

アブラナ科ウイルスの時間尺度と拡散経路に関する研究
(Study on the timescales and migration routes of the viruses infecting
Brassicaceae plants)

八坂 亮祐

2017

目次

I. 要約	1
II. 要約 (英文)	3
III. 緒言	5
IV. 研究史	8
1. ウイルスの時間尺度および拡散	8
A. 動物ウイルス	8
B. 植物ウイルス	11
2. カリフラワーモザイクウイルス	13
A. 生物学的性質	13
B. 粒子およびゲノム構造	13
C. 分子進化	17
3. カブモザイクウイルス	18
A. 生物学的性質	18
B. 粒子およびゲノム構造	18
C. 分子進化	22
V. 材料および実験方法	25
1. 供試ウイルス	25
A. カリフラワーモザイクウイルス	25
B. カブモザイクウイルス	25
2. 供試植物	25
3. 宿主反応調査	34
4. ウイルスゲノム構造	36

A.	カリフラワーモザイクウイルス	36
a.	合成プライマーの設計	36
b.	ウイルス核酸抽出	36
c.	ポリメラーゼ連鎖反応産物による塩基配列の決定	36
d.	クローニング産物による塩基配列の決定	38
B.	カブモザイクウイルス	44
a.	合成プライマーの設計	44
b.	ウイルス核酸抽出	44
c.	逆転写—ポリメラーゼ連鎖反応産物による塩基配列の決定	44
5.	分子進化的解析	48
A.	組換え部位の解析	48
B.	分子系統解析	49
C.	中立平衡解析	50
D.	遺伝的分化および遺伝子流動解析	50
E.	集団遺伝学的解析	51
6.	進化速度, 時間尺度推定	51
7.	拡散経路推定	52
8.	組換え時期の推定	52
VI.	結果	52
1.	カリフラワーモザイクウイルス	52
A.	宿主反応	52
B.	分子性状	53
C.	分子進化的解析	57
a.	パトリステイック距離解析	57
b.	組換え部位の解析	57
c.	分子系統解析	57
d.	集団遺伝学的解析	61

D. 進化速度および時間尺度推定	66
E. 拡散経路推定	69
2. カブモザイクウイルス	77
A. 宿主反応	77
B. 分子性状	77
C. 分子進化的解析	80
a. 組換え部位の解析	80
b. 分子系統解析	83
c. 集団遺伝学的解析	86
D. 進化速度および時間尺度推定	88
E. 拡散経路推定	88
F. 組換え時期の推定	94
VII. 考察	99
1. カリフラワーモザイクウイルス	99
2. カブモザイクウイルス	101
VIII. 総合考察	105
IX. 引用文献	109
X. 謝辞	137

I. 要約

動物ウイルスのインフルエンザウイルスやエイズウイルスなどでは、将来のワクチン生産に不可欠であるため、時間尺度や拡散経路に関する研究が精力的に研究されている。一方植物ウイルスではウイルス病防除そして抵抗性植物の育成にこのような研究が必要であるが、1本鎖DNAのジェミニウイルス科のウイルス種などに研究が限られている。そこで本研究では、未だ研究の進展していないアブラナ科植物に感染する約8kbの2本鎖DNAを持つカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) と約9.8kbの1本鎖RNAを持つカブモザイクモザイクウイルス (TuMV) を取り上げ、両ウイルスの時間尺度と拡散経路について解析した。

CaMV については、ギリシャ、イラン、トルコおよび日本から67分離株を採集し全ゲノム構造を決定後、国際塩基配列データベースに登録されている9分離株の塩基配列と合わせた76分離株を用いて分子進化的に解析した。多くのCaMV ゲノムに組換え部位が認められたため、組換え体を除きCaMV 集団の進化速度、時間尺度および系統地理学的なパターンを推定した。オープンリーディングフレーム (ORFs) I-V と ORF VI 領域の分子進化的な比較から、両領域は異なる進化的な歴史を持っていたことが明らかになり、分子系統解析から本ウイルス集団は地理的隔離により分化した4グループが存在することが認められた。ORFs I-V および ORF VI 領域の塩基置換速度はそれぞれ1.71および 5.81×10^{-4} 塩基/部位/年と算出された。この値を基にCaMV 集団の時間尺度を推定すると、共通祖先と考えられる集団から約400-500年前に分岐し、現在のユーラシア大陸諸国に広く広がっていると考えられた。また系統地理学的解析から、トルコとその近隣諸国、また日本およびアメリカ間においても遺伝子流動が起きていることが明らかになった。

TuMV については、オーストラリアおよびニュージーランドから32分離株を採集し全ゲノム構造を決定後、国際塩基配列データベースに登録されている197分離株の塩基配列と合わせた229分離株について解析した。多くのTuMV ゲノ

ム中に組換え部位が認められたため、組換え部位の少ない3遺伝子 [ヘルパー成分プロテアーゼタンパク質 (helper-component protease; HC-Pro)*, 第3タンパク質 (third protein; P3)* および核内封入体bタンパク質 (NIb)*] の一部領域を用いて分子進化的解析を行った。両国分離株の組換え解析から、本研究では新たに11組換え体型が認められ、そのうち1組換え体型は両国間で共通していたが、両国の遺伝集団は異なっており、またヨーロッパやアジア諸国の集団とも異なっていた。ベイズ合祖理論に基づいて解析した結果、HC-Pro*, P3* および NIb* 遺伝子領域の塩基置換速度はそれぞれ、1.47, 1.35, 1.30×10^{-4} 塩基/部位/年と算出され、約80年前にヨーロッパから両国に侵入し、basal-B2分子系統サブグループはworld-B2やworld-B3サブグループよりも以前に両国へと侵入してきたと思われた。

以上の結果から、本研究は、アブラナ科植物に感染するCaMVとTuMVの時間尺度と拡散経路を初めて明らかにし、両ウイルスゲノムは似た進化速度を持つこと、またそれぞれのウイルスは農業の発展の歴史や人類の移動に関係して進化してきたことを明らかにした。

II. 要約 (英語)

The timescales and migration routes of animal viruses including *Influenza virus* and *Human immunodeficiency virus* have frequently been studied for the vaccine production. In contrast, although these studies are necessary for viral disease control and virus-resistant plant production, only a few studies were reported for single-stranded (ss) DNA plant virus species in the family *Geminiviridae*. In this study, the timescales and migration routes of two viruses infecting Brassicaceae plants were assessed; *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) which contains a circular double-stranded DNA molecule of 8kb and *Turnip mosaic virus* (TuMV) which contains ss RNA molecule of 9.8kb.

To assess the timescale and migration routes of CaMV, sixty-seven isolates of CaMV were collected in Greece, Iran, Turkey and Japan. The genomes were sequenced and nine sequences from the international nucleotide sequence databases were also used in the subsequent analyses. Recombination was a common feature of CaMV evolution, and the open-reading frames (ORFs) I-V had a different evolutionary history from ORF VI. The two ORFs evolved at rates between 1.71 and 5.81×10^{-4} substitutions/site/year, similar to those of viruses with RNA or ss DNA genomes. The phylogenetic analyses showed four geographically confined lineages. CaMV probably spread from a single population to other parts of the world around 400-500 years ago, and is now widely distributed among Eurasian countries. The results revealed that the evidence of frequent gene flow between populations in Turkey and its neighboring countries, and also revealed that gene flow between Japan and USA.

To assess the timescale and migration routes of TuMV, thirty-two isolates of TuMV were collected in Australia and in New Zealand. The genomic sequences together with 197 isolates from the international nucleotide sequence databases were analysed. Eleven recombination type patterns were found in the genomes of the Australian and New Zealand isolates, and all were novel. Only one recombination type

pattern was found in both countries. Australian and New Zealand populations were genetically different, and were different from the European and Asian populations. The three non-recombinogenic (HC-Pro*, P3* and NIB*) regions were used for Bayesian coalescent analyses. The substitution rates of HC-Pro*, P3* and NIB* regions were 1.47, 1.35, 1.30×10^{-4} substitution/site/year respectively, and TuMV probably started to migrate from Europe to Australia and New Zealand more than 80 years ago. The basal-B2 subpopulations of the two countries seen in phylogenetic trees seemed to be older than those of the world-B2 and B3 populations.

This study reports the first assessment of the timescales and migration routes of CaMV and TuMV. Both virus genomes had similar evolutionary rates and the timescales of two viruses correlated well with the history of agriculture development and human migration to both countries.

III. 緒言

生物の進化過程でその時間尺度（共通祖先と分岐した年代）をゲノム情報から推定する分子時計という概念が注目を浴びている。最近，時間尺度の解析に加え，拡散経路も解析が可能なコンピュータソフトウェアが開発されている。今日までに様々な動植物種および微生物種で時間尺度の解析が行われ，生物の進化の道筋が明らかになってきた (Drummond et al., 2012; Duchêne et al., 2014; Ho & Duchêne, 2014)。その中でもとりわけヒトに関しては，Darwin (1871) が人類は共通の祖先を持つと記したように科学研究の黎明期，あるいはそれ以前からそのルーツに関して多くの議論が交わされてきた。現在では，現世人類の誕生や出アフリカなどのヒトの進化の重要な歴史が紐解かれている (Eriksson & Manica, 2012; Malaspinas et al., 2016; Timmermann & Friedrich, 2016)。

ウイルスの時間尺度に関する研究も進展している。その理由として，ウイルスは他生物と比較して，進化速度が極めて速く，1世代当たりの複製サイクルが短いため，変異が集積しやすく，またゲノム長が短いためにゲノム解析が行いやすいことが挙げられる。動物ウイルスでは研究者間での連携が図られ，またウイルス株を得やすいことから塩基配列やその他のゲノム情報が集めやすく，これら情報を基盤とした分子疫学的な研究が推進されている。動物ウイルスの中でも人類に甚大な被害をもたらしているヒト免疫不全ウイルス (*Human immunodeficiency virus*; HIV)，デングウイルス (*Dengue virus*; DENV) あるいはインフルエンザウイルス (*Influenza virus*) を中心に研究がなされており，これらウイルスの時間尺度や拡散経路が明らかにされた (Korber et al., 2000; Lemey et al., 2003; Twiddy et al., 2003; Bahl et al., 2013; Sun & Meng, 2013)。これらの結果から，ヒトを中心とした宿主の移動がウイルスの発生生態に大きく関与することが明らかになっている。最近では，インフルエンザウイルスを中心として，その膨大なゲノム情報や病原性比較のビッグデータから過去の流行や進化の軌跡を探るだけでなく，未来の進化のシミュレーションそしてより正確な発生予察に関する研究も試みられてきている (Chao et al., 2010; Ahn et al., 2014; Guo et al.,

2015)。

農作物にもウイルスが感染し、食料生産において大きな被害を与えている。これらウイルス病の被害拡大を防ぐためには、ウイルスの進化や生態の基礎的な研究が不可欠である。植物ウイルスとしては、*Rice yellow mottle virus (RYMV)*, トマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus; TYLCV*), *Maize streak virus (MSV)* そしてカブモザイクウイルス (*Turnip mosaic virus; TuMV*) などで地球規模あるいは地域規模での時間尺度や拡散に関する研究が進められている (Ohshima et al., 2002; Tomimura et al. 2003, 2004; Tan et al., 2004; Tomitaka & Ohshima 2006; Lefeuvre et al., 2010; Monjane et al., 2011; Kraberger et al., 2013; Nguyen et al., 2013ab)。これら研究から植物ウイルスの地理的分布、拡散時期や集団遺伝構造が解明され、新規集団の出現や新たな病原性の獲得、ウイルスの移動についての知見が得られ、植物防疫やウイルスの防除に大きく貢献することが期待されている。植物ウイルスの集団遺伝構造を研究することは、ウイルスと宿主の相互作用やウイルスの系統地理学的拡散を理解する上で重要である (García-Arenal et al., 2001; Gibbs et al., 2008a; Gibbs & Ohshima, 2010)。今日では世界的な生鮮野菜類の輸出入が爆発的に増加しており、植物ウイルスを含む病原体の侵入問題が深刻化・表面化してきている (Cameron et al., 2016; Fuehrer et al., 2016; Thompson et al., 2016)。今後もこの傾向は続くと見られ、病原体の侵入の機会益々増加し、近隣地域からの保毒媒介昆虫の飛来だけでなく、地理的な距離に関係なく遠くの地域から輸入される汚染種苗などによる病原体侵入の機会が増加することが予想される。そのためより地球規模での包括的な病原体の危機管理体制が求められるようになり、いつ拡散したのかという時間尺度の関係性も含めその基礎的な知見を積み上げる必要がある。

そこで本研究ではアブラナ科植物に感染するゲノム構造の異なる 2 種のウイルス、2 本鎖 DNA をゲノムに持つカリフラワーモザイクウイルス (*Cauliflower mosaic virus; CaMV*) および 1 本鎖 RNA をゲノムに持つ TuMV の 2 種ウイルスについて、それら集団の時間尺度を推定し、どのように世界的に拡散したかを探ることを目的とした。両ウイルスのゲノム情報を基に集団の進化速度を推定

後、集団の時間尺度推定および拡散経路解析を行い、ウイルス集団が「いつ」「どこからどこへ」拡散したのかを調査した。CaMV については、日本、イラン、ギリシャおよびトルコから CaMV 様症状を呈するアブラナ科植物を採集し、それら分離株の全ゲノム構造を網羅的に決定後、時間尺度解析を行い、CaMV がどのような集団がどのように世界各地に拡散したのかを考察した。TuMV については、オセアニア地方に位置するオーストラリアおよびニュージーランドから TuMV 様症状を呈するアブラナ科植物を採集し、全ゲノム構造を決定後、いつ、どのような経路で島国であるこれらの国々に TuMV が侵入したのか、時間尺度を解析した。さらにこれら結果と合わせて各分離株の遺伝学的性質や生物学的性質を考慮し、世界的規模での拡散経路について考察した。

IV. 研究史

1. ウイルスの時間尺度および拡散

A. 動物ウイルス

動物 RNA ウイルスは複製中にエラーを校正する機構を持っておらず、高い割合で変異体を作ることが知られており、高い遺伝的多様性を持つ (Vignuzzi et al., 2006)。その遺伝的多様性は宿主の免疫より逃れたり、薬剤抵抗性を獲得することに寄与し、ウイルスの生存戦略に大きく関与する。ウイルスは常にその宿主はもちろん、同種・他種ウイルスとの軍拡競争に曝されており、新たな病原性を獲得あるいは生存に適した宿主が分布している地域に拡散して種を絶やさないうようにする必要がある (Vignuzzi et al., 2006)。これまで分子進化的研究がこれらウイルスの病原性獲得や各系統間の関係性、地理的拡散に関わる進化の道筋を解明してきた (Faria et al., 2014; Gire et al., 2014; Monne et al., 2014)。

分子進化的研究が進んでいるウイルスとして HIV がある。HIV は 1983 年に初めて発見され、世界的流行を引き起こし、年間 110 万人以上の人命を奪っている (Say et al., 2014)。HIV はレトロウイルス科レトロウイルス亜属に分類され、そのゲノムは約 $7.0-8.0 \times 10^5$ (置換/部位/年) の高い突然変異率を持ち、ヒトゲノム上に組込まれてプロウイルスの形態をとる。また感染してからの潜伏期間が 2-10 年間と非常に長く、ヒト CD4 細胞を認識する超可変領域を持つ。以上のように他のウイルスとは極めて異なる性質を持つことから、HIV の治療は困難を極め、ワクチン開発が遅れている。そのため、遺伝的多様性のメカニズムと特異的な性質を明らかにするためにも分子進化的研究は非常に重要である (Maldarelli et al., 2013)。

HIV は血清反応および分子系統解析から 2 つの主要な型である 1 型 (HIV-1) および 2 型 (HIV-2) に分けられ、前者は世界中に流行し、後者はアフリカのみ限定された地域で発生している (Barin et al., 1985; Clavel et al., 1986; Kuiken et

al., 1999; Reeves & Doms, 2002)。HIV-1 および HIV-2 の塩基配列をサル免疫不全ウイルス (*Simian immunodeficiency virus*; SIV) の塩基配列と比較した結果, HIV-1 はチンパンジーから分離される SIV と遺伝的に近縁, HIV-2 は霊長類のマカクやスーティーマンガベイから分離される SIV と遺伝的に近縁であった。そのため HIV の 2 種亜型はこれら SIV に由来すると考えられている。I 型は 4 つの異なるグループ (M, O, N および P) に分けられる (Keele et al., 2006; Heuverswyn et al., 2007)。世界中に流行している HIV は HIV-1 のグループ M に属しており (Vidal et al., 2000; Kalish et al., 2004), 本グループの起源を探ることにより, ワクチン開発や治療法に繋がる新しい知見を得られる可能性があり, チンパンジーからヒトに対して感染した SIV が起源と考えられてきた (Gilbert et al., 2007; Hemelaar et al., 2011)。HIV と SIV の塩基配列のデータを合わせた時間尺度の解析も試みられており, SIV と HIV-1 および HIV-2 はそれぞれ約 294-666 年, 76-228 年前に分岐したと推定された (Wertheim & Worobey, 2009)。ヒトおよび HIV の移動から HIV-1 のグループ M の拡散の歴史を調査した結果, SIV のヒトへの感染は少なくとも 13 回あったが, 1909 年から 1930 年の間, コンゴ民主共和国の首都キンシャサでパンデミック (世界的大流行) が発生し, それが現在の HIV-1 のグループ M に繋がったと考えられている。そして, 1930 年-1950 年の間, キンシャサから港まで伸びる鉄道を通してヒトの移動があり, そこから感染がコンゴ民主共和国全土, 次いで国境を接するアフリカ諸国に広がったとされている (Faria et al., 2014)。このように年代推定や拡散経路の解析により, HIV-1 の進化の歴史が明らかになってきており, これら知見は効果的な治療法の開発およびこれからの分子疫学的研究に大いに貢献すると考えられる。

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に分類され, そのゲノムはマイナスセンス 1 本鎖 RNA の 8 分節からなる分節ゲノムを特徴とする (King et al., 2012)。核タンパク質およびマトリックスタンパク質の抗原性の違いにより A, B および C 型の 3 種に分類される。感染成立に重要なインフルエンザウイルスの抗原性は表面タンパク質であるヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) により決定される。インフルエンザウイルスはその抗原性が容易に

変化することから、宿主の免疫から巧みに逃れ、薬剤抵抗性を獲得し、流行を続けて人類に多大な被害を与えている。また、インフルエンザウイルスの抗原性シフトのメカニズムとして遺伝子再集合が挙げられる。トリ、ブタおよびヒトのウイルス間で起きた遺伝子再集合の中には、その抗原性がこれまで人類で流行していたものとは大きく異なるものがあり、出現したウイルスは時にパンデミックを引き起こす。人類は3度のパンデミックを経験した (Simonsen et al., 2013)。1918年のH1N1ウイルスによるスペイン風邪、1957年のH2N2ウイルスによるアジア風邪、1968年のH3N2ウイルスによる香港風邪である。アジアおよび香港風邪流行の際に分離されたインフルエンザウイルスは、ヒトおよびトリインフルエンザウイルスに由来したゲノムから構成される再集合体であることが明らかになっている。1957年に分離された系統ではHA、NAおよびPB1タンパク質をコードする遺伝子を、1968年の系統ではHAおよびPB1タンパク質をコードする遺伝子をトリ由来ウイルスから獲得したと考えられている (Laver & Webster, 1973; Scholtissek et al., 1978; Kawaoka et al., 1989)。一方B型インフルエンザウイルスは宿主が限られており、こうしたパンデミックは起こさないが、地域的な流行は引き起こす。

インフルエンザウイルスが流行するたびにそのウイルス株が凍結保存されるためウイルス化石のようなものとみなせる (Holmes, 2009)。そのウイルス化石からはゲノム情報を得ることができる。塩基置換数とウイルス株を分離した時期の関係性からインフルエンザウイルスが一定の速度で進化してきていることが確認されており (Hayashida et al., 1985)、インフルエンザウイルスはほぼ分子進化の中立説に則って進化した。そのため分子時計を用いた解析が有用である。

2013年から中国でヒトにおいて継続的に発生しているH7N9トリインフルエンザウイルスはトリには低病原性であるが、ヒトに対して高病原性であるため、特に家禽などの生産現場において両者間でのウイルスの伝播は大きな問題となっている。本ウイルスは短期間で中国東南部に広く拡散したが、ウイルスに感染した家禽類の広い地域での移動と生きた家禽類が多数集められる生鳥市場の存在がその原因として報告されている (Lam et al., 2015)。そしてH7N9はH5N1

および H9N2 トリインフルエンザウイルスと同じように国境を越えて地球規模での拡散が起きる可能性も指摘されている (Gao et al., 2013; Wang et al., 2014)。またトリインフルエンザウイルスの進化を追跡する新しい手法も考案されており「宿主特異的なローカル時計 (host-specific local clock) モデル」では、様々な宿主系統ごとに、独立のウイルス分子進化速度を組み込み、解析を行った (Worobey et al., 2014)。全ゲノム領域にわたる一貫した進化の歴史が明らかになり、ウマ H7N7 ウイルスがトリ由来株の姉妹分岐群にあたり、それらの株との共通祖先が 19 世紀に存在した (Tao et al., 2015)。また西半球のトリインフルエンザウイルス系統は後に、そのゲノム領域の大部分が 1918 年のパンデミックウイルスに寄与し、それとは独立に 1963 年にウマ間で大流行した H3N8 系統にも寄与した (Gilbert et al., 2014)。

インフルエンザウイルスに関しては、過去の流行、塩基配列の変異および病原性の変化の情報からこれから出現する未来のウイルスの系統や病原性を予測することも試みられている (Chao et al., 2010; Ahn et al., 2014; Guo et al., 2015)。

B. 植物ウイルス

動物ウイルスに比べ、植物ウイルス分離株を保存している機関は少ないため、分子進化的解析を行うために世界各国からの分離株を多く集めることは非常に困難である (大島, 2012)。その中でも幾つかの植物ウイルスに関しては研究者間での連携が図られ、世界中の分離株を用いた解析が行われた (Ohshima et al., 2002; Ohshima et al., 2007; Lefeuvre et al., 2010; Nguyen et al., 2013a)。

TYLCV は 1964 年にイスラエルでは初めて報告されて以来、世界各地で確認され、葉の黄化、葉巻、落果などの病徴を引き起こすトマト葉巻病の重要病原であり、栽培トマトに大きな被害を与えている (Cohen & Harpaz, 1964; Antignus & Cohen, 1994; Pico et al., 1996)。TYLCV はジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に分類され、唯一の媒介昆虫であるタバココナジラミによって特異的に媒介される。最近までは循環型・非増殖型の媒介様式と考えられていたが、タバコ

コナジラミ体内での増殖が確認された (Pakkianathan et al., 2015)。またトマトにおける種子伝染が報告され、ウイルス汚染種子の輸出入が本ウイルスの世界的流行に関与している (Kil et al., 2016)。本ウイルスは通常は約 2,800 塩基から構成される単一の環状 1 本鎖 DNA をゲノムとして持つが、アメリカ大陸由来の TYLCV は 2 つの環状 1 本鎖 DNA をゲノムとして持つ (Kheyr-Pour et al., 1992; Navot et al., 1991; Abhary et al., 2007; Díaz-Pendón et al., 2010)。TYLCV には 7 系統が存在するが、マイルド系統およびイスラエル系統は世界中に拡散しているが、その他の 5 系統はイラン国内のみで確認されている。分子時計を用いた解析により、本ウイルスは 1980 年代に中東地域でマイルド系統とイスラエル系統が誕生し、その後近隣諸国に拡がり、アメリカ大陸、ヨーロッパ、東アジアなど世界各地に拡散したことが明らかになった (Duffy & Holmes, 2007; 2008; Lefevre et al., 2010; Mabvakure et al., 2016)。そしてこれらの拡散には罹病植物の移動や宿主のタバココナジラミの拡散が寄与していると考えられた (Gorovits et al. 2014; Seal et al., 2006)。一連の研究は、先駆けてウイルスの世界的拡散を解析し明らかにされ、植物 DNA ウイルスの系統地理学的・分子疫学的研究のモデルケースの 1 つとなっている。

RYMV は 1966 年にケニアで初めて発生が報告されて以来、イネが栽培されているアフリカのほとんどの国々で発生が認められ、栽培および野生イネの他にイネ科雑草でも稀に感染が認められた (Abo et al., 1998)。RYMV はテトラウイルス科ソベモウイルス属に分類され、約 4500 塩基から構成されるプラス 1 本鎖 RNA を持つ (Fauquet et al., 2005)。RYMV は地域・宿主が限定されており、ウイルス集団の集団遺伝構造が比較的維持されているため、系統地理学的な研究に適したウイルスである (Abubakar et al., 2003)。アフリカ諸国から採集した RYMV 320 分離株中 14 分離株の全塩基配列を用いた時間尺度の解析から、RYMV の起源地は東アフリカと推定され、そこから西アフリカへ徐々に拡散した (Fargette et al., 2004)。アフリカ 11 カ国から採集した RYMV40 分離株の外被タンパク質 (coat protein; CP) を用いた分子系統解析から、それら分離株は大きく 2 グループに分かれ、各グループは東アフリカおよび西・中央アフリカ産の分離株で構成

されており、東アフリカ集団は西・中央アフリカ集団よりも遺伝的に多様であった (Abubakar et al., 2003)。そのため、東アフリカ集団の方が古い集団であることが推察された (Pinel-Galzi et al., 2009)。また全塩基配列, ORF1, ORF2a, ORF2b および ORF IV を用いた解析から, RYMV の各系統は系統ごとに異なる進化速度で進化してきていることが示唆された (Fargette et al., 2008; Pinel-Galzi et al., 2009)。さらにアフリカ 16 カ国から採集した 253 分離株の外被タンパク質遺伝子を用いた RYMV の分岐年代推定から, RYMV の出現は約 200 年前であり, 出現の主な原因はアフリカでイネ栽培が広がったことにより媒介昆虫と栽培イネがウイルスを保持している野生イネとが接触する機会が多くなったことが推察され, イネの栽培化を進めたことが RYMV の進化の大きな推進力ではないかと考えられた。

2. カリフラワーモザイクウイルス

A. 生物学的性質

CaMV は自然界ではダイコンアブラムシおよびモモアカアブラムシなど少なくとも 25 種のアブラムシによって半永続的に伝搬され, 汁液接種で容易に伝染することが知られており, 種子伝染の記録はない。また CaMV は亜熱帯・温帯など世界中に広く分布するパンデミックなウイルスであり (Tomlinson, 1987), その宿主範囲は主にアブラナ科植物に限られるが, ナス科植物に感染した報告もある (Shepherd, 1981)。アブラナ科植物は人類や動物にとって非常に重要な作物で世界各地で栽培されており, 南西ユーラシアが起源地と考えられている (Crisp, 1995; Hemingway, 1995; Hodgkin, 1995; MacNaughton, 1995ab)。多くの植物ウイルスがアブラナ科植物に感染するが, 特に TuMV, キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) そして CaMV が甚大な被害をもたらしている。

B. 粒子およびゲノム構造

CaMV は動物ウイルスのヘパドナウイルスと同様に逆転写酵素を持ち、増殖過程で RNA を介するパラレトロウイルスである (King et al., 2012)。CaMV のウイルス粒子にはエンベロープがなく、直径約 52 nm の正 20 面体のカプシドタンパク質から成る (Fig. 1)。ウイルスゲノムは約 8,000 塩基対の 2 本鎖環状 DNA であり、プラスセンス鎖・マイナスセンス鎖共にギャップが存在する。このギャップは逆転写の過程を経た際に生じ、宿主細胞に感染後、修復される。CaMV マイナスセンス鎖 DNA 上には 7 個の同じ向きのオープンリーディングフレーム (ORF) が I から VII まであり、ORFs V-VI 領域間と ORFs VI-VII 領域間にはそれぞれ約 150 と 700 塩基対の非翻訳領域が存在する。各 ORF は完全に独立しているか、あるいは隣接する ORF とオーバーラップしている (Tang & Leisner, 1998)。CaMV DNA からは 35S および 19S の 2 種類の RNA が転写される。これらの RNA は強力なプロモーターである 35S プロモーターおよび 19S プロモーターを含み、ORFs I- V および ORF VII は 35SRNA, ORF VI は 19SRNA から翻訳される (Fig. 2)。

ORF I (first protein; P1) は細胞間移行タンパク質、ORF II (second protein; P2) および ORF III (third protein; P3) はアブラムシによる伝搬に関与する。ORF IV (fourth protein; P4) は CP をコードし、ORF V (fifth protein; P5) は逆転写酵素、アスパラギン酸プロテアーゼおよび RNaseH をコードしている。ORF VI (sixth protein; P6) は封入体の構造タンパク質をコードし、他のタンパク質発現の transactivator として働く。ORF VII にコードされるタンパク質は未知である (Haas et al., 2002)。これらのタンパク質は様々な機能を持っており、P1 は隣接する細胞へ CaMV 粒子が移行するために必要である (Parbal et al., 1993)。また、P1 の C 末端領域を除く領域は P1 がプラズモデスマータに局在し、CaMV の隣接細胞への移行を安定させるために必要である (Huang et al., 2001)。P2 はアブラムシ伝搬に関与し、ウイルスの複製には必ずしも必要ではない (Armour et al., 1983)。

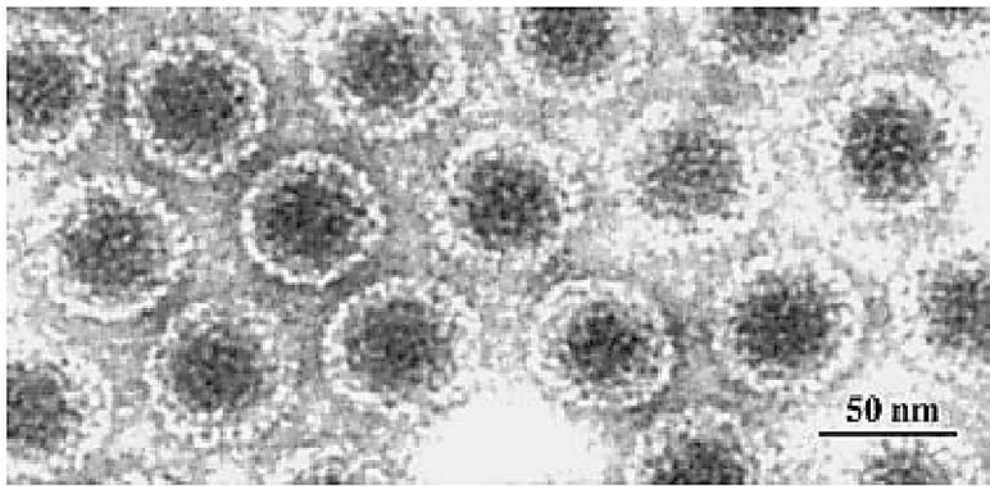


Fig. 1. Electron micrograph of *Cauliflower mosaic virus* virions (Haas et al., 2002).

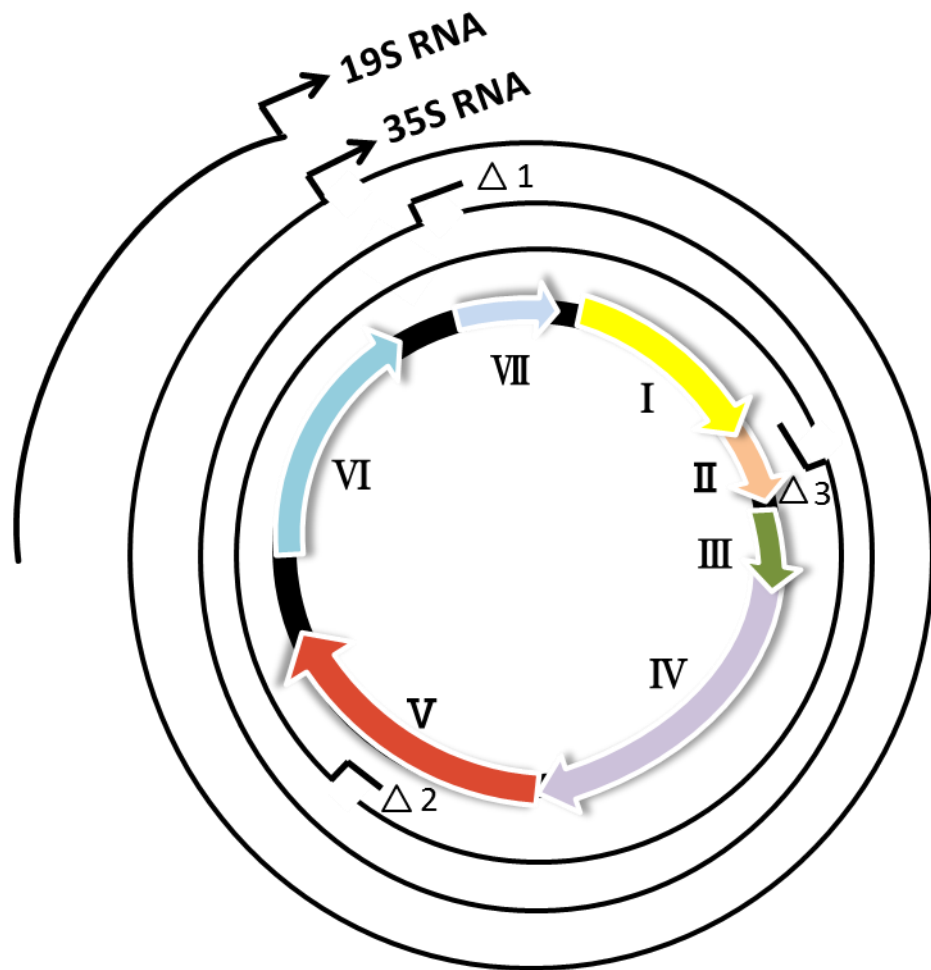


Fig. 2. Genome map of *Cauliflower mosaic virus*. Thin lines represent the double-stranded circular DNA (8 kbp) with sequence discontinuities ($\Delta 1-3$). Major ORFs shown by coloured arrows code for the cell-to-cell movement protein (I), aphid transmission factors (II and III), the precursor of the capsid proteins (IV), the precursor of aspartic proteinase, reverse transcriptase and RNase H (V), and an inclusion body protein/translational transactivator (VI). The solid black lines of the inner circle are the long and small intergenic regions which contain the 35S and 19S promoters, respectively. The two external arrowed lines correspond to the 35S and 19S RNAs.

P2 は同じ細胞内に存在する他の P2 あるいは P3 と相互作用し、P2-P2 あるいは P2-P3 複合体を形成する。P3 は P2 と同様にアブラムシ伝搬に関与し、その N 末端および C 末端はウイルスの全身感染に重要な役割を果たす (Jacquot et al., 1998)。また P3 はアブラムシに伝搬される際の CaMV の形態にも影響を与えている (Leh et al., 2000)。P4 は CP の前駆体であり、C 末端領域にプロセッシングを受けて外被タンパク質となる (Guerra-Peraza et al., 2000)。P5 の遺伝子はレトロウイルスの核酸伸長に関与する遺伝子と相同性を示し、ウイルスゲノムの複製に必須である (Richert-Poggeler & Shepherd, 1997)。また P5 はアスパラギン酸プロテアーゼ、逆転写酵素および RNaseH の働きをする。P6 は感染細胞内において多く存在する複数の機能をもったタンパク質である。封入体の主要な構造タンパク質、そして他のタンパク質発現の transactivator として働く。Transactivator は CaMV ポリシストロニック mRNA の翻訳活性化、タンパク質の安定化および複製の効率化に寄与する。一方で P6 は CaMV の宿主範囲の決定 (Schoelz & Shepherd, 1988) や感染した植物の病徴にも影響を与える (Broglio, 1995)。transactivator はウイルス封入体構成タンパク質であり、CaMV ポリシストロニック mRNA の翻訳活性化、タンパク質の安定化および複製の効率化に寄与する。また transactivator の N 末端領域がナス科植物における病原性を決定していることが報告されている (Kobayashi & Hohn, 2004)。

C. 分子進化

これまで CaMV に関する研究は、感染機構、生理学あるいは血清学などが中心であり、分子進化に関する研究はほとんど進展していない。数分離株に限定されるが ORF VI と全塩基配列を用いた解析では北アメリカ産分離株は 1 つのクラスターを形成することが示唆されている (Chenault & Melcher, 1993ab, 1994)。また ORF VI を用いた解析では、イラン東部から採集した分離株と中国産分離株が同一のクラスターに属し、他の地域から採集したイラン分離株は独立したクラスターを形成し、CaMV の集団形成には創始者効果が働いている (Farzadfar & Pourrahim, 2013)。

3. カブモザイクモザイクウイルス

A. 生物学的性質

TuMV はポティウイルス属に分類され、アブラムシによって非永続的に伝播される (Hamlyn, 1953; Shukla et al., 1994; Fauquet et al., 2005)。園芸作物や農作物に発生する重要病原ウイルスとしては CMV に次いでランクされている (Tomlinson, 1987; Provvidenti, 1996; Ohshima et al., 2002; Walsh & Jenner, 2002; Tomimura et al., 2003)。宿主範囲が広く、アブラナ科植物を始めとしてキク科、アカザ科、ナデシコ科、ナス科など 43 科 156 属 318 種の植物に感染し (Edwardson & Christie, 1991)、アフリカ、アジア、ヨーロッパ、オセアニアおよび南北アメリカの温帯および亜熱帯地方を中心に広く世界中に発生し、農作物に被害をもたらしている。ポティウイルス科のウイルスは世界中に分布するため、分子進化の研究に適している (Gibbs & Ohshima, 2010)。

B. 粒子およびゲノム構造

ポティウイルス科はピコルナ様スーパーウイルスグループに属し、中でもポティウイルス科ポティウイルス属は約 180 種のウイルスから構成される。ポティウイルス属のウイルスの粒子長は 680~900 nm の屈曲したひも状で (Fig. 3)、プラス一本鎖 RNA をゲノムとして持つ。5' 末端側にはゲノム結合タンパク質 (genome linked viral protein; VPg) が共有結合しており、3' 末端側には様々な長さのポリ A (Poly A) 配列が存在する。ポティウイルスのゲノムには単一の ORF がコードされており、そのポリタンパク質から第 1 タンパク質 (first protein; P1)、ヘルパー成分プロテアーゼタンパク質 (helper-component protease; HC-Pro)、および核内封入体 a タンパク質 (nuclear inclusion a; NIa) のプロテアーゼ活性によりプロセッシングを受けて少なくとも 10 個の成熟したタンパク質が算出され

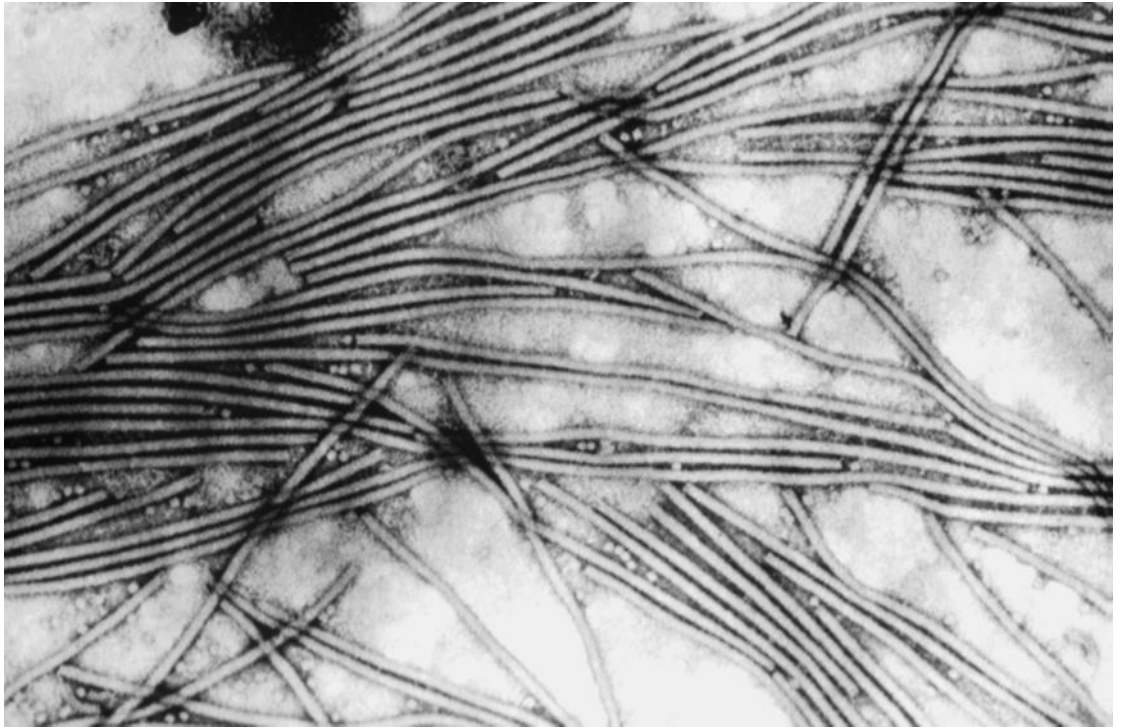


Fig. 3. Electron micrograph of *Turnip mosaic virus* virions stained with methylamine tungstate (Walsh & Jenner, 2002).

る (Richmann et al., 1992; Urcuqui-Inchima et al., 2001)。即ち、ポティウイルスゲノムは 5' 末端側から P1, HC-Pro, 第 3 タンパク質 (third protein; P3), 6K ダルトン第 1 タンパク質 (6K1), 筒状封入体タンパク質 (cylindrical inclusion; CI), 6K ダルトン第 2 タンパク質 (6K2), VPg, NIa-Pro, 核内封入体 b タンパク質 (NIb), CP から構成される (Riechmann et al., 1992) (Fig. 4)。また P3 遺伝子領域中に重複して PIPO と呼ばれる小さな ORF が-1/+2 塩基分ずれた読み枠に見つかった (Chung et al., 2008)。PIPO がコードするタンパク質は, P3 遺伝子の前半部分のタンパク質とそれが合成される途中で読み枠が-1 塩基分ずれて合成されるタンパク質が融合した P3N-PIPO タンパク質として発現する。

これらのタンパク質は様々な機能を持っている。P1 遺伝子は, 自身のタンパク質の C 末端を切断するセリンプロテアーゼ活性を持っており (Verchot et al., 1992; Choi et al., 2002), N 末端領域は宿主域決定, 病徴発現, 細胞間移行に関与していると推定されている (Barrett & Rawlings, 2007; Shi et al., 2007; Rohozková & Navrátil, 2011)。HC-Pro 遺伝子は, N 末端領域は細胞間移行, 中央領域はアブラムシ伝播性に関与し (Pirone et al., 1983), C 末端は自身の Gly-Gly を切断するパイン様システインプロテアーゼ活性を有している (Carrington et al., 1989)。その他にも RNA サイレンシングの抑制 (Valli et al., 2006; Fuellgrabe et al., 2011), 相乗効果と病徴発現, 全身移行に関与している。P3 遺伝子は P1 遺伝子と同様に多様な遺伝子を持ち, ウイルスの蓄積, 複製, 病原性, 抵抗性打破および細胞間移行に関与すると考えられている (Shukla et al., 1994; Merits et al., 1998; Sáenz et al., 2000; Dallot et al., 2001; Johansen et al., 2001; Urcuqui-Inchima et al., 2001; Jenner et al., 2002, 2003; Suehiro et al., 2004; Tan et al., 2005)。6K1 遺伝子は RNA 複製に関与していると考えられている (Riechmann et al., 1992; Lin et al., 2009)。CI 遺伝子から産出される CI タンパク質は感染した宿主細胞の細胞質に約 70kDa のタンパク質として局在して筒状封入体を形成し (Rojas et al., 1997), ATPase 活性と NTP 存在下で dsRNA を巻き戻す RNA ヘリカーゼ活性 (Láin et al., 1991), 病原力と病徴発現 (Zhang et al., 2009), 細胞間移行に関与する。6K2 遺伝子は疎水性アミノ酸領域が存在し, ピコルナウイルスのペプチドと同様の

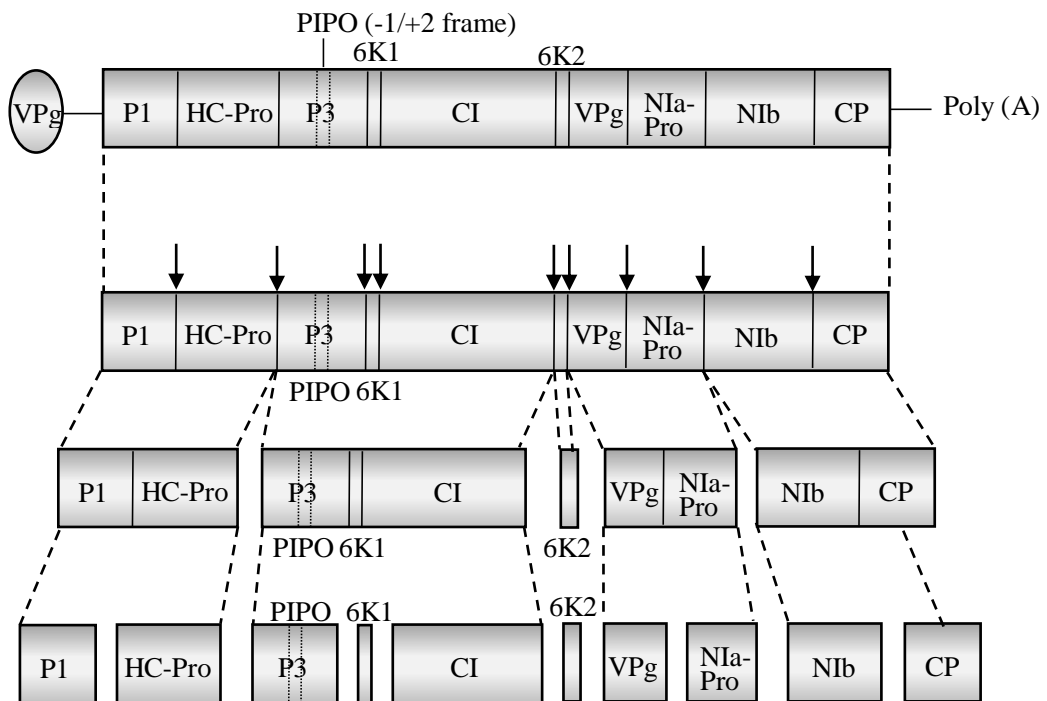


Fig. 4. Genome maps of *Turnip mosaic virus* and its encoded protein. Arrows indicate cleavage sites of polyprotein.

配置を示すことから、RNA の複製に関与している (Riechmann et al., 1992)。また、この 6K2 遺伝子はウイルスの長距離移行および病徴の誘発にも関与し、これらの機能は宿主特異的である (Spetz & Valkonen, 2004)。VPg 遺伝子はウイルス RNA の 5' 末端に共有結合し (Murphy et al., 1990)、宿主細胞によるエキソヌクレアーゼ活性を阻害してゲノム RNA を保護し、また、直接ウイルスの RNA 複製酵素と相互作用することから、ウイルス複製の間に RNA 複製酵素が働くためのプライマーとして機能すると考えられる。ウイルスタンパク質合成、細胞間移行やウイルスの長距離移行 (Schaad et al., 1997a; Lellis et al., 2002; Puustinen et al., 2002; Dunoyer et al., 2004)、ウイルス粒子の蓄積 (Rajamäki & Valkonen, 2009) にも関与し、特異的に宿主遺伝子を認識し、抵抗性を決定する際に重要な役割を果たしている (Dunoyer et al., 2004; Moury et al., 2004)。NIa-Pro 遺伝子は、核内封入体 a をコードし、ポリタンパク質プロセッシングのためのプロテアーゼ活性およびゲノム複製に関与している (Carrington & Dougherty, 1987; Carrington et al., 1988; Hajimorad et al., 1996; Tözsér et al., 2005)。NIb 遺伝子は核内封入体 b をコードし、GDD モチーフを持つためポティウイルスの RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) と考えられ、複製活性を持つ (Hajimorad et al., 1996; Hong & Hurt, 1996)。CP 遺伝子は、ウイルス粒子の再構成、植物内でのウイルスの細胞間移行、長距離移行 (Dolja et al., 1994, 1995; Rojas et al., 1997; López-Moya & Pirone, 1998)、ウイルスとアブラムシ伝播性に関与している (Atreya et al., 1991)。

C. 分子進化

これまで TuMV の分子進化について研究がなされ (Ohshima et al., 2002, 2007)、世界各国から採集した分離株の分子進化的な解析から、TuMV ゲノムの分子進化には突然変異 (Mutation) および組換え (Recombination) が重要であること、またゲノム型には 4 分子系統グループ、*basal-Brassica* (basal-B)、*basal-Brassica/Raphanus* (basal-BR)、*Asian-Brassica/Raphanus* (Asian-BR) および

world-*Brassica* (world-B) 分子系統グループがあり、そのゲノム型は病原型とほぼ一致していることを明らかにしてきた。TuMV の起源地はヨーロッパを含めた南西ヨーロッパ地方であり、それらの地域から宿主適応、地理的隔離を受けながら世界各地に拡散し、アジア地方へはアブラナ属植物だけでなく、ダイコン属植物に対する病原性を獲得しながら拡散してきた (Ohshima et al., 2002; Tomimura et al., 2003; Tan et al., 2004; Tomimura et al., 2004; Tan et al., 2005; Tomitaka & Ohshima, 2006; Ohshima et al., 2007; Tomitaka et al., 2007; Korkmaz et al., 2008; Farzadfar et al., 2009; Ohshima et al., 2010; Nguyen et al., 2013ab)。組換え体に関しては明瞭な組換え部位を持つ分離株が東アジアの分離株で多く見られ、一方で不明瞭な組換え部位はヨーロッパの分離株に多く見られたことから、東アジアへの侵入は比較的最近のことである (Tomimura et al., 2003)。さらに東アジアの分離株を中心にゲノムの一部領域 (P1 遺伝子, 6K2 から NIa-Pro 遺伝子までの領域および CP 遺伝子) の塩基配列を決定し、これらを連結した塩基配列を用いて組換え部位について調査したところ、多くの分離株がそのゲノム上に組換え部位を持っており、特に P1 および VPg 遺伝子に多く見られた。同じ組換え体型の分離株がアジア広域で認められたため、一度組換えを経験した分離株が東アジアに拡散したと考えられた (Tan et al., 2004)。東アジアとヨーロッパから 142 分離株を採集して行われた集団遺伝構造の比較から東アジアとヨーロッパの TuMV 集団は遺伝的に異なることが示され、各集団の形成には創始者効果が影響していると推察された (Tomimura et al., 2004)。またアブラナ属植物に感染性を示すが、ダイコン属植物にほとんど感染性を示さないイギリス産 UK 1 分離株の感染性 cDNA クローンを用いて、大量のダイコンに接種・継代し、ゲノムに認められる変異を調査した結果、ダイコンの初期感染には P3 遺伝子内のアミノ酸変異が関与していることが示され、TuMV がアブラナ属植物からダイコン属植物へ適応してきたことが示唆された (Tan et al., 2005; Ohshima et al., 2010; Gibbs et al., 2015)。中華人民共和国と我が国の一部地域から採集した集団遺伝構造解析からは、両国に見られる一部の遺伝集団は共通しているが一部の集団は異なっており、特に九州地方において basal-BR 分子系統グループの集団が

2000 年以降に突発的に拡散して優位となってきた (Tomitaka & Ohshima, 2007)。本邦においては、九州地方と本州中央部から採集した集団遺伝構造解析から本州中央部においても basal-BR 分子系統グループが優位な新興集団であることが示された (Tomitaka et al., 2006)。間もなくして中華人民共和国の山東省で採集したダイコンに感染していた TuMV 2 分離株が basal-BR 分子系統グループに属することが報告され、それらは日本産分離株と高い遺伝的同一性を示した (Wang et al., 2009)。トルコ共和国における調査では、アブラナ属およびダイコン属植物などで TuMV の感染が認められ、全ゲノム構造を決定した 2 分離株はグループ内組換えおよび非組換え体であり、world-B および Asian-BR 分子系統グループに属することが示された。小アジアに属するトルコ共和国において TuMV が広く分布していることが初めて明らかとなった (Korkmaz et al., 2008)。またベトナムから採集した 30 分離株の全ゲノム構造を決定し、中国そして日本分離株と集団遺伝構造について比較した結果、これら 3 国間において遺伝子流動が認められた一方、アジア諸国とヨーロッパ諸国間では遺伝子流動はほとんど認められなかった (Nguyen et al., 2013a)。また分子系統解析から野生のラン科植物に感染していたウイルスが TuMV の起原型株であり、分子時計を用いた時間解析の結果、これら TuMV は約 1,000 年前に出現した。さらに単子葉植物を宿主とする TuMV の外群 (アウトグループ) に位置するウイルスと TuMV の関係性および TuMV 分子系統樹上での分離株の位相から推測すると、おそらく TuMV は最初単子葉植物を主な宿主としており、宿主適応を通じてアブラナ科植物を中心とした双子葉植物への病原性を獲得した (Nguyen et al., 2013a)。以上の詳細は、大島の総説を参照にされたい (大島, 2009; 2012; 2013; 2015ab)。

V. 材料および実験方法

1. 供試ウイルス

A. カリフラワーモザイクウイルス

日本, イラン, ギリシャおよびトルコで CaMV 様症状を示すダイコン, キャベツおよびカブ植物などを採集した (Table 1, Fig. 5)。日本産 JPN-M, JPN-S1, JPN-S2, JPN-UV1 および JPN-UV26 分離株については農業生物資源ジーンバンク (MAFF 番号 104018, 104019, 104020, 104021 および 104022) から購入した。それら分離株をカブ (品種; 博多据わり) に接種後, 単一病斑分離を最低 3 回行った後, 再度カブ (品種; 博多据わり) に接種し CaMV を増殖させた。これら 67 分離株に加えて国際塩基配列データベースで全塩基配列が公開されている 9 分離株, さらに塩基配列の一部が公開されている 21 分離株を合わせて, 以降の実験に用いた。

B. カブモザイクウイルス

オーストラリアおよびニュージーランドで TuMV 様症状を示す *Hirschfeldia incana*, *Rapistrum rugosum* およびカブ植物などを採集した (Table 2, Fig. 6)。それらを *Chenopodium quinoa* を用いて単一病斑分離を行った後, カブ (品種; 博多据わり) あるいは *Nicotiana benthamiana* に接種して 32 分離株の TuMV を増殖させた。これら分離株に加えて国際塩基配列データベースで全塩基配列が公開されている 197 分離株を合わせて, 以降の実験に用いた。

2. 供試植物

CaMV および TuMV 共にオートクレーブ (高圧滅菌) 処理をした土壌に供試植物の種子を播種し, 空調室内 (25°C) で供試植物を育成した。罹病葉と適量の

Table 1. *Cauliflower mosaic virus* isolates analyzed in this study

Isolate	Original host	Location (city, district)	Year of collection	Reference	Sequenced region or Accession no.
Asia					
China					
Xinjing	<i>Brassica oleracea</i>	-, Xinjiang	1963	Xie et al., 1979 , Fang et al., 1985	AF140604 (Full)
Iran					
Ca-BE39	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	-, Esfahan	2004		DQ870913 (partial ORF VI)
Ca-CAz22	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Orumiyeh, Azarbayjan-e-Gharbi	2004	Farzadfar et al., 2007	DQ870907 (partial ORF VI)
Ca-CAz26	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Orumiyeh, Azarbayjan-e-Gharbi	2004	Farzadfar et al., 2007	DQ870908 (partial ORF VI)
Ca-Cbz10	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-, Zanjan	2004		DQ870909 (partial ORF VI)
Ca-Cbz26	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-, Zanjan	2004		DQ870911 (partial ORF VI)
Ca-CE1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, Esfahan	2003	Farzadfar et al., 2007	DQ119041 (partial ORF VI)
Ca-CKh19	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, Khorasan	2004	Farzadfar et al., 2007	DQ870910 (partial ORF VI)
Ca-CSH1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Shiraz, Fars	2003	Farzadfar et al., 2007	DQ119040 (partial ORF VI)
Ca-CQ50	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, Qazvin	2004	Farzadfar et al., 2007	DQ870914 (partial ORF VI)
Ca-CT4	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Varamin, Tehran	2004	Farzadfar et al., 2007	DQ870912 (partial ORF VI)
Ca-CT22	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Karaj, Tehran	2004	Farzadfar et al., 2007	DQ870915 (partial ORF VI)
Ca-Kh32	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, Khorasan	2004	Farzadfar et al., 2007	EF503597 (partial ORF VI)
Ca-RT66	<i>Raphanus sativus</i>	Karaj, Tehran	2004		DQ870918 (partial ORF VI)
Ca-TM65	<i>Brassica rapa</i>	Mahallat, Markazi	2005		DQ870917 (partial ORF VI)
Ca-TT56	<i>B. rapa</i>	Karaj, Tehran	2004		DQ870919 (partial ORF VI)
Ca-TY61	<i>B. rapa</i>	Meybod, Yazd	2004		DQ870916 (partial ORF VI)
HC63	<i>Brassica napus</i>	Razan, Hamedan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015282 (ORF VI)
HRA4	<i>Raphanus rogosum</i>	Hamedan, Hamedan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015283 (ORF VI)
IC1	<i>B. napus</i>	Ilam, Ilam	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015284 (ORF VI)
IRN1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Uromia, Azarbayjan-e-Gharbi	2003	this study	AB863136 (Full)
IRN2	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Uromia, Azarbayjan-e-Gharbi	2003	this study	AB863137 (Full)
IRN3	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, Qazvin	2003	this study	AB863138 (Full)
IRN4	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Varamin, Tehran	2003	this study	AB863139 (Full)
IRN5	<i>Brassica pekinensis</i>	Karaj, Tehran	2003	this study	AB863140 (Full)
IRN6	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Falavarjan, Esfahan	2003	this study	AB863141 (Full)
IRN7	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Karaj, Tehran	2004	this study	AB863142 (Full)
IRN8	<i>Matthiola</i> sp.	Mahallt, Markazi	2004	this study	AB863143 (Full)
IRN9	<i>B. rapa</i>	Mahallat, Markazi	2004	this study	AB863144 (Full)
IRN10	<i>R. rogosum</i>	Vavan, Tehran	2006	this study	AB863145 (Full)
IRN11	<i>B. napus</i>	Shiraz, Fars	2006	this study	AB863146 (Full)
IRN12	<i>R. rogosum</i>	Vavan, Tehran	2006	this study	AB863147 (Full)
IRN13	<i>R. sativus</i>	-, Yazd	2006	this study	AB863148 (Full)
IRN14	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Falavarjan, Esfahan	2007	this study	AB863149 (Full)
IRN15	<i>Lepidium sativum</i>	Mashhad, Khorasan Razavi	2007	this study	AB863150 (Full)
IRN16	<i>R. sativus</i>	Mashhad, Khorasan Razavi	2007	this study	AB863151 (Full)
IRN17	<i>R. sativus</i>	Mashhad, Khorasan Razavi	2007	this study	AB863152 (Full)
IRN18	<i>R. sativus</i>	Shiraz, Fars	2007	this study	AB863153 (Full)
IRN19	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	Shiraz, Fars	2007	this study	AB863154 (Full)
IRN20	<i>B. rapa</i>	Mashad, Khorasan Razavi	2007	this study	AB863155 (Full)
IRN21	<i>R. sativus</i>	-, Esfahan	2008	this study	AB863156 (Full)
IRNCaCOr1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Uromia, Azarbayjan-e-Gharbi	2004		DQ119036 (ORF II)
IRNCaCQ1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Boin-zahra, Qazvin	2001		DQ119038 (ORF II)
IRNCaCSh1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Shiraz, Fars	2003		DQ119039 (ORF II)
IRNCaME1	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	-, Esfahan	2003		AY703456 (ORF II)
IRNCaRE4	<i>R. sativus</i>	-, Esfahan	2003		DQ119037 (ORF II)
KEC17	<i>B. napus</i>	Kermanshah, Kermanshah	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015285 (ORF VI)
KORC1	<i>B. napus</i>	-, Kordestan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015287 (ORF VI)
LC11	<i>B. napus</i>	Koram abad, Lorestan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015288 (ORF VI)
LR9	<i>R. sativus</i>	Koram abad, Lorestan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015286 (ORF VI)
TuE24	<i>B. rapa</i>	-, Esfahan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015289 (ORF VI)
WKBi7	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Birjand, Khorasan-e-Jonubi	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015294 (ORF VI)
WKBi32	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Birjand, Khorasan-e-Jonubi	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015295 (ORF VI)
WKB13	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Bohnurd, Khorasan-e-Shomali	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015290 (ORF VI)
WKB15	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Bohnurd, Khorasan-e-Shomali	2010	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015291 (ORF VI)
WKB17	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Bohnurd, Khorasan-e-Shomali	2010	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015292 (ORF VI)
WKB63	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Bohnurd, Khorasan-e-Shomali	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015293 (ORF VI)
ZC20	<i>B. napus</i>	-, Zanjan	2012	Farzadfar & Pourrahim, 2013	KF015296 (ORF VI)
Japan					
JPNHGB340	<i>B. oleracea</i>	-, Hyogo	2010	this study	AB863157 (Full)
JPNKWB778	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Takamatsu, Kagawa	2004	this study	AB863158 (Full)
JPNM	<i>B. oleracea</i>	-, Tokyo	1960	this study	AB863159 (Full)
JPNN	<i>B. oleracea</i>	Sendai, Miyagi	2008	this study	AB863160 (Full)
JPNS1	<i>Armoracia rusticana</i>	-, Nagano	1965	this study	AB863161 (Full)
JPNS2	<i>A. rusticana</i>	-, Nagano	1965	this study	AB863162 (Full)
JPNTKD762	<i>R. sativus</i>	Miyoshi, Tokushima	2002	this study	AB863163 (Full)
JPNUV1	<i>B. oleracea</i>	-, Ibaraki	1981	this study	AB863164 (Full)
JPNUV26	<i>B. oleracea</i>	-, Ibaraki	1981	this study	AB863165 (Full)
S-Japan	<i>A. rusticana</i>	Yokohama, Kanagawa	Not known	Takahashi et al., 1989	X14911 (ORF VI)

Table 1. cont.

Isolate	Original host	Location (city, district)	Year of collection	Reference	Sequenced region or Accession no.
Turkey					
TUR1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Canakkale, Marmora	2006	this study	AB863166 (Full)
TUR2	<i>B. oleracea</i>	Balikesir, Marmora	2006	this study	AB863167 (Full)
TUR4	<i>R. sativus</i>	Balikesir, Marmora	2006	this study	AB863168 (Full)
TUR5	<i>B. oleracea</i>	Canakkale, Marmora	2006	this study	AB863169 (Full)
TUR12	<i>B. oleracea</i>	Konya, Center Anatolia	2007	this study	AB863170 (Full)
TUR34	<i>B. oleracea</i>	Aksaray, Center Anatolia	2007	this study	AB863171 (Full)
TUR50	<i>B. oleracea</i>	Nigde, Center Anatolia	2007	this study	AB863172 (Full)
TUR59	<i>B. oleracea</i>	Bursa, Marmora	2007	this study	AB863173 (Full)
TUR69	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Bursa, Marmora	2007	this study	AB863174 (Full)
TUR81	<i>B. oleracea</i>	Bursa, Marmora	2007	this study	AB863175 (Full)
TUR84	<i>B. oleracea</i>	Bursa, Marmora	2007	this study	AB863176 (Full)
TUR94	<i>B. oleracea</i>	Canakkale, Marmora	2007	this study	AB863177 (Full)
TUR213	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Izmir, Aegean	2007	this study	AB863178 (Full)
TUR214	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Izmir, Aegean	2007	this study	AB863179 (Full)
TUR216	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Izmir, Aegean	2007	this study	AB863180 (Full)
TUR220	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Aydin, Aegean	2007	this study	AB863181 (Full)
TUR239	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Canakkale, Marmora	2007	this study	AB863182 (Full)
TUR244	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Balikesir, Marmora	2007	this study	AB863183 (Full)
TUR249	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Balikesir, Marmora	2007	this study	AB863184 (Full)
TUR263	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Canakkale, Marmora	2007	this study	AB863185 (Full)
TUR278	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Balikesir, Marmora	2007	this study	AB863186 (Full)
TUR279	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Balikesir, Marmora	2007	this study	AB863187 (Full)
TUR285	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Bursa, Marmora	2007	this study	AB863188 (Full)
TUR289	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Bursa, Marmora	2007	this study	AB863189 (Full)
TUR303	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Umurbey, Tekirdag	2008	this study	AB863190 (Full)
TUR306	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, Center Anatolia	2008	this study	AB863191 (Full)
Europe					
Croatia					
CRO180A	<i>B. napus</i>	Zagreb, -	2009	this study	AB863192 (Full)
France					
B29	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Rennes, Ille-et-Vilaine	Not known	Pique et al., 1995	X79465 (Full)
Greece					
GRC83	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Dytiko, Pella	2008	this study	AB863193 (Full)
GRC84B	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Dytiko, Pella	2008	this study	AB863194 (Full)
GRC86B	<i>R. sativus</i>	Athyra, Pella	2008	this study	AB863195 (Full)
GRC86D	<i>R. sativus</i>	Athyra, Pella	2008	this study	AB863196 (Full)
GRC87E	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Ionia, Thessaloniki	2008	this study	AB863197 (Full)
GRC87G	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Ionia, Thessaloniki	2008	this study	AB863198 (Full)
GRC91B	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Epanomi, Thessaloniki	2008	this study	AB863199 (Full)
GRC92A	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Epanomi, Thessaloniki	2008	this study	AB863200 (Full)
GRC92C	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Epanomi, Thessaloniki	2008	this study	AB863201 (Full)
GRC92D	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Epanomi, Thessaloniki	2008	this study	AB863202 (Full)
Hungary					
D/H	<i>B. oleracea</i>	Budapest, Budapest	Not known	Howarth et al., 1981	M10376 (Full)
Italy					
Bari 1	<i>Brassica campestris-rapa</i> L	Bari, Puglia	Not known	Stratford & Plaskitt, 1988	D00335 (ORF VI)
Cabbage S	<i>B. ruvo</i>	Bari, Puglia	Not known	Franck et al., 1980	V00141 (Full)
North America					
U. S. A					
BBC	<i>B. rapa</i> var. <i>chinensis</i>	-, California	1988	Chenault & Melcher, 1993a	M90542 (Full)
Cabb B-JI	<i>Brassica</i> sp.	-, Wisconsin	Not known	Vaden & Melcher, 1990, Geri et al., 2004	DQ211685 (ORF VI), M32813 (ORF III)
Campbell	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, California	Not known	Shalla et al., 1980	M17415 (ORF I)
CM1841	<i>Brassica</i> sp.	-, California	1967	Gardner et al., 1981	V00140 (Full)
CMV-1	Not known	-, California	Not known	Chenault & Melcher, 1993b	M90543 (Full)
D4	<i>B. rapa</i>	-, California	Not known	Daubert & Routh, 1990	M23620 (ORF VI)
NY8153	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-, New York	Not known	Chenault et al., 1992	M90541 (Full)
PV147	<i>B. rapa</i>	-, Wisconsin	Not known	Volovitch & Modjtahedi 1990	M37581 (ORF II), X53860 (ORF VI)
South America					
Argentina					
W260	Not known	-, Mendoza	1985	Qiu & Schoelz, 1992, Wintermantel et al., 1993	M94887 (ORF I, ORF VII), L09053 (ORF VI), JF809616 (Full)

Table 2. Turnip mosaic virus isolates analysed in this study.

Isolate	Original host	Location (City, District, Country)	Year of collection	Host type ^a	Reference	Accession code
Oceania						
Australia						
AU1	<i>Hirschfeldia incana</i>	Canberra, ACT	1998	B	Imamura, 2007, This study	AB989628
AUST1 (3696F)	<i>Cicer arietinum</i>	Myall Vale-Narrabri, NSW	2003	B	Ohba, 2014, Schwinghamer et al., 2014, This study	AB989629
AUST2 (3834A)	<i>Rapistrum rugosum</i>	Breeza, NSW	2004	B	Ohba, 2014, Schwinghamer et al., 2014, This study	AB989630
AUST3 (3896A)	<i>Brassica Juncea</i>	Breeza, NSW	2004	B	Ohba, 2014, Schwinghamer et al., 2014, This study	AB989631
AUST4 (3896B)	<i>B. Juncea</i>	Breeza, NSW	2004	B	Ohba, 2014, Schwinghamer et al., 2014, This study	AB989632
AUST6 (Q1280)	<i>R. rugosum</i>	Allora, QLD	2001	B	Ohba, 2014, Schwinghamer et al., 2014, This study	AB989633
AUST10 (Q186)	<i>B. pekinensis</i>	Kalbar, QLD	1996	B	Ohba, 2014, This study	AB989634
AUST13 (Q484)	<i>B. pekinensis</i>	Gatton, QLD	1994	B	Ohba, 2014, This study	AB989635
AUST19 (Q2080)	<i>R. raphanistrum</i>	Melbourne, VIC	2007	B	Ohba, 2014, This study	AB989636
AUST21 (5346A)	<i>H. incana</i>	Tamworth, NSW	2011	B	Ohba, 2014, This study	AB989637
AUST22 (5349A)	<i>R. rugosum</i>	Tamworth, NSW	2011	B	Ohba, 2014, This study	AB989638
AUST23 (Q2081)	<i>R. raphanistrum</i>	Melbourne, VIC	2007	B	Ohba, 2014, This study	AB989639
AUST26 (4323A)	<i>B. rapa</i>	Mullaley, NSW	2007	B	Ohba, 2014, This study	AB989640
AUST27 (4323C)	<i>B. rapa</i>	Mullaley, NSW	2007	B	Ohba, 2014, This study	AB989641
AUST28 (5346B)	<i>H. incana</i>	Tamworth, NSW	2011	B	Ohba, 2014, This study	AB989642
AUST29 (5349B)	<i>R. rugosum</i>	Tamworth, NSW	2011	B	Ohba, 2014, This study	AB989643
BRS1	<i>B. rapa</i>	Brisbane, NSW	2007	Not known		HM544042
New Zealand						
NZ11	<i>Crocus sativus</i>	Mid Canterbury-South Island	2002	ND	Noguchi, 2011, Ochoa Corona et al., 2007, This study	AB989644
NZ12	<i>Nasturtium officinale</i> ,	Kumeu, Auckland-North Island	2003	ND	Noguchi, 2011, Ochoa Corona et al., 2007, This study	AB989645
NZ246	<i>B. napus</i> cv. York Globe	Hornby, Mid Canterbury-South Island	1995	B	Imamura, 2007, This study	AB989646
NZ290	<i>B. pekinensis</i>	Hornby, Mid Canterbury-South Island	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093612
NZ402	<i>Lepidium oleraceum</i>	Stony Bay, Banks Peninsula, South Island	2010	B	Ohba, 2014, This study	AB989647
NZ403	<i>L. oleraceum</i>	Island Rock, Banks Peninsula, South Island	2010	B	Ohba, 2014, This study	AB989657
NZ403B	<i>L. oleraceum</i>	Island Rock Banks Peninsula, South Island	2010	B	Ohba, 2014, This study	AB989658
NZ412	<i>Pachycladon fastigiatum</i>	Lincoln, Mid Canterbury-South Island	2010	B	Ohba, 2014, Fletcher et al., 2010, This study	AB989648
NZ412B	<i>P. fastigiatum</i>	Lincoln, Mid Canterbury-South Island	2010	B	Ohba, 2014, Fletcher et al., 2010, This study	AB989649
NZ415	<i>L. oleraceum</i>	Bridge Point, Otago, South Island	2010	B	Ohba, 2014, This study	AB989659
NZ419	<i>B. rapa</i> cv. Marco	Methven, Mid Canterbury-South Island	2010	B	Ohba, 2014, This study	AB989650
NZ419B	<i>B. rapa</i> cv. Marco	Methven, Mid Canterbury-South Island	2010	B	This study	AB989651
NZ419C	<i>B. rapa</i> cv. Marco	Methven, Mid Canterbury-South Island	2010	B	This study	AB989652
NZL5 (NZ298)	<i>Brassica</i> spp.	Lincoln, Canterbury-South Island	1999	B	Imamura, 2007, This study	AB989653
NZW3 (NZ299)	<i>B. rapa</i>	Lincoln, Mid Canterbury-South Island	1999	B	Imamura, 2007, This study	AB989654
NZW4 (NZ300)	<i>B. rapa</i>	Lincoln, Mid Canterbury-South Island	1999	B	Imamura, 2007, This study	AB989655
NZW6 (NZ302)	<i>B. rapa</i>	Lincoln, Mid Canterbury-South Island	1999	B	Imamura, 2007, This study	AB989656
Asia						
1J	<i>Raphanus. sativus</i>	Saga, Saga, Japan	1977	BR	Ohshima et al. 1996	D83184
2J	<i>B. pekinensis</i>	-, Tochigi, Japan	1994	BR	Tomimura et al., 2003	AB093622
59J	<i>R. sativus</i>	Saga, Saga, Japan	1996	BR	Tomimura et al., 2003	AB093620
AD178J	<i>R. sativus</i>	Rokunohe, Aomori, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252094
AD181J	<i>R. sativus</i>	Tohoku, Aomori, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252095
AD853J	<i>R. sativus</i>	Ohhata, Aomori, Japan	2002	BR	Ohshima et al., 2007	AB252096
AD855J	<i>R. sativus</i>	Ohminato, Aomori, Japan	2002	BR	Ohshima et al., 2007	AB252097
AD860J	<i>R. sativus</i>	Sennai, Aomori, Japan	2002	BR	Ohshima et al., 2007	AB252098
AKD161J	<i>R. sativus</i>	Ogachi, Akita, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252099
AKD934J	<i>R. sativus</i>	Hachiryu, Akita, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252100
AKH937J	<i>B. pekinensis</i>	Yuzawa, Akita, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252101
AT181J	<i>Eustoma russellianum</i>	Aomori, Aomori, Japan	<1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252102
BJ-B01	<i>B. oleracea</i>	Beijing, Beijing, China	2010	Not known		KC119185
BJ-B02	<i>B. oleracea</i>	Beijing, Beijing, China	2010	Not known		KC119186
BJ-B03	<i>B. oleracea</i>	Beijing, Beijing, China	2010	Not known		KC119187
BJ-B04	<i>B. oleracea</i>	Beijing, Beijing, China	2009	Not known		KC119188
BJ-B05	<i>B. oleracea</i>	Beijing, Beijing, China	2009	Not known		KC119189
BJ-C4	<i>B. oleracea</i>	Beijing, Beijing, China	1985-1987	Not known		HQ446217
BJ-R01	<i>R. sativus</i>	Beijing, Beijing, China	2010	Not known		KC119184
C1	Not known	-, -, Taiwan	Not known	Not known		AF394601
C42J	<i>B. rapa</i>	Saga, Saga, Japan	1993	B	Tomimura et al., 2003	AB093625
CH6						
CHK16	<i>R. sativus</i>	Guilin, Guangxi, China	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252104
CHK16	<i>R. sativus</i>	Guilin, Guangxi, China	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252104
CHL13	<i>R. sativus</i>	Lushun, Liaoning, China	1999	BR	Ohshima et al., 2007	AB252105
CHN 1	<i>Brassica</i> sp.	-, -, Taiwan	<1980	BR	Tomimura et al., 2003	AB093626

^a Host type B; *Brassica*, isolates infected *B. rapa* cv. Hakatasuware systemically giving mosaic symptoms. Host type (B); isolates infected *B. rapa* only occasionally. Host type BR; these isolates infected both *B. rapa* and *R. sativus* systemically giving mosaic symptoms. Host type B(R); isolates infected *B. rapa* systemically giving mosaic symptoms and infected *R. sativus* only occasionally.

^b Difficult to infect brassica plants

^c Unclear

Table 2. cont.

Isolate	Original host	Location (City, District, Country)	Year of collection	Host type	Reference	Accession code
CHN 12	Not known	-, -, China	<1990	B	Jenner et al., 2002	AY090660
CHZJ26A	<i>B. campestris</i>	Jiande, Zhejiang, China	1999	B(R)	Ohshima et al., 2007	AB252106
CP845J	<i>Calendula officinalis</i>	Kisarazu, Chiba, Japan	1997	BR	Tomimura et al., 2003	AB093614
DMJ	<i>R. sativus</i>	-, Tochigi, Japan	1996	BR	Tomimura et al., 2003	AB093623
FD27J	<i>R. sativus</i>	Fukuoka, Fukuoka, Japan	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093618
FKD001J	<i>R. sativus</i>	Sukagawa, Fukushima, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252109
FKD004J	<i>R. sativus</i>	Funehiki, Fukushima, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252110
FKH122J	<i>B. pekinensis</i>	Naraha, Fukushima, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252111
GFD462J	<i>R. sativus</i>	Yoro, Gifu, Japan	2001	BR	Ohshima et al., 2007	AB252115
H1J	<i>R. sativus</i>	Hirosaki, Aomori, Japan	1996	BR	Ohshima et al., 2007	AB252118
HOD517J	<i>R. sativus</i>	Kimobetsu, Hokkaido, Japan	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093617
HRD	<i>R. sativus</i>	Hongzhou, Zhejiang, China	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093627
HZ6	<i>Brassica</i> sp.	Xiaoshan, Zhejiang, China	1998	B	Ohshima et al., 2007	AB252119
Asia						
IWD032J	<i>R. sativus</i>	Iwaizumi, Iwate, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252120
IWD038J	<i>R. sativus</i>	Yahaba, Iwate, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252121
Ka1J	<i>B. pekinensis</i>	-, Tochigi, Japan	1994	BR	Tomimura et al., 2003	AB093624
KD32J	<i>R. sativus</i>	Nankan, Kumamoto, Japan	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093621
KGD54J	<i>R. sativus</i>	Sendai, Kagoshima, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252123
KWB778J	<i>B. oleracea</i>	Takamatsu, Kagawa, Japan	2004	B	Ohshima et al., 2007	AB252124
KWB779J	<i>B. rapa</i>	Takamatsu, Kagawa, Japan	2004	BR	Ohshima et al., 2007	AB252125
KYD073J	<i>R. sativus</i>	Mineyama, Kyoto, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252126
KYD81J	<i>R. sativus</i>	Joyo, Kyoto, Japan	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093613
Lu2	<i>Brassica</i> sp.	-, Shandong, China	1986-1990	Not known		HQ446216
MED302J	<i>R. sativus</i>	Shiroyama, Mie, Japan	2001	BR	Ohshima et al., 2007	AB252127
MYD013J	<i>R. sativus</i>	Yamamoto, Miyagi, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252128
MYD015J	<i>R. sativus</i>	Kesennuma, Miyagi, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252129
ND10J	<i>R. sativus</i>	Hirato, Nagasaki, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252130
NDJ	<i>R. sativus</i>	Takaki, Nagasaki, Japan	1997	BR	Tomimura et al., 2003	AB093616
NID048J	<i>R. sativus</i>	Niitsu, Niigata, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252131
NID119J	<i>R. sativus</i>	Yuzawa, Niigata, Japan	1998	BR	Ohshima et al., 2007	AB252132
NRD350J	<i>R. sativus</i>	Gojyo, Nara, Japan	2001	BR	Ohshima et al., 2007	AB252134
RC4	<i>Zantedeschia</i> sp.	-, -, Taiwan	2000	BR	Chen et al., 2003	AY134473
SGB088J	<i>B. rapa</i>	Hikone, Shiga, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252136
SGD311J	<i>R. sativus</i>	Nishiiazai, Shiga, Japan	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093619
SMD060J	<i>R. sativus</i>	Gotsu, Shimane, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252137
TANX2	<i>R. sativus</i>	Tai'an, Shandong, China	2007	BR	Wang et al., 2009	EU734433
TD88J	<i>R. sativus</i>	Tokyo, Tokyo, Japan	1998	BR	Tomimura et al., 2003	AB093615
TRD052J	<i>R. sativus</i>	Akasaki, Tottori, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252138
TRD053J	<i>R. sativus</i>	Tomari, Tottori, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252139
Tu-2R1	<i>R. sativus</i>	-, Tochigi, Japan	Not known	BR	Suehiro et al., 2004	AB105135
Tu-3	<i>B. oleracea</i>	-, Tochigi, Japan	Not known	B	Suehiro et al., 2004	AB105134
TW	Not known	-, -, Taiwan	Not known	Not known		AF394602
VIET15	<i>R. sativus</i>	Van Giang, Hung Yen, Vietnam	2006	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747286
VIET56	<i>B. juncea</i>	Moc Chau, Son La, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747287
VIET58	<i>B. juncea</i>	Moc Chau, Son La, Vietnam	2007	BR	Nguyen et al., 2013b	AB747288
VIET65	<i>R. sativus</i>	Gia Lam, Ha Noi, Vietnam	2007	BR	Nguyen et al., 2013b	AB747289
VIET66	<i>R. sativus</i>	Gia Lam, Ha Noi, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747290
VIET73	<i>R. sativus</i>	Van Giang, Hung Yen, Vietnam	2007	BR	Nguyen et al., 2013b	AB747291
VIET79	<i>R. sativus</i>	Cam Giang, Hai Dung, Vietnam	2007	BR	Nguyen et al., 2013b	AB747292
VIET80	<i>R. sativus</i>	Cam Giang, Hai Dung, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747293
VIET82	<i>R. sativus</i>	Ban Me Thuot, Dak Lak, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747294
VIET83	<i>R. sativus</i>	Ban Me Thuot, Dak Lak, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747295
VIET89	<i>R. sativus</i>	Ban Me Thuot, Dak Lak, Vietnam	2007	BR	Nguyen et al., 2013b	AB747296
VIET138	<i>B. juncea</i>	Thanh Long, Thua Thien Hue, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747297
VIET153	<i>B. juncea</i>	Hoi An, Quang Nam, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747298
VIET158	<i>B. juncea</i>	Gia Lam, Ha Noi, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747299
VIET159	<i>B. juncea</i>	-, Lang Son, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747300
VIET160	<i>B. juncea</i>	Huu Lung, Lang Son, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747301
VIET164	<i>B. juncea</i>	Thuong Tin, Ha Tay, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747302
VIET166	<i>B. juncea</i>	Thuong Tin, Ha Tay, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747303
VIET167	<i>B. juncea</i>	Gia Lam, Ha Noi, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747304
VIET169	<i>B. juncea</i>	Vo Cuong, Bac Ninh, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747305
VIET170	<i>B. juncea</i>	Vo Cuong, Bac Ninh, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747306
VIET172	<i>B. juncea</i>	Gia Lam, Ha Noi, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747307
VIET173	<i>B. juncea</i>	Viet Yen, Bac Giang, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747308
VIET174	<i>B. juncea</i>	Viet Yen, Bac Giang, Vietnam	2007	B	Nguyen et al., 2013b	AB747309
VIET175	<i>B. juncea</i>	Viet Yen, Bac Giang, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747310
VIET176	<i>B. juncea</i>	Vu Thu, Thai Binh, Vietnam	2007	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747311
VIET177	<i>B. juncea</i>	Vu Thu, Thai Binh, Vietnam	2008	B	Nguyen et al., 2013b	AB747312
VIET178	<i>B. juncea</i>	Nam Truc, Nam Dinh, Vietnam	2008	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747313
VIET179	<i>B. juncea</i>	Nam Truc, Nam Dinh, Vietnam	2008	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747314
VIET180	<i>B. juncea</i>	Viet Yen, Bac Giang, Vietnam	2008	B(R)	Nguyen et al., 2013b	AB747315
YAD020J	<i>Raphanus sativus</i>	Shirataka, Yamagata, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252140
YAL018J	<i>Lactuca sativa</i>	Sakae, Yamagata, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252141
YC5	<i>Zantedeschia</i> sp.	-, -, Taiwan	2000	BR	Chen et al., 2003	AF530055
YMD069J	<i>R. sativus</i>	Misumi, Yamaguchi, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252142
YMD070J	<i>R. sativus</i>	Abu, Yamaguchi, Japan	2000	BR	Ohshima et al., 2007	AB252143
WFLB06	<i>R. sativus</i>	Weifang, Shandong, China	2006	BR	Wang et al., 2009	EU734434
ZH1	<i>Phalaenopsis</i> sp.	-, -, China	2012	Not known		KF246570
Europe						
A102/11	<i>Anemone coronaria</i>	-, Liguria, Italy	1993	B	Tomimura et al., 2003	AB093597
A64	<i>A. coronaria</i>	-, Liguria, Italy	1991	B	Tomimura et al., 2003	AB093599

Table 2. cont.

Isolate	Original host	Location (City, District, Country)	Year of collection	Host type	Reference	Accession code
Europe						
AI	<i>Alliaria officinalis</i>	-, Piedmont, Italy	1968	(B)	Tomimura et al., 2003	AB093598
ALLA	<i>A. officinalis</i>	-, -, Denmark	1991	B	Nguyen et al., 2013a	AB701694
ASP	<i>Allium</i> sp.	Gatersleben, Sachsen-Anhalt, Germany	1995	B	Nguyen et al., 2013a	AB701697
BEL 1	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	Wavre, Walloon Brabant, Belgium	1986	B	Nguyen et al., 2013a	AB701698
Ca11	<i>Calendula officinalis</i>	-, Liguria, Italy	1979	BR	Tomimura et al., 2003	AB093601
CAR37	<i>Cochlearia armoracia</i>	-, -, Poland	2004	Not known	Kozubek et al., 2007	DQ648592
CAR37A	<i>C. armoracia</i>	-, -, Poland	2004	Not known	Kozubek et al., 2007	DQ648591
CAR39	<i>C. armoracia</i>	-, -, Poland	2004	Not known		EF374098
CAR51	<i>C. armoracia</i>	-, -, Poland	2004	Not known		HQ637383
CRO184A	<i>Brassica napus</i>	Zagreb, Zagreb, Croatia	15. 5. 2009	Not known	Musić et al., 2014	KF595121
CZE 1	<i>B. oleracea</i>	Ruzyne-Prague, Prague, Czech Republic	1981	B	Tomimura et al., 2003	AB093608
CZE 5	<i>B. rapa</i>	Ceske Budejovice, South Bohemian Region, Czech Republic	1993	B	Ohshima et al., 2007	AB252107
DEU 1	Not known	-, -, Germany	<1976	B	Nguyen et al., 2013a	AB701699
DEU 2	<i>Raphanus sativus</i>	-, -, Germany	<1993	B	Nguyen et al., 2013a	AB701700
DEU 4	<i>Lactuca sativa</i>	Stuttgart, Baden-Württemberg, Germany	1986	BR	Nguyen et al., 2013a	AB701701
DEU 5	<i>L. sativa</i>	Monchengladbach, Nordrhein-Westfalen, Germany	1991	B	Nguyen et al., 2013a	AB701702
DEU 7	<i>L. sativa</i>	Frankfurt, Hessen, Germany	1994	B	Nguyen et al., 2013a	AB701695
DNK 2	<i>B. napus</i>	-, -, Denmark	<1993	B	Ohshima et al., 2007	AB252108
DNK 3	<i>B. rapa</i>	-, -, Denmark	1978	B	Ohshima et al., 2007	AB701703
DNK 4	<i>B. rapa</i>	-, -, Denmark	1986	B	Nguyen et al., 2013a	AB701704
Eru 1D	<i>Eruca sativa</i>	-, Piedmont, Italy	1991	B	Nguyen et al., 2013a	AB701705
ESP 1	<i>Eruca vesicaria</i> subsp. <i>sativa</i>	-, -, Spain	2001	B	Nguyen et al., 2013a	AB701706
ESP 2	<i>Sisymbrium orientale</i>	Las Matas, Aragón, Spain	2001	B	Nguyen et al., 2013a	AB701707
FRA 2	<i>B. napus</i>	-, -, France	<1994	B	Nguyen et al., 2013a	AB701708
FRD 1	<i>B. oleracea</i>	-, -, Germany	1987	B	Ohshima et al., 2007	AB252112
GBR 7	<i>Rheum rhubarbarum</i>	-, Gloucestershire, UK	15.9.1993	B	Nguyen et al., 2013a	AB701709
GBR 8	<i>Lunaria annua</i>	-, Essex, UK	20.4.1994	B	Nguyen et al., 2013a	AB701710
GBR 27	<i>B. oleracea</i>	Kimmeridge, Dorset, UK	24.3.1999	B	Nguyen et al., 2013a	AB701711
GBR 30	<i>B. oleracea</i>	Kimmeridge, Dorset, UK	26.4.1999	B	Nguyen et al., 2013a	AB701712
GBR 31	<i>B. oleracea</i>	Chapman's Pool, Dorset, UK	26.4.1999	B	Nguyen et al., 2013a	AB701713
GBR 32	<i>B. oleracea</i>	Chapman's Pool, Dorset, UK	26.4.1999	B	Nguyen et al., 2013a	AB701714
GBR 36	<i>B. oleracea</i>	Winspit, Dorset, UK	18.6.1999	B	Ohshima et al., 2007	AB252113
GBR 38	<i>B. oleracea</i>	Winspit, Dorset, UK	15.7.1999	B	Nguyen et al., 2013a	AB701715
GBR 50	wild <i>B. oleracea</i>	Staithe, Yorkshire, UK	28.9.1999	B	Ohshima et al., 2007	AB252114
GBR 51	wild <i>B. oleracea</i>	Staithe, Yorkshire, UK	28.9.1999	B	Ohshima et al., 2013a	AB701742
GBR 57	wild <i>B. oleracea</i>	Llandudno, Conwy, UK	12.9.2000	B	Nguyen et al., 2013a	AB701716
GBR 83	wild <i>B. oleracea</i>	Llandudno, Conwy, UK	20.8.2002	B	Nguyen et al., 2013a	AB701717
GBR 91	wild <i>B. oleracea</i>	Llandudno, Conwy, UK	20.8.2002	B	Nguyen et al., 2013a	AB701718
GBR 98	wild <i>B. oleracea</i>	Winspit, Dorset, UK	28.8.2002	B	Pallett et al., 2007	EU861593
GK1	<i>Matthiola incana</i>	-, -, Greece	<1989	B	Nguyen et al., 2013a	AB701696
GRC 17	<i>B. oleracea</i>	Volos, Magnesia, Greece	1993	B	Ohshima et al., 2007	AB252116
GRC 42	wild <i>Allium</i> sp.	-, -, Greece	1999	B	Ohshima et al., 2007	AB252117
HUN 1	<i>Alliaria petiolata</i>	-, -, Hungary	<1996	B	Nguyen et al., 2013a	AB701719
ITA 1A	<i>Brassica ruvo</i>	-, Campania, Italy	1990	B	Nguyen et al., 2013a	AB701720
ITA 2	<i>Cheiranthus cheiri</i>	-, Campania, Italy	1992	BR	Nguyen et al., 2013a	AB701721
ITA 3	<i>B. ruvo</i>	-, Campania, Italy	1990	B	Ohshima et al., 2007	AB252122
ITA 4	<i>B. rapa</i>	-, Campania, Italy	1990	B	Nguyen et al., 2013a	AB701722
ITA 5	<i>B. ruvo</i>	-, Campania, Italy	1990	B	Nguyen et al., 2013a	AB701723
ITA 6	<i>M. incana</i>	-, Campania, Italy	1992	B	Nguyen et al., 2013a	AB701724
ITA 7	<i>R. raphanistrum</i>	-, Campania, Italy	1990	BR	Tomimura et al., 2003	AB093600
ITA 8	<i>Abutilon</i> sp.	-, Piedmont, Italy	09.1993	BR	Nguyen et al., 2013a	AB701725
ITA 9A	<i>Cucurbita pepo</i>	-, -, Italy	<1995	B	Nguyen et al., 2013a	AB701726
NLD 1	<i>B. oleracea</i>	-, -, The Netherlands	<1995	B	Ohshima et al., 2007	AB252133
NLD 2	<i>B. oleracea</i>	-, -, The Netherlands	<1995	B	Nguyen et al., 2013a	AB701727
OM-A	<i>Orchis militaris</i>	Celle, Lower Saxony, Germany	1981	DI ^f	Nguyen et al., 2013a	AB701691
OM-N	<i>O. militaris</i>	Celle, Lower Saxony, Germany	1981	DI	Nguyen et al., 2013a	AB701690
ORM	<i>O. morio</i>	Celle, Lower Saxony, Germany	1983	(B)	Nguyen et al., 2013a	AB701692
OS	<i>O. simia</i>	Celle, Lower Saxony, Germany	1981	DI	Nguyen et al., 2013a	AB701693
POL 1	<i>B. napus oleifera</i>	Poznan, Wielkopolska, Poland	<4.10.1993	B	Nguyen et al., 2013a	AB701728
POL 2	<i>Papaver somniferum</i>	Czempin, -, Poland	<4.10.1993	B	Nguyen et al., 2013a	AB701731
POL 4	<i>B. napus oleifera</i>	Grabianowo, Wielkopolska, Poland	<4.10.1993	B	Nguyen et al., 2013a	AB701732
PRT 1	<i>B. oleracea acephala</i>	-, Madeira, Portugal	1993/1994	B	Nguyen et al., 2013a	AB701729
PV0054	<i>B. oleacea</i>	-, -, Germany	Not known	BR	Nguyen et al., 2013a	AB701730
PV0104	<i>L. sativa</i>	Stuttgart, Baden-Württemberg, Germany	1986	BR	Tomimura et al., 2003	AB093603
PV376-Br	<i>B. napus</i>	Braunschweig, Lower Saxony, Germany	1970	B	Tomimura et al., 2003	AB093604
Rn98	<i>Ranunculus asiaticus</i>	-, Liguria, Italy	1997	B	Ohshima et al., 2007	AB252135
RUS 1	<i>Armoracia rusticana</i>	-, -, Russia	1993	B	Tomimura et al., 2003	AB093606
RUS 2	<i>B. napus</i>	Moscow, Moscow, Russia	Not known	B	Tomimura et al., 2003	AB093607
St48	<i>Limonium sinuatum</i>	-, Toscana, Italy	1993	B	Tomimura et al., 2003	AB093596
TIGA	<i>Tigridia</i> sp.	Braunschweig, Lower Saxony, Germany	1983	(B)	Nguyen et al., 2013a	AB701734
TIGD	<i>Tigridia</i> sp.	Braunschweig, Lower Saxony, Germany	1983	(B)	Nguyen et al., 2013a	AB701735
UK 1	<i>B. napus</i>	-, Warwickshire, UK	1975	B	Jenner et al., 2000	AF169561
UT	<i>Utricularia</i> sp.	Wuerzburg, Bayern, Germany	1997	B	Nguyen et al., 2013a	AB701736

Table 2. cont.

Isolate	Original host	Location (City, District, Country)	Year of collection	Host type	Reference	Accession code
Other						
BZ1	<i>B. oleracea</i>	-, Federal, Brazil	1996	B	Tomimura et al., 2003	AB093611
CDN 1	<i>B. napus napobrassica</i>	-, -, Canada	<1988	B	Jenner et al., 2003	AY227024
IRNTRa6	<i>Rapistrum rugosum</i>	Varamin, Tehran, Iran	2004	B	Farzadfar et al., 2009	AB440238
IRNSS5	<i>Sisymbrium loeselii</i>	Semnan, Semnan, Iran	2003	B	Farzadfar et al., 2009	AB440239
IS1	<i>Allium ampeloprasum</i>	-, -, Israel	1993	B	Tomimura et al., 2003	AB093602
KEN 1	<i>B. oleracea</i>	-, -, Kenya	1994	B	Tomimura et al., 2003	AB093605
PV134	<i>Sesynibium</i> sp.	-, California, USA	<1960	B	Nguyen et al., 2013a	AB701737
PV389	<i>Tulipa gesnerana</i>	Beltsville, Maryland, USA	1986	B	Nguyen et al., 2013a	AB701738
Q-Ca	<i>B. rapa</i>	-, -, Canada	Not known	Not known	Nicolas & Laliberté, 1991	D10927
TUR1	<i>B. oleracea</i>	Canakkale, Marmora, Turkey	2004	B	Korkmaz et al., 2008	AB362512
TUR9	<i>R. sativus</i>	Balikesir, Marmora, Turkey	2005	BR	Korkmaz et al., 2008	AB362513
USA 1	<i>B. oleracea</i>	-, -, USA	<1980	B	Tomimura et al., 2003	AB093609
USA 4	<i>B. pekinensis</i>	-, -, USA	1993	B	Nguyen et al., 2013a	AB701739
USA 5	<i>R. sativus</i>	San Francisco, California, USA	2002	BR	Nguyen et al., 2013a	AB701740
USA 6	<i>R. sativus</i>	San Francisco, California, USA	2002	BR	Nguyen et al., 2013a	AB701741

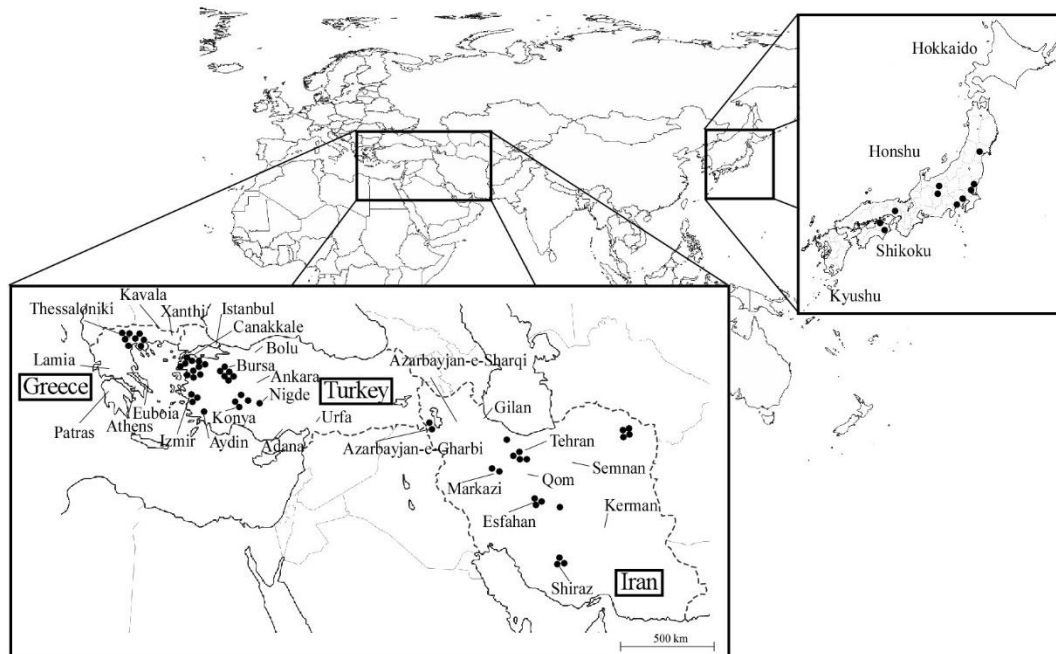


Fig. 5. Map showing the provenance of *Cauliflower mosaic virus* isolates which were studied. Dots on the map correspond to the isolates listed in Table 1.

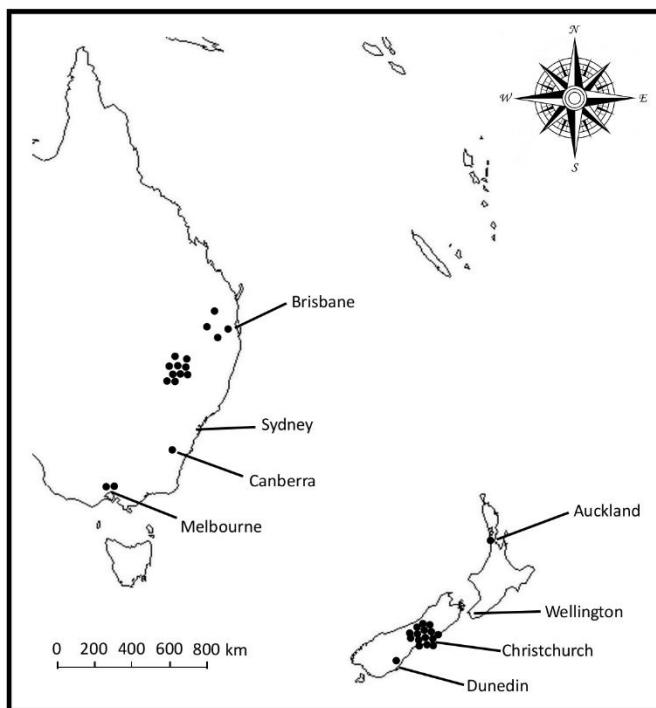


Fig. 6. Maps showing the provenance of the *Turnip mosaic virus* isolates from Australia and New Zealand that were studied. Dots on the map correspond to the isolates listed in Table 2.

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を乳鉢に入れて磨碎し、カーボランダム (600 メッシュ) を用いた塗沫接種によりウイルスの接種を行った。

3. 宿主反応調査

CaMV については、カブ (品種; 博多据わり), カリフラワー (品種; スノークイーン), ブロッコリー (品種; チャレンジャー), キャベツ (品種; 新星, 早秋および稜山 2 号), タアサイ (品種; タアサイ), ナタネ (品種; 大粒), ハクサイ (品種; 野崎 1 号), コールラビ (品種; グランデューク) を用いて宿主反応について検討した。

TuMV については、採集した分離株についてカブ (品種; 博多据わり), *C. quinoa*, ダイコン (品種; 秋まさり, 耐病総太りおよびエベレスト), カラシナ (品種; 葉からし菜), ナタネ (品種; 農林 32 号), キャベツ (品種; 稜山 2 号および新星), ハクサイ (品種; 野崎 1 号および結球京都 3 号) の宿主反応について検討した。接種した植物を約 1 ヶ月間, ガラス室内で育成し, 病徴を観察した後, 病徴が不明瞭な植物および病徴が認められなかった植物について, 二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法 (Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay; DAS-ELISA) (Clark & Adams, 1977) によって感染の有無を確認した (Fig. 7)。DAS-ELISA は初めに炭酸・重炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈した IgG (1.25 μ l/ml) をマイクロウェルプレートに CaMV の場合 100 μ l, TuMV の場合 200 μ l ずつ分注し, 37°C で 3 時間静置した。その後プレートに吸着しなかった IgG を除くため, 0.05% の Tween-20 を含む 0.02M リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS-Tween) で 3 回洗浄した後, 磨碎した粗汁液を 100 あるいは 200 μ l ずつ分注し, 4°C で一晩静置した。IgG と結合しなかった抗原を除くため 0.02M PBS-Tween で 3 回洗浄した後, 0.02M PBS-Tween で希釈したコンジュゲートを 100 あるいは 200 μ l ずつ分注し, 37°C で 3 時間静置した。さらに抗原と反応しなかった抗体を除くため, 0.02M PBS-Tween で 3 回洗浄した後, *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム 6 水和物 (1mg/ml) を溶解したジエタノールアミン溶液

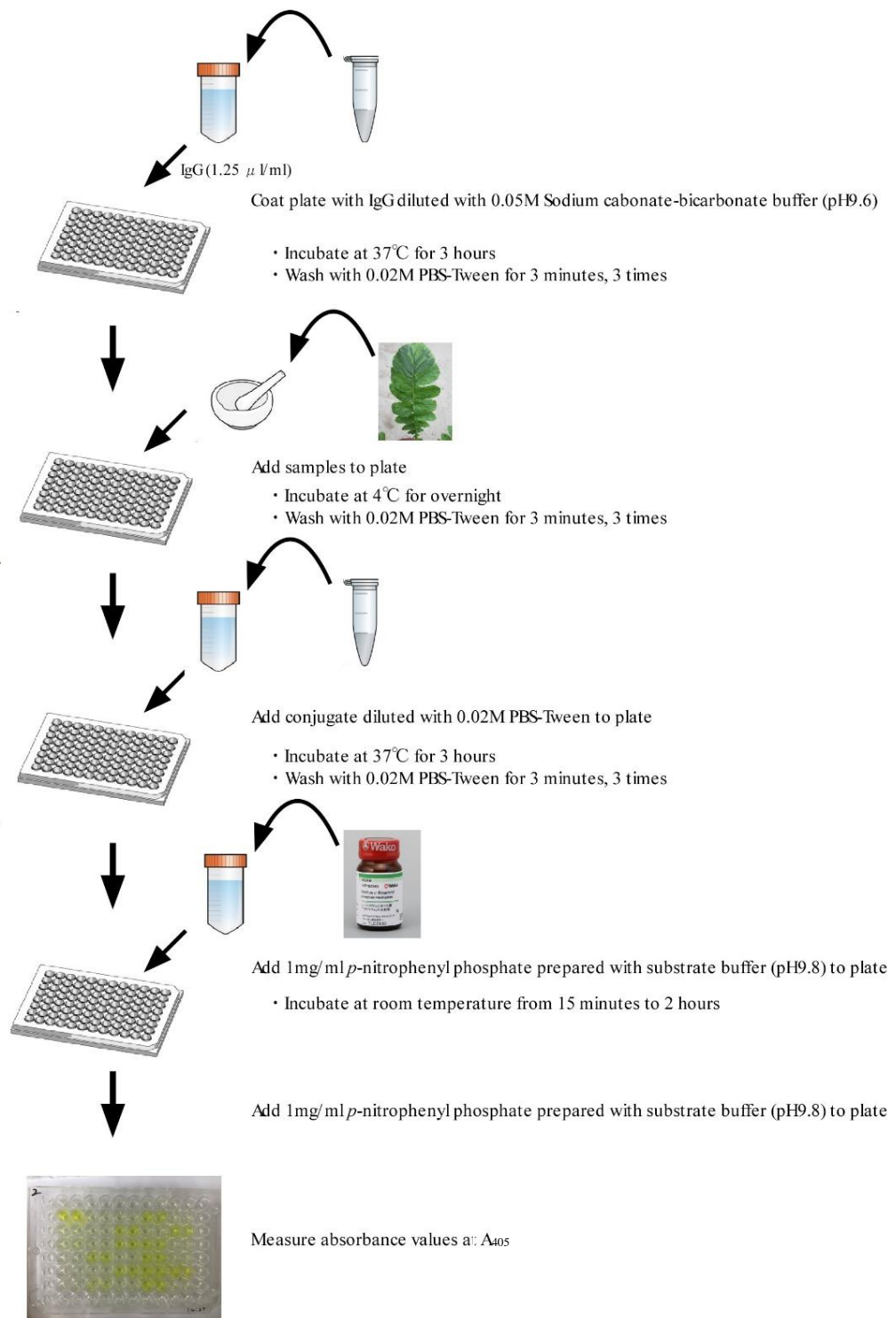


Fig. 7. Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA).

を 100 あるいは 200 μl ずつ分注した後、室温で静置して 15 分あるいは 30 分おきに吸光度を測定した。なお、吸光度 (A_{405}) が陰性コントロールの 2-3 倍以上の値を示した試料を陽性反応とした。

4. ウイルスゲノム構造の決定

A. カリフラワーモザイクウイルス

多くの分離株についてはダイレクトシーケンス法にて塩基配列決定を行ったが、21 分離株についてはポリメラーゼ連鎖反応産物では検出した蛍光シグナルが重複し、一部ゲノム領域の塩基配列決定が困難であったため、クローニングを行い塩基配列を決定した。

a. 合成プライマーの設計

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および塩基配列の決定に用いたプライマーを、既に植物ウイルス病制御学研究室で決定されている CaMV ゲノムの塩基配列および国際塩基配列データベースに登録されている CaMV ゲノムの塩基配列をもとに設計した (データ未掲載)。

b. ウイルス核酸抽出

CaMV 感染葉から DNAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) (Fig. 8) を用い、プロトコールに準じて全 DNA を抽出した。抽出した全 DNA を DEPC-Treated Water (アンピオン) に溶解して分光光度計 GeneQuant pro (アマーシャムファルマシア バイオテック) で吸光度を測定し、 $OD_{260}=20$ を $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ とし、全 DNA 濃度を算出した。

c. ポリメラーゼ連鎖反応産物による塩基配列の決定

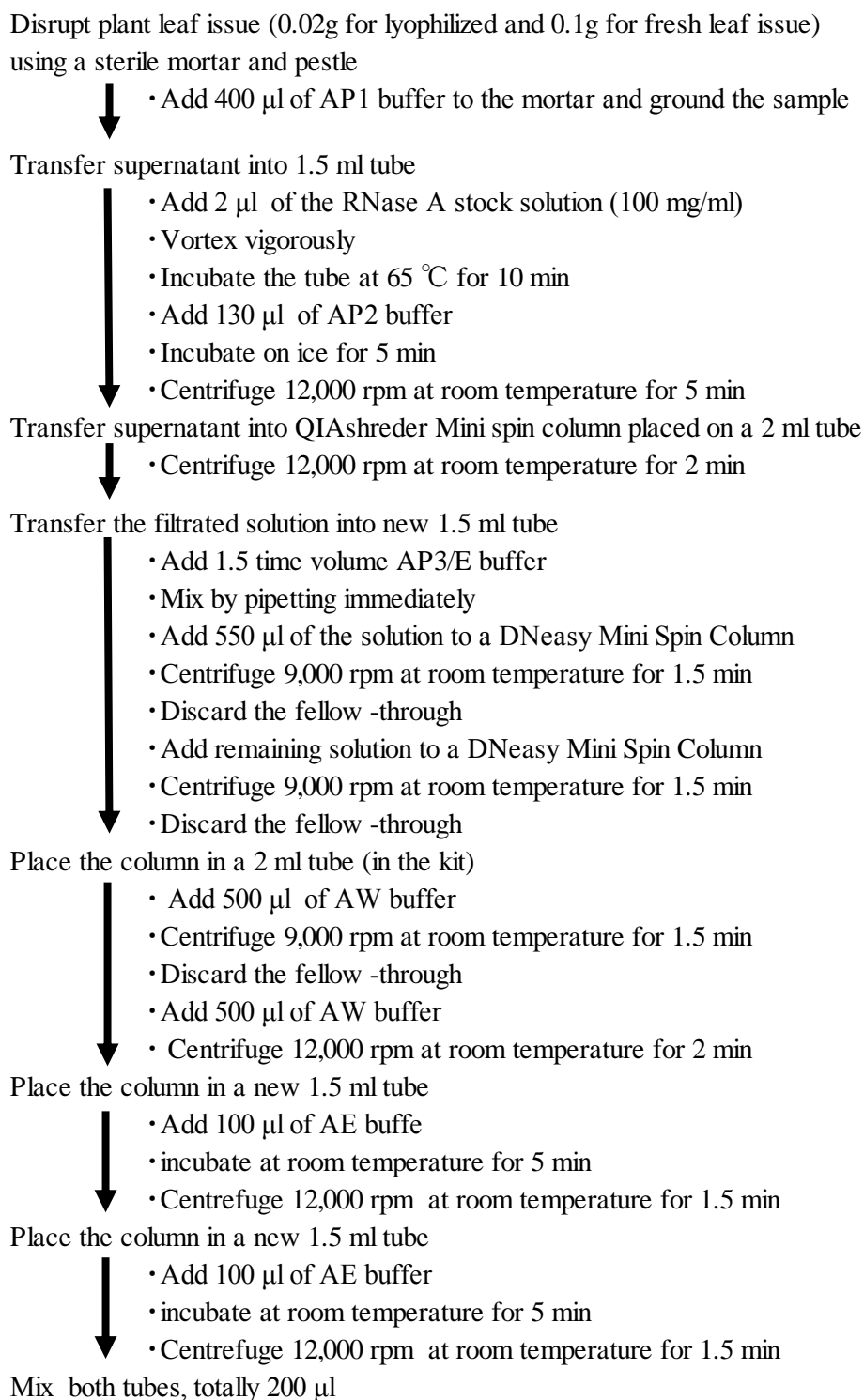


Fig. 8. DNA extraction by QIAGEN, DNeasy Plant Mini Kit.

DNA 増幅機 iCycler (バイオラッド) およびジーンアトラス (アステック) で PCR を行った。PCR 反応は PLATINUMTM Pfx DNA polymerase (インビトロジェン) を用い、変性 94°C (2分) を 1 サイクル、変性 94°C (15 秒)-アニーリング 40°C (30 秒)-伸長 68°C (3分) のセットを 30 サイクル、伸長 4°C (10 分) を 1 サイクルの条件下で行った (Fig. 9)。PCR 後の反応液 50µl 中 2µl を 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試し、目的とする ds DNA の増幅を確認し、これを PCR 産物とした (Fig. 9)。PCR 産物を 0.7 % アガロースゲル電気泳動に供試し、UV ランプ照射下で目的とするバンドを切り出した。その後、Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてプロトコールに従って DNA を精製後、エタノール沈殿によりさらに純化した (Fig. 10)。なお、カラムから DNA を溶出する際、50µl の 10mM Tris-HCl (pH8.5) を用いた。

塩基配列の決定には、Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ; ABI) を用いた。精製した DNA, DDW, プライマー (2, 4, 8 pmol), 5×Sequence buffer および Big Dye Terminator v 3.1 を加えて混和後、iCycler (バイオラッド) で PCR を行った (Fig. 11)。その後、余分な蛍光 ddNTP を除くためエタノール沈殿を行い乾燥後、使用するまでの試料を -80°C で遮光保存した (Fig. 11)。使用直前に、沈殿を 40µl の Hi-Di Formamide (ABI) に溶解し、2 分間煮沸後、急冷により DNA を変性させ、20µl をジェネティックアナライザー用サンプルチューブに移し、ジェネティックアナライザー 310 および 3130 (ABI) で塩基配列の解析を行った。塩基配列の決定および推測されるアミノ酸の解析には DNASIS version3.5 (日立) および BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999) を使用した。

d. クローニング産物による塩基配列の決定

増幅プライマーはポリメラーゼ連鎖反応による塩基配列で使用した時と同様のプライマーを用いた。また塩基配列の決定には M13 Forward Primer (アプライ

Polymerase chain reaction (PCR) mixture	
DDW	28 μ l
10mM dNTPs	1 μ l
10 \times <i>Pfx</i> Amplification buffer	5 μ l
10 \times PCR Enhancer Solution	5 μ l
50 mM MgSO ₄	2 μ l
DNA	5 μ l
Plus sense primer (10 pmol/ μ l)	1.5 μ l
Minus sense primer (10 pmol/ μ l)	1.5 μ l
PLATINUM™ <i>Pfx</i> DNA Polymerase	0.33 μ l
Total	50 μ l



• Vortex and short spin

PCR cycle	
94°C (2 min)	1 cycle
94°C (15 sec) – 45°C (30 sec) – 68°C (3 min)	40 cycles
4°C (10 min) – 25°C (∞)	1 cycle

50 \times Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer	
Tris	60.5 g
Acetic acid	14.275 ml
0.5M EDTA \cdot 2NA	25 ml
Fill up to 250 ml with DDW	



Dilute 50 times to prepare 1 \times TAE buffer with DDW

0.7% Agarose gel	
Agarose	0.14 g
Ethidium bromide (250 μ g/ μ l)	20 μ l
50 \times TAE	800 μ l
DDW	20 ml

Fig. 9. Procedure for polymerase chain reaction and composition of Tris-Acetate-EDTA buffer and agarose gel.

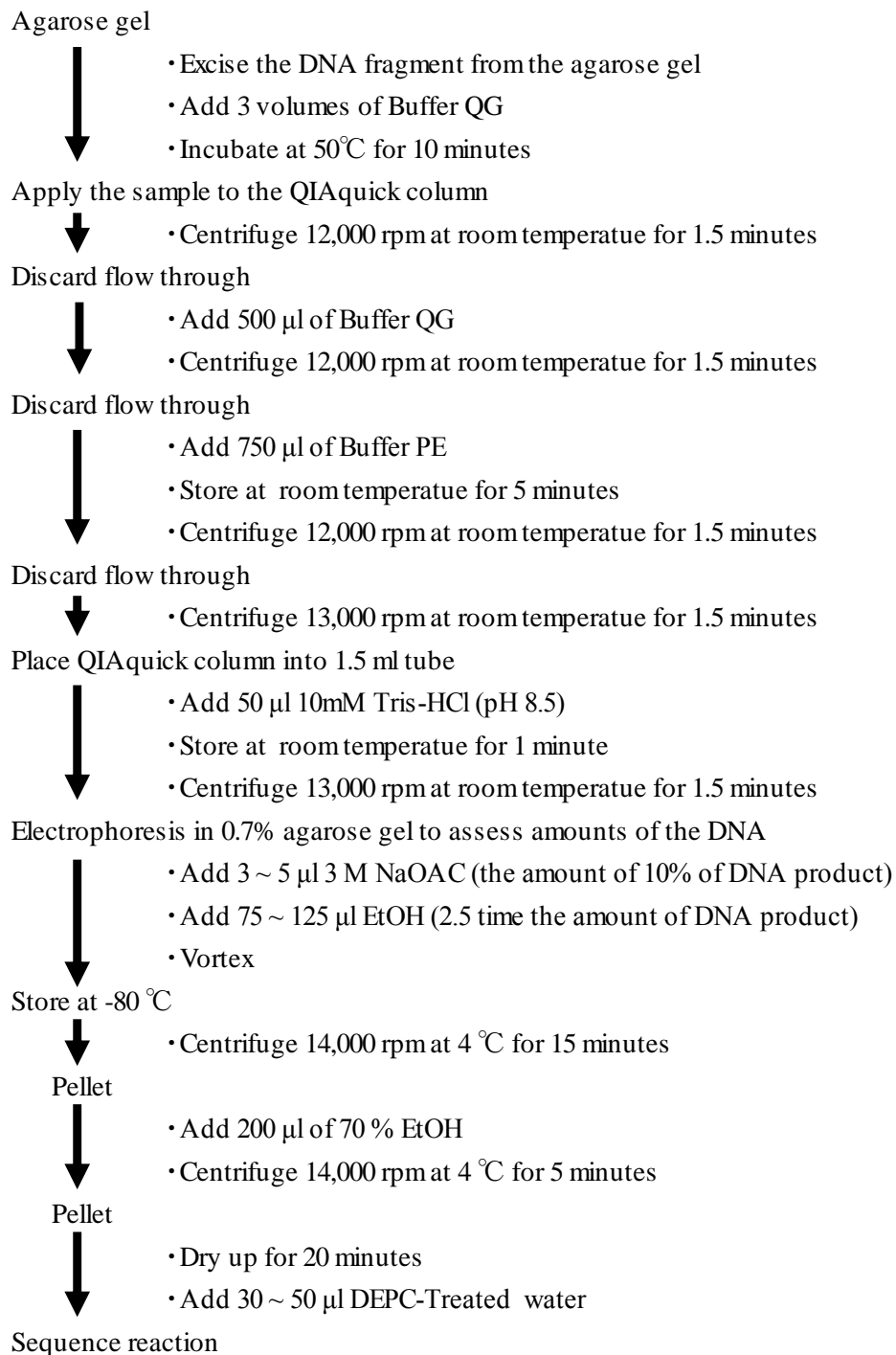


Fig. 10. DNA extraction by QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) and EtOH ppt.

PCR	
DDW	X μ l
5 \times Sequence buffer	2.0 μ l
Primer (2 pmol/ μ l, 4 pmol/ μ l or 8 pmol/ μ l)	1.5 μ l
cDNA (Total 66 ng)	Y μ l
BigDye Terminator v3.1	0.5 μ l
Total	10 μ l



- Vortex and short spin

PCR cycle	
96°C (1 min)	1 cycle
96°C (10 sec) - 50°C (5 sec) - 60°C (75 sec)	15 cycles
96°C (10 sec) - 50°C (5 sec) - 60°C (90 sec)	5 cycles
96°C (10 sec) - 50°C (5 sec) - 60°C (120 sec)	5 cycles
25°C (∞)	



- Add 10 μ l DDW
- Add 2 μ l of 125 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA)
- Add 2 μ l of 3 M sodium acetate (pH4.6)
- Add 50 μ l 100% EtOH
- Vortex and short spin
- Incubate at 27°C for 15 minutes
- Centrifuge 14,000 rpm at room temperature for 20 minutes

Pellet



- Short spin

Pellet



- Add 200 μ l of 70% EtOH
- Centrifuge 14,000 rpm at room temperature for 5 minutes

Pellet



- Short spin

Pellet



- Dry up for 20 minutes using aspirator

Store at -80°C



Add 40 μ l Hi Di Formamide (Applied Biosystems) and boil for 2 minutes

Fig. 11. Polymerase chain reaction and EtOH/EDTA/sodium acetate precipitation for sequencing.

ドバイオシステム) を用いた。PCR 反応は上述した方法と同様に行った (Fig. 9)。

PCR 産物を精製するために PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて 10mM Tris-HCl (pH 8.5) で DNA を溶出し、エタノール沈殿を行った (Fig. 12)。

次に pZErO-2 (インビトロジェン) を EcoR V (ニッポンジーン) を用いて 37°C で 3 時間静置し、制限酵素部位の切断を行った。制限酵素部位を切断した pZErO-2 を精製するために、MiniElute Reaction Cleanup Kit (キアゲン) を用いて 10mM Tris-HCl (pH 8.5) で溶出し、エタノール沈殿を行った (Fig. 12)。精製した PCR 増幅産物およびベクターDNA を DDW で溶解した。それぞれ 1 μ l を 0.7% アガロースゲルに供試し、DNA 量を電気泳動で確認後、T4 DNA Ligase (ロシュ) を用いて 16°C で一晩インキュベートし、ライゲーションを行った (Fig. 12)。インサート DNA とベクターDNA はモル比が 6:1 となるように調整した。

大腸菌 DH5 α のコンピテントセルをルビジウムクロライド法 (Hanahan, 1985) により調整した (Fig. 12)。コンピテントセルとライゲーション反応液が 10:1 となるように混和し、ヒートショック法で大腸菌の形質転換を行った。その後、抗生物質であるカナマイシンを添加した LB 培地に塗布し、37°C で 18 から 20 時間培養した (Fig. 12)。

プラスミド DNA をボーリング法 (Holmes & Quigley, 1981) により抽出した (Fig. 12)。LB 培地に形成したコロニーを 2 ml の LB 培地に接種した。大腸菌は絶対好気性菌のため 37°C で 14 から 16 時間振盪培養した。その培養液を遠心分離し、沈殿に STET 溶液、STETL 溶液を添加し、100°C で 30 秒間煮沸後遠心分離した。その後生じた沈殿を殺菌した爪楊枝で取り除き、上清の 1 μ l を 0.7% アガロースゲルに供試し、電気泳動で目的の遺伝子を持つクローンを選抜した。その後 RNase A (ニッポンジーン) を最終濃度 0.01 (μ g/ μ l) になるように添加し 37°C で 30 分間反応させ RNA を分解した。反応後の溶液に等量のイソプロパノールを添加して遠心分離し、生じた沈殿をアスピレーターで乾燥させて DDW に溶解した溶液をプラスミド溶液とした。その後 MiniElute Reaction Cleanup Kit (キアゲン) を用いて、10mM Tris-HCl (pH8.5) 50 μ l で溶出し、エタノール沈殿を行った (Fig. 12)。

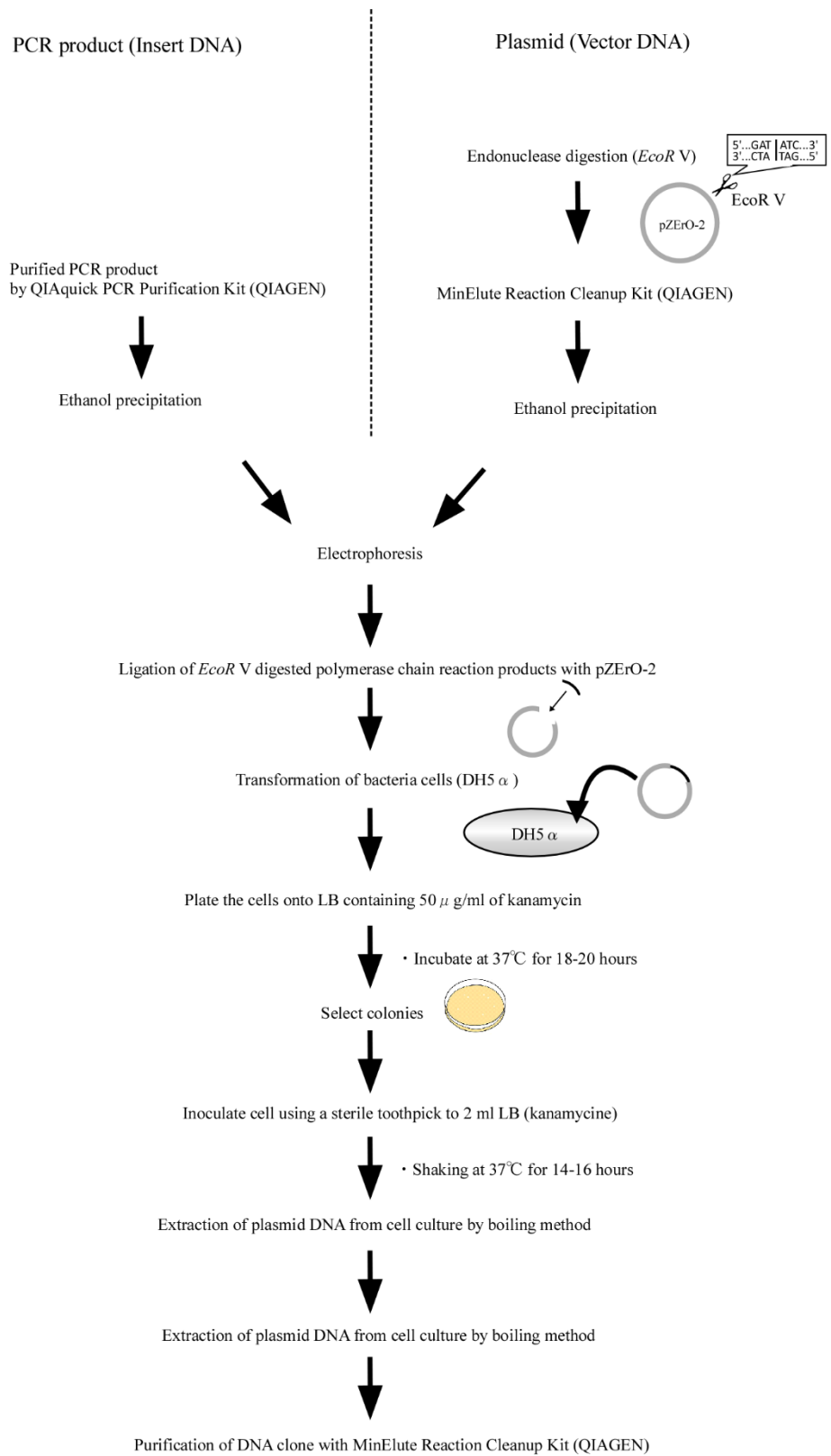


Fig. 12. Procedure of cloning.

塩基配列の決定はポリメラーゼ連鎖反応産物の塩基配列の決定 (Fig. 11) と同様の手順で行った (Fig. 13)。

B. カブモザイクウイルス

TuMV については全分離株において単一病斑分離を行った。シーケンシングの結果、単一の蛍光シグナルが得られたため実験に用いた全分離株についてダイレクトシーケンス法において全塩基配列決定を行った。

a. 合成プライマーの設計

カリフラワーモザイクウイルスの項目を参照。

b. ウイルス核酸抽出

TuMV を増幅させた感染葉からウイルス RNA を抽出するために ISOGEN II (ニッポンジーン) (Fig. 14) を用い、ニッポンジーンのプロトコールに準じて全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA を DEPC-Treated Water (ニッポンジーン) に溶解して分光光度計 BioSpectrometer (エッペンドルフ) で吸光度を測定し、 $OD_{260}=20$ を $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ として RNA 濃度を算出した。

c. 逆転写—ポリメラーゼ連鎖反応産物による塩基配列の決定

TuMV のゲノム RNA を鋳型にして、モロニー Maus 白血病ウイルス (*Moloney murine leukemia virus*; M-MLV) 逆転写酵素 (Prime Script Reverse Transcriptase; タカラバイオ) を用いて 42°C で 1 時間インキュベートし、一本鎖相補 DNA (ss cDNA) を合成した (Fig. 15)。逆転写反応で得られた ss cDNA から二本鎖相補 DNA (ds cDNA) を増幅させるため、PCR を行った。PCR は PLATINUM™ Pfx DNA polymerase (インビトロジェン), DNA 増幅機 iCycler (パ

Composition of sequencing reaction

DDW	X μ l
5 \times Sequence buffer	2.0 μ l
M13 Forward Primer (0.8 pmol/ μ l)	3.75 μ l
pDNA (Total 400 ng)	Y μ l
BigDye Terminator v3.1	0.5 μ l
Total	10 μ l



- Vortex and short spin

Sequencing reaction cycle

96°C (1 min)	1 cycle
96°C (10 sec) - 50°C (5 sec) - 60°C (75 sec)	15 cycles
96°C (10 sec) - 50°C (5 sec) - 60°C (90 sec)	5 cycles
96°C (10 sec) - 50°C (5 sec) - 60°C (120 sec)	5 cycles
25°C (∞)	



- Add 10 μ l DDW
- Add 2 μ l of 125 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA)
- Add 2 μ l of 3 M sodium acetate (pH4.6)
- Add 50 μ l 100% EtOH
- Vortex and short spin
- Incubate at 27°C for 15 minutes
- Centrifuge 14,000 rpm at room temperature for 20 minutes

Pellet



- Short spin

Pellet



- Add 200 μ l of 70% EtOH
- Centrifuge 14,000 rpm at room temperature for 5 minutes

Pellet



- Short spin

Pellet



- Dry up for 20 minutes using aspirator

Store at -80°C



Add 40 μ l Hi Di Formamide (Applied Biosystems) and boil for 2 minutes

Fig. 13. Polymerase chain reaction and EtOH/EDTA/sodium acetate precipitation for sequencing.

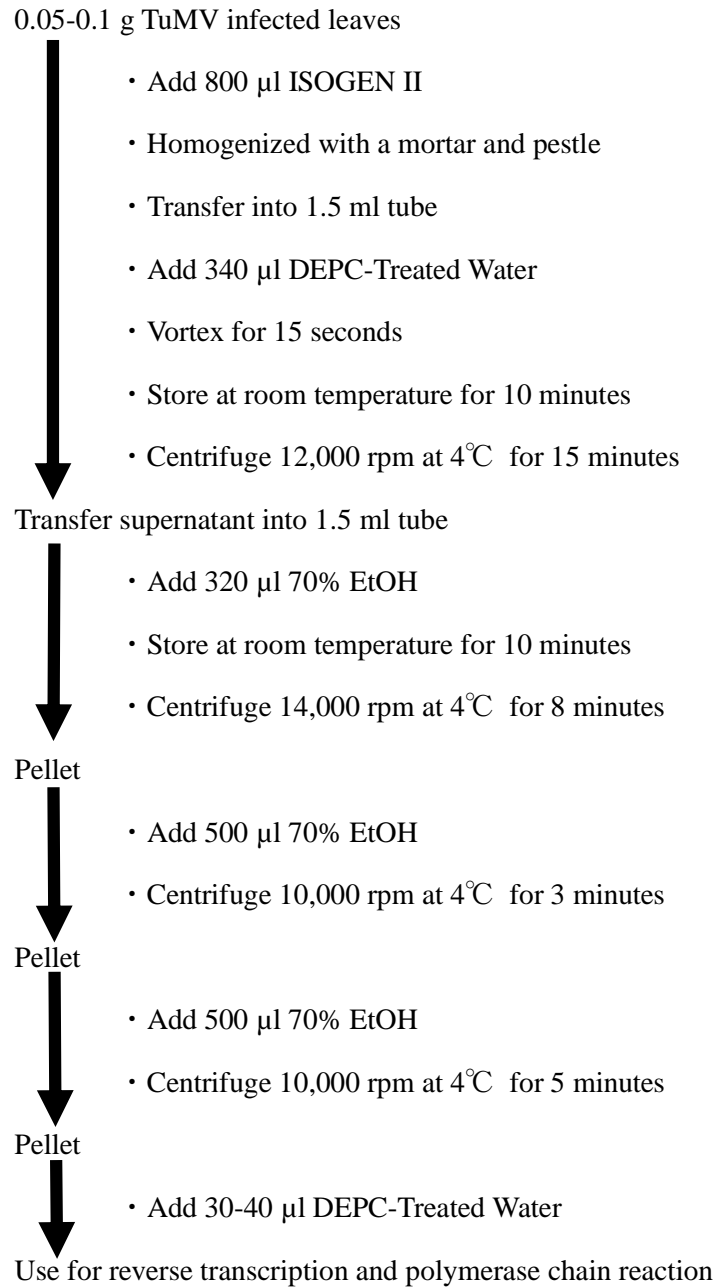




Fig. 14. RNA extraction procedure using ISOGEN II.

Reverse transcription (RT) reaction mixture	
DEPC-Treated Water	11 μ l
10mM dNTPs	1 μ l
5 \times RT buffer	4 μ l
Minus sense primer (50 pmol/ μ l)	1 μ l
RNA (1 μ g/1 μ l)	2 μ l
PrimeScript TM Reverse Transcriptase (Takara)	1 μ l
Total	20 μl

 Incubate at 42°C for 1 hour

Polymerase chain reaction (PCR) mixture	
DDW	29.7 μ l
10mM dNTPs	1 μ l
10 \times <i>Pfx</i> Amplification buffer	5 μ l
10 \times PCR Enhancer Solution	5 μ l
50mM MgSO ₄	2 μ l
1 st cDNA (RT reaction mixture)	4 μ l
Plus sense primer (10 pmol/ μ l)	1.5 μ l
Minus sense primer (10 pmol/ μ l)	1.5 μ l
PLATINUM TM <i>Pfx</i> DNA Polymerase	0.33 μ l
Total	50 μl

 Vortex and short spin

PCR cycle	
94°C (2 min)	1 cycle
94°C (15 sec) – 45°C (30 sec) – 68°C (3 min)	40 cycles
4°C (10 min) – 25°C (∞)	1 cycle

Fig. 15. Procedure for reverse transcription and polymerase chain reaction.

イオラッド) およびジーンアトラス (アステック) を用いて行った (Fig. 15)。PCR 終了後の ds DNA 増幅のチェックおよび DNA の精製はカリフラワーモザイクウイルスの項目を参照 (Fig. 10)。

塩基配列の決定はカリフラワーモザイクウイルスの項目を参照 (Fig. 11)。なおオーストラリア分離株ゲノムの塩基配列を用いた解析に今村 (2007) , 大庭 (2014) そして本研究のデータを用い, ニュージーランド分離株ゲノムの解析は, 今村 (2007), 野口 (2011) および大庭 (2014) そして本研究のデータを用いた。

5. 分子進化学的解析

A. 組換え部位の解析

採集した分離株の塩基配列および国際塩基配列データベースから得られた塩基配列を組換え部位の解析に用いた。分子進化的解析には, 外群を必要とするが CaMV の各遺伝子および領域について BLAST 検索を行ったところ, *Horseradish latentvirus* (HRLV, アクセション番号 NC_018858) の塩基配列と近縁であることが明らかになったため, その塩基配列を外群として用いた。それぞれの分離株の塩基配列は BioEdit v5.0.9 (Hall, 1999) を用いてアミノ酸配列に変換した後, ClustalX2 (Larkin et al, 2007) によりアライメントを行った。次にそれぞれのアミノ酸配列に見られたギャップを TRANSALIGN (Weiller 博士より分譲) を用いて塩基配列中に挿入し, BioEdit v5.0.9 (Hall, 1999) を用いてギャップが認められた領域を除いた。その後, CaMV については ORF I, II, III, IV および V の塩基配列を結合して連結配列 (ORFs I-V) および ORF VI の塩基配列を得た。塩基配列中の組換え部位を調査するため, RDP4 (Martin et al., 2015) ソフトウェアに統合されている組換え検出プログラムである RDP (Martin & Rybicki, 2000), BOOTSCAN (Salminen et al., 1995), GENECONV (Sawyer, 1999), MAXCHI (Maynard Smith, 1992), CHIMAERA (Posada & Crandall, 2001) および SISCAN プログラムを用いて解析を行った。また全塩基配列について PHYLLO プログラ

ム (Weller, 1998) を用いて 50 塩基ごとに組換え部位を調べた。組換えの可能性
がある部位については全て原版の SISCAN version 2 (Gibbs et al., 2000) を用い
て再度組換え部位の検索を行った。さらに Recombination Analysis Tool (RAT;
Etherington et al., 2005) を用いて解析を行った。

B. 分子系統学的解析

採集した分離株および国際塩基配列データベースから得られた分離株の分子
系統関係を 3 種の方法により調べた。すなわち, SPLITSTREE v4.11.3 (Huson &
Bryant, 2006) における Neighbor-Net 法, PhyML v3 (Guindon & Gascuel, 2003) に
おける最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法), BEAST v1.7.5 および
TreeAnnotator v1.7.5 (Lemey et al., 2009) におけるベイズ法を用いて分子系統樹
を作成した。なお, 最尤法およびベイズ法を用いて作成した系統樹では, 上記
の解析から組換え体と思われる分離株を除き, CaMV について ORF VI について
は 5' 末端から 220 塩基付近には組換え部位が多く認められたため, すべての分
離株の 5' 末端から 220 塩基までの配列を除いた配列を用いて解析を行った。ま
た TuMV については CaMV と同様に組換え部位を考慮し, Region A, B および C
[塩基番号 1460-3472, 3812-6016 および 6479-8068; UK 1 分離株 (Jenner et al.,
2000) の塩基番号を参照] の 3 領域を用いて解析を行った。CaMV の外群には
HRLV の塩基配列, TuMV の外群には *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) (Fuji &
Nakamae, 1999, 2000), *Scallion mosaic virus* (ScaMV) (Chen et al., 2006), *Narcissus
late season yellows virus* (NLSYV) (Lin et al., 2012; Wylie et al., 2014) を用い,
jModelTest v2 で最適な塩基置換モデルを調べた。ML 法を用いた解析では, 両ウ
イルスの解析を行った全領域に関して塩基置換モデルとして *general
time-reversible* (GTR), 座位間の変異速度の不均一性についても考慮し, ガンマ
分布および不変座位率を用い最適なモデルとして GTR+ Γ_4 +I を適用した。系統樹
の各枝の信憑性を評価するためにはブートストラップ法にて 1000 回のランダム

サンプリングを行った。一方ベイズ法を用いた解析では、各パラメーターの事後確率分の推定はマルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC 法) に基づき行った。サンプリングは 10^8 回反復し、最初の 10% のサンプルを burn-in として除いた。それぞれの方法によって作成した系統樹は TREEVIEW (Page, 1996) および FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2009) を用いて表示した。さらに、ここで得られた系統樹は PATRISTIC (Fourment & Gibbs, 2006) の解析に用いた。

C. 中立平衡解析

集団の遺伝構造について調査するため中立平衡テストを行った。すなわち、Tajima's D (Tajima, 1989), Fu & Li's D^* および F^* テスト (Fu & Li, 1993) およびハプロタイプの多様性を DNASP v5 (Librado & Rozas, 2009) ソフトウェアを用いて算出した。Tajima's D テストの値は塩基配列の多様性の平均値と多型サイト (segregating site) 数の相違により算出される。Fu & Li's D^* および F^* テストの値は塩基配列間の変異の総数と塩基配列間で 1 塩基のみ認められる変異 (singleton) 数の相違により算出され、Fu & Li's F^* テストの値は塩基配列の各ペア間の塩基相違の平均値と singleton 数の相違により算出した。ハプロタイプの多様性は集団におけるハプロタイプの数と頻度により算出した。また、非同義置換/同義置換 (dN/dS) 比の解析を MEGA v6 (Tamura et al., 2013) の Pamilo-Bianchi-Li (PBL) 法を用いて算出した。

D. 遺伝的分化および遺伝子流動解析

集団間の遺伝的分化および遺伝子流動の大きさの指標である Ks^* , Z , Snn および F_{ST} 値 (Hudson, 2000) を DNASP v5 (Librado & Rozas, 2009) ソフトウェアを用いて算出した。 F_{ST} 値の絶対値が 1 に近似するほど集団は遺伝的に分化していることが示唆され、 F_{ST} 値 < 0.33 であれば、遺伝子流動が頻繁に起きていることを示す。

E. 集団遺伝学的解析

CaMV 集団に関して Structure v2.3.4 (Hubisz et al., 2009) を用いて各分離株がどの祖先集団にどの程度の割合で由来するかを推定した。各データセットに対して 1-10 のサブ集団数 ($K = 1-10$) から最も適切なサブ集団数を推定した。MCMC 法で 10^6 回反復し, burn-in として 10^2 回分を除いた。Evanno et al. (2005) に従い, delta- K 統計量を算出し, delta- K が最大値を示す時の K を最も適切なサブ集団数とした。

6. 進化速度, 時間尺度推定

ベイズ法に基づいた BEAST v1.7.5 (Lemey et al., 2009) を用い, 両ウイルスの進化速度と時間尺度の推定を行った。なお, TuMV に関しては組換え部位を考慮し, 組換え部位の少ないコールドスポットである 3 遺伝子領域 (HC-Pro, P3 および Nib 遺伝子) の部分領域 [塩基番号 1460-2494; HC-Pro*, 2591-3463; P3*, 7208-8068; Nib*, 塩基番号は UK1 分離株 (Jenner et al., 2000) の塩基配列を参照] を解析に用いた。分子時計モデルの選出にはベイズ因子 (Bayes Factor, BF) を基準に行った。分子時計モデルでは strict および relaxed (uncorrelated exponential および uncorrelated lognormal) の中から, また 5 統計モデル (constant population size, expansion growth, exponential growth, logistic growth および Bayesian skyline plot) の中から最適なモデルを選んだ。また, 分離株の採集年度とその変異の蓄積量に相関があるかどうかを検定するために Path-O-Gen v1.3 を用い, 回帰分析を行った。

各パラメーターの事後確率分の推定はマルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC 法) に基づき行った。サンプリングは 10^8 回反復し, 最初の 10% のサンプルを burn-in として除いた。これらの結果は Tracer v1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) を用いて確認を行った。

推定した塩基置換速度と分岐年代の信憑性を確かめるために、同様のアプローチを行った先行研究 (Ramsden et al., 2009; Firth et al., 2010; Duchêne et al., 2014) に従い、ランダムマイゼーション検定を行った。また BEAST v1.7.5 の結果出力ファイルを用いて Maximum clade credibility (MCC) 系統樹を FigTree v1.4.2 で表示し編集した。

7. 拡散経路推定

時間経過に伴う空間的な両ウイルスの集団変動については BEAST の離散位置モデルを用いて解析を行った (Lemey et al., 2009)。それぞれの集団の拡散がベイズ因子 (Suchard et al., 2001) で支持されているかを確認し、SPREAD (Bielejec et al., 2011) および Google Earth を用いて、両ウイルス集団の地球規模での移行経路を印した。

8. 組換え時期の推定

TuMV に関して遺伝的組換えが起きた時期を Visser et al. (2012) の方法を基に推定した。組換え部位を境に塩基配列を分割し、その境の前半および後半の塩基配列を削除後、削除した領域にギャップを挿入し、これら組換え体と非組換え体の塩基配列を BEAST v1.7.5 (Lemey et al., 2009) で年代推定を行った。その後 MCC 系統樹の節の分岐年代を基に組換え時期の推定を行った。

VI. 結果

1. カリフラワーモザイクウイルス

A. 宿主反応

イラン、ギリシャ、トルコおよび日本から CaMV 様症状を呈する罹病植物を

採集し、CaMV 特異的抗体を用いた DAS-ELISA 法にてウイルス感染の有無を検定した。その結果、ナタネ、キャベツ、カリフラワー、ブロッコリー、他アブラナ属植物およびダイコンなどで陽性反応が認められた。それら分離株の病原性を確認するため、各国から代表的な分離株を選定し、アブラナ科植物を用いて宿主反応を調査した (Fig. 16, Table 3)。その結果、多くの分離株はダイコン属植物やアブラナ属植物に感染し、ほぼ同様の感染性を示した。明瞭な症状を示さなかった植物においては、DAS-ELISA 法により、感染の有無を確認した。日本産 JPN-N, JPN-S1 および JPN-S2 分離株はカブ (品種 博多据わり) などのアブラナ属植物やダイコン属植物において明瞭な症状を示さなかったが、DAS-ELISA 法により感染が確認できたため、これら分離株は他の分離株と比較して弱毒と思われた。

B. 分子性状

採集した 67 分離株についてポリメラーゼ連鎖反応産物を用いて全塩基配列決定を試みたところ、19 分離株ではゲノム 3'末端のポリ A 配列、また 6 分離株においては検出した蛍光シグナルが重複し、一部ゲノム領域の塩基配列決定が困難であった。そのため、クローニング産物を用いて該当する領域の塩基配列の決定を行った (Table 4)。その結果、TUR1 分離株では 3 クローン中 2 クローンは 8 塩基のアデニン、1 クローンは 7 塩基のアデニンでポリ A 配列が構成されていた。また、IRNCaQA 分離株では 7392 塩基から 7775 塩基までの配列をクローニングしたところ、6 クローン中 3 クローンは共通の配列であり、ポリメラーゼ連鎖反応産物の配列として採用した。各分離株ゲノムの塩基数は 7984-8063 塩基であった。ORF I は 978-984 塩基、ORF II は 459-480 塩基、ORF III は 390 塩基、ORF IV は 1458-1512 塩基、ORF V は 2025-2040 塩基、ORF VI は 1560-1575 塩基および ORF VII は 285-291 塩基であった。さらに、ORF VI と ORF VII 間および ORF VI と ORF VII の遺伝子間領域はそれぞれ 704-784 塩基および 103-104 塩基であった。なお、CaMV 67 分離株の全塩基配列は DDBJ



Fig. 16. Symptoms caused by *Cauliflower mosaic virus*. Chlorotic spots on *Brassica rapa* cv. Hakatasuwari and mosaic on *Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Snow queen.

Table 3. Host reaction of *Cauliflower mosaic virus*.

A.

Isolate	Original host	<i>Raphanus sativus</i> (Radish)			<i>Brassica rapa</i> (Turnip)
		cv. Akimasari 2 go	cv. Everest	cv. Taibyō-sobutori	cv. Hakatasuwari
GRC83	Broccoli	LI/CS, M, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/CS, M, VB, VC (5/6), -/- (1/6)	LI/CS, VB, VC (2/3), -/- (1/3)	CS/M, Ru, VB, VC (6/6)
GRC84B	Broccoli		LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	CS/Ru, VB, VC (6/6)
GRC87E	Cauliflower			LI/CS, VB, VC (2/3), -/- (1/3)	CS/M, Ru, VB, VC (3/3)
GRC87G	Cauliflower	LI/CS, M, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	CS/ M, Ru, VB, VC, (12/12)
GRC92A	Broccoli		LI/CS, M, VB, VC (2/3), -/- (1/3)		CS/M, Ru, VC (3/3)
JPN-M	Cabbage	LI/CS, M, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, VC (3/3)	CS/Ru, VB, VC
JPN-S1	Cabbage		LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/M, VB, VC (3/3)	CS/M, Ru, VC
JPN-S2	Horse radish	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VC (3/3)	CS/VB, VC (6/6)
JPN-UV1	Cabbage		LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M,VB,VC (3/3)	CS/M, Ru, VB, VC (3/3)
JPN-UV26	Cabbage	LI/CS, M, VB, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/CS, M, VB, VC (6/6)	LI/CS, M, VB, VC (2/3), -/- (1/3)	CS/M, Ru, VB, VC (3/3)
TUR34	Cabbage	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (6/6)	LI/CS, VC, (3/3)	CS/ M, Ru, VB, VC, (12/12)
TUR50	Cabbage	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (6/6)	LI/CS, VB, VC (6/6)	CS/M, Ru, VB, VC (3/3)
TUR263	Cauliflower		LI/CS, M, VB,VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	CS/M, VC (3/3)
TUR285	Cauliflower		LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	CS/M, Ru, VC (5/5)

^a Symptoms of inoculated leaves / upper uninoculated leaves.

^b Numbers of plants infected / plants inoculated.

CS; Chlorotic spots, LI; Latent infection, M; Mosaic, Mo; Mottle, Ru; Rugosity, VB; Vein banding, VC; Vein clearing, -; Not infect

B.

Isolate	Original host	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>
		cv. Snow queen	cv. Shinsei	cv. Grand duke	cv. Challenger
GRC83	Broccoli			LI/Mo, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/VB, VC (3/3)
GRC84B	Broccoli			LI/Mo, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/VB, VC (3/3)
GRC87E	Cauliflower				LI/CS, VB, VC (3/3)
GRC87G	Cauliflower	LI/CS, M, Mo, VC, VB (3/3)		LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	LI/CS, VB, VC (6/6)
GRC92A	Broccoli				
JPN-M	Cabbage				
JPN-S1	Cabbage	LI/VC (3/3)			LI/VB, VC (2/2)
JPN-S2	Horseradish				
JPN-UV1	Cabbage				LI/RS, VB, VC (3/3)
JPN-UV26	Cabbage				
TUR34	Cabbage	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/Mo (3/3)	LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)
TUR50	Cabbage	LI/CS, M, VB, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/CS, Mo, VC (2/3), -/- (1/3)	LI/ M, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)
TUR263	Cauliflower	LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	LI/CS, Mo, VC (3/3)	LI/ M, VC (3/3)	LI/CS, VB, VC (3/3)
TUR285	Cauliflower				LI/CS, VB, VC (3/3)

C.

Isolate	Original host	<i>B. campestris</i> var. <i>Narinosa</i>	<i>B. napus</i>	<i>B. pekinensis</i>
		cv. Tatsuai	cv. Otsubu	cv. Nozaki I-go
GRC83	Broccoli		LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (2/3), -/- (1/3)
GRC84B	Broccoli	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)	LI/CS, Mo, VB, VC (2/2)	LI/CS, M, Ru, VB (2/2)
GRC87E	Cauliflower		LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	
GRC87G	Cauliflower	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
GRC92A	Broccoli		LI/CS, Mo, VB, VC (2/2)	LI/CS, M, Ru, VC (2/2)
JPN-M	Cabbage		LI/CS, Mo, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
JPN-S1	Cabbage		LI/CS (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
JPN-S2	Horseradish		LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/LI (3/3)
JPN-UV1	Cabbage		LI/CS, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
JPN-UV26	Cabbage	LI/CS, M, Ru, VB, VC (2/2)	LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
TUR34	Cabbage	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
TUR50	Cabbage	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)	LI/CS, M, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (3/3)
TUR263	Cauliflower	LI/CS, M, Ru, VC (1/2), -/- (1/2)	LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	LI/CS, M, Ru, VC (2/2)
TUR285	Cauliflower		LI/CS, Mo, VB, VC (3/3)	

Table 4. The results obtained by cloning for *Cauliflower mosaic virus*.

Isolate	Region ^a	Clone	Number of A or mismatch between clones	Adopted number of A ^b	Mismatch between clone and PCR product	
CRO180A	7704 - 181	CL6 ^c	7	7	0	
		CL8	7		0	
GRC86B	7704 - 181	CL2 ^c	4	4	0	
		CL3	4		0	
GRC91B	7704 - 181	CL3 ^c	6	6	0	
		CL4	6		0	
	7392-7775	CL2 ^c	-	-	0	
		CL5	-		0	
		CL7	-		0	
GRC92A	7704 - 181	CL3 ^c	7	7	0	
		CL4	7		0	
IRNCaE2	7704 - 181	CL1 ^c	8	8	1	
		CL4	8		2	
		CL7	9		1	
IRNCaQA	7704 - 181	CL1 ^c	6	6	0	
		CL8	6		0	
	7392 - 7775	CL1-2 ^c	5'-ATGTGTGAGTAG-3'	-	0	
		CL2-2	5'-ATGTGTGAGTAG-3'		0	
		CL3-1	5'-ATGAXXGAGTAG-3'		2 nt deletion, 1 nt mismatch	
	IRNTuKh12	7704 - 181	CL3-2	Couldn't read after nt 7505 (perhaps contaminated)		-
			CL4	5'-ATGTGTGAGTAG-3'		0
			CL6	5'-AGGTGTGAGTAG-3'		1
			CL7	5'-AXXXXXXXXXXXTAG-3'		8 nt deletion
			CL1	15	9	0
CL2			17		1	
CL3			Couldn't read after polyA region (perhaps contaminated)		0	
CL4 ^c			9		0	
CL5			10		0	
CL6			9		0	
IRNTuMA	7704 - 181	CL8	15		2	
		CL1	Couldn't read after polyA region (perhaps contaminated)	11	9 nt deletion	
	7392-7775	CL2-1	5'-TAATCCGCATAAXXXXXXXXXXAAAAAAAA-3' (polyA=8)		-	
		CL2-2	5'-TAATCCGCATAAGCCCCGCXAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (polyA=12)		-	
		CL3-1	5'-XXXXXXXXXXXXGCCCCGXAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (polyA=11)		11 nt deletion	
		CL3-2 ^c	5'-TAATCCGCATAAGCCCCGCXAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (polyA=11)		-	
		CL5	5'-XXXXXXXXXXXXGCCCCGXAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (polyA=14)		10 nt deletion	
		CL6	5'-TAATCCGCATAAGCCCCGCXAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (polyA=12)		-	
		CL8	5'-TAATCCGCATAAGCCCCGCXAAAAAAAAAAAAAAAA-3' (polyA=12)		1 nt insertion	
		CL2	-	-	1	
CL4 ^c	-		1			
TUR1	7704 - 181	CL6	-		1	
		CL7	-		1	
		CL1 ^c	8	8	0	
TUR2	7704 - 181	CL4	7		0	
		CL8	8		1	
		CL1 ^c	8	8	0	
TUR4	7704 - 181	CL2	8		0	
		CL5	7		0	
		CL1	9	8	1	
TUR5	7704 - 181	CL5 ^c	8		0	
		CL7	Couldn't read after polyA region (perhaps contaminated)		0	
		CL8	8		0	
TUR50	7704 - 181	CL1 ^c	10	10	0	
		CL7	10		0	
TUR12	3131-3549	CL2	-	-	1	
		CL5 ^c	-		1	
TUR59	7704 - 181	CL7	nt 3257-3585 deleted		1	
		CL8	nt 3257-3585 deleted		1	
TUR213	7704 - 181	CL1 ^c	7	7	0	
		CL2	7		0	
TUR214	7704 - 181	CL2 ^c	6	6	0	
		CL6	6		0	
TUR249	7704 - 181	CL1 ^c	7	7	0	
		CL4	7		0	
TUR303	1753-1836	CL4	8	8	1	
		CL5 ^c	8		0	
TUR306	7704 - 181	CL1	13	10	0	
		CL2 ^c	10		0	
		CL3	10		0	
		CL1	Couldn't read after nt 1847 (perhaps contaminated)		-	
		CL2 ^c	5'-AAGXXXXXXXXXXXXXAGC-3'		0	
		CL3	5'-AAGAAGAAGTTAAAGAGC-3'		12 nt insertion	
TUR306	7704 - 181	CL4	5'-AAGXXXXXXXXXXXXXAGC-3'		0	
		CL7	Couldn't read after nt 1847 (perhaps contaminated)		-	
TUR306	7704 - 181	CL8	5'-AAGXXXXXXXXXXXXXAGC-3'		0	
		CL5 ^c	6	6	0	
		CL7	6		0	

^a Nucleotide position where cloning is necessary.

^b Number of A added to the PCR product.

^c Adopted clone as adding to the PCR product.

データベースに登録した (アクセッション番号 AB863136-AB863202)。

C. 分子進化的解析

a. パトリスティック距離解析

PATRISTIC を用いて各 ORF 毎の系統樹間の比較を行った (Fig. 17)。その結果, ORF I, II, III, IV および V 間は系統学的な距離が近かった。例として, ORF I に対する ORF III のパトリスティック距離プロットを図に示した (Fig. 17A)。対照的に, ORF VI に対する ORFs I-V のプロットはそれぞれに独立したパターンを示した (Fig. 17BC)。また, グループ A および B に属する分離株のみで ORF VI に対する ORFs I-V のプロットの比較を行ったところ, 2 サブリネージに分かれた (Fig. 17DE)。ORF VII については他の ORF と比較し, より複雑なプロットパターンを示した (データ未掲載)。

b. 組換え部位の解析

多くの組換え部位が全ゲノムを通じて検出された (Table 5)。特にイランおよび日本産分離株の ORF VI の 5' および 3' 末端, ギリシャ産分離株の ORF VI の 3' 末端において多くの組換え部位が検出された (Fig. 18)。トルコ産分離株のゲノム中にも同様にいくつかの組換え部位が検出されたが, その多くは不明瞭な組換え部位であった。これまでに大量の塩基配列を用いて組換え部位の解析を行うことにより, 不明瞭な組換え体の親型の分離株をより正確に同定できることが示唆されている (Ohshima et al., 2007)。いくつかの組換え体は国ごとに分布していたことから, CaMV の分布には創始者効果に関与していることが示唆された。

c. 分子系統解析

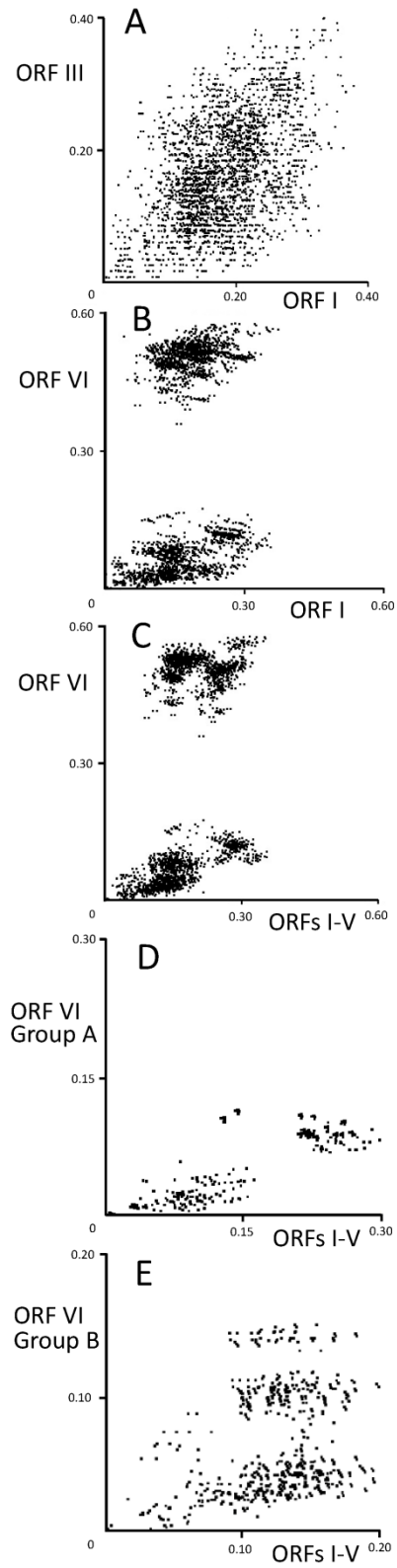


Fig. 17. Multidimensional scaling of tree-to-tree patristic distances. (A) ORF I vs ORF III isolates, (B) ORF I vs ORF VI isolates, (C) ORFs I-V vs ORF VI isolates, (D) ORFs I-V Group A vs ORF VI isolates and (E) ORFs I-V Group B vs ORF VI isolates.

Table 5. Tentative and clear recombination sites in *Cauliflower mosaic virus* genomes.

Isolate	Position (nt) ^a	ORF	Parental isolate		Recombination detection program ^b	P-value ^c
			Major	Minor		
B29	3296-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	3.81 × 10 ⁻⁹
	5996-7341	VI	Unknown (TUR50)	TUR4	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.14 × 10 ⁻³¹
BBC	3259-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	6.48 × 10 ⁻¹⁰
	4214-5995 (UD)	V	Unknown (TUR263)	TUR50	<u>RGMCS_o</u>	3.41 × 10 ⁻¹⁷
Cabbage S	3298-4078	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>GB_RS_oP</u>	2.02 × 10 ⁻⁹
	6239-74	VI - VII	TUR285	CM1841	<u>RGBMCS_RS_o</u>	7.43 × 10 ⁻³¹
CM1841	3259-4071	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	3.80 × 10 ⁻¹⁰
	4214-5995	V - VI	Unknown (TUR263)	TUR50	<u>RGMCS_o</u>	3.42 × 10 ⁻¹⁵
CMV-1	3259-4031	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>S_RS_oP</u>	2.66 × 10 ⁻¹⁰
	5887-195	VI - VII	Unknown (TUR4)	TUR50	<u>RGBMCS_RS_o</u>	7.84 × 10 ⁻³⁴
CRO180A	5996-7362	VI	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	3.10 × 10 ⁻³¹
D/H	5957-82	VI - VII	Unknown (TUR50)	TUR4	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	4.21 × 10 ⁻³⁵
GRC83	7240-15	VI - VII	GRC86D	BBC	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	1.32 × 10 ⁻²⁶
GRC84B	7240-15	VI - VII	GRC86D	BBC	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	1.37 × 10 ⁻²⁴
GRC86B	4318-7239	VI	GRC84B	TUR216	<u>RBMC_SR_SP</u>	3.21 × 10 ⁻¹⁰
GRC86D	7348-615	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	7.28 × 10 ⁻¹⁷
GRC87E	7348-615	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	3.18 × 10 ⁻¹³
GRC87G	7348-615	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	4.21 × 10 ⁻¹⁴
GRC91B	7348-615	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.63 × 10 ⁻¹⁵
GRC92A	7348-615	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	7.99 × 10 ⁻¹⁵
GRC92C	7348-615	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.83 × 10 ⁻¹⁴
GRC92D	7348-504	VI - VII	TUR94	Unknown (CM1841)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.15 × 10 ⁻¹⁷
IRN1	5969-102	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.07 × 10 ⁻³⁵
IRN2	5969-102	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	7.68 × 10 ⁻³⁵
IRN3	5969-102	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.07 × 10 ⁻³⁵
IRN4	5996-195	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	4.08 × 10 ⁻³⁴
IRN5	5996-208	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.58 × 10 ⁻³⁴
IRN6	5944-180	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	4.70 × 10 ⁻³⁴
IRN7	5969-76	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	8.64 × 10 ⁻³⁴
IRN8	5962-208	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	4.48 × 10 ⁻³⁵
IRN9	5965-64	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.53 × 10 ⁻³³
IRN10	5967-7342	VI	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	3.77 × 10 ⁻³⁴
IRN11	5969-42	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	1.44 × 10 ⁻³⁴
IRN12	5965-7342	VI	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.59 × 10 ⁻³⁴
IRN13	5965-180	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.45 × 10 ⁻³³
IRN14	5952-99	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.46 × 10 ⁻³³
IRN18	5969-212	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_oP</u>	1.57 × 10 ⁻³⁶
IRN19	5965-64	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.18 × 10 ⁻³⁵
IRN21	5996-180	VI - VII	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.93 × 10 ⁻³⁴
JPNHGB340	3259-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	5.12 × 10 ⁻⁹
	5996-7341	VI	Unknown (TUR4)	TUR50	<u>RGBMCS_RS_o</u>	5.81 × 10 ⁻³³
JPNKWB778	3265-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	3.72 × 10 ⁻⁹
	5965-7341	VI	Unknown (TUR4)	TUR50	<u>RGBMCS_RS_o</u>	3.35 × 10 ⁻³³
JPNM	4214-5964	V - VI	Unknown (TUR263)	TUR50	<u>RGMCS_o</u>	1.26 × 10 ⁻¹⁵
JPNN	5996-7361	VI	Unknown (TUR4)	TUR50	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.35 × 10 ⁻³⁴
JPNS1	3259-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>S_RS_oP</u>	9.43 × 10 ⁻⁹
	5996-269	VI - VII	Unknown (TUR50)	TUR4	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.19 × 10 ⁻³⁶
JPNS2	3259-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>S_RS_oP</u>	5.74 × 10 ⁻⁹
	5996-269	VI - VII	Unknown (TUR50)	TUR4	<u>RGBMCS_RS_o</u>	1.19 × 10 ⁻³⁶
JPNUV1	4214-5964	V - VI	Unknown (TUR263)	TUR50	<u>RGMCS_o</u>	1.26 × 10 ⁻¹⁵
JPNUV26	4214-5964	V - VI	Unknown (TUR263)	TUR50	<u>RGMCS_o</u>	1.15 × 10 ⁻¹⁶
JPNTKD762	3242-3989	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>S_RS_oP</u>	2.17 × 10 ⁻⁸
	5881-210	VI - VII	Unknown (TUR50)	TUR4	<u>RGBMCS_RS_o</u>	5.12 × 10 ⁻³⁵
NY8153	3296-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	3.20 × 10 ⁻¹¹
	2104 (UD) - 5896 (UD)	IV - VI	Unknown (TUR263)	TUR50	<u>S_RS_oP</u>	8.95 × 10 ⁻¹³
	5909-164	VI - VII	Unknown (TUR4)	TUR50	<u>RGBMCS_RS_o</u>	5.70 × 10 ⁻³⁵
TUR2	399-1261	I - II	TUR249	TUR59	<u>RB_SR</u>	2.87 × 10 ⁻⁵
TUR34	4438-5876	V - VI	Unknown (TUR285)	TUR278	<u>S_RS_o</u>	1.39 × 10 ⁻⁶
TUR59	4511-5948	V - VI	TUR278	Unknown (TUR285)	<u>MS_RS_o</u>	4.61 × 10 ⁻⁷
	5996-164	VI - VII	TUR4	Unknown (TUR50)	<u>RGBMCS_RP</u>	8.65 × 10 ⁻³⁴
TUR214	1772-2108	III - IV	TUR2	TUR12	<u>BS_RS_oP</u>	2.49 × 10 ⁻⁶
TUR216	2832-4937 (UD)	IV - V	TUR249	Unknown (TUR2)	<u>BS_RS_o</u>	2.03 × 10 ⁻¹⁶
	5324-7347	VI	Unknown (TUR306)	GRC92D	<u>M</u>	1.90 × 10 ⁻⁵
TUR220	5539-6357	VI	TUR81	Unknown (TUR285)	<u>RGB</u>	5.22 × 10 ⁻⁵
TUR239	34 (UD) -1034	I	Unknown (TUR4)	TUR244	<u>RGBS_RS_o</u>	3.09 × 10 ⁻¹⁰
	1857 (UD) -2799	V	GRC83	Unknown (IRN2)	<u>S_RS_oP</u>	3.71 × 10 ⁻⁵
	4365-5326 (UD)	V - VI	TUR50	TUR4	<u>BM_SR_SP</u>	6.57 × 10 ⁻¹¹
TUR289	471 (UD) -2485	I - IV	TUR84	Unknown (TUR306)	<u>RGBMCS_RS_o</u>	2.00 × 10 ⁻⁹
TUR306	1831-2512	III - IV	Unknown (TUR94)	TUR84	<u>BS_RS_o</u>	4.52 × 10 ⁻⁹
W260	3259-3946	IV - V	TUR50	Unknown (TUR4)	<u>BS_RS_oP</u>	2.54 × 10 ⁻⁹
Xinjing	627-1661	I - III	Unknown (IRN19)	IRN21	<u>RB_SP</u>	1.96 × 10 ⁻⁵

^aRecombination sites detected in the CaMV genomes by the recombination detection programs (listed in column 6), from the aligned sequences of the likely recombinant and its 'parental isolates'. The nucleotide position shows locations of individual genes numbered as in Xinjing genome (AF140604). UD; Undetermined.

^bRecombinant isolates identified by the recombination detection programs: R (RDP), G (GENECONV), B (BOOTSCAN), M (MAXCHI), C (CHIMAERA) and S_R (SISCAN)

programs in RDP4, and So (SISCAN total nucleotide site analysis) in original SISCAN version 2 and P (PHYLPRO) programs. The analyses were done using default settings and a Bonferroni-corrected P-value cut-off of 0.01 in RDP4.

^cThe reported P-value is for the program in bold type and underlined in RDP4 and is the smallest P-value among the isolates calculated for the region in question. P-values smaller than 10⁻⁶ are listed.

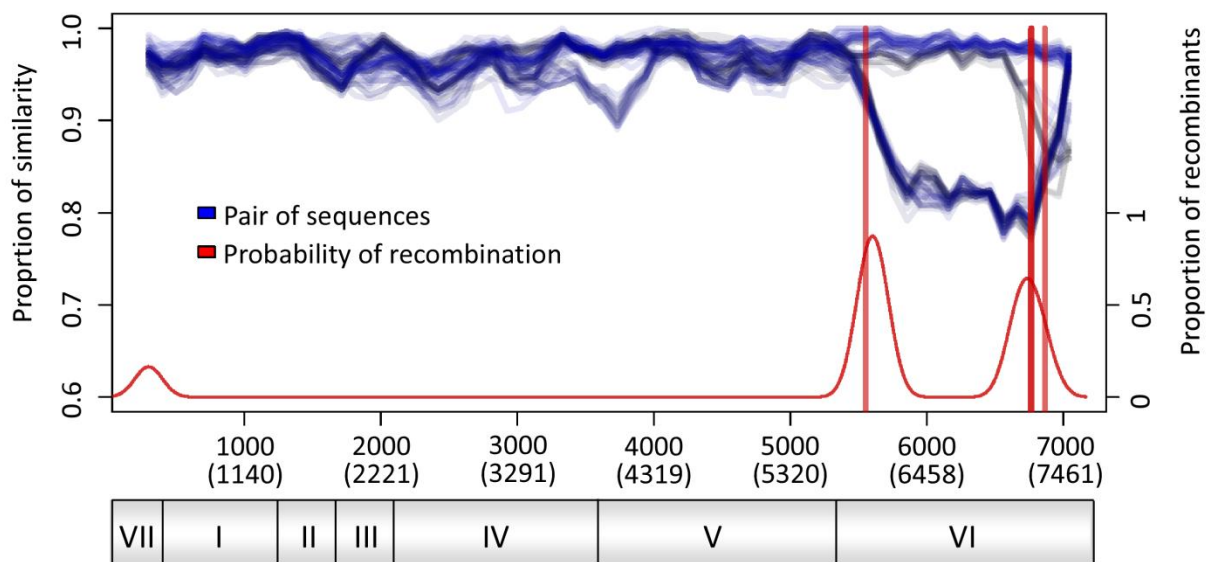


Fig. 18. Recombination analysis by RAT plot. Each blue line represents a pairwise sequence comparison. The red curve represents the estimated proportion of recombinants at each position in the alignment. The red vertical lines denote estimated positions of recombination breakpoints, which approximately match the boundaries of the ORF VI region. The estimated nucleotide positions of the recombination sites are shown relative to the 5' end of the genome, using numbering of the gapped aligned sequences with gaps removed. Recombination sites in parentheses are shown relative to the 5' end of the genome using numbering of the sequence of the Xinjing isolate.

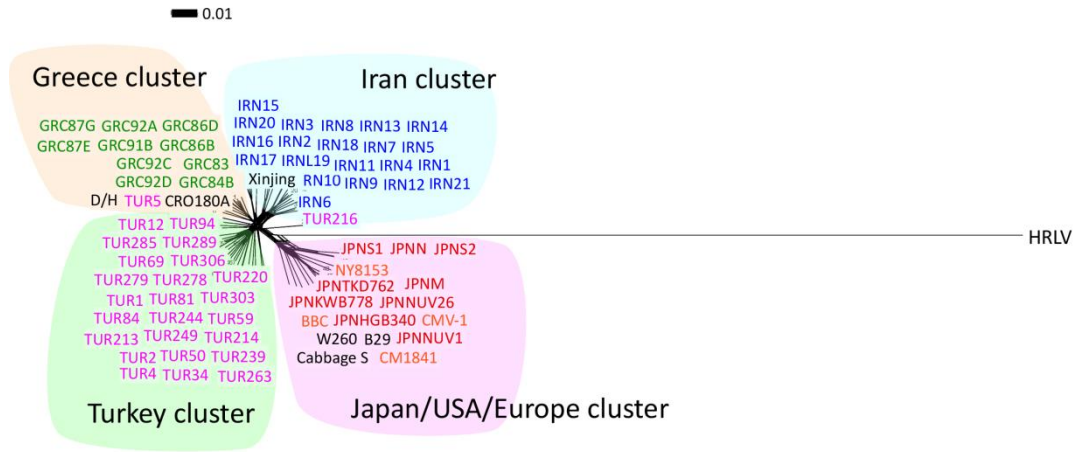
パトリスティック距離プロットの結果から、ORFs I-V および ORF VI について分子系統関係について調査した。Neighbor-Net 法では ORFs I-V は各枝が短く、対照的に、ORF VI では長い枝を持つ 2 つの主要なグループが形成され、ORFs I-V および ORF VI の各サブグループは地理的な分布と関係性があるように思われた (Fig. 19)。また、組換え体を除き ML 法により作成した ORF VI の系統樹は Neighbor-Net 法により作成した系統樹と同様の位相を示した (Fig. 20)。ML 系統樹ではグループ A はイランおよび日本/北アメリカ/ヨーロッパサブグループ、グループ B はギリシャ、トルコおよびイランサブグループに分かれた (Fig. 20)。各地域から採集した多くの分離株は 1 つのサブグループに属したが、イラン産分離株は 2 つのグループに属していた。興味深いことに、トルコサブグループと同様にグループ B を形成したイラン II サブグループの全ての分離株はトルコとは離れたイランの東部地域であるラザヴィ・ホラーサーン州から得られた分離株であった。

d. 集団遺伝学的解析

塩基配列の多型を DNASP v5 プログラムの Tajima's D , Fu & Li's D^* および F^* テストを用いて解析した (Table 6)。Tajima's D , Fu & Li's D^* および F^* テストでは ORF VI の Iran II グループの分離株を用いて算出した値のみ有意な正の値を示し、集団の遺伝的変異を維持し、多様性を広げていると思われた。ハプロタイプの多様性は ORFs I-V を用いて算出した値はすべて 1.000 を示したが、ORF VI では 1.000 を下回る値も認められた。

STRUCTURE を用いて CaMV 集団のクラスタリングを行った。ORFs I-V および VI を用いた解析では最適なサブ集団数がそれぞれ 6 および 5 (ΔK が最大値の時の K は 6 および 5) と算出された (Fig. 21)。ORFs I-V では多くの分離株でサブ集団が混在していたのに対して、ORF VI では多くの分離株はほぼ単一の

A. ORFs I-V



B. ORF VI

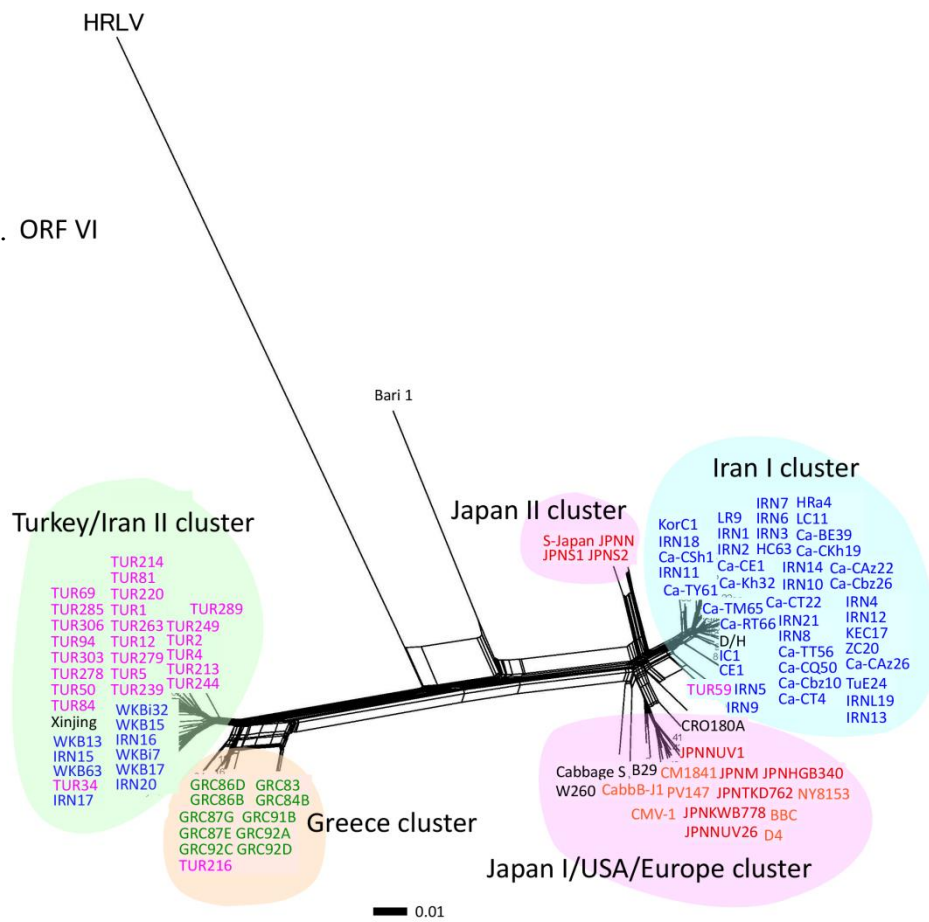


Fig. 19. Phylogenetic networks of *Cauliflower mosaic virus* from the Europe, Japan, Middle East (Iran and Turkey) and USA. ORFs I-V (A) and ORF VI (B). Neighbor-Net network analysis was performed using SplitsTree4. *Horseradish latent virus* is used as the outgroup. Formation of a reticular network rather than a single bifurcated tree is suggestive of recombination. The isolates obtained in this study are listed in Table 1.

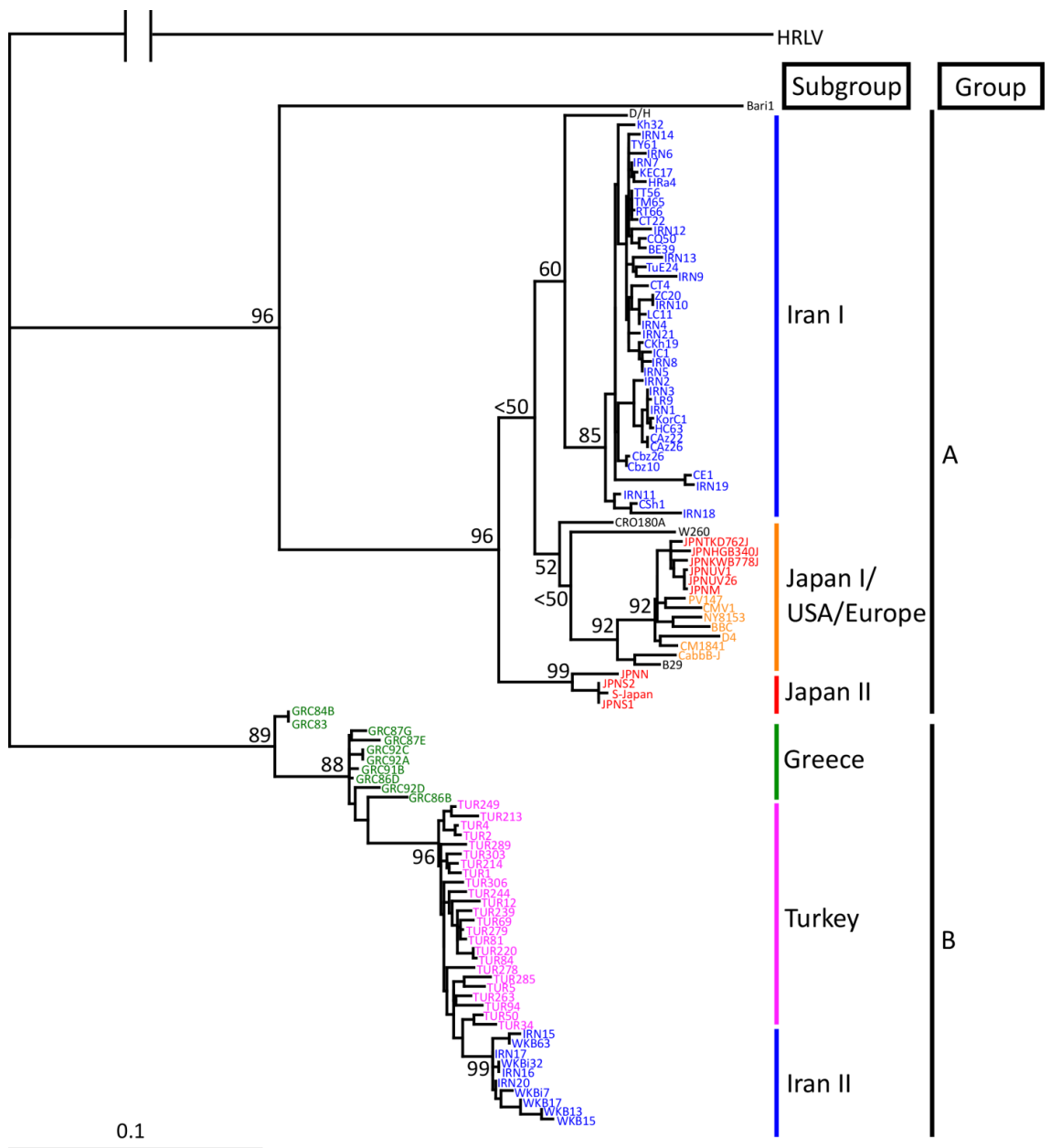


Fig. 20. Maximum-likelihood tree estimated from ORF VI of 105 non-recombinant *Cauliflower mosaic virus* isolates. Nodes are labelled with bootstrap support percentages.

Table 6. Neutrality tests, haplotype and nucleotide diversities of each *Cauliflower mosaic virus* population.

Population	n ^a	Tajima's <i>D</i>	Fu & Li's <i>D</i> *	Fu & Li's <i>F</i> *	H ^b	π ^c
ORFs I - V						
Europe	1	ND	ND	ND	ND	ND
Greece	10	-0.82887	-0.83106	-0.93903	1.000 ± 0.045	0.01444 ± 0.00142
Iran	21	-0.52759	-0.66138	-0.72583	1.000 ± 0.015	0.02456 ± 0.00107
Japan	9	0.18843	0.17286	0.19863	1.000 ± 0.052	0.02173 ± 0.00378
Turkey	24	-0.96070	-1.07740	-1.22349	1.000 ± 0.012	0.02776 ± 0.00152
USA	0	ND	ND	ND	ND	ND
Europe and Middle East	56	-1.14071	-1.86667	-1.89633	1.000 ± 0.003	0.02974 ± 0.00066
ORF VI						
Group A						
Iran I	42	-1.77600	-1.59392	-1.97970	0.995 ± 0.006	0.01418 ± 0.01336
Japan/USA/Europe	20	-0.92229	-1.01111	-1.14931	0.995 ± 0.018	0.04114 ± 0.00481
Japan I	6	-0.71704	-0.80069	-0.85372	1.000 ± 0.096	0.00672 ± 0.00136
Japan II	4	-0.86098	-0.86098	-0.90322	0.833 ± 0.222	0.01143 ± 0.00535
All Japan	10	1.10579	0.53744	0.76837	0.978 ± 0.054	0.03849 ± 0.00589
USA	7	-1.25469	-1.21381	-1.35564	1.000 ± 0.076	0.02627 ± 0.00361
Europe	3	ND	ND	ND	ND	ND
Group B						
Greece	10	-0.71255	-1.47501	-0.77668	0.956 ± 0.059	0.01763 ± 0.00350
Turkey	24	-1.79825	-2.22791	-2.45792	1.000 ± 0.012	0.01389 ± 0.00075
Iran II	10	1.32614	1.56210**	1.69509*	0.978 ± 0.054	0.00749 ± 0.00111
All Iran	52	0.37842	0.97767	0.89536	0.996 ± 0.059	0.06934 ± 0.01178

^a The number of sequences.

^b Haplotype diversity.

^c Nucleotide diversity was estimated by the average pairwise difference between sequences in a sample, based on all sites.

**P<0.02, *P<0.05; Tajima's *D* test compares the nucleotide diversity with the proportion of polymorphic sites, which are expected to be equal under selective neutrality. Fu & Li's *D* test is based on the differences between the numbers of singletons (mutations appearing only once among the sequences) and the total number of mutations. Fu & Li's *F* test is based on the differences between the number of singletons and the average number of nucleotide differences between pairs of sequences.

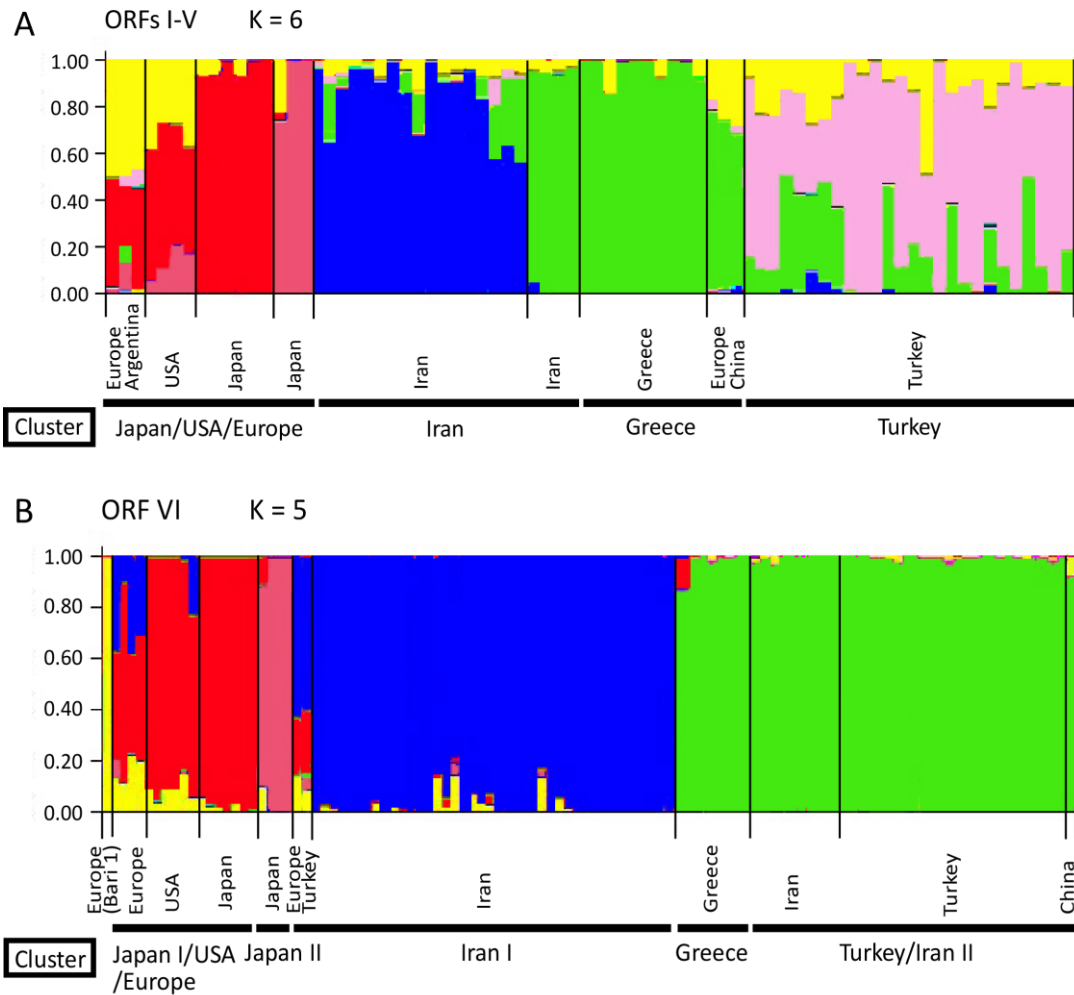


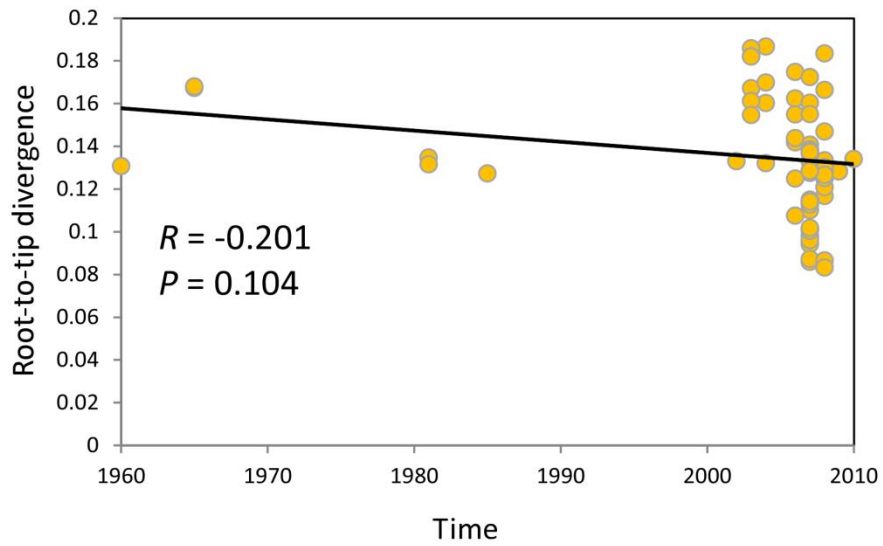
Fig. 21. Cluster-based analysis of population subdivision using Structure. The results are grouped by population of origin for each individual. Each individual is represented by a column. The number of clusters is indicated by the value of K : ORFs I-V, $K = 6$ (A), ORF VI, $K = 5$ (B). The colour proportion for each bar represents the posterior probability of assignment of each individual to one of six clusters (A) and one of five clusters (B) of genetic similarity. Clusterings correspond to those shown in Fig. 19.

集団で占められていた。ORFs I-V に関して、日本/アメリカ/ヨーロッパ クラスターの各分離株は主に黄色，赤および濃いピンク色で示されたサブ集団で構成されており，日本産分離株は大きく 2 サブ集団に分かれているように思われた。イランクラスターでは主に黄色，青色および緑色で示されたサブ集団で構成されており，大きく分けて青色と緑色の 2 サブ集団が優勢になっていた。トルコクラスターは主に黄色，ピンク色および緑色のサブ集団で構成されており，その割合からピンク色のサブ集団が優勢であると思われる。また黄色のサブ集団はほとんどの分離株に存在しており，最も古い祖先集団かもしれない。一方 ORF VI では各クラスター間において優勢となっているサブ集団がほぼ明確に分かれていた。日本産分離株では赤色と濃いピンク色，イラン産分離株では青色と緑色のサブ集団が優勢になっていると思われた。Bari 1 分離株は黄色で示されたサブ集団に単一で占められ，低い割合ではあるが，他のクラスターに属する多くの分離株においてもこのサブ集団は認められた。これらの集団遺伝構造は CaMV が地理的に独自の集団を形成していること，その地理間での遺伝子流動が頻繁に生じていることを示唆していた。

D. 進化速度および時間尺度推定

BEAST を用いて ORFs I-V および ORF VI について最適な分子時計および統計モデルの選抜を行った。分離株の採集年度とその変異の蓄積量に相関があるかどうかを検定するために Path-O-Gen v1.3 を用い，回帰分析を行った (Fig. 22)。その結果，ORFs I-V においては両者に負の相関 ($R=-0.201$) が見られたため，進化速度が一定であると仮定するモデル (Strict-clock) は不適當であると思われた。一方，ORF VI では弱い正の相関 ($R=0.160$) が見られた。また ORFs I-V および ORF VI について，ランダムイゼーション検定を行った結果，両者ともにその値は支持された (Fig. 23)。以上の結果およびベイズ因子の値を考慮すると，分子時計モデルは ORFs I-V および ORF VI 両者ともに relaxed-clock モデル，統計モデルは ORFs I-V では exponential growth，ORF VI では constant size が妥当である

A ORFs I-V



B ORF VI

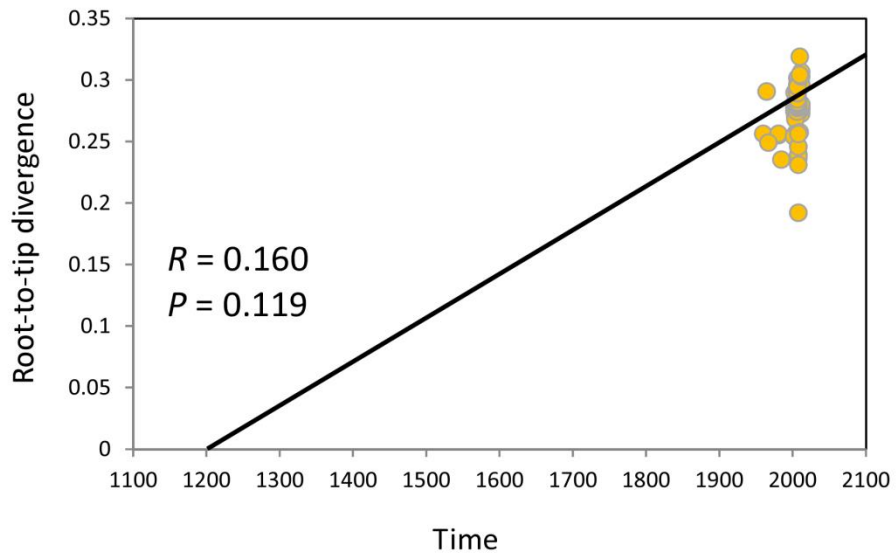


Fig. 22. Regression of root-to-tip distance. These analysis were inferred from Maximum-likelihood trees against year of isolation for the gene with the smallest number of sequences in each ORF region.

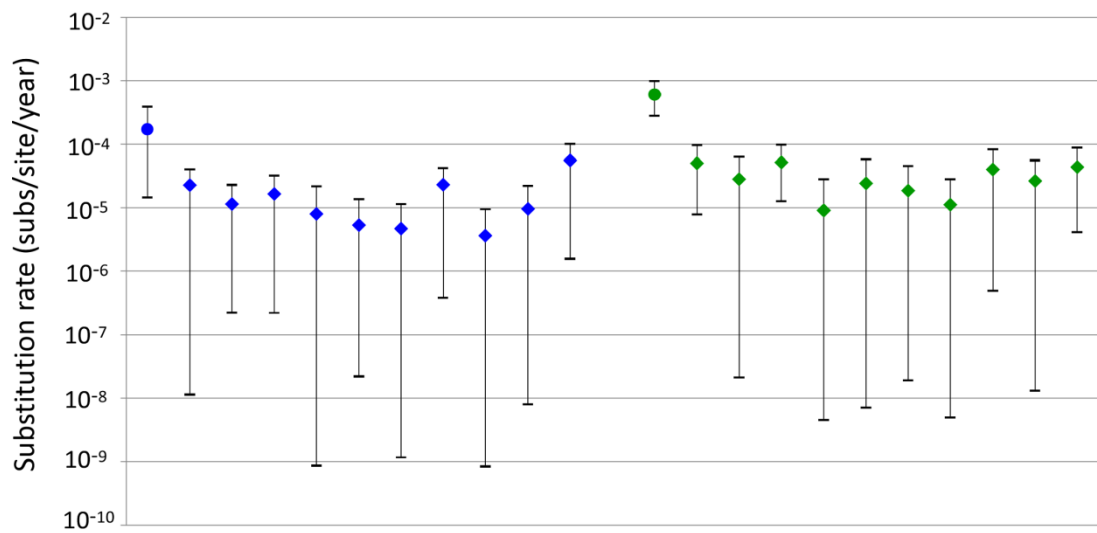


Fig. 23. Estimates of nucleotide substitution rates. Mean estimates and 95% credibility intervals are shown. These were estimated from 66 ORFs I-V and 97 ORF VI (see text). In each set of estimates, the first is based on the original data, whereas the remaining ten values are from date-randomized replicates. The 95% credibility intervals of the estimates from the date-randomized replicates do not overlap with the mean posterior estimate from the original data set. In addition, the lower tails of the credibility intervals are long and tend towards zero. These features suggest that there is sufficient temporal structure in the original data sets for rate estimation.

と思われた (Table 7)。また塩基置換速度の平均値を算出した結果, ORFs I-V および ORF VI ではそれぞれ 1.71×10^{-4} および 5.81×10^{-4} 塩基/部位/年となった。さらに各領域で用いた分離株の共通祖先までの時間を算出すると, ORFs I-V および ORF VI では 491 年および 431 年となった (Table 8)。これらの結果を用いて ORFs I-V および ORF VI について MCC tree を作成したところ, Neighbor-Net 法 および ML 法により作成した系統樹と同様の位相を示した (Figs. 24, 25)。

E. 拡散経路推定

DNASP v5 プログラムを用いて 2 地域間の遺伝子流動について解析した結果 (Table 9), ORFs I-V ではイラン, ギリシャおよびトルコ間, ORF VI では日本-アメリカ間において遺伝子流動が認められた。

また系統地理学的手法を用いて CaMV の各地域間での移行について ORFs I-V および ORF VI について解析を行い, それぞれ 4 および 5 つの地域での移行経路を示した (Fig. 26)。またそれらの結果が統計学的に有意であるかどうかを調べるために BF テストを行った (Table 10)。ORFs I-V のデータセットの解析結果はトルコを起源にギリシャ (BF = 205) およびイラン (BF = 61) へと拡散した移行パターンを示した。またこれらの解析よりも BF テストで低い支持ではあったが, トルコから日本への移行も示唆された (BF = 14)。一方 ORF VI のデータセットの解析結果では, ギリシャからトルコ (BF = 230) へ, トルコからイラン (BF = 128) への移行パターンが認められ, 日本からギリシャ (BF = 23) およびアメリカ (BF = 112) への移行も認められた。トルコから日本への移行も示唆された (BF = 14)。一方 ORF VI のデータセットの解析結果では, ギリシャからトルコ (BF = 230) へ, トルコからイラン (BF = 128) への移行パターンが認められ, 日本からギリシャ (BF = 23) およびアメリカ (BF = 112) への移行も認められた。トルコから日本への移行に関しては STRUCTURE による集団構造の解析 (Fig. 21) においても結果が支持されていた。

Table 7. Detailed results from BEAST analyses of *Cauliflower mosaic virus*.

Model		Marginal likelihood	Bayes factor	TMRCAs (95% HPD lower-upper)	Substitution Rate (subs/site/year)	95% HPD Rate-lower (subs/site/year)	95% HPD Rate-upper (subs/site/year)	Population Size	95% HPD Population Size (lower, upper)	Population Growth Rate	95% HDP Growth Rate (lower, upper)
ORFs I-V											
Strict clock	Constant Size	-25503.665	-	2052 (457 - 4697)	4.25×10^{-5}	2.45×10^{-6}	7.81×10^{-5}	1.16×10^4	$2.24 \times 10^3, 2.69 \times 10^4$	N/A	N/A
	Expansion Growth	-25503.434	1.26E+00	1163 (440 - 2298)	5.18×10^{-5}	1.39×10^{-5}	8.95×10^{-5}	2.73×10^4	$6.94 \times 10^3, 5.92 \times 10^4$	8.01×10^{-3}	$1.30 \times 10^{-3}, 1.46 \times 10^{-2}$
	Exponential Growth	-25503.301	1.44E+00	1057 (433 - 2086)	5.28×10^{-5}	1.67×10^{-5}	8.76×10^{-5}	2.04×10^4	$6.60 \times 10^3, 4.22 \times 10^4$	6.41×10^{-3}	$1.92 \times 10^{-3}, 1.09 \times 10^{-2}$
	Bayesian Skyline	-25503.692	9.74E-01	4383 (359 - 10271)	3.53×10^{-5}	3.39×10^{-8}	7.29×10^{-5}	3.05×10^4	$3.02 \times 10^3, 7.70 \times 10^4$	N/A	N/A
Relaxed Exponential	Constant Size	-25410.037	4.59E+40	2998 (71 - 5677)	2.48×10^{-4}	1.48×10^{-8}	6.95×10^{-4}	7.75×10^3	$1.16 \times 10^2, 1.13 \times 10^4$	N/A	N/A
	Expansion Growth	-25411.092	1.60E+40	634 (108 - 1687)	1.69×10^{-4}	9.62×10^{-6}	3.72×10^{-4}	1.41×10^4	$1.01 \times 10^3, 3.92 \times 10^4$	2.23×10^{-2}	$1.30 \times 10^{-3}, 4.87 \times 10^{-2}$
	Exponential Growth	-25404.395	1.30E+43	491 (86 - 1260)	1.71×10^{-4}	1.45×10^{-5}	3.87×10^{-4}	1.24×10^4	$5.25 \times 10^2, 3.40 \times 10^4$	1.69×10^{-2}	$1.66 \times 10^{-3}, 3.70 \times 10^{-2}$
	Bayesian Skyline	-25409.932	5.10E+40	1438 (77 - 2822)	1.75×10^{-4}	1.92×10^{-7}	4.29×10^{-4}	8.95×10^4	$4.50 \times 10^1, 1.99 \times 10^4$	N/A	N/A
Relaxed Lognormal	Constant Size	-25412.128	5.67E+39	2649 (216 - 6083)	5.37×10^{-5}	1.24×10^{-7}	1.14×10^{-4}	1.26×10^4	$9.14 \times 10^2, 2.91 \times 10^4$	N/A	N/A
	Expansion Growth	-25411.496	1.07E+40	904 (245 - 1920)	7.45×10^{-5}	1.56×10^{-5}	1.38×10^{-4}	1.96×10^4	$4.04 \times 10^3, 4.43 \times 10^4$	1.04×10^{-2}	$1.72 \times 10^{-3}, 2.08 \times 10^{-2}$
	Exponential Growth	-25411.528	1.03E+40	848 (274 - 740)	7.21×10^{-5}	1.59×10^{-5}	1.31×10^{-4}	1.77×10^4	$4.31 \times 10^3, 3.85 \times 10^4$	8.33×10^{-3}	$1.22 \times 10^{-3}, 1.55 \times 10^{-2}$
	Bayesian Skyline	-25413.313	1.73E+39	3565 (217 - 9665)	5.62×10^{-5}	3.38×10^{-8}	1.28×10^{-4}	2.38×10^4	$1.48 \times 10^2, 6.60 \times 10^4$	N/A	N/A
ORF VI											
Strict clock	Constant Size	-7092.584	1.20E+00	1687 (784 - 2875)	1.20×10^{-4}	5.35×10^{-5}	1.94×10^{-4}	1.08×10^3	$4.52 \times 10^2, 1.94 \times 10^3$	N/A	N/A
	Expansion Growth	-7090.175	1.35E+01	2179 (886 - 4086)	9.51×10^{-5}	3.31×10^{-5}	1.59×10^{-4}	4.10×10^3	$8.73 \times 10^2, 4.09 \times 10^3$	3.15×10^{-2}	$7.97 \times 10^{-3}, 5.89 \times 10^{-2}$
	Exponential Growth	-7092.774	-	1489 (738 - 2447)	1.28×10^{-4}	6.27×10^{-5}	2.00×10^{-4}	1.04×10^3	$4.61 \times 10^2, 1.80 \times 10^3$	1.01×10^{-3}	$4.00 \times 10^{-4}, 2.52 \times 10^{-3}$
	Bayesian Skyline	-7090.555	9.20E+00	1911 (781 - 3698)	1.08×10^{-4}	3.44×10^{-5}	1.79×10^{-4}	1.50×10^3	$7.50 \times 10^1, 3.98 \times 10^3$	N/A	N/A
Relaxed Exponential	Constant Size	-6992.577	3.28E+43	431 (113 - 886)	5.81×10^{-4}	2.47×10^{-4}	9.47×10^{-4}	2.16×10^2	$8.70 \times 10^1, 3.94 \times 10^2$	N/A	N/A
	Expansion Growth	-6992.859	2.47E+43	404 (101 - 823)	4.91×10^{-4}	1.96×10^{-4}	8.41×10^{-4}	4.14×10^2	$9.20 \times 10^1, 1.03 \times 10^3$	3.06×10^{-2}	$9.14 \times 10^{-8}, 8.16 \times 10^{-2}$
	Exponential Growth	-6992.439	3.76E+43	292 (113 - 565)	5.81×10^{-4}	2.32×10^{-4}	9.47×10^{-4}	2.51×10^2	$8.80 \times 10^1, 4.78 \times 10^2$	5.66×10^{-3}	$3.20 \times 10^{-3}, 1.59 \times 10^{-2}$
	Bayesian Skyline	-6993.657	1.11E+43	447 (106 - 931)	4.93×10^{-4}	1.87×10^{-4}	8.64×10^{-4}	3.20×10^2	$1.30 \times 10^1, 8.47 \times 10^2$	N/A	N/A
Relaxed Lognormal	Constant Size	-7000.845	8.40E+39	533 (96 - 1134)	5.03×10^{-4}	1.66×10^{-4}	9.37×10^{-4}	2.85×10^2	$8.60 \times 10^1, 5.25 \times 10^2$	N/A	N/A
	Expansion Growth	-7002.750	1.25E+39	645 (111 - 1370)	3.49×10^{-4}	8.72×10^{-5}	7.09×10^{-4}	1.00×10^3	$9.30 \times 10^1, 2.45 \times 10^3$	3.75×10^{-2}	$6.73 \times 10^{-6}, 8.32 \times 10^{-2}$
	Exponential Growth	-7000.228	1.56E+40	306 (89 - 672)	4.71×10^{-4}	1.77×10^{-4}	8.37×10^{-4}	3.71×10^2	$1.15 \times 10^2, 6.88 \times 10^2$	8.14×10^{-3}	$1.90 \times 10^{-4}, 2.06 \times 10^{-2}$
	Bayesian Skyline	-7006.522	2.88E+37	527 (98 - 1128)	3.86×10^{-4}	1.51×10^{-4}	6.68×10^{-4}	4.10×10^2	$1.70 \times 10^1, 1.06 \times 10^3$	N/A	N/A

^a Not applicable

Grey column show the best fit BEAST models.

Table 8. Details of the data sets used for estimation of nucleotide substitution rate and time to the most recent common ancestor for *Cauliflower mosaic virus*.

Parameter	Open reading frame	
	I-V	VI
Best-fit substitution model	GTR + I + Γ_4	GTR + I + Γ_4
Best-fit molecular clock model	Relaxed Uncorrelated Exponential	Relaxed Uncorrelated Exponential
Best-fit population growth model	Exponential growth	Constant size
Sequence length (nt)	5106	1269
No. of sequences	66	97
Sampling date range	1960 - 2010	1960 - 2012
Chain length (in millions)	100	100
TMRCAs ^a (years)	491 (86 - 1270)	431 (113 - 886)
Substitution rate (nt/site/year)	1.71×10^{-4} (1.45×10^{-5} - 3.87×10^{-4})	5.81×10^{-4} (2.47×10^{-4} - 9.47×10^{-4})
dN/dS ^b	0.069	0.201
No. of variable sites	1074	448

^a Time to the most recent common ancestor

^b Nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) substitution (dN/dS) ratios were calculated for seven ORFs using the Pamilo-Bianchi-Li (PBL) method in MEGA v6 (Tamura et al., 2013).

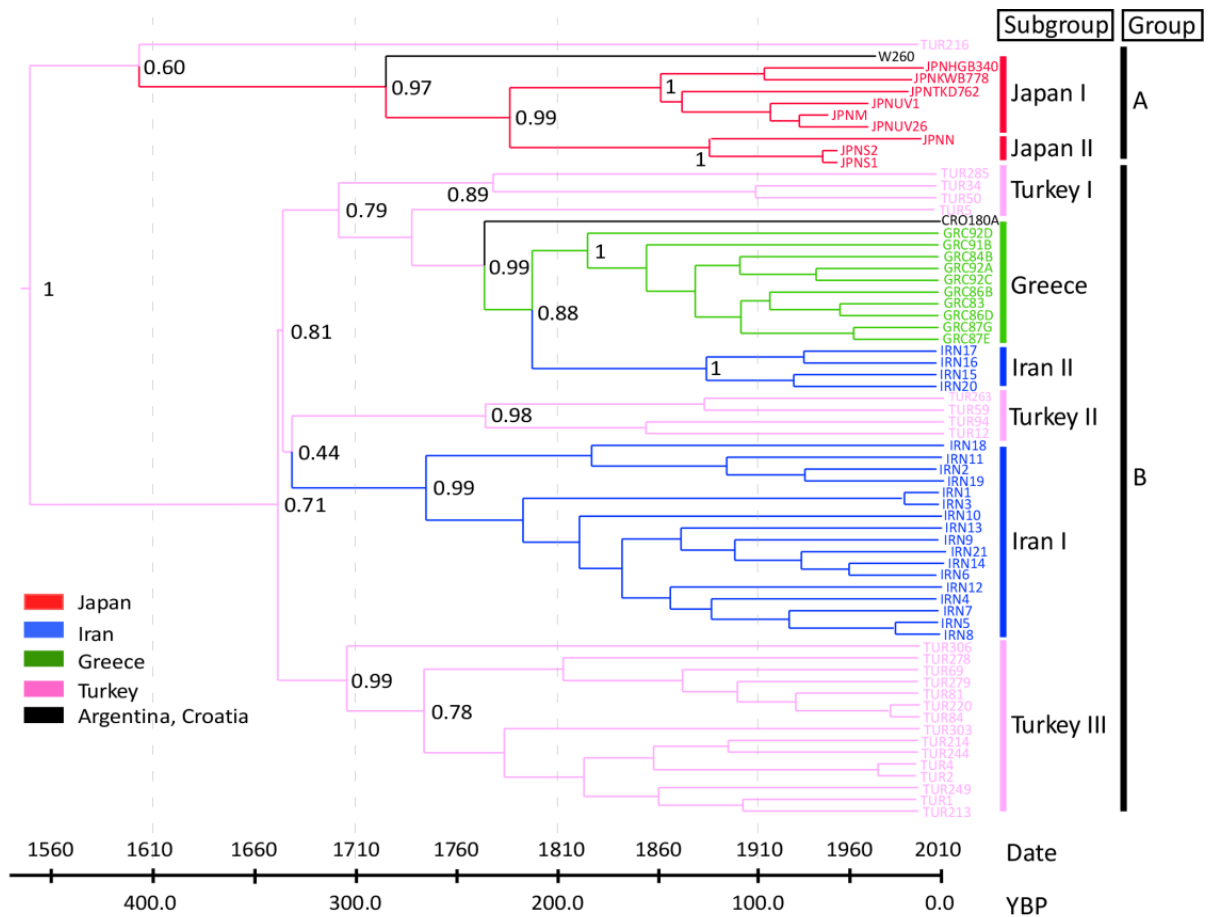


Fig. 24. Bayesian phylogenetic estimates from ORFs I-V of *Cauliflower mosaic virus*. Maximum-clade-credibility trees from BEAST analyses of 66 isolates of ORFs I-V. Branch colours correspond to the most probable geographic location of their descendent nodes.

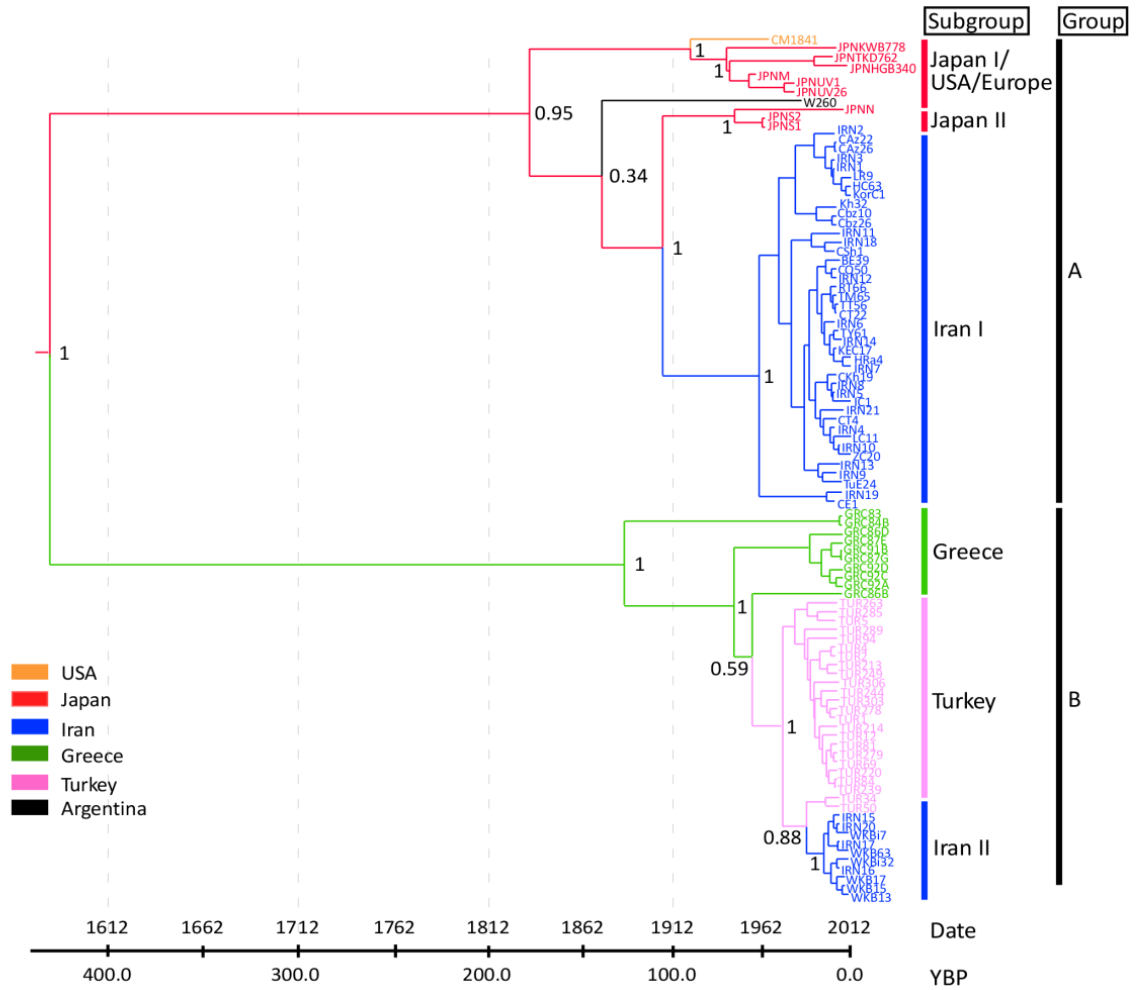


Fig. 25. Bayesian phylogenetic estimates from ORF VI of *Cauliflower mosaic virus*. Maximum-clade-credibility trees from BEAST analyses of 97 isolates of ORF VI. Branch colours correspond to the most probable geographic location of their descendent nodes.

Table 9. Genetic differentiation and gene flow of *Cauliflower mosaic virus* population.

ORF ^a	Country (the number of sequences ^b)	Parameter ^c				
		<i>K</i> s* (<i>P</i> -value)	<i>Z</i> (<i>P</i> -value)	<i>S</i> nn (<i>P</i> -value)	<i>F</i> _{ST}	<i>N</i> m
ORFsI-V	Greece (n=10) vs. Iran (n=21)	108.72294 (0.0000 ^{†††})	150.82049 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.34935	0.47
	Greece (n=10) vs. Japan (n=9)	91.34795 (0.0000 ^{†††})	40.09444 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.61151	0.16
	Greece (n=10) vs. Turkey (n=24)	121.73345 (0.0000 ^{†††})	216.45522 (0.0000 ^{†††})	0.96324 (0.0000 ^{†††})	0.28154	0.64
	Iran (n=21) vs. Japan (n=9)	121.06000 (0.0000 ^{†††})	122.68394 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.53250	0.22
	Iran (n=21) vs. Turkey (n=24)	134.11391 (0.0000 ^{†††})	306.04036 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.24050	0.79
ORFVI	Japan (n=9) vs. Turkey (n=24)	133.34321 (0.0000 ^{†††})	153.08465 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.48760	0.26
	Iran I (n=42) vs. Japan I/USA/Europe (n=16)	22.94629 (0.0000 ^{†††})	533.54888 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.64361	0.14
	Iran I (n=42) vs. Japan I (n=6)	16.81565 (0.0000 ^{†††})	416.76782 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.82735	0.05
	Iran I (n=42) vs. Japan II (n=4)	17.69459 (0.0000 ^{†††})	430.65718 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.75865	0.08
	Iran I (n=42) vs. All Japan (n=10)	23.9369 (0.0000 ^{†††})	504.38951 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.54238	0.21
	Iran I (n=42) vs. USA (n=7)	20.18948 (0.0000 ^{†††})	470.00155 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.67852	0.12
	Iran I (n=42) vs. Greece (n=10)	18.84094 (0.0000 ^{†††})	461.24647 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.90972	0.02
	Iran I (n=42) vs. Turkey (n=24)	17.86356 (0.0000 ^{†††})	571.23837 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.92351	0.02
	Iran I (n=42) vs. Iran II (n=10)	16.36658 (0.0000 ^{†††})	422.36339 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.94267	0.02
	Japan I/USA/Europe (n=16) vs. Japan II (n=4)	31.64667 (0.0010 ^{††})	59.56510 (0.0010 ^{††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.69388	0.11
	Japan I/USA/Europe (n=16) vs. Greece (n=10)	30.71966 (0.0000 ^{†††})	78.89583 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.86885	0.04
	Japan I/USA/Europe (n=16) vs. Turkey (n=24)	24.94942 (0.0000 ^{†††})	209.08176 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.88319	0.03
	Japan I/USA/Europe (n=16) vs. Iran II (n=10)	25.77094 (0.0000 ^{†††})	75.55278 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.90362	0.03
	Japan I/USA/Europe (n=16) vs. All Iran (n=52)	75.74787 (0.0000 ^{†††})	930.31255 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.41789	0.35
	Japan I (n=6) vs. Japan II (n=4)	10.92000 (0.0010 ^{††})	10.06667 (0.0010 ^{††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.86062	0.04
	Japan I (n=6) vs. USA (n=7)	21.88718 (0.0010)	32.33069 (0.0030 ^{††})	0.79487 (0.0040 ^{††})	0.25174	0.74
	Japan I (n=6) vs. Greece (n=10)	17.18611 (0.0000 ^{†††})	27.91852 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.93067	0.02
	Japan I (n=6) vs. Turkey (n=24)	15.80812 (0.0000 ^{†††})	131.59306 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.95022	0.01
	Japan I (n=6) vs. Iran II (n=10)	9.14444 (0.0000 ^{†††})	29.20741 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.96187	0.01
	Japan I (n=6) vs. All Iran (n=52)	79.77796 (0.0010 ^{††})	725.46485 (0.0010 ^{††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.55127	0.20
	Japan II (n=4) vs. USA (n=7)	26.48485 (0.0020 ^{††})	12.43537 (0.0020 ^{††})	1.00000 (0.0020 ^{††})	0.71636	0.10
	Japan II (n=4) vs. Greece (n=10)	20.12698 (0.0000 ^{†††})	24.28444 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.91967	0.02
	Japan II (n=4) vs. Turkey (n=24)	17.18012 (0.0000 ^{†††})	140.36262 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.93193	0.02
	Japan II (n=4) vs. Iran II (n=10)	10.93651 (0.0000 ^{†††})	25.16333 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.95100	0.01
	Japan II (n=4) vs. All Iran (n=52)	82.74860 (0.0140 [†])	709.84085 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.49508	0.25
	All Japan (n=10) vs. USA (n=7)	42.45752 (0.0290 [†])	60.37875 (0.0130 [†])	0.84314 (0.0000 ^{†††})	0.18659	1.09
	All Japan (n=10) vs. Greece (n=10)	35.61111 (0.0000 ^{†††})	44.50000 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.84213	0.05
	All Japan (n=10) vs. Turkey (n=24)	26.80847 (0.0000 ^{†††})	164.68927 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.85745	0.04
	All Japan (n=10) vs. Iran II (n=10)	29.17778 (0.0000 ^{†††})	44.50000 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.87841	0.03
	All Japan (n=10) vs. All Iran (n=52)	81.68332 (0.0000 ^{†††})	835.69147 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.34921	0.47
	USA (n=7) vs. Greece (n=10)	26.88889 (0.0000 ^{†††})	33.51148 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.87606	0.04
	USA (n=7) vs. Turkey (n=24)	21.17345 (0.0000 ^{†††})	163.48361 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.88935	0.03
	USA (n=7) vs. Iran II (n=10)	19.32026 (0.0000 ^{†††})	34.69231 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.90949	0.02
	USA (n=7) vs. All Iran (n=52)	81.51279 (0.0000 ^{†††})	782.31284 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.44009	0.32
	Greece (n=10) vs. Turkey (n=24)	19.02415 (0.0000 ^{†††})	166.53871 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.58285	0.18
Greece (n=10) vs. Iran II (n=10)	15.94444 (0.0000 ^{†††})	45.42222 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.71157	0.10	
Greece (n=10) vs. All Iran (n=52)	77.41451 (0.0000 ^{†††})	810.12283 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.71144	0.10	
Turkey (n=24) vs. Iran II (n=10)	15.23984 (0.0000 ^{†††})	152.02963 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.50985	0.24	
Turkey (n=24) vs. All Iran (n=52)	65.77586 (0.0000 ^{†††})	1034.41657 (0.0000 ^{†††})	1.00000 (0.0000 ^{†††})	0.72696	0.09	

^a Open reading frame

^b For the numbers of sequences, refer Table 1.

^c *K*s* and *Z* are the sequence-based statistics considered by Hudson (2000). *S*nn is the nearest-neighbor statistic. *F*_{ST} is the interpopulation component of genetic variation of the standardized variance in allele frequencies across populations. *N* is the population size of each subpopulation. *m* is the migration fraction per generation.

† 0.01<*P*<0.05, †† 0.001<*P*<0.01, ††† *P*<0.001, determined using 1000 permutation



Fig. 26. Patterns of *Cauliflower mosaic virus* migration estimated across the two ORF regions. ORFs I-V and ORF VI migrations are shown by solid and dashed lines. Lines connecting discrete regions indicate statistically supported ancestral state changes and their thicknesses denote statistical support. There are five categories of support. In increasing order, line thicknesses indicate $6 \leq BF < 10$ (positive support); $10 \leq BF < 30$ (strong support); $30 \leq BF < 100$ (very strong support); and $BF \geq 100$ (decisive support). Migration line was not shown when they were represented by only a single sample.

Table 10. Bayes factors for geographical analysis.

From	To	Bayes Factor (BF)	Support
ORFs I - V			
Turkey	Greece	205	100≤BF Decisive
Turkey	Iran	61	30≤BF<100 Very strong support
Turkey	Japan	14	10≤BF<30 Strong support
ORF VI			
Greece	Turkey	230	100≤BF Decisive
Japan	Greece	23	10≤BF<30 Strong support
Japan	USA	112	100≤BF Decisive
Turkey	Iran	128	100≤BF Decisive

2. カブモザイクウイルス

A. 宿主反応

オーストラリアおよびニュージーランドにおいて合計 32 分離株の TuMV 分離株を採集し、本研究に用いた (Table 2)。16 分離株はオーストラリア東部, 1 分離株はニュージーランド北部, 15 分離株はニュージーランド南部から採集した (Fig. 5)。

採集した 32 分離株についてアブラナ属植物のカブ (品種; 博多据わり), カラシナ (品種; 葉からし菜), キャベツ (品種; 新星および稜山 2 号), ハクサイ (品種; 野崎 1 号および京都結球 3 号) およびナタネ (品種; 農林 32 号), ダイコン属植物のダイコン (品種; 秋まさり, エベレストおよび耐病総太り) およびアカザ属のキノアを病原性検定に用いた (Table 11)。

その結果, 32 分離株全てがアブラナ属植物に全身感染した (Table 11, Fig. 27)。一方 NZ290 分離株を除く全ての分離株がダイコン (品種; 耐病総太り) に感染せず, B 宿主型であった。また全分離株に関してキノアに接種を行うと, 約 10 日後に接種葉に退緑病斑が認められ, さらに数日後には上位葉にも退緑病斑が認められた。すなわちオーストラリアおよびニュージーランド分離株はキノア接種葉上での過敏感反応死による細胞内へのウイルスの封じ込めから逃れることができ, 全身感染したと思われた。多くのアジアおよびヨーロッパ産分離株ではこのようなキノアの上位葉へのウイルスの移行は認められない (データ未掲載)。

B. 分子性状

本研究ではオーストラリアおよびニュージーランド産 TuMV32 分離株の全ゲノム構造を決定した。オーストラリアおよびニュージーランド 29 分離株の全塩基配列の長さは 5'末端の 35 塩基を除き 9798 塩基であった。一方でニュージー



Fig. 27. Symptoms caused by *Turnip mosaic virus*. Mosaic on *Brassica rapa* cv. Hakatasuwari and *Raphanus sativus* cv. Taibyō-sobutori.

Table 11. Host reaction of *Turnip mosaic virus*.

Isolate	Original host	<i>B. juncea</i> cv Hakarasina	<i>B. napus</i> cv. Norin-32go	<i>B. oleracea</i> cv.		<i>B. pekinensis</i> cv.		<i>Brassica rapa</i> cv. Hakatasuwari	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Raphanus sativus</i> cv.		
				Ryozan-2go	Shinsei	Nozaki-1go	Kekkyu Kyoto-3go			Akimasari	Taibiyosobutori	Everest
Australia												
AU1	<i>Hirschfeldia incana</i>											
AUST1	<i>Cicer arietinum</i>	*LI/M, St (1/6), LI/M (5/6)		LI/M (2/6), -/-(4/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)	LI/LI (2/6), -/-(4/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)	LI/M (3/3) LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (6/6)
AUST2	<i>Rapistrum rugosum</i>	LI/M, St (3/6), LI/M (3/6)	LI/M (6/6)	LI/mM (5/6), -/-(1/6)	LI/mM (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)
AUST3	<i>B. juncea</i>	LI/M, St (1/6), LI/M (5/6)						LI/M (5/6), -/-(1/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)
AUST4	<i>B. juncea</i>	LI/M, St (2/6), LI/M (4/6)						LI/M (5/6), -/-(1/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (6/6)
AUST6	<i>R. rugosum</i>	LI/M, St (2/6), LI/M (4/6), -/-(1/6)						LI/M (5/6), -/-(1/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)
AUST10	<i>B. pekinensis</i>	LI/M (6/6)	LI/M (6/6)	LI/Mo (5/6), -/-(1/6)	LI/Mo (6/6)	LI/mM (5/6), -/-(1/6)	LI/mM (5/6), -/-(1/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (6/6)
AUST13	<i>B. pekinensis</i>	LI/M (5/6), -/-(1/6)	LI/M (6/6)	LI/Mo (6/6)	LI/Mo(6/6)	LI/mM (6/6)	LI/mM (6/6)	LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (6/6)
AUST19	<i>Raphanus raphanistrum</i>	LI/M (4/6), -/-(2/6)	LI/M (6/6)	LI/mM (6/6)	LI/mM (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (4/6), -/-(2/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	-/-(6/6)
AUST21	<i>H. incana</i>	LI/M, St (2/6), -/-(4/6)						LI/Mo (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (6/6)
AUST22	<i>R. rugosum</i>	LI/M, St (3/5), LI/M (1/5), -/-(1/5)						LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	-/-(6/6)
AUST23	<i>R. raphanistrum</i>	LI/M, St (3/6), LI/Mo (3/6)						LI/M (5/6), -/-(1/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (5/6), -/-(1/6)
AUST26	<i>B. rapa</i>	LI/M, St (3/6), LI/M (3/6)						LI/M (4/6), -/-(2/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (4/6), -/-(2/6)
AUST27	<i>B. rapa</i>	LI/M, St (2/6), LI/M (2/6), -/-(2/6)						LI/M (4/6), -/-(2/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (4/6), -/-(2/6)
AUST28	<i>H. incana</i>	LI/M, St (2/6), LI/M (4/6)						LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (6/6)
AUST29	<i>R. rugosum</i>	LI/M, St (2/6), LI/M (1/6), -/-(3/6)						LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (3/6), -/-(3/6)
New Zealand												
NZ246	<i>B. napus</i> cv. York Globe		LI/M (6/6)		LI/mM (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (3/3)				
NZ290	<i>B. pekinensis</i>		LI/M (6/6)	LI/mM (6/6)	LI/mM (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M, NL (6/6)	LI/M (3/3)		LI/M (6/6)		
NZ402	<i>Lepidium oleraceum</i>							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (4/6), -/-(2/6)
NZ403	<i>L. oleraceum</i>							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (6/6),
NZ403B	<i>L. oleraceum</i>							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (6/6),
NZ412	<i>Pachycladon fastigiatum</i>							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (4/6), -/-(2/6)
NZ412B	<i>P. fastigiatum</i>							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (4/6), -/-(2/6)
NZ415	<i>L. oleraceum</i>							LI/M (5/6), -/-(1/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/Mo (6/6)
NZ419	<i>B. rapa</i> cv. Marco							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (3/6), -/-(3/6)
NZ419B	<i>B. rapa</i> cv. Marco							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)
NZ419C	<i>B. rapa</i> cv. Marco							LI/M (6/6)	CS/ (1/1)	CS	-/-(6/6)	LI/M (3/6), -/-(3/6)
NZL5	<i>Brassica</i> spp.		LI/M (6/6)	LI/Mo (5/6), -/-(1/6)	LI/Mo (5/6), LI/mM(1/6)	LI/mM (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M (3/3)				
NZW3	<i>B. rapa</i>		LI/M (6/6)	LI/LI (5/6), -/-(1/6)	LI/mM (6/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)	LI/M, St (6/6)	LI/M (3/3)				
NZW4	<i>B. rapa</i>		LI/M (6/6)	LI/LI (2/6), -/-(4/6)	LI/M (6/6)	LI/M (6/6)	LI/M, St (6/6)	LI/M (3/3)				
NZW6	<i>B. rapa</i>		LI/M (6/6)	LI/Mo (2/6), -/-(4/6)	LI/LI (3/6), -/-(3/6)	LI/M (5/6), -/-(1/6)	LI/M (4/6), -/-(2/6)	LI/M (3/3)				

*Reaction of inoculated leaves/uninoculated upper leaves. At least three plants were inoculated.

CS; Chlorotic spot, D; Dead, LI; Latent infection, M; Mosaic, mM; mild Mosaic, Mo; Mottle, NL; Necrosis lesion, St; Stunt, -; Not infected

ランド産 NZ403, NZ403B および NZ415 分離株においては 3'末端領域が 2 塩基欠失しており, 9796 塩基であった。また各遺伝子の塩基配列は P1, HC-Pro, P3, PIPO, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb および CP 遺伝子それぞれ 1086, 1374, 1065, 177, 156, 1932, 159, 1932, 159, 576, 729, 1551 および 864 塩基であり, オーストラリアおよびニュージーランド分離株の各遺伝子の塩基配列は同一の長さであった。なお, TuMV 32 分離株の全塩基配列は DDBJ データベースに登録した (アクセッション番号 AB989628-AB989659)。

C. 分子進化的解析

a. 組換え部位の解析

既に全ゲノム構造が決定され, 国際塩基配列データベースに全塩基配列が登録されている 197 分離株と本研究で塩基配列を決定した 32 分離株, 合計 229 分離株を用いて組換え解析を行った。まず RDP4 (Martin et al., 2015) ソフトウェアに統合されている組換え部位検出プログラムにて組換え部位の検出を試みた。その後, SISCAN v2 (Gibbs et al., 2000) プログラムの結果も加味し, どの分離株が親型あるいは組換え体であるか確認を行った。さらに PHYLPRO (Weiller, 1998) プログラムでは組換えが生じたと考えられる部位にグラフ中に下向きのピークが認められる。そのようなピークが他組換え検出プログラムによって検出した組換え部位と同一箇所であるかを確認した。また主要な組換え部位, そして不明瞭な組換え部位に関しては, 組換え部位を境にゲノムを分割し, 分割した各ゲノム領域を用いて分子系統樹を作成し, 各分子系統樹間の同一分離株の位相の関係から組換えが生じているかを確認した。オーストラリアおよびニュージーランド 34 分離株では合計 21 の組換え部位が認められ, 14 の組換え体型に分類された (Fig. 28, Table 12)。オーストラリア産分離株では AUST21 分離株のみが全ゲノムを通じて組換え部位が認められず, world-B3 分子系統サブグループの非組換え体と思われた。BRS1 分離株は basal-B 分子系統グループ,

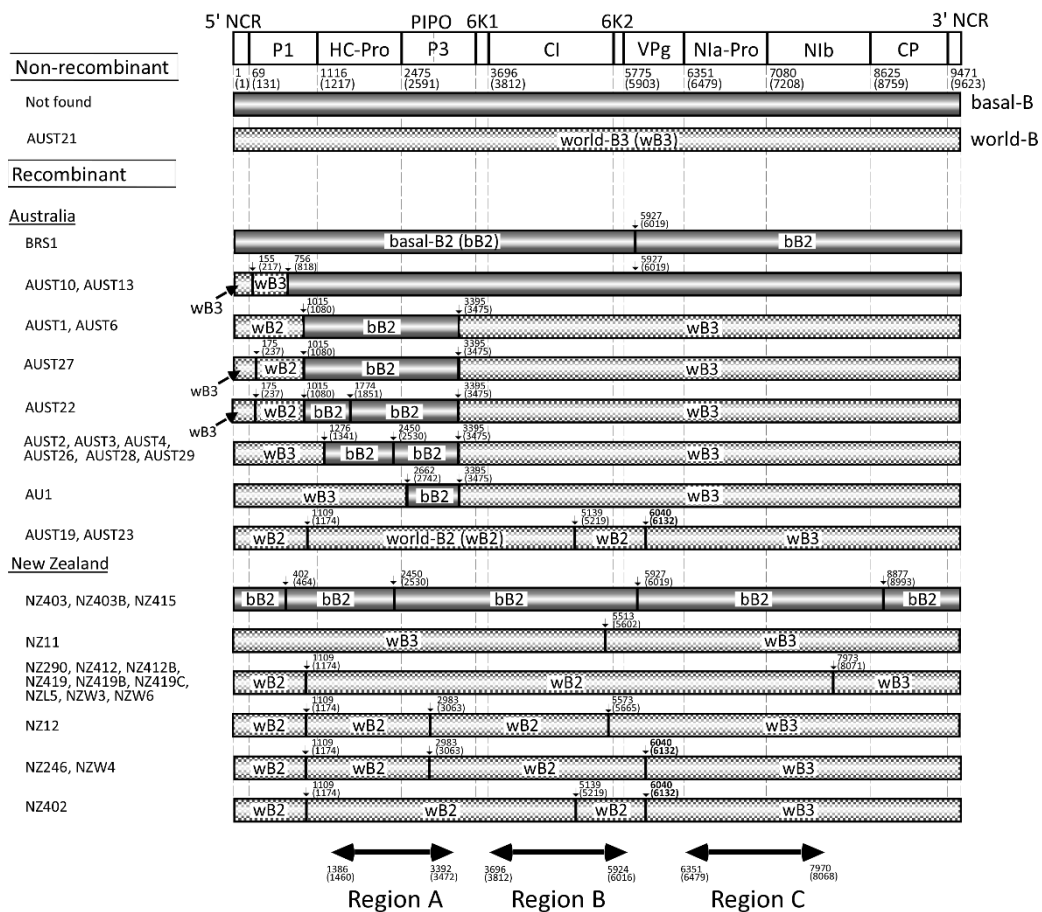


Fig. 28. Recombination maps of *Turnip mosaic virus* genomes of the Australian and New Zealand isolates. The estimated nucleotide positions of the recombination sites and those in parentheses are shown relative to the 5' end of the genome using the numbering of the aligned sequences used in the present study and the UK 1 isolate (Jenner et al., 2000), respectively. Vertical arrows and lines show estimated recombination sites (listed in Table 12). The grey and chequered boxes denote basal-B and world-B parents, respectively. The horizontal arrows show the regions (A, B and C) used to infer trees from non- and intralineage recombinant sequences (shown in Fig. 30). The recombination sites newly identified in the present study (non-bold font) or those identified in earlier studies (bold font) are listed separately.

Table 12. Recombination sites in the genomes of *Turnip mosaic virus* of Australia and New Zealand.

Isolate	Nucleotide position and protein-encoding region ^a	Parental isolate and subgroup ^b		Recombination detection program ^c	<i>P</i> -value ^d	<i>Z</i> -value ^e
		Major	Minor			
Australia						
AU1	2742 (P3) - 3475 (P3)	Lu2 (wB3)	AUST27 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	2.04 × 10 ⁻⁴¹	6.86
AUST1	1080 (P1) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	1.96 × 10 ⁻¹¹⁵	5.52
AUST2	1341 (HC-Pro) - 2530 (HC-Pro)	AUST6 (bB2)	TIGD (bB2)	<u>RGBMCS_R</u>	1.29 × 10 ⁻¹⁴	<3.00
	1341 (HC-Pro) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	9.77 × 10 ⁻⁴⁴	4.94
AUST3	1341 (HC-Pro) - 2530 (HC-Pro)	AUST6 (bB2)	TIGD (bB2)	<u>RGBMCS_R</u>	4.08 × 10 ⁻¹⁴	<3.00
	1341 (HC-Pro) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	4.82 × 10 ⁻⁷⁹	4.95
AUST4	1341 (HC-Pro) - 2530 (HC-Pro)	AUST6 (bB2)	TIGD (bB2)	<u>RGBMCS_R</u>	1.68 × 10 ⁻¹⁴	<3.00
	1341 (HC-Pro) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	3.80 × 10 ⁻⁷⁵	5.61
AUST6	1080 (P1) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	9.97 × 10 ⁻¹¹⁶	4.78
AUST10	217 (P1) - 818 (P1)	BRS1 (wB3)	GBR 91 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	1.29 × 10 ⁻⁵¹	5.70
	6019 (VPg) - 8318 (NIb) (UD)	AllA (bB2)	TIGA (bB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	1.47 × 10 ⁻¹⁹	3.83
AUST13	217 (P1) - 818 (P1)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	5.97 × 10 ⁻⁴⁸	5.73
	6019 (VPg) - 8318 (NIb) (UD)	AllA (bB2)	TIGA (bB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	1.47 × 10 ⁻¹⁹	3.72
AUST19	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	8.88 × 10 ⁻²⁷	4.66
	3094 (P3) (UD) - 5139 (CI)	NZ246 (wB2)	USA 4 (wB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	2.19 × 10 ⁻²⁹	4.44
	6132 (VPg) - 9834 (3' NCR)	USA 4 (wB2)	GBR 91 (wB3)	<u>RBMCS_R</u> S _o	8.82 × 10 ⁻²³	5.52
AUST22	237 (P1) - 1080 (P1)	NLD 2 (wB3)	DNK 3 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	1.32 × 10 ⁻³⁰	3.18
	1080 (P1) - 1851 (HC-Pro)	AUST29 (bB2)	PV134 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	3.06 × 10 ⁻¹²	4.31
	1080 (P1) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	2.03 × 10 ⁻⁹⁸	3.97
AUST23	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.14 × 10 ⁻⁵²	4.66
	3094 (P3) (UD) - 5139 (CI)	NZ246 (wB2)	USA 4 (wB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	3.05 × 10 ⁻²⁹	3.15
	6132 (VPg) - 9834 (3' NCR)	USA 4 (wB2)	GBR 91 (wB3)	<u>RBMCS_R</u> S _o	1.43 × 10 ⁻²²	5.52
AUST26	1341 (HC-Pro) - 2530 (HC-Pro)	AUST6 (bB2)	TIGD (bB2)	<u>RGBMCS_R</u>	9.29 × 10 ⁻¹⁵	<3.00
	1341 (HC-Pro) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	4.70 × 10 ⁻⁸³	5.19
AUST27	237 (P1) - 1080 (P1)	NLD 2 (wB3)	DNK 3 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	2.45 × 10 ⁻³⁰	4.03
	1080 (P1) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	5.74 × 10 ⁻⁸⁹	4.06
AUST28	1341 (HC-Pro) - 2530 (HC-Pro)	AUST6 (bB2)	TIGD (bB2)	<u>RGBMCS_R</u>	8.42 × 10 ⁻¹⁵	<3.00
	1341 (HC-Pro) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	3.35 × 10 ⁻⁸¹	5.60
AUST29	1341 (HC-Pro) - 2530 (HC-Pro)	AUST6 (bB2)	TIGD (bB2)	<u>RGBMCS_R</u>	1.80 × 10 ⁻¹⁵	<3.00
	1341 (HC-Pro) - 3475 (P3)	GBR 27 (wB3)	AUST13 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	8.10 × 10 ⁻⁸⁴	5.19
BRS1	6019 (VPg) - 7279 (NIb) (UD)	AllA (bB2)	TIGA (bB2)	<u>RBMCS_R</u>	1.75 × 10 ⁻¹⁹	<3.00
New Zealand						
NZ11	5602 (CI) - 9834 (3' NCR)	GBR 51 (wB3)	VIET153 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	7.03 × 10 ⁻³⁷	3.73
NZ12	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	4.76 × 10 ⁻²²	7.95
	3063 (P3) - 5665 (CI)	NZ246 (wB2)	USA 4 (wB2)	<u>RBMCS_R</u>	7.19 × 10 ⁻³²	<3.00
NZ246	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.24 × 10 ⁻²⁸	7.85
	1174 (P1) (UD) - 3063 (P3)	CDN1 (wB2)	DEU 2 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	4.66 × 10 ⁻²⁴	4.49
	6132 (VPg) - 9834 (3' NCR)	USA 4 (wB2)	GBR 91 (wB3)	<u>RBMCS_R</u> S _o	2.13 × 10 ⁻¹⁶	3.32
NZ290	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.50 × 10 ⁻³⁵	7.31
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	3.61 × 10 ⁻⁴¹	4.61
NZ402	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	4.50 × 10 ⁻²⁰	8.24
	1174 (P1) (UD) - 5219 (CI)	CDN1 (wB2)	DEU 2 (wB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	3.87 × 10 ⁻¹⁵	3.27
	6132 (VPg) - 9834 (3' NCR)	USA 4 (wB2)	GBR 91 (wB3)	<u>RBMCS_R</u> S _o	5.19 × 10 ⁻¹⁹	3.23
NZ403	402 (P1) - 2530 (HC-Pro)	BRS1 (bB2)	DEU 7 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	2.36 × 10 ⁻³¹	4.62
	6019 (VPg) - 8993 (CP)	DEU 7 (bB2)	AUST10 (bB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	1.10 × 10 ⁻³¹	3.26
NZ403B	402 (P1) - 2530 (HC-Pro)	BRS1 (bB2)	DEU 7 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	2.36 × 10 ⁻³¹	4.62
	6019 (VPg) - 8993 (CP)	DEU 7 (bB2)	AUST10 (bB2)	<u>RBMCS_R</u> S _o	1.10 × 10 ⁻³¹	3.26
NZ412	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.03 × 10 ⁻³⁵	7.31
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.54 × 10 ⁻⁴²	4.69
NZ412B	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.03 × 10 ⁻³⁵	4.48
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.40 × 10 ⁻⁴²	4.53
NZ415	402 (P1) - 2530 (HC-Pro)	BRS1 (bB2)	DEU 7 (bB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o P	8.58 × 10 ⁻³²	4.48
	6019 (VPg) - 8993 (CP)	DEU 7 (bB2)	AUST10 (bB2)	<u>RBMCS_R</u>	1.10 × 10 ⁻³¹	<3.00
NZ419	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.88 × 10 ⁻³¹	7.48
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.80 × 10 ⁻⁴²	4.25
NZ419B	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	2.39 × 10 ⁻³¹	7.69
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	2.16 × 10 ⁻³¹	4.58
NZ419C	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	2.16 × 10 ⁻³¹	7.69
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.97 × 10 ⁻⁴²	4.17
NZL5	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	9.75 × 10 ⁻³⁵	7.31
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.92 × 10 ⁻⁴¹	4.56
NZW3	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	4.03 × 10 ⁻³⁴	7.44
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	2.96 × 10 ⁻⁴³	4.02
NZW4	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	7.15 × 10 ⁻²⁷	6.99
	1174 (P1) (UD) - 3063 (P3)	CDN1 (wB2)	NZ402 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.14 × 10 ⁻²³	4.71
	6132 (VPg) - 9834 (3' NCR)	USA 4 (wB2)	GBR 91 (wB3)	<u>RBMCS_R</u> S _o	1.32 × 10 ⁻¹⁴	3.49
NZW6	1 (5' NCR) - 1174 (P1)	CZE 1 (wB2)	PV134 (wB2)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	1.03 × 10 ⁻³²	7.02
	8071 (NIb) - 9834 (3' NCR)	POL 2 (wB2)	NZ246 (wB3)	<u>RGBMCS_R</u> S _o	8.47 × 10 ⁻³⁷	4.84

^aRecombination sites detected in the *Turnip mosaic virus* genomes by the recombination detection programs, from the aligned sequences of the likely recombinant and its 'parental isolates'. Nucleotide positions show locations of individual genes numbered as in the UK 1 genome (Jenner et al., 2000).

P1; Protein 1, HC-Pro; Helper-component proteinase protein, P3; Protein 3, CI; cylindrical inclusion protein, VPg; genome linked viral protein, NIb; Nuclear inclusion b protein and CP; coat protein, NCR; non-coding region, UD; Undetermined.

^bbB2; basal-B2 subgroup, wB2; world-B2 subgroup, wB3; world-B3 subgroup.

^cRecombinant isolates identified by the recombination detection programs: R (RDP), G (GENECONV), B (BOOTSCAN), M (MAXCHI), C (CHIMAERA) and S_R (SISCAN) programs in RDP4 package (Martin et al., 2015), and S_o (SISCAN total nucleotide site analysis) in original SISCAN version 2 (Gibbs et al., 2000) and P (PHYLPRO) (Weiller, 1998) programs. The analyses were done using default settings and a Bonferroni-corrected *P*-value cut-off of 0.01 in RDP4.

^dThe reported *P*-value is for the program in bold type and underlined in RDP4 package and is the smallest *P*-value among the isolates calculated for the region in question.

^eBoth of the parental isolates of the recombination sites had *Z*-values greater than 3 in total nucleotide site analysis in S_o of the SISCAN version 2 program; thus lower *Z*-value of one of the parents identified are shown.

AUST19 および AUST23 分離株は world-B 分子系統グループの分離株を親型に持つグループ内組換え体であると思われた。また 13 分離株は world-B と basal-B 分子系統グループの分離株を親型に持つグループ間組換え体と思われた。ニュージーランド産分離株においては非組換え体およびグループ間組換え体は認められなかった。一方で 14 分離株は単一あるいは 3 つの組換え部位を持つ world-B 分子系統グループのグループ内組換え体でと思われ, NZ403, NZ403B および NZ415 分離株は 4 組換え部位を持つ basal-B2 分子系統サブグループのグループ内組換え体と思われた。さらに両国に共通する VPg 遺伝子領域内 (6132 塩基; UK 1 分離株の塩基配列を参照) の組換え部位以外の 20 の組換え部位は先行研究 (Ohshima et al., 2007; Nguyen et al., 2013a) において認められていない新規の組換え部位であった。すなわち, オーストラリアおよびニュージーランドの TuMV 集団は他の地域の TuMV 集団とは共通の組換え体の祖先をほとんど持たず, 両国に侵入直前あるいは侵入後に独立した組換えが起きたと思われた。

b. 分子系統解析

5' および 3' 末端遺伝子領域とポリタンパク質遺伝子の連結配列を用いて Neighbor-Net 法により分子系統樹を作成した (Fig. 29)。オーストラリア産 3 分離株 (AUST10, AUST13 および BRS1), ニュージーランド産 3 分離株 (NZ403, NZ403B および NZ415) とイタリア, スペインおよびドイツ産のヨーロッパ分離株の組換え体および非組換え体が basal-B および組換え体のグループを形成した。さらに多くのオーストラリアおよびニュージーランド分離株はヨーロッパ産分離株と共に world-B および組換え体のグループに属した。両国の分離株はこれら 2 グループのみに属し, 他のグループには属さなかった。オーストラリアおよびニュージーランド分離株は AUST21 分離株を除き, 全て組換え体であった (Fig. 28)。そのため, 組換え部位を出来る限り含まない遺伝子領域 A, B および C (それぞれ塩基番号 1460-3472, 3812-6016 および 64798068; UK 1 分離株の塩基配列を参照) (Fig. 28) を用いて PhyML v3 (Guindon & Gascuel, 2003) における最尤法で分子系統樹を描いた (Fig. 30)。jModelTest v2 (Darriba et al., 2012) により各遺

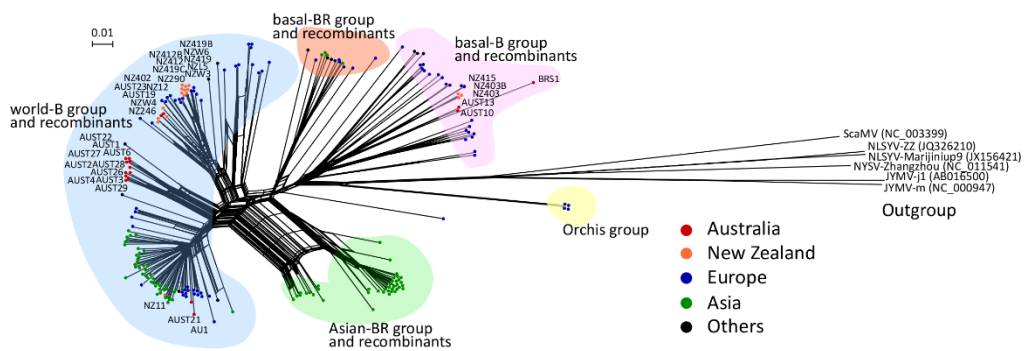


Fig. 29. Phylogenetic evidence for recombination among *Turnip mosaic virus* from the Australia, New Zealand and worldwide full genomic sequences. Neighbor-Net network analysis was done using SPLITSTREE v4.11.3 (Huson et al., 2006). The homologous two sequences of *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) (Fuji & Nakamae, 1999, 2000), one of *Scallion mosaic virus* (ScaMV) (Chen et al., 2002), one of *Narcissus yellow stripe virus* (NYSV) (Chen et al., 2006) and two of *Narcissus late season yellows virus* (NLSYV) (Lin et al., 2012; Wylie et al., 2014) were used as the outgroup. Formation of a reticular network rather than a single bifurcated tree is suggestive of recombination. The isolates obtained in this study are listed in Table 2.

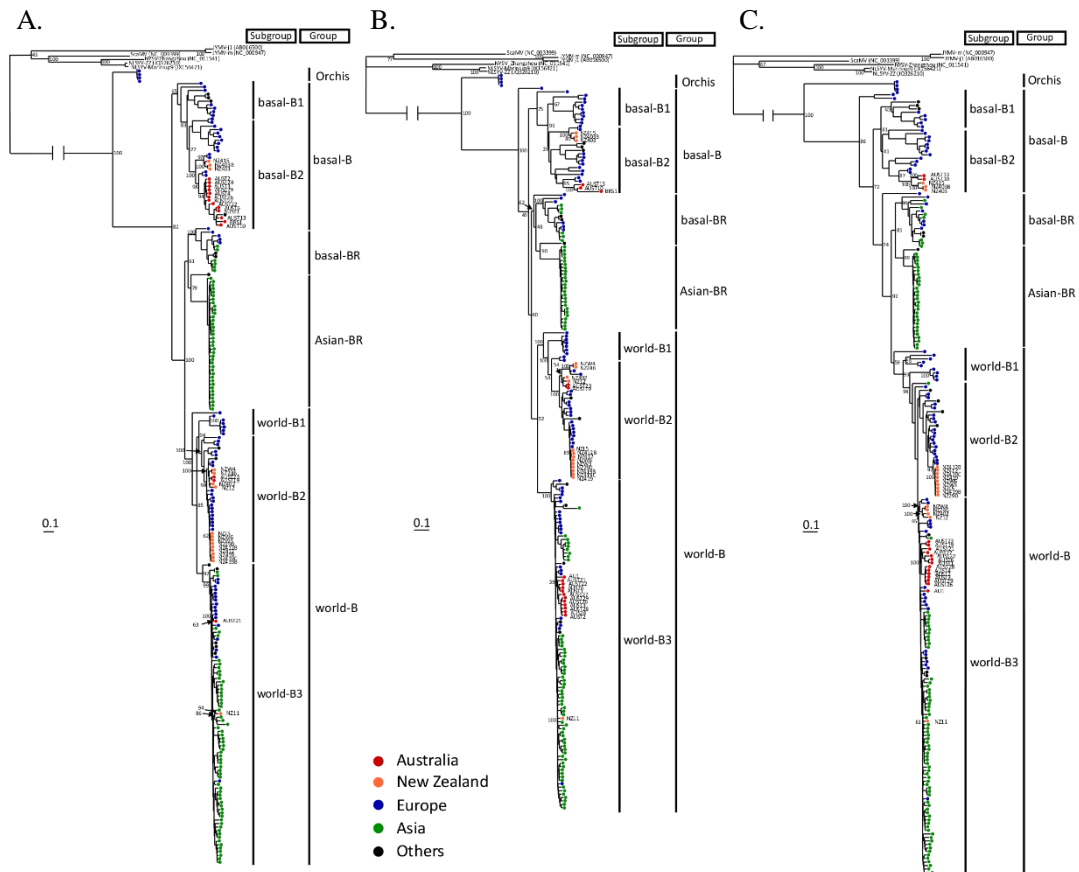


Fig. 30. Maximum likelihood (ML) trees calculated from the Regions A (nt 1460-3472, correspond to the positions in original UK 1 genome) (A), Region B (nt 3812-6016) (B), and Region C (nt 6479-8068) (C) using 225, 214 and 226 isolates of *Turnip mosaic virus*, respectively. See Fig. 28 and Methods for details. Interlineage recombinants had been discarded. Numbers at each node indicate bootstrap percentages based on 1000 pseudoreplicates in ML tree. Horizontal branch length is drawn to scale with the bar indicating 0.1 nt replacements per site. The homologous two sequences of *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) (Fuji & Nakamae, 1999, 2000), one of *Scallion mosaic virus* (ScaMV) (Chen et al., 2002), one of *Narcissus yellow stripe virus* (NYSV) (Chen et al., 2006) and two of *Narcissus late season yellows virus* (NLSYV) (Lin et al., 2012; Wylie et al., 2014) were used as the outgroup. Note that isolate BRS1 was discarded from the Region C tree because the isolate seemed to have tentative recombination site in the region. The isolates collected in Australia (acronyms in red) and New Zealand (acronyms in orange), Asia (acronyms in green), Europe (acronyms in blue) and other countries (acronyms in black) are separately listed. For the details of isolates, refer Table 2.

伝子領域での最適な塩基置換モデルは GTR+I+r₄ であった。分子系統樹は A, B および C 遺伝子領域それぞれ 225, 214 および 226 分離株の非組換え体とグループ内組換え体を用いて作成した。各分子系統樹上の分離株は Nguyen et al. (2013a) で報告されている 5 主要グループ (Orchis, basal-B, basal-BR, Asian-BR および world-B) に分類された。basal-B および world-B 分子系統グループはさらに basal-B1 および basal-B2 と world-B1, world-B2 および world-B3 サブグループに分かれた。

組換え部位が少ない 3 遺伝子領域 (A, B, C) (材料と実験方法を参照) を用いて分子系統樹を描いた。遺伝子領域 A の分子系統樹では 13 オーストラリア分離株と 3 ニュージーランド分離株が basal-B2 サブグループに属し、各 1 分離株ずつ両国の分離株が world-B3 サブグループに属した (Fig. 30A)。遺伝子領域 B の分子系統樹では各 3 分離株ずつ両国の分離株が basal-B2 サブグループに、2 オーストラリア分離株と 13 ニュージーランド分離株が world-B2 サブグループに、さらに 12 オーストラリア分離株が world-B3 サブグループに属した (Fig. 30B)。遺伝子領域 C の分子系統樹では 2 オーストラリア分離株と 3 ニュージーランド分離株が basal-B2 サブグループに、14 オーストラリア分離株と 5 ニュージーランド分離株が world-B3 サブグループに属した (Fig. 30C)。両国の分離株は Orchis, basal-BR, Asian-BR 分子系統グループには属さなかった。

c. 集団遺伝学的解析

DNASP v5 プログラムを用いてオーストラリアおよびニュージーランド集団の塩基配列およびハプロタイプの多様性を解析した (Table 13)。その結果、多くのデータセットにおいて、塩基配列の多様性は小さく、ハプロタイプの多様性は大きな値を示す傾向にあった。HC-Pro*および P3*遺伝子を用いた解析では、ほとんどのオーストラリアの分子系統グループはニュージーランドの分子系統グループに比べ、塩基配列の多様性は大きいと思われた。また低い塩基配列の多様性と高いハプロタイプの多様性は、それら地域の集団が出現してから時間

Table 13. Haplotype and nucleotide diversities of Australia and New Zealand populations in *Turnip mosaic virus*.

Group and country	Protein encoding region ^a								
	Helper-component proteinase			Protein 3			Nuclear inclusion b		
	<i>n</i> ^b	<i>H</i> ^c	π ^d	<i>n</i>	<i>H</i>	π	<i>n</i>	<i>H</i>	π
All groups									
Oceania	33	0.991±0.011	0.1439±0.0074	30	0.993±0.011	0.1490±0.0084	33	0.988±0.012	0.0905±0.0108
Australia	16	1.000±0.022	0.1365±0.0161	16	1.000±0.022	0.1004±0.0238	16	1.000±0.022	0.0749±0.0176
New Zealand	17	0.963±0.033	0.0933±0.0227	14	0.962±0.041	0.1115±0.0290	17	0.950±0.036	0.0863±0.0167
basal-B (B2)									
Oceania	15	0.990±0.028	0.0902±0.0084	16	0.992±0.025	0.0821±0.0156	5	0.900±0.016	0.0640±0.0129
Australia	12	1.000±0.034	0.0866±0.0100	13	1.000±0.030	0.0420±0.0053	2	1.000±0.500	0.0434±0.0219
New Zealand	3	0.667±0.314	0.0209±0.0098	3	0.667±0.314	0.0193±0.0091	3	0.667±0.314	0.0277±0.0131
world-B									
Oceania	18	0.974±0.029	0.0607±0.0137	14	0.974±0.039	0.0716±0.0243	28	0.986±0.015	0.0581±0.0025
Australia	4	1.000±0.177	0.1009±0.0273	3	1.000±0.272	0.1182±0.0547	14	1.000±0.027	0.0429±0.0042
New Zealand	14	0.956±0.045	0.0410±0.0145	11	0.956±0.059	0.0388±0.0273	14	0.936±0.051	0.0455±0.0090
world-B2									
Oceania	15	0.962±0.040	0.0287±0.0047	12	0.964±0.051	0.0271±0.0111	9	0.821±0.101	0.0014±0.0003
Australia	2	1.000±0.500	0.0032±0.0016	2	1.000±0.500	0.0033±0.0017	0	ND ^e	ND
New Zealand	13	0.949±0.051	0.0248±0.0060	10	0.944±0.070	0.0033±0.0004	9	0.821±0.101	0.0014±0.0003
world-B3									
Oceania	3	1.000±0.272	0.0478±0.0135	2	1.000±0.500	0.0970±0.0485	19	1.000±0.017	0.0483±0.0034
Australia	2	1.000±0.500	0.0388±0.0194	1	ND	ND	14	1.000±0.027	0.0429±0.0042
New Zealand	1	ND	ND	1	ND	ND	5	1.000±0.126	0.0406±0.0084

^aPartial helper-component (HC-Pro*), Protein 3 (P3*) and nuclear inclusion b (NIb*) regions (see Material and Methods).

^bNumber of sequences.

^cHaplotype diversity.

^dNucleotide diversity was estimated by the average pairwise difference between sequences in a sample, based on all sites.

^eNot determined.

が間もなく、最近分布域を拡大したことを示していると思われた。

D. 進化速度および時間尺度推定

HC-Pro*, P3*および Nib*遺伝子領域を用いて、BEAST v1.7.5 (Drummond et al., 2012) におけるベイズ法により進化速度および時間尺度を解析した。初めに解析の統計的有意性を確認するために各遺伝子領域ごとにランダムイゼーション検定を行った結果、これらデータセットはオリジナルのデータセットが採集年度と塩基配列がランダムイズされたデータセット (10 回反復) と比較し、95%信頼区間が短く、有意に大きな進化速度であったため統計的有意性が示された (Fig. 31)。ベイズ因子の値を考慮すると (データ未掲載)、最適な分子時計モデルは 3 領域全て relaxed uncorrelated exponential モデル、統計モデルは constant size が妥当であると思われた (Table 14)。塩基置換速度の平均値を算出した結果、HC-Pro*, P3*および Nib*遺伝子領域でそれぞれ 1.47×10^{-3} , 1.35×10^{-3} および 1.30×10^{-3} 塩基/部位/年となった。さらに各領域で用いた分離株の共通祖先までの時間を算出すると、HC-Pro*, P3*および Nib*遺伝子領域でそれぞれ 610, 806 および 679 年となった (Table 14)。これらの結果を用いて各遺伝子領域について MCC 系統樹を作成した (Figs. 32-34)。これら MCC 系統樹のオーストラリアとニュージーランド分離株およびヨーロッパ分離株の位相は ML 系統樹 (Fig. 30) と比較し、推定法の違いが位相に影響していないことを確認した。

E. 拡散経路推定

HC-Pro*, P3*および Nib*遺伝子領域を用いて、ベイジアン系統推定 (Lemey et al., 2009) により、TuMV のオーストラリアおよびニュージーランドへの拡散経路を推定した。病原性や進化的背景を考慮すると、各分子系統サブグループごとに TuMV の拡散経路は異なることが予想されたため、各サブグループごとに

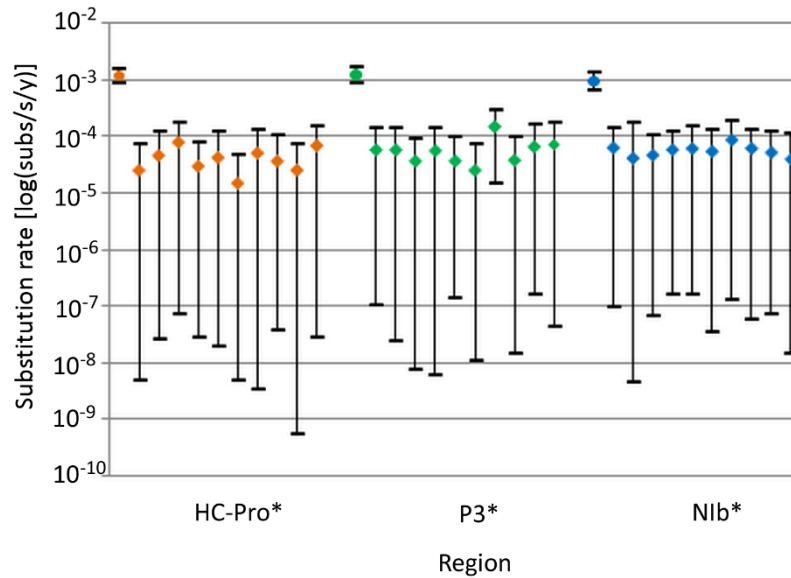


Fig. 31. Estimates of nucleotide substitution rates. Mean estimates and 95% confidence interval (CI) are shown. These were estimated from the partial sequences of 180 helper-component proteinase (HC-Pro*), 186 protein 3 (P3*) and 182 nuclear inclusion b (N1b*) regions (For region, see Material and Methods). The first is based on the original data, whereas the remaining ten values are from date-randomized replicates, in each set of estimates. The 95% CI of the estimates from the date-randomized replicates did not overlap with the mean posterior estimate from the original data set. Moreover, the lower tails of the credibility intervals were long and tend towards zero. These features suggested that there was sufficient temporal structure in the original data sets for rate estimation.

Table 14. Details of the data sets used for estimation of nucleotide substitution rate and time to the most recent common ancestor for *Turnip mosaic virus*.

Parameter	Protein encoding region ^a		
	Helper-component proteinase	Protein 3	Nuclear inclusion b
Best-fit substitution model	GTR + I + Γ_4	GTR + I + Γ_4	GTR + I + Γ_4
Best-fit molecular clock model	Relaxed uncorrelated exponential	Relaxed uncorrelated exponential	Relaxed uncorrelated exponential
Best-fit population growth model	Constant size	Constant size	Constant Size
Sequence length (nt)	927	897	891
No. of sequences	180	186	182
Sampling date range	1968-2012	1970-2012	1968-2012
Chain length (in millions)	100	100	100
TMRCAs ^b (years)			
All isolates	610 (233-1156) ^c	806 (274-1630)	679 (205-1502)
Australia			
basal-B2 subgroup	80 (52-119) [n=12] ^d	44 (25-65) [n=13]	36 (19-51) [n=2]
world-B2 subgroup	14 (9-20) [n=2]	9 (5-29) [n=2]	NA ^e [n=0]
world-B3 subgroup	27 (16-36) [n=2]	NA [n=1]	46 (28-67) [n=14]
New Zealand			
basal-B2 subgroup	14 (4-29) [n=3]	16 (4-28) [n=3]	22 (12-31) [n=3]
world-B2 subgroup	56 (30-83) [n=13]	16 (9-23) [n=10]	17 (11-24) [n=9]
world-B3 subgroup	NA [n=1]	NA [n=1]	68 (36-100) [n=5]
Substitution rate (nt/site/year)	1.47×10^{-3} (1.08×10^{-3} - 1.89×10^{-3})	1.35×10^{-3} (9.50×10^{-4} - 1.77×10^{-3})	1.30×10^{-3} (9.07×10^{-4} - 1.77×10^{-3})
dN/dS ^f	0.025	0.120	0.030
No. of variable sites ^g	511	536	493

^aPartial helper-component (HC-Pro*), Protein 3 (P3*) and nuclear inclusion b (NIb*) regions (see Methods).

^bTime to the most recent common ancestor (years).

^c95% highest posterior density interval in parentheses.

^dThe number of isolates in square brackets.

^eNot available.

^fNon-synonymous (dN) and synonymous (dS) substitution (dN/dS) ratios were calculated for three protein-encoding regions using the Pamilo-Bianchi-Li method.

^gThe number of variable sites.

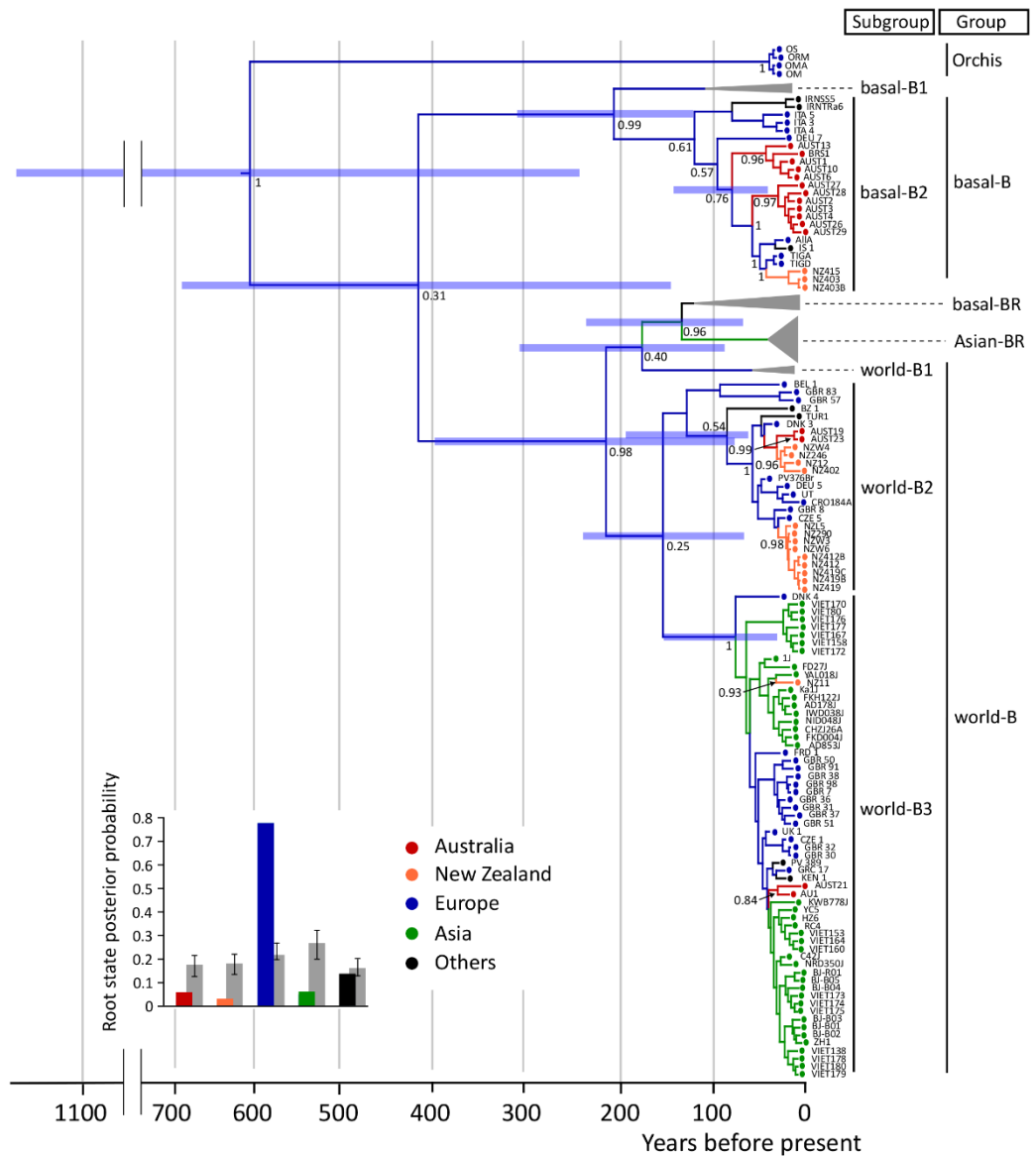


Fig. 32. Bayesian maximum-clade-credibility chronogram inferred from the protein-encoding region of *Turnip mosaic virus*. The trees were calculated from the 180 non-recombinant isolates of partial helper-component proteinase (HC-Pro*) (nt 1460-2494, corresponding to the positions in original UK 1 genome) sequences. The non-Australian and non-New Zealand (sub)groups of basal-B1, basal-BR, Asian-BR and world-B1 are collapsed. Horizontal blue bars represent the 95% confidence interval (CI) intervals of estimates of node ages. The bar graph shows the root state posterior probabilities for each location (colored bars). Gray bars show probabilities obtained with 10 randomizations of the tip locations.

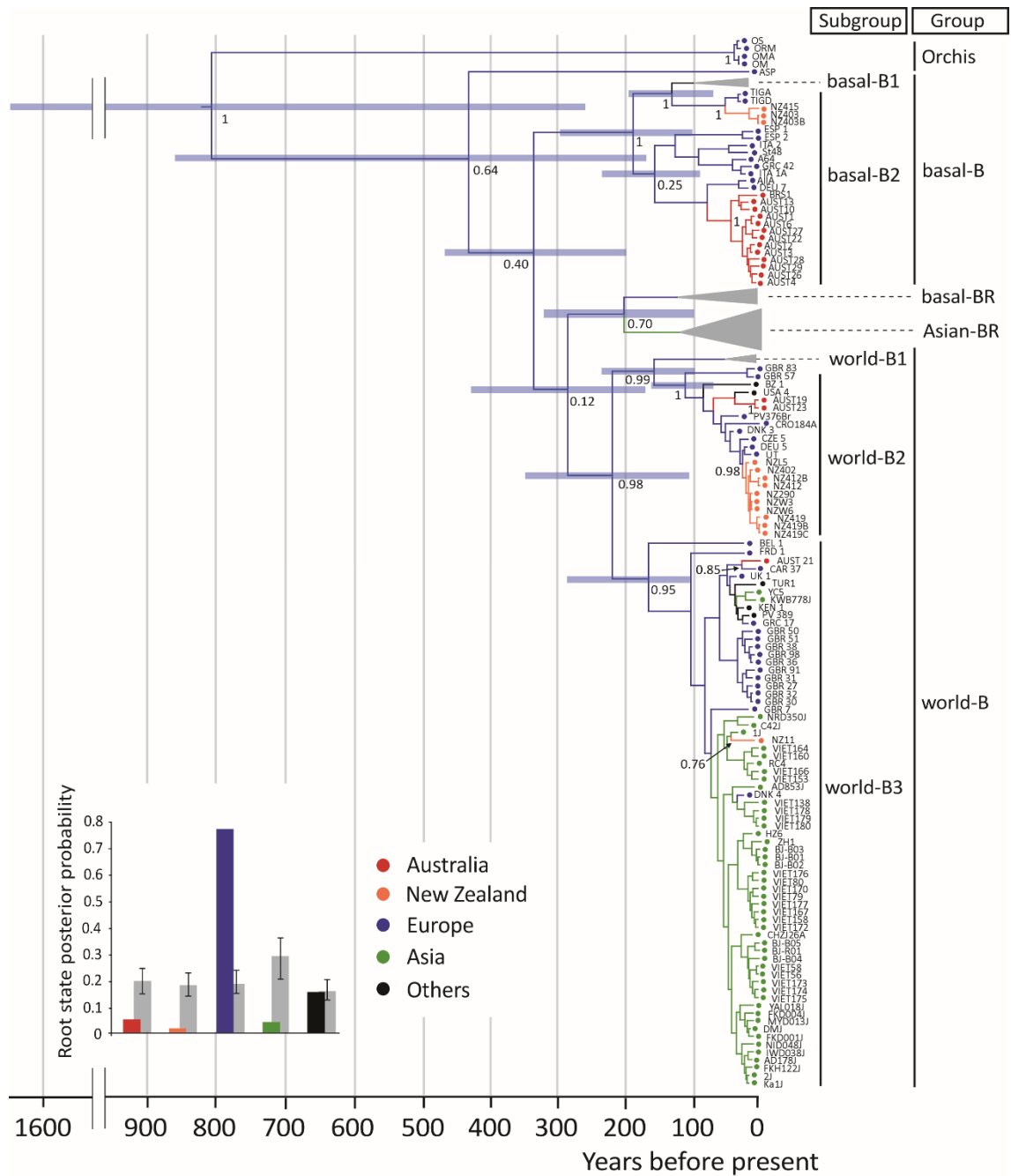


Fig. 33. Bayesian maximum-clade-credibility chronogram inferred from the protein-encoding region of *Turnip mosaic virus*. The tree was estimated from the 186 non-recombinant isolates of partial protein 3 (P3*) (nt 2591-3463, corresponding to the positions in original UK 1 genome) sequences. The non-Australian and non-New Zealand (sub)groups of basal-B1, basal-BR, Asian-BR and world-B1 are collapsed. Horizontal blue bars represent the 95% confidence (CI) intervals of estimates of node ages. The bar graph shows the root state posterior probabilities for each location (coloured bars). Grey bars show the probabilities obtained with 10 randomizations of the tip locations.

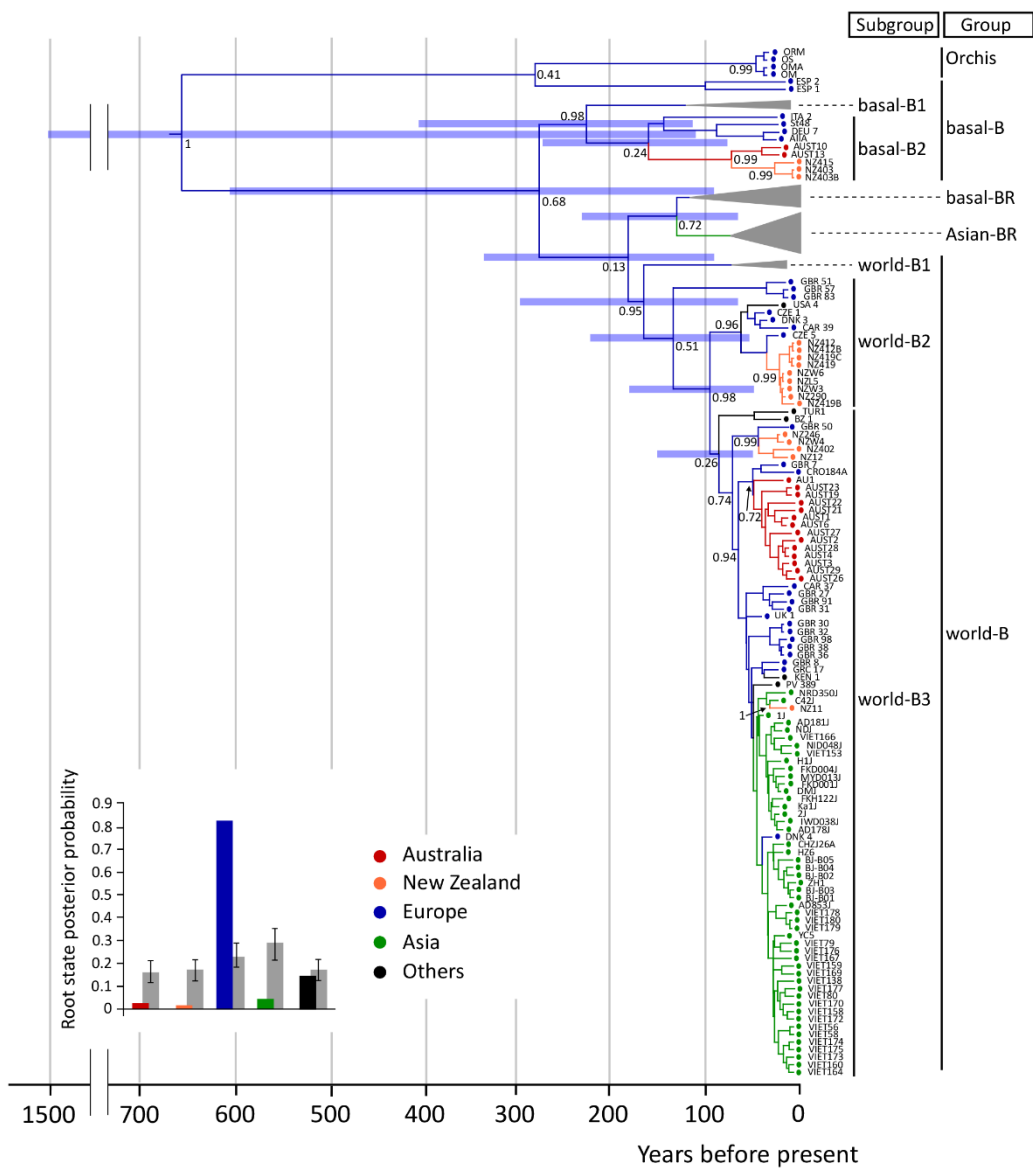
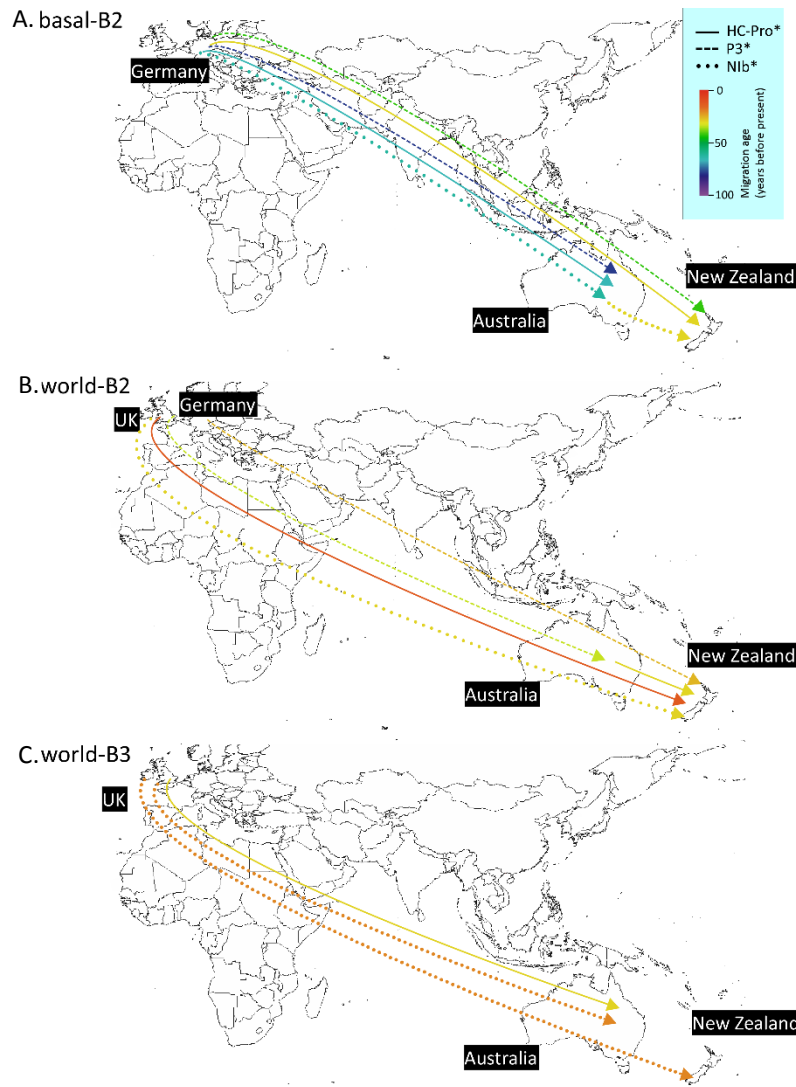


Fig. 34. Bayesian maximum-clade-credibility chronogram inferred from the protein-encoding region of *Turnip mosaic virus*. The trees were calculated from the 182 non-recombinant isolates of partial nuclear inclusion b (NIb*) (nt 7208-8068) sequences. The non-Australian and non-New Zealand (sub)groups of basal-B1, basal-BR, Asian-BR and world-B1 are collapsed. Horizontal blue bars represent the 95% confidence interval (CI) intervals of estimates of node ages. The bar graph shows the root state posterior probabilities for each location (colored bars). Gray bars show probabilities obtained with 10 randomizations of the tip locations.

拡散経路の推定を行った (Fig. 35)。その結果、**basal-B2** サブグループの分離株を用いて **HC-Pro*** および **P3*** 遺伝子を解析すると、ドイツからオーストラリアおよびニュージーランドへの拡散が認められ (**HC-Pro***; BF=54, BF=22, **P3***; BF=129, BF=63), **NIb*** 遺伝子を用いた解析ではドイツからオーストラリアへの拡散が認められた (BF=55) (Fig. 35A)。拡散時期はオーストラリアへは約 83-70 年前 (95% 信頼区間; 159-23 年前) であり、ニュージーランドへは約 45-32 年前 (95% 信頼区間; 72-16 年前) と推定された。**NIb*** 遺伝子を用いた解析では、オーストラリアからニュージーランドへの拡散 (BF=68) が約 33 年前 (95% 信頼区間; 54-20 年前) にあったことが示された。対照的に、**world-B2** および **world-B3** サブグループの両国への拡散は約 42-20 年前 (95% 信頼区間; 63-12 年前) であり、比較的最近であった (Figs. 35B, C, D)。さらにヨーロッパ内および東アジア内での拡散を解析したところ、近隣国間での拡散 (BF>100) が認められた (Fig. 36)。

F. 組換え時期の推定

Visser et al. (2012) の方法に基き、組換え時期の推定を行った (Table 15, Fig. 37)。グループ間組換え体においては、**basal-B2** と **world-B3** 分子系統グループの親型を持つオーストラリア分離株の 2 組換え部位 [818 および 3475 塩基 (UK 1 分離株の塩基番号を参照)] の組換えはそれぞれ 50-10 および 51-22 年前に起きたと推定された。グループ内組換え体においては、**basal-B2** 分子系統グループのニュージーランド分離株の組換え部位 (6019 塩基) の組換えは 75-19 年前、**world-B** 分子系統グループのニュージーランド分離株の 2 組換え部位 (5602 および 5665 塩基) の組換えはそれぞれ 49-20 および 22-11 年前に起きたと推定された。すなわち、**world-B** 分子系統グループより **basal-B** 分子系統グループに関連する組換えの方が生じた時期は古いと思われた。



D.

Subgroup	Protein encoding region				P3*				Nib*			
	HC-Pro*		YBP	BF	From		YBP	BF	From		YBP	BF
From	To	From			To	From			To			
basal-B2	Germany	Australia	70 (136-38)	54	Germany	Australia	83 (159-23)	129	Australia	New Zealand	33 (54-20)	68
	Germany	New Zealand	32 (52-16)	22	Germany	New Zealand	45 (72-30)	63	Germany	Australia	71 (140-32)	55
world-B2	Australia	New Zealand	33 (55-23)	43	UK	Australia	42 (63-24)	68	UK	New Zealand	36 (47-27)	43
	UK	New Zealand	20 (40-13)	40	Germany	New Zealand	29 (38-13)	63				
world-B3	UK	Australia	34 (48-24)	39					UK	Australia	24 (41-12)	44
									UK	New Zealand	26 (40-15)	38

Fig. 35. Plausible historical migration pathways of *Turnip mosaic virus* inferred using partial helper-component proteinase (HC-Pro*), protein 3 (P3*) and nuclear inclusion b (Nib*) regions. Details of the regions are given in Methods. (A-C) Migration routes for Australia and New Zealand only are shown, and only when supported by a Bayes factor (BF) > 10. Only the migration pathways for basal-B2 (A), world-B2 (B) and world-B3 (C) isolates are shown. (D) For each subgroup migration, the BF and estimated age in years before present (YBP) are shown. The 95% confidence interval for each age estimate is given in parentheses. We analysed basal-B group isolates instead of basal-B2 subgroup isolates because too few isolates belong to the basal-B2 subgroup, and only the BFs from the basal-B2 subgroup are listed. BF values can be interpreted as follows: $10 \leq BF < 30$, strong support; $30 \leq BF < 100$, very strong support; and $BF \geq 100$, decisive support.

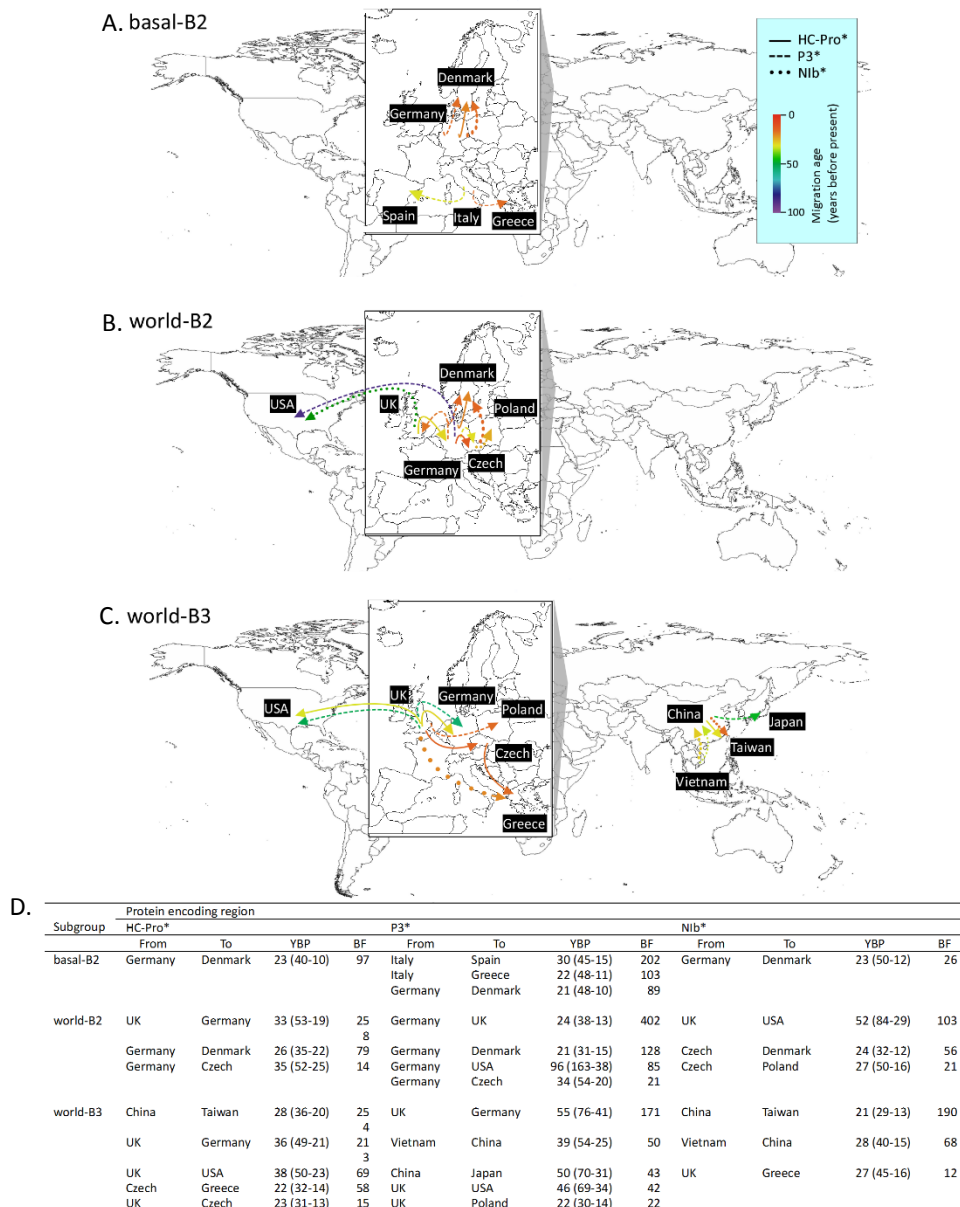


Fig. 36. Plausible historical migration pathways of *Turnip mosaic virus* inferred using partial helper-component proteinase (HC-Pro*), protein 3 (P3*) and nuclear inclusion b (Nib*) regions. Details of the regions are given in the Methods. Migration lines between European, Asian and American countries are shown, and only when supported by a Bayes factor (BF) greater than 10. The migration pathways in basal-B2 (A), world-B2 (B) and world-wB3 (C) subgroups are shown because Australia and New Zealand isolates analysed in this study only fell into these subgroups. For each subgroup migration, the BF and estimated age in years before present (YBP) are shown (D). The 95% confidence interval for each age estimate is given in parentheses. We analysed basal-B group isolates instead of basal-B2 subgroup isolates because too few isolates belong to basal-B2 subgroup, and only the BFs from the basal-B2 subgroup are listed. BF values can be interpreted as follows: $10 < BF < 30$, strong support; $30 < BF < 100$, very strong support; and $BF > 100$, decisive support.

Table 15. The estimate of the time of recombination events of *Turnip mosaic virus* in Australia and New Zealand.

Recombination site ^a	Parent (5' × 3')	Recombinant type ^b	Recombination age (YBP) ^c	Stem age (YBP)	Crown age (YBP)
Australia					
nt 818	world-B3 × basal-B2	Inter	50-10	50-18	23-10
nt 1080	world-B2 × basal-B2	Inter	54-13	54-21	50-13
nt 1341	world-B3 × basal-B2	Inter	48-21	48-25	40-21
nt 1851	basal-B2 × basal-B2	Intra	35-9	35-14	22-9
nt 2530	basal-B2 × basal-B2	Intra	48-23	48-25	37-23
nt 2742	world-B3 × basal-B2	Inter	38-14	38-14	N/A ^d
nt 3475	basal-B2 × world-B3	Inter	51-22	51-26	49-22
New Zealand					
nt 5602	world-B3 × world-B3	Intra	49-20	49-37	46-20
nt 5665	world-B2 × world-B3	Intra	22-11	22-11	N/A
nt 6019	basal-B2 × basal-B2	Intra	75-19	75-28	70-19
nt 8071	world-B2 × world-B3	Intra	20-10	20-14	19-10
Both countries					
nt 1174	world-B2 × world-B2	Intra	27-14	27-18	24-14
nt 5219	world-B2 × world-B2	Intra	24-13	24-17	21-13
nt 6132	world-B2 × world-B3	Intra	28-16	28-20	25-16

^aThe ages of major recombination sites in Australia and New Zealand were estimated with reference to the results of Bayesian phylogenetic analyses shown in Fig 37, respectively. The common recombination sites in both countries were estimated from the tree including all isolates (data not shown). Nucleotide positions show locations of individual genes numbered as in the original UK 1 genome (Jenner et al., 2000).

^bInter; interlineage recombination site, Intra; intral lineage recombination site.

^cThe oldest and youngest ages are shown. The oldest and the youngest ages were estimated from the stem and crown ages, respectively. Estimates are given in years before present (YBP).

^dNot available

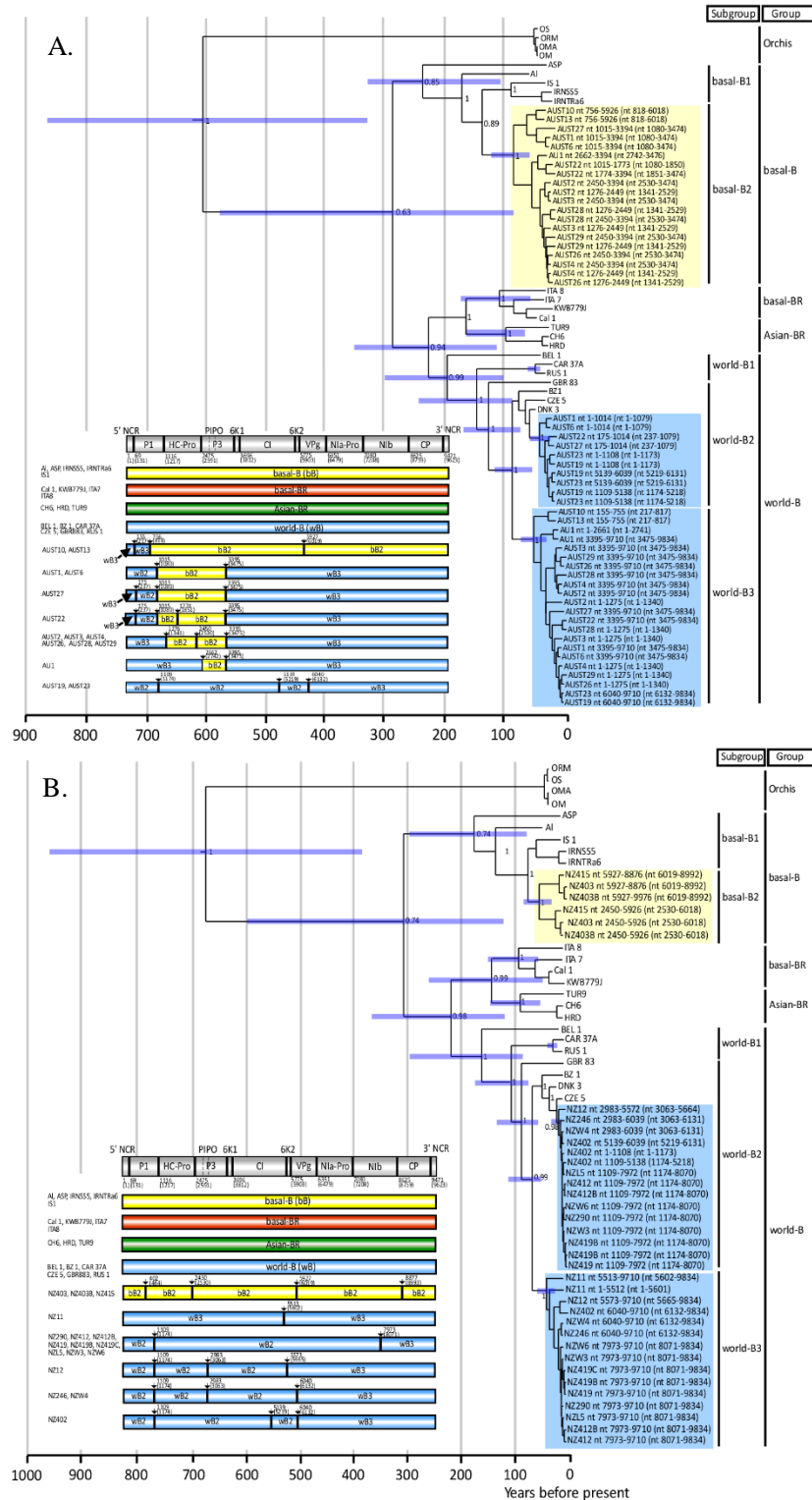


Fig. 37. The recombinant origins of *Turnip mosaic virus* in Australia (A) and New Zealand (B). Maximum-clade-credibility trees from the BEAST analyses are shown with error bars representing the 95% confidence interval (CI) of node ages (blue) according to relaxed uncorrelated exponential models. Recombinant isolates are represented as multiple taxa, each representing a subset of the alignment (as indicated) with distinct phylogenetic signal. The nucleotide positions of the recombination sites and those in parenthesis are shown relative to the 5' end of the genome using numbering of the sequences of the aligned sequences used in present study and the UK 1 isolate (Jenner et al., 2000), respectively.

VII. 考察

1. カリフラワーモザイクウイルス

過去 50 年以上に渡るデータを用いて CaMV の空間的・時間的な拡散についての調査を行った。本研究はアブラナ科植物が初めて栽培化された地域を含む地域における調査であり、本研究には含めることができなかった未発見の非アブラナ科植物感染 CaMV 分離株が今回の分子進化的解析の結果に影響を与えるかもしれないが、本研究では、地球規模での CaMV の遺伝的多様性についての知見を得ることができた。

パトリスティック距離プロットの解析では、ORFs I-V では各 ORF がそれぞれ同様の進化をしてきたこと、一方 ORFs I-V および ORF VI が異なる進化をしてきたことを示した。興味深いことに、ORFs I-V からは 35SRNA、ORF VI からは 19SRNA が転写される。これは CaMV の複製機構と進化のメカニズムが関係していることを示しているかもしれない。

ORF VI には翻訳活性化因子がコードされ、ORFs I-V にはポリシストロニックな 35S タンパク質がコードされている (Haas et al., 2002; Hohn, 2013)。多くの他の植物ウイルスと同様に CaMV においても組換えが遺伝的多様性を広げる上で重要な役割を果たしている (Chenault & Melcher, 1994; Froissart et al., 2005)。本研究では多くのイラン、北アメリカ、日本およびヨーロッパ産分離株が組換え体であり、その組換え部位は ORF VI の 5' および 3' 末端に認められた。これら 2 部位は CaMV の組換えにおけるホットスポットと思われる。これら組換え部位は CaMV の Vi/Av 領域 (Kobayashi & Hohn, 2004) および病原性ドメイン (Hapiak et al., 2008; Hohn, 2013) に位置する。本研究で検出した組換え部位は CaMV の病原性に関与していると思われ、これらの組換え体が離散的に分布していることは複雑な CaMV の地球規模での移行が過去にあったことを示唆していると思われる。

各地域の CaMV の集団遺伝構造は ORFs I-V および ORF VI を用いた分子系統

解析の結果から、少なくとも 4 グループが存在することが明らかとなり、それら各グループは地理的に分化しているように思われた。これらの地域特異的な集団構成は各地域に CaMV 集団が導入される際、栽培されている作物あるいは自生している雑草の地域間の違いによるボトルネック効果の影響を受けたため、あるいは創始者効果が働いたためと考えられる。

集団遺伝学的解析の結果、各地域間で頻繁に遺伝子流動が生じていることが示された (Fig. 21, Table 6)。特に、地中海沿岸および中東地域、日本およびアメリカ間において顕著に遺伝子流動が認められ、これらの地域間で過去に罹病作物の移動があったのではないかと推察された。

系統地理学的解析の結果、ORFs I-V および ORF VI は異なる移行経路を辿っていることが明らかとなった。例えば、ORFs I-V ではトルコからギリシャそしてイランへ、一方 ORF VI ではギリシャからトルコ、トルコからイランへ拡散した。これらの結果は、過去に CaMV 集団が複雑な地域間の移行を経験したことを示唆しており、集団遺伝学的解析の結果とほぼ一致した。また Neighbour-Net 法を用いた ORF VI の系統樹ではイタリア産 Bari 1 分離株がどのクラスターにも属しておらず、未知のクラスターが存在する可能性が示唆された (Fig. 19)。さらに Bari 1 分離株は分子系統樹および STRUCTURE による集団遺伝解析から最も起源に近い分離株であると考えられたため、今後 Bari 1 分離株の全ゲノム構造を決定することは元より本分離株が採集されたイタリアバリ島周辺にて多くの分離株を採集し、解析を行う必要があるかもしれない。CaMV 集団の地域間の移行パターンは CaMV の伝搬方法および地理的障壁から受ける影響を反映している可能性がある。CaMV はアブラムシにより半永続的に伝搬される。また山脈、砂漠あるいはその土地特異的な作物の存在なども大きな制約となって CaMV の拡散に関係しているかもしれない。ウイルスの拡散における物理的な障壁については RYMV (Traore et al., 2005) および *Tobacco vein banding mosaic virus* (Zhang et al., 2011) で報告されている。

CaMV は主にキャベツ、ブロッコリーおよびカリフラワーを含むアブラナ科植物に感染する。キャベツとケールは紀元前 1000 年から栽培化が始まっており

(Katz and Weaver, 2003), それぞれ 17 および 19 世紀になってから北アメリカおよび日本に持ち込まれた。ブロッコリーおよびカリフラワーはケールを起源としており地中海沿岸地域が発祥の地であると考えられている。そしてイタリアからヨーロッパの各国へ 16-19 世紀に広まったとされ、北アメリカおよび日本には 19-20 世紀に導入された (Buck, 1956; Gray, 1982)。分子時計を用いた解析により、ORF VI のデータセットで分子系統樹を描くと、最も根元に位置する主要な分岐は約 450 年前に起きたと思われるが、サブグループはその約 200-350 年後に出現したと思われる。今回の汁液接種における接種試験ではアブラナ科植物に対する病原性の差はほとんど見出だせなかったが、おそらく拡散した地域特有の品種に宿主適応が起きていると思われるため、このサブグループの出現時期は CaMV 集団が新たな病原性を獲得した時期と一致しているかもしれない。推定した拡散の速さと経路から、CaMV においておそらくアブラムシによる拡散は考えにくい。すなわち、アブラムシがウイルスを保毒し、媒介能を有したまま短期間の間に山脈や海を超えるのは難しいと思われるためである。しかしながら、自然界における CaMV の進化は、おそらく伝搬の間の宿主間、そして宿主内で起こると考えられる集団のボトルネック効果を含む確率論的な過程に影響を受けると考えられており (Monsion et al., 2008), アブラムシによる伝搬は世界規模での拡散には関与していないにしても、限定された地域における伝搬には関係しているかもしれない。本研究で推定した CaMV の拡散の歴史とこれらの作物の世界的な拡散はほぼ一致していた。

以上の成果は、植物のパラレトロウイルス、2 本鎖 DNA ウイルスについて初めて時間尺度と拡散経路の解析を行った研究である (Yasaka et al., 2014)。

2. カブモザイクウイルス

これまでのオーストラリア産 TuMV に関しては 5 分離株の CP 遺伝子領域、1 分離株の全塩基配列が国際塩基配列データベースに登録されており、これら塩基配列を用いて解析した結果、オーストラリアには少なくとも 2 リネージが存

在することが示されていた (Gibbs et al., 2008b)。一方でニュージーランド産 TuMV に関しては 1 分離株の全塩基配列が国際塩基配列データベースに登録されているのみであった。すなわち、両国の TuMV 集団に関する集団遺伝学・系統地理学的な研究はほとんど進展していなかった。そこで本研究では、オーストラリアおよびニュージーランドから 32 分離株の TuMV を採集後、全ゲノム構造を決定し、分子進化的解析を行い、さらにそれら集団の時間尺度および拡散経路を明らかにした。

本研究で行った宿主反応調査の結果、ニュージーランド産 NZ290 分離株以外の分離株はダイコン属植物 (品種; 耐病総太り) に病原性を示さなかった。そのため、NZ290 分離株を除く他の分離株は B 宿主型であった。両国の分離株の多くは野生のアブラナ科植物から採集しており、分離株の宿主型と採集植物の間には相関が認められた。すなわち、両国の TuMV 集団の病原性はアジアの TuMV 集団の病原性と異なり、生物学的に異なる性質を持つと思われた。また両国の全ての分離株はキノアに汁液接種を行うと、接種葉だけでなく上位葉にも退緑病斑が認められた。おそらくこれらウイルスは過敏感反応死による細胞内への封じ込みから逃れていると思われ、つまり、完全にではないが、抵抗性を一部打破し全身感染能を獲得しているのではないかと思われた。このキノアでの全身感染は多くのアジアおよびヨーロッパ分離株では認められていない。そのため、両国分離株に共通する特徴であり、おそらく TuMV が両国に侵入した後に病原性を獲得したか、あるいは両国に侵入した TuMV 集団はキノアに全身感染することが出来る単一あるいは少数の集団であり、それら集団が創始者効果による影響を受けながら両国に拡がったのではないかと思われた。

オーストラリアおよびニュージーランド TuMV 分離株の多くは組換え体であった。しかしながら、これら組換え体はこれまでの TuMV に関する研究 (Ohshima et al., 2002; Ohshima et al., 2007; Nguyen et al., 2013b) で見出された他の地域・国の組換え体とは組換え体型が異なっていた。すなわち、両国の組換え体は新しく見つかった組換え体型であった。そのため、TuMV 集団が両国に侵入した後に組換えが起きたと考えるのが最も妥当と思われた。これまでの研究でウイル

スにおいて遺伝的組換えは進化の推進力の 1 つに数えられており、ウイルスの病原性を劇的に変化させることが知られている (Revers et al., 1996; Moury et al., 2002; Ohshima et al., 2002; Moreno et al., 2004; Tomimura et al., 2004; Chare & Holmes, 2006)。また動物および植物ウイルスにおいて、それらの宿主に適応するために組換えが促された事例が報告されている (Brennan et al., 2014; Feng, et al., 2014; Lefeuvre & Moriones, 2015)。本研究で認められた組換えも例外ではなく、おそらく両国の環境、特に宿主植物に TuMV が急速に適応するために組換えが起きたことが考えられた。また、組換え時期の推定を行ったところ、その時期は両国への侵入時期よりも最近だったことが示され (Table 15)、以上の組換え解析の結果の解釈を支持したものと思われた。

本研究では Neighbor-Net 法、最尤法およびベイズ法を用いた分子系統解析を行った。Neighbor-Net 法による分子系統樹では、その枝が網状の構造になっている場合、それら枝に該当する分離株間で組換えが起きていることが示唆される。本研究で作成した分子系統樹においても網状の構造が認められ、組換え解析の結果と比較したところ矛盾がないと思われた。また最尤法およびベイズ法による分子系統樹は位相がほぼ一致していた。本研究では解析に用いたどの遺伝子領域においても約 200 分離株と大量の分離株を用いたため、分子系統樹の樹形が安定したと思われた。全てのオーストラリアおよびニュージーランド分離株は basal-B および world-B 分子系統グループに属したため、これら分子系統グループの分離株が両国では優勢になっていると思われた。しかしながら、本研究ではオーストラリアの西部地域から TuMV 分離株を採集出来なかったため、それら地域から分離株を集め、再度解析を行う必要がある。またより多くのアブラナ科植物を調査することによって他の分子系統グループに属する分離株が見つかることも考えられるため、これらは今後の課題と思われた。

BEAST ソフトウェアを用いた解析では分子時計の概念を利用し、ウイルスの進化速度および分岐年代を推定した。初めに 3 統計モデルおよび 4 モデルの合計 12 通りのパターンを解析し、その中で最もベイズ因子の値が大きな最適なモデルを決定した。その結果では、分子時計モデルは exponential clock モデル、統

計モデルは **constant size** モデルが支持された。**strict clock** モデルが支持される場合は一定の速度で進化していると仮定し、塩基置換速度を固定して推定を行うが、本研究ではこのモデルは支持されなかった。すなわち、**TuMV** 集団は一定の塩基置換速度ではなく、**exponential clock** モデルで仮定されているような時期によって塩基置換速度が指数関数的な増減を繰り返す複雑な進化をしていると思われた。**Nguyen et al. (2013a)** においても **TuMV** の時間解析がなされ、**HC-Pro**、**P3** および **NIb** 遺伝子領域を用いた解析では本研究で支持された分子時計・統計モデルが支持され、その **TMRCA** は 819-1330 年と推定された。そのため本研究の結果と大きな矛盾はないと思われた。

分子系統樹上において、両国の分離株はドイツおよびイギリス分離株の姉妹群であり、両国の分離株の方が新しい位置に来る。すなわち、この分子系統樹の位相は **TuMV** がドイツおよびイギリスから両国に拡散してきたことを示唆していると思われた。またベイズ法を用いた分子系統樹では集団の分岐年代を推定することが出来る (**Figs. 32-34**)。その結果から、**basal-B** 分子系統グループの方が **world-B** 分子系統グループよりも古いことが考えられ、**basal-B2** サブグループに属する **TuMV** が約 70 年前にドイツからオーストラリアに、約 45 年前にドイツからニュージーランドに侵入したのが最初の両国への拡散と思われる。さらに両国で初めて **TuMV** の発生が報告されたのは 1930 年代である (**Samuel, 1931; Chamberlain, 1936**)。本研究の解析で示された拡散時期とこれらの報告における初発生時期はほぼ一致していた。しかしながら、本研究で推定された **TuMV** のニュージーランドの侵入時期はこれら報告よりも最近である。これはおそらく侵入時期の解析の鍵となる分離株を本研究では採集出来なかったため、あるいは既にそれらの分離株が絶滅している可能性を示唆していると思われる。

以上は初めてオーストラリアおよびニュージーランドの **TuMV** について時間尺度と拡散経路の解析を行った報告である (**Yasaka et al., 2015**)。

VIII. 総合考察

本研究ではアブラナ科植物に感染する2本鎖DNAをゲノムに持つCaMVと1本鎖RNAをゲノムに持つTuMVの時間尺度および拡散経路について解析し、考察した。

CaMVやTuMVのような宿主範囲が重なる別種ウイルスについて、これまで時間的・空間的アプローチからウイルスを比較した例はほとんどない。本研究の解析からCaMVおよびTuMVは似た進化速度を持っていた。CaMVは2本鎖DNAをゲノムに持つが、CaMVを含むパラレトロウイルスはDNAの複製の際生じるエラーを校正するプルーフリーディング機能を持たない (Haas et al., 2002)。そのため、同様にエラーを校正することができないRNAウイルスのTuMVと同程度の速度で塩基置換が起きていると思われた。プルーフリーディング機能を持つウイルスとしては、2本鎖DNAをゲノムに持つB型肝炎ウイルス (*Hepatitis B virus*; HBV) が挙げられ、HBVの進化速度は約 2.29×10^{-5} - 1.57×10^{-4} 塩基/置換/部位と推定されている (Zhou & Holmes, 2007; Wang et al., 2010)。一方でパラレトロウイルスと同様にDNAをゲノムとして持つがプルーフリーディング機能がないウイルスとして代表的なウイルスにレトロウイルスのHIVが挙げられる。HIVの進化速度は約 $7-8 \times 10^{-3}$ 塩基/置換/部位であり、本研究で推定した両ウイルスの進化速度と同程度と推定されている (Duffy et al., 2008; Tee et al., 2009; Ward et al., 2014)。つまりプルーフリーディング機能を持つウイルスは、その機能を持たないウイルスと比較すると進化速度は約10-100倍速い (Zhou & Holmes, 2007; Aiewsakun & Katzourakis, 2016)。多くのウイルス種で進化速度は常に一定ではなく、短期間に採集した分離株のみを用い解析を行った場合異なる進化速度が推定される場合があり (Posada & Crandall, 2001; Ho et al., 2011)、本研究で推定したCaMVとTuMVにおいても例外ではないかもしれない。

ウイルスの出現や拡散経路を推定する研究は、最近のゲノムシーケンス技術の向上に伴い脚光を浴びている。DENVは1899年頃にインドシナ半島周辺において、現在世界各地に発生しているDENVの共通祖先ウイルスが出現し、そこ

から数十年を経て世界各地に拡散したと考えられている (Villabona-Arenas & Zanotto, 2013)。また地球温暖化などの気候変動が DENV の媒介昆虫であるネッタイシマカの生息域を拡大し、DENV の流行・拡散に大きく影響している可能性が示唆されている (Jetten & Focks, 1997)。一方で植物ウイルスでは TYLCV は 1940 年頃に中東地域で出現し、それから世界各地に拡がったと推定されている (Lefeuvre et al., 2010)。TYLCV はタバココナジラミによって永続的に媒介されるので、TYLCV の拡散は媒介昆虫の拡散に大きく依存している (Mabvakure et al., 2016)。本研究で推定した CaMV および TuMV の進化的な歴史はこれらウイルスよりも長いようであったが、今後この理由を明らかにするためには、ウイルス種の壁を超えて、属・科レベルでの包括的な解析を行う必要があると思われた。

他種ウイルスの進化・歴史的背景を踏まえると、CaMV および TuMV の進化の時間尺度と拡散に関しても、両ウイルスを取り巻く多様な環境が複雑に関与している可能性が高い。CaMV の主な宿主であるキャベツ、ブロッコリーおよびカリフラワーなどのアブラナ属植物はおそらくケールから紀元前 1000 年頃に品種改良された (Katz & Weaver, 2003)。しかしながら、日本やアメリカ合衆国には 17-19 世紀まで持ち込まれなかった。ブロッコリーとカリフラワーは地中海沿岸地方で誕生し、16-19 世紀頃イタリアからヨーロッパ各国に伝播したとされている (Buck et al., 1956; Gray, 1982)。本研究で推定した CaMV の拡散の歴史とこれら宿主植物の拡散の歴史はほぼ一致していた。また一般的に植物ウイルスはその媒介昆虫により伝搬されるため、地理的に近い地域から遅々と広がっていくと思われる。そのためオーストラリアおよびニュージーランドの TuMV の場合、東南アジア (5000-9000 km) が最も地理的には近いためこれら地域から拡散してきたと考えるのが妥当である。しかしながら、本研究では両国の TuMV 集団は組換え、分子系統および集団遺伝学的解析から日本、中国およびベトナムのような東・東南アジアの TuMV 集団とは遺伝的に異なり、むしろ地理的に遠いヨーロッパ (16000-18000 km) から約 80 年前に拡散してきた証拠を示した。両国は新世界に属する地域にあり、その歴史は比較的新しく農業の歴史は 200 年にも満たない。そしてヨーロッパ、特にイギリスからの移民が現在の人口の

大部分を占めており、第二次世界大戦を期にその移民の数も増加、農業に関してもヨーロッパから多くの影響を受けている (Wace, 1985)。両国は最近までイギリスやヨーロッパ本土から多くの移民を受け入れており、多くの種苗はこれら地域から輸入されてきた (Wace, 1985; Zubareva et al., 2013)。本研究では、両国の TuMV 集団がこれら人間の活動に影響されて両国に侵入した可能性が示された。また分子系統樹の分離株の位相から、両国の分離株の上位の枝に位置するドイツおよびイギリスの分離株は球根植物などの園芸作物から採集されており、両国への TuMV の侵入はヨーロッパから輸入された罹病園芸作物によるものと思われた。以上は、植物ウイルスの他国への侵入が人類の移動とそれらの国々での農業の発展の時間尺度において一致していることを示しており、本研究は植物ウイルスとしてはそれらの関係を最初に明らかにした。

近年では世界的に外来生物の侵入が問題視されており、植物ウイルスもその例外ではない。以前は侵入が不可能な環境条件であっても、環境変動によってその種の侵入に有利な環境に変化していく場合があり、予期しないウイルスが出現する可能性も懸念される。また国際的な貿易が盛んになってきており (Barraclough & Ghimire, 2013)、罹病植物が様々な国に持ち込まれる機会が以前に比べて増えてきている。我が国においても、1980 年から 2010 年の間に農作物の輸入額が約 6 倍に増加している (浅見, 2014)。このような時代背景もあり、作物に感染するウイルスの世界的拡散にはより一層の注意が必要と思われる。これまで人間に感染するいくつか動物ウイルスでは、人類の移動との関連性について報じられている (Sugimoto et al., 1997; Yogo et al., 2007)。一方、植物ウイルスでは以前から農業の歴史や農作物の移動と関連していることが示唆されており (Gibbs et al., 2008; Sacristán & García-Arenal, 2008)、人間の営みが植物ウイルスに多大な影響を与えている可能性がある。人間が新しい作物や品種を生み出し、栽培していることを考えると、特に栽培作物に感染するウイルスの場合、人間の行動がウイルスの進化や拡散をコントロールしているのかもしれない (大島, 2015)。おそらく両ウイルスについても例外ではなく、現代まで人間の行動に大きく影響を受けながら、進化・拡散を続けてきたと思われた。

本研究では、アブラナ科植物に感染する CaMV と TuMV の時間尺度と拡散経路を明らかにし、得られた知見では人間の手によって植物ウイルスが運ばれ、世界各地に拡散していったことを示唆したことから、国際的な植物防疫に貢献する情報を提供できる可能性がある。最近ではインフルエンザウイルスではその大量のゲノムデータを用いて未来の進化の道筋を予測し、ワクチンや治療法の開発に役立てるための研究が盛んに行われている (Chao et al., 2010; Ahn et al., 2014; Guo et al., 2015)。植物ウイルスにおいても同様の技術は応用できると思われる。本研究がこれら応用研究の基盤になり、さらには植物ウイルスが「なぜ」「いつ」「どのようにして」誕生したのかという極めて根源的な問いに対するヒントも提示できるかもしれない。

IX. 引用文献

- Abhary M, Patil BL, Fauquet CM (2007) Molecular biodiversity, taxonomy, and nomenclature of tomato yellow leaf curl-like viruses. In: *Tomato Yellow Leaf Curl Disease, Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 85-118.
- Abo MAS, Alegbejo M (1998) *Rice yellow mottle virus* in Africa: evolution, distribution, economic significance and sustainable rice production and management strategies. *J Sustainable Agri* 11: 85-111.
- Abubakar Z, Ali F, Pinel A, Traoré O, N'Guessan P, Notteghem JL, Kimmins F, Konaté G, Fargette D (2003) Phylogeography of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *J Gen Virol* 84: 733-743.
- Ahn J, Ruiz P, Barber GN (2014) Intrinsic self-DNA triggers inflammatory disease dependent on STING. *J Immunol* 193: 4634-4642.
- Aiewsakun P, Katzourakis A (2016) Time-dependent rate phenomenon in viruses. *J Virol* 90: 7184-7195.
- Antignus Y, Cohen S (1994) Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Phytopathology* 84: 707-712.
- Armour SL, Melcher U, Pirone TP, Lyttle DJ, Essenberg RC (1983) Helper component for aphid transmission encoded by region II of *Cauliflower mosaic virus* DNA. *Virology* 129: 25-30.
- Atreya PL, Atreya CD, Pirone TP (1991) Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11919-11923.
- 浅見満 (2014) 日本の農産物貿易の現在と課題. 中央学院大学商経論叢, 16: 39-49.
- Bahl J, Krauss S, Kühnert D, Fourment M, Raven G, Pryor SP, Niles LJ, Danner A, Walker D, Mendenhall IH, Su YC, Dugan VG, Halpin RA, Stockwell TB, Webby RJ, Wentworth DE, Drummond AJ, Smith GJ, Webster RG (2013) Influenza A virus

- migration and persistence in North American wild birds. *Plos Pathog* 9: e1003570.
- Barin F, M'Boup S, Denis S, Kanki P, Allan JS, Lee TH (1985) Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 2: 1387-1389.
- Barraclough SL, Ghimire B (2013) Agricultural expansion and tropical deforestation. In *Poverty, international trade and land use* Earthscan publications, London, UK, pp. 57.
- Barrett AJ, Rawlings ND (2007) 'Species' of peptidases. *J Biol Chem* 388: 1151-1157.
- Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* 27: 2910-2912.
- Brennan B, Welch SR, Elliott RM (2014) The consequences of reconfiguring the ambisense S genome segment of *Rift valley fever virus* on viral replication in mammalian and mosquito cells and for genome packaging. *Plos Pathog* 10: e1003922.
- Broglio E (1955) Mutational analysis of *Cauliflower mosaic virus* gene VI: Changes in host range, symptoms, and discovery of transactivation-positive, noninfectious mutants. *Mol Plant-Microbe Interact* 8: 755-760.
- Buck PA (1956) Origin and taxonomy of broccoli. *Econ Bot* 10: 250-253.
- Carrington JC, Dougherty WG (1987) Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a proteinase. *J Virol* 61: 2540-2548.
- Carrington JC, Cary SM, Dougherty WG (1988a) Mutational analysis of *Tobacco etch virus* polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *J Virol* 62: 2313-2320.
- Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC (1998b) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* 14: 393-400.
- Chao DL, Halloran EM, Longini IM (2010) School opening dates predict pandemic influenza A (H1N1) outbreaks in the United States. *J Infect Dis* 202: 877-880.
- Chare ER, Holmes EC (2006) A phylogenetic survey of recombination frequency in

- plant RNA viruses. Arch Virol 151: 933-946.
- Chen J, Zheng HY, Chen JP, Adams MJ (2002) Characterisation of a potyvirus and a potexvirus from Chinese scallion. Arch Virol 147: 683-693.
- Chen J, Chen JP, Langeveld SA, Derks AFLM, Adams MJ (2003) Molecular characterization of carla- and potyviruses from Narcissus in China. J Phytopathol 151: 26-29.
- Chen J, Lu Y-W, Shi Y-H, Adams MJ, Chen JP (2006) Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of *Narcissus yellow stripe virus* from Chinese narcissus in Zhangzhou city, China. Arch Virol 151: 1673-1677.
- Chenault KD, Steffens DL, Melcher U (1992) Nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* isolate NY8153. Plant Physiol 100: 542-545.
- Chenault KD, Melcher U (1993a) *Cauliflower mosaic virus* isolate CMV-1. Plant Physiol 101: 1395-1396.
- Chenault KD, Melcher U (1993b) The complete nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* isolate BBC. Gene 123: 255-257.
- Chenault KD, Melcher U (1994) Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic virus. J Mol Evol: 496-505.
- Choi BK, Koo JM, Ahn HJ, Yum HJ, Choi CW, Ryu KH, Chen P, Tolin SA (2002) Emergence of *Rsv*-resistance breaking *Soybean mosaic virus* isolates from Korean soybean cultivars. Virus Res 112: 42-51.
- Chung BY-W, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. Proc Natl Acad Sci USA 105: 5897-5902.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen Virol 34: 475-483.
- Clavel F, Guetard D, BrunVézinet F, Chamaret S, Rey M-A, Santos-Ferreira MÓ, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Chanpalimaud JL, Montagnier L (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients

with AIDS. *Science* 233: 343-346.

- Cohen S, Harpaz I (1964) Periodic rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 7: 155-166.
- Crisp P (1995) Radish, *Raphanus sativus* (Cruciferae). In *Evolution of Crop Plants*. 2nd ed. Longman scientific & technical. Harlow, UK, pp. 86-89.
- Dallot S, Quiot-Douine L, Sáenz P, Cervera MT, García JA, Quiot JB (2001) Identification of *Plum pox virus* determinants implicated in specific interactions with different prunus spp. *Phytopathol* 91: 159-164.
- Darwin CR (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, UK, pp. 5-25.
- Daubert S, Routh G (1990) Point mutations in *Cauliflower mosaic virus* gene VI confer host-specific symptom changes. *Mol Plant-Microbe Interact* 3: 341-345.
- Díaz-Pendón JA, Cañizares MC, Moriones E, Bejarano ER, Czosnek H, Navas-Castillo J (2010) *Tomato yellow leaf curl viruses*: ménageàtrois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol Plant Pathol* 11: 441-450.
- Dolja VV, Haldman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC (1994). Distinct function of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO J* 13: 1482-1491.
- Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology* 206: 1007-1016.
- Drummond AJ, Pybus OG, Rambaut A, Forsberg R, Rodrigo AG (2003) Measurably evolving populations. *Trends Ecol Evol* 18: 481-488.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biol* 4: e88.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 29: 1969-1973.

- Duchêne S, Holmes EC, Ho SYW (2014) Analyses of evolutionary dynamics in viruses are hindered by a time-dependent bias in rate estimates. *Proc Roy Soc B* 281: 20140732.
- Duffy S, Holmes EC (2007) Multiple introductions of the old world begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the New World. *Appl Environ Microbiol* 73: 7114-7117.
- Duffy S, Holmes EC (2008) Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *J Virol* 82: 957-965.
- Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9: 267-276.
- Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, Revers F, Maule A (2004) A cysteine –rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *J Virol* 78: 2301-2309.
- Edwardson JR, Christie RG (1991) *Turnip mosaic virus*. In: *Viruses Infecting Forage Legumes*, vol II. University of Florida, Gainesville, USA, pp. 438-453.
- Eriksson A, Manica A (2012) Effect of ancient population structure on the degree of polymorphism shared between modern human populations and ancient hominins. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13956-13960.
- Etherington GJ, Dicks J, Roberts IN (2005) Recombination Analysis Tool (RAT): a program for the high-throughput detection of recombination. *Bioinformatics* 21: 278-281.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
- Franck A, Guilley H, Jonard G, Richards K, Hirth L (1980) Nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* DNA. *Cell* 21: 285-294.
- Franck A, Guilley H, Jonard G, Richards K, Hirth L (1985) Complete nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* (Xinjiang isolate) genomic DNA. *Chin J Virol*

1: 247-256.

- Fang R, Wu X, Bu M, Tian Y, Cai F, Mang K (1985) Complete nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* (Xinjiang isolate) genomic DNA. *Chin J Virol* 1: 247-256.
- Fargette D, Pinel A, Abubakar Z, Traoré O, Brugidou C, Fatogoma S, Hébrard E, Choisy M, Séré Y, Fauquet C, Konaté G (2004) Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *J Virol* 78: 3252-3261.
- Fargette D, Pinel-Galzi A, Sérémé D, Lacombe S, Hébrard H, Traoré O, Konaté G (2008) Diversification of *Rice yellow mottle virus* and related viruses spans the history of agriculture from the Neolithic to the present. *Plos Pathog* 4: e1000125.
- Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, Tatem Aj, Sousa JD, Arinaminpathy N, Pèpin J, Posada D, Peeters M, Pybus OG, Lemey P (2014) The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346: 56-61.
- Farzadfar S, Ahoonmanesh A, Mosahebi GM, Ohshima K, Koochi-Habibu M, Pourrahim R, Golnaraghi AR (2007) Partial biological and molecular characterization of *Cauliflower mosaic virus* isolates in Iran. *Plant Pathol J* 6: 291-298.
- Farzadfar S, Tomitaka Y, Ikematsu M, Golnaraghi AR, Pourrahim R, Ohshima K (2009) Molecular characterization of *Turnip mosaic virus* isolates from Brassicaceae weeds. *Eur J Plant Pathol* 124: 45-55.
- Farzadfar S, Pourrahim R (2013) Biological and molecular variation of Iranian *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) isolates. *Virus Genes* 47: 347-356.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J (2005) *Virus Taxonomy*, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 1259.
- Feng Z, Baroch JA, Long LP, Xu Y, Cunningham FL, Pedersen K, Lutman MW, Schmit BS, Bowman AS, Deliberto TJ, Wan XF (2014) Influenza A subtype H3 viruses in feral swine, United States, 2011–2012. *Emerg Infect Dis* 20: 843-846.

- Firth C, Kitchen A, Shapiro B, Suchard MA, Holmes EC, Rambaut A (2010) Using time-structured data to estimate evolutionary rates of double-stranded DNA viruses. *Mol Biol Evol* 27: 2038-2051.
- Fletcher JD, Lister RA, Bulman SR, Heenan PB (2010) First record of *Turnip mosaic virus* in *Pachycladon* spp. (Brassicaceae): an endangered native plant species in New Zealand. *Australas Plant Dis Notes* 5: 9-10.
- Fourment M, Gibbs MJ (2006) PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol Biol* 6: 1.
- Franck A, Guilley H, Jonard G, Richards K, Hirth L (1980) Nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* DNA. *Cell* 21: 285-294.
- Froissart R, Roze D, Uzest M, Galibert L, Blanc S, Michalakis Y (2005) Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *Plos Biol* 3: e89.
- Fuellgrabe MW, Boonrod K, Jamous R, Moser M, Shibolet Y, Krczal G, Wassenegger M (2011) Expression, purification and functional characterization of recombinant *Zucchini yellow mosaic virus* HC-Pro. *Pro Exp Pur* 75: 40-45.
- Fuji S, Nakamae H (1999) Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a *Japanese yam mosaic virus*, a new potyvirus in Japan. *Arch Virol* 144: 231-240.
- Fuji S, Nakamae H (2000) Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a mild strain of *Japanese yam mosaic potyvirus*. *Arch Virol* 145: 635-640.
- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong J, Li Q, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao GF, Wu G, Wang Y, Yuan Z, Shu Y (2013) Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med* 368: 1888-1897.
- García-Arenal F, Frail A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant

- virus populations. *Annu Rev Phytopathol* 39: 157-186.
- García-Arenal F, Frail A, Malpica JM (2003) Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol* 6: 225-232.
- Gardner RC, Howarth AJ, Hahn P, Brown-Luedi M, Shepherd RJ, Messing J (1981) The complete nucleotide sequence of an infectious clone of *Cauliflower mosaic virus* by M13mp7 shotgun sequencing. *Nuc Acids Res* 9: 2871-2888.
- Gayral P, Blondin L, Guidolin O, Carreel F, Hippolyte I, Perrier X, Iskra-Caruana ML (2010) Evolution of endogenous sequences of *Banana streak virus*: What can we learn from Banana (*Musa* sp.) evolution? *J Virol* 84: 7346-7359.
- Geri C, Love AJ, Cecchini E, Barrett SJ, Laird J, Covey SN, Milner JJ (2004) Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Mol Biol* 56: 111-124.
- Gibbs AJ, Mackenzie AM, Wei K-J, Gibbs MJ (2006) The potyviruses of Australia. *Arch Virol* 153: 1411-1420.
- Gibbs AJ, Ohshima K, Gibbs M, García-Arenal F (2008a) More about plant virus evolution; past, present and future. In *Origin and Evolution of Viruses*, 2nd ed, Elsevier Academic Press San Diego, USA, pp. 229-249.
- Gibbs AJ, Ohshima K, Phillips MJ, Gibbs MJ (2008b) The prehistory of potyviruses: their initial radiation was during the dawn of agriculture. *Plos One* 3: e2523.
- Gibbs AJ, Ohshima K (2010) Potyviruses and the digital revolution. *Annu Rev Phytopathol* 48: 205-223.
- Gibbs AJ, Fargette D, García-Arenal F, Gibbs MJ (2010) Time-the emerging dimension of plant virus studies. *J Gen Virol* 91: 13-22.
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000) Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573-582.
- Gilbert MT, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci* 104:

18566-18570.

- Gilbert M, Golding N, Zhou H, Wint GR, Robinson TP, Tatem AJ, Lai S, Zhou S, Jiang H, Guo D, Huang Z, Messina JP, Xiao X, Linard C, Van Boeckel TP, Martin V, Bhatt S, Gething PW, Farrar JJ, Hay SI, Yu H (2014) Predicting the risk of avian influenza A H7N9 infection in live-poultry markets across Asia. *Nature Commn* 5: 4116.
- Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RSG, Park DJ, Kanneh L, Jalloh S, Momoh M, Fullah M, Dudas G, Wohl S, Moses LM, Yozwiak NL, Winnicki S, Matranga CB, Malboeuf CM, Qu J, Gladden AD, Schaffner SF, Yang X, Jiang P-P, Nekoui M, Colubri A, Coomber MR, Fonnies M, Moigboi A, Gbakie M, Kamara FK, Tuclcer U, Konuwa E, Saffa S, Sellu J, Jalloh AA, Kovoma A, Koninga J, Mustapha I, Kargbo K, Momoh F, Yillah M, Kanneh F, Robert W, Massally JLB, Chapman SB, Bochicchio J, Murphy C, Nusbaum C, Young S, Birren BW, Grant DS, Scheffelin JS, Lander ES, Hapfi C, Gevao SM, Gnirke A, Rambaut A, Garry RF, Khan SH, Sabeti PC (2014) Genomic surveillance elucidates *Ebola virus* origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 345: 1369-1372.
- Gorovits R, Moshe A, Ghanim M, Czosnek H (2014) Degradation mechanisms of the *Tomato yellow leaf curl virus* coat protein following inoculation of tomato plants by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Pest Manag Sci* 70: 1632-1639.
- Gray AR (1982) Taxonomy and evolution of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Econ Bot* 36: 397-410.
- Guerra-Peraza O, De Tapia M, Hohn T and Hemmigs-Mieszczak M (2000) Interaction of the *Cauliflower mosaic virus* coat protein with the pregenomic RNA leader. *J Virol* 74: 2067-2072.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Guo W, Han J, Zhuang D, Liu S, Liu Y, Li L, Li H, Bao Z, Wang F, Li J (2015) Characterization of two HIV-1 infectors during initial antiretroviral treatment, and the emergence of phenotypic resistance in reverse transcriptase-associated mutation

- patterns. *Virology* 12: 187.
- Haas M, Bureau M, Geldreich A, Yot P, Keller M (2002) *Cauliflower mosaic virus* : still in the news. *Mol Plant Pathol* 3: 419-429.
- Hajimorad MR, Ding XS, Flasiński S, Mahajan S, Graff E, Haldeman-Cahill R, Carrington JC, Cassidy BG (1996) N1a and N1b of *Peanut stripe potyvirus* are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. *Virology* 224: 368-379.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hamlyn BMG (1953) Quantitative studies on the transmission of *Cabbage black ringspot virus* by *Myzus persicae* (Sulz.). *Ann Appl Biol* 40: 393-402.
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning: A Practical Approach* (ed. D.M. Glover), IRL Press, UK, Oxford, pp. 109-135.
- Hapiak M, Li Y, Agama K, Swade S, Okenka G, Falk J, Khandekar S, Raikhy G, Anderson A, Pollock J, Zellner W, Schoelz J, Leisner SM (2008) *Cauliflower mosaic virus* gene VI product N-terminus contains regions involved in resistance-breakage, self-association and interactions with movement protein. *Virus Res* 138: 119-129.
- Harkins GW, Delpont W, Duffy S, Wood N, Monjane AL, Owor BE, Donaldson L, Saumtally S, Triton G, Bridson RW, Shepherd DN, Rybicki EP, Martin DP, Varsani A (2009) Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. *Virology* 6: 104.
- Harlan JR (1998) Distributions of agricultural origins: A global perspective. In *Origins of Agriculture and Crop Domestication*. ICARDA, Syria, Aleppo. pp. 1-2.
- Hayashida H, Toh H, Kikuno R, Miyata T (1985) Evolution of evolution of virus genes. *Mol Biol Evol* 2: 289-303.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 25: 679-689.
- Hemingway JS (1995) Mustards, *Brassica* spp. and *Sinapis alba* (Cruciferae). In

- Evolution of Crop Plants*. 2nd ed., Longman scientific & technical, UK, Harlow, pp. 82-86.
- Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Neel C, Lafay B, Keele BF, Shaw KS, Takehisa J, Kraus MH, Loul S, Butel C, Liegeois F, Yangda B, Sharp PM, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M (2007) Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* 368: 155-171.
- Ho SYW, Lanfear R, Phillips MJ, Barnes I, Thomas JA, Kolokotronis S-O, Shapiro B. (2011) Bayesian estimation of substitution rates from ancient DNA sequences with low information content. *Syst Biol* 60: 366-375.
- Hodgkin T (1995) Cabbages, kales, etc. *Brassica oleracea* (Cruciferae). In *Evolution of Crop Plants*. 2nd ed.: Longman scientific & technical. UK, Harlow, pp. 76-82.
- Hohn T (2013) Plant pararetroviruses: interactions of *Cauliflower mosaic virus* with plants and insects. *Curr Opin Virol* 3: 1-10.
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
- Holmes EC (2004) The phylogeography of human viruses. *Mol Ecol* 13: 745-756.
- Holmes, EC (2009) The evolution and emergence of RNA viruses. In *Case Studies in RNA Virus Evolution and Emergence*. Oxford University Press, UK, Oxford, pp. 54-56.
- Hong Y, Hunt AG (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226: 146-151.
- Howarth AJ, Gardner RC, Messing J, Shepherd RJ (1981) Nucleotide sequence of naturally occurring deletion mutants of *Cauliflower mosaic virus*. *Virology* 635: 678-685.
- Huang Z, Han Y, Howell S (2001) Effects of movement protein mutations on the formation of tubules in plant protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and *Cauliflower mosaic virus* movement protein. *Mol Plant-Microbe interact* 14: 1026-1031.

- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour* 9: 1322-1332.
- Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23: 254-267.
- Hong Y, Hunt AG (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226: 146-151.
- 今村美華 (2007) 北海道およびオセアニア産のカブモザイクウイルスのゲノム構造の比較. 卒業研究, pp 1-25.
- Jacquot E, Geldreich A, Keller M, Yot P (1998) Mapping regions of the *Cauliflower mosaic virus* ORFIII product required for infectivity. *Virology* 242: 395-402.
- Jenner CE, Sanchez F, Nettleship, SB, Foster, GD, Ponz F, Walsh JA (2000) The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the brassica resistance gene *TuRB01*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1102-1108.
- Jenner CE, Tomimura K, Ohshima K, Hughes SL, Walsh JA (2002) Mutation in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion protein are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 300: 50-59.
- Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of *Turnip mosaic virus* as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 777-784.
- Jetten TH, Focks DA (1997) Potential changes in the distribution of dengue transmission under climate warming. *Am J Trop Med Hyg* 57: 285-297.
- Johansen IE, Lund OS, Hjulsgaard CK, Laursen J (2001) Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in agene-for-cistron correspondence between host and virus. *J Virol* 75: 6609-6614.
- Kalish ML, Robbins KE, Pieniazek D, Schaefer A, Nzilambi N, Quinn TC, Michael E.

- Louis ME, Youngpairoj AS, Phillips J, Jaffe HW, Folks TM (2004) Recombinant viruses and early global HIV-1 epidemic. *Emerg Infect Dis* 10: 1227-1234.
- Katz SH, Weaver WW (2003) *Encyclopedia of food and culture 2*. Scribner, USA, New York, pp. 284.
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG (1989) Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63: 4603-4608.
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-527.
- Kheyr-Pour A, Bendahmane M, Matzeit V, Accotto GP, Crespi S, Gronenborn B (1992) *Tomato yellow leaf curl virus* from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nuc Acid Res* 19: 6763-6769.
- Kill E-J, Kim S, Lee Y-J, Byun H-S, Park J, Seo H, Kim C-S, Shim J-K, Lee J-H, Kim J-K, Lee K-Y, Choi H-S, Lee S (2016) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Sci Rep* 6: 19013.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, USA, San Diego, pp. 432-433.
- Kobayashi K, Hohn T (2004) The avirulence domain of *Cauliflower mosaic virus* transactivator/viroplasm is a determinant of viral virulence in susceptible hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 475-483.
- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain. *Science*

288: 1789-1796.

- Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S, Ohshima K (2008) Occurrence and molecular characterization of Turkish Isolates of *Turnip mosaic virus*. *Plant Pathol* 57: 1155-1162.
- Kozubek E, Irzykowski W, Lehmann P (2007) Genetic and molecular variability of a *Turnip mosaic virus* population from horseradish (*Cochlearia armoracia* L.). *J Appl Genet* 48: 295-306.
- Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Marx PA, McCutchan F, Mellors JW, Mullins JI, Wolinsky S, Korber B (1999) A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In *Human Retroviruses and AIDS*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA, New Mexico, pp. 158-167.
- Láin S, Martín MT, Riechmann JL, García JA. (1991) Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the *Plum pox potyvirus* helicase-like protein. *J Virol* 65: 1-6.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lam TT, Zhou B, Wang J, Chai Y, Shen Y, Chen X, Ma C, Hong W, Chen Y, Zhang Y, Duan L, Chen P, Jiang J, Zhang Y, Li L, Poon LL, Webby RJ, Smith DK, Leung GM, Peiris JS, Holmes EC, Guan Y, Zhu H (2015) Dissemination, divergence and establishment of H7N9 influenza viruses in China. *Nature* 522: 102-105.
- Laver WG, Webster RG (1973) Studies on the origin of pandemic influenza. III. Evidence implicating duck and equine influenza viruses as possible progenitors of the Hong Kong strain of human influenza. *Virology* 51: 383-391.
- Lecoq H, Wipf-Scheibel C, Chandeysson C, Lê Van A, Fabre F, Desbiez C (2009) Molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* in France: an historical overview. *Virus Res* 141: 190-200.

- Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM (2007) *Begomovirus* “melting pot” in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *J Gen Virol* 88: 3458-3468.
- Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J (2010) The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. *Plos Pathog* 6: e1001164.
- Lefeuvre P, Moriones E (2015) Recombination as a motor of host switches and virus emergence: Geminiviruses as case studies, *Curr Opin Virol* 10: 14-19.
- Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role of eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Curr Biol* 12: 1046-1051.
- Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM (2003) Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *J Virol* 77: 6359-6366.
- Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *Plos Comput Biol* 5: e1000520.
- Leh V, Yot P, Keller M (2000) The *Cauliflower mosaic virus* translational transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L18 of *Arabidopsis thaliana*. *Virology* 266: 1-7.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lin L, Shi Y, Luo Z, Lu Y, Zheng H, Yan F, Chen J, Chen J, Adams MJ, Wu Y. (2009) Protein–protein interactions in two potyviruses using the yeast two-hybrid system. *Virus Res* 142: 36-40.
- Lin S-Q, Shen J-G, Gao F-L, Cai W, Huang Z, Xie L-Y, Wu Z-J (2012) Complete genome sequence of *Narcissus latent season yellows virus* infecting Chinese narcissus in China. *Arch Virol* 157: 1821-1824.
- López-Moya JJ, Pirone TP (1998) Charge changes near the N terminus of the coat

- protein of two potyviruses affect virus movement. *J Gen Virol* 79: 161-165.
- Luo A, Qiao H, Zhang Y, Shi W, Ho SY, Xu W, Zhang A, Zhu C (2010) Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evol Biol* 10: 242.
- Mabvakure B, Martin DP, Kraberger S, Cloete L, van Brunschot S, Geering AD, Thomas JE, Bananej K, Lett JM, Lefeuvre P, Varsani A, Harkins GW (2016) Ongoing geographical spread of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology* 498: 257-264.
- MacNaughton IH (1995a) Turnip and relatives, *Brassica campestris* (Cruciferae). In: *Evolution of Crop Plants*. 2nd ed. Longman scientific & technical, Harlow, UK, pp. 62-68.
- MacNaughton IH (1995b) Swedes and rapes, *Brassica napus* (Cruciferae). In: *Evolution of Crop Plants*. 2nd ed. Longman scientific & technical, Harlow, UK, pp. 68-75.
- Maldarelli F, Kearney M, Palmer S, Stephens R, Mican J, Polis MA, Davey RT, Kovacs J, Shao W, Rock-Kress D, Metcalf JA, Rehm C, Creer SE, Lucey DL, Danley K, Alter H, Mellors JW, Coffin JM (2013) HIV populations are large and accumulate high genetic diversity in a nonlinear fashion. *J Virol* 87: 10313-10323.
- Mammen MP, Pimgate C, Koenraad CJM, Rothman AL, Aldstadt J, Nisalak A, Jaman RG, Jones JW, Srikiatknachom A, Ypil-Butac CA, Getis A, Thammapalo S, Morrison AC, Libraty DH, Green S, Scott TW (2008) Spatial and temporal clustering of *Dengue virus* transmission in Thai villages. *Plos Med* 5: e205.
- Malaspinas AS (2016) Methods to characterize selective sweeps using time serial samples: an ancient DNA perspective. *Mol Ecol* 25: 24-41.
- Martin D, Rybicki E (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16: 562-563.
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol* 1: 1-5.
- Maynard Smith J (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34: 126-129.

- Merits A, Guo D, Saarma M (1998) VPg, coat protein and five non-structure proteins of potato A potyvirus proteins bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J Gen Virol* 79: 3123-3127.
- Monjane AL, Harkins GW, Martin DP, Lemey P, Lefevre P, Shepherd DN, Oluwafemi S, Simuyandi M, Zinga I, Komba EK, Lakoutene DP, Mandakombo N, Mboukoulida J, Semballa S, Tagne A, Tiendrebeogo F, Erdmann JB, van Antwerpen T, Owor BE, Flett B, Ramusi M, Windram OP, Syed R, Lett JM, Briddon RW, Markham PG, Rybicki EP, Varsani A (2011) Reconstructing the history of *Maize streak virus* strain a dispersal to reveal diversification hot spots and its origin in southern Africa. *J Virol* 85: 9623-9636.
- Monne I, Fusaro A, Nelson MI, Bonfanti L, Mulatti P, Hughes J, Murcia PR, Schivo A, Valastro V, Moreno A, Holmes EC, Cattolli G (2014) Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor. *J Virol* 88: 4375-4388.
- Monsion B, Froissant R, Michalakakis Y, Blanc S (2008) Large bottleneck size in *Cauliflower mosaic virus* populations during host plant colonization. *Plos Pathog* 4: e1000174.
- Moreno IM, Thompson JR, Garcí'a-Arenal F (2004) Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by *Cucumber green mottle mosaic virus*. *J Gen Virol* 85: 749-759.
- Moury B, Morel C, Johansen E, Jacquemond M (2002) Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other potyviruses. *J Gen Virol* 83: 2563-2573.
- Moury B, Morel C, Johansen E (2004) Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 322-329.
- Murphy JK, Rhoads RE, Hunt AG (1990) The VPg of *Tobacco etch virus* RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* 178:

285-288.

- Musić M, Nguyen HD, Černi S, Mamula O, Ohshima K, Škorić D (2014) Multilocus sequence analysis of 'Candidatus Phytoplasma asteris' strain and the genome analysis of *Turnip mosaic virus* coinfecting oilseed rape. *J Appl Microbiol* 117: 774-785.
- Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, Czosnek H (1991) *Tomato yellow leaf curl virus*: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185: 151-161.
- Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SY, Duchêne S, Vetten HJ, Lesemann D, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K (2013a) *Turnip mosaic potyvirus* probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *Plos One* 8: e55336.
- Nguyen HD, Tran HTN, Ohshima K (2013b) Genetic variation of the *Turnip mosaic virus* population of Vietnam: A case study of founder, regional and local influences. *Virus Res* 171: 138-149.
- Nicolas O, Laliberté JF (1991) The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of *Turnip mosaic potyvirus*. *J Virol Meth* 32: 57-66.
- 野口卓也 (2011) ニュージーランドと我が国の東北地方から採集したカブモザイクウイルスのゲノム構造. 卒業研究, pp. 1-28.
- Ochoa Corona FM, Lebas BSM, Elliott DR, Tang JZ, Alexander BJR (2007) New host records and new host family range for *Turnip mosaic virus* in New Zealand. *Australas Plant Dis Notes* 2: 127-130.
- Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa, A, Ohshima K (2008) Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North America and European populations. *Virus Res* 131: 199-212.
- 大庭希歩 (2014) 東アジアおよびオセアニア産カブモザイクウイルスの集団遺伝構造に関する研究. 修了研究, pp. 1-61.
- Ohshima K, Tanaka M, Sako N (1996) The complete nucleotide sequence of *Turnip mosaic virus* RNA Japanese strain. *Arch Virol* 141: 1991-1997.
- Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Z, Sano T,

- Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A (2002) Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J Gen Virol* 83: 1511-1521.
- Ohshima K, Tomitaka Y, Wood JT, Minematsu Y, Kajiyama H, Tomimura K, Gibbs AJ (2007) Patterns of recombination in *Turnip mosaic virus* genomic sequences indicate hotspots of recombination. *J Gen Virol* 88: 298-315.
- 大島一里 (2009) ポティウイルスの進化生態と宿主特異性. 植物-病原体相互作用の理解に基づく病害制御の新視点. 植物感染生理談話会論文集 45: 64-74.
- Ohshima K, Akaishi S, Kajiyama H, Koga R, Gibbs AJ (2010) Evolutionary trajectory of *Turnip mosaic virus* populations adapting to a new host. *J Gen Virol* 91: 788-801.
- 大島一里 (2012) 植物感染性ポティウイルスの進化; 集団遺伝構造の調査. ウィルス 62: 151-160.
- 大島一里 (2013) ポティウイルスの分子進化的研究. 日本植物病理学会報 79: 135-138.
- 大島一里 (2015a) カブモザイクウイルスの起源と拡散年代: 種の壁を乗り越えて. 植物防疫 69: 810-813.
- 大島一里 (2015b) 植物ウイルスの拡散: 農業史及び人類移動との時間的関連. ウィルス 65: 229-238.
- Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computer. *Comput Applic Biosci* 12: 357-358.
- Pakkianathan BC, Kontsedalov S, Lebedev G, Mahadav A, Zeidan M, Czosnek H, Ghanim M (2015) Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *J Virol* 89: 9791-9803.
- Parbal MC, Thomas CL, Maule AJ (1993) *Cauliflower mosaic virus* gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology* 195: 281-285.

- Pico B, Diez MJ, Nuez F (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus* – a review. *Sci Hort* 67: 151-196.
- Pinel-Galzi A, Mpunami A, Sangu E, Rakotomalala M, Traoré O, Sérémé D, Sorho F, Séré Y, Kanyeka Z, Konaté G, Fargette D (2009) Recombination, selection and clock-like evolution of *Rice yellow mottle virus*. *Virology* 394: 164-172.
- Pinel-Galzi Agnès, Traoré Oumar, Séré Yacouba, Hébrard Eugénie, Fargette Denis. (2015) The biogeography of viral emergence: *Rice yellow mottle virus* as a case study. *Curr Opin Virol* 10: 7-13.
- Piqué M, Mougeot JL, Geldreich A, Guidasci T, Mesnard JM, Lebourier G, Yot P (1995) Sequence of a *Cauliflower mosaic virus* strain infecting solanaceous plants. *Gene* 155: 305-306.
- Pirone TP, Thorunbury DW (1983) Role of vision and helper component in regulating aphid transmission of *Tobacco etch virus*. *Plant Pathol* 73: 872-875.
- Podevin N, du Jardin P (2012) Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 3, UK, pp. 296-300.
- Posada D, Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13757-13762.
- Provvidenti R (1996) *Turnip mosaic potyvirus*. In *Viruses of Plants*, Cab International, UK, Wallingford, pp. 1340-1343.
- Puustinen P, Rajamäki ML, Ivanov KI, Valkonen JP, Mäkinen K (2002) Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. *J Virol* 76: 12703-12711.
- Qiu SG, Schoelz JE (1992) Three regions of *Cauliflower mosaic virus* strain W260 are involved in systemic infection of solanaceous hosts. *Virology* 190: 773-782.
- Rajamäki ML, Valkonen JP (2009) Control of nuclear and nucleolar localization of

- nuclear inclusion protein a of picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21: 2485-2502.
- Rambaut A (2009) Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: FigTree [Online]. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ramsden C, Holmes EC, Charleston MA (2009) *Hantavirus* evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol Biol Evol* 26: 143-153.
- Reeves JD, Doms RW (2002) *Human immunodeficiency virus type 2*. *J Gen Virol* 83: 1253-1265.
- Revers F, Le Gall O, Candresse T, Le Romancer M, Dunez J (1996) Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *J Gen Virol* 77: 1953-1965.
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73: 1-16.
- Richert-Poggeler KR, Shepherd RJ (1997) *Petunia vein-clearing virus*: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* 236: 137-146.
- Rocha CS, Castillo-Urquiza GP, Lima AT, Silva FN, Xavier CA, Hora-Júnior BT, Beserra-Júnior JE, Malta AW, Martin DP, Varsani A, Alfenas-Zerbini P, Mizubuti ES, Zerbini FM (2013) Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. *J Virol* 87: 5784-5799.
- Rodelo-Urrego M, Pagán I, González-Jara P, Betancourt M, Moreno-Letelier A, Ayllón MA, Fraile A, Piñero D, García-Arenal F (2013) Landscape heterogeneity shapes host-parasite interactions and results in apparent plant-virus codivergence. *Mol Ecol* 22: 2325-2340.
- Rohožková J, Navrátil M (2011) P1 peptidase—a mysterious protein of family Potyviridae. *J Biosci* 36: 189-200.
- Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ (1997) Capsid protein and

- helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237: 283-295.
- Roossinck MJ (1997) Mechanisms of plant virus evolution. *Annu Rev Phytopathol* 35: 191-209.
- Sáentz P, Cervera MT, Dallot S, Quiot L, Quiot JB, Riechmann JL, García JA (2000) Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *J Gen Virol* 81: 557-566.
- Sacristán S, García-Arenal F (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant. *Mol Plant Pathol* 9: 369-384.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1423-1425.
- Samuel G (1931) Summary of plant disease records in south Australia for the two years ending June 30, 1930. *So Aust Dept Agr Jour* 34: 746.
- Sawyer SA (1999) GENECONV: A computer package for the statistical detection of gene conversion. Distributed by the author. Department of Mathematics, Washington University in St. Louis. Sawyer website. Available: <http://www.math.wustl.edu/~sawyer>. Accessed 2013 Dec 6.
- Say L, Chou D, Gemmill A, Tuncalp O, Moller A-B, Daniels J, Gülmezoglu AM, Temmerman M, Alkema L (2014) Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2: e323-e333.
- Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997a) VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* 71: 8624-8531.
- Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997b) Formation of plant RNA virus replication complexes on membrane: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16: 4049-4059.
- Schliep KP (2011) Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27: 592-593.

- Scholelz JE, Shepherd RJ (1988) Host range control of *Cauliflower mosaic virus*. *Virology* 162: 30-37.
- Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R (1978) On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87: 13-20.
- Schwarz R, Dayhoff M (1979). Matrices for detecting distant relationships. In *Atlas of protein sequences*: National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, USA, pp. 353-358.
- Schwinghamer MW, Schilg, MA, Walsh JA, Bambach RW, Cossu RM, Bambridge JM, Hind-Lanoiselet TL, McCorkell BE, Cross P (2014) *Turnip mosaic virus*: potential for crop losses in the grain belt of New South Wales, Australia. *Australas Plant Pathol* 43: 663-679.
- Seal SE, van den Bosch F, Jeger MJ (2006) Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Crit Rev Plant Sci* 25: 23-46.
- Seo JK, Ohshima K, Lee HG, Son M, Choi HS, Lee SH, Sohn SH, Kim KH (2009) Molecular variability and genetic structure of the population of *Soybean mosaic virus* based on the analysis of complete genome sequences. *Virology* 393: 91-103.
- Shalla TA, Shepherd RJ, Petersen LJ (1980) Comparative cytology of nine isolates of *Cauliflower mosaic virus*. *Virology* 388: 381-388.
- Shepherd RJ (1981) CMI/AAB descriptions of plant viruses, no. 243. Commonwealth Mycological Institute, UK, Kew, Surrey, pp.148-157.
- Shi Y, Chen J, Hong X, Chen J, Adams MJ (2007) A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Mol Plant Pathol* 8: 785-790.
- Shockey MW, Gardner CO Jr, Melcher U, Essenberg RC (1980) Polypeptides associated with inclusion bodies from leaves of turnip infected with *Cauliflower mosaic virus*. *Virology* 105: 575-581.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) *The potyviridae*. Cab International, UK, Wallingford, pp.1-26.

- Simonsen L, Spreeuwenberg P, Lustig R, Taylor RJ, Fleming DM, Kroneman M, Van Kerkhove MD, Mounts AW, Paget WJ, the GLaMOR Collaborating Teams (2013) Global mortality estimates for the 2009 influenza pandemic from the GLaMOR project: A modeling study. *Plos Med* 10: e1001558.
- Spetz C, Valkonen JPT (2004) Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 502-510.
- Stratford R, Plaskitt KA (1988) Molecular properties of Bari 1, a mild strain of *Cauliflower mosaic virus*. *J Gen Virol* 69: 2375-2386.
- Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18: 1001-1013.
- Suehiro N, Natsuaki T, Watanabe T, Okuda S (2004) An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. And/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J Gen Virol* 85: 2087-2098.
- Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, Ondrejka P, Chollet JY, ElSafi S, Ettayebi M, Grésenguet G, Kocagöz T, Chaiyarasamee S, Thant KZ, Thein S, Moe K, Kobayashi N, Taguchi F, Yogo Y (1997) Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9191-9196.
- Sun Y, Meng S (2013) Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of *Dengue virus type 1* in Asia. *Infect Genet Evol* 16: 19-26.
- Takahashi H, Shimamoto K, Suzuki M, Ehara Y (1989) DNA sequence of gene VI of *Cauliflower mosaic virus* Japanese strain S (CaMV S-Japan). *Nuc Acids Res* 17: 7981.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Tan, Z., Wada Y, Chen J, Ohshima K (2004) Inter- and intralineaage recombinants are common in natural populations of *Turnip mosaic virus*. *J Gen Virol* 85: 2683-2696.

- Tan Z, Wada Y, Chen J, Sanchez F, Ponz F, Ohshima K (2005) Mutations in *Turnip mosaic virus* genomes that have adapted *Raphanus sativus*. J Gen Virol 86: 501-510.
- Tang W, Leisner S (1998) Methylation of nonintegrated multiple copy DNA in plants. Biochem Biophys Res Commun 245: 403-406.
- Tao H, Li L, White MC, Steel J, Lowen AC (2015) Influenza A virus coinfection through transmission can support high levels of reassortment. J Virol 89: 8453-8461.
- Tee KK, Pybus OG, Parker J, Ng KD, Kamarulzaman A, Takebe T (2009) Estimating the date of origin of an HIV-1 circulating recombinant form. Virology 387: 229-234.
- Timmermann A, Friedrich T (2016) Late pleistocene climate drivers of early human migration. Nature 538: 92-95.
- Tomimura K, Gibbs AJ, Jenner CE, Walsh JA, Ohshima K (2003) The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. Mol Ecol 12: 2099-2111.
- Tomimura K, Spak J, Katis N, Jenner CE, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K (2004) Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. Virology 330: 408-423.
- Tomitaka Y, Ohshima K (2006) A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. Mol Ecol 15: 4437-4457.
- Tomitaka Y, Yamashita T, Ohshima K (2007) The genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in Kyushu and central Honshu, Japan. J Gen Plant Pathol 73: 197-208.
- Tomlinson JA (1987) Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. Ann Appl Biol 110: 661-681.
- Tözsér J, Tropea JE, Cherry S (2005) Comparison of the substance specificity of two potyvirus proteases. FBES J 272: 514-523.
- Traore O, Sorho F, Pinel A, Abubakar Z, Banwo O, Maley J, Hebrard E, Winter S, Sere Y, Konate G, Fargette D (2005) Processes of diversification and dispersion of *Rice*

- yellow mottle virus* inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Mol Ecol* 14: 2097-2110.
- Twiddy SS, Rambaut A, Holmes EC (2003) Inferring the rate and time-scale of *Dengue virus* evolution. *Mol Biol Evol* 20: 122-129.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74: 157-175.
- Vaden VR, Melcher U (1990) Recombination implications sites in *Cauliflower mosaic virus* DNAs : for mechanisms of recombination. *Virology* 726: 717-726.
- Valli A, Martín-Hernández AM, López-Moya JJ, García JA (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of *Cucumber vein yellowing ipomovirus*, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* 80: 10055-10063.
- Verchot J, Herndon KJ, Carrington JC (1992) Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* 190: 298-306.
- Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E (2000) Unprecedented degree of *human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) group M genetic diversity in the democratic republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in central Africa. *J Virol* 74: 10498-10507.
- Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R (2006) Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439: 344-348.
- Villabona-Arenas CJ, Zanutto PMA (2013) Worldwide spread of *Dengue virus type 1*. *Plos One* 8: e62649.
- Visser, JC, Bellstedt, DU, Pirie MD (2012) The recent recombinant evolution of a major crop pathogen, *Potato virus Y*. *Plos One* 7: e50631.
- Volovitch M, Modjtahedi N (1990) DNA sequence of gene VI of *Cauliflower mosaic*

- virus* strain PV147. *Nuc Acids Res* 18: 5297.
- Wace N (1985) The isolated continent. In *Pests and parasites as migrants*, Cambridge Press, University Cambridge, UK, pp. 3-22.
- Walsh JA, Jenner CE (2002) *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. *Mol Plant Pathol* 3: 289-300.
- Wang HY, Liu JL, Gao R, Chen J, Shao YH, Li XD (2009) Complete genomic sequence analyses of *Turnip mosaic virus* basal-BR isolates from China. *Virus Genes* 38: 421-428.
- Wang H-Y, Chien W-H, Huang HP, Chang H-C, Wu C-C, Chen P-J, Chang M-H, Chu S-D (2010) Distinct *Hepatitis B virus* dynamics in the immunotolerant and early immunoclearance phases. *J Virol* 84: 3454-3463.
- Wang C, Luo J, Wang J, Su W, Gao S, Zhang M, Xie L, Ding H, Liu S, Liu X, Chen Y, Jia Y, He H (2014) Novel human H7N9 influenza virus in China. *Integr Zool* 9: 372-375.
- Ward, M.J, Gibbons CL, McAdam PR, van Bunnik BA, Girvan EK, Edwards GF, Fitzgerald JR, Woolhouse ME (2014) Time-scaled evolutionary analysis of the transmission and antibiotic resistance dynamics of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. *Appl Environ Microbiol* 80: 7275-7282.
- Weiller GF (1998) Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol Biol Evol* 15: 326-335.
- Wertheim JO, Worobey M (2009) Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *Plos Com Biol* 5: e1000377.
- Wintermantel WM, Anderson EJ, Schoelz JE (1993) Identification of domains within gene VI of *Cauliflower mosaic virus* that influence systemic infection of *Nicotiana bigelovii* in a light-dependent manner. *Virology* 798: 789-798.
- Worobey M, Han G-Z, Rambaut A (2014) A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. *Nature* 508: 254-257.
- Wylie SJ, Li H, Sivasithamparam K, Jones MGK (2014) Complete genome analysis of

- three isolates of *Narcissus late season yellows virus* and two of *Narcissus yellow stripe virus*: three species or one? *Arch Virol* 159: 1521-1525.
- Xie H, Li S, Li W, Ni S, Li Y (1979) A preliminary study of *Cauliflower mosaic virus* strain 63-3. *Acta Microbiol Sinica* 19: 52-56.
- Yasaka R, Nguyen HD, Ho SYW, Duchêne S, Korkmaz S, Katis N, Takahashi H, Gibbs AJ, Ohshima K (2014) The temporal evolution and global spread of *Cauliflower mosaic virus*, a plant pararetrovirus. *Plos One* 9: e85641.
- Yasaka R, Ohba K, Schwinghamer MW, Fletcher J, Ochoa-Corona FM, Thomas JE, Ho, SY, Gibbs AJ, Ohshima K (2015) Phylodynamic evidence of the migration of *Turnip mosaic potyvirus* from Europe to Australia and New Zealand. *J Gen Virol* 96: 701-713.
- Yogo Y, Zhong S, Suzuki M, Shibuya A, Kitamura T (2007) Occurrence of the European subgroup of subtype I BK polyomavirus in Japanese-Americans suggests transmission outside the family. *J Virol* 81: 13254-13258.
- Zhang C, Hajimorad MR, Eggenberger AL, Tsang S, Whitham SA, Hill JH (2009) Cytoplasmic inclusion cistron of *Soybean mosaic virus* serves as a virulence determinant on Rsv3-genotype soybean and a symptom determinant. *Virology* 391: 240-248.
- Zhang CL, Gao R, Wang J, Zhang GM, Li XD, Liu HT (2011) Molecular variability of *Tobacco vein banding mosaic virus* populations. *Virus Res* 158: 188-198.
- Zhou Y, Holmes EC (2007) Bayesian estimates of the evolutionary rate and age of *Hepatitis B virus*. *J Mol Evol* 65: 197-205.
- Zubareva IA, Vinogradova SV, Gribova TN, Monakhos SG, Skryabin KG, Ignatov AN (2013) Genetic diversity of *Turnip mosaic virus* and the mechanism of its transmission by *Brassica* seeds. *Doklady Biochem Biophys* 450: 119-122.

X. 謝辞

本研究を遂行するにあたり終始熱心なご指導を賜りました佐賀大学農学部教授大島一里博士に心から感謝致します。博士論文の審査において佐賀大学農学部准教授草場基章博士，鹿児島大学教授岩井久博士，琉球大学教授田場聡博士ならびに佐賀大学農学部准教授徳田誠博士には副査として多大なる御助言を賜りました。ここに心から厚く御礼申し上げます。

本研究の分子進化的解析において，元オーストラリア国立大学 Adrian J. Gibbs 博士，シドニー大学 Simon Y. W. Ho 博士ならびに Sebastián Duchêne 博士にはデータ解析および考察についての的確な御助言を賜りました。また，本研究においてトルコチャナッカレオンセキズマルト大学 Savas Korkmaz 博士，ギリシャテサロニキ大学 Nicolas Katis 博士，東北大学教授 高橋英樹博士，イランイスラミックアザッド大学 Alireza Golnaraghi 博士，オーストラリアタムワース農業研究所 Mark W. Schwinghamer 博士，ニュージーランド植物・食品研究所 John Fletcher 博士，アメリカオクラホマ州立大学 Francisco M. Ochoa-Corona 博士ならびにオーストラリアクイーンズランド大学 John E. Thomas 博士には貴重な分離株を提供頂きました。国際的に著名な共同研究者の方々と研究を遂行できたことに感謝致します。

佐賀大学総合分析実験センター 永野幸生博士にはDNAシーケンサー解析に関して，多くのご助言を頂き，データ解析のサポートをして頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

これまで配属大学である佐賀大学には学部3年生から博士3年生までの計9年間在籍し，その中で植物ウイルス制御学研究室ならびに植物病制御学研究室の諸氏にも日々有益なご助言やご協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。特にベトナムハノイ農業大学 Huy D. Nguyen 博士，植物ウイルス病制御学研究室 深川裕史氏，西山舞氏ならびに副島健太氏には実験方法に関して多くのご助言を頂きました。また本研究の一部を担って頂きました今村美華氏，野口卓也氏ならびに大庭希歩氏に厚く御礼を申し上げます。

植物ウイルス病制御学研究室の卒業生である農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所 富村健太博士ならびに同九州沖縄農業研究センター 富高保弘博士には日本植物病理学会等で多くの有益なご意見，また温かいご助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

また日本学術振興会による特別研究員への採用と特別研究員奨励研究費(16J04390) は博士課程での研究継続のための大きな支えとなりました。ここに深く感謝致します。

最後に本研究の遂行にあたり多くの研究者の方々と意見を交わし，多くのご教示を頂きましたことに厚く御礼を申し上げます。