

ポスピウイルス属8種のRT-PCR法を用いた検出法の開発

柳澤 広宣・志岐 悠介

横浜植物防疫所

Development of RT-PCR Assay Method for Detection of eight Pospiviroids. Hironobu Yanagisawa and Yusuke Shiki. (Yokohama Plant Protection Station, 5-57, Kitanakadori Naka-ku, Yokohama, 231-0003 Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. **51**: 1-6 (2015).

Abstract: The genus Pospiviroid including *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) consists of some important plant pathogens of *Solanaceae* plants. We developed the 2 step method that eight pospiviroids were comprehensively screened and then the species of pospiviroid was identifiable by conventional PCR. As the 1st step, the screening method which used 2 sets of specific primers and one universal primer was able to detect eight pospiviroids efficiently. Furthermore, when the sample tested positive to the universal primer sets at the 1st step, at the 2nd step it was possible to identify each species of six pospiviroids by the specific primer set. In addition, the methods developed could consistently detect PSTVd and *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) which were known to transmit through seed, even from a 400 tomato seed sample including one PSTVd or TASVd infected tomato seed.

Key Words: RT-PCR, Pospiviroid, Detection, Tomato, Seed

緒 言

Potato spindle tuber viroid (PSTVd)をタイプ種とするポスピウイルス属には、ナス科の重要な農作物に甚大な被害を引き起こす種が多く含まれ(Singh *et al.*, 2004)、PSTVd及び*Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd)では近年ペチュニア(*Petunia × hybrida*)やダリア(*Dahlia* sp.)等の観賞用植物で無病徴感染することが報告されている(Malandraki *et al.*, 2010; Shiraishi *et al.*, 2013; Tsushima *et al.*, 2011; Verhoeven *et al.*, 2007)。

ポスピウイルス属には機械伝搬の他、種子伝搬するものも知られており、PSTVdはトマト(*Solanum lycopersicum*)及びバレイショ(*Solanum tuberosum*)で(Diener *et al.*, 1979; Hadidi *et al.*, 2003; Loebenstein *et al.*, 2001)、TCDVd 及び*Tomato apical stunt viroid* (TASVd)はトマトで(Antignus *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009)、*Pepper chat fruit viroid* (PCFVd)はトウガラシ(*Capsicum annuum*)で種子伝搬することが報告されている(Verhoeven *et al.*, 2009)。これらのウイルスが無病徴感染した植物や感染種子は重大な侵入経路

となり得るため、検出技法の開発が喫緊の課題となっている。

これまでウイルスの検出法として、RT-PCR (Behjatnia *et al.*, 1996; Bostan *et al.*, 2004; Matsushita *et al.*, 2010; Nakahara *et al.*, 1998; Verhoeven *et al.*, 2004)、Real-time RT-PCR (Boonham *et al.*, 2004; Botermans *et al.*, 2013)及びRT-LAMP (Tsutsumi *et al.*, 2010)等による検出法が複数報告されている。しかし、これらの検出法で検出できるのは、一部のウイルスに限定されたものであること、ウイルス検出後、種の識別にシーケンス解析が必要であり、さらに時間を要する。このため、より簡便かつ確実にポスピウイルス属の検出を可能とし、さらにポスピウイルス属の種を正確に識別することができる簡易的且つ汎用性の高い手法が求められている。

そこで、ウイルスやウイルスを含む植物病原体の検出法として、最も広く普及している手法であるRT-PCRを用いて、少数の検出系によるスクリーニング検定を実施し、その後種特異的プライマーで正確な識別を可能とする手法を開発した。また、種子伝搬の報告のあるPSTVd及びTASVdを対象としてトマト種子からの検出及び識別が可能か検討した。

材料及び方法

1. 供試ウイルス及び供試植物

供試ウイルスとして、PSTVd 4 株、TCDVd 1 株、*Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) 1 株、*Citrus exocortis viroid* (CEVd) 1 株の他、日本国内で発生報告の無い *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) 1 株、TASVd 1 株、*Columnea latent viroid* (CLVd) 1 株、PCFVd 1 株について農林水産大臣の許可を取得し使用した(Table 1)。各々ウイルスに単独感染したトマト葉を0.1Mリン酸緩衝(pH7.0)で磨砕し、粗汁液をトマト(品種: Rutgers)の子葉に接種し、25-30℃に調整した温室内で管理を行い、感染植物を作製した。接種植物は、接種3週間後にポスピウイルス属のユニバーサルプライマー Pospil-FW/RE、CLVdを検出するプライマー Vid-FW/RE (Verhoeven *et al.*, 2004)、並びに PCFVd を検出するプライマー AP-FW1/RE2 (Verhoeven *et al.*, 2009)を用いてRT-PCRを行い、感染を確認した。また、PSTVd及びTASVdについては、感染を確認したトマトに着果した果実から感染種子を採取し、種子表面を滅菌水で洗浄、室温にて風乾後、4℃で保管した。

Table 1. List of pospiviroids, DDBJ accession numbers and the origin in this study

Viroid	DDBJ ^a accession No.	Origin
PSTVd-M	-	Canada (from R. P. Singh)
PSTVd-S	-	Canada (from R. P. Singh)
PSTVd-F	EU862231	Fukushima Prefecture in Japan
PSTVd-D	AB623143	Yamanashi Prefecture in Japan
TCDVd	AB329668	Hiroshima Prefecture in Japan
CEVd	AB054593	in Japan
CSVd	-	in Japan
PCFVd	HQ731652	Thailand (from Reanwarakorn)
CLVd	AY372392	Netherlands (from Verhoeven J.T.J.)
TPMVd	GQ131573	Netherlands (from Verhoeven J.T.J.)
TASVd	AM777161	Netherlands (from Verhoeven J.T.J.)

a: DNA data bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)

2. スクリーニング検定用プライマー及び植物内在性コントロール用プライマーの選定及び条件設定

既報のポスピウイルス属のユニバーサルプライマーとして、Pospiviroid-For/Rev及びPospil-FW/REがあるが、新たに Pospil-F2(5' - TCCTGTGGTTCACACCTGACC -3')/R2(5' - TTCAGTTGTTTCCACCGGGTAG -3') プライマー (増幅サイズ: PSTVdの場合、261bp)を設計し、計3組のプライマーについて、上記8種のウイルスが、検出可能か試験を行った。また、植物組織から核酸が抽出されたことを確認するための植物内在性コントロールプライマーを、植物体の核酸配列のうち、NADH dehydrogenase subunit IIをコードする領域に対応するmRNA上に設計した(nad2 RT2-F(5' - CGCTGTAGGATCCCTATTCAAGA-3') 及び R(5' - TGGGTGAACCCTCATAGATATCAG-3')) (増幅サイズ: 80bp)。各ウイルス感染トマト葉からの核酸抽出は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)を用い、付属マニュアルに従い行った。RT-PCRは、省力化を図るためOneStep RT-PCR Kit (QIAGEN社)を用い、付属マニュアルに従い反応液の調製を行った。RT-PCRにはVerti サーマルサクラー (Applied Biosystems)を用い、反応条件は、50℃ 30分、95℃ 10分の後、95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 1分、40サイクル行い、72℃ 7分後、4℃で維持した。増幅産物は、2% アガロースゲル及び1×TAEを用いて電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。

3. 種特異的プライマーの設計及び条件設定並びに検出感度比較

供試した各ウイルスの種特異的プライマーを新たに設計し (Table 2)、OneStep RT-PCR Kitを用い反応液の調製を行った。RT-PCRの反応条件は、50℃ 30分、95℃ 10分の後、95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 45秒、40サイクル行い、72℃ 7分後、4℃で維持した。また、スクリーニング検定用プライマーと各ウイルスの種特異的プライマーの検出感度を比較した。検出感度

Table 2. Newly designed specific primer which detects each of eight pospiviroids in this study

The species	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)
PSTVd	PSTVd-spe-5F	CGTGGTTCCTGTGGTTCACACC	207
	PSTVd-spe-5R	TGCGGGCGCGAGGAA	
TCDVd	TCDVd-spe-NP3	CAGGGAGCTTGTGGAAGGC	161
	TCDVd-spe-NP4	TCTCGGGAGCTTCAGTTG TT	
CEVd	Pospiviroid-For	ATTAATCCCCGGGGAAACCTGGAG	139
	CEVd-spe-R	GCGACGATCGGATGTGGAG	
CLVd	CLVd-spe-F2	GAGAGCGCAAGAGCGGTCT	186
	CLVd-spe-R	GTCAGMACCTGCGCTGG	
TASVd	TASVd-spe-F1	TGACCCTGCAGGCATCAAGA	245
	Pospiviroid-Rev	AGCTTCAGTTGTTTCCACCGGGT	
PCFVd	PCFVd-spe-F2	CGGCCGGGAGTGAAGCTAC	302
	Pospiviroid-Rev	AGCTTCAGTTGTTTCCACCGGGT	
CSVd	CSVd-spe-F1	CGGCTGGGGCTTAGGACC	158
	Pospiviroid-Rev	AGCTTCAGTTGTTTCCACCGGGT	
TPMVd	TPMVd-spe-F	GGAGCGAACTGGCGAAGGAG	125
	TPMVd-spe-R	CGGGCGAGGGTGTGCGAC	

Forward or reverse primer of Pospiviroid-For/Rev (Bostan *et al.*, 2004) was used in the specific primer of CEVd, TASVd, PCFVd and CSVd.

の比較には、各ウイルスの感染トマト葉からの核酸抽出液を健全トマト葉の核酸抽出液により希釈し、 10^{-1} から 10^{-7} の希釈系列を作製し、各ウイルスの検出可否を確認した。

4. 非感染性人工PSTVdポジティブコントロール

ウイルスは保存性が高く、容易に接触伝染するため、植物に病原性を持たず、さらにコンタミネーションが生じた場合にも、増幅断片のサイズから、ポジティブコントロール由来の増幅断片が識別可能なポジティブコントロールの利用が望ましい。Hataya *et al.*, (2009)により報告された植物への感染性が無く、本来のPSTVdと識別するためのウイルス由来でない36ntの断片を組み込んだ人工PSTVdポジティブコントロールが、PSTVd特異的プライマーに使用可能か試験を行った。

5. トマト種子からのウイルス検出

トマトにおいて種子伝搬の報告のあるPSTVd及びTASVdの2種について、トマト種子(品種：桃太郎)399粒に1粒のPSTVd又はTASVd感染トマト種子を混入したサンプルを作製し、3種のユニバーサルプライマー、新たに設計したPSTVd及びTASVdの種特異的プライマーを用いて、柳澤ら(2012)の方法により核酸抽出を行い、RT-PCRを行った。

結 果

1. 各ウイルス感染トマトの作出

各ウイルスを接種したトマト苗は接種後約2週間で、上位葉に病徴が現れ、接種3週間後、RT-PCRにより感染確認を行った結果、8種のウイルスがそれぞれ感染していることを確認した。これらのウイルス感染トマト苗から葉を採取し核酸抽出を行い以降の試験に用いた。

2. スクリーニング用及び植物内在性コントロール用プライマーの有効性

3種のユニバーサルプライマーの検出範囲を確認した結果、3種とも、PSTVd、TCDVd、TASVd、TPMVd、CSVd及びCEVdは検出されたが、CLVd及びPCFVdは検出されなかった(Fig. 1-a, b, c)。このため、スクリーニング検定には、CLVd及びPCFVdを検出するプライマーを追加する必要があることが確認された。また、植物内在性コントロール用プライマーは、トマト葉及び種子においても、予定長の増幅断片が得られた(Fig. 2)。

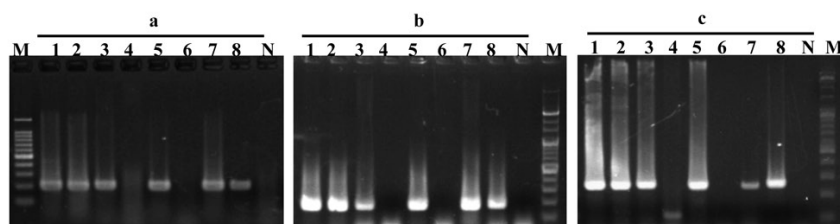


Fig. 1. The detection range of three kinds of pospiviroid universal primer sets to eight pospiviroids

a: Pospiviroid-For/Rev (Fragment size: 196-228bp), b: Pospil-FW/RE (Fragment size: 196-227bp), c: Pospil-F2/R2 (Fragment size: 258-299bp)

1: PSTVd-M, 2: TASVd, 3: TCDVd, 4: PCFVd, 5: CSVd, 6: CLVd, 7: TPMVd, 8: CEVd, N: healthy tomato leaf, M: 100bp ladder marker

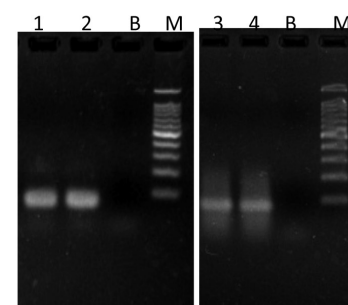


Fig. 2. Detection in tomato live plant and seed using the internal control primer

1, 2: tomato leaf; 3, 4: tomato seed; B: D.W.; M: 100bp ladder marker

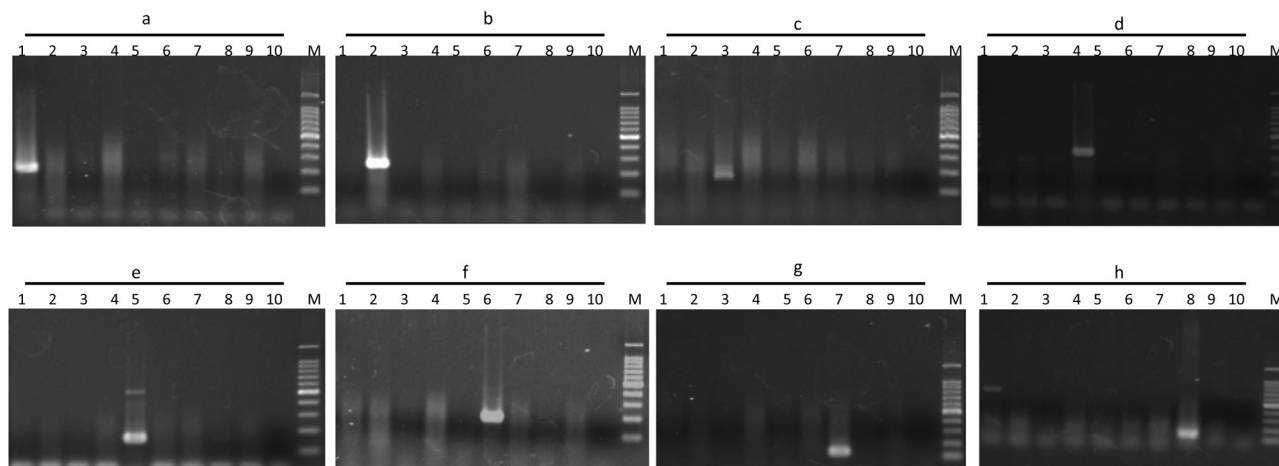


Fig. 3. The specificity of newly designed specific primer to eight pospiviroids

a: PSTVd specific primer, b: TASVd specific primer, c: TCDVd specific primer, d: PCFVd specific primer, e: CSVd specific primer, f: CLVd specific primer, g: TPMVd specific primer, h: CEVd specific primer

1: PSTVd-M (207 bp), 2: TASVd (245 bp), 3: TCDVd (161 bp), 4: PCFVd (302 bp), 5: CSVd (158 bp), 6: CLVd (186 bp), 7: TPMVd (125 bp), 8: CEVd (139 bp), 9: healthy tomato leaf, 10: D.W., M: 100bp ladder marker

3. 確認検定用種特異的プライマーの特異性及び検出感度

新たに設計した種特異的プライマーの特異性を確認した結果、それぞれ標的ウイルスのみにおいて、予定長の増幅断片が得られた。しかし、PSTVd、TCDVd及びTPMVdの種特異的プライマーでは、ウイルス由来の増幅断片の他、非特異的増幅断片が認められた。そのため、非特異的増幅を軽減する効果のあるQ solution (OneStep RT-PCR Kit 付属) を添加しRT-PCRを行った結果、ウイルス由来の増幅断片のみが確認された(Fig. 3)。また、ユニバーサルプライマーと各ウイルスの種特異的プライマー間の検出感度は、ほぼ同等であった(データ不掲載)。

4. 非感染性人工PSTVdポジティブコントロールの有効性

新たに設計したPSTVd種特異的プライマーにより、非感染性人工PSTVdポジティブコントロールをRT-PCRした結果、PSTVd由来の増幅断片よりも大きい予定長の増幅断片が得られ、非感染性人工PSTVdポジティブコントロール由来の増幅産物であることが確認された(Fig. 4)。

5. トマト種子からのウイルス検出

PSTVd又はTASVd感染トマト種子1粒を含むトマト種子400粒から、3種のユニバーサルプライマーによりRT-PCRを行った結果、それぞれ予定長の増幅断片が得られた。また、PSTVd又はTASVdの種特異的プライマーにより、それぞれ予定長の増幅断片が得られた。

6. 8種ポスピウイルス検定の流れの構築

以上の結果より、スクリーニング検定及び確認検定までの検定の流れを構築した(Fig. 5)。すなわち、スクリーニング検定において、植物内在性プライマーにより、核酸抽出が正確に行われたか確認し、その後①3種のユニバーサルプライマーのいずれか、②CLVd特異的プライマー、③PCFVd特異的

プライマーを用い、ウイルスの検定を行う。その結果、ユニバーサルプライマーにおいて陽性の結果が得られた場合には、確認検定において、6種のウイルスの種特異的プライマーにより種の識別を行う。また、CLVd及びPCFVdでは、スクリーニング検定の結果を反映する。なお、確認検定におけるPSTVdの種特異的プライマーでは、Hataya *et al.*, (2009)の非感染性人工PSTVdポジティブコントロールを用いる。

考 察

Bostan *et al.*, (2004)及びVerhoeven *et al.*, (2004)が設計したユニバーサルプライマー、並びに新たに設計したポスピウイルス属のユニバーサルプライマーは、CLVd及びPCFVdの2種以外の6種について検出することが可能であった。今般、既報の2種のユニバーサルプライマーとは異なる領域に新たなユニバーサルプライマーを設計したが、同様にCLVd及びPCFVdを検出することはできなかった。この原因は、CLVd及びPCFVdが他のポスピウイルス属に比べ、塩基配列の共通領域が少なく、また変異部位も多いことからであろう。ポスピウイルス属を一組のプライマーで検出することは困難であることから、より変異部位の少ない安定した領域に設計したプライマーを用い、確実に検出することが重要であると考えられる。3種のユニバーサルプライマー間では検出感度等の性能上の差が確認されなかったことから、いずれかのユニバーサルプライマーを採用し、ユニバーサルプライマーで検出されないCLVd及びPCFVdの種特異的プライマーを同時に使用することにより、ポスピウイルス属8種の検出が可能であることを確認した。また、新たに開発した植物内在性コントロール用プライマーは、トマト葉及び種子においても有効であった。そのため、検定現場において、最も多く用いると想定されるスクリーニング検定には、植物内在性コントロールを設けることにより、ポジティブコントロールを使用しなくても検定の妥当性を担保できると考える。

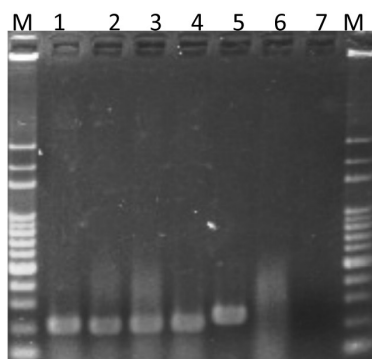


Fig. 4. Detection of a non-infectious positive control RNA of PSTVd by PSTVd specific primer
1: PSTVd-F, 2: PSTVd-M, 3: PSTVd-S, 4: PSTVd-D, 5: a non-infectious positive control RNA of PSTVd, 6: healthy tomato leaf, 7: D.W., M: 100bp ladder marker

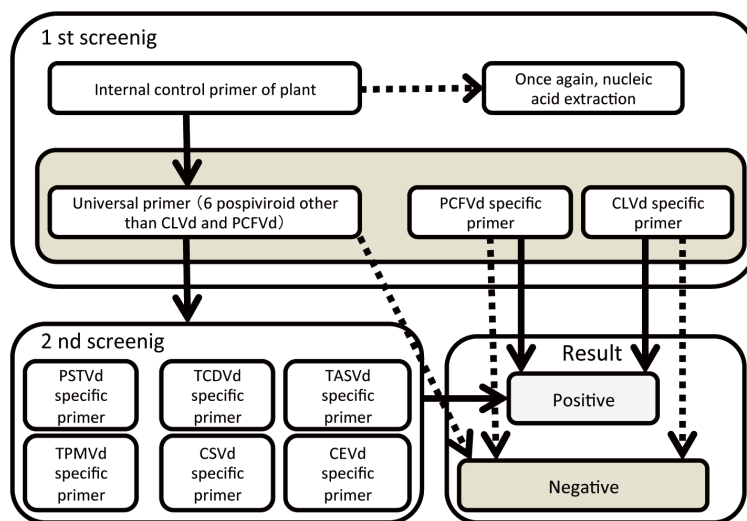


Fig. 5. The flow chart of the method for detection of eight pospiroid
Solid line : Positive, Dotted line: Negative

新たに開発した各ウイルスの種特異的プライマーは、正確に種の識別が可能であることが確認され、スクリーニング検定後にウイルスの種の識別を行う際に用いることとした。種を識別する確認検定では、より正確な判断が求められるため、ポジティブコントロールの使用が必要と考えるが、病原体由来のポジティブコントロールを用いた際にコンタミネーションが生じた場合、実在する病原体と同一の塩基配列を有するため、実際に陽性であったかを区別することは困難である。しかしながら、新たに設計したPSTVd種特異的プライマーでは、Hataya *et al.*, (2009)の非感染性PSTVdポジティブコントロールの使用が可能であることからコンタミネーションの有無を区別することが可能であった。しかし、その他のウイルスには、こうした人工ポジティブコントロールがないため、他の種特異的プライマーにおいても、同様の非感染性人工ポジティブコントロールを今後開発する必要があるものと考ええる。

本報はトマト葉又はトマト種子に感染しうる、ポスピウイルス属の8種に対する包括的検定法の初記載であり、ポスピウイルス属の宿主となる他の植物についても有効と考える。また、本検定システム又はその一部をReal-time RT-PCRの検出系に移行することで、これまで以上の検査の簡便化及び検査時間の短縮化等も可能であると考ええる。

摘 要

*Potato spindle tuber viroid*を含むポスピウイルス属は、ナス科の農作物に甚大な被害を与える重要な病原を多く含む。本研究において、通常のPCRを用いた、より簡便かつ正確にポスピウイルスを検出し、さらに種の識別までを一連の流れとした検定法を開発した。検定法は、スクリーニング検定と確認検定の2段階からなり、スクリーニング検定では、CLVd及びPCFVd以外の6種ウイルスを検出可能なユニバーサルプライマーと、CLVd及びPCFVd種特異的プライマーの3種のプライマーを用い、ポスピウイルス8種が検出可能であることを確認した。さらに、核酸抽出が確実に行われたことを証明するため、植物内性コントロールを併用し、スクリーニング検定の有効性を担保した。確認検定では、ユニバーサルプライマーにより検出されるPSTVd、TCDVd、TASVd、CSVd、CEVd、TPMVdの6種について、それぞれ種特異的プライマーを用い、ウイルスの種の識別が可能であることを確認した。さらに、本検定法が、トマト種子400粒中PSTVd又はTASVd感染1種子を含んだトマト種子からでも、ウイルスの検出及び種の識別が可能であることを確認した。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ウイルス感染植物の分譲を受けたVerhoeven, J. T. J.氏(Naktuinbouw, The Netherlands)及びReanwarakorn, K.氏(Kasetat University, Thailand)、並びに非感染性PSTVd人工ポジティブコントロールの分譲を受けた畑谷達二氏(北海道大学)に感謝の意を表したい。

引 用 文 献

- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M. (2007) The spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Dis.* **91**: 47-50.
- Behjatnia, S. A. A., I. B. Dry, L. R. Krake, B. D. Conde, M. I. Connelly, J. W. Randles, and M. A. Rezaian, (1996) New Potato Spindle Tuber Viroid and Tomato Leaf Curl Geminivirus Strains from a Wild *Solanum* sp. *Phytopathology* **86**: 88.
- Boonham, N., L. González Pérez, M. S. Mendez, E. L., Peralta, A. Blockley, K. Walsh, I. Barker, R. A. Mumford (2004) Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, **116**(2): 139-146.
- Bostan, H., X. Nie, R. P. Singh (2004) An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids. *Journal of Virological Methods*. **116**(2): 189-193.
- Botermans, M., B. Vossenbergh, J. Th. J. Verhoeven, J. W. Roenhorst, M. Hooftman, R. Dekter, E. T. M. Meekes, (2013) Development and validation of real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*. **187**: 43-50.
- Diener, T. O. (1979) *Viroids and Viroid Diseases*. John Wiley & Sons. 12pp.
- Hataya, T. (2009) Duplex reverse transcription-polymerase chain reaction system to detect Potato spindle tuber viroid using an internal control mRNA and a non-infectious positive control RNA. *J. Gen Plant Pathol.* **75**: 167-172.
- Hadidi, A., R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik eds. (2003) *Viroids*. CSIRO, Collingwood Australia: 37pp.
- Loebenstein, G., P. H. Berger, A. A., Brunt and R. H. Lawson (2001) *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Protection of Seed-Potatoes*. Kluwer Academic, Dordrecht The Netherlands: 138pp.
- Makandraki, I., Papachristopoulou and N. Vassilakos (2010) First report of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in ornamental plants in Greece. *New Disease Reports*. **21**: 9.
- Matsushita, Y., T. Usugi, S. Tsuda (2010) Development of a multiplex RT-PCR detection and identification

- system for Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* **128**(2): 165-170.
- Nakahara, K., T. Hataya, Y. Hayashi, T. Sugimoto, I. Kimura and E. Shikata (1998) A mixture of synthetic oligonucleotide probes labeled with biotin for the sensitive detection of potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*. **71**: 219-227.
- Shiraishi, T., K. Maejima, K. Komatsu, M. Hashimoto, Y. Okano, Y. Kitazawa, Y. Yamaji, S. Namba (2013) First report of tomato chlorotic dwarf viroid from symptomless petunia plants (*Petunia* spp.) in Japan. *Journal of general plant pathology*. **79**(3): 214.
- Singh, R. P., A. D. Dilworth (2009) *Tomato chlorotic dwarf viroid* in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**: 111-116.
- Singh, R. P., K. F. M. Ready and X. Nie (2004) *Viroids* [Hadidi, A. *et al.*] CSIRO Publishing, Collingwood, Australia: 30-48.
- Tsushima, T., S. Murakami, H. Ito, Y.-H. He, Raj, A. P. C. and T. Sano (2011) Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *Journal of general plant pathology*. **77**: 253-256.
- Tsutsumi, N., H. Yanagisawa, Y. Fujiwara, T. Ohara (2010) Detection of *Potato Spindle Tuber Viroid* by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. *Res. Bull. Pl. Prot.* **46**: 61-67.
- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen, J. W. Roenhorst. (2007) *Streptosolen jamesonii* 'Yellow', a new host plant of *Potato spindle tuber viroid*. *New Disease Reports* **15**: 40.
- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen, J. W. Roenhorst, R. Flores, M. de la Peña (2009) Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*. **144**: 209-214.
- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen, T. M. Willemsen, L. F. F. Kox, R. A. Owens, J. W. Roenhorst (2004) Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*. **110**: 823-831.
- 柳澤広宣・堤直也・石井一考・志岐悠介・栗原金光(2012) RT-LAMP法を用いたPotato spindle tuber viroid検出法の改良. 植防研報 **48**: 7-12.