

野生植物とウイルスの見えない相互作用を RNA-Seq で観る

神谷麻梨¹, 永野惇², 本庄三恵¹, 工藤洋¹

¹ 京都大学生態学研究センター,

〒520-2113 滋賀県大津市平野2丁目509-3,

² 龍谷大学農学部

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1番5

RNA-Seq reveals hidden-interactions between wild plants and viruses

Mari Kamitani¹, Atsushi J. Nagano², Mie N. Honjo¹ and Hiroshi Kudoh¹

¹Center for Ecological Research, Kyoto University,

Hirano 2-509-3, Otsu, 520-2113, Japan

²Faculty of Agriculture, Ryukoku University, Yokotani 1-5, Otsu, 520-2194, Japan

Key words: *plant viruses, RNA-Seq, virus ecology*

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00108

1. はじめに

植物にとってウイルスは、その感染によって生理的な変化をもたらし、時に大量死を引き起こす重要な存在である。しかし、植物ウイルスの研究はこれまで主に農作物の病害を対象に行われてきたため、野生植物の自然生育地における知見はごく限られている。植物ウイルスはタンパク質とおよそ数千塩基ほどゲノムから成り、その性状は、ゲノムが RNA であるか DNA であるか、ゲノムが複数本に分節するか非分節であるか、ゲノム 3'末端の polyA-tail の有無などによって区別される (Hull, 2014)。現在 900 種以上の植物ウイルスが知られているが、そのほとんどは農作物から発見されたものである (Wren *et al.*, 2006)。一方、古くから、農作物の大量枯死において見られるような激しい病徵を伴う感染は、自然条件下では植物にとってもウイルスにとっても適応的でないと考えられてきた (May & Anderson, 1983, Remold, 2002)。実際、植物の見た目の病徵（外部病徵）のない感染の存在は知られており、近年では、植物に対し中立的もしくは有益な影響を与えるウイルス感染の報告が増えてきている (Fraile & Garcia-Arenal, 2016)。また野生植物集団はジェノタイプや生育環境が多様であること、ウイルスとの相互作用の進化的歴史が長いということを考えると、農作物で見つかっているものとは異なるウイルスの種構成や相互作用が期待される。これまで見過ごされてきた野生植物におけるウイルス感染やウイルス-宿主間、ウイルス種間相互作用を明らかにすることは、ウイルスの自然生息地でのふるまいを理解するうえで重要である。本総説では、自然生育地での植物ウイルス研究の意義や、具体的手法、著者らの研究で得られた結果について議論したい。

M. Kamitani *et al.*-1

BSJ-review 8:12 (2017)

2. 自然環境下におけるウイルス叢の解析

近年、これまで見過ごされてきた自然環境下におけるウイルスの多様性解明を目指した研究が盛んに行われており、地球上の隠されたウイルス叢 (Virome) への注目が高まっている (Suttle, 2005, Brum *et al.*, 2015, Paez-Espino *et al.*, 2016, Nishimura *et al.*, 2017)。ウイルス叢とは、ある生物あるいは環境下に存在する全ウイルスのゲノムの集合のことである。自然環境下においては、感染しているウイルスの候補を前もって絞ることはできないため、ウイルスの網羅的な同定手法が必要になる。真菌類や細菌類では rRNA の配列に基づく種の探索・同定が用いられるが、ウイルスにはそのような全種をカバーする共通保存配列が存在しないため、網羅的な探索は困難である。特定のウイルス種を対象とした水圏環境における先行研究により、自然環境下にはウイルスが普遍的かつ大量に存在すると考えられてきた (Breitbart & Rohwer, 2005)。近年の次世代シークエンシング技術の発展に伴い、メタゲノミクスの手法を用いた対象を絞らないウイルスの解析が多く行われるようになり、実際に新種を含む多くのウイルスを報告している (Edwards & Rohwer, 2005, Culley *et al.*, 2006, Kristensen *et al.*, 2010, Nishimura *et al.*, 2017)。環境中から見つかるウイルスの殆どは細菌を宿主とするウイルス (ファージ) であるが、それらは宿主の個体数制御や多様性の維持、物質循環などにおいて重要な役割を果たしていると考えられている (Thingstad, 2000, Suttle, 2007)。また節足動物宿主における研究では、ウイルスの複製酵素の配列に基づいたウイルスの探索同定により、一宿主内のウイルス種数を 1~20 種ほどと見積もっている (Shi *et al.*, 2016)。植物においてもウイルスが普遍的に感染しているのではないかと考えられているが、その多様性や、一宿主内のウイルス種数を調べた研究はまだ殆どない。

3. 見えないウイルスを網羅的にとらえる

野生植物では、外部病徵を伴わないウイルス感染が多くみられるため、病徵によらないウイルスの検出方法が必須である。上述のようにウイルスには全種をまたぐ共通保存配列が存在しないため、網羅的な探索が困難である。そのため野生植物を対象とした研究では、ウイルスの粒子や核酸の性状に基づく検出手法が様々に用いられている (Roossinck, 2012)。とりわけ、ウイルスの殆どが増殖時に宿主内で二本鎖 RNA (dsRNA) を合成することに着目し、それを単離して解析する手法は、ウイルスの網羅的同定に有力な手段として期待されている。実際この手法により、新種のウイルスが多く報告されている (Roossinck *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2016, Urayama *et al.*, 2016)。

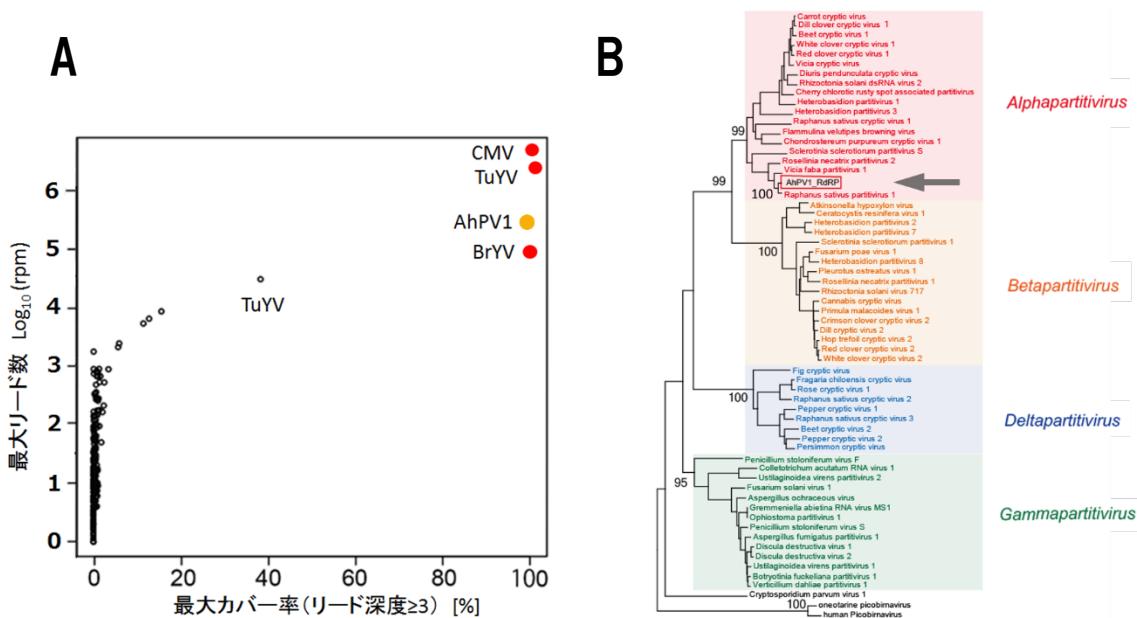
一方で、dsRNA の単離・濃縮などを経ずにウイルスの網羅的同定を行う試みもなされている。例えば、筆者らは、ウイルス感染の検出とともに宿主トランスクリプトームを解析可能な RNA-Seq を用い、ウイルスと植物との相互作用を明らかにした。植物ウイルスは RNA ゲノムと DNA ゲノムを持つものが存在するが、DNA ゲノムのウイルスも増殖の段階で相補鎖の RNA を合成するため、RNA-Seq では両者を検出することが可能である。また通常の RNA-Seq では oligo-dT による精製を行うためゲノム末端に polyA-tail のないウイルスを捕捉することができないが、これを rRNA の選択的分解に代えた RNA-Seq (Morlan *et al.*, 2012,

Nagano *et al.*, 2015) を行うことで、ゲノム末端の形状に寄らずウイルスを網羅的に検出できる。しかしながら、次世代シーケンシングを用いる手法で得られる多量の配列データからウイルスを検出する際には、実際のデータ解析手法が重要になる。次節で実際のデータを例として、RNA-Seq データからより正確にウイルスの在・不在判定を行うための工夫について紹介する。

4. 野生植物ハクサンハタザオにおけるウイルス感染の例

著者らは野生のアブラナ科植物ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* subsp. *gemmaifera*) の自然集団において 68 個体から採集した葉のサンプルを対象に RNA-Seq を行った。ハクサンハタザオはモデル植物のシロイヌナズナに近縁な野生種であるため、高品質のリファレンスゲノム配列やアノテーションが使用可能である。植物側の解析と同時に、既知のウイルスを種レベルで同定するため、NCBI にゲノム全長が登録されている全ウイルス種の配列に対し RNA-Seq のリードをマッピングし、感染有無を判断した。ウイルスは部分的に植物と似た配列を持つことや、近縁な種間では局所的に保存配列をもつ場合があるため (Antczak *et al.*, 1982, Mertens & Sangar, 1985, Anzola *et al.*, 1987), マッピングされたリードのウイルスゲノムに対するカバー率を考慮することで、部分的な相同意による誤検出のリスクを除いた、より正確な同定を試みた。さらに残りのリードの *de novo assembly* を行うことで、新規ウイルスの探索を行った。

マッピングの結果、ウイルスゲノムのほぼ 100%の範囲の配列が検出されるウイルス（感染）と、そうでないウイルス（非感染）を明瞭に区別できることが示された（図 1）。感染とみなされる 3 種のウイルス *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Brassica yellows virus* (BrYV) と、*de novo assembly* で同定された 1 種の新規ウイルス *Arabidopsis partitivirus1* (AhPV1) の計 4 種のウイルスが検出された。水圏のウイルス叢の研究では大量のウイルスが見つかることがあるため、一見少なくも感じられるが、1 種の宿主植物を対象にしたものでは同等の種数が先行研究で報告されている。例えば、上述の dsRNA の解析手法による先行研究では、栽培種 2 種、野生種 1 種からそれぞれ 1~3 種のウイルスが検出されている (Blouin *et al.*, 2016)。検出された 4 種の感染率は 26%~82% で、AhPV1 が最も多くの宿主に感染していた。それぞれのウイルスの感染個体中で外部病徵のない感染の割合は、AhPV1 が 55% で最も高かった (Kamitani *et al.*, 2016)。



(図 1) 感染ウイルスの同定 **A** 各ウイルス種のゲノムにマップされたリード数(縦軸)と各ウイルスゲノムのリードによるカバー率(横)。縦軸の rpm は宿主の total mRNA 量(10^6)を分母として計算している。各丸点がウイルス種を表す。赤い丸は既知ウイルスの CMV, TuMV, BrYV。オレンジの丸は *de novo* assembly で見つかった新規ウイルス AhPV1。これら 4 種はほぼ 100% のカバー率を示した。TuYV (*Turnip yellows virus*) は 38% のカバー率を示したが BrYV と非常に近縁で配列の 80% 以上が相同なため、BrYV の配列が一部マッピングされたと判定した。**B** 複製酵素のアミノ酸配列に基づく AhPV1 の系統解析。AhPV1 (矢印部) はパーティティウイルスの中で Alphapartitivirus 属に属する。Kamitani *et al.* 2016 改変。

5. 自然環境下における植物とウイルスの相互作用

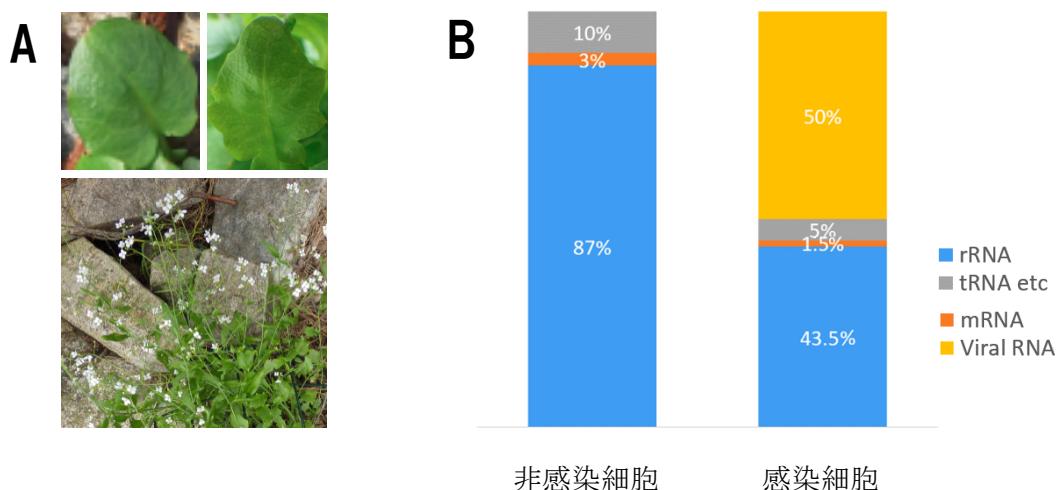
野生植物におけるウイルス多様性の解明と共に、生態系におけるウイルスの役割にも注目が集まっている。“病害”としてだけではないウイルスの新しい見方が広がっている (Roossinck, 2011)。例えば、農作物に被害をもたらすウイルスでも、その周辺の野生植物では外部病徵なく感染しうることや (Rist & Lorbeer, 1989)，ウイルス感染が宿主のストレス条件下で有益に働く例が報告されている (Remold, 2002, Xu *et al.*, 2008)。たとえば、CMV に感染したビートは凍結・乾燥ストレスに対し非感染植物個体よりも耐性を持つことが報告されている (Xu *et al.*, 2008)。また、病原性の弱いウイルスの感染は、病原性の強い近縁なウイルスの感染を防ぐワクチン効果がある事が知られている (Fulton, 1986, Goic & Saleh, 2012)。

自然環境下における野生植物とウイルスの相互作用を調べた研究はまだほとんどないが、実験室レベルでは多くの先行研究がある。ウイルスは種によって多様な遺伝子を持ち、それらが宿主への病原性を決定する要素となる (García & Pallás, 2015)。植物側も、遺伝子対遺伝子抵抗性 (gene-for-gene resistance, Flor, 1971, Greenberg, 1997, Hatsugai *et al.*, 2004, Jones & Dangl, 2006)、全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, Ryals *et al.*, 1996)、RNA サイレンシング (RNA-silencing, Baulcombe, 2004) など様々な防御機構を備えている。植物の RNA サイレンシングは、ウイルスの RNA によって誘導される重要な防御機構であるが、いくつ

かのウイルスのグループは、植物の RNA サイレンシングを阻害するサプレッサーを生産しこれを抑制するカウンターディフェンス機構を持つ(Anandalakshmi *et al.*, 1998)。今後、このような仕組みによって、自然環境下ではどのような相互作用が成立しているのかを明らかにする必要がある。また、実際の野外条件においては、植物—ウイルスの関係は植物と他の生物との相互作用の影響も受ける。植物とウイルスだけでなく、昆虫などの媒介生物や菌類を含めた3者間の相互作用も近年注目されている。ウイルスの多くは伝播を媒介者に依存しており、その中でも昆虫は主要な媒介者である(Hogenhout *et al.*, 2008)。これらの昆虫が、非感染植物個体よりもウイルスに感染した植物個体に対しより多く惹きつけられることが報告されている(Moreno-Delafuente *et al.*, 2013, Blanc & Michalakis, 2016, Shalileh *et al.*, 2016)。この観察は、宿主植物により多く媒介者が訪れることで、ウイルスにとっての伝播機会が増加することを示唆している。また、植物の内生菌に感染するウイルスの存在が、高温環境にさらされる宿主植物の熱耐性に不可欠である例も報告されている(Marquez *et al.*, 2007)。

6. 宿主とウイルスの見えない攻防を観る

現時点の先行研究の多くは特定のウイルスに着目して行われているが、今後次世代シークエンシングの技術を活用した網羅的なウイルスの多様性解析・植物—ウイルス間相互作用の解析が進むことで、自然環境下での植物とウイルスの新しい関係が明らかになることが期待される。例えば、上述の筆者らのハクサンハタザオを用いた研究(Kamitani *et al.*, 2016)では、感染葉の透過型電子顕微鏡解析からはウイルスの複製時に特異的な封入体構造が観察され、ウイルスの活発な増殖が示唆されたが、ハクサンハタザオにおけるウイルスの感染は外部病徵のないもののが多かった(図2A)。ウイルスのリード数は最大で宿主の全 mRNA リード数の33倍にも達していた。これは即ち、もし非感染植物細胞内の rRNA, mRNA, その他の低分子 RNA が 87%, 3% 10% の割合で存在すると仮定すると, rRNA/mRNA の比が一定な場合、感染細胞ではウイルス RNA が細胞内全 RNA の 50% を占める計算になる(図2B)。

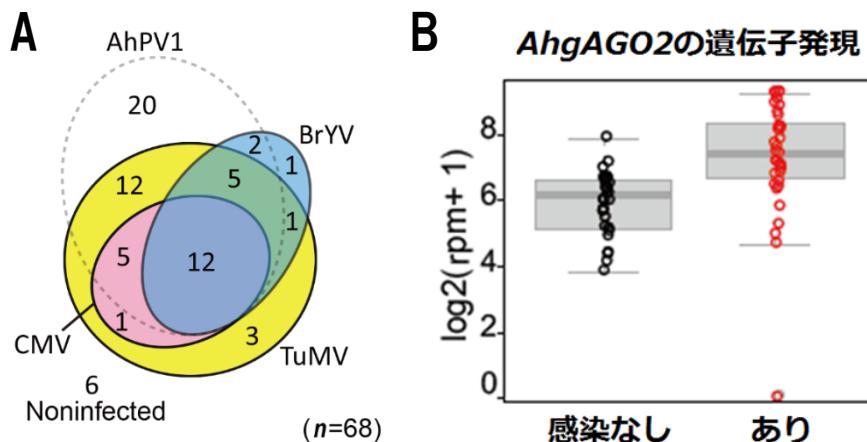


(図 2) A 野外で見られるハクサンハタザオにおけるウイルスの外部病徵のない感染。

上の2枚は複数のウイルスに感染した葉の拡大写真、下は TuMV 感染個体の開花の様子。**B** 非感染細胞と感染細胞における各 RNA 種と、感染ウイルス由来 RNA の計算上の割合のイメージ。

農作物や実験条件下においては、複数のウイルスの重複感染時に、宿主の病徵が激化することが知られている (Pruss *et al.*, 1997, Wintermantel, 2005, Tatineni *et al.*, 2010, Xia *et al.*, 2016)。しかし野外のハクサンハタザオにおいては、最大4種による重複感染が見られたものの外部病徵のない感染が多く観察された。重複感染は TuMV の感染葉に有意に多く観察された (図 3 A)。実験室での先行研究では TuMV は宿主の主要な対ウイルス防御機構である RNA サイレンシングのサプレッサータンパク質 (HC-Pro) をコードする遺伝子を持ち (Anandalakshmi *et al.*, 1998), 宿主内に重複感染した他のウイルスの増殖を促進することが報告されている (Pruss *et al.*, 1997, Fukuzawa *et al.*, 2010, Syller, 2012)。このため野外で見られた TuMV 感染葉への重複感染の偏りは、HC-Pro が宿主防御を抑制することにより他種のウイルスの侵入・感染を促進しているためではないかと考えられる。

宿主のトランスクリプトーム解析において、ウイルス感染葉で *AGO2* オーソログの発現が上昇した (図 3 B)。*AGO2* は、宿主の RNA サイレンシング経路においてウイルスゲノムの認識・分解を担う複合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) のコンポーネントとして働くタンパク質であり (Schuck *et al.*, 2013), 発現上昇からは宿主のウイルス感染への応答が示唆される。一方で前述の TuMV による抑制はタンパク質レベルで RISC に対して働く (Kasschau & Carrington, 1998, Ivanov *et al.*, 2016)ため、宿主の発現レベルでの応答は起こっているものの、タンパク質レベルで HC-Pro がその働きを抑制していると示唆される。



(図 3) A それぞれのウイルスに感染したハクサンハタザオの個体数とその重複。各色の円がウイルスの種を表し、数字が植物の個体数を表す。B TuMV の感染／非感染サンプルにおける *AGO2* オーソログの発現。縦軸がリード数を表す。Kamitani *et al.* 2016 改変。

7. おわりに

RNA-Seq では、上述したウイルスの種数だけでなくゲノム配列も同時に解析可能である。実際に、筆者らのデータでも宿主葉サンプル内にウイルスの多型が確認されており、1つのウイルス種についても、宿主の中に多様性が潜んでいる可能性がある。本研究では、葉1枚～個体、集団レベルでのウイルス感染と宿主—ウイルス、ウイルス種間相互作用に着目したが、より小さなスケールや、他科の植物、地理的分布を含めた大きなスケールでの相互作用解析も興味深いテーマである。また、宿主のトランスクリプトーム解析についてもまだ改良の余地がある。トランスクリプトームはある時点における植物の状態の縮図であり、ウイルス感染に対する宿主応答の情報を含むと同時に、植物に内在するウイルスにとっての“環境”としての情報を含んでいる。これと同時にウイルス側の病原性の決定要素となるゲノム配列情報を合わせて得ることができる RNA-Seq は、野外におけるウイルス研究において非常に有用なツールである。今後、野外環境の様々なノイズを除くより洗練された解析により、野外における隠された植物—ウイルス相互作用が明らかにされていくことに期待する。さらに、シークエンシング技術の発展に伴い、ナノポア DNA シーケンサー (MinION) による、調査現場地でのリアルタイムのウイルス同定や、1細胞シークエンシングによる植物細胞スケールでの相互作用解析なども、近い将来に現実のものとなると考えられる。

8. 謝辞

ウイルスの研究を進めるにあたってご助言をいただきました、佐藤昌直博士(北海道大学)、厚見剛博士 (AIST) に、この場をお借りして御礼申しあげます。また、本稿で紹介した著者らの研究は、基盤 S (工藤洋, 26221106), JST さきがけ (永野惇), 日本学術振興会 特別研究員奨励金 (神谷麻梨, 15J00628) の支援を受けて行わされました。

9. 引用文献

- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. & Vance, V.B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13079-13084.
- Antczak, J.B., Chmelo, R., Pickup, D.J. & Joklik, W.K. 1982. Sequences at both termini of the 10 genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology* 121: 307-319.
- Anzola, J.V., Xu, Z., Asamizu, T. & Nuss, D.L. 1987. Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 8301-8305.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Blanc, S. & Michalakis, Y. 2016. Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Curr. Opin. Insect Sci.* 16: 36-43.
- Blouin, A.G., Ross, H.A., Hobson-Peters, J., O'Brien, C.A., Warren, B. & MacDiarmid R. 2016. A new virus discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus M. Kamitani *et al.* - 7

- enrichment in metagenomic studies. *Mol. Ecol. Resour.* 16: 1255-1263.
- Breitbart, M. & Rohwer, F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* 13: 278-284.
- Brum, J.R., Ignacio-Espinoza, J.C., Roux, S., et al. 2015. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. *Science* 348: 1261498.
- Culley, A.I., Lang, A.S. & Suttle C.A. 2006. Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities. *Science* 312: 1795-1798.
- Edwards, R.A. & Rohwer, F. 2005. Viral metagenomics. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 504-510.
- Flor, H.H., 1971 Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 9: 275-296.
- Fraile, A. & Garcia-Arenal, F. 2016. Environment and evolution modulate plant virus pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 17: 50-56.
- Fukuzawa, N., Itchoda, N., Ishihara, T., Goto, K., Masuta, C. & Matsumura, T. 2010. HC-Pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of Cucumber mosaic virus in Nicotiana benthamiana plants. *Virus Genes* 40: 440-446.
- Fulton, R.W. 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 67-81.
- García, J.A. & Pallás, V. 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 11: 21-30.
- Goic, B. & Saleh, M.C. 2012. Living with the enemy: viral persistent infections from a friendly viewpoint. *Curr. Opin. Microbiol.* 15: 531-537.
- Greenberg, J.T. 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48: 525-545.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858.
- Hogenhout, S.A., Ammar, el-D., Whitfield, A.E. & Redinbaugh M.G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. rev. phytopathol.* 46: 327-359.
- Hull, R. 2014. *Plant virology*. Elsevier Academic Press.
- Ivanov, K.I., Eskelin, K., Basic, M., De, S., Lohmus, A., Varjosalo, M. & Makinen, K. 2016. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J.* 85: 30-45.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kamitani, M., Nagano, A.J., Honjo, M.N. & Kudoh, H. 2016. RNA-Seq reveals virus-virus and virus-plant interactions in nature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: 11.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. 1998. A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses. *Cell* 95: 461-470.
- Kristensen, D.M., Mushegian, A.R., Dolja, V.V. & Koonin, E.V. 2010. New dimensions of the virus M. Kamitani et al.-8

- world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol.* 18: 11-19.
- Li, L., Liu, J., Zhang, Q., Fu, R., Zhu, X., Li, C. & Chen, J. 2016. Seed-borne viral dsRNA elements in three cultivated *Raphanus* and *Brassica* plants suggest three cryptoviruses. *Can. J. Microbiol.* 62: 287-295.
- Marquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J. & Roossinck, M.J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515.
- May, R.M. & Anderson, R.M. 1983. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 219: 281-313.
- Mertens, P. & Sangar, D. 1985. Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Virology* 140: 55-67.
- Moreno-Delafuente, A., Garzo, E., Moreno, A. & Fereres, A. 2013. A Plant Virus Manipulates the Behavior of Its Whitefly Vector to Enhance Its Transmission Efficiency and Spread. *PLoS ONE* 8: e61543.
- Morlan, J.D., Qu, K. & Sinicropi, D.V. 2012. Selective Depletion of rRNA Enables Whole Transcriptome Profiling of Archival Fixed Tissue. *PLoS ONE* 7: e42882.
- Nagano, A.J., Honjo, M.N., Mihara, M., Sato, M. & Kudoh, H. 2015. Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq. *Methods Mol. Biol.* 1236: 89-98.
- Nishimura, Y., Watai, H., Honda, T., et al. 2017. Environmental Viral Genomes Shed New Light on Virus-Host Interactions in the Ocean. *mSphere* 2.
- Paez-Espino, D., Eloe-Fadrosh, E.A., Pavlopoulos, G.A., Thomas, A.D., Huntemann, M., Mikhailova, N., Rubin, E., Ivanova N.N. & Kyrpides, N.C. 2016. Uncovering Earth's virome. *Nature* 536: 425-430.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Bowman, V.V. 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9: 859-868.
- Remold, S.K. 2002. Unapparent virus infection and host fitness in three weedy grass species. *J. Ecol.* 90: 967-977.
- Rist, D.L. & Lorbeer, J.W. 1989. Occurrence and overwintering of cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York. *Phytopathology*. 79: 65-69.
- Roossinck, M.J. 2011. The big unknown: plant virus biodiversity. *Curr Opin Virol* 1: 63-67.
- Roossinck, M.J. 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu. Rev. Genet.* 46: 359-369.
- Roossinck, M.J., Saha P., Wiley G.B., Quan J., White J.D., Lai H., Chavarria F., Shen G. & Roe B.A. 2010. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Mol. Ecol.* 19: 81-88.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. & Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809.

- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J. & Behrens, S.E. 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. *Nucleic Acids Res* gkt193.
- Shalileh, S., Ogada, P.A., Moualeu, D.P. & Poehling, H.M. 2016. Manipulation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Tomato Spotted Wilt Virus* (Tospovirus) Via the Host Plant Nutrients to Enhance Its Transmission and Spread. *Ecol. Entomol.* 45: 1235-1242.
- Shi, M., Lin, X.D., Tian, J.H., et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* advance online publication.
- Suttle, C.A.. 2005. Viruses in the sea. *Nature* 437: 356-361.
- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Micro.* 5: 801-812.
- Syller, J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant. Pathol.* 13: 204-216.
- Tatineni, S., Graybosch, R.A., Hein, G.L., Wegulo, S.N. & French, R. 2010. Wheat Cultivar-Specific Disease Synergism and Alteration of Virus Accumulation During Co-Infection with Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Phytopathology* 100: 230-238.
- Thingstad, T.F. 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1320-1328.
- Urayama, S.I., Takaki, Y. & Nunoura, T. 2016. FLDS: A Comprehensive dsRNA Sequencing Method for Intracellular RNA Virus Surveillance. *Microbes Environ.* 31: 33-40.
- Wintermantel, W.M. 2005. Co-infection of Beet mosaic virus with Beet Yellowing Viruses Leads to Increased Symptom Expression on Sugar Beet. *Plant Dis.* 89: 325-331.
- Wren, J.D., Roossinck, M.J., Nelson, R.S., Scheets, K., Palmer, M.W. & Melcher, U. 2006. Plant Virus Biodiversity and Ecology. *PLoS Biol.* 4: e80.
- Xia, Z., Zhao, Z., Chen, L., Li, M., Zhou, T., Deng, C., Zhou, Q. & Fan, Z. 2016. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Sci. Rep.* 6: 20520.
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J.P., Feldman, T., Sumner, L.W. & Roossinck, M.J. 2008. Virus infection improves drought tolerance. *New. Phytol.* 180: 911-921.