

## 特別報告

## 園芸植物における日本国内でのウイロイドの発生分布と変異体の感染性 †

松下 陽介

(平成 23 年 6 月 23 日受付 平成 23 年 10 月 5 日受理)

Distribution of Viroid Variants and Their Infectivity  
in Horticultural Plants in Japan

Yosuke MATSUSHITA

## Summary

Stunting caused by *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) is one of the most damaging diseases of cultivated chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), the most important cut flower in Japan. This disease has been reported in many regions of the world. The symptoms are severe stunting of plant height, reduction in flower size, and bleaching of the flower. We assayed for CSVd in cultivated chrysanthemums collected from 10 prefectures in Japan by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and determined complete nucleotide sequences of CSVd isolates infecting the plants. CSVd was detected in 80 of 89 samples of cultivated chrysanthemum, and samples from all 10 prefectures were infected. Five sequence variants of CSVd were distinguished among 21 isolates based on the differences in the nucleotide sequences. Variant 1 was most frequently detected in samples from 6 prefectures and was assumed to be the predominant CSVd variant occurring in Japan.

A viroid disease causing chlorosis of leaves and dwarfism has been found on commercial tomato (*Solanum lycopersicum*) plants in Hiroshima Prefecture, Japan. Grafting of stems from infected tomatoes onto healthy ones resulted in the healthy plants showing identical symptoms to the infected plants used as a source. Nucleotide sequencing indicated that the causal pathogen was *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) sharing 98% nucleotide sequence identity with that of a Canadian isolate reported previously. This description is the first of TCDVd infection of tomato plants in Japan. We investigated the host range and physical properties of TCDVd, with the aim of developing further protective procedures against infection by this viroid. Among the 46 plant species that were inoculated with the viroid, two in the family Compositae and 23 in the family Solanaceae were systemic hosts. The viroids in the crude sap from diseased tomato plants were thermally inactivated by heating at 100 °C for at least 40 min. Viroids also lost their infectivity when diluted in phosphate buffer to at least 10<sup>-6</sup>, or after 3 days of incubation at room temperature.

CSVd, a non-coding RNA, is known to cause chrysanthemum stunt disease, which affects the yield of flowers. To gain insights into CSVd replication, infection, and the reasons for the spreading of CSVd disease in chrysanthemum plants, we prepared linear CSVd RNA and analyzed its ability to cause disease in chrysanthemum plants. We found that linear CSVd replicated as efficiently as CSVd RNA isolated from infected chrysanthemum plants. Additionally, evaluation of the linear CSVd RNA for its ability to infect other plants revealed that CSVd has a wide host range for its replication. Of particular concern here that, CSVd isolated from these hosts was found to be infectious to chrysanthemum plants, and thus potentially contributes to the spreading of the disease to chrysanthemum plants.

**Key Words:** chrysanthemum, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, tomato

† 本論文は京都大学学位審査論文(平成 23 年 1 月)を基に編集・加筆したものである。

## 目 次

緒言	10
第 1 章 日本国内における <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> の発生分布と発生系統	11
第 1 節 <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> の発生分布	11
第 2 節 発生のみられる <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> の系統	13
第 3 節 考察	14
第 2 章 日本国内での <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> の発生とその特性	17
第 1 節 <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> の発生	18
第 2 節 発生のみられる <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> の特性	20
第 3 節 考察	22
第 3 章 <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> の変異と感染性	26
第 1 節 <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> と相同の感染性単分子 RNA の開発	26
第 2 節 <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> 相同 RNA の変異と園芸植物への感染性	30
第 3 節 考察	34
総合考察	38
摘要	41
謝辞	43
引用文献	43

## 緒 言

近年、園芸植物におけるウイロイド病害は、感染種子や無病徴感染の苗の国際的な移動に伴い、世界各地で発生している。特に、ペチュニアやバーベナなどの無病徴感染の園芸植物から、トマトやキクなどの園芸植物で重大な被害をもたらすウイロイドの検出例が相次いでいる (James et al., 2008; Singh et al., 2006; Verhoeven et al., 2004, 2007)。さらに 2009 年には、新たにピーマンでのウイロイド病害の発生が報告されるなど

(Verhoeve et al., 2009)、今後もウイロイドの国外からの侵入と突発的な発生には予断を許さない状況となっている。

ウイロイド (viroid) は 1 本鎖環状 RNA からなる最小の植物病原体であり、1971 年に Diener らによってジャガイモから発見された。ウイロイドはウイルスゲノムの大きさの 1/10 ~ 1/100 (246-399 塩基) にすぎず、最小の病原体である (佐野, 2007)。ウイルスは DNA または RNA を包むようにタンパクの殻をもっているが、ウイロイドはタンパク質をもたない上、その RNA はタンパク質の情報をもたないノンコーディング RNA である (Ding, 2009)。また、ウイロイドは、宿主細胞の酵素に依存して、RNA から RNA へ自律的に自己増殖・複製している。現在、植物に感染するウイロイドは 28 種が報告されており (佐野, 2007)、園芸植物に発生のみられるウイロイドにはジャガイモに感染する *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) やキク等に感染する *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd)、かんきつ類に感染する *Citrus exocortis viroid* (CEVd) などがあげられる。

ウイロイドはポスピウロイド科とアブサンウイロイド科に分類される。PSTVd, CSVd, CEVd は前者に属し、このポスピウロイド科に属するウイロイドは、Keese and Symons (1985) によって提案された 2 次構造による 5 つの構造・機能ドメインがあり、このうち、中央保存領域 (CCR) は保存性の高い領域である。アブサンウイロイド科は、中央保存領域を持たないが、ハンマーヘッド型リボザイム活性を有し、自己切断するという特徴をもつ。また、前者は核内で増殖し、後者は葉緑体内で増殖することが知られている。

ポスピウロイド科ポスピウロイド属 (Pospiviroid) のウイロイドは、トマト、ペチュニア、キク、ダリア等のナス科やキク科の園芸植物に感染するものが多い (佐野, 2007)。実際、野菜・花き類で病害を引き起こすウイロイドはほとんどポスピウロイド属のウイロイドである。なかでもポスピウロイド属の CSVd は、日本において花き類で生産量・栽培面積の最も多いキクの重要病害である。また、野菜の重要品目であるトマトには、ポスピウロイド属の *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) や *Tomato apical stunt viroid* (TASVd)、*Tomato planta macho viroid* (TPMVd)、*Columnea latent viroid* (CLVd) による葉の黄化等を引き起こすウイロイドが感染し、海外では問題となっている (Singh et al., 2003b)。現在のところ、野菜・花き類ではこれらのウイロイドが防除や植物防疫上最も警戒すべきウイロイド

である。しかし、CSVdは花き類の重要病害であるにもかかわらず、国内での発生状況やその変異体についての情報は少ない。また、TCDVdの国内での発生については、本研究における報告が最初のものである。

ウイロイドはウイルスや細菌よりも変異が発生する速度が速いとされており (Gago et al., 2009), 1つのウイロイド種における変異体も数多く報告されている。例えば、*Hop stunt viroid* (HSVd) は265の変異体が報告されている (佐野, 2007)。CEVdでは、無病徴感染の宿主を経ることで、CEVdの塩基配列が変化し、病徴や宿主範囲が変化することが知られている (Fagoaga et al., 1995; Gandia et al., 2007)。また、ウイロイドはRNAのみから構成されていることから、変異による特性への影響は大きく、1塩基変異によってウイロイドの複製や移行能の欠失や病徴の変化が起こることが、PSTVdの感染性cDNAクローンやその転写RNAを用いた研究で明らかになっている (Qi and Ding, 2003; Wassengger et al., 1996; Zhong et al., 2007, 2008)。

CSVdはHaseloff and Symons (1981) によって初めて塩基配列が決定された。その後、33に及ぶ変異体が報告されているが、それらのキクでの発生状況やキク以外の各種宿主植物体への感染性や病徴などの特性についてはほとんど研究例はなく、これらの変異体がキク以外の宿主植物に伝染する可能性やその際新たな変異体が発生する可能性についての検証が必要となっている。また、1999年に新たに報告されたTCDVdは既報のウイロイドであるPSTVdの近縁種であり、塩基配列の相同性が80~85%あるにもかかわらず、宿主範囲が異なり、種子伝染の可否も異なることが知られている (Singh et al., 1999)。しかし、TCDVdについても宿主範囲等の特性についての報告はない。CSVdやTCDVdの発生状況や感染植物による拡散の可能性についての情報は、これら園芸植物に感染するウイロイドに対する防除のために必要な情報である。

そこで、本研究では、野菜・花き類におけるウイロイドの発生状況の調査と新たな変異体の発生の可能性について明らかにし、ウイロイドに関する病害防除ならびに植物防疫上の基礎的知見を得ることを目的とした。

## 第1章 日本国内における *Chrysanthemum stunt viroid* の発生分布と発生系統

栽培ギク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. 以下キク

と記述する) は、日本で生産されている花き類の中で生産量・栽培面積ともに最多の最重要品目であり、全国各地に産地が存在する。近年、*Chrysanthemum stunt viroid* (以下、CSVd) を病原とするキクわい化病の発生が各地で問題となっている。本ウイロイドに感染すると、草丈が著しく短くなり、切り花としての商品価値を失う (Horst et al., 1977)。このようにCSVdはキクの重要病害であるにもかかわらず、国内での発生状況やその変異体についての情報はほとんどない。そこで本章では国内におけるCSVdの発生状況およびその変異体の分布についての調査を行った。

### 第1節 *Chrysanthemum stunt viroid* の発生分布

キクわい化病は1945年にアメリカで発見され、1973年になって初めて病原がCSVdであることが明らかにされた (Bouwen and Zaayen, 2004)。日本では大沢ら (1977) により初めて確認された。三重県 (花田ら, 1982)、香川県 (楠ら, 1993)、兵庫県 (塩飽ら, 1996)、熊本県 (森山ら, 1996)、北海道 (李ら, 1997)、山形県 (兼松ら, 1998)、新潟県 (Sugiura and Hanada, 1998)、福岡県、宮崎県、沖縄県 (花田・酒井, 2001)、静岡県 (土井・加藤, 2004) など各地で発生が報告されている。しかし、これらの報告は年次もまちまちであり、日本国内におけるCSVdの発生分布について同時期に調査した事例はない。本節では日本国内のキク産地における発生分布の状況を知るため、2005年から2006年にかけて全国一斉に調査を実施した。また、同様に野生のキク属植物におけるCSVdの感染実態についても調査を行った。

### 材料および方法

#### 1) 検定用キクの収集

CSVdの発生実態を調査するために、各地でサンプリングを行った。2005年から2006年にかけて全国のキク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) の主要生産地 (福島・新潟・茨城・栃木・群馬・神奈川・三重・岡山・香川・福岡) から収集したキク苗 (輪ギク・スプレーギク・小ギク) 合計89サンプルおよび花き研究所保存の野生ギク (オオシマノジギク (*C. crassum* (Kitam.) Kitam), シマカンギク (*C. indicum* L. var. *indicum*), チョウセンノギク (*C. zawadskii* Herbich.), ピレオギク (*C.*

*weyrichii* (Maxim.) Miyabe & T. Miyake), ナカガワノギク (*C. yoshinaganthum* Makino ex Kitam.), ノジギク (*C. japonense* Nakai var. *japonense*), リュウノウギク (*C. makinoi* Matsum. & Nakai), およびワカサハマギク (*C. wakasaense* Shimot. ex Kitam.) をそれぞれ 1 個体ずつ実験に用いた。

## 2) CSVd の RT-PCR による検定

試料から RNA を得るために, Hosokawa et al. (2005) の方法に従って, direct tissue RT-PCR 法を用いた。注射針 (25 G × 25 mm, テルモ) をサンプル葉に突き刺し, 付着した組織液を逆転写 (RT) 溶液に 30 秒浸すことでウイロイド RNA を得た。RT 反応の条件は, 42°C -30 分の後, 99°C -5 分とし, RT の溶液は, 2 µL の RT buffer, 1 µL の dNTPs (各 10 mM), 0.5 µL の CSVd-R リバースプライマー (5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3'), 1 µL の RNase inhibitor (1U, TOYOBO) および 0.5 µL の逆転写酵素 ReverTra Ace (TOYOBO) の混合溶液をチューブに入れ, RNase free 水で合計 9 µL に調整した。この RT 産物 1.6 µL を RT-PCR のテンプレートとして用いた。RT-PCR には, プライマーセット, CSVd-R と CSVd-F を用いた (第 1 表)。PCR の反応液は, 0.1 µL の CSVd-F フォワードプライマー (20 µM; 5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3'), 1 µL の KOD dash buffer (TOYOBO), 0.1 µL の KOD dash polymerase (TOYOBO), 1 µL の dNTPs (各 2 mM) の混合溶液を用いて, ここに RT 産物を 1.6 µL 加えて, DNase free 水で 10 µL に調整したものである。PCR 条件は 98°C -45 秒, 62°C -10 秒, 74°C -45 秒の 35 サイクルとした。6 µL の PCR 反応液を 1.0 % アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した後, 目的の大きさに相当する約 250 bp のバンドを UV 光下で

確認した。

RT-PCR で目的のバンドが検出されなかった試料については, nested PCR を行った。Nested PCR の反応液は, 0.1 µL の nested PCR フォワードプライマー (20 µM), nested PCR リバースプライマー (20 µM), 1 µL の KOD dash buffer (TOYOBO), 0.1 µL の KOD dash polymerase (TOYOBO), 1 µL の dNTPs (2 mM) の混合溶液を用いて, ここに RT-PCR 産物を 1 µL 加えて, DNase free 水で 10 µL に調整したものである。Nested PCR の条件は, 94°C -30 秒, 60°C -5 秒, 74°C -30 秒の 30 サイクルとし, プライマーには CSVd-NR および CSVd-NF を用いた (第 1 表)。6 µL の PCR 反応液を 1.0 % アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した後, 目的の大きさに相当する約 200 bp のバンドを UV 光下で確認した。RT-PCR で検出されたものを高保毒, RT-PCR で検出されず nested PCR 検出されたものを低保毒とした。

## 結 果

RT-PCR の結果, 全国から集めたキク 89 サンプル中 36 サンプルから CSVd の約 250 bp のバンドが検出された。また, nested PCR では, 残り 53 サンプル中 44 サンプルから CSVd の約 200 bp のバンドが検出された。Nested PCR において CSVd が検出されなかったサンプルはわずか 9 サンプルであった (第 2 表)。これより, サンプルを採集したすべての県で CSVd が検出されたことになる。

一方, 8 種の野生ギクからはいずれも CSVd が RT-PCR で検出された (第 1 図)。CSVd に感染している野生ギクには明瞭な病徴は認められなかったが, これらが CSVd の宿主となることが初めて示された。

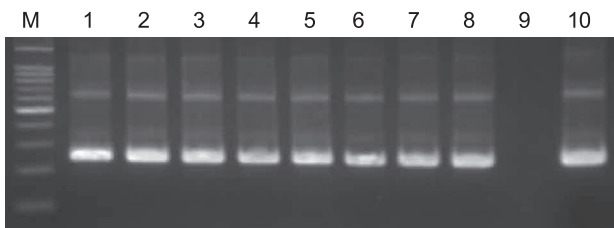
**Table 1.** Oligonucleotide primers used for the detection and sequence determination of CSVd.

Name	Method	Sequence (5'-3')	Target of annealing (position number)	PCR product size (bp)	Reference
CSVd-R	RT-PCR	AGGATTACTCCTGTCTCGCA	148-167	252	Hosokawa et al. (2005)
CSVd-F		CAACTGAAGCTTCAACGCCTT	270-290		
CSVd-NR	Nested PCR	AGTGGGGTCCTAAGCCCCAA	126-145	204	Hosokawa et al. (2005)
CSVd-NF		CCAATCTTCTTTAGCACCGG	296-315		
CSVd-1P	RT-PCR	CTTAGGACCCCACTCCTGCG	132-151	349	Li et al. (1997)
CSVd-1M		CCGCGATCTCGTCGGACTTC	125-106		
CSVd-ZR	Sequence	GGAACCACAAGTAAGTCCCG	1-20	354	Newly designed in this study
CSVd-ZF		TGTGGTGCACTCCTGACCCT	21-40		



**Table 2.** PCR detection of CSVd in cultivated chrysanthemums collected from various areas in Japan in 2005 and 2006.

Collected area	Number of samples	Number of CSVd-infected samples with		Number of CSVd-free samples (Not detected by nested PCR)
		With high concentration (Detected by RT-PCR)	With low concentration (Detected by nested PCR)	
Fukushima	15	3	12	0
Niigata	5	2	3	0
Ibaraki	40	10	21	9
Tochigi	3	3	-	0
Gunma	12	9	3	0
Kanagawa	2	0	2	0
Mie	4	2	2	0
Okayama	3	3	-	0
Kagawa	1	1	-	0
Fukuoka	4	3	1	0
Total	89	36	44	9



**Fig. 1.** Detection of CSVd from wild type chrysanthemum using RT-PCR. Lane 1: *Chrysanthemum crassum*, Lane 2: *C. indicum*, Lane 3: *C. zawadskii*, Lane 4: *C. weyrichii*, Lane 5: *C. yoshinaganthum*, Lane 6: *C. japonense*, Lane 7: *C. makinoid*, Lane 8: *C. wakasaense*, Lane 9: DNase and RNase-free water, Lane 10: CSVd-infected chrysanthemum as a positive control, Lane M: 100-bp ladder markers (TaKaRa).

## 第2節 発生のみられる *Chrysanthemum stunt viroid* の系統

CSVdの全塩基配列はオーストラリアで発生したCSVdに関してはじめて決定された (DDBJ accession no. V01107; Haseloff and Symons, 1981). その後イギリスで発生したCSVdについても塩基配列が報告された (No. M19506; Gross et al., 1982). これまでにCSVdには全長354, 355, 356塩基の変異体の報告がある (Steger and Riesner, 2003). 日本では兵庫県 (No. X16408; 塩飽ら, 1996), 北海道 (AB006737; 李ら, 1997), 山形県 (兼松ら, 1998), 新潟県 (Sugiura and Hanada, 1998), 福岡県, 宮崎県, 沖縄県 (花田・酒井, 2001), 静岡県 (土井・加藤, 2004) で発生したCSVdの全塩基配列が報告されている. しかし, 国内で発生しているCSVdの変異体の種類の全国分布を明らかにした報告はないことから, 本節では各地のキクへ感染しているCSVdの塩基配列を調査して, どの程度の変異体があるかを明らかにし, 既報のCSVdの塩基配列との比較を

行った.

## 材料および方法

第1章第1節のRT-PCRにおいてCSVdが検出された14サンプルおよび野生ギク7サンプルを用いて, CSVdの全塩基配列を解析した. RT-PCRは第1表のプライマー (CSVd-1P, -1M・CSVd-ZR, -ZF) を用いて第1章第1節と同様の方法で行った. 解析した塩基配列が既報の配列 (Genbank/EMBL/DDBJ データベース) と異なったものに関しては, RT-PCR産物をクローニングし, 得られたクローンの塩基配列を解析した. RT-PCR産物を1.0%アガロースゲルで電気泳動し, 目的の産物をゲルから単離して, Qiagen QIA Quick gel extraction kit (Qiagen) で精製した. 精製したPCR産物をQiagen A-Addition kit (Qiagen) を用いてDNAの末端にA付加を行い, pGEM-T easy vector (Promega) にクローニングした. M13プライマーを用いてBigDye terminator cycle sequence kit (Applied Biosystem) でシーケンシング反応を行い, DNAシーケンサーABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した.

## 結果

塩基配列を解析した結果, サンプルから検出されたCSVdの全長はすべて354塩基であった. 今回のサンプルからは5クローンのCSVdが検出された (第3表). 変異体5 (No. AB279771) は, 栽培ギクから, 変異体4 (No. AB279770) はナカガワノギクからそれぞれ分離された新しい変異体であった. また21分離株のうち14株は変異体1 (No. X16408) であり, 兵庫株 (塩飽ら, 1996) と同じ配列であった. 茨城県から単離された変異

体 4 および変異体 5 はそれぞれ、シネラリアからの分離株（イギリス株；No. M19506；Gross, 1982）および山形株（No. D88895；兼松ら, 1998）と同じであった。ノジギクおよびピレオギクから変異体 1 が、ノジギク、シマカンギク、リュウノウギク、チョウセンノギクから変異体 2 が、ナカガワノギクから変異体 4 がそれぞれ分離された。変異体 2 は既報の変異体を含めて、キク以外のキク科植物から検出されており、本実験ではノジギク、シマカンギク、リュウノウギク、チョウセンノギクから、Gross et al. (1982) の実験ではシネラリアから検出されている。

ポスピウイルスの 2 次構造における 5 つのドメイン構造には、左末端領域 (TL)、病原性領域 (P)、中央保存領域 (CCR)、可変領域 (V)、右末端領域 (TR) があり (Keese and Symons, 1985)、今回のサンプルから得られた変異体は中央保存領域 (78-105 および 255-280) では塩基の変異は見られず、病原性領域 (45-70 および 284-309) で変異が多く見られた (第 3 表)。

### 第 3 節 考察

CSVd は 1945 年にアメリカではじめて確認され、その後、カナダでも発見された。1950 年代には日本を含む各国のキク生産地においても発病が報告された (Bouwen and van Zaayen, 2004)。CSVd の土壌伝染

や虫媒伝染は報告されていないことから、このような世界各地での発生報告は、感染したキク苗の国際的な移動によるとされている (Lawson, 1968)。第 1 節では、国内の 10 県で採集した栽培キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 89 サンプルおよび花き研究所で保存されている野生キクから CSVd を検出し、21 単離株の全塩基配列を決定した。その結果、栽培キク 89 サンプル中 80 サンプルが CSVd に感染しており、うち 36 サンプルは RT-PCR で検出されるレベルの高濃度感染であり、44 サンプルは nested PCR で検出される低濃度感染であった。採集したすべての県で CSVd が検出され、日本国内のキク栽培地域で感染が拡大している可能性が示された (第 2 表)。本病による被害が全国的に発生し、場所によっては壊滅的な被害をもたらしていることが花き研究所が行ったアンケートによっても明らかとなっている (松下, 2005)。日本国内のすべてのキク産地での高い CSVd の感染状況もまた、苗の移動によるところが大きいと推察された。

これまでに、CSVd の自然感染植物として、キク (Diener and Lawson, 1973) 以外にキク科植物のシネラリア (*Pericallis hybrida* B. Nord.; Gross et al., 1982)、アゲラタム (*Ageratum houstonianum* Mill)、マーガレット (*Argyranthemum frutescens* (L.) Schultz-Bip.; Menzel and Maiss, 2000)、ダリア (*Dahlia* spp.; Nakashima et al., 2007)、およびナス科植物の

Table 3. Comparison of nucleotide sequences of CSVd isolated from stunted chrysanthemum plants in Japan.

Variant number	Isolated area (Prefecture)	Number of isolates	Hosts	Position of mutation <sup>†</sup>																Accession number in DDBJ (Reference)
				27	47	49	50	64	65	103	120	126	162	248	254	293	298	345		
1	Tsukuba (Ibaraki), Ishioka (Ibaraki), Kashima (Ibaraki), (Fukushima), (Tochigi), Agatsuma (Gunma), (Hyojo) <sup>‡</sup> , (Okayama), (Fukuoka)	14	<i>Chrysanthemum morifolium</i> , <i>C. japonense</i> var. <i>japonense</i> , <i>C. weyrichii</i>	G	U	G	A	G	A	G	U	C	A	U	U	U	A	U	X16408 (Shiwaku et al., 1996)	
2	Tsukuba (Ibaraki)	4	<i>C. japonense</i> var. <i>japonense</i> , <i>C. indicum</i> var. <i>indicum</i> , <i>C. makinoi</i> , <i>C. zawadskii</i>	G	U	G	A	G	A	G	U	C	A	U	A	U	A	U	M19506 (Gross et al., 1982)	
3	Ishioka (Ibaraki), (Yamagata) <sup>‡</sup>	2	<i>C. morifolium</i>	G	A	A	C	G	A	G	U	C	A	U	U	U	A	U	D88895 (Kanematsu et al., 1998)	
4	Tsukuba (Ibaraki)	1	<i>C. yoshinaganthum</i>	G	U	G	A	A	G	G	U	C	A	U	A	U	U	A	AB279770 <sup>×</sup>	
5	Tsukuba (Ibaraki)	1	<i>C. morifolium</i>	G	U	A	C	G	A	G	U	C	A	U	U	U	A	U	AB279771 <sup>×</sup>	
6	(Hokkaido) <sup>‡</sup>	2	<i>C. morifolium</i>	G	U	A	C	G	A	G	U	U	A	U	U	U	A	U	AB006737 (Li et al., 1997)	
7	(Shizuoka) <sup>‡</sup>	3	<i>C. morifolium</i>	G	U	G	A	G	A	G	U	C	A	C	U	U	A	U	(Doi and Kato, 2004)	
8	(Niigata) <sup>‡</sup>	1	<i>C. morifolium</i>	G	U	G	A	G	A	C	U	C	A	U	U	U	A	U	(Sugiyama and Hanada, 1998)	
9	(Fukuoka) <sup>‡</sup>	1	<i>C. morifolium</i>	A	U	G	A	G	A	G	A	C	G	C	U	C	A	U	(Hanada and Sakai, 2001)	
10	(Miyazaki) <sup>‡</sup>	2	<i>C. morifolium</i>	A	U	G	A	G	A	G	A	C	A	C	U	U	A	U	(Hanada and Sakai, 2001)	
11	(Okinawa) <sup>‡</sup>	1	<i>C. morifolium</i>	G	U	G	A	G	A	G	A	C	G	C	U	C	A	U	(Hanada and Sakai, 2001)	
12	(Okinawa) <sup>‡</sup>	1	<i>C. morifolium</i>	G	A	A	C	G	A	G	U	C	A	U	U	U	U	U	(Hanada and Sakai, 2001)	
13	(Okinawa) <sup>‡</sup>	1	<i>C. morifolium</i>	G	U	A	C	G	A	G	U	C	A	U	U	U	A	U	(Hanada and Sakai, 2001)	

<sup>‡</sup>Data from previous reports.

<sup>†</sup>Position number is based on the sequence of strain 1. P domain is located in shadowed areas.

<sup>×</sup>Newly registered sequences in this study.

ペチュニア (*Petunia hybrida hort.*; Brierley, 1953; Runia and Peters, 1980; Verhoeven et al., 1998), *Solanum jasminoides* Paxt. (Verhoeven et al., 2006), キョウチクトウ科植物のツルニチニチソウ (*Vinca major* L.; Nie et al., 2005) が報告されている。また、実験上感染させることが可能な宿主植物としては、キク科、ナス科、ウリ科のいくつかの植物が報告されている (Brierley, 1953; Niblett et al., 1980; Runia and Peters, 1980)。このうちキク、シネリア、ダリアを除き、明瞭な病徴は観察されない。CSVd に感染したキクやダリアでは生育不良やわい化症状以外はほとんど観察されないが、キク 'Mistletoe' や 'Bonnie Jean' でのみ葉の退緑斑点が観察され (Brierley, 1953; Laurie et al., 1987)、シネリアでは退緑斑点やえそ斑点が観察される (Lawson et al., 1968)。これらの報告には野生ギクに関するものはみあたらないが、本調査において野生ギクが宿主植物となることはじめて明らかとなった (第1図)。これらの野生ギクにおいては、栽培ギクで見られるような極端なわい化病状は見られなかったが、健全個体がないために比較できず病徴の有無は不明であった。

CSVd のキクに対する病原性は品種によって異なることが明らかとなっており、土井・加藤 (2004) の実験によると、CSVd に感染させたキク 10 品種を比較したところ、健全個体と比べてもほとんどわい化しない品種や、健全個体の半分程度までわい化した品種があることが報告されている。CSVd に感染していても無病徴または弱い病徴しか示さない品種があることから、そのような無病徴感染の苗が感染源になっている可能性が指摘されている。また、秋田県で行われた調査では、CSVd に感染していた 240 個体中 63 個体はわい化病状が見られなかった。こうした株が配布されることで県内産地に CSVd が蔓延した可能性が高いと推察している (山本, 2008)。

第2節では RT-PCR において CSVd が検出された 14 サンプルおよび野生ギク 7 サンプルを用いて、CSVd の全塩基配列を解析した。サンプルから検出された CSVd の全長はすべて 354 塩基であった。これはイギリス株 (No. M19506; Gross et al., 1982) の 354 塩基と同じである。過去に国内で発生した CSVd の塩基数はすべて 354 塩基であった (土井・加藤, 2004; 花田・酒井, 2001; 李ら, 1997; Sugiura and Hanada, 1998)。海外ではこれまでに 354 ~ 356 塩基の CSVd が報告されており (Steger and Riesner, 2003), 354 塩基 (日本,

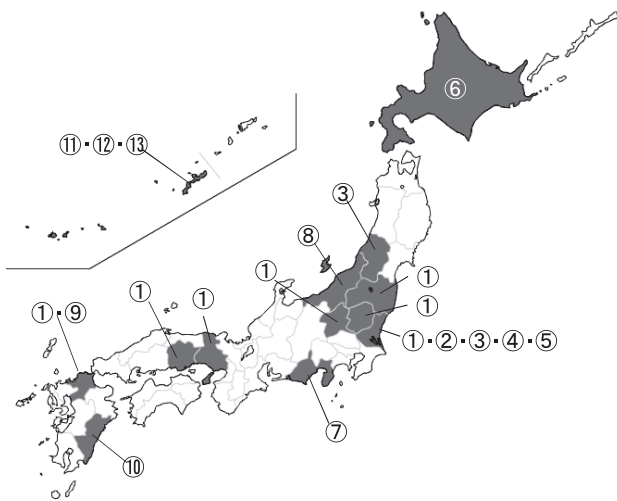
イギリス), 355 塩基 (アメリカ, カナダ), 356 塩基 (オーストラリア) がある。その中で最も多く報告されている変異体は全長 354 塩基の CSVd であり, 356 塩基の CSVd はオーストラリアの CSVd (No. V01107) 以外では報告されていない (Genbank/EMBL/DDBJ データベース)。また, 355 塩基の CSVd はツルニチニチソウ (No. DQ094298; Nie et al., 2005) やペチュニア (No. U82445; Verhoeven et al., 1998) から検出されているのみである。これより, 日本国内の CSVd はすべて 354 塩基であることから, キクに感染する主な CSVd の塩基数は 354 塩基であると推察された。一方, PSTVd は 357, 358, 359, 360, 361, 364 の変異体が, CEVd は 366, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375 塩基の変異体が報告されており, 変異の幅が大きい (Steger and Riesner, 2003)。本章で得られた変異体を含め, 現在知られている CSVd の変異体は 354, 355, 356 塩基しかなく, 既報の CSVd では塩基の挿入や欠失による変異体は少ないと考えられた。

ウイロイドの塩基配列の多様性については, ポスピウイロイド科のウイロイドでは CEVd (Gandia et al., 2005, 2007), *Citrus dwarfing viroid* (Owens et al., 2000), *Citrus bent leaf viroid* (Foissac and Duran-Vila, 2000; Gandia and Duran-Vila, 2004), PSTVd (Gruner et al., 1995; Gora et al., 1994; Gora-Sochacka et al., 1997), HSVd (Kofalvi et al., 1997), *Grapevine yellow speckle viroid I* (Polivka et al., 1996; Rigden and Rezaian, 1993), アブサンウイロイド科のウイロイドでは *Chrysanthemum chlorotic dwarf viroid* (Codoner et al., 2006; Navarro and Flores, 1997), *Peach latent mosaic viroid* (Ambros et al., 1998, 1999; Hernandez and Flores, 1992), *Avocado sunblotch viroid* (Rakowski and Symons, 1989) で報告されており, これらのウイロイドは多様な塩基配列をもつ集団であることが示されている。しかし CSVd の変異体の多様性についての報告はこれまでにない。

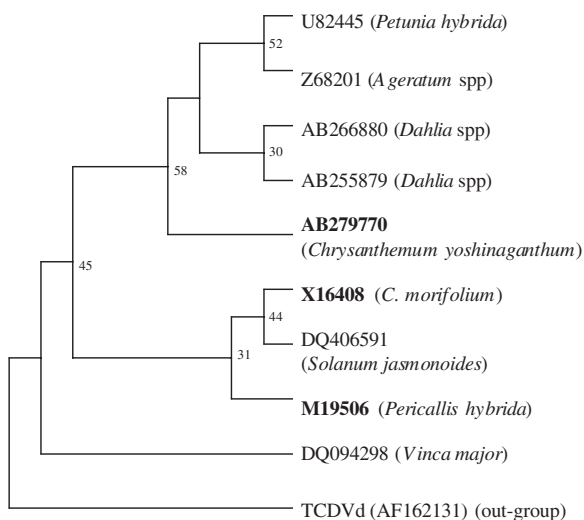
第1章第2節で行った塩基配列の解析の結果, 5 クローンの CSVd が検出された (第3表)。21 分離株のうち 14 株は変異体 1 (No. X16408) であり, 兵庫株 (塩飽ら, 1996) と同じ配列であった。変異体 1 は最も高頻度に検出され, 10 県中 6 県で検出されたことから, 日本で優占して分布する CSVd 系統と推定した (第2図)。日本国内で発生した CSVd の塩基配列を既報の変異体を含めて比較すると, 変異体 1 とは最大 5 塩基の違いがあるだけであり (第3表), 塩基配列の相同性は 98% ~ 100

%であった。また、海外のものも含めても CSVd の変異幅は PSTVd や CEVd と比較すると小さく、安定していることが示されている (Nie et al., 2005)。

これまでに、栽培ギク以外の宿主植物のみで検出された CSVd の変異体としては、キク科のシネラリアの変異体 (No. M19506), アゲラタム (No. Z68201), ダリア (No. AB255879, No. AB255879), ナス科のペチュニア (No. U82445) や *Solanum jasminoides* Paxt. (No. DQ406591), ツルニチニチソウ (*Vinca major* L.; No.



**Fig. 2.** Distribution of CSVd strains including previously reported ones in Japan. CSVd was detected in shadowed prefectures. Numbers in circulars indicate CSVd strain numbers in Table 1-3.



**Fig. 3.** Phylogenetic trees of CSVd. The phylogenetic tree was constructed according to Nie et al. (2005), using TCDVd as an out-group, and accession numbers were used as names for CSVd isolates. The numbers in the tree are the bootstraps from 100 trees. The CSVd in bold represent data from isolates of the present study.

DQ094298) がある。さらに、本研究では新たにナカガワノギク (*C. yoshinaganthum* Makino ex Kitam.) に変異体 (No. AB279770) が検出された (第 3 表, 第 3 図)。このように CSVd はいくつかの変異を伴ってキク科, ナス科, キョウチクトウ科等比較的幅広く分布している。ウイロイドの複製および移行はすべて宿主の因子に依存していることから (Ding, 2009), 宿主植物に合わせて変異体が生じている可能性が考えられる。系統樹をみると本実験で得られたナカガワノギクの変異体 (No. AB279770) はキクから検出された変異体 1 (No. X16408) よりもペチュニア, アゲラタム, ダリアの変異体に近いグループであると考えられ、一方その他の野生ギクであるノジギク, シマカンギク, リュウノウギク, チョウセンノギクはシネラリアの変異体 (No. M19506) と同じであり、変異体 1 に近いと考えられる (第 3 図)。

しかし、ペチュニアの変異体はキクやトマトに汁液接種で感染させることができたことが報告されているが (Verhoeven et al., 1998), 感染後の CSVd の配列は不明であり、感染後にキクまたはトマト内で変異したか否かは不明である。また、その他の変異体を他の宿主植物体へ接種した場合に変異が生じる可能性を示した報告はないことから、それぞれの変異体が宿主特有のものであるのかは不明である。一方、PSTVd には 341 ~ 364 塩基の長さの変異体が存在しており、それらは異なる宿主植物から単離されている (Vachev et al., 2010)。また PSTVd を接種した雑草のアオゲイトウ, *Anthemis arvensis* L., マトリカリアカモミール, タイチヌノフグリからは新しい変異体が発生したことが報告されており、宿主特有の変異体になることが知られている (Matousek et al., 2007)。CEVd (Fagoaga et al., 1995) や HSVd (Ito et al., 2010) においても同様に、宿主による変異の誘導が報告されている。このような現象を CSVd で確認した試験例はない。ウイロイドの場合、感染植物から単一の変異体を分離する方法がないため、ウイロイド配列と相同の DNA または RNA を人工的に合成して、それを接種源とする方法を用いる。PSTVd や CEVd, HSVd の場合はそのような方法を用いて接種試験を行うことができるが (Cress et al., 1983; Meshi et al., 1984; Owens et al., 1986; Tabler and Sanger, 1984, 1985; Visvader et al., 1985), CSVd の場合はその手法は確立していない。そのことが変異体に関する接種試験例がない原因と考えられる。

これまで PSTVd における病原性領域の変異は、トマトにおける病徴に影響することが報告されている



(Ding, 2009). PSTVdにはトマトにおける病徴発現の程度によって、弱毒、中間、強毒と分けられている。この3変異体の違いは病原性領域における2~3塩基の違いだけである。今回のサンプルから得られたCSVdの変異体の中央保存領域(78-105および255-280)では塩基の変異はほとんど見られず、病原性領域(45-70および284-309)で変異が多く見られた(第3表)。変異体1と比較すると、変異体4は病原性領域の4塩基が置換されていた。変異体1に感染していたキクはわい化症状を示していた一方、変異体4が感染していたナカガワノギクには、わい化等の病徴の有無を観察することはできなかった。しかし、これらのCSVdの病原性領域における変異が、わい化等の病徴に与える影響は不明である。これまでにCSVdの塩基配列の変異がキクでの病徴に対してどのような影響を及ぼすかについては報告されていない。本節で検出した変異体および既報の変異体を用いることで、キクでの病徴の変化を観察できるかもしれない。

本章の実験より、日本国内のすべてのキク栽培地域で感染が拡大している可能性が示された(第2表)。また、8種の野生ギクからはいずれもCSVdがRT-PCRで検出され、病徴は認められなかったが、これらがCSVdの宿主となることが初めて示された(第1図)。さらに塩基配列が異なる5種のCSVd変異体を認め、既報の系統とは塩基配列の異なる系統として、栽培ギクからは変異体5が、ナカガワノギクからは変異体4が検出された(第3表)。変異体1(DDBJ accession No. X16408)は最も高頻度に検出され、10県中6県で検出されたことから、日本で優占的に分布するCSVd系統と推定した(第2図)。日本国内で発生したCSVdの塩基配列を既報の変異体を含めて比較すると、変異体1とは最大5塩基の違いがあるだけであり、塩基配列の相同性は98%~100%であった(第3表)。また、海外のものも含めてもCSVdの変異幅はPSTVdやCEVdと比較すると小さく、安定していることが示されており(Nie et al., 2005)、日本国内で発生したCSVdの変異幅の小さいという本結果はそれと一致するものであった。

## 第2章 日本国内での *Tomato chlorotic dwarf viroid* の発生とその特性

第1章では国内におけるCSVdの発生状況とその変異体についての調査を行い、すでに全国のキク産地でCSVdが発生していることが明らかとなった。第2章で

はこれまでに国内で発生が報告されていないトマトで、激しい病徴を示すウイロイドの発生様相とそのウイロイドの特性について調査した。

*Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd)は、PSTVdと同じポスピウロイド科ポスピウロイド属に分類される。PSTVdはジャガイモの塊茎収量の減少や奇形化により経済的価値を著しく減少させることから、日本では植物防疫法上の規制対象病害として特定重要病害の一つに指定されている。また、TCDVdのRNAの塩基配列はPSTVdと類似しており、塩基配列の相同性は85%から89%である(第4図)。ウイロイドの場合、全塩基配列の10%程度以内の変異は同種の扱いとなるが(佐野, 2007)、その基準値以下であること、また、TCDVdは特徴的な可変領域を有することなどから、TCDVdは1999年にPSTVdから分離され別種に位置付けられた(Singh et al., 1999)。

トマトに感染する既報のウイロイドは、TCDVd、PSTVd、TASVd、TPMVd、*Mexican papita viroid* (MPVd)、

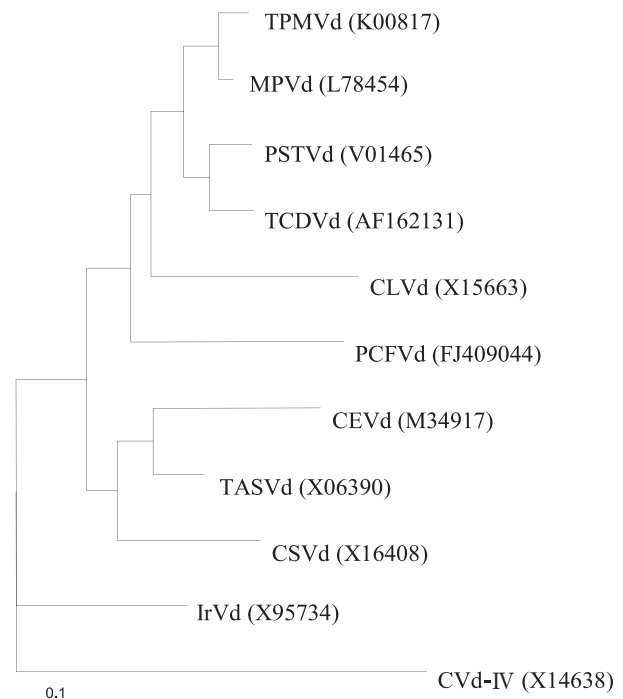


Fig. 4. GrowTree phylogram of members of the genus Pospiviroid, indicating the distinct position of the TCDVd in comparison to PSTVd. Distances are estimated number of substitutions per 100 bases. MPVd, *Mexican papita viroid*; TPMVd, *Tomato planta macho viroid*; CEVd, *Citrus exocortis viroid*; TASVd, *Tomato apical stunt viroid*; CSVd, *Chrysanthemum stunt viroid*; CLVd, *Columnnea latent viroid*; and IrVd, *Iresine viroid*. *Citrus viroid IV*(CVd-IV; X14638) was added as an outgroup.

CEVd, CSVd, CLVd (Singh et al., 2003b), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) (Verhoeven et al., 2009) の9種とされているが、その中でトマトに経済被害を引き起こすウイルスは、TCDVd, PSTVd, TASVd および TPMVd である。これらトマトに感染するウイルスは、日本の植物検疫上、生のナス科植物の輸入を嚴重に制限していることから、これまで国内での発生は皆無であった。しかし、2006年に広島県でTCDVdによる発病が疑われ感染拡大が懸念されたため、本章ではその同定を行うことを目的とし、さらにその病原体の特性を調べるための実験を行った。

## 第1節 *Tomato chlorotic dwarf viroid* の発生

2006年、広島県内の施設栽培トマトにおいて上位葉の退緑、黄化、えそを伴う葉巻症状が発生した(広島県, 2007)。その発生拡大は、栽培管理作業の方向と一致しながら時間経過とともに徐々に進行していった。現場圃場における発病実態の経過から、単なる生理障害ではなく、植物病原体による感染症が疑われ、病原体の同定が必要となったため、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センターおよび花き研究所が委託を受けその調査を行った。

### 材料および方法

2006年に広島県で発生した上位葉の退緑、黄化、えそを伴う葉巻症状を伴うトマトの茎葉を材料に用いた。まず、ウイルスおよびファイトプラズマの検定のために、電子顕微鏡観察を行った。病徴のみられるトマト(品種不詳)の葉をリタングステン酸(2%水溶液)で磨砕し、DN法により電子顕微鏡JEM-1230(日本電子)でウイルス粒子を観察した。

ファイトプラズマの観察のためには次の方法で行った。トマトの葉の一部を維管束が中心になるように切り出し(1mm×2-3mm)、3%グルタルアルデヒド(pH 7.4)を用い室温で3時間固定した。次に1%オスミック酸中で氷上に置いて2時間固定した。固定した葉をエタノールで脱水した後、等量のプロピレンオキシドと混合した50%低粘度エポキシ樹脂(Polyscience)に移して室温で一晩静置した。100%低粘度エポキシ樹脂に移し、室温で6時間静置した。次に70℃に1日間静置した。固まった樹脂をダイヤモンドナイフで80-100nmの厚さに切った。Jiang et al. (2007)の方法に従

って、4%酢酸ウラニルで10分間およびSato's lead aqueous solution(1%硝酸鉛, 1%酢酸鉛, 1%クエン酸鉛, 2%クエン酸ナトリウム, 0.18N NaOH)で10分間染色した。カーボン蒸着した後、80kVで電子顕微鏡JEOL JEM-1230(日本電子)で観察した。

次に健全トマトへの接種試験を行った。病徴のみられるトマトの葉を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で磨砕し、健全トマト'ルトガス'へカーボランダムによる汁液接種を行った。また、感染トマトを台木として、健全トマト'ルトガス'を穂木として接木による接種を行った。

接木接種および汁液接種による病徴の発現が確認された後、上位葉20gからTRIzol(Invitrogen)を用いてtotal RNAを抽出した。対照区として健全トマトからも同様に抽出を行った。Total RNAを2M LiCl溶液中で4℃2時間静置した後、遠心分離して上清を回収した(Semancik, 1986)。エタノールを加えて35%エタノール濃度に調整し、SV total RNA isolation kit(Promega)のカラムでRNAを精製した。得られたRNAを15%ポリアクリルアミドゲル(PAGE)で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色してウイルスと思われる300~400ntのRNAのバンドをゲルから切り出した。この切り出したゲル片を一晩室温で2×STEバッファー(100mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.2)中で静置し、3000×gで遠心して上清を回収した。この溶液を健全トマト'ルトガス'の展開4枚目の葉にカーボランダムを用いて接種し、14時間日長、20~30℃に維持し、温室で栽培した。接種3週間から4週間後に病徴観察を行った。

接種試験後、病徴を示したトマトの最上位の展開葉を採取して、RT-PCRの材料として用いた。RT-PCRは第1章第1節の方法に従って行った。RT反応およびPCR反応のリバースプライマーとして、3P(5'-CCGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGAGC-3')、PCRのフォワードプライマーとして4P(5'-TCGGATCCCCGGGAAACC TGGAGCG-3')を用いた(Behjatnia et al., 1996)。加えて、RT反応およびPCR反応のリバースプライマーとして、2A(5'-TGTTTCCACCG GTAGTAGC-3')、PCRのフォワードプライマーとして1S(5'-ACTCGTGGTTCTGTGGTTC-3')を用いた(Herold et al., 1992)。3Pと4P、2Aと1SのプライマーセットはTCDVdおよびPSTVdを検出用として設計されている。それぞれのRT-PCRで増幅されるcDNAは360bpおよび260bpである。得られたPCR産物を電気泳動し、ウイルス由来と想定されるバンドを切り取り、

Qigaen QIA quick gel extraction kit (Qiagen) を用いて DNA を回収した. BigDye terminator cycle sequence kit (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行い, DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した.

結果

上位葉の退緑, 黄化, えそを伴う葉巻症状を示すトマトを材料にした電子顕微鏡観察では, ウィルス粒子およびファイトプラズマ様の病原体は観察されなかった. 健全トマトへの接種試験では, 接木試験およびカーボラダムによる汁液接種において, 病徴が再現できた (第5図).

葉巻症状を示す葉の汁液接種によって病徴が再現されたトマト 'ルトガス' の上位葉から得られた total RNA のポリアクリルアミドゲルによる分離によって, 約 350 bp のウイロイド様 RNA が確認できた. 一方, 健全トマ



Fig. 5. Viroid symptoms of a 'Rutgers' tomato plant infected with a TCDVd (Japanese) isolate. An infected tomato plant shows chlorosis of leaves and dwarfing.

トには同様のバンドは観察されなかった. ゲルから切り取ったウイロイド様 RNA を精製し, 健全トマトに接種したところ第5図と同様に上位葉の退緑や黄化, えそを伴う葉巻症状が観察された.

ゲルから分離したウイロイド様 RNA を接種したトマト 'ルトガス' の展開葉を材料にした RT-PCR の結果, プライマーセット 3P と 4P の RT-PCR では約 360 bp, また, 2A と 1S の RT-PCR では約 260 bp のバンドが得られた (第6図). これらのバンドを切り出して, ダイレクトシーケンスを行った結果, カナダで発生した TCDVd (No. AF162131; Singh et al., 1999) の塩基配列と 98 % 一致する全長 359 塩基の TCDVd (No. AB329668) であることが明らかとなった. カナダの系統とは, 165 (T→A), 167 (T→\_), 196 (T→G), 197

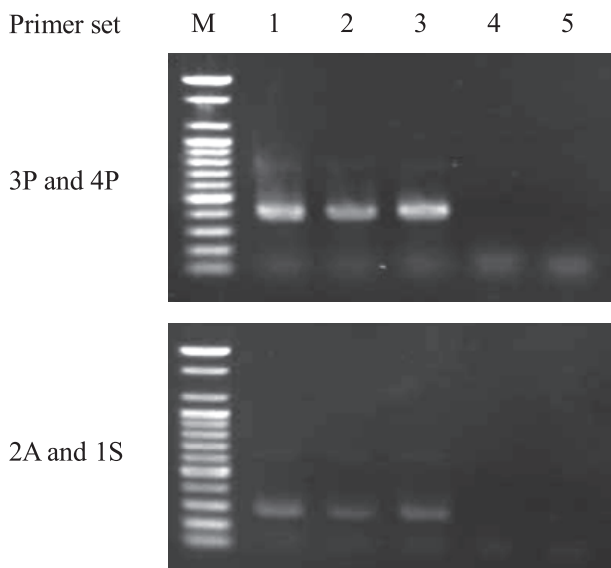
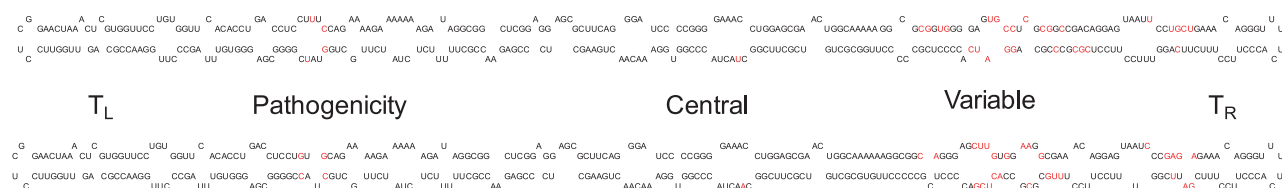


Fig. 6. Reverse transcription and polymerase chain reaction products amplified using two pairs of 3P and 4P primers or 2A and 1S primers. Lane 1: diseased tomato leaves collected from a field at Hiroshima Prefecture, 2: graft-inoculated tomato leaves, 3: mechanically-inoculated tomato leaves, 4: mock-inoculated tomato leaves, 5: distilled water control, M: 100-bp size marker.

(+)PSTVd (EU862231)



(+)TCDVd (AB329668)

Fig. 7. Comparison of complete sequence and proposed secondary structure of PSTVd(EU862231) and TCDVd(AB329668). The five structural domains (Keese and Symons, 1985) are indicated. TL = left-terminal domain, Central = central domain, and TR = right-terminal.

(C→A), 199 (G→T) の 5 塩基が異なっていた (第 7 図)。以上の結果より, TCDVd の日本国内での発生が初めて確認された。

## 第 2 節 発生のみられる *Tomato chlorotic dwarf viroid* の特性

第 1 節の実験結果から日本国内にも TCDVd が発生していることが判明した。TCDVd は 1999 年にカナダで報告されてから, 各国で発生が認められるものの, 本病原体に関する宿主範囲や耐熱性等の物理的な特性に関する情報は少ない。本ウイルスの防除のためにはこれらの情報を得ることが必要不可欠である。

Singh et al. (1999) は, オオセンナリ (*Nicandra physaloides* L. Gaertn.), *Nicotiana debneyi* Domin, *N. glutinosa* L., *N. physaloides* L., *Physalis angulata* L., *Scopolia sinensis* Hemsl., *Solanum demissum* Lindl., トマ

ト (*S. lycopersicum* L.), ジャガイモ (*S. tuberosum* L.) といったナス科植物やバーベナ (*Verbena hybrida*) が TCDVd の宿主であることを報告している (Singh et al., 2006)。しかし, TCDVd の近縁のウイロイドである PSTVd は, ナス科のみならず, ムラサキ科 (Boraginaceae), キキョウ科 (Campanulaceae), ナデシコ科 (Caryophyllaceae), ヒルガオ科 (Convolvulaceae), キク科 (Compositae), マツムシソウ科 (Dipsacaceae), ムクロジ科 (Sapindaceae), ゴマノハグサ科 (Scrophulariaceae), オミナエシ科 (Valerianaceae) が宿主となっていることから (Singh et al., 2003a), 塩基配列が比較的似ている TCDVd においても幅広い植物種が宿主植物となっている可能性があり, それらが無病徴感染植物として TCDVd の供給源になっている危険性が考えられる。そこで本節は本病原体に関する宿主範囲や物理的特性に関する調査を PSTVd との比較のもとに行った。

Table 4. Host range of TCDVd.

Plant species	Infection	Plant species	Infection
<b>Aizoaceae</b>		<b>Pedaliaceae</b>	
<i>Tetragonia tetragonoides</i>	-	<i>Sesamum indicum</i>	-
<b>Amaranthaceae</b>		<b>Scrophulariaceae</b>	
<i>Gomphrena globosa</i>	- <sup>Z</sup>	<i>Antirrhium majus</i>	-
<b>Apocynaceae</b>		<b>Solanaceae</b>	
<i>Catharanthus roseus</i>	-	<i>Capsicum annuum</i>	+
<i>Vinca major</i>	+ <sup>Y</sup>	<i>Datura metel</i>	- <sup>Z</sup>
<b>Brassicaceae</b>		<i>D. stramonium</i>	+
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-	<i>Nicandra physaloides</i>	+ <sup>Z</sup>
<i>B. rapa</i> var. <i>peruviridis</i>	-	<i>Nicotiana benthamiana</i>	+
<b>Chenopodiaceae</b>		<i>N. clevelandii</i>	+
<i>Spinacia oleracea</i>	-	<i>N. debneyi</i>	+ <sup>Z</sup>
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	<i>N. glutinosa</i>	+
<i>C. quinoa</i>	-	<i>N. occidentalis</i>	+
<b>Compositae</b>		<i>N. physaloides</i>	+ <sup>Z</sup>
<i>Ageratum houstonianum</i>	-	<i>N. rustica</i>	+
<i>Arctium lappa</i>	-	<i>N. tabacum</i> 'Samsun'	+
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	+	<i>N. tabacum</i> 'Xanthi'	+
<i>C. morifolium</i>	-	<i>Physalis angulata</i>	+ <sup>Z</sup>
<i>Helianthus annuus</i>	-	<i>P. floridana</i>	+
<i>Lactuca sativa</i>	-	<i>Petunia hybrida</i>	+
<i>Leucanthemum paludosum</i> 'North Pole'	+	<i>Scopolia sinensis</i>	+ <sup>Z</sup>
<b>Cucurbitaceae</b>		<i>Solanum carolinense</i>	+
<i>Cucumis melo</i>	-	<i>S. demissum</i>	+ <sup>Z</sup>
<i>C. sativus</i>	-	<i>S. lycopersicum</i>	+ <sup>Z</sup>
<b>Fabaceae</b>		<i>S. melongena</i>	+
<i>Crotalaria juncea</i>	-	<i>S. mammosum</i>	+
<i>Vigna unguiculata</i>	-	<i>S. nigrum</i>	+
<b>Gentianaceae</b>		<i>S. tuberosum</i>	+ <sup>Z</sup>
<i>Eustoma grandiflorum</i>	-	<b>Verbenaceae</b>	
		<i>Verbena hybrida</i>	+ <sup>X</sup>

<sup>Z</sup>Data from Singh et al. (1999). <sup>Y</sup>Data from Singh and Dilworth (2009). <sup>X</sup>Singh et al. (2006).



**Table 5.** Symptoms and detection of tomato cultivars inoculated with TCDVd.

Cultivar	Symptoms	Detected by RT-PCR
Rutgers	Plants stunted with severe systemic leaf chlorosis and malformation	+
Momotaro	Plants stunted with systemic leaf chlorosis and malformation	+
House Momotaro	Plants stunted with systemic leaf chlorosis and malformation	+
Fukuju No. 2	Plants stunted with systemic leaf chlorosis and malformation	+
Redall	Plants stunted with systemic leaf chlorosis and malformation	+
Ponderosa	Interveinal leaf chlorosis and yellowing of axillary bud	+
Micro-Tom	Systemic leaf chlorosis and malformation	+

## 材料および方法

### 1) *Tomato chlorotic dwarf viroid* の宿主範囲

TCDVd の宿主範囲を調査するために、本ウイロイドに感染したトマト‘ルトガス’の葉 0.1 g を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨碎し、各種植物にカーボランダムで汁液接種した。接種後は 14 時間日長、20 ~ 30°C に維持し、温室で栽培した。その後、接種植物における病徴の発症経過を観察した。接種植物種は 12 科 30 種 (キョウチクトウ科, アブラナ科, ツルナ科, ヒユ科, アカザ科, キク科, ウリ科, マメ科, リンドウ科, ゴマ科, ナス科, クマツヅラ科) を用いた (第 4 表)。また、トマトの品種間における TCDVd の感受性の差を調査するために、‘ルトガス’, ‘桃太郎’, ‘ハウス桃太郎’, ‘福寿 2 号’, ‘レッドオール’, ‘ポンテローザ’, ‘マイクロトム’を用いた。

各接種植物の感染の有無を確認するために、接種 2 か月後に上位葉を採取し、RT-PCR のサンプルおよびトマト‘ルトガス’への戻し接種の接種源とした。戻し接種の方法は、採取した上位葉を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨碎してトマト‘ルトガス’にカーボランダムで接種した。

TCDVd の RT-PCR 検定は第 2 章第 1 節の方法に従い、3P と 4P のプライマーセットを用いて行った。

### 2) *Tomato chlorotic dwarf viroid* の物理的特性

ウイロイドの物理的性質に関する情報は、ウイロイドに感染した植物体や付着した資材等の処理など実際の農業現場におけるウイロイド病対策の立案に欠かせない。そこで、TCDVd についてもその感染性を失活させるために必要な物理的条件を調査した。

本実験では、TCDVd に感染したトマト葉 0.1g を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨碎して作製した磨碎液に各処理を施し、その汁液を健全トマト‘ルトガス’に接種して病徴観察と RT-PCR による検定で評価した。

TCDVd の RT-PCR 検定は第 2 章第 1 節の方法に従い、3P と 4P のプライマーセットを用いて行った。

まず TCDVd の耐熱性を調査するために、感染磨碎液を 100°C で各 10, 20, 30, 40 分間煮沸処理し、その処理液を健全トマトに接種して感染性を検定した。また、TCDVd 希釈液を用いて感染限界を調べるため、トマト葉 0.1 g から作製した感染磨碎液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 10 倍から 10<sup>7</sup> 倍まで段階的に希釈し、それら希釈液を健全トマトに接種した。

次に、保存性を調査するために、感染磨碎液を室温に静置して、静置 0 日後から 4 日後までの磨碎液を健全トマトに接種した。耐乾燥性については、感染磨碎液を 1.5mL チューブに入れて、-75°C で真空凍結乾燥させた後室温で保存し、乾燥状態で 50 日間保存することで評価した。

## 結果

### 1) *Tomato chlorotic dwarf viroid* の宿主範囲

TCDVd はほとんどのナス科と一部のキク科において、接種葉より上位の葉で感染が確認されたことから、全身感染していることが判明した。その他の接種植物では非感染であった (第 4 表)。ナス科では、*Datura metel* L. を除くすべての接種植物で感染したが、感染植物ではトマトと *Nicotiana glutinosa* L. のみで発症し、その他は無病徴感染であった。感染した *N. glutinosa* L. では花色の退色が観察された。また、キク科ではシュンギク (*C. coronarium* L.) と ノースポール (*Leucanthemum paludosum* (Poir) Pomel) で感染が確認されたが、無病徴であった。

一方、TCDVd を接種したトマト各品種は、接種 3 ~ 4 週間後にはすべて上位葉の退緑、黄化、葉巻症状を呈し萎縮したが、‘マイクロトム’では上位葉の退緑、黄化は認められたものの、植物全体の萎縮症状は確認できなかった (第 5 表)。

2) *Tomato chlorotic dwarf viroid* の物理的特性

## 耐熱性

TCDVd の耐熱性試験の結果、TCDVd 磨砕液は 100℃ で 10 ~ 30 分煮沸処理してもその感染性を有しており、本ウイロイドの感染性を失活させるためには 100℃ で 40 分間以上の処理が必要であることが分かった (第 6 表)。

## 耐希釈性

TCDVd の希釈限界を調査した結果、葉 0.1 g の磨砕液を 10<sup>5</sup> 倍に極めた薄い磨砕液でも TCDVd の感染性が認められ、10<sup>6</sup> 以上に希釈した場合にのみ感染性が消失した (第 7 表)。

## 保存性

TCDVd は室温で 3 日以上放置することで感染性は失われた (第 8 表)。

## 耐乾燥性

感染磨砕液を -75℃ で真空凍結乾燥させてから室温で保存した結果、少なくとも室温保存 50 日まで感染性を示した (第 9 表)。さらに、感染葉を乾燥せずに -75℃ で凍結保存した試料でも、少なくとも 50 日までは感染性を維持していた (データ省略)。

Table 6. Infectivity of crude sap at 100 °C incubation.

Duration at 100 °C <sup>Z</sup> (min.)	Test plants infected <sup>Y</sup>
0	9/9
10	4/9
20	1/9
30	1/9
40	0/9

<sup>Z</sup>Preparations were heated at 100 °C for the given time.

<sup>Y</sup>Number of test plants infected with TCDVd / total number of plants.

Table 7. Infectivity of diluted crude sap.

Dilution of inoculum <sup>Z</sup>	Test plants infected <sup>Y</sup>
10 <sup>-1</sup>	8/8
10 <sup>-2</sup>	7/8
10 <sup>-3</sup>	5/8
10 <sup>-4</sup>	5/8
10 <sup>-5</sup>	2/8
10 <sup>-6</sup>	0/8
10 <sup>-7</sup>	0/8

<sup>Z</sup>Preparations were diluted with phosphate buffer (pH 7.0).

<sup>Y</sup>Number of test plants infected with TCDVd / total number of plants.

## 第 3 節 考察

2006 年に広島県の施設栽培トマトにおいて発生したトマトの上位葉の退緑、黄化、えそを伴う葉巻症状の病原体の同定のために、発病植物から抽出したウイロイド様 RNA の接種試験および RT-PCR 増幅産物の塩基配列の解析を行った。結果、その病原体は TCDVd であることが判明した。これより、日本で初めて TCDVd の発生が確認された。海外ではカナダでトマト (No. AF162131; Singh et al., 1999), アメリカでトマト (No. AY372399; Verhoeven et al., 2004), インドでパーベナ (No. DQ846883; Singh et al., 2006), アメリカでペチュニア (No. DQ859013; Verhoeven et al., 2007), イギリスでペチュニア (No. EF582392; James et al., 2008) から TCDVd が検出されている (第 10 表)。カナダとアメリカのトマトから検出された TCDVd の全長は 360 塩基であり、広島県のトマト、アメリカとイギリスのペチュニアから検出された TCDVd の全長は 359 塩基であった。

Hosokawa et al. (2005) によって開発された direct RT-PCR 法は、注射針をサンプル葉に刺して付着した植物組織を逆転写反応の試料とする方法で、サンプル葉か

Table 8. Infectivity of crude sap stored at room temperature.

Storage period <sup>Z</sup> (days)	Test plants infected <sup>Y</sup>
0	8/8
1	3/8
2	1/8
3	0/8
4	0/8

<sup>Z</sup>Preparations were maintained at room temperature for the given days.

<sup>Y</sup>Number of test plants infected with TCDVd / total number of plants.

Table 9. Infectivity of dried crude stored at room temperature.

Storage period <sup>Z</sup> (days)	Test plants infected <sup>Y</sup>
0	3/3
1	2/3
3	1/3
5	2/3
10	0/3
20	3/3
30	3/3
40	3/3
50	3/3

<sup>Z</sup>Preparations were maintained dry at room temperature for the given days.

<sup>Y</sup>Number of test plants infected with TCDVd / total number of plants.

らの RNA 抽出を簡略化した有用な検出技術であり、CSVd や CChMVd の検出に用いることができる。TCDVd の病徴を示したトマトから採取した葉を用いた RT-PCR には Hosokawa et al. (2005) の方法に従って direct RT-PCR 法で TCDVd の検出を行った。その結果、プライマーセット 3P と 4P の RT-PCR では約 360 bp、また、2A と 1S の RT-PCR では約 260 bp のバンドが得られた (第 6 図)。これは Singh et al. (1999) が行った RT-PCR の結果と一致する。また、PCR 産物の塩基配列の解析から、産物は TCDVd の PCR の増幅産物であることが示された。以上より、プライマーセット 3P と 4P および 2A と 1S を用いた direct RT-PCR 法によってトマトから TCDVd を検出することが可能であることが示された。さらに TCDVd の宿主植物の検定においても本法を用いて RT-PCR を行った結果、第 4 表に示す感染植物種からも TCDVd を検出することができたことから、TCDVd の感染植物の検定に direct RT-PCR 法を利用することが可能であることが示された。

TCDVd の検出に用いたプライマーセット 3P と 4P、2A と 1S は TCDVd と PSTVd の両方を検出するプライマーセットであり、これらを用いて PCR 産物を電気泳動した際のバンドの大きさは両ウイロイドともほぼ同じである (Singh et al., 1999)。したがって、これらのプライマーセットを用いた RT-PCR による検定では TCDVd と PSTVd を区別することはできないため、厳密には塩基配列の解析を行う必要がある (Verhoeven et al., 2010)。本章の広島県のトマトでみられたウイロイドは塩基配列の解析の結果、カナダで発生した TCDVd の塩基配列 (No. AF162131) と 98 % 一致することから、TCDVd であると判断される。Verhoeven et al. (2004) は、オランダ国内未発生のポスピウイロイドを検出する

ために、CLVd を除くすべてのポスピウイロイドを検出する共通プライマーセット (Pospi1-FW: 5'-GGGATCCCCGGGGAAAC-3' / Pospi-RE: 5'-AGCTTCAGTTGTWTCCACCGGGT-3') を用いた RT-PCR 法を実施し、その後の産物の塩基配列を解析することでウイロイド種を特定している。

TCDVd の宿主範囲を調査した結果、ほとんどのナス科と一部のキク科で全身感染することが判明した (第 4 表)。過去の報告では上記の宿主植物以外に、クマツヅラ科のバーベナやキョウチクトウ科のヒメツルニチニチソウ (*Vinca minor* L.) が TCDVd の宿主植物であると報告されている (Singh et al., 2006; Singh and Dilworth, 2009)。過去の報告も含めて感染植物の中で、病徴を示したものはトマトと *Nicotiana glutinosa* のみであり、その他の感染植物は無病徴であった (第 4 表)。TCDVd はアメリカ (2007)、イギリス (2008)、フィンランド (2009)、チェコ (2008) においてペチュニアから、インド (2006) ではバーベナから、オランダ (2010) では *Brugmansia sanguinea* から検出されており (第 10 表)、それら植物では何れも無病徴感染である。Verhoeven and Roenhorst (2010) および Verhoeven et al. (2004, 2010) は TCDVd を含むポスピウイロイドの感染源は無病徴感染のナス科植物である可能性が高いことを示唆している。本節の試験では感染した宿主植物からトマトへの戻し接種が可能であったことから、TCDVd の感染経路の 1 つとして、これらの宿主植物に感染した TCDVd が栽培トマトへ感染する可能性が考えられた。同様に TCDVd と近縁種の PSTVd においても、PSTVd の無病徴感染植物である *Solanum jasminoides* からトマトへ容易に感染させることが可能であったことから、無病徴感染植物からのトマトへの伝染の可能性が示

Table 10. Reports of outbreaks of TCDVd in 1999-2010.

Year	Country	Host	Length	Accession number in DDBJ	Reference
1999	Canada	<i>Solanum lycopersicum</i>	360	AF162131	Singh et al. (1999)
2004	USA	<i>S. lycopersicum</i>	360	AY372399	Verhoeven et al. (2004)
2006	India	<i>Verbena hybrida</i>	partial sequence	DQ846883	Singh et al. (2006)
2007	USA	<i>Petunia hybrida</i>	359	DQ859013	Verhoeven et al. (2007)
2008	Japan	<i>S. lycopersicum</i>	359	AB329668	This study
2008	UK	<i>Petunia hybrida</i>	359	EF582392	James et al. (2008)
			359	EF582393	
2009	USA	<i>Vinca minor</i>	360	EU625577	Singh and Dilworth (2009)
2009	Finland	<i>Petunia hybrida</i>	-	-	-
2009	Czech Republic	<i>Petunia hybrida</i>	-	-	-
2009	USA	<i>S. lycopersicum</i>	360	FJ822878	Ling and Zhang (2009)
2009	Mexico	<i>S. lycopersicum</i>	-	GQ131572	Ling et al. (2009)
2010	Netherlands	<i>Brugmansia sanguinea</i>	356	EF626530	Verhoeven et al. (2010)
2010	France	<i>S. lycopersicum</i>	360	EU729744	Candresse et al. (2010)

唆されている (Verhoeven and Roenhorst, 2010). 一方、フランスで発生した TCDVd の調査では、発病したトマトと同じ起源の種子の検定を行ったところ、TCDVd が低率ではあるが検出され、それは発病トマトの TCDVd の塩基配列と一致していた (Candress et al., 2010). そのことから種子伝染により TCDVd が発生した可能性があるとされている. 以上より、無病徴の感染植物および感染種子の国際的な流通が、防疫所等の検疫から漏れ、TCDVd の世界的な広域拡散の原因になっている可能性が考えられる.

TCDVd の宿主範囲は近縁種の PSTVd と類似しており、どちらもほとんどのナス科植物に感染性を示した. ただし、PSTVd はセンニチコウ (*Gomphrena globosa* L.) に感染するが (Singh et al., 2003b), TCDVd は感染しなかった (第 4 表). 両ウイルスの塩基配列の相同性は 85 ~ 89 % あり、互いに異なる塩基はほとんど病原性領域 (P), 可変領域 (V), 右末端領域 (TR) に集中している (第 7 図). これらの塩基配列の差が宿主範囲の違いにも影響を与えていると考えられる. また、系統樹では PSTVd と TCDVd, TPMVd と MPVd がそれぞれ近縁であることが示されているが (第 4 図), PSTVd や TPMVd (Singh et al., 2003b) はセンニチコウに感染するが、TCDVd や MPVd (Martinez-Soriano et al., 1996) は感染しない. TCDVd や MPVd の塩基配列を比較すると、全塩基配列では相同性は 80 % しかないが、右末端領域 (TR) の塩基配列では相同性は 93 % もある (Singh et al., 2003b). それに対して、TCDVd と PSTVd の右末端領域を比較すると、80% の相同性しかない (第 7 図). 右末端領域の塩基配列は、TCDVd や PSTVd のセンニチコウにおける感染性に関与しているかもしれない.

本節の実験では TCDVd は *N. tabacum* に全身感染することが確認できたが、Singh et al. (1999) の実験では *N. tabacum* には感染しなかった. 本節で用いた TCDVd (No. AB329668) は Singh et al. (1999) が用いた

TCDVd (No. AF162131) の塩基配列とは 165 (T→A), 167 (T→\_), 196 (T→G), 197 (C→A), 199 (G→T) の 5 塩基が異なっており、これらはすべて右末端領域に位置していた (第 11 表). *N. tabacum* に感染するためにはこの領域の特定の塩基が重要であると考えられる. 一方、これまでに全塩基配列が報告されている TCDVd は 11 の変異体があり、そのうち 6 変異体はトマトから検出されている (第 11 表). さらに、ペチュニア、ツルニチニチソウ、*Brugmansia sanguinea* から検出された TCDVd は、接種試験でトマトに感染することが確認されている (James et al., 2008; Singh and Dilworth, 2009; Verhoeven and Roenhorst, 2010; Verhoeven et al., 2007). したがって、これら 11 変異体はすべてトマトに感染することがわかる. 第 11 表の変異はトマトにおける TCDVd の感染能には影響しない範囲の変異であると考えられ、それに対して、*N. tabacum* への感染には大きな影響を及ぼすと考えられる.

トマトの品種間における TCDVd の感受性の差を調査するために、‘ルトガス’、‘桃太郎’、‘ハウス桃太郎’、‘福寿 2 号’、‘レッドオール’、‘ポンテローザ’、‘マイクロトム’に TCDVd を接種した結果、すべての品種ですべて上位葉の退緑、黄化、葉巻症状を呈した (第 5 表). 過去に行われた接種試験においても、‘Sheyenne’や‘Trust’は上記と同様の症状を呈した (Singh et al., 1999). これら商業品種のトマトには TCDVd に対する抵抗性はないと考えられる. PSTVd に対しては‘ルトガス’をはじめ、多数の品種が病徴を示すことが知られているが (Mahfouze et al., 2009), ‘Goldkugel’は感染しても病徴を示さない (Stark-Lorenzen et al., 1997). しかし、トマトにおける PSTVd の病徴は PSTVd の塩基配列のわずかな違いによって異なることが知られていることから (Gross et al., 1981), 接種する PSTVd の系統によっては、たとえ同一品種であっても、その病徴は異なると考えられる. 残念ながら Stark-Lorenzen et al. (1997) や Mahfouze et al. (2009) が接種試験で

**Table 11.** Comparison of nucleotide sequence of TCDVd.

Accession number in DDBJ	Hosts	Position of mutation <sup>2</sup>																								Reference
		28	45	60	63	92	157	158	160	161	165	167	177	184	196	197	198	199	202	203	257	308	346			
AF162131	<i>Solanum lycopersicum</i>	U	U	-	U	C	U	A	U	C	U	U	G	C	U	C	U	G	G	U	A	-	A	Singh et al. (1999)		
AY372399	<i>S. lycopersicum</i>	U	U	-	U	C	U	A	U	C	U	U	G	C	U	C	U	G	G	U	A	-	A	Verhoeven et al. (2004)		
EU729744	<i>S. lycopersicum</i>	U	U	-	U	C	U	A	U	C	U	U	G	C	U	C	U	G	G	U	U	-	A	Candress et al. (2010)		
AB329668	<i>S. lycopersicum</i>	U	U	-	U	C	U	A	U	C	A	-	G	C	G	A	U	U	G	U	A	-	A	This study		
FJ822878	<i>S. lycopersicum</i>	U	A	+A	U	C	U	A	G	C	C	-	G	C	G	A	C	G	G	C	U	+U	A	Ling and Zhang (2009)		
GQ131572	<i>S. lycopersicum</i>	U	A	+A	U	C	U	A	G	C	C	-	G	C	G	A	C	G	G	C	U	+U	A	Ling et al. (2009)		
DQ859013	<i>Petunia hybrida</i>	U	U	-	U	U	U	A	U	C	A	-	G	C	G	A	U	U	G	U	A	-	A	Verhoeven et al. (2007)		
EF582392	<i>Petunia hybrida</i>	A	U	-	U	C	U	A	U	C	A	-	G	C	G	A	U	U	G	U	A	-	A	James et al. (2008)		
EF582393	<i>Petunia hybrida</i>	U	U	-	U	C	U	A	U	C	A	-	G	C	G	A	U	U	G	U	A	-	A	James et al. (2008)		
EU625577	<i>Vinca major</i>	U	U	-	U	C	G	U	U	C	U	U	G	C	U	C	U	G	G	U	A	-	G	Singh and Dilworth (2009)		
EF626530	<i>Brugmansia sanguinea</i>	U	U	-	-	C	U	A	U	-	C	C	A	U	U	C	-	G	-	U	A	-	A	Verhoeven et al. (2010)		

<sup>2</sup>Position number is based on the sequence of AF16131. Terminal right (TR) domain is located in shadowed areas.



用いた PSTVd の塩基配列は不明である。一方、TCDVd の塩基配列の違いによって生じる病徴の差についての報告はほとんどないが、Singh et al. (2010) はジャガイモに感染させて変異した TCDVd をトマトに接種すると、そのトマトはカナダの TCDVd (No. AF162131) よりも激しく萎縮することを示している。変異した TCDVd の塩基配列とカナダの TCDVd の配列を比較すると右末端領域の 7 塩基が異なっていた。これまでに TCDVd に感染して無病徴であるトマトの品種は知られていないが、TCDVd の変異体と品種の組み合わせ次第では、感染しても無病徴である品種が存在するかもしれない。仮にそのような事例があれば、その無病徴感染トマトが栽培温室での感染源となることが懸念される。

TCDVd の耐熱性試験の結果、TCDVd 磨砕液は 100°C で 10 ~ 30 分煮沸処理してもその感染性を有していた (第 6 表)。TCDVd に限らず多くのウイロイドは乾燥状態では非常に安定している。例えば、高温に対しては HSVd は 84°C 以下で耐熱性があることが報告されている (佐々木・四方, 1978)。次に、TCDVd の希釈限界を調査した結果、 $10^5$  倍の極めて薄い磨砕液でも TCDVd の感染性が認められた (第 7 表)。TCDVd は高い耐熱性や耐希釈性を有していることが明らかになった。

TCDVd に感染した葉を磨砕した液を室温で 1 ~ 2 日程度放置することで、TCDVd の感染性は失われた (第 8 表)。しかし、感染磨砕液を -75°C で真空凍結乾燥させ室温で保存した結果、少なくとも室温保存 50 日まで感染性を示した (第 9 表)。以上の結果は、磨砕液の状態では植物組織液中の RNase 等のリボ核酸分解酵素の影響でウイロイドの感染性が短期間で失われるが、乾燥状態ではこれらの酵素等の影響が及ばないために感染性が保たれるのであろうと考えられた。以上のように TCDVd が乾燥状態で非常に安定していることから、TCDVd が種子表面に付着して発芽時に感染する危険性が考えられる。

このように耐熱性が高く乾燥しても感染性を示すことから、植物の乾燥残渣やウイロイド感染植物汁液などが付着した資材や手袋、ハサミ等はその取り扱いに十分な注意が必要であることが示唆される。そこで、圃場での管理作業を想定し、ハサミ等の栽培管理器具に付着した TCDVd の感染性の持続期間を調査したところ、少なくとも 1 週間室温に放置した器具でも感染性を示した (データ省略)。PSTVd (Manzer and Merriam, 1961) や CEVd (Barbosa et al., 2005) においても、汚染され

た刃物やその他の器具によって健全植物へ容易に伝染することが知られている。本実験の結果は、TCDVd についても管理器具による接触で容易に伝染拡大することが明らかとなった。このことは、TCDVd の感染経路の 1 つとしての、トマト以外の無病徴感染植物からトマトへの農作業による伝染の可能性を支持するものである。また、広島県での TCDVd の発生状況として、栽培管理作業の方向と一致しながら時間経過とともに徐々に感染拡大していったことは、本研究で得られたデータから、管理器具を介した感染であることを強く疑わせる TCDVd の物理的特性に起因していると考えられる。

TCDVd に汚染された刃物やその他の器具から容易に伝染することから、有効な消毒方法が必要である。また、TCDVd を含むポスピウロイドの感染源は無病徴感染のナス科植物である可能性が高いことから (Verhoeven and Roenhorst, 2010; Verhoeven et al., 2004, 2010)、それらの植物に触れた器具の消毒をすることが重要であると考えられる。これまでに次亜塩素酸ナトリウム (Garnsey and Whidden, 1971; Roistacher et al., 1969; Singh et al., 1989) や第三リン酸ナトリウム (Antignus et al., 2007; Takahashi and Yamaguchi, 1985) がウイロイドの失活に有効であることが知られている。TCDVd の感染磨砕液を付着させ、4 時間室温で乾燥させたカミソリを各薬剤に浸した後、健全トマトに切りつけて感染の有無を調査した結果、3% 次亜塩素酸ナトリウム (pH 11.8) が最も効果的に TCDVd の感染を阻害することができた (Matsuura et al., 2010)。一方で、2.5% または 5% 第三リン酸ナトリウムによる消毒ではそれぞれ 16%、70% の感染率を示し、3% 次亜塩素酸ナトリウムより効果が落ちることが示されている。しかし、3% 次亜塩素酸ナトリウムは高濃度であり、農作業の現場で使用するにあたって危険であることから、Matsuura et al. (2010) は pH 値を変えることで低濃度での効果を調査した。その結果、pH 10.6 の 0.06% 次亜塩素酸ナトリウムの処理区では接種したトマトの感染率が 18.5% であった一方、pH 6.5 の 0.06% 次亜塩素酸ナトリウムの処理区では感染率は 1.9% であり、pH を下げることで感染率を下げることもできた。このような方法で TCDVd に汚染された刃物やその他の器具からの伝染を防ぐことが望ましい。

本章の実験により、2006 年に広島県の施設栽培トマトで発生したトマトの上位葉の退緑、黄化等を示す症状の病原体から RT-PCR によって PSTVd または TCDVd のバンドが検出された。その PCR 産物の塩基配列を解

析した結果、カナダで発生した TCDVd (No. AF162131; Singh et al., 1999) の塩基配列と 98% 一致する全長 359 塩基の TCDVd (No. AB329668) であった。これより、日本で初めて TCDVd の発生が確認された。日本国内での TCDVd の発生は初めてであったことから、TCDVd の防除に必要な情報を得るために、宿主範囲および物理的特性について調べた。TCDVd の宿主範囲を調査したところ、TCDVd はほとんどのナス科と一部のキク科において、全身感染していたが、トマトと *Nicotiana glutinosa* L. のみで発症し、その他は無病徴感染であった。(第4表)。また、TCDVd は高い耐熱性(第6表)や耐希釈性(第7表)を有していた。TCDVd は室温で3日以上放置することで感染性は失われたが(第8表)、感染磨砕液を -75°C で真空凍結乾燥させてから室温で保存した結果、少なくとも室温保存 50 日まで感染性を示すことが明らかとなった(第9表)。さらに、圃場での管理作業を想定し、ハサミ等の栽培管理器具に付着した TCDVd の感染性の持続期間を調査したところ、少なくとも1週間室温に放置した器具でも感染性を示した(データ省略)。本実験の結果は、TCDVd についても管理器具による接触で容易に伝染拡大することを示している。このことは、TCDVd の感染経路の1つとしての、トマト以外の無病徴感染植物からトマトへの農作業による伝染の可能性を支持するものである。

### 第3章 *Chrysanthemum stunt viroid* の変異と感染性

第1章および第2章の実験結果より CSVd や TCDVd の日本国内における発生状況が明らかとなった。特に、第1章第2節では、これまで33件の CSVd の変異体が報告されており、日本では2005・2006年時まで5種類以上の変異体が国内に分布していることが示された。既報の CSVd の変異体の変異幅は小さいが、一方で、PSTVd、CEVd、HSVd は変異の幅は大きく、由来の異なる宿主植物に感染することで新たな変異体が発生することが報告されている(Ito et al., 2010; Fagoaga et al., 1995; Matousek et al., 2007)。既報の CSVd がキク以外の園芸植物に感染した場合、新たな変異体が発生し、感染植物に定着して感染源になる可能性が考えられる。接種植物による変異体の発生を確認するためには特定の塩基配列をもつ CSVd を用いて接種試験を行う必要がある。接種源となる感染植物体内ではすでに変異が生じている状態である可能性があるため、研究手法とし

て汁液接種や接木接種を用いることはできない。そのため、人工合成した cDNA あるいは RNA の系を構築することが必要である。しかし、これまでに CSVd についてそのような実験系は確立されておらず、任意の塩基配列をもつ変異体 CSVd の接種試験を行うことはできない。そこで、本章ではまず CSVd の感染性 cDNA および RNA 系の構築を試み、さらにその系を用いて、各種園芸植物への接種を行うことで、CSVd 変異体の発生と感染性との関係解析を試みた。

#### 第1節 *Chrysanthemum stunt viroid* と同様の感染性単分子 RNA の開発

ウイルス RNA はタンパクをコードしていないことから、ウイルスの塩基配列によって構築される立体構造が宿主植物体内におけるウイルスの複製や移行、病徴発現などに関与していることが示唆される(Ding, 2009)。ポスピウイルス属の塩基配列は二次構造から、5つのドメインに分けられる(Keese and Symons, 1985)。したがって、各ドメイン構造を構成している塩基配列を人為的に変異させることによって、複製や移行、病徴発現などがどのように変化するかを明らかにする研究が可能となる。この変異体作製技術に必須である感染性 cDNA および RNA クローン技術はウイルスの研究では広く用いられてきた方法であり、PSTVd (Cress et al., 1983)、HSVd (Meshi et al., 1984)、CEVd (Visvader et al., 1985) の感染性 cDNA クローンが開発され、実際に植物に接種して感染させることに成功している。また、cDNA クローンから転写された PSTVd (Tabler and Sanger, 1984, 1985) や CEVd (Rakowski and Symons, 1994; Rigden and Rezaian, 1992) の+鎖 RNA を植物体に接種することでも感染させることが可能となった。近年では、PSTVd の変異体を用い、宿主植物内での移行や複製についての実体とその際の RNA の立体構造の解析により、移行および複製に必要な条件が明らかにされつつある(Zhong et al., 2007)。しかし、CSVd の感染性 cDNA クローン技術はこれまでに報告されておらず、それから転写された CSVd RNA の感染性に関する研究もない。そのため、CSVd の複製や移行、病徴発現などに関する研究報告はほとんどない。そこで、本章では感染性や複製能をもつ、転写された CSVd RNA の合成系を構築することを目指した。

## 材料および方法

### 1) CSVdに感染したキクからの CSVd RNA の単離と塩基配列の決定

CSVdに感染したキク (*C. morifolium* Ramat.) ‘セイエルザ’ と CSVd 非感染のキク ‘セイエルザ’ の挿し芽苗を温室で14時間日長、20～30℃に維持して栽培した。これらのキクの上位葉20gを液体窒素で凍結してサンプリングした。TRIzol (Invitrogen) を用いて Total RNA を抽出した。得られた RNA を 2M 塩化リチウム中で2時間4℃で静置し、上清を回収して35%エタノール濃度になるようエタノールを加え、SV total RNA isolation kit (Promega) のカラムで RNA を精製した。得られた RNA を15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。エチジウムブロマイドで染色して CSVd の RNA のバンドをゲルから切り出した (第8図A)。この切りだしたゲル片を一晩室温で2×STE バッファー (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.2) 中で静置し、3000×g で遠心して上清を回収した。得られた RNA が CSVd であることを確認するために、第1章第1節の方法に従って、RT-PCR 法によって CSVd のバンドを検出した。単離した CSVd の塩基配列を決定するために、RT-PCR 産物を pGEM-T easy vector (Promega) にクローニングし、その挿入配列を M13 プライマーを用いて解析した。得られたベクターを pT7-CSVd として以下の実験に使用した。

### 2) CSVd RNA の *in vitro* 合成

CSVd の +鎖 RNA と -鎖 RNA を別々に合成するために、CSVd の全長配列を持つベクター (pT7-CSVd) を用いて、+鎖と-鎖の全長 CSVd の PCR 産物を得た。PCR 産物の合成にはプライマーセットとして、+鎖用に CSVd-R と CSVd-F、-鎖用に CSVd-mR と CSVd-mF をそれぞれリバースプライマーとフォワードプライマーとして用いた (第12表)。PCR の反応液には、0.5μL のリバースプライマー (20 μM)、0.5μL のフォワードプライマー (20 μM)、10 μL の 5×PrimeSTAR HS buffer (TaKaRa)、0.5 μL の Prime STAR HS DNA polymerase (TaKaRa)、4 μL の dNTPs (各 2.5 mM) の混合溶液を用いて、ここに pT7-CSVd (50 ng/μL) を 1 μL 加えて、DNase free 水で 50 μL に調整したものを用いた。PCR 条件は 98℃ -10 秒、60℃ -5 秒、72℃ -30 秒の 35 サイクルとした。6 μL の PCR 反応液を 1.0 %

アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、目的の大きさである T7 プロモーター配列と CSVd の配列を合計した約 375 bp バンドを UV 光下で確認した。

得られた PCR 産物を鋳型にして、Ampliscribe T7 kit (Epicentre Technologies) を用い 37℃ で RNA の転写を12時間行わせた。転写産物を DNase I で処理し、8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して RNA のバンドを切り取り、上記の方法で精製した。得られた RNA が CSVd であることを確認するために第1章第1節の方法に従って、RT-PCR 法によって CSVd のバンドを検出した。+鎖の RT-PCR には CSVd-r を RT のプライマーとして用いて、PCR には CSVd-f をフォワードプライマーとして用いた (第12表)。-鎖の RT-PCR には CSVd-f を RT のプライマーとして用いて、PCR には CSVd-f をフォワードプライマーとして用いた。

### 3) CSVd 感染試験

CSVd の全長 cDNA をもつプラスミド (pT7-CSV)、CSVd の全長 cDNA PCR 産物、転写 RNA である CSVd (+) RNA および CSVd (-) RNA を植物体に接種して感染の有無を調べた。接種植物として野生ギクであるイソギク (*C. pacificum* Nakai) を用いた。それぞれの植物に 2.5 μg の pT7-CSV、cDNA PCR 産物、CSVd (+) RNA、CSVd (-) RNA を接種した。接種方法は接種源を針の先に付着させ、それを接種植物の茎に刺す方法で行った (第8図A)。ポジティブコントロールとして、CSVd に感染したキクから抽出した total RNA を用い、ネガティブコントロールとして RNase-free 水を用いた。接種植物にはそれぞれの実験区において6個体を用いた。14時間日長20～24℃で栽培した。接種2週間後、接種葉より上位の展開葉100mgを採取して TRIzol (Invitrogen) で total RNA を抽出し、RT-PCR を行った (第8図B)。RT-PCR はシーケンス用プライマーセットとして、CSVd-94-r および CSVd-94-f を用い、第1章第1節の方法に従って行った (第12表)。得られた PCR 産物を pGEM-T easy ベクターにクローニングし、M13 プライマーを用いて BigDye terminator cycle sequence kit (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行わせ、DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した。

### 4) 接木接種試験

転写 CSVd RNA を接種して8週間後のイソギクから







挿し芽を採取し、発根させた上でハウス内に定植した。それを台木にして、CSVd 非感染のキク‘セイエルザ’を穂木にして接木による接種を行った（第9図A）。接木植物を8週間、14時間日長 20～24℃で栽培した。

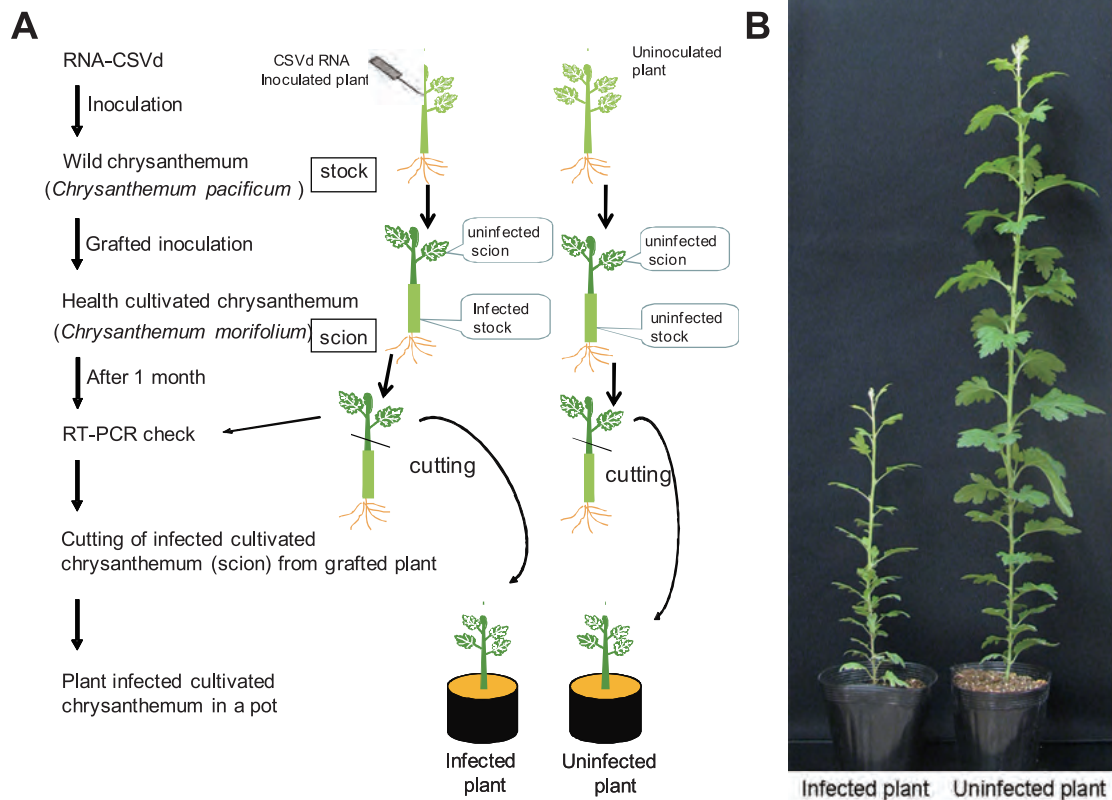
穂木の最上位葉 100 mg を採取して TRIzol (Invitrogen) で total RNA を抽出し、第1章第1節の方法で RT-PCR を行い CSVd の感染を確認した。その

上で、穂木の CSVd のわい化症状を確認するために、穂木から挿し芽を採取し発根させた。同様に对照区として非接種のキク‘セイエルザ’から挿し芽を採取し発根させた。発根した挿し芽をハウス内に定植し、4か月間14時間日長 20～24℃で栽培した。CSVd 接種の‘セイエルザ’と非接種の‘セイエルザ’の草丈を比較した。

**Table 12 .** Oligonucleotide primers used for *in vitro* synthesis of CSVd RNA and RT-PCR<sup>Z</sup>.

Name	Method	Sequence (5'-3')	Target of amplification (position number)
CSVd-R	<i>In vitro</i> transcription (plus strand RNA)	GAGGGAACAAACTAAGTTCCACGGGC	328-1
CSVd-F	<i>In vitro</i> transcription (plus strand RNA)	AGAGTAATACGACTCACTATAGGGACTTACTTGTGGTTCCTGTGG	2-25
CSVd-mR	<i>In vitro</i> transcription (minus strand RNA)	CGGGACTTACTTGTGGTTCCT	1-21
CSV-mF	<i>In vitro</i> transcription (minus strand RNA)	AGAGTAATACGACTCACTATAGGGAAACAAACTAAGGT	337-354
CSVd-r	RT-PCR	AGGATTACTCCTGTCTCGCA	148-167
CSVd-f	RT-PCR	CAACTGAAGCTTCAACGCCTT	269-290
CSVd-94-r	Sequence	GGATCCCTGAAGGACT	88-74
CSVd-94-f	Sequence	CCGGGAAACCTCCAG	90-105

<sup>Z</sup>The T7 RNA polymerase promoter sequence is depicted in bold let ters.



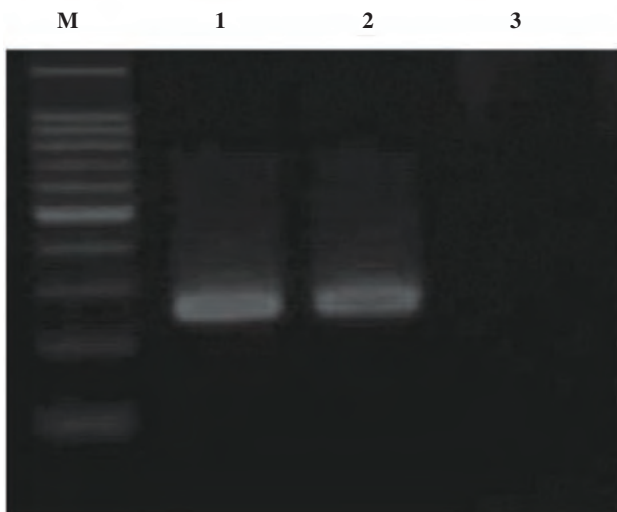
**Fig. 9.** Grafting assay to analyze the ability of linear CSVd RNA to reproduce the disease symptoms in cultivated chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) plants. A: Grafting procedure used in our study, B: Comparison of the heights of infected and uninoculated cultivated chrysanthemum plants, grown for 4 months after re-transplantation and photographed.

## 結 果

### 1) CSVd RNA の単離

CSVd に感染したキク‘セイエルザ’から CSVd を単離するために、感染植物と非感染植物の両方から total RNA を抽出し、非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した結果、400 塩基付近に感染植物のみで観察されるバンドが得られた (第 8 図 A)。このバンドをゲルから分離して精製し、それをテンプレートとして RT-PCR を行ったところ CSVd が検出された (第 10 図)。これより、単離したバンドは CSVd RNA であることが示された。

次に、ポリアクリルアミドゲルより単離した CSVd の全塩基配列を決定するために、CSVd の全長 cDNA をク



**Fig. 10.** Detection of CSVd in RNAs extracted from poly acrylamide gel using RT-PCR. Lane 1: CSVd extracted from an expected RNA band in poly acrylamide gel, Lane 2: CSVd-infected chrysanthemum as a positive control, 3: DNase and RNase-free water, Lane M: 100-bp ladder markers (TaKaRa).

**Table 13.** Ability of CSVd nucleic acids to replicate in *Chrysanthemum pacificum* plants.

Inoculum	Post inoculation (week)	
	4	5
Plasmid	0/6 <sup>Z</sup>	0/6
cDNA	0/6	0/6
(-)RNA transcripts	0/6	0/6
(+)RNA transcripts	3/6	5/6
CSVd RNA	6/6	6/6
mock	0/6	0/6

<sup>Z</sup>Number of test plants infected with CSVd / number of plants inoculated.

ローニングして得られたプラスミド (pT7-CSV) の 5 クローンの配列を解析した結果、Genbank accession no. X16408 の CSVd 系統が得られた (第 8 図 C)。初報の CSVd の配列 (No. V01107; Haseloff and Symons, 1981) と比較すると、第 8 図 C で示したように中央保存領域 (CCR, 78-105f および 255-280) では塩基の変異は見られず、右端領域 (1-44 および 310-354) や病原性領域 (45-70 および 284-309) で変異が多く見られた。

### 2) CSVd RNA の合成と複製能

T7 プロモーター配列をもつ CSVd の全長 DNA を鋳型にして *in vitro* において転写した CSVd (+) RNA および CSVd (-) RNA をイソギクに接種したところ、CSVd (+) RNA 区では、CSVd に感染したキクから抽出した total RNA を接種した区と同様に、接種 4 週間後には半数の個体で CSVd が検出された (第 13 表)。なお、どちらの区においても、接種 3 週間後の時点では感染は確認されなかった。一方、プラスミド pT7-CSV や cDNA PCR 産物、CSVd (-) RNA の接種区では感染は確認されなかった (第 13 表)。以上より、単分子の転写 CSVd (+) RNA は感染性をもち、宿主植物細胞内で複製されることが示された。

### 3) 転写 CSVd (+) RNA の病徴発現

上記の試験により、転写 CSVd (+) RNA はイソギクにおいて複製されることが示されたが、栽培ギクにおいて病徴を示すかどうかは不明である。そこで接木接種試験において、栽培ギクにおける病徴発現を調査した結果、CSVd の典型的な病徴であるわい化病状が確認された (第 9 図 B)。これより、転写 CSVd (+) RNA は自然界の CSVd と同様に、栽培ギクにおいて病徴を発現することが示された。

## 第 2 節 *Chrysanthemum stunt viroid* 相同 RNA の変異と園芸植物への感染性

キク由来の CSVd がキク以外の園芸植物に感染した場合、新規の変異体が発生し、感染植物に定着して感染源になる可能性が考えられる。そこで本節ではキクから分離した変異体と相同の cDNA クローンから転写した CSVd (+) RNA を用いて、いくつかの園芸植物へ接種試験を行い、その感染性を確認した。また、本接種試験によって園芸植物に感染性を示した CSVd の塩基配列の確認を行い、CSVd の塩基配列上の変異発生の有無を確

認した。さらにキク由来の CSVd をキク以外の宿主植物に接種して長期間栽培した場合、宿主特有の変異体が発生し、感染植物に定着して感染源となる可能性を検証した。

## 材料および方法

### 1) 園芸植物への転写 CSVd RNA の接種試験

第3章第1節で作製した、転写 CSVd (+) RNA を用いて、いくつかの園芸植物に接種試験を行った。接種植物にはキク科のイソギク、アゲラタム‘ブルーミング’およびシュンギク (*C. coronarium* L.) ‘大葉しゅんぎく’、ナス科のトマト (*Solanum lycopersicum* L.) ‘ルトガス’を用いた。栄養成長中のイソギクおよびアゲラタム‘ブルーミング’から挿し芽を採取し、発根した挿し芽をハウス内に定植した。最上位の展開葉に 2.5 µg の転写 CSVd (+) RNA を接種した。また、シュンギクおよびトマト‘ルトガス’の種子を播種し、子葉に 2.5 µg の転写 CSVd (+) RNA を接種した。

接種植物を8週間、14時間日長 20～24℃で栽培した。接種4, 6, 8週間後に最上位葉 100 mg を採取して TRIzol (Invitrogen) で total RNA を抽出し、CSVd-94-r および CSVd-94-f を用いて、第1章第1節の方法で RT-PCR を行い、CSVd の感染を確認した。接種8週間後の最上位葉から得た PCR 産物を pGEM-T easy ベクターにクローニングした。クローニングには各2植物体の PCR 産物を用いた。M13 プライマーを用いて BigDye Terminator cycle sequence kit (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行い、DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した。

### 2) 転写 CSVd RNA に感染した園芸植物からの再接種試験

転写 CSVd (+) RNA を接種したアゲラタムおよびトマトの上位葉 0.5 g を接種8週間後に採取して、TRIzol (Invitrogen) を用いて第2章第1節の方法で RNA を抽出した。

再接種する植物にはイソギク、アゲラタム‘ブルーミング’およびトマト (*Solanum lycopersicum* L.) ‘ルトガス’を用いた。接種植物体の準備は上記と同様の方法で行った。

健全トマトと健全イソギクへの再接種試験では、接種源の量として感染トマトからの total RNA 9.6 µg、感染

アゲラタムからの total RNA 2.4 µg を用いた。健全アゲラタムへの再接種試験では、接種源の量を感染トマトからの total RNA 30.2 µg、感染アゲラタムからの total RNA 16.5 µg を用いた。再接種した植物を8週間、14時間日長、20～24℃で栽培した。

接種8週間後に最上位葉 100 mg を採取して TRIzol (Invitrogen) で total RNA を抽出し、上記と同様の方法で CSVd の感染の有無の検定を行った。

### 3) 接木接種試験

CSVd (No. X16408) に感染したキクの汁液をトマト‘ルトガス’に接種して CSVd に感染したトマトを作製した。CSVd に感染したトマトを台木として、穂木に CSVd 非感染ペチュニア (*Petunia hybrida hort.*) および非感染ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) を用いて CSVd の接木接種を行った (第11図, 第12図)。まず転写 CSVd (+) RNA を接種して感染したトマトから挿し芽を採取して発根させ、ハウス内に定植し、これを台木とした。栄養成長中の CSVd 非感染ペチュニアおよび非感染ジャガイモから展開葉2-3枚ついた穂木を採取した。ハウス内で接木した植物体をそれぞれ12週間および16週間、14時間日長、20～24℃で栽培した。穂木の最上位葉 100 mg を採取して TRIzol で total RNA を抽出し、第1章第1節の方法で RT-PCR を行い CSVd の感染を確認した。CSVd の感染を確認した後、穂木をそれぞれ分離して発根させてハウス内に定植し、自然日長下で約1年間、20～30℃で維持し栽培した。再び上位葉 100 mg を採取して TRIzol で total RNA を抽出し、第1章第1節の方法で RT-PCR を行った。得られた PCR 産物を pGEM-T easy ベクターにクローニングした。M13 プライマーを用いて BigDye terminator cycle sequence kit (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行い、DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) で塩基配列を解析した。

## 結果

### 1) 園芸植物への転写 CSVd RNA の接種試験

転写 CSVd (+) RNA を各種園芸植物に接種した結果、接種4週間後にはイソギク、アゲラタム、トマトで感染が確認でき、シュンギクでは接種6週間後に感染が確認できた (第14表)。これより、転写 CSVd (+) RNA はナス科のトマトおよびキク科の広範な園芸植物種においても複製され、その複製効率は宿主植物によって異なる

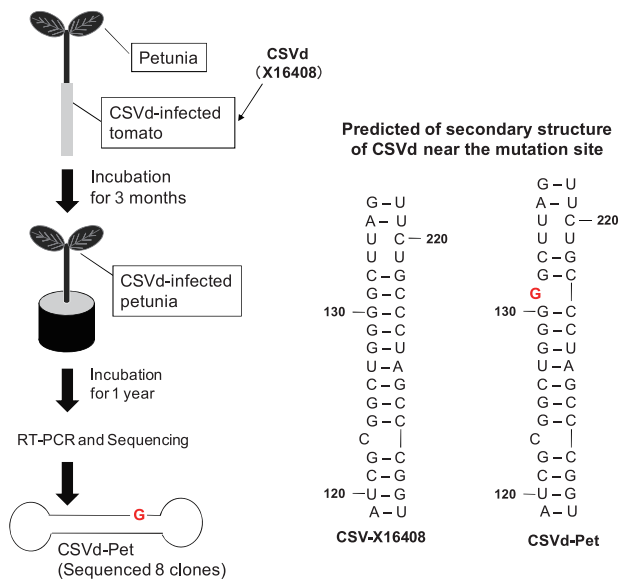
ることが示された。また、CSVdに感染したキクの汁液からアゲラタム (Bouwen and Zaayen, 2004) やトマト (Niblett et al., 1980) への機械接種による感染が確認されており、転写 CSVd (+) RNAは CSVd 感染した植物体の汁液と同じように感染性があることが示された。しかしながら、これらの感染が確認された各接種植物体における病徴は観察されなかった。

次に、これらの接種植物に感染した CSVd の塩基配列を解析するために、園芸植物ごとに接種 8 週間後の葉から RNA サンプルを得て RT-PCR を行い、クローニングをして 5~8 クローンの配列を解析した。その結果、それぞれの感染植物から得られた優占的な配列を第 13 図に示す。アゲラタムおよびシュンギクから得られた CSVd は接種した転写 CSVd (+) RNA の配列 (No. X16408) と完全に同じ配列であった。一方、感染した

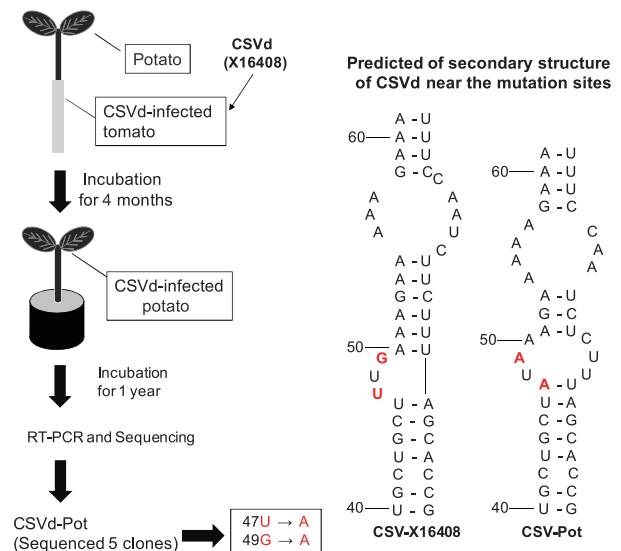
イソギクおよびトマトの CSVd の配列は、塩基配列の置換および欠失、付与が発生していた。トマトの CSVd は中央保存領域 (CCR, 78-105 および 255-280) を含む配列で 1 塩基の変異が生じていた。一方、イソギクの CSVd の CCR には変異は生じていなかった。

## 2) 転写 CSVd RNA に感染した園芸植物からキクへの再接種試験

転写 CSVd (+) RNA を接種したアゲラタムおよびトマトから total RNA を抽出して、それぞれの抽出液を非感染イソギクおよびアゲラタム、トマトへ接種し、8 週間後に RT-PCR によって検定を行った。その結果、イソギクおよびトマトにおいてはすべての接種区において、感染が確認された (第 15 表)。一方、アゲラタムにおいては、感染アゲラタムの total RNA を接種源にした



**Fig. 11.** CSVd-infected tomato plants can transmit the infection to petunia plants. Sap from CSVd-infected chrysanthemum plants (CSVd-X16408) was injected into CSVd-free tomato plants by a needle puncture method. After confirming CSVd infection by RT-PCR analysis, petunia scions were grafted on the tomato stock and allowed to grow for three months. The CSVd infection was confirmed in the petunia by the RT-PCR analysis of the upper leaves of the scions. In order to find a replication of competent CSVd RNA, the infected petunia scions were replanted and allowed to grow for about 1 year. The CSVd specific RNA was amplified, cloned into a vector, and sequenced (eight clones). The G base insertion in the infected CSVd RNA in petunia is indicated by a red letter. Secondary structure of the CSVd RNA fragment near the G base insertion position, generated using an RNA folding program (Mfold; Zuker, 2003).



**Fig. 12.** CSVd-infected tomato plants can transmit the infection to potato plants. Sap from CSVd-infected chrysanthemum plants (CSVd-X16408) was injected into CSVd-free tomato plants by a needle puncture method. After confirming CSVd infection by RT-PCR analysis, potato scions were grafted on the tomato stock and allowed to grow for four months. In order to find a replication of competent CSVd RNA, the CSVd infection was confirmed in the potato scions by RT-PCR analysis. The scions from infected potato plants were replanted and allowed to grow for about 1 year. The CSVd specific RNA was amplified, cloned into a vector, and sequenced (five clones). Base substitutions in the infected CSVd RNA in potato are indicated by red letters. Secondary structure of the CSVd RNA fragment near the G base insertion position, generated using an RNA folding program (Mfold; Zuker, 2003).



区では感染が確認されたが、感染トマトの total RNA を接種源にした区では感染は確認されなかった。

3) 接木接種による CSVd の変異の発生

CSVd に感染したトマトを台木とし非感染のペチュニアおよびジャガイモを穂木とした。穂木の上位葉から total RNA を抽出し、RT-PCR によって得られた産物のクローニングを行った。塩基配列の解析では、それぞれ 8 クローンおよび 5 クローンのプラスミドを解析した。

その結果、ペチュニアから得られた CSVd の配列（以下、CSVd-Pet と略）には 130 番目と 131 番目の間の塩基にグアニン (G) が挿入されており（第 11 図）、一方ジャガイモから得られた配列（以下、CSVd-Pot と略）では 47 番目の塩基がウラシル (U) からアデニン (A) に置換され、49 番目の塩基はグアニン (G) からアデニン (A) に置換されていた（第 12 図）。

CSVd-Pet および CSVd-Pot の配列の二次構造を Mfold (Zuker, 2003) で解析した結果、第 11 図 およ

Table 14 . Ability of linear CSVd (+) RNA to replicate in horticultural plants.

Family	Inoculated plants	Inoculum	Infectivity <sup>Z</sup>		
			Post inoculation (week)		
			4	6	8
Asteraceae	<i>Chrysanthemum pacificum</i>	(+)RNA	3/6	5/6	5/6
		mock	0/6	0/6	0/6
	<i>Ageratum houstonianum</i>	(+)RNA	7/10	9/10	9/10
		mock	0/3	0/3	0/3
	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	(+)RNA	0/8	4/8	7/8
		mock	0/3	0/3	0/3
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	(+)RNA	6/10	8/10	8/10
		mock	0/4	0/4	0/4

<sup>Z</sup>Number of CSVd replication plants/number of plants inoculated.

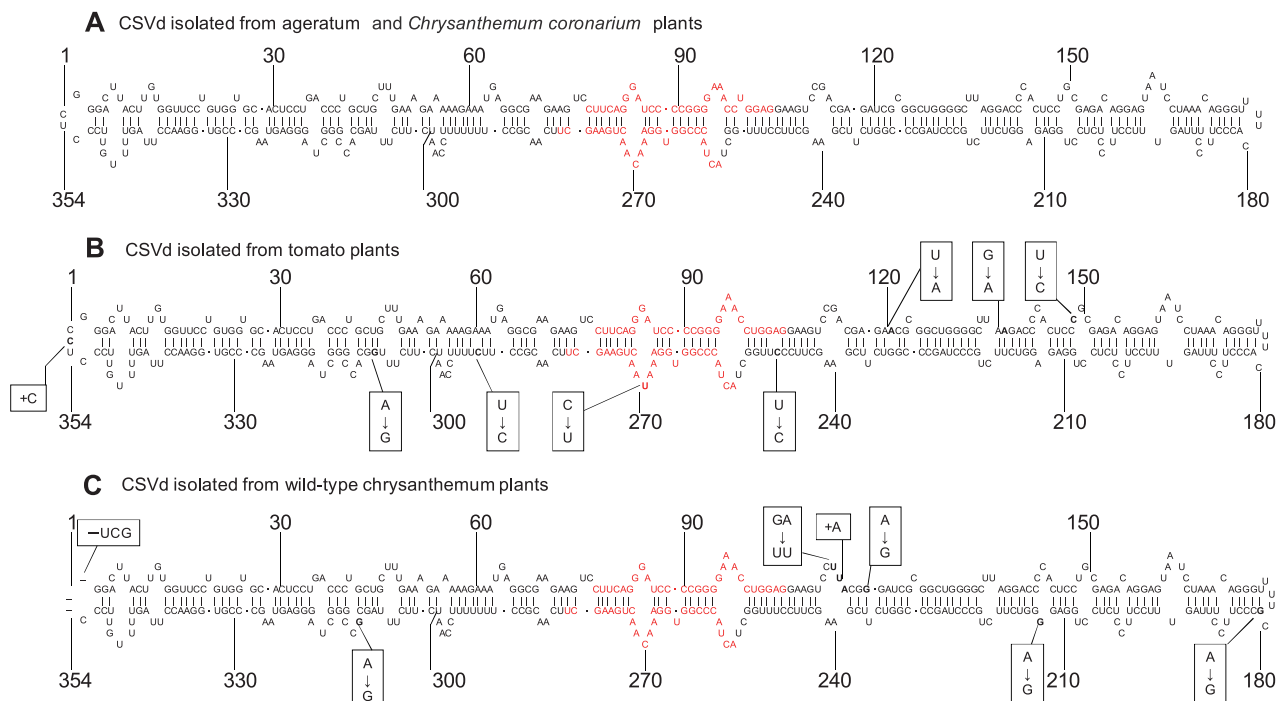


Fig. 13. CSVd RNA sequence and predicted secondary structures. The transcribed RNA was used to infect the ageratum, tomato, and wild-type chrysanthemum (*Chrysanthemum pacificum*) plants. After confirming the presence of CSVd RNA in the infected plants (p.i. 8 weeks), total RNA was isolated from these plants. The RNA was subjected to RT-PCR, followed by cloning and sequencing of the entire CSVd region. Approximately 8 clones were sequenced from each plant, and the predominant CSVd sequences in the infected plants, ageratum (A), tomato (B), and wild-type chrysanthemum (C), are shown. Solid and red nucleotides are the substituted nucleotides and the central conserved region (CCR, 78-105, 255-280), respectively.

び第 12 図 で示したように、接種源の配列 (No. X16408) の二次構造とは異なる構造が得られた。さらに、第 3 章第 1 節で用いた方法で CSVd-Pet の配列をもつ転写 RNA を作製し、健全パチュニアに接種したところ、感染することが確認された (データ省略)。

### 第 3 節 考察

これまで、感染性をもつ転写 CSVd RNA に関する報告はなかったが、本研究により単分子の転写 CSVd (+) RNA は感染性をもち、イソギク植物体において複製されることが示された (第 13 表)。以前、CSVd に感染したキクから単離された CSVd RNA は、キク科のギヌラ (*Gynura aurantiaca* (Blume) DC.) において感染性があることが確認されている (Palukalitis and Symons, 1980)。しかし、彼らが単離した CSVd RNA は、抽出過程において Mg<sup>2+</sup> によって環状 RNA から線状 RNA に切断されている可能性があり、感染性があるのは環状 RNA であるか、または線状 RNA であるかは判断できないと考察されている (Rigden and Rezaian, 1992)。本研究結果により、はじめて単分子の線状 CSVd (+) RNA が感染性をもつことが示された。以前、cDNA クローンから転写されたウイロイド RNA は、完全長より長い配列をもった (+) 鎖 RNA でなければ感染性をもたないことが報告されていたが (Tabler and Sanger, 1984; Visvader et al., 1985)、その後 T7 プロモーター下流に 1 分子の CEVd を直結した cDNA クローンから転写された CEVd (+) RNA が、感染性をもつことが確認されている (Rigden and Rezaian, 1992)。本実験において単分子の線状 CSVd (+) RNA も同様に感染性をもつことが示されたことは、Rigden and Rezaian (1992) の結果を支持するものである。

ウイロイドの線状 RNA が複製を開始するためには

RNA リガーゼによって環状化される必要がある (Rigden and Rezaian, 1992; Simon and Gehrke, 2009)。その際に線状 RNA の 5' 末端の形状が -OH 基、1 個のリン酸基、3 個のリン酸基であるかによって生じる感染性への影響を、Rigden and Rezaian (1992) は CEVd (+) RNA を用いて明らかにしており、いずれの形状であっても感染性はあることが示されている。同様に、転写後の CSVd (+) RNA は 5' 末端に 3 個のリン酸基を有するが、感染性をもつことが本章の実験において示された (第 13 表)。また、CSVd (+) RNA はアゲラタム、シュンギク、トマト、イソギクにおいても感染したことから (第 14 表)、これらの植物種には、CSVd (+) RNA を環状化する RNA リガーゼを有していると考えられる。

一方、CSVd (-) RNA は感染性を示さなかった (第 13 表)。PSTVd (-) RNA が感染性を持たない理由として、リボヌクレアーゼへの耐性がなく RNA の複製が起こらないこと、移行に必要なタンパク質と結合できないことが示されており (Tabler and Sanger, 1985)、CSVd (-) RNA においても同様の理由で感染性がないと推察される。

また、CSVd の配列をもつ cDNA クローンには感染性が認められなかった (第 13 表)。単分子の PSTVd を組み込んだプラスミドは感染性をもたないか、または低効率の感染しかしない。一方、PSTVd を 2 分子または、複製過程に重要とされている配列を両端にもつ単分子の PSTVd のプラスミドは高率で感染することが報告されている (Cress et al., 1983; Owens et al., 1986; Tabler and Sanger, 1984)。cDNA クローンが感染するためには、いったん植物細胞内で cDNA クローンからウイロイド配列を含む RNA が合成され、その後、この RNA から 1 ユニット長のウイロイドが切断されることが必要であり、切断されるための配列が 2 か所必要であるからだと推定されている (Meshi et al., 1984)。おそらく CSVd の単分子 cDNA クローンの場合においても合成された RNA からの切断がうまくいかないことが理由で感染性がないと考えられる。

CSVd に感染したキク 'セイエルザ' から CSVd を非変性ポリアクリルアミドゲルで単離し、RT-PCR によって得られた cDNA の塩基配列を解析した結果、Genbank accession no. X16408 の CSVd が得られた (第 8 図 C)。初報の CSVd (No. V01107; Haseloff and Symons, 1981) の配列と比較すると、第 8 図 C で示したように右末端領域 (1-44 および 310-354) や病原性領域 (45-70 および 284-309) では変異が多く見られた。

**Table 15.** Ability of CSVd (+) RNA isolated from other plants to infect either chrysanthemum plants or other plants.

Inoculated plants	Inoculum	Infectivity
		(Infected plants / test plants)
<i>Chrysanthemum pacificum</i>	Tomato CSVd	2/4
	Ageratum CSVd	2/4
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomato CSVd	6/7
	Ageratum CSVd	2/3
<i>Ageratum houstonianum</i>	Tomato CSVd	0/4
	Ageratum CSVd	3/3

ポスピウイロイドは宿主の DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II によって複製されるが (Ding, 2009), この DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の校正機能は非常に低い (Schindler and Muhlbach, 1992). したがって, 宿主内で一度生じた変異が修正されないために, ウイロイドの複製や移行に重大な影響を与えない変異はそのまま残ると考えられる. CSVd (+) RNA を接種したイソギクやトマトから生じた CSVd には変異が見られたが, それは上記の理由によるものと考えられる. 病原性領域の変異がキクにおいて病徴に変化をもたらすかどうかは不明である.

キク‘セイエルザ’から単離した CSVd (No. X16408) の中央保存領域 (CCR; 78-105, 255-280) には塩基の変異は見られなかった (第 8 図 C). CCR はポスピウイロイドで高い保存性がある配列である (Ding, 2009). CCR は PSTVd の複製過程において宿主の DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II によって合成されたウイロイド RNA の切断と環状化のために必須の配列である (Baumstark et al., 1997). これまでに 33 の異なる塩基配列をもつ CSVd が報告されているが (Genbank/EMBL/DDBJ データベース), 33 の CSVd すべて CCR は完全に保存されている. これには, キク以外の感染植物のシネラリア (No. M19506), アゲラタム (No. Z68201), ダリア (No. AB255879), ペチュニア (No. U82445), *Solanum jasminoides* (No. DQ406591), ツルニチニチソウ (No. DQ094298) から検出された CSVd も含まれる. さらに, 変異体 8 を除き, DDBJ に未登録の日本国内で発生した変異体も CCR は保存されていた (第 3 表). また, 第 2 項で示したように CSVd (+) RNA を接種したアゲラタムやシュンギクで複製された CSVd の CCR も保存されていた. さらに, イソギクの CSVd では, CCR 以外の領域では変異が生じていたが, CCR は保存されていた. CSVd (+) RNA の接種試験によって得られたトマトの CSVd は CCR を含む配列で変異が発生していたが, 1 箇所に変異が生じていたのみであった (第 13 図). 以上より, 他のポスピウイロイドと同様に CCR の保存性は高く, 宿主内での複製に重要な配列であると考えられる.

CCR 以外の領域では, 接種源となる感染植物体内ではすでに変異が生じている状態である可能性が考えられる. そのため変異体の発生を確認するためには汁液接種や接木接種を用いることはできない. ウイルスの場合, 多様な変異体を含んでいる感染植物体から単一病斑分離によって純粋なウイルス集団を選び出すことができる

(大木, 2009). これは明瞭な局部病斑を現す宿主植物を選び, ウイルスの単一病斑分離を行うものである. しかし, ウイロイドの場合, 明瞭な局部病斑を現す宿主植物は存在しないため, 単一病斑分離を行って多様な変異体から単一の変異体を分離することができない. そのため, 人工合成したウイロイドの配列をもつ cDNA あるいは RNA を植物体に感染させて変異体を発生させる試験が行われる (Bernad et al., 2009; Gandia et al., 2007; Kofalvi et al., 1997; Navarro and Flores, 1997). しかし, これまで CSVd の感染性 cDNA および RNA クローン技術は確立していなかったため, 上記のような試験を行うことはできなかった. そこで第 3 章第 1 項において, CSVd の感染性 RNA クローン技術を確認し, その技術を用いて宿主植物に接種試験を行い, 変異体を発生させる試験を行った.

キク‘セイエルザ’から単離された CSVd (No. X16408) の cDNA クローンから転写された CSVd (+) RNA をアゲラタム, シュンギク, トマト, イソギクに接種した. その結果, アゲラタムおよびシュンギクから得られた CSVd は接種した転写 CSVd (+) RNA の配列 (No. X16408) と完全に同じ配列であった (第 13 図). 一方, トマトやイソギクからは接種源とは異なる変異体が見られた (第 13 図). 塩基配列の解析は, 各植物種で 2 植物体を用いて行ったが, いずれの種とも 2 個体間で同様の結果が得られたことから, 塩基配列の変異は感染する植物種に依存して発生すると考えられた. トマトやイソギクから得られた変異体は既報の配列とは異なる変異体であった (Genbank/EMBL/DDBJ データベース).

ウイロイドの変異体が生じる理由として, (1) ウイロイドの複製を行う DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の校正機能が非常に低いこと (Schindler and Muhlbach, 1992), さらに, 本来は DNA を鋳型とするポリメラーゼであるにもかかわらず RNA を鋳型にしていることによるエラーの誘発 (Diener, 1996), (2) 宿主による選択圧, があげられている (Bernad et al., 2009). 宿主による選択圧とは, RNA サイレンシングなどの植物の防御応答によるウイロイド RNA の切断やウイロイドの全身移行能や細胞内での複製量の差などである. 本章の実験で用いた接種源は単一の配列の RNA であり, 複数の変異体の混合物ではないことから, トマトやイソギクで発生した変異体は接種植物体の DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II によって変異を受けて発生したと考えられる. また, 塩基配列の解析には接種葉よりも上位の葉を用いたことから, 全身感染可能な変異体が見出されたと



考えられた。一方で変異体が得られなかったアゲラタムやシュンギクの場合、感染葉では DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II によって変異を受けた可能性は否定できないが、結果的に全身感染できた CSVd は接種源と同じ配列をもつ CSVd であったと推察された。また、これまでにトマトやイソギクは実験上感染させることができる植物種ではあるが (Brierley, 1953; Niblett et al., 1980), 自然界や栽培トマトやイソギクから CSVd が検出された報告はまだない (Genbank/EMBL/DDBJ データベース)。そのような植物種にキクから単離した CSVd の配列 (No. X16408) をもつ CSVd (+) RNA を感染させたことから、既報にない変異体が発生したと考えられる。同様に PSTVd を過去に検出例がない実験上の宿主植物であるアオゲイトウ (アオビユ), *Anthemis arvensis* L., マトリカリア (ジャーマンカモミール), タチヌノフグリに接種したところ既報にはない新しい変異体が発生し、既報にはない塩基の箇所に変異が生じたことが報告されている (Matousek et al., 2007)。PSTVd が新しい宿主植物に適応するために複製や全身移行するためには、変異の発生が重要であることが示唆されている。

また、第 1 章で明らかとなった日本国内のキクで発生した CSVd の塩基配列を既報の変異体を含めて比較すると、変異体 1 (No. X16408) とは最大 5 塩基の違いがあるだけであり (第 3 表), 塩基の置換以外に塩基の挿入や欠失はみられなかった。一方、キクから検出された CSVd の配列 (変異体 1, No. X16408) をもつ CSVd (+) RNA を感染させたトマトから得られた CSVd の変異体を変異体 1 と比較すると 7 塩基の塩基置換と 1 塩基の挿入が確認された (第 13 図)。またイソギクから得られた CSVd の変異体には 6 塩基の置換, 1 塩基の挿入, 3 塩基の欠失が確認された (第 13 図)。変異体 1 の配列と比較すると、日本国内のキクで発生した CSVd の変異の幅よりもトマトやイソギクから得た CSVd の変異の幅の方が大きくなっていることがわかる。宿主植物がキクからトマトまたはイソギクになったことで、変異幅が広がったと考えられる。

単分子の転写 CSVd (+) RNA を各園芸植物に接種した結果、接種 3 週間後にはイソギク、アゲラタム、トマトで感染が確認でき、一方、シュンギクでは接種 6 週間後に感染が確認できた (第 14 表)。ポスピウイルスは宿主の RNA リガーゼによって環状化されて、核内の DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II によって複製される (Ding, 2009; Simon and Gehrke, 2009)。感染までに

要する期間の違いは、宿主植物のもつ、ウイロイド RNA に対する RNA リガーゼや DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の適合性や酵素活性の違いなどが原因であると考えられる。また、環状化のために RNaseIII 型の酵素 (未同定) がウイロイド RNA の 5' 末端を 1 個のリン酸をもつ状態にする必要がある (Gas et al., 2008)。接種源の CSVd RNA は 5' 末端に 3 個のリン酸を有している状態であるので、この RNaseIII 型の酵素の活性の違いも感染まで要する期間に影響すると考えられる。本章で作製した CSVd (+) RNA と同じように作製した CEVd (+) RNA では、5' 末端をリン酸 1 個の状態にした RNAの方がリン酸 3 個の RNA よりも感染性が高いことがわかっている (Rigden and Rezaian, 1992)。そのため、CSVd (+) RNA においても、5' 末端をリン酸 1 個の状態にした方が感染性は高くなり感染までに要する期間を短くできるかもしれない。

本章第 2 項の実験で得られた CSVd に感染した各園芸植物から別の宿主植物への伝染の可能性の検証を行った。CSVd に感染した各園芸植物から total RNA を抽出して、接種試験を行った結果、感染アゲラタムから、アゲラタム以外にイソギクやトマトへの感染が確認され、また感染トマトからトマト以外にイソギクへの感染が確認された (第 14 表)。一方、感染トマトからアゲラタムへの感染は確認できなかった。CSVd 感染アゲラタムの CSVd はキク由来の配列 (No. X16048) と同じであり (第 13 図)、またアゲラタム、トマト、イソギクはキク由来の配列と同じ配列の CSVd (+) RNA に感染可能であったことから (第 14 表)、感染アゲラタムからアゲラタム、トマト、イソギクへの感染が可能であったと考えられる。一方、CSVd 感染トマトの CSVd は変異を生じていたが (第 13 図)、感染トマトからイソギクへの感染が確認されたことから、感染トマトの変異体はイソギクへの感染性を有していたと考えられる。CSVd が感染トマトからイソギクに感染した後にどのような変異を生じたかは不明であるが、CEVd では由来の異なる変異体を特定の宿主植物に感染させると、宿主特異的な変異が生じることが知られていることから (Szychowski et al., 2005)、感染トマトからイソギクに感染した CSVd もイソギク特有の変異を生じた可能性がある。

本研究で CSVd に感染したトマトから得た total RNA をアゲラタムに接種したところ、感染が確認できなかった (第 15 表)。トマトにおいて発生した塩基置換された配列には、アゲラタムにおいて CSVd が複製や全身感染するために必要な配列が含まれていた可能性がある。ウ



イロイドの1塩基置換がウイロイドの構造や複製, 移行, 病徴に影響を与えることに関しては多くの報告がある (Ding, 2009). PSTVd KF-440-2 はジャガイモおよびトマトには感染性があり *N. tabacum* には感染しないが, これから1塩基置換 (C259→U259) によって生じた PSTVd-NT は *N. tabacum* に感染する (Wassengger et al., 1996). 一方, PSTVd KF-440-2 をトマトへ寄生性をもつ *Orobanche ramosa* L. に接種して生じた1塩基置換 (C227→U227) の変異体は, トマトへの感染性や移行性を失っており (Vachev et al., 2010), この変異体は *N. benthamiana* においても移行性を失っていることが報告されている (Zhong et al., 2008).

Fagoaga et al. (1995) によると, ソラマメ (*Vicia faba* L.) に感染している CEVd をトマトに接種し, さらにソラマメに戻し接種したものを他の植物に接種試験を行った場合, もともと感染しなかったギヌラヤシトロン (*Citrus medica* L.) に感染性をもつようになり, また, 病徴を示さなかったトマトでは病徴を発現するようになった. ソラマメに戻し接種した際の CEVd の塩基配列は接種源の塩基配列とは異なっていた. これは, 接種した植物内で生じた変異が感染性や病徴発現に影響を与えたと考えられている. 一方, 第1章の結果および既報の CSVd の配列は病原性領域 (45-70 および 284-309) で変異が多く見られており (第3表), さらに本章第2項の実験で得られたトマトに感染した CSVd やジャガイモに感染した CSVd においても病原性領域に変異が見られた (第12図, 第13図). しかし, これらの CSVd の病原性領域における変異が, わい化等の病徴に与える影響は不明である. これまでに CSVd の塩基配列の変異がキクでの病徴に対してどのような影響があるかについては報告されていない. 今後は cDNA クローンから転写されたウイロイド RNA を用いて人為的に変異体を作製することで, CSVd の病原性領域と病徴に関する研究が進展すると考えられる.

キク由来の CSVd (No. X16408) をトマトに接種して, さらにペチュニアに接種して約1年経たところ, 130番目と131番目の塩基の間にグアニン (G) が挿入されていた (CSVd-Pet; 第11図). 既報のペチュニアから分離された変異体 (No. U28445) も同様に, 130番目と131番目の塩基の間にグアニン (G) が挿入されていた (Verhoeven et al., 1998). さらに, その配列をもつ cDNA クローンを本章第2項の方法で作製して転写 RNA をペチュニアに接種したところ, 感染が確認された (データ省略). CEVd では由来の異なる変異体を特

定の宿主植物に感染させると, 宿主特異的な変異が生じることが知られていることから (Szychowski et al., 2005), キク由来の CSVd がペチュニア特有の変異を受けた結果, CSVd-Pet へと変異したと考えられる. 130番目と131番目の塩基挿入によって生じる2次構造の変化が, ペチュニアがもつウイロイド複製に関与するタンパク質 (RNA リガーゼや DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II) との結合または全身移行に必要なのかもしれない (Bernad et al., 2009). ジャガイモにおける同様の試験によって生じた CSVd-Pot の塩基置換も同様の理由であると考えられる (第12図). De la Pena and Flores (2002) は CChMVd の 82 から 85 番目までの4塩基を人為的に様々な塩基に置換してキクに接種した結果, 接種1か月後にこの4塩基部分が変異した数種類の変異体が検出されたが, 最終的には2種類の変異体が優占種となることを示している. 同様に, キクを起源とした CSVd がペチュニアやジャガイモに感染後約1年間栽培された結果, おそらく途中様々な変異体が生じた後に, その宿主に適応した変異体に推移して CSVd-Pet または CSVd-Pot に到達すると考えられる.

ウイロイドの変異発生の理由としての DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の校正機能の問題以外に DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の 'jumping' による変異発生が指摘されている (Keese and Symons, 1985). ウイロイドの変異には塩基の欠失, 挿入, 重複が発生することがある. その理由として, ウイロイド複製の際に DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の 'jumping' が発生することによって塩基の欠失, 挿入, 重複が生じるという可能性が示されている (Fadda et al., 2003; Keese and Symons, 1985; Szychowski et al., 2005). CSVd-Pet の 130 番目と 131 番目の塩基の間の G の挿入 (第11図) やトマトやイソギクに感染した CSVd の塩基挿入・欠失 (第13図) は DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II の 'jumping' によるものであるかもしれない.

本章の実験により, 単分子の転写 CSVd (+) RNA は感染性を持ち, イソギク植物体において複製されることが示された (第13表). キク由来の CSVd (+) RNA をアゲラタム, シュンギク, トマト, イソギクに接種するとすべて CSVd に感染し (第14表), 感染したアゲラタムとシュンギクからは接種した転写 CSVd (+) RNA の配列 (No. X16408) と完全に同じ配列の CSVd が検出された (第13図). 一方, トマトやイソギクからは接種源とは異なる変異体が多量に得られたことから (第13図), CSVd の塩基配列の変異は感染する植物種に依存して発

生すると考えられた。さらに CSVd に感染したトマトから得た total RNA をアゲラタムに接種したところ、感染が確認できなかった (第 15 表)。トマトにおいて発生した塩基置換された配列には、アゲラタムにおいて CSVd が複製や全身感染するために必要な配列が含まれていた可能性が示唆された。また、上記のようにトマトやイソギクで変異体を発生させたキク由来の CSVd を他の宿主植物で長期間感染させることで、どのような変異を生じるのかを確認した。その結果、感染後約 1 年間栽培したペチュニアやジャガイモからは CSVd-Pet または CSVd-Pot が得られた (第 11 図, 第 12 図)。以上より、キクに感染している CSVd が他の宿主植物に定着すると、比較的短期間でその宿主に適応した変異体に推移していく可能性が示唆された。

## 総合考察

昨今の苗や種子の国際的な移動に伴い、世界各地でトマト (*Solanum lycopersicum* L.) やキク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) などの園芸植物から、重大な被害をもたらすウイロイドが相次いで検出されている (James et al., 2008; Singh et al., 2006; Verhoeven et al., 2004, 2007)。野菜・花き類で病害を引き起こすウイロイドはほとんどポスピウイロイド属のウイロイドであり (佐野, 2007)、中でもポスピウイロイド属の *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) は花き類では日本における生産量・栽培面積とも 1 位であるキクの重要病害である。また、野菜の重要品目であるトマトでは、ポスピウイロイド属の *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) が感染し、海外で問題となっている (James et al., 2008; Singh et al., 1999, 2006; Verhoeven et al., 2004, 2007)。現在のところ野菜・花き類ではこれらのウイロイドが防除や植物防疫の点で最も警戒すべきウイロイドである。特に、CSVd は多くの被害例があるにもかかわらず、国内での発生状況についての情報は少ない、一方、TCDVd は国内での発生についてはこれまで報告されていないものの、海外から持ち込まれて感染が広がる危険性を秘めている。そこで本研究ではまず国内における CSVd および TCDVd の発生状況についての調査を行った。

その結果、キクを採集したすべての 10 県で CSVd が検出され、日本国内のキク栽培地域で感染が拡大している可能性が示された (第 1 表)。さらに、8 種の野生ギクからいずれも CSVd が検出され、これらが CSVd の

宿主となることがはじめて示された (第 1 図)。CSVd に感染していた野生ギクには明瞭な病徴は認められなかったことから、CSVd 感染株を見つけ出して取り除くことは困難で、これらが無病徴の宿主植物となる可能性が考えられた。これまでに、CSVd の自然感染植物として、キク科植物のキク (Diener and Lawson, 1973)、シネラリア (*Pericallis hybrida* hort. B. Nord. ; Gross et al., 1982)、アゲラタム (*Ageratum* spp.), マーガレット (*Argyranthemum frutescens* (L.) Schultz Bip ; Menzel and Maiss, 2000)、ダリア (*Dahlia* spp. ; Nakashima et al., 2007)、ナス科植物のペチュニア (*Petunia hybrida* hort. ; Verhoeven et al., 1998)、*Solanum jasmonoides* (Verhoeven et al., 2006)、キョウチクトウ科植物の *Vinca major* L. (Nie et al., 2005) が報告されている。このなかでキク、シネラリア、ダリアを除き、明瞭な病徴は観察されない。また、これらは栄養繁殖されることからその移動に伴う CSVd の拡散が懸念された。

一方、TCDVd は国内での発生についてはこれまで報告されていなかったが、本研究の調査によって、広島県で発生した上位葉の退緑、黄化、えそを示す葉巻症状を伴うトマトから、カナダで発生した TCDVd (No. AF162131 ; 第 10 表) の塩基配列と 98% 一致する全長 359 塩基の TCDVd (No. AB329668 ; 第 7 図) が得られ、TCDVd の日本国内の初発生が確認された (第 6 図)。次に、その宿主範囲について調査したところ、ほとんどのナス科と一部のキク科で全身感染することが判明した (第 4 表)。過去の報告では上記の宿主植物以外に、クマツヅラ科のバーベナやキョウチクトウ科のヒメツルニチニチソウ (*Vinca minor* L.) が TCDVd の宿主植物であることが報告されている (Singh et al., 2006, 2009)。過去の報告も含めて感染植物の中で、病徴を示したものはトマトと *Nicotiana glutinosa* L. のみであり、その他の感染植物は無病徴であった (第 4 表)。TCDVd はアメリカ (2007)、イギリス (2008)、フィンランド (2009)、チェコ (2008) においてペチュニアから、インド (2006) ではバーベナから、オランダ (2010) では *Brugmansia sanguine* (Ruiz et Pav.) D. Don. から検出されており (第 10 表)、それら植物ではいずれも無病徴感染である。Verhoeven and Roenhorst (2010) および Verhoeven et al. (2004, 2010) は TCDVd を含むポスピウイロイドの感染源は無病徴感染のナス科植物である可能性が高いことを示唆している。本節の試験では感染した宿主植物からトマトへの戻し接種が可能であったことから、

TCDVd の感染経路の 1 つとして、これらの宿主植物に感染した TCDVd が栽培トマトへ感染する可能性が考えられた。同様に TCDVd と近縁種の *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) においても、PSTVd の無病徴感染植物である *Solanum jasminoides* L. からトマトへ容易に感染させることが可能であったことから、無病徴感染植物からのトマトへの伝染の可能性が示唆されている (Verhoeven et al., 2010)。以上より、無病徴の感染植物の流通が、防疫所等の検疫から漏れ、TCDVd の世界的な広域拡散の原因になっている可能性が考えられる。広島県の温室トマトで発生した TCDVd は無病徴感染植物由来であったのかもしれない。

ウイロイドの伝染は一部の例外を除き昆虫による媒介や土壌伝染などは知られていない。ウイロイドに対する一般的な防除方法は、圃場からの感染植物の除去、刃物等による汁液伝染の防止、非感染植物の利用があげられる (Singh et al., 2003c)。第 1 章第 1 項で示したように、これまでに報告されている自然宿主以外に 8 種の野生ギクが CSVd の無病徴感染の宿主植物となる可能性が考えられた (第 1 図)。無病徴感染の植物から刃物等による汁液伝染を防ぐために、キクの栽培環境中または周辺に野生ギクを放置しないことが望ましい。一方、TCDVd はほとんどのナス科と一部のキク科植物に感染し、トマトと *N. glutinosa* L. 以外では無病徴であった (第 4 表)。したがって、TCDVd の宿主植物で無病徴感染するペチュニアやバーベナ等の園芸植物は同一圃場内での混植・栽培等は極力避けることが望ましい。キクやトマトの栽培において、やむを得ず混植する場合にはこれら潜在的感染植物からの万が一の伝染を防ぐため、剪定器具等は植物種それぞれに用意するべきである。また、ワルナスビ等のナス科雑草も宿主植物になることから (第 4 表)、圃場周辺の除草も重要である。

TCDVd は高い耐熱性や耐乾燥性を有することから (第 6 表, 第 9 表)、TCDVd が発生した場合には、発生株は速やかに圃場外で埋没処分し、圃場内の残渣は確実に取り除くことが必要である。さらに、TCDVd は非常に低濃度でも感染することから (第 7 表)、摘芽・誘引・収穫などの管理作業時には手袋やハサミを定期的に交換するべきである。また、TCDVd に汚染された刃物やその他の器具から容易に伝染することから、次亜塩素酸等による有効な消毒方法が必要である。また、TCDVd を含むポスピウイロイドの感染源は無病徴感染のナス科植物である可能性が高いことから (Verhoeven and Roenhorst, 2010; Verhoeven et al., 2004, 2010)、そ

これらの植物に触れた器具を消毒することが重要であると考えられる。TCDVd では 3% 次亜塩素酸ナトリウム (pH11.8) が効果的に TCDVd の感染を阻害することができることが報告されており (Matsuura et al., 2010)、器具の消毒に利用できると考えられる。

種子繁殖性のトマトとは異なり、栄養繁殖性であるキクの栽培においては、非感染植物の利用が CSVd に対する重要な防除手段である。有用な商業品種が CSVd に感染した場合、茎頂培養による CSVd の除去が有効な手段となる。しかし、CSVd は葉原基を含む茎頂分裂組織を培養する通常の茎頂培養では、ほとんど除去することができない。Hosokawa et al. (2004) は葉原基を含まない超微小な茎頂分裂組織をキャベツ根へ移植する培養法を用いることで CSVd 除去株を作出できることを報告した。このようにして作出された CSVd フリーのキク‘神馬’は低濃度保毒個体よりも茎の伸長がよくなり、また、切り花重が増加した (堀田ら, 2006)。このような方法を用いて CSVd を除去して、感染した有用な商業品種を順次 CSVd フリーの植物に置き換えていくことが望ましい。

ウイロイドはウイルスや細菌よりも変異の速度が速いとされており、1 つのウイロイド種における変異体が数多く報告されている (Gago et al. 2009)。例えば *Hop stunt viroid* (HSVd) では 265 の変異体が知られている (佐野, 2007)。一方で、CSVd は 33 の変異体が報告されているが (Genbank/EMBL/DDBJ データベース)、キクでの発生状況やそれらの各種宿主植物体への感染性や病徴などの特性についてはほとんど研究例はなく、これらの変異体が他の宿主植物に伝染する可能性や新たな変異体を発生させている可能性については検証されていない。

そこで国内で発生している CSVd について各地のキク科植物における CSVd の塩基配列を調査することで変異体の発生状況を把握することを目的として第 1 章第 2 節の実験を行った。その結果、サンプルから検出された CSVd の全長はすべて 354 塩基であった。過去に国内で発生した CSVd の塩基数はすべて 354 塩基であった (土井・加藤, 2004; 花田・酒井, 2001; 李ら, 1997; Sugiura and Hanada, 1998)。海外ではこれまでに、354 塩基 (日本, イギリス), 355 塩基 (アメリカ, カナダ), 356 塩基 (オーストラリア) の CSVd が報告されており (Steger and Riesner, 2003)、その中で最も多く報告されている変異体は全長 354 塩基の CSVd である (Genbank/EMBL/DDBJ データベース)。356 塩



基の CSVd はオーストラリアの CSVd (No. V01107) 以外では報告されておらず、355 塩基の CSVd はツルニチニチソウ (No. DQ094298; Nie et al., 2005) やペチュニア (No. U82445; Verhoeven et al., 1998) から検出されているのみである。さらに日本国内のキクから検出された CSVd はすべて 354 塩基であったことから、キクに感染する主な CSVd の塩基数は 354 塩基であると推察された。

また、今回のサンプルからは 5 つの CSVd 変異体が検出された (第 3 表)。変異体 5 (No. AB279771) は栽培キクから、変異体 4 (No. AB279770) はナカガワノギクからそれぞれ分離された新変異体であった。また 21 分離株のうち 14 株は変異体 1 (No. X16408) であり、兵庫株 (塩飽ら, 1996) と同じ配列であった。変異体 1 は最も高頻度に検出され、10 県中 6 県で検出されたことから、日本で優占的に分布する CSVd 系統であると推定された (第 2 図)。日本国内で発生した CSVd の塩基配列を既報の変異体を含めて比較すると、変異体 1 とは最大 5 塩基の違いがあるだけで (第 3 表)、塩基配列の相同性は 98%~100% であった。また、海外のものも含めても CSVd の変異幅は PSTVd や CEVd と比較すると小さく、安定していることが示されていることから (Nie et al., 2005)、本実験結果はそれを支持するものであった。

既報の CSVd の変異体の変異幅は小さい一方で、PSTVd, CEVd, HSVd は変異の幅が大きく、由来の異なる宿主植物に感染することで新たな変異体が発生することが報告されている (Fagoaga et al., 1995; Ito et al., 2010; Matousek et al., 2007)。キクの変異体を他の宿主植物体へ接種した場合に変異が生じる可能性を示した報告はないことから、それぞれの変異体が宿主特有のものであるのかは不明である。一方、PSTVd を接種した *Amaranthus retroflexus* L., *Anthemis arvensis* L., *Chamomilla recutita* L., *Veronica arvensis* L. からは新しい変異体が発生したことが報告されており、宿主特有の変異体になることが知られている (Matousek et al., 2007)。CEVd (Fagoaga et al., 1995) や HSVd (Ito et al., 2010) においても同様に、宿主による変異の誘導が報告されている。このような現象を CSVd で確認した試験例はない。既報の CSVd がキク以外の園芸植物に感染した場合、新たな変異体が発生し、感染植物に定着して感染源になる可能性が考えられる。接種植物による変異体の発生を確認するためには特定の塩基配列をもつ CSVd を用いて接種試験を行う必要がある。接種源とな

る感染植物体内ではすでに変異が生じている状態である可能性があるため、汁液接種や接木接種を用いることはできない。またウイロイドの場合、感染植物から単一の変異体を分離する方法がないため、ウイロイド配列と相同の DNA または RNA を人工的に合成して、それを接種源とする方法を用いる。PSTVd や CEVd, HSVd の場合はすでにこのような方法を用いて接種試験を行うことができる (Cress et al., 1983; Meshi et al., 1984; Owens et al., 1986; Tabler and Sanger, 1984, 1985; Visvader et al., 1985)。しかし、CSVd についての実験系は確立されておらず、任意の塩基配列をもつ変異体 CSVd の接種試験を行うことはできない。

そこで第 3 章ではキクから検出された変異体 1 の CSVd の感染性単分子 RNA の構築を試みた。さらにその系を用いて、キク由来の変異体 1 (No. X16408) を各種園芸植物への接種を行って感染の有無を確認することで、既報の CSVd がキク以外の園芸植物に感染した場合、新たな変異体が発生する可能性を検証した。その結果、単分子の転写 CSVd (+) RNA は感染性をもち、イソギク植物体において複製されることが示された (第 13 表)。本研究結果により、はじめて単分子の線状 CSVd (+) RNA が感染性をもつことが示された。

さらにその技術を用いて各園芸植物に接種試験を行い、変異体を発生させる試験を行った。キク‘セイエルザ’から単離された CSVd (No. X16408) の cDNA クローンから転写された CSVd (+) RNA をアゲラタム、シュンギク、トマト、イソギクに接種した。その結果、アゲラタムおよびシュンギクから得られた CSVd は接種した転写 CSVd (+) RNA の配列 (No. X16408) と完全に同じ配列であった (第 13 図)。一方、トマトやイソギクからは接種源とは異なる変異体を得られた (第 13 図)。塩基配列の解析は、各植物種で 2 植物体を用いて行ったが、同様の結果が得られたことから、塩基配列の変異は感染する植物種に依存して発生すると考えられた。トマトやイソギクから得られた変異体は既報の配列とは異なる変異体であった (Genbank/EMBL/DDBJ データベース)。実験で用いた接種源は単一の配列の RNA であり、複数の変異体の混合物ではない。したがって接種した転写 CSVd (+) RNA がトマトやイソギク植物体で DNA 依存 RNA ポリメラーゼ II によって変異を受けて変異体となり (Schindler and Muhlbach, 1992)、その変異体の中で全身感染可能な変異体のみが検出されたと考えられる (Bernad et al., 2009)。このような宿主の選択圧を受けた結果、既報にない変異体が発生したと考えられ



る。

また、第1章で明らかとなった日本国内のキクで発生した CSVd の塩基配列を既報の変異体を含めて比較すると、変異体 1 (No. X16408) とは最大 5 塩基の違いがあるだけであり (第 3 表)、塩基の置換以外に塩基の挿入や欠失はみられなかった。一方、キクから単離された CSVd の配列 (変異体 1, No. X16408) をもつ CSVd (+) RNA を感染させたトマトから得られた CSVd の変異体を変異体 1 と比較すると 7 塩基の塩基置換と 1 塩基の挿入が確認された (第 13 図)。またイソギクから得られた CSVd の変異体には 6 塩基の置換、1 塩基の挿入、3 塩基の欠失が確認された (第 13 図)。変異体 1 の配列と比較すると、日本国内のキクで発生した CSVd の変異の幅よりもトマトやイソギクから得た CSVd の変異の幅の方が大きくなっていることがわかる。宿主植物がキクからトマトまたはイソギクになったことで、変異幅が広がったと考えられる。

第 3 章第 1 項の実験結果よりキク由来の CSVd がキク以外の園芸植物に感染した場合、新規の変異体が発生することが確認された。第 2 項ではキク由来の CSVd をキク以外の宿主植物に接種して長期間栽培した場合、宿主特有の変異体が発生する可能性を検証した。キク由来の CSVd (No. X16408) をトマトに接種して、さらにペチュニアに接種して約 1 年経たところ、130 番目と 131 番目の塩基の間にグアニン (G) が挿入されていた (CSVd-Pet; 第 11 図)。既報のペチュニアから分離された変異体 (No. U28445) も同様に、130 番目と 131 番目の塩基の間にグアニン (G) が挿入されていた (Verhoeven et al., 1998)。さらに、CSVd-Pet の配列をもつ cDNA クローンを本章第 2 項の方法で作製して転写 CSVd (+) RNA をペチュニアに接種したところ、感染が確認された (データ省略)。CEVd では由来の異なる変異体を特定の宿主植物に感染させると、宿主特異的な変異が生じることが知られており (Szychowski et al., 2005)、本実験においても同様にキク由来の CSVd がペチュニア特有の変異を受けた結果、CSVd-Pet へと変異したと考えられる。ジャガイモにおける同様の試験によって生じた CSVd-Pot の塩基置換も同様の理由であると考えられる (第 12 図)。 *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) の 82 から 85 番目までの 4 塩基を人為的に様々な塩基に置換してキクに接種した結果、接種 1 か月後には数種類の変異体が検出されたが、最終的には 2 種類の変異体が優占種となることを報告されている (De la Pena and Flores, 2002)。同様に、キクを起源とし

た CSVd がペチュニアやジャガイモに感染後約 1 年間栽培された結果、途中様々な変異体が生じた後にその宿主に適応した変異体に推移して CSVd-Pet または CSVd-Pot に到達したと考えられる。また、PSTVd を感染させた雑草 3 種では新たな変異体が生じて、宿主植物に適応する。それらの感染植物は無病徴であることから、取り除かれることが少なく、ジャガイモやトマトなどの作物への伝染源となる可能性が示唆されている (Matousek et al., 2007)。CSVd においても同様に、CSVd に感染したペチュニアやジャガイモが伝染源となる可能性が考えられる。以上より、キクに感染している CSVd が他の宿主植物に定着するとその宿主に適応して変異し、それらは園芸植物への伝染源となる可能性が示唆された。

CSVd はキク科、ナス科、ウリ科の植物 49 種に実験上感染し、ほとんどが無病徴感染することが報告されており、今後、栽培中の園芸植物に近接する植物種に CSVd が感染して宿主に適応して定着し、感染源となる可能性が秘められている。TCDVd においても、近年トマト以外の植物種からの検出例が相次いでいる。それらの植物体からは異なる変異体が検出されており、無病徴感染であった (第 10 表、第 11 表)。以上より、CSVd や TCDVd の変異体に無病徴に感染した植物種が園芸植物への伝染源となる可能性が考えられる。

本論文では、園芸植物に感染するウイロイドの国内における発生と変異体について調査し、異なる科レベルでの園芸植物間で伝染する可能性を示した。また、そのような伝染に伴い変異体が発生する可能性を示した。ウイロイドの変異体が発生し、定着した無病徴感染の植物がトマトやキクなどの病徴を発症する園芸植物への伝染源となる危険性に対して、本論文は科学的な根拠を示している。

## 摘 要

*Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) は、キクに感染するとわい化症状や発根不良を引き起こすウイロイドである。1972 年に国内での発生が報告されて以来、全国各地のキク産地で問題となっている。しかし、その発生分布や発生している CSVd の系統について調査した報告はない。そこで、全国各地のキク産地における CSVd の感染状況を調査し、さらにその変異体の分布を明らかにした。

国内の 10 県で採集した栽培ギク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 89 サンプルおよび花き研究所で保

存されている野生ギクからキクわい化ウイルス (CSVd) を検出し、21 単離株の全塩基配列を決定した。栽培ギク 89 サンプル中 80 サンプルが CSVd に感染しており、うち 36 サンプルは RT-PCR で検出されるレベルの高濃度感染であり、44 サンプルは nested PCR で検出される低濃度感染であった。採集したすべての県で CSVd が検出され、日本国内のキク栽培地域で感染が拡大している可能性が示された。8 種の野生ギクからはいずれも CSVd が RT-PCR で検出され、病徴は認められなかったが、これらが CSVd の宿主となることが初めて示された。また、塩基配列が異なる 5 種の CSVd 変異体を認め、既報の系統とは塩基配列の異なる系統として、栽培ギクからは変異体 5 が、ナカガワノギクからは変異体 4 が検出された。変異体 1 (DDBJ accession No. X16408) は最も高頻度に検出され、10 県中 6 県で検出されたことから、日本で優占的に分布する CSVd 系統と推定した。

トマトには CSVd を含め、ポスピウイルス属の 8 種類のウイルスが感染することが知られているが、これまで、日本国内でトマトにおいてウイルス病害が問題になることはなかった。しかし、2006 年、広島県の温室栽培のトマトにおいて葉の退緑や茎頂部の萎縮などの症状を示すトマトが発見された。そこで、その病原体の同定と特性の調査を行った。広島県で発生したトマトから RNA を抽出し、電気泳動によって得られた健全トマトにはない RNA のバンドを回収して、健全トマトに接種したところ、約 1 か月後には同様の病徴が確認できた。次に、接種トマトから全 RNA を抽出し、ポスピウイルス属のウイルスを検出できるプライマーセットを用いて RT-PCR を行い、その全塩基配列を解析した結果、全塩基配列は 359 塩基であり、カナダで発生した *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) の系統と 98% の相同性があった。

TCDVd の詳細な宿主範囲や特性について調査を行った。その結果、TCDVd の宿主植物はナス科が主体で、その他一部のキク科、クマツヅラ科、キョウチクトウ科に限定された。ナス科植物で病徴を発現するのはトマトおよび *Nicotiana glutinosa* L. のみで、ペチュニア、ピーマン、ナス等多くの植物では、感染しても無病徴であった。過去に輸入ペチュニアからも TCDVd が検出されており、無病徴の栄養繁殖の花き類を通じて各地に伝播している可能性が推察された。さらに、TCDVd の物理的特性を次のように明らかにした。TCDVd 磨砕液は 100°C で 10 ~ 30 分煮沸処理しても感染性を示し、高い

耐熱性を有していた。また、 $10^6$  倍希釈でも感染性を示し、低いウイルス濃度でも感染性を保持することができた。耐保存性は、リン酸緩衝液磨砕粗汁液中で 1 ~ 2 日程度であるが、乾燥状態では 50 日以上と耐乾燥性は強い結果となった。

CSVd は上記の試験において、5 種類以上の変異体が国内に分布していることが示された。また、データベースには 30 種類の変異体が登録されている。これらの変異体は園芸植物種や品種の間の移動などによって発生した可能性がある。

特定の配列の CSVd を単離して接種試験を行うためには人工合成系が必要であることからその系の構築を試みた。国内で最も広く感染している CSVd の系統 (変異体 1 ; No. X16408) に感染したキクから全 RNA を抽出し、RT-PCR によって CSVd の cDNA を得た。次に、CSVd cDNA の 5' 末端に T7 プロモーター配列を直結するように DNA 断片を作製し、それを鋳型にして RNA を転写した。転写した直鎖状の CSVd RNA をイソギクに機械的に接種すると、感染植物から抽出・精製した天然の CSVd と同様に、CSVd の感染が確認できた。一方、鋳型として用いた cDNA やその配列をもつプラスミド、マイナス鎖の CSVd RNA には感染性は認められなかった。合成 CSVd (+) RNA をその他の宿主植物に接種すると、イソギク、トマト、アゲラタムからは 4 週間後に、シュンギクからは 8 週間後に CSVd が検出され、CSVd RNA に対する感受性は宿主植物によって異なると考えられた。

さらに合成 CSVd RNA を接種したトマトおよびアゲラタムから抽出した全 RNA を健全トマトや健全イソギクに接種したところ、CSVd の感染が確認できた。これより、合成 CSVd RNA より生じた CSVd は他の植物への感染性を保持していることが示された。また、CSVd の他の宿主園芸植物への感染の可能性が示された。以上のことから、本方法によって合成された単分子 CSVd RNA は CSVd 宿主植物に感染し、複製能を持ち、接種試験に利用できることを示した。この系を利用して CSVd の変異体を生じさせる実験を行った。

CSVd RNA を接種して CSVd に感染した各宿主植物から全 RNA を抽出し、RT-PCR によって CSVd の cDNA を得て、その全塩基配列を解析した。その結果、アゲラタムとシュンギクからは鋳型の CSVd (No. X16408) と配列が完全に一致したクローンが 8 個得られたが、一方、トマトとイソギクからは鋳型の配列と異なるクローンが得られ、これらの宿主植物体を経ると変

異体が生ずる可能性が示された。次に、CSVd (X16408) を接種したトマトを作製し、それを台木にしてペチュニアに接木接種を行った。接種3か月後に穂木のペチュニアを分離し、挿し木を行って1年間栽培した。その株からRT-PCRによってCSVdのcDNAを得て全塩基配列を確認したところ、130番目の塩基にGが挿入されたCSVd (CSVd-Pet) が得られた。同様の方法でCSVd-PetのRNAを作製し、ペチュニアに再接種したところ、感染が確認された。過去報告されているペチュニアから分離されたCSVdの配列は、CSVd-Petと同様に130番目と131番目にGの配列が挿入されている。さらに、同様の試験をジャガイモにおいて行ったところ、47番目のUがAに、49番目のGがAに塩基置換されていた。以上より、キクに感染しているCSVdが他の宿主植物に定着すると、その宿主に適応した変異体に移行していく可能性が示唆された。

## 謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり、京都大学大学院農学研究科教授 土井元章博士、准教授 細川宗孝博士に懇切なご指導とご校閲を賜った。また、矢澤進博士（現在京都学園大学バイオ環境学部バイオ環境デザイン学科教授）には終始ご指導とご助言を賜った。本研究の遂行からとりまとめに至るまで、独立行政法人農業・食品産業技術研究機構花き研究所 月星隆雄博士（現在畜産草地研究所）、中央農業総合研究センター 津田新哉博士、宇杉富雄博士、独立行政法人産業技術総合研究所 Penmetcha Kumar 博士には直接ご指導とご鞭撻を賜った。ここに心より感謝の意を表す。

また、実験の遂行にあたり、花き研究所 柴田道夫博士、築尾嘉章博士、佐藤衛博士、伊藤陽子主任研究員（現在近畿中国四国農業研究センター）、久松完博士、住友克彦博士、中央農業総合研究センター 花田薫博士、弘前大学農学生命科学部教授 佐野輝男博士、香川大学農学部准教授 鳴海貴子博士、農林水産省消費・安全局植物防疫課 石川智基係長（現在横浜植物防疫所）、横浜植物防疫所 藤原裕治検疫官、広島県立総合技術研究所 松浦昌平博士には多大なご協力をいただいた。また、研究の遂行にあたり、花き研究所、中央農業総合研究センター、産業技術総合研究所、山形県農業総合研究センター、新潟県農業総合研究所、茨城県農業総合センター、千葉県農業総合研究センター、神奈川県農業技術センター、静岡県農業試験場、富山県農林水産総合技術センタ

一、広島県立総合技術研究所、福岡県農業総合試験場、福岡県病害虫防除所、鹿児島県農業開発総合センター、横浜植物防疫所の職員の方々にご協力いただいた。心より厚くお礼申し上げる。

## 引用文献

- Ambros, S., C. Hernandez, J. C. Desvignes and R. Flores. 1998. Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. *J. Virol.* 72: 7397-7406.
- Ambros, S., C. Hernandez and R. Flores. 1999. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *J. Gen. Virol.* 80: 2239-2252.
- Antignus, Y., O. Lachman and M. Pearlsman. 2007. Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crop is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Dis.* 91: 47-50.
- Barbosa, C. J., A. J. Pina, J. Perez-Panades, L. Brenad, P. Serra, L. Navarro and N. Duran-Vila. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Dis.* 89: 749-754.
- Baumstark, T., A. R. W. Schroder and D. Riesner. 1997. Viroid processing: Switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* 16: 599-610.
- Behjatnia, S. A. A., I. B. Dry, R. L. Krake, D. B. Conde, I. M. Connelly, W. J. Randles and A. M. Rezaian. 1996. New potato spindle tuber viroid and tomato leaf curl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. *Phytopathology* 86: 880-886.
- Bernad, L., N. Duran-Vila and E. F. Santiago. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of *Citrus exocortis* viroid. *J. Gen. Virol.* 90: 2040-2049.
- Bouwen, I. and van A. Zaayen. 2004. *Chrysanthemum stunt viroid*. p. 218-223 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Brierley, P. 1953. Some experimental hosts the chrysanthemum stunt virus. *Plant Dis. Rep.* 37: 343-345.
- Candresse, T., A. Marais, X. Tassus, P. Suhard, I. Renaudin, A.



- Leguay, F. Poliakoff and D. Blancard. 2010. First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in tomato in France. *Plant Dis.* 94: 633.
- Codoner, F. M., J. A. Daros, R. V. Sole and S. F. Elena. 2006. The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathog.* 2: e136.
- Cress, D. E., C. M. Kiefer and A. R. Owens. 1983. Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones. *Nucleic Acids Res.* 11: 6821-6835.
- De la Pena, M. and R. Flores. 2002. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *J. Mol. Biol.* 16: 411-412.
- Diener, T. O. 1996. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. *Virus Genes* 11: 119-131.
- Diener, T. O. and H. R. Lawson. 1973. *Chrysanthemum stunt*: a viroid disease. *Virology* 51: 94-101.
- Ding, B. 2009. The biology of viroid-host interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47: 105-131.
- 土井 誠・加藤公彦. 2004. 静岡県で発生したキクわい化ウイルス (CSVd) の塩基配列とキク品種の病徴. 関西病虫研報. 46 : 11-14.
- Fadda, Z., J. A. Darosb, R. Floresb and N. Duran-Vila. 2003. Identification in eggplant of a variant of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. 97: 145-149.
- Fagoaga, C., S. J. Semancik and N. Duran-Vila. 1995. A citrus exocortis viroid variant from broad bean (*Vicia faba* L.): infectivity and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 76: 2271-2277.
- Foissac, X. and N. Duran-Vila. 2000. Characterization of two citrus apscaviroids isolated in Spain. *Arch. Virol.* 145: 1975-1983.
- Gago, S., F. S. Elena, R. Flores and R. Sanjuan. 2009. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science* 323: 1308.
- Gandia, M., L. Bernad, M. Gandia and N. Duran-Vila. 2007. Host effect on the genetic variability of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). *Phytopathology* 97: 1004-1010.
- Gandia, M. and N. Duran-Vila. 2004. Variability of the progeny of a sequence variant *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd). *Arch. Virol.* 149: 407-416.
- Gandia, M., L. Rubio, A. Palacio and N. Duran-Vila. 2005. Genetic variation and population structure of an isolate of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. *Arch. Virol* 150: 1945-1957.
- Garnsey, S. M. and R. Whidden. 1971. Decontamination treatments to reduce the spread of *Citrus exocortis virus* (CEV) by contaminated tools. *Proc. Flo. State Hortic. Soc.* 84: 63-67.
- Gas, M.-E., D. Molina-Serrano, C. Hernandez, R. Flores and J.-A. Daros. 2008. monomeric linear RNA of *Citrus exocortis viroid* resulting from processing in vivo has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: Implications for the RNase and RNA ligase involved in replication. *J. Virol.* 82: 10321-10325.
- Gora, A., T. Candresse and W. Zagorski. 1994. Analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates. *Arch. Virol.* 138: 233-245.
- Gora-Sochacka, A., A. Kierzek, T. Candresse and W. Zagorski. 1997. The genetic stability of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) molecular variants. *RNA* 3: 68-74.
- Gross, J. H., G. Krupp, H. Domdey, M. Raba, P. Jank, C. Lossow, H. Alberty, K. Ramm and L. H. Sanger. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of *Citrus exocortis* and *Chrysanthemum stunt viroid*. *Eur. J. Biochem.* 121: 249-257.
- Gross, H. J., U. Liebl, H. Alberty, G. Krupp, H. Domdey, K. Ramm and L. H. Sanger. 1981. A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Bioscience Rep.* 1: 235-241.
- Gruner, R. A. Fels, F. Qu, R. Zimmat, G. Steger and D. Riesner. 1995. Interdependence of pathogenicity and replicability with *Potato spindle tuber viroid*. *Virology* 209: 60-69.
- 花田 薫・酒井淳一. 2001. 九州・沖縄で発生したキクわい化ウイルスの塩基配列. 九病虫研会報. 47 : 43-45.
- 花田 薫・栃原比呂志・橋本純治・沖村 誠・川田穰一. 1982. わが国のキクから分離されたキク矮化ウイルス. 日植病報. 48 : 131.
- Haseloff, J. and R. H. Symons. 1981. *Chrysanthemum stunt viroid*: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 9: 2741-2752.



- Herold T, B. Hass, P. R. Singh, A. Boucher and L. H. Sanger. 1992. Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol. Biol.* 19: 329-333.
- Hernandez, C. and R. Flores. 1992. Plus and minus RNAs of *Peach latent mosaic viroid* self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3711-3715.
- 広島県. 2007. 平成 19 年度病害虫発生予察情報. 特殊報. 第 5 号.
- Horst, R. K., W. R. Langhan and H. S. Smith. 1977. Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rotting of chrysanthemums. *Phytopathology* 67: 9-14.
- Hosokawa, M., Y. Matsushita, H. Uchida and S. Yazawa. 2005. Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plants tissue. *J. Virol. Meth.* 131: 28-33.
- Hosokawa, M., A. Otake, K. Ohishi, E. Ueda, T. Hayashi and S. Yazawa. 2004. Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordia-free shoot apical meristem dome attached to a root tip. *Plant Cell Rep.* 22: 859-863.
- 堀田真紀子・長谷川徹・大石一史・細川宗孝・原 広志・加藤俊博. 2006. きく‘神馬’におけるキクわい化ウイロイド (CSVd) 除去株の生育特性. *関西病虫研報.* 48 : 39-40.
- Ito, Y., S.-F., Li, M. Tagawa, H. Araki, M. Goshono, S. Yamamoto, M. Tanaka, M. Narita, K. Tanaka, S.-X. Liu, E. Shikata and T. Sano. 2010. Cultivated grapevines represent a symptomless reservoir for the transmission of Hop stunt viroid to hop crops: 15 years of evolutionary analysis. *PLoS One* 4: e8386.
- James, T., V. Mulholland, C. Jeffries and J. Chard. 2008. First report of Tomato chlorotic dwarf viroid infecting commercial petunia stocks in the United Kingdom. *Plant Pathol.* 57: 400.
- Jiang, S., P. Park and H. Ishii. 2007. Ultrastructural study on scab resistance expressed in epidermal pectin layers of pear leaves. *J. Gen. Plant Pathol.* 73:314-323.
- 兼松誠司・日高 操・村山 徹・石黒 潔. 1998. 山形県寒河江市で分離されたキクわい化ウイロイドについて. *北日本病虫研報.* 49 : 73-75.
- Keese, P. and H. R. Symons. 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA arrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4582-4586.
- Kofalvi, S. A., J. F. Marcos, M. C. Canizares, V. Pallas and T. Candresse. 1997. *Hop stunt viroid* (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: evidence for recombination between HSVd isolates. *J. Gen. Virol.* 78: 3177-3186.
- 楠幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博. 1993. 逆転写－Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によるキク矮化ウイロイドの検出. *関西病虫研報.* 35 : 7-12.
- Laurie, T. M., P. E. Nelson and R. K. Horst. 1987. Histopathology of the chrysanthemum cultivar Bonnie Jean infected with *Chrysanthemum stunt viroid*. *Phytopathology* 77: 655-660.
- Lawson, R. H. 1968. Cineraria varieties as starch lesion test plants for *Chrysanthemum stunt virus*. *Phytopathology* 58: 690-695.
- 李 世訪・畑谷達児・古田和義・堀田治邦・佐野輝男・四方英四郎. 1997. 北海道におけるキク矮化病の発生と電気泳動法およびハイブリダイゼーション法によるキク矮化ウイロイドの検出. *北日本病虫研報.* 48 : 113-117.
- Ling, K. S., J. T. J. Verhoeven, P. R. Singh and K. J. Brown. 2009. First report of a natural infection by Mexican papita viroid and *Tomato chlorotic dwarf viroid* on greenhouse tomatoes in Mexico. *Plant Dis.* 93:1216.
- Ling, K. S. and W. Zhang. 2009. First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in greenhouse tomatoes in Arizona. *Plant Dis.* 93:1075.
- Mahfouze, S. A., M. M. M. El-Shamy and Kh. A. El-DougDoug. 2009. Molecular variability of tomato cultivars to *Potato spindle tuber viroid* infection. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 3: 3321-3329.
- Manzer, F. E. and D. Merriam. 1961. Field transmission of the potato spindle tuber virus and virus X by cultivating and hilling equipment. *Am. Potato J.* 38: 346-352.
- Martinez-Soriano, J. P., J. Galindo-Alonso, M. J. Maroon, I. Yucel, R. D. Smith and O. T. Diener. 1996. *Mexican papita viroid*: putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9397-9401.
- Matousek, J., L. Orctova, J. Ptacek, J. Patzak, P. Dedic, G. Steger and D. Riesner. 2007. Experimental

- transmission of pospiviroid populations to weed species characteristic of potato and hop fields. *J. Virol.* 81: 11891-11899.
- 松下陽介. 2005. アンケートによるキクわい化病の発生実態調査(キクわい化病ミニ特集). *植物防疫.* 60: 455-456.
- Matsuura, S., Y. Matsushita, T. Usugi and S. Tsuda. 2010. Disinfection of *Tomato chlorotic dwarf viroid* by chemical and biological agents. *Crop Protection.* doi:10.1016/j.cropro.2010.05.018.
- Menzel, W. and E. Maiss. 2000. Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) in cultivars of *Argyranthemum frutescens* by RT-PCR-ELISA. *Z. Pflanzenk. Pflanzensch.* 107: 548-552.
- Meshi T., M. Ishikawa, Y. Ohno, Y. Okada, T. Sano, I. Ueda and E. Shikata. 1984. Double-stranded cDNAs of hop stunt viroid are infectious. *J. Biochem.* 95: 1521-1524.
- 森山美徳・杉浦広幸・清田洋次・花田薫. 1996. 熊本県のキクから検出されたキク矮化ウイルス. *九病虫研会報.* 42: 45-47.
- Nakashima, A., M. Hosokawa, S. Maeda and S. Yazawa. 2007. Natural infection of *Chrysanthemum stunt viroid* in dahlia plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 73: 225-227.
- Navarro, B. and R. Flores. 1997. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11262-11267.
- Niblett, C. L., E. Dickson, K. R. Horst and P. C. Romaine. 1980. Additional hosts and an efficient purification procedure for four viroids. *Phytopathology* 70: 610-615.
- Nie, X., P. R. Singh and H. Bostan. 2005. Molecular cloning, secondary structure, and phylogeny of three pospiviroids from ornamental plants. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 1715-2992.
- 大木理. 2009. 汁液接種によるウイルスの分離と判別. p. 28-42. *植物ウイルス同定の基礎.* 日植防. 東京.
- 大沢高志・森田篤・森喜作. 1977. キクウイルス病の防除に関する研究 2, 指標植物への接木接種によるウイルスの検定. *日植病報.* 43: 372-373.
- Owens, R. A., W. R. Hammond, C. R. Gardner, C. M. Kiefer, M. S. Thompson and E. D. Cress. 1986. Site-specific mutagenesis of potato spindle tuber viroid cDNA. *Plant Mol. Bio.* 6: 179-192.
- Owens, R. A., G. Yang, D. Gundersen-Rindal, R. W. Hammond, T. Candresse and M. Bar-Joseph. 2000. Both point mutation and RNA recombination contribute to the sequence diversity of citrus viroid III. *Virus Genes* 20: 243-252.
- Palukaitis, P. and H. R. Symons. 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of *Chrysanthemum Stunt Viroid*. *J. Gen. Virol.* 46: 477-489.
- Polivka, H., U. Staub and H. J. Gross. 1996. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I. *J. Gen. Virol.* 77: 155-161.
- Qi, Y. and B. Ding. 2003. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a non-coding viroid RNA. *The Plant Cell* 15:1360-1374.
- Rakowski, A. G. and R. H. Symons. 1989. Comparative sequence studies of variants of *Avocado sunblotch viroid*. *Virology* 173: 352-356.
- Rakowski, A. G. and H. R. Symons. 1994. Infectivity of linear monomeric transcripts of *Citrus exocortis viroid*: terminal sequence requirements for processing. *Virology* 203: 328-335.
- Rigden, J. E. and M. A. Rezaian. 1992. In vitro synthesis of an infectious viroid: analysis of the infectivity of monomeric linear CEV. *Virology* 186: 210-206.
- Rigden, J. E. and M. A. Rezaian. 1993. Analysis of sequence variation in grapevine yellow speckle viroid 1 reveals two distinct alternative structures for the pathogenic domain. *Virology* 193: 474-477.
- Roistacher C. N., C. E. Calavan and L. R. Blue. 1969. Citrus exocortis virus-chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates. *Plant Dis. Rep.* 53: 333-336.
- Runia, W. Th. and D. Peters. 1980. The response of plant species used in agriculture and horticulture to viroid infections. *Neth. J. Plant Pathol.* 86: 135-146.
- 佐野輝男. ウィロイド (Viroid). 2007. *植物防疫.* 61: 660-664.
- 佐々木真津生・四方英四郎. 1978. ホップ矮化病に関する研究 第 2 報: 病原ウィロイドについて. *日植病報.* 44: 570-577.
- Schindler, I. M. and H. P. Muhlbach. 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerase in *Potato spindle tuber viroid* replication. *Plant Sci.* 84: 221-229.
- Semancik, J. S. 1986. Separation for viroid RNAs by cellulose

- chromatography indicating conformational distinctions. *Virology* 155: 39-45.
- 塩飽邦子・山元義久・岩井豊通. 1996. キクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum Stunt Viroid*) 遺伝子のクローニングと全塩基配列. 兵庫農技研報 (農業) 44: 1-4.
- Simon, A. E. and L. Gehrke. 2009. RNA conformational changes in the life cycles of RNA viruses, viroids, and virus-associated RNAs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1789: 571-583.
- Singh, R. P., A. Boucher, and H. T. Somerville. 1989. Evaluation of chemicals for disinfection of laboratory equipment exposed to *Potato spindle tuber viroid*. *Am. Potato J.* 66: 239-245.
- Singh, R. P. and D. A. Dilworth. 2009. *Tomato chlorotic dwarf viroid* in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 111-116.
- Singh R. P., D. A. Dilworth, K. V. Baranwal and N. K. Gupta. 2006. Detection of *Citrus exocortis viroid*, *Iresine viroid*, and *Tomato chlorotic dwarf viroid* in new ornamental host plants in India. *Plant Dis.* 90:1457.
- Singh, R. P., A. D. Dilworth, X. P. Ao, M. Singh and S. Misra. 2010. Molecular and biological characterization of a severe isolate of *Tomato chlorotic dwarf viroid* containing a novel terminal right (T-R) domain sequence. *Eur. J. Plant Pathol.* 127: 63-72.
- Singh, R. P., X. Nie and M. Singh. 1999. *Tomato chlorotic dwarf viroid*: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J. Gen. Virol.* 80:2823-2828.
- Singh, R. P., J. W. Randles, and A. Hadidi. 2003c. Strategies for the control of viroid disease. p. 295-302 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Singh, R. P., M. F. K. Ready and X. Nie. 2003a. *Biology*. p. 30-48 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Singh, R. P., M. F. M. Ready and X. Nie. 2003b. Viroids of solanaceous species. p. 125-133 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Sugiura, H. and K. Hanada. 1998. *Chrysanthemum stunt viroid*, a disease of large-flowered chrysanthemum in Niigata Prefecture. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 432-438.
- Stark-Lorenzen, P., M.-C. Guitton, R. Wernerand and H.-P. Mühlbach. 1997. Detection and tissue distribution of *Potato spindle tuber viroid* in infected tomato plants by tissue print hybridization. *Arch. Virol.* 142: 1289-1296.
- Steger, G. and D. Riesner. 2003. Molecular characteristics. p. 15-29 In: A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik (eds.), *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Melbourne.
- Szychowski, J. A., G. Vidalakis and J. S. Semancik. 2005. Host-directed processing of *Citrus exocortis viroid*. *J. Gen. Virol.* 86: 473-477.
- Tabler, M. and L. H. Sanger. 1984. Cloned single- and double-stranded DNA copies of *Potato spindle tuber viroid* (PSTV) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious. *EMBO J.* 3: 3055-3062.
- Tabler, M. and L. H. Sanger. 1985. Infectivity studies on different *Potato spindle tuber viroid* (PSTV) RNA synthesized in vitro with SP6 transcription system. *EMBO J.* 4: 2191-2199.
- Takahashi, T. and S. Yamaguchi. 1985. Strategies for preventing mechanical transmission of *Hop stunt viroid*; chemical and heat inactivation on contaminated tools. *Z. Pflkrankh. Pflschutz.* 92: 132-137.
- Vachev, T., D. Ivanova, I. Minkov, M. Tsagris and M. Gozmanova. 2010. Trafficking of the *Potato spindle tuber viroid* between tomato and *Orobanche ramosa*. *Virology* 399: 187-193.
- Verhoeven, J. Th. J., J. S. M. Arts, A. R. Owens and J. W. Roenhorst. 1998. Natural infection of petunia by *Chrysanthemum stunt viroid*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 383-386.
- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen, M. Botermans and J. W. Roenhorst. 2010. Epidemiological evidence that vegetatively propagated, solanaceous plant species act as sources of *Potato spindle tuber viroid* inoculum for tomato. *Plant Pathol.* 59: 3-12.
- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen and J. W. Roenhorst. 2006. First report of Potato virus M and *Chrysanthemum stunt viroid* in *Solanum jasminoides*. *Plant Dis.* 90: 1359.
- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen, W. J. Roenhorst, R. Flores and M. de la Pena. 2009. Pepper chat fruit viroid: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Res.* 144: 209-214.

- Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen and M. T. Willemsen. 2007. First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in *Petunia hybrida* from the United States of America. *Plant Dis.* 91: 324-324.
- Verhoeven, J. T. J. and J. W. Roenhorst. 2010. High stability of original predominant pospiviroid genotype upon mechanical inoculation from ornamentals to potato and tomato. *Arch. Virol.* 155: 269-274.
- Verhoeven J. T. J., C. C. C. Jansen and M. T. Willemsen. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 823-831.
- Visvader, J. E. C. A. Forster and H. R. Symons. 1985. Infectivity and in vitro mutagenesis of monomeric cDNA clones of *Citru exocortis viroid* indicates the site of processing of viroid precursors. *Nucleic Acids Res.* 13: 5843-5856.
- Wassenegger, M., L. R. Spieker, S. Thalmeir, F-U. Gast, L. Riedel and L. H. Sanger. 1996. A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 226: 191-197.
- 山本英樹. 2008. 秋田県におけるキクのウイルス・ウイロイドの発生状況. 秋田県農試特別報. 48 : 99-119.
- Zhong, X., A. J. Anthony, A. A. Amin and B. Ding. 2008. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell* 20: 35-47.
- Zhong, X., X. Tao, J. Stombaugh, N. Leontis and B. Ding. 2007. Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.* 26: 3836-3846.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31: 3406-3415.