

# **ポスピウイルスの包括的検出法の開発と花粉を介した垂直・水平伝染メカニズムの解明**

**Development of comprehensive detection method of pospiviroid and  
elucidation of vertical and horizontal transmission mechanism through  
pospiviroid-infected pollen**

2018 年度

岩手大学大学院連合農学研究科

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

中央農業研究センター

柳澤 広宣

## 目次

第1章 緒言	2
第2章 tomato planta macho viroid 及び pepper chat fruit viroid の宿主範囲・種子伝染	10
第3章 8 種ポスピウイルスの遺伝子診断による網羅的検出法及び種識別法の開発	28
第4章 tomato planta macho viroid 及び potato spindle tuber viroid の感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違	55
第5章 花粉を介した水平及び垂直伝染への tomato planta macho viroid 及び potato spindle tuber viroid の左末端領域の影響	77
第6章 総合考察	100
摘要	109
謝辞	112
引用文献	114

## 第1章

### 緒言

園芸作物を含む農作物の種子の多くが海外において生産され、世界各国の間で流通し、最終的に農産物の生産に用いられている。International Seed Federation (ISF) の調査によると、年間の国際的に流通する種子量の内、輸入量が約 500 万トン（金額ベース：約 110 億ドル）、輸出量が 440 万トン（金額ベース：110 億ドル）となっている（Seed Exports 2016 and Seed Imports 2016, <http://www.worldseed.org/resources/seed-statistics/>）。このことから、莫大な量の種子が世界各国間を移動し、種苗ビジネスとして確立されている。そして、2016 年の日本へ輸入種子量は 47,000 トン、輸出種子量は 9,000 トンとされており（Seed Exports 2016 and Seed imports 2016）、国内の野菜生産に使用される種子の 90%以上が海外で採種された種子である（初田，2013）。また、幼苗においては、2016 年の日本へ輸入された苗数は、4 億 5,000 万本以上に達し、年々増加傾向にあり、また 200 属以上の多種多様な植物が国内へ持ち込まれている（農林水産省植物防疫所，植物検疫統計）。これらの輸入種苗が国内の農業生産資材として用いられている。そのため、国内の農作物の生産には、海外から輸入される種苗無しには成り立たない状況となっている。

これらの種苗の国際的な流通に伴い、ウィロイドは感染種子や無病徴感染した苗によって人知れず侵入し、新たな地域や国に拡散して被害を与えている。海外ではトマト（*Solanum lycopersicum* L.）、ピーマン（*Capsicum annuum*）、キク（*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.）等の植物に、多種のウィロイドが被害を与え（Brunschot et al., 2014 ; Ling and Bledsoe, 2009 ; Ling and Li, 2014 ; Ling and

Zhang, 2009 ; Mehle et al., 2010 ; Nixon et al., 2010 ; Reanwarakorn et al., 2011 ; Steyer et al., 2009 ; Verhoeven et al., 2009 及び 2011a) , ナス科及びキク科の観葉植物では無病徴感染の報告が相次いでいる (Brunschot et al., 2014 ; Gottsberger and Suárez-Mahecha, 2010 ; Luigi et al., 2016 ; Mertelik et al., 2009 ; Ward et al., 2010) . 同様に, 日本国内においても, トマト, ペチュニア (*Petunia*×*hybrid* E. Vilm.) 及びダリア (*Dahlia* spp.) において, 未発生であったウイロイドの発見事例が相次いでおり (Matsushita et al., 2008, 2010 ; Shiraishi et al., 2013 ; Tsushima et al., 2011) , 新たなウイロイドの侵入・発生に対して予断を許さない状況が続いている.

ウイロイドは, 植物病原体の中で最も小さい病原体であり, 長さ 246~475 nt の一本鎖環状 RNA からなり, ウイルスと異なりゲノム上にタンパク質をコードしない (Ding, 2009 ; Flores et al., 2011 ; Hadidi et al., 2017) . また, 1971 年にジャガイモから初めて発見され, 他の病原体に比べ新しい病原体である (Diner et al., 1971) . 植物に感染するウイロイドは, 現在 32 種が報告されており, ゲノムの塩基配列から推定された構造や複製様式の違いからポスピウイロイド科とアブサンウイロイド科の 2 科に分類されている (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) . 前者のポスピウイロイド科の特徴は棒状の 2 次構造を形成し, 5 つの構造・機能領域 (左末端領域 (TL) , 病原性領域 (P) , 中央保存領域 (C) , 可変領域 (V) , 右末端領域 (TR) ) がある. また, 複製は感染細胞の核内において非対称型ローリングサークルと呼ばれる様式をとる (Branch and Robertson, 1984 ; Keese and Symons, 1985) . 一方, 後者のアブサンウイロイド科の特徴は, 中央保存領域 (C) を持たず, ハンマーヘッド型リボザイム活性の保存配列を持ち, 葉緑体で対称型ローリングサークルによって複製す

る．このように，両科は構造・機能及び複製機構に違いがあるが，特に前者のポスピウイロイド科は，5つの領域の機能推定に関する研究が進んでいる．

ポスピウイロイド科に属するポスピウイロイド属には，Table 1-1に記載する9種のウイロイドが存在する．タイプ種はジャガイモやせいもウイロイド（potato spindle tuber viroid, PSTVd）で，他にキク矮化ウイロイド（chrysanthemum stunt viroid, CSVd），カンキツエクソコーティスウイロイド（citrus exocortis viroid, CEVd），columnnea latent viroid (CLVd)，iresine viroid 1 (IVd1)，pepper chat fruit viroid (PCFVd)，tomato apical stunt viroid (TASVd)，トマト退緑萎縮ウイロイド（tomato chlorotic dwarf viroid, TCDVd）及びtomato planta macho viroid (TPMVd)である（Hadidi et al., 2017）．これらのうち，IVd1以外の8種のウイロイドは，トマトやジャガイモ（*S. tuberosum* L.）等の*Solanum*属に感染し，矮化，葉の萎縮や奇形，果実の小型化，茎や葉への壊疽症状を引き起こし，結果として減収をもたらす（Hadidi et al., 2003）．そして，これら8種のウイロイドの内，CSVd及びCEVd以外の国内未発生種である6種のウイロイドは，植物防疫法により，植物検疫上重要な病原体として検疫有害植物に指定され，国内への侵入が強く警戒されている．

輸出入検疫において，これらのウイロイドの検査を行う対象植物を決定するには，ウイロイドの宿主範囲に関する情報が不可欠である．本属の主な宿主範囲は，ジャガイモ，トマト，ペチュニア等のナス科作物，並びにキク，ダリア等のキク科作物である（佐野，2007；Matsushita and Tsuda, 2015）．また，PSTVdは古くから研究されているウイロイドの一種で，11科（ヒユ科，キク科，ナス科，ムラサキ科，キキョウ科，ナデシコ科，ヒルガオ科，マツムシソウ科，ムクロジ科，ゴマノハグサ科，オミナエシ科）の植物に感染することが知られており，宿主範囲についての情報が蓄積されている（Matsushita and Tsuda, 2015；松下陽介・津田新哉，2010a，

2010b) . 一方, TPMVd及びPCFVd の2種のウィロイドは, 他のウィロイドに比べ, 宿主範囲についての情報が十分でない状況にあり, 宿主植物と認識されていない植物に感染して新たなウィロイドの侵入・拡散を引き起こす可能性がある. そのため, 宿主範囲の情報をもとに検査すべき植物を特定し, 輸出国における検査や輸入時に検査を実施することにより, ウィロイドに感染した植物の流通を阻止することが可能となる. これらのことから, さらに精度の高い検査体制を構築するために, ポスピウィロイドの宿主範囲に係る詳細な情報を集積することが求められている.

ポスピウィロイドの伝染方法は, 主に汁液接種, 栄養繁殖による伝染, 種子伝染, 及び花粉伝染が知られており, 限られた環境下ではアブラムシやマルハナバチにより虫媒伝染することがある (Antignus et al., 2007 ; Diner, 1987 ; Hadidi et al., 2017 ; Matsuura et al., 2010) . これらの伝染方法の中で, 特に種子伝染は, その流通に伴いウィロイドが国内外に拡散する可能性が危惧されており, オーストラリアの植物検疫機関による検査において, 商業レベルで流通するトマト種子からPCFVdの検出事例があった (Chambers et al., 2013) . さらにオーストラリアでは輸入トマト種子が原因となって, PSTVdが発生したケースも報告された (Brunschot et al., 2014) . 実際にポスピウィロイドの多くの種 (PSTVd, CEVd, CLVd, CSVd, PCFVd, TASVd) は, 何らかの植物種において種子伝染することが報告されている (Antignus et al., 2007 ; Chung and Pak, 2008 ; Kryczyński et al., 1988 ; Matsushita and Tsuda, 2014, 2016 ; Singh, 1970 ; Singh and Dilworth, 2009 ; Verhoeven et al., 2009) . しかしながら, TPMVdは種子伝染の研究事例が全く無い. 一方, PCFVdはパプリカ (*C. annuum*) で種子伝染することが確認されたが (Verhoeven et al., 2009) , 流通するトマト種子から検出された事例があるにも関わらず (Chambers et al., 2013) , トマトにおける種子伝染について未調査のまま

である．そのため，種子が侵入経路となり得るか判断する上で，トマトを含め宿主植物において種子伝染するか把握することが重要である．

これらのポスピウイルスの拡散を防止するため，日本を含めた世界各国の植物検疫機関が，種苗にウイルスが感染していないことを証明する検査の実施を輸出国に要求している．そして，この検査では，特定のウイルス種だけでなく，ポスピウイルス属全体を対象とする検査が求められている（CRC Plant biosecurity, <http://www.pbcrc.com.au/node/1521/viroid>）．ポスピウイルスの検出法は，これまでに多数報告されてきたが，いずれもポスピウイルスの一部の種のみを対象とした検出系である（Boonham et al., 2004 ; Bostan et al., 2004 ; Botermans et al., 2013 ; Monger et al., 2010 ; Verhoeven et al., 2004）．上述のとおり，ポスピウイルス属に含まれるウイルス種はいずれも甚大な被害を引き起こすため，ポスピウイルス属を包括的に検出可能であり，さらに高感度かつ高精度な検出法が必要とされている．

ウイルスの伝染様式の内，種子及び花粉伝染は，自然界でウイルスが後代に伝染するために重要な伝染方法である．これまでの研究により，母体がウイルスに感染している場合の種子伝染は，ウイルスが胚形成前の生殖細胞の発達段階で，胚珠や花粉に感染し，その後胚に感染することにより種子伝染が成立する（Matsushita and Tsuda, 2014）．一方，ウイルスの感染花粉を介した伝染様式には，後代の種子に伝染する経路（垂直伝染）の他に，感染花粉が受粉された母体がウイルスに感染する伝染経路（水平伝染）の2つの伝染様式が存在する（Card et al., 2007 ; Mink, 1993）．これまでに，PSTVd 及び CSVd の2種はジャガイモやトマトで，感染花粉によって垂直及び水平伝染を引き起こすことが知られている（Fernow et al., 1970 ; Kryczyński et al., 1988 ; Matsushita and Tsuda, 2014 ; Singh

et al., 1992) . このうち、ウイロイドの垂直伝染は、花粉内の精核及び栄養核に局在したウイロイドが授粉後に花粉管の伸長に伴い花柱を通過し、最終的に母本の胚珠に到達することにより成立すると考えられる (Matsushita and Tsuda, 2014 ; Matsushita and Yanagisawa, 2018) . また、ウイルスの場合、感染花粉が健全母株の柱頭に受粉された後、花粉が発芽して柱頭に花粉管が貫入する際、柱頭においてウイルスが感染することが引き金となり、最終的に全身感染を引き起こす (Isogai et al., 2014, 2017) . しかしながら、ウイロイドの水平伝染については、受粉後に花粉内のウイロイドが母本ほどの段階で感染し、全身感染に至るのか、その伝染様式は不明のままである.

ウイロイドは 5 つの構造ドメインの塩基配列の違いにより形成する 2 次構造が変化する. その変化は病原性、感染性、複製能に影響し、1 塩基の変異によっても、生物学的特徴が劇的に変化することが知られている (Hammann and Steger, 2012 ; Hu et al., 1996 ; Owens et al., 1991 ; Owens et al., 1995 ; Owens and Hammond, 2009 ; Tsushima et al., 2016 ; Zhong et al., 2008) . ポスピウイロイド科 Coleviroid 属に属する *coleus blumei viroid 1* (CBVd-1) は、1 塩基の変異により種子伝染率に影響を与え、種子伝染においても塩基配列の相違が関与する (Tsushima and Sano, 2018) . また PSTVd 及び TCDVd は、同属の中で最も近縁の 2 種であるにも関わらず、PSTVd は胚珠に感染し種子伝染するが、TCDVd は胚珠に侵入できず種子伝染することができない (Matsushita et al., 2011) . これらの先行研究から、伝染性に遺伝子配列が関与している可能性が高い. しかしながら、感染花粉を介した垂直及び水平伝染とウイロイドの遺伝子配列との関連性に係る研究は事例がない. そのため、感染花粉を介した伝染性に関与するウイロイドの遺伝子配列の特定は、ウイロイドの伝染拡大を防止する上で、重要な研究テーマである.

以上のことから、本研究では、第 2 章において、国内外へ TPMVd 及び PCFVd が拡散し得る植物種を特定するため、それらの宿主範囲・種子伝染性を明らかにすることにより、宿主範囲・種子伝染が不明であったウイロイド種の感染性・伝染性を解明する。第 3 章では、ポスピウイロイドの国際的検査体制の強化を見越して、情勢に対応した検出系を構築し、感染植物を排除し種苗の流通に伴う新たな発生地域の抑制を図ることを目的に、遺伝子診断による 8 種ポスピウイロイドの網羅的検出及び種識別法を開発する。第 4 章は、ウイロイドの伝染方法のうち、感染花粉を介した伝染方法を明らかにするため、感染花粉授粉後の TPMVd 及び PSTVd の 2 種ウイロイド間の花器官における動態に相違があるか調査する。さらに、第 5 章において、ウイロイドの垂直・水平伝染に関与する遺伝子領域を特定するために、TPMVd 及び PSTVd 間のウイロイドキメラを使用し、ウイロイドの各構造・機能領域の伝染性への影響を調査する。これらの調査・解明を行うことにより、植物検疫の制度向上への貢献とウイロイドフリーの健全種苗を確保することを最終目的とする。

**Table 1-1** List of viroid species in the genus *Pospiviroid*

Viroid			
Genus	No.	Scientific Name	English acronym
Pospiviroid	1	potato spindle tuber viroid	PSTVd
	2	tomato chlorotic dwarf viroid	TCDVd
	3	tomato apical stunt viroid	TASVd
	4	tomato planta macho viroid	TPMVd
	5	colmnea latent viroid	CLVd
	6	pepper chat fruit viroid	PCFVd
	7	iresine viroid 1	IVd1
	8	chrysanthemum stunt viroid	CSVd
	9	citrus exocortis viroid	CEVd

## 第2章

### tomato planta macho viroid 及び pepper chat fruit viroid の 宿主範囲・種子伝染性

**Host ranges and seed transmission of tomato planta macho viroid and pepper chat  
fruit viroid**

*Hironobu Yanagisawa and Yosuke Matsushita*

*European Journal of Plant Pathology*, (2017) 149:211–217

## 要約

TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲について、日本への輸入量の多い園芸植物を含む 10 属 32 種に接種し調査した。植物への接種は機械的接種法である汁液接種を用い、接種後のウイロイド感染の有無は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（reverse-transcription polymerase chain reaction ; RT-PCR）と戻し接種により感染を確認した。接種した 32 種の植物の内、TPMVd は 16 種の植物に、PCFVd は 15 種の植物にそれぞれ感染し、その大半がナス科植物に属する植物種であった。これら植物の内、発病した植物はトマト、ジャガイモ、ピーマン、ペピーノ (*S. muricatum* Aiton) のみで、その他の感染した植物は無病徴感染であった。また TPMVd 及び PCFVd の種子伝染について、感染したトマト、ピーマン、ペチュニアから採種した種子を用い調査した。次に、ペチュニアを用い、健全植物と感染植物間で交配を行い、種子親並びに花粉親の種子伝染に与える影響を調査した。その結果、TPMVd の種子伝染率は、トマトでは 0~4.4%、ペチュニアでは、17.5~43.3%であった。一方 PCFVd の種子伝染率は、トマトでは 0~1.4%、ペチュニアでは 0~16.8%であった。さらにウイロイドが種子伝染する際のウイロイド感染花粉親、又は感染種子親の影響の程度を調査し、TPMVd では花粉親が感染していた場合の種子伝染率は 91.8%、種子親が感染していた場合は 100%の種子伝染率であり、PCFVd の花粉伝染率は 69.2%、種子親由来の伝染率は 65.3%であった。これらのことから、ウイロイドは、無病徴感染した植物、及び感染種子が流通することで発生地域の拡大を招いている可能性がある。

キーワード：PCFVd, TPMVd, ペチュニア, 種子伝染, ナス科, トマト

## 序論

ウイロイドは植物病原体のうち最小の病原体であり、タンパク質をコードしない 250～400 nt の 1 本鎖環状 RNA である (Ding and Itaya, 2007) . ポスピウイロイド科のポスピウイロイド属は、トマト (Diener and Raymer, 1971) やキク (Hadidi et al., 2003) などの植物に対し甚大な被害を与え、本属のタイプ種には PSTVd が含まれる. その他、ポスピウイロイドの複数のウイロイド種 (PSTVd, CSVd, PCFVd, TASVd) が種子伝染することが報告された (Antignus et al., 2007 ; Chung and Pak, 2008 ; Singh, 1970 ; Kryczyński et al., 1988 ; Matsushita and Tsuda, 2014, 2016 ; Singh and Dilworth, 2009 ; Verhoeven et al., 2009) . 今般、これらウイロイドは種子及び苗の流通を通して世界各国に拡散している状況にある (Mertelik et al., 2009 ; Verhoeven et al., 2010, 2012 ; Chambers et al., 2013 ; Shiraishi et al., 2013 ; Brunschot et al., 2014) . それゆえ、新たなウイロイドの拡散を抑制するために、これら植物に対する植物検疫制度、並びに輸入時の検査体制の強化が必要である. また、より正確な検査体制を構築するためには、宿主範囲、並びに種子伝染に係る情報を集積することが必要不可欠である. しかしながら、ポスピウイロイドのうち、TPMVd 及び PCFVd の 2 種ウイロイドの宿主範囲はほとんど知られていない.

TPMVd はメキシコのトマトから初めて発見され (Galindo et al., 1982) , その後 mexican papita viroid (MPVd) がメキシコの *S. cardiophyllum* から新たに発見された (Martínez-Soriano et al., 1996) . そして、Martinez-Soriano et al. (1996) により、MPVd 及び TPMVd は、塩基配列の相同性ではウイロイドの種の分類基準である 90%以上であるが、*Gomphrena globosa* 及び *Nicotiana glutinosa* へ機械的接種を行った際に感染性が異なるとの結果から、別種と提案した. その後、Verhoeven et al. (2011) は、これらの両ウイロイドの *G. globosa* 及び *N. glutinosa* への感受性は同

等であり、また両ウイルスの塩基配列は高い相同性を示すことから、国際ウイルス分類委員会（the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)）に対し、MPVd を TPMVd の 1 種に統合することを提案し決定された（ICTV の分類リスト参照；<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>）。また、2009 年には TPMVd がカナダ及びメキシコのトマト生産地において相次いで発生した（Ling and Bledsoe, 2009；Ling and Zhang, 2009）。TPMVd に感染したトマトは、著しい矮化症状を示し、頂葉には明瞭な上偏生長（エピナスティ）症状や縮葉を引き起こし、最終的には果実収量の低下をもたらす。PCFVd は、2009 年にオランダのパプリカ苗から検出され、ポスピウイルスの新種として報告された（Verhoeven et al., 2009）。この初報告した同年には、カナダのトウガラシ（*C. annuum*）の苗から（Verhoeven et al., 2011a）、2011 年にはタイのトマト苗から PCFVd が発見された（Reanwarakorn et al., 2011）。PCFVd は、パプリカでは果実サイズの小型化を引き起こし、トマトでは他のポスピウイルス同様に矮化症状を引き起こし、葉脈壊疽症状を伴いながら、葉の奇形をもたらす。

これらポスピウイルスは、感染した種苗の輸出入によって、新たな地域や国へ侵入し感染拡大することが危惧される。しかしながら、園芸植物は TPMVd 及び PCFVd の宿主となり得るのか、また感染により病徴を示すか不明であった。また TPMVd の種子伝染が確認された事例は一切無く、PCFVd ではパプリカで種子伝染が報告されているにとどまる（Verhoeven et al., 2009）。それゆえ、本研究では、新たな感染リスクや経済的被害の低減を目的として、これまで不明であった TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲、並びに種子伝染性について調査した。

## 材料および方法

### TPMVd 及び PCFVd 検出用プライマーの設計

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse-transcription polymerase chain reaction ; RT-PCR) による TPMVd 及び PCFVd を検出するため, GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に登録されたポスピウイロイド全種の完全長の塩基配列を比較することにより, 新規の種特異的プライマーを設計した. プライマー設計の際の種特異的塩基配列の探索には, CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) を用い, プライマーは, Primer Express ソフトウェア v3.0.1 (Life Technologies, Japan) を用いて設計した (Table 2-1). 設計した TPMVd 特異的プライマーセット (TPMV-FW/RE) 及び PCFVd 特異的プライマーセット (PCFV-FW/RE) による PCR 産物の予定長は, それぞれ 124bp 及び 330bp となった. 設計した両プライマーセットの特異性の確認は, TPMVd (359 nt, GenBank/EMBL/DDBJ accession no. GQ131573, Verhoeven et al., 2011b), PCFVd (348 nt, HQ731652, Reanwarakorn et al., 2011), 並びにその他のポスピウイロイドに属する 6 種 (PSTVd, 358 nt, EU862231, Matsushita et al., 2010 ; TCDVd, 359 nt, AB329668, Matsushita et al., 2008 ; TASVd, 354 nt, AM777161, Verhoeven et al., 2008 ; CLVd, 374 nt, AY373446, Verhoeven et al., 2004 ; CSVd, 364 nt, X16408, Matsushita et al., 2007 ; CEVd, 372 nt, AB054593, Ito et al., 2002) のゲノム RNA を鋳型にして, 標的ウイロイドのみが検出されるか RT-PCR を行った. さらに, TPMVd 及び PCFVd の全長の塩基配列を取得するためには, 種特異的プライマー設計時と同じソフトウェアを用いて TPM-seq-F/R 及び PCF-seq-F/R の 2 組のプライマーセットを別途設計した (Table 2-1).

## 核酸抽出法・RT-PCR 反応条件

RT-PCR に供する鋳型となる核酸の抽出は、接种植物の上位葉から 0.1 g の葉片を採取し、Dellaporta et al. (1983) の核酸抽出法に従い実施した。

RT-PCR は、OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) を用いて実施した。RT-PCR の反応条件は、48 °C で 30 分間インキュベート後、95 °C で 15 分間の変性を行った後、95°C で 30 秒、60°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルを行った後、72°C で 5 分間の伸長反応を行った。RT-PCR 反応後の PCR 産物は、アガロース S (Nippon Gene, Japan) を使用し 2.0% のアガロースゲルを作製した。泳動バッファーは、1×TAE (40 mM トリス ; 20 mM 酢酸 ; 1 mM EDTA, pH 8.0) バッファーを用いて電気泳動を行った。

## 遺伝子解析

各接种植物に対する種特異的プライマーを用いた RT-PCR による検出の結果、陽性となった植物では、シーケンス用プライマーとして、TPMVd は TPM-seq-F/R を、PCFVd は PCF-seq-F/R を用いて RT-PCR を行った。これらの PCR 産物をダイレクトシーケンス解析により塩基配列を取得し、接種前のウイロイドの塩基配列と比較することにより変異の発生の有無を調査した。

## 宿主範囲調査に用いた植物の選定

これまでに報告のあったポスピウイロイドに含まれる他のウイロイド種の宿主とされる園芸植物 (Matsushita and Tsuda, 2015) を中心に Table 2-2 に記載された植物種に対し接種試験を実施することにより、TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲となり

得るか調査した．これらの園芸植物は，種苗として日本への輸入量が多く，国内へのウイロイドの侵入リスクの高い植物を中心に選定した．

## 接種方法

TPMVd 及び PCFVd の接種試験に用いた接種源は，各ウイロイドが感染したトマト葉 ‘Rutgers’ 0.5 g を重量比で 10 倍容量の 0.1M リン酸バッファー（pH 7.5）で磨砕した溶液を使用し，各接种植物に対し 3 株以上に接種した．接種方法は，子葉展開時にカーボランダムを子葉に振り掛け，磨砕液を塗布することにより汁液接種した．ジャガイモ塊茎の場合は，栽培開始後に形成された新芽に同様の手順で接種した．接種後の植物は，室温 25～27℃．明暗条件は 16/8 時間に設定した恒温室内で生育させ，病徴の有無を調査した．また無病徴感染の可能性もあるため，全ての接种植物に対し RT-PCR を用いてウイロイド感染の有無を確認した．さらに，RT-PCR の結果，陽性となった接种植物では，感染性を有していることを確認するため，これらの接种植物の上位葉を採取し，上記と同法を用いて汁液接種により 3 株の感受性トマト苗 ‘Rutgers’ に戻し接種を実施し，接種 1 ヶ月後までウイロイド様の病徴が再現するか調査した．

## 種子伝染

TPMVd 及び PCFVd の種子伝染について，トマトの 4 品種（‘ペペ’，‘千果’，‘イエローペア’，‘サンチェリー’），ピーマンの 1 品種（‘みよぎ’），並びにペチュニアの 3 品種（‘V26’，‘クリーピア’，‘Vacara’）を用いた．種子伝染を確認するために用いた種子は，各ウイロイドを接種した後 3～5 ヶ月経過した感染苗から採種した．採種した種子は，200 セルの種子トレイに播種し，室温 25～27℃で，明暗条件

16/8 時間に設定した恒温室内で発芽・生育させた。発芽後のペチュニアは 1 ヶ月後、またトマト及びピーマンは 3 ヶ月後まで生育させ、本葉が 4~5 葉展開した段階で、宿主範囲調査と同様の方法を用いて、発芽苗のウイロイド感染の有無を検定した。検定の結果、陽性であった場合には、感受性トマト苗‘Rutgers’への戻し接種を実施した。

次にウイロイド感染花粉を介して種子伝染が生じるか、並びに種子親、又は花粉親のどちらが種子伝染へ関与しているのか調査した。既に PSTVd はペチュニアにおいて感染花粉から直接胚珠に伝染することが報告されている (Matsushita and Tsuda, 2014) 。そのため、PSTVd を比較対象として、TPMVd 及び PCFVd の種子伝染率を比較した。これら 3 種の各ウイロイドについて、花粉交配の試験区として、3 区 (感染種子親×感染花粉；感染種子親×健全花粉；健全種子親×感染花粉) を設定した。交配により形成された種子は、授粉 3 週間後に果実から採種した。そして採種した種子を 200 セルの種子トレイに播種し、発芽後 1 ヶ月以上育成させた後、発芽個体のウイロイドへの感染の有無を宿主範囲の調査と同様の手法によって検定した。

## 結果及び考察

### TPMVd 及び PCFVd 種特異的プライマーの特異性確認

新規に設計した TPMVd 及び PCFVd の種特異的プライマーセット (TPMV-FW/RE 及び PCFV-FW/RE) の特異性を確認するため、ポスピウイロイド 8 種を用いて検出可否を調査した結果、各プライマーセットとも標的ウイロイドである TPMVd 又は PCFVd のみが検出された (Fig. 2-1) 。そのため、これらのプライマ

一を用いて RT-PCR を実施することにより各接种植物へのウイロイド感染の有無を確認した。

### TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲

TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲について、RT-PCR 及び戻し接種を行った。その結果、TPMVd は 16 種、PCFVd は 15 種の植物種に感染した (Table 2-2) 。 TPMVd は、ナス科植物以外にキク科のシュンギク (*Glebionis coronaria* (L.) Cass. ex Spach) への感染が認められた。これまでの研究により、MPVd を含む TPMVd は *Gynura aurantiaca* (Blume) DC., ピーマン, *N. glutinosa*, *Physalis foetens* Poir., *P. philadelphica* Lam., *S. cardiophyllum* Lindl., トマト, *S. nigrescens* M. Martens & Galeotti, *S. rostratum* Dunal 及びジャガイモに感染することが報告された (Galindo et al., 1982・1986) 。 一方、PCFVd は、Verhoeven et al. (2009) により、*Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Sweet, パプリカ, *Lycianthes rantonnetii* Carrière Bitter, ツルハナス (*S. jasminoides* Paxton) 及びナス (*S. melongena* L.) に感染することが報告された。

これらの感染植物の病徴として、TPMVd 及び PCFVd に感染したトマト苗では、いずれも株全体が矮化し、葉の奇形を伴いながら退緑症状を呈し、PCFVd 感染トマトは、葉の葉脈に沿って明瞭な壊疽症状が認められた。また TPMVd 感染トマトの生育後期には、花器の奇形と共に花粉形成しなくなった。TPMVd 及び PCFVd に感染したジャガイモの地上部は、株全体の葉が退緑黄化症状を引き起こし、茎や葉柄に壊疽斑が生じた。また地下部の塊茎は小型化し、塊茎表面は亀裂を生じ壊疽症状が確認された (Fig. 2-2, I) 。 ピーマンでは、両ウイロイド共に矮化や退緑症状は認められなかったが、ウイロイド感染後に形成された果実は、非感染のピーマン

の果実に比べ小型化した (Fig. 2-2, II) . またペピーノは, TPMVd 感染の場合, ウイロイド様の症状が認められなかったが, PCFVd 感染の場合には接種 2 ヶ月経過後に明瞭な矮化症状を呈し, それ以上の成長しなかった (Fig. 2-2, III) . 一方, トマト, ジャガイモ及びペピーノ以外の感染した植物では, 無病徴感染することが確認され, これら 2 種のウイロイドとして, これまでに宿主として報告されていない植物種が含まれていた. しかしながら, 多くの国々において, *Brugmansia* spp., *Cestrum* spp., ダリア, ペチュニア, ツルハナス及びペピーノにポスピウイロイドが無病徴感染していた事例が相次いで報告されている (Mertelik et al., 2009 ; Luigi et al., 2011 ; Tsushima et al., 2011 ; Shiraishi et al., 2013) . それゆえ, これらの園芸植物に対するウイロイド感染の有無について, RT-PCR 等による遺伝子診断技術を用いた検査を実施することが必要であると考ええる.

### 新規宿主における遺伝子変異

TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲調査の結果, ウイロイドの感染が認められた植物種の内, *Datura stramonium* L. に感染した TPMVd のみが, ポスピウイロイドの病原性領域の 4 カ所 (T<sub>304</sub> の欠損, C<sub>305</sub> 及び C<sub>309</sub> が G に置換, A<sub>312</sub> が G に置換) に突然変異が認められた. この *D. stramonium* L. から分離された TPMVd 変異体は, もとの接種源に混在し, *D. stramonium* L. の植物細胞内において選択が生じた可能性がある. また *D. stramonium* L. から分離された TPMVd について TPMVd 感染 *D. stramonium* L. を接種源としてトマトに戻し接種を実施したところ, *D. stramonium* L. に感染した TPMVd 株の病徴は接種に用いた TPMVd 株と同等の病徴あった. そのため, 新たに生じた突然変異はトマトにおける病原性には関与しないと推察された.

## 種子伝染

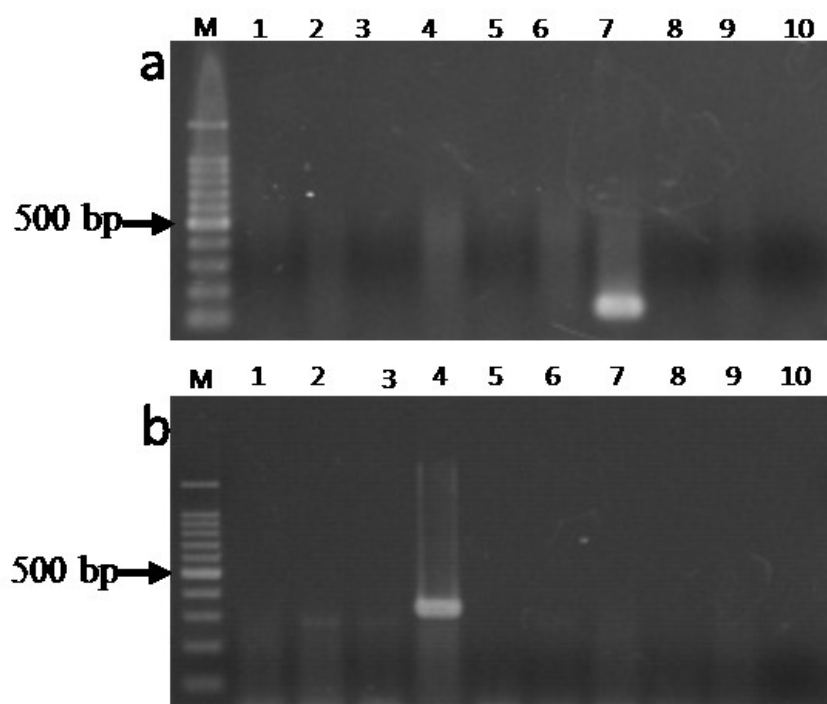
TPMVd 及び PCFVd のトマトにおける種子伝染を調査した。その結果、供試したトマト 4 品種の内、‘イエローペア’のみで TPMVd は 4.4%、PCFVd は 1.4%の種子伝染が確認された (Table 2-3)。またピーマンではどちらのウイルスも種子伝染は認められなかった。一方、ペチュニアにおける TPMVd の種子伝染率は、‘V26’では 17.5%、‘クリーピー’では 43.3%で、PCFVd は、それぞれ 0%及び 16.8%であった。

ペチュニア‘Vacara’を用いたウイルス感染植物と健全植物間の交配試験の結果、種子親及び花粉親がウイルスに感染していた場合の種子伝染率は、それぞれ TPMVd ; 96.4%、PCFVd ; 91.9%、PSTVd ; 96.0%であった。一方で種子親のみが感染していた場合は、TPMVd、PCFVd 及び PSTVd の種子伝染率は、それぞれ 100%、65.3%、97.7%であった。また、花粉親のみが感染していた場合は、TPMVd、PCFVd 及び PSTVd の種子伝染率は、それぞれ 91.8%、69.2%、20.8%であった (Table 2-4)。以上の結果から、種子親のみが感染した場合であっても、種子伝染率は高く維持された。一方で、花粉親のみ感染していた場合は、ウイルス種により大差が認められた。これらの種子伝染した実生苗を接種源として、感受性トマト苗に接種したところ、接種したトマト苗にはウイルス特異的な病徴が再現された。

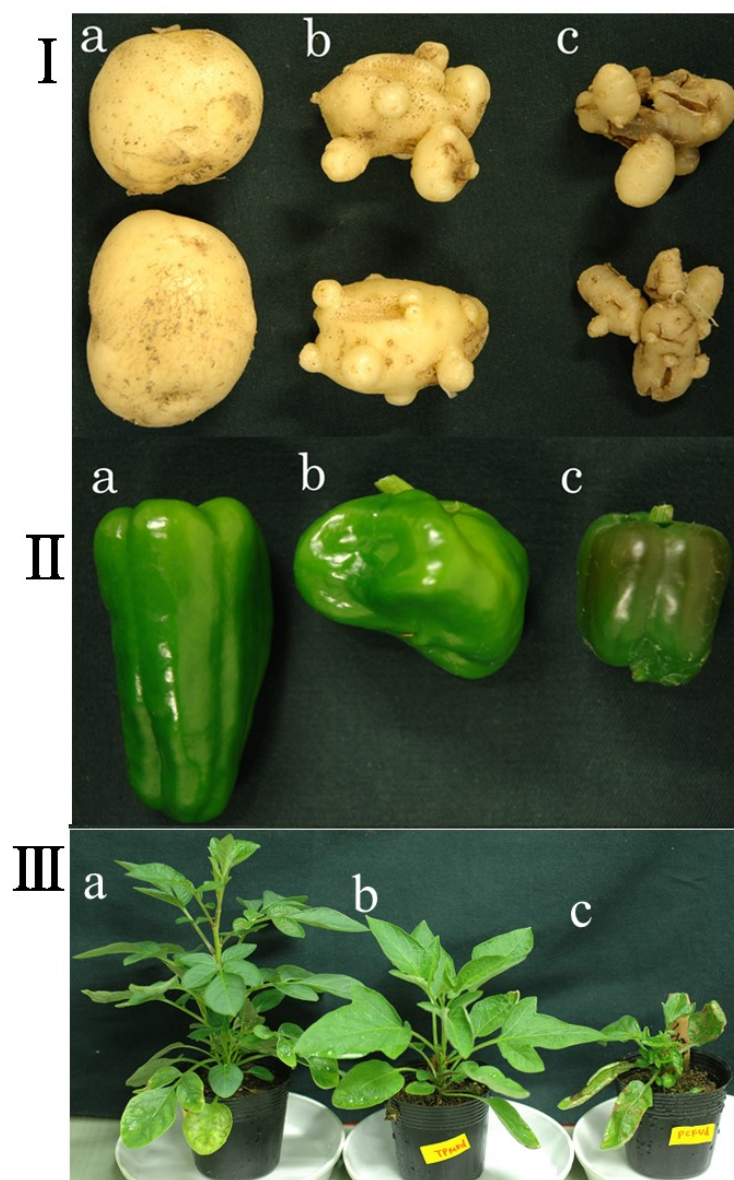
これまでの先行研究により、TCDVd はトマトの胚に侵入するが (Matsushita et al., 2011)，一方で PSTVd はペチュニア及びトマトにおいて胚珠や胚に感染することが明らかにされている (Matsushita and Tsuda, 2014, 2016)。また PSTVd はピーマン及びナスの胚珠に高率に感染することができないため、種子伝染率は低率であった (Matsushita and Tsuda, 2016)。それゆえ、ウイルスの種子伝染にはウイルス

イドが直接胚に感染できるか否かが大きく影響していると考えられた。以上のことから、TPMVd 及び PCFVd は、ペチュニアの種子内の胚及び胚乳に感染していると推察され、種子親又は花粉親のいずれかがウイロイドに感染した場合、種子伝染率は比較的高かった (> 65%)。また種子親及び花粉親の両方がウイロイドに感染していた場合の種子伝染率は、ペチュニア、ジャガイモ及びトマトにおいては、これまでの報告と同様に高かった (Singh, 1970 ; Kryczyński et al., 1988 ; Matsushita and Tsuda, 2014, 2016)。そして、種子伝染した後代のペチュニア苗を接種源として感受性トマト苗に接種したところ、TPMVd 及び PCFVd は、いずれもトマト苗に感染した。それゆえ、これらのウイロイドはペチュニアのように無病徴感染する植物の感染穂木や感染種子を介して多くの国々へ拡散される可能性がある と推察される。

TPMVd 及び PCFVd は、本試験で供試した全てのナス科植物に感染した。しかしながら、その多くの感染植物が無病徴感染であったことから、ウイロイド感染に気付かず、輸出入される可能性がある と推察される。そのため、これらの植物は、ウイロイドが他の地域や国々に拡散するための潜在的な感染源となりうる。また、トマトにおける TPMVd 及び PCFVd の種子伝染は、これまで報告されてこなかったが、実際にオーストラリアの植物検疫機関における検査によりトマト種子 から PCFVd が検出された事例があった (Chambers et al., 2013)。そのため、ウイロイドの侵入リスクを低減させるには、PSTVd を含むポスピウイロイド属に対して、苗や種子を含む植物を包括的にスクリーニング可能な検出技術が必要である と考える。



**Fig. 2-1.** Specificity of designed primer pairs for TPMVd and PCFVd by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). a: The detection results for TPMVd, b: The detection results for PCFVd. Lane 1: PSTVd. Lane 2: TASVd. Lane 3: TCDVd. Lane 4: PCFVd. Lane 5: CSVd. Lane 6: CLVd. Lane 7: TPMVd. Lane 8: CEVd. Lane 9: Healthy tomato. Lane 10: DNase- and RNase-free water. M: 100 bp DNA ladder.



**Fig. 2-2.** Symptoms of *Capsicum annuum* (green pepper) and *Solanum tuberosum* L. (potato) infected with TPMVd and PCFVd. I: *S. tuberosum* L., II: *C. annuum*, III: *S. muricatum* Aiton, a: Healthy plant. b: TPMVd. c: PCFVd.

第 2 章 Table 2-1

**Table 2-1** Primer sets for detection of TPMVd and PCFVd

Target	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Target amplification (Position number)	NCBI accession number
TPMVd	TPMV-FW	GGAGCGAACTGGCGAAGGAG	124	106–125	GQ131573
	TPMV-RE	CGGGCGAGGGTGTCGAC		213–229	
	TPM-seq-F	CTCTGAGTCGACACCCTCGC	357	207–226	
	TPM-seq-R	AGGAAACCCGAAGAAAGGAAGG		183–204	
PCFVd	PCFV-FW	CGGCCGGGAGTGAAGCTAC	330	311–329	HQ731652
	PCFV-RE	TGGAAGAAAAAGCACCTCTG		274–292	
	PCF-seq-F	CCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCC	347	136–159	
	PCF-seq-R	ACCCGCACGGCGCTTCTC		118–135	

## 第 2 章 Table 2-2

**Table 2-2** Host ranges of TPMVd and PCFVd

Plant species		Infection	
Family	Genus	TPMVd	PCFVd
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.	- (0/4)	- (0/4)
	<i>Calendula officinalis</i> L.	- (0/9)	- (0/9)
	<i>Chrysanthemum</i> spp.	- (0/12)	- (0/12)
	<i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.	- (0/4)	- (0/4)
Asteraceae	<i>Glebionis coronaria</i> (L.) Cass. ex Spach	+ (3/8)	- (0/8)
	<i>Helianthus annuus</i> L.	- (0/8)	- (0/8)
	<i>Tagetes erecta</i> L.	- (0/8)	- (0/8)
	<i>T. patula</i> L.	- (0/8)	- (0/8)
Apiaceae	<i>Rudbeckia</i> sp.	- (0/4)	- (0/4)
	<i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk.	- (0/4)	- (0/4)
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	- (0/12)	- (0/12)
	<i>B. rapa</i> L. subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt	- (0/12)	- (0/12)
Campanulaceae	<i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC.	- (0/4)	- (0/4)
Cucurbitaceae	<i>Cucumis melo</i> L.	- (0/4)	- (0/4)
	<i>C. sativus</i> L.	- (0/4)	- (0/4)
Lamiaceae	<i>Salvia splendens</i> Sellow ex Wied-Neuw.	- (0/4)	- (0/4)
Papaveraceae	<i>Papaver</i> sp.	- (0/4)	- (0/4)
Verbenaceae	<i>Verbena</i> sp.	- (0/6)	- (0/6)
	<i>Capsicum annuum</i> L. (red pepper)	+ (4/4)	+ (3/3)
	<i>C. annuum</i> (Paprika)	+ (4/4)	+ (6/6)
	<i>C. annuum</i> (green pepper)	+ (7/7) <sup>a</sup>	+ (7/7) <sup>b</sup>
	<i>Datura metel</i> L.	+ (2/6)	+ (2/5)
	<i>D. stramonium</i> L.	+ (4/8)	+ (2/8)
	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	+ (5/8)	+ (3/8)
	<i>N. glutinosa</i> L.	+ (3/3)	+ (3/3)
	<i>N. rustica</i> L.	+ (3/3)	+ (3/3)
	<i>N. tabacum</i> L.	+ (2/6)	+ (3/6)
Solanaceae	<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> E. Vilm.	+ (3/3)	+ (3/3)
	<i>Physalis alkekengi</i> L.	+ (6/6)	+ (6/6)
	<i>S. lycopersicum</i> L.	+ (3/3) <sup>c</sup>	+ (3/3) <sup>d</sup>
	<i>S. melongena</i> L.	+ (3/6)	+ (3/8)
	<i>S. muricatum</i> Aiton	+ (3/3)	+ (3/3) <sup>c</sup>
	<i>S. tuberosum</i> L.	+ (5/5) <sup>f</sup>	+ (5/5) <sup>f</sup>

+: infected; -: uninfected; nt; non tested; (the number of infected plant/the number of inoculated plant) ; a: fruit size reduction and malformation, b: fruit size reduction, c: stunting, leaf distortion, no pollen d: stunting, leaf yellowing and stunting, e: stunting, f: necrotic lesions on stems and petioles, stunting, tuber cracking and necrosis

**Table 2-3** Seed transmission of TPMVd and PCFVd in tomato, pepper, and petunia

Plant species	Cultivars	Fruit colour/size/shape	Viroid	
			TPMVd	PCFVd
<i>Solanum lycopersicum</i>	Pepe	red/small/round	0/232 <sup>a</sup> (0.0%)	0/214 (0.0%)
	Chika	red/small/round	0/407 (0.0%)	0/392 (0.0%)
	Yellow Pear	yellow/small/pear	13/297 (4.4%)	3/182 (1.4%)
	Sun Cherry	red/small/round	0/103 (0.0%)	0/153 (0.0%)
<i>Capsicum annum</i>	Miyogi	green/normal/normal	0/46 (0.0%)	0/46 (0.0%)
<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>	V26		22/126 (17.5%)	26/155 (16.8%)
	Kuripia		15/31 (43.4%)	0/51 (0.0%)

a: number of test plants infected with viroid/total number of plants

**Table 2-4** Seed transmission of TPMVd, PCFVd ,and PSTVd between viroid-infected and healthy petunia plants

Cross		Viroid		
seed parent	pollen parent	TPMVd	PCFVd	PSTVd
I	I	27/28 (96.4%) <sup>a</sup>	177/216 (91.9%)	24/25 (96.0%)
I	H	16/16 (100.0%)	47/72 (65.3%)	172/176 (97.7%)
H	I	45/49 (91.8%)	83/120 (69.2%)	27/130 (20.8%)

I; infected, H; healthy, a; number of test plants infected with viroid/total number of plants

### 第3章

#### 8 種ポスピウイロイドの遺伝子診断による網羅的検出法及び 種識別法の開発

**Development of a comprehensive molecular based detection and  
identification system for eight pospiviroids.**

*Hironobu Yanagisawa, Yusuke Shiki, Yosuke Matsushita,  
Moritsugu Ooishi, Naoki Takaue and Shinya Tsuda  
European Journal of Plant Pathology (2017) 149:11–23*

## 要約

ポスピウイルスは、トマトを含むナス科作物に甚大な被害をもたらす、一方で多くの園芸作物では無病徴感染する。無病徴感染及び種子伝染は、植物検疫における肉眼検査では見逃す可能性がある。それゆえ本研究では、リアルタイム RT-PCR システムを用いて、遺伝子診断による 8 種のポスピウイルスに対する網羅的検出及び種の同定法を開発した。本検出法は、SYBR Green 法及び TaqMan 法の 2 種のリアルタイム RT-PCR システムを組み合わせたものである。SYBR Green 法を用いた 1 次スクリーニングにより 1 組のユニバーサルプライマーを含む 3 組のプライマーセットにより、8 種の全てのポスピウイルスのスクリーニングを行った。また 1 次スクリーニングのユニバーサルプライマーによって陽性と判断されたサンプルの内、ウイルス種の識別が必要な場合には、各ウイルスの種特異的検出系による TaqMan 法を用いることにより 2 次スクリーニングを実施した。この 2 段階からなる検出系により、トマト種子 400 粒中に 1 粒のウイルスの汚染種子を混入したサンプルからウイルスを検出することができた。本研究により開発した検出法は、トマト種子を介したポスピウイルスの侵入リスクの低減に効果を発揮すると考えられた。

キーワード：リアルタイム PCR, 植物検疫, 検出法, トマト苗, トマト種子

## 序論

ウイロイドは、環状の一本鎖の 246~475 nt の RNA 分子から構成され、植物病原体の中で最も小型である (Flores et al., 2009 ; Hadidi et al., 2017) . そして、ウイロイドは、ポスピウイロイド科とアブサンウイロイド科で構成される (Flores et al., 2009 ; Hadidi et al., 2017) . CSVd, CEVd, CLVd, MPVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd は、ポスピウイロイド科のポスピウイロイド属に属しており、トマトやジャガイモ等の *Solanum* 属に感染し、矮化、葉の萎縮及び奇形、果実の小型化や colour break, 茎や葉への壊疽症状を引き起こし、結果として減収をもたらす (Hadidi et al., 2003) . CLVd, CSVd, PSTVd 及び TASVd は、トマトの種子を介して種子伝染することが知られており (Kryczyński et al., 1988 ; Antignus et al., 2007 ; Matsushita and Tsuda, 2014, 2016) , CEVd はインパチエンス (*Impatiens* sp.) 及びビンカ (*Verbena* sp.) において種子伝染する (Singh et al., 2009) . また PCFVd は、パプリカにおいて種子伝染する (Verhoeven et al., 2009) . 国際的な植物の物流が盛んに行われる中で、日本を含む複数の国々は種子流通を介してこれらのポスピウイロイドが侵入することを強く警戒している. 実際に、オーストラリアの植物検疫機関における検査によって、流通するトマト種子より PCFVd が検出された事例がある (Chambers et al., 2013) . しかしながら、上記のトマトを含む宿主植物におけるポスピウイロイドの種子伝染の一般的なメカニズムはまだほとんど不明である. CLVd, MPVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd 及び TPMVd は、日本の植物防疫所により指定された検疫有害の病原体としてリストに掲載されている (農林水産省) . また同様に多くの国々においてもこれらのウイロイドの侵入が危惧されており、近年植物検疫制度の強化を進められている. それゆえ、国際的に取引される苗や種子等の植物体を対象として、これらのウイロイドを検出するための遺伝子診断法が必要とされている.

通常の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) は、ウイロイドの検出に広く使用され、ポスピウイロイド属のウイロイド種を検出するためのユニバーサルプ

ライマーが開発されている (Bostan et al., 2004 ; Verhoeven et al., 2004) . しかしながら, これらのユニバーサルプライマーは, ポスピウイロイドに属する全種のウイロイドを検出することはできない. さらに, 通常の RT-PCR は, 電気泳動を実施する過程で直接 PCR 産物を扱うため, PCR 産物が飛散した場合にはコンタミネーションを引き起こす恐れがある. 植物検疫における検査では, 正確な検査結果が求められるため, できる限りコンタミネーションのリスクを低減させる必要がある.

ウイロイドを含む植物病原体の検出法として, リアルタイム RT-PCR は, 一般的に検出感度及び特異性が通常 RT-PCR よりも高いとされる (Boonham et al., 2004 ; Monger et al., 2010 ; Botermans et al., 2013) . さらに, リアルタイム PCR は, 電気泳動の工程を必要としない. そのため, 本章では, リアルタイム PCR を用いて 8 種のポスピウイロイドに対する網羅的検出系とウイロイド種の識別法を開発することにした. 本研究において開発した検出法は, SYBR Green 法を採用した 1 次スクリーニングと TaqMan 法による 2 次スクリーニングで構成される. 本検出系は, トマト種子を介するポスピウイロイドの侵入リスクを低減させるための効率的かつ簡便な検出法として効果を発揮するであろう.

## 材料及び方法

### 供試ウイロイド

本試験において供試したウイロイドは, Table 3-1 に記載した複数の感染植物から入手した. また Verhoeven et al. (2011) により MPVd と TPMVd は同一種であると提案されたことから, TPMVd の供試株 (accession no : K00817) は, MPVd と同種として用いた.

### プライマー・プローブの設計

リアルタイム PCR に用いるプライマー及びプローブを設計するため, GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に 2015 年 9 月時点で登録され

たポスピウイロイドの完全長の塩基配列データをもとに CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994) によりアライメントを実施した. 具体的には, データベースに登録された CEVd は 22 株, CLVd は 27 株, CSVd は 13 株, PCFVd は 30 株, PSTVd は 60 株, MPVd は 17 株, TASVd は 20 株, TCDVd は 11 株, TPMVd は 3 株の計 203 株の塩基配列を比較し, Primer Express Software v3.0.1 (Life technologies, Japan) を用いてプライマー及びプローブの設計を行った. SYBR Green 法に用いるポスピウイロイドのユニバーサルプライマーは, 本属の保存性の高い遺伝子領域を見出して設計した. また, 設計したポスピウイロイドのユニバーサルプライマーにより全種のポスピウイロイド及び全ての変異体を検出することが不可能な場合には, ユニバーサルプライマーで検出できないウイロイド種を検出するための種特異的プライマーを設計した. さらに, プライマー設計時には, 同じソフトウェアを用いて, プライマーダイマーが生じないようセルフダイマー及びヘテロダイマーの発生の可能性が低率であることをチェックした.

加えて, 通常の RT-PCR 用によりポスピウイロイドを検出するためのユニバーサルプライマー (Pospiviroid-For/Rev ; Bostan et al., 2004) が, SYBR Green 法に適合するか否かについて試験を行った. また, 当プライマーを基として, 新たに Pospi-For2re 及び Pospi-For3re を設計した (Table 3-2) . Pospi-For2re では, Pospiviroid-For の 3'末端の 3 nt (GAG) を削除し, より多くのポスピウイロイドの変異体を検出できるように改変した. 一方, Pospi-For3re では, Pospi-For2re で実施した 3 nt の削除に加え, Pospiviroid-For の 5'末端に位置する 4 nt (ATTA) をさらに削除した.

次に, ユニバーサルプライマーにより検出される 6 種 (CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd) のウイロイド種を識別するため, TaqMan 法に用いる各ウイロイドの種特異的プライマー及び TaqMan プローブを設計した. そして, TaqMan プローブは, 主にレポーター色素に FAM を, クエンチャー色素に TAMRA をそれぞれ選択した. しかし, これらの色素を選択したプローブの設計

が困難な場合には、クエンチャー色素として MGB (minor groove binder) プローブを選択した。

### ポスピウイロイドの検出手順

ポスピウイロイドの検出法は、リアルタイム RT-PCR を使用し、1 次スクリーニングは SYBR Green 法を、2 次スクリーニングは TaqMan 法を採用した (Fig. 3-1) 。 まず、SYBR Green 法では、6 種 (CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd 及び TPMVd) を検出可能なポスピウイロイドのユニバーサルプライマーセット (6Pospi-F/R) , CLVd 種特異的プライマーセット (CLV-F1/R3) , PCFVd 種特異的プライマーセット (PCFVd-F8/6Pospi-R) の 3 組のプライマーセットにより検出を実施した。また、ユニバーサルプライマーで陽性と判断されたサンプルは、2 次スクリーニングにおいてウイロイド種の識別を実施するため、TaqMan 法を用いた種特異的検出系により実施した。1 次スクリーニングの CLVd 及び PCFVd の種特異的検出系で陽性となった場合には、CLVd 及び PCFVd のいずれかに汚染されていると判断した。そして、1 次スクリーニングにおいて陰性であった場合には、ポスピウイロイドへの汚染は無かったと判断することとした。

### トマト葉及び種子からの RNA 抽出

各ポスピウイロイドに感染した凍結保存トマト 'Rutgers' 葉からのトータル RNA の抽出には、感染葉 0.1 g を採取し、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用い、キット付属のプロトコールに従って実施した。

Hoshino et al. (2006) によりトマト種子のバルクサンプルからのポスピウイロイドの検出には、1 サンプル当たり 400 粒が最適であると提案された。そのため、健全種子 399 粒に日本が特に侵入を警戒する 5 種 (CLVd, PCFVd, PSTVd, TASVd 及び TPMVd) のいずれかのウイロイドの汚染種子 1 粒を混入したサンプルを準備した。各ウイロイドの汚染種子は、各ウイロイドをトマトに接種して、その後 3 ヶ月以上栽培した苗に着果した果実から採種した。採種した種子は、種

子表面に付着してゼリー状の組織を除去するため水道水で2度洗浄し、その後室温で風乾させた。得られた種子のウィロイド感染を確認するために、PSTVd、TASVd 及び TPMVd は、Pospiviroid-For/Rev プライマーセット (Bostan et al., 2004) , CLVd は Vid-FW/RE プライマーセット (Verhoeven et al., 2004) , PCFVd は AP-FW1/RE2 プライマーセット (Verhoeven et al., 2009) を用いて通常の RT-PCR により検出した。また健全種子は健全トマト苗から採種した。

トマト種子からの RNA 抽出は RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて付属のプロトコールを一部改変し実施した。まず、50 ml 容量のコニカルチューブにトマト種子 400 粒を入れ、マルチビーズショッカー (Yasui Kikai, Japan) を用いて 2,000 rpm で 1 分間破碎した。その後、キット付属の RTL バッファーを 10 ml 加え良く攪拌した。次に、2.0 ml 容量のマикроチューブに 1.9 ml を移し、56°C で 2 分間加温した。加温後、その溶液を QIAshredder スピンカラム (キット付属) に移し、15,000 ×g で 2 分間遠心分離し、これ以降の抽出工程は、キット付属のプロトコールに従った。最後に、RNA を溶出するために RNeasy スピンカラムに 50 µL の RNase フリー水を添加した。

### リアルタイム RT-PCR による 1 次スクリーニング

1 次スクリーニングでは、Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて実施した。各 RT-PCR 反応液の組成は、鋳型 RNA 2 µL, RT-PCR Master Mix 10 µL, フォワードプライマー及びリバースプライマーは終濃度 200 nM, RT-Enzyme Mix 0.16 µL に滅菌水を加え反応液量を 20 µL に調整した。また SYBR Green 法における RT-PCR サイクルは、プライマーダイマーの発生を抑えるため、2 ステップ RT-PCR と 3 ステップ RT-PCR の 2 つの反応条件にて実施した (Table 3-2) 。2 ステップ RT-PCR では、48 °C で 30 分間の逆転写反応後、95 °C で 15 分間のヒートショックを行い、95 °C で 30 秒、60 °C で 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 反応を行った。3 ステップ RT-PCR は、48 °C で 30 分間の逆転写反応後、95 °C で 15 分間のヒートショック

を行い、95 °C で 30 秒、60 °C で 30 秒、72°C で 30 秒を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 反応を行った。また、いずれの RT-PCR においても増幅反応後に、特異性を確認するため解離曲線解析を実施した。リアルタイム RT-PCR は、Step One Plus real-time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて、96 ウェルの PCR プレーットのフォーマットを用いた。また 1 次スクリーニングにおいてポスピウイルスの検出用のプライマーセットにより得られた解離温度を測定した。そして、各ウイルスの同一の RNA 鋳型を用いて、10 反復検出を行い、解離温度の平均値を求めた。また SYBR Green 法により得られたそれぞれのプライマーセットから得られた PCR 産物についてダイレクトシーケンスを実施することにより、標的ウイルスが増幅されたか確かめた。

## リアルタイム RT-PCR による 2 次スクリーニング

1 次スクリーニングにおける検定の結果、ユニバーサルプライマーで陽性となった場合には、6 種のウイルス (CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd) の種を識別するために TaqMan RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) を使用して TaqMan 法を用いた 2 次スクリーニングを実施した。各ウイルスの特異的検出系の反応液の組成は次のとおりである。1 µL の鋳型 RNA, 1 × RT-PCR Master Mix, フォワード及びリバースプライマー (終濃度 300 nM), TaqMan プローブ (終濃度 100 nM), 1 × RT-Enzyme Mix を加え、滅菌水で反応液量が 10 µL になるように調整した。RT-PCR の反応条件は、48 °C で 15 分間の逆転写反応の後、95 °C, 10 分間のヒートショックを行い、次に 95 °C, 15 秒の後、60 °C, 1 分間を 1 サイクルとして 40 サイクルの PCR 反応を行った。また検査を実施する際の省力化を図るため、2 次スクリーニングでは遺伝子組換え植物検出の分野で Mano et al. (2009) が開発した「PCR アレイ」と称する検出技術を採用した。具体的には、標的ウイルスの検出のために、各プライマー (終濃度 1.5 µM) 及び TaqMan プローブ (終濃度 0.5 µM) を含む 2 µL を事前に PCR プレーットの各ウェルに分注した。そして、プライマー及びプロ

ブを分注した PCR アレイプレートは、MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用い密封し、最長で 2 ヶ月の間、使用するまでの期間をマイナス 25°Cで冷凍保管した。検出を実施する際には、1  $\mu$ L の鋳型 RNA, 5  $\mu$ L の 2  $\times$  RT-PCR master mix, 0.25  $\mu$ L の 40  $\times$  RT enzyme mix を加え滅菌水により反応液量に 8  $\mu$ L に調整し、PCR アレイプレートの各ウェルに分注した。そして、Step One Plus real-time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, USA) に 96 ウェルプレートにセットしてリアルタイム RT-PCR を実施した。そして、6 種のウイロイド (CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd) の種の識別が必要な場合のみ実施した。

### 検出特異性及び感度

本研究で開発した SYBR Green 法及び TaqMan 法の検出特異性は、8 種のポスピウイロイドのそれぞれの抽出 RNA を用いて確認した。さらに、これらの検出感度は、Table 3-5 に記載した既報の TaqMan 法を用いたリアルタイム RT-PCR 及び通常の RT-PCR と比較した。8 種のポスピウイロイドがそれぞれ感染したトマト葉から抽出した核酸溶液を健全トマト葉の抽出核酸溶液で 5, 25, 125, 625, 3,125, 15,625, 78,125 倍に希釈した。そして、これらの鋳型を使用して、それぞれ 3 反復ずつ実施した。

## 結果

### リアルタイム RT-PCR による 1 次スクリーニング

1 次スクリーニングに用いるユニバーサルプライマーセット (6Pospi-F/R) を設計した。本プライマーセットは 6 種のポスピウイロイド (CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd) 及び CLVd の一部の変異体を検出することができたが、PCFVd を検出することはできなかった。また、Pospiviroid-For/Rev, Pospi-For2/Rev 及び Pospi-For3re/Rev は、SYBR Green 法を用いて 8 種のポスピウイロイドを検出した結果、6 種のウイロイド (PSTVd, TCDVd, TASVd, TPMVd,

CSVd, CEVd) を検出することができた. しかしながら, 健全トマトの葉及び種子から抽出した鋳型RNA, 並びに鋳型RNAを添加しなかったブランクにおいて非特異的反応が生じた (データ未掲載). そのため, SYBR Green法においては, これら3組のプライマーセットは適さなかった.

CLVd及びPCFVdは, Clustal W を用いてアライメント解析を行った結果, 他の6種のウイロイドの塩基配列と異なった. そのため, これら2種のウイロイドを検出するための種特異的プライマーセット (CLV-F1/R3, PCFVd-F8/6Pospi-R) を別途設計した. また, 各プライマー設計時にはプライマーダイマーの発生の可能性が低くなるよう考慮した.

上記の3組のプライマーセット (6Pospi-F/R, CLV-F1/R3, PCFVd-F8/6Pospi-R) を用いて, 8種のポスピウイロイドがそれぞれ感染したトマト葉から抽出したRNAを鋳型としてSYBR Green法により検出した. ユニバーサルプライマーセット (6Pospi-F/R) では, CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd及びCLVd を検出することができ, その際のCt値は14.6–29.5であった (Table 3-4). また, 2ステップRT-PCRと3ステップRT-PCR間で, 各ウイロイドを検出した際のCt値は同様の値を示した. しかし, 2ステップRT-PCRで実施した場合, 健全トマト葉の区においてCt値が37.7になったところで非特異的反応が認められたが, 3ステップRT-PCRの場合には非特異的反応が生じなかった. ユニバーサルプライマーにより検出された各ポスピウイロイドのPCR産物由来の解離温度 (T<sub>m</sub> 値) は, CEVd : 86.99°C, CLVd : 85.44°C, CSVd : 83.27°C, PSTVd : 86.48°C, TASVd : 83.45°C, TCDVd : 85.01°C, TPMVd : 84.73°Cであった (Fig. 3-2). これらの各ウイロイドのT<sub>m</sub>値のうち, CSVdとTASVdの値は類似していたため区別することが困難であったが, 他の5種のウイロイドは識別が可能であった.

CLVd特異的プライマー (CLV-F1/R3) を用いたSYBR Green法では, CLVdをCt値 20.2で検出し, 非特異的反応は生じなかった. 同様に, PCFVd特異的プライマー (PCFVd-8/6Pospi-R) では, PCFVdをCt値 21.9で検出された. この時, CLVd (CLVd-F1/R3) 及びPCFVd (PCFVd-8/6Pospi-R) 特異的プライマーにより

得られたPCR産物の解離温度（T<sub>m</sub>値）は、84.68℃及び84.25℃であった。

### リアルタイムRT-PCRによる2次スクリーニング

リアルタイムRT-PCRを用いて6種のウイロイド（CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd）を識別するために新たに開発した各ウイロイドの検出系の種特異性を確認した。CLVd及びPCFVdを含む8種のウイロイドがそれぞれ感染したトマト葉から抽出したRNAを鋳型として使用して、各ウイロイドの種特異的プライマー・プローブが標的ウイロイドのみを検出できるか調査した。その結果をFig. 3-3に示した。TaqMan法におけるPSTVd特異的検出系では、3反復行った際の平均のCt値は19.8となり、他の7種ウイロイドの感染トマト葉の他、健全トマト葉の試料において非特異的反応は生じなかった（Fig. 3-3, I）。その他の5種のウイロイドの検出系では、それぞれ標的ウイロイドのみが特異的に検出され、そのCt値はCEVdがCt値 21.7（Fig. 3-3, VI）、CSVdがCt値 22.7（Fig. 3-3, V）、TASVdがCt値 22.3（Fig. 3-3, III）、TCDVdがCt値 24.0（Fig. 3-3, II）、TPMVdがCt値 23.8（Fig. 3-3, IV）であった。また、これらウイロイドが各検出系で検出された際、健全トマト及びブランクにおいて非特異的反応は生じなかった。

### 各検出系の検出感度

8種のポスピウイロイドのそれぞれの抽出した鋳型RNAは希釈系列を用いて、通常のRT-PCR法、SYBR Green法、及びTaqMan法によるリアルタイムRT-PCRの3つの異なる検出系に供試し、検出感度を比較した（Table 3-5）。本研究で開発したSYBR Green法及びTaqMan法は、PSTVd及びTCDVdの検出用として報告されたTaqMan法（Boonham et al., 2004）と2法の通常RT-PCR（Behjatnia et al., 1996；Bostan et al., 2004）との間で比較を行った。その結果、PSTVdの場合、3種のリアルタイムRT-PCRの検出系と通常のRT-PCR法であるPospiviroid-For/Revプライマーセットは、3,125倍まで検出することができた。一

方、通常の RT-PCR 法の P3/P4 プライマーセットは、他の検出系よりも検出感度が 5 倍低かった。また TCDVd を検出した場合、TaqMan 法の検出感度は、SYBR Green 法より 5 倍、通常 RT-PCR より 125 倍高かった。TASVd 及び CSVd を検出した場合、TaqMan 法は SYBR Green 法及び通常 RT-PCR よりも、検出感度がそれぞれ 5 倍又は 25 倍高かった。TPMVd 及び CEVd の場合では、SYBR Green 法と TaqMan 法の検出感度は同等であり、通常 RT-PCR より TPMVd では 25 倍、CEVd では 5 倍高かった。次に、SYBR Green 法による CLVd 特異的検出系は、同様に SYBR Green 法を用いたユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）よりも 5 倍検出感度が高く、Vid-FW/RE（Verhoeven et al., 2004）を用いた通常 RT-PCR は、SYBR Green 法よりも 25 倍低かった。PCFVd の場合では、SYBR Green 法が通常 RT-PCR よりも 125 倍高かった（Table 3-5）。また、SYBR Green 法においてユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）により各ウイロイドを検出した結果、検出限界の Ct 値は 37.6 であった。同様に、SYBR Green 法における CLVd 及び PCFVd のそれぞれの検出限界の Ct 値は、36.3 及び 36.5 であった。また、これらの試験を行った際の健全区とブランクでは、非特異的反応は生じなかった。一方、2 次スクリーニングにおける各種特異的検出系の検出限界の Ct 値は、32.7–37.1 の範囲であり、健全区とブランクでは非特異的反応は生じなかった。これらの結果から、1 次及び 2 次スクリーニングの陽性と判断するカットオフ値は 38 に設定した。

### トマト種子からのウイロイド検出

トマト種子を対象とした検査法として本法が有効であることを確認するため、健全トマト種子 399 粒に CLVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TPMVd のいずれか 1 種のウイロイドが感染したトマト種子を混入し、1 サンプル 400 粒の種子サンプルから全 RNA を抽出した。

この抽出 RNA を鋳型とし、ユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）を用いて SYBR Green 法による 1 次スクリーニングを行なった結果、PSTVd は Ct 値 25.2–

26.1 で検出され、Tm 値は 86.43–86.59 であった。同様に、TASVd の Ct 値は 30.6–35.9 で、Tm 値は 83.60–83.78 であり、TPMVd の Ct 値及び Tm 値はそれぞれ 25.1–27.3 及び 84.49–84.79 であった。また CLVd の場合では、SYBR Green 法によるユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）を用いた検出系における Ct 値及び Tm 値は、32.8–34.1 及び 84.70–85.15 であり、CLVd 特異的検出系では、Ct 値 33.7–34.1、Tm 値 84.10–84.40 であった。PCFVd 特異的検出系では、PCFVd は Ct 値 33.7–34.1、Tm 値 84.49–84.80 で検出された。また、これらの各検出系の健全区において、非特異的反応は認められなかった（Table 3-6）。

次に、ユニバーサルプライマー（6Pospi-F/R）により陽性となったサンプルについて、TaqMan 法を用いた 2 次スクリーニングによりウイロイド種の識別を行った。その結果、PSTVd は Ct 値 21.1–22.2 で、TASVd は Ct 値 22.5–25.0 で、TPMVd は Ct 値 22.0–23.9 でそれぞれ標的ウイロイドを特異的に検出し、非特異的反応は生じなかった（Table 3-7）。また 1 次スクリーニングにおける種特異的検出系により検出された CLVd 及び PCFVd は、2 次スクリーニングの各 TaqMan 法では反応しなかった。

## 考察

ポスピウイロイドの宿主として報告のある植物体を流通する場合、多くの国の植物検疫機関がより信頼性の高いポスピウイロイドの検出法による検査を求めている。それゆえ、多数のポスピウイロイドを包括的に検出することが可能な検出法が必要とされている。さらに開発された検出システムが、新しいウイロイドの国内への侵入リスクの低減、並びに健全種苗の確保及び流通を図るため、検出法は高感度で、簡便かつ迅速な方法であることが重要である。

園芸作物の種子の検査を担うオランダ公的機関の Naktuinbouw では、トマト種子からポスピウイロイドを検査する際、1 つのサブサンプルサイズを 1,000 粒とされている。一方、オーストラリアの植物検疫機関では、ポスピウイロイドを対象としたトマト種子の検査の場合、Hoshino et al. (2006) のサブサンプルサイズ

に基づき、1つのサブサンプルサイズは400粒と定めている（Chambers et al., 2013）。Naktuinbouwの採用するプロトコールに記載されるトマト種子の破碎法は、完全に種子を破碎することはできない。一方、Hoshino et al. (2006)の方法は、種子を完全に破碎することができる。Matsushita and Tsuda (2014, 2016)の研究により、トマト及びペチュニア種子において、PSTVdは種子表面だけでなく種子内部の胚及び胚乳に多く存在することが示された。このことから、種子内部のウイロイドを含めて検出するには、種子を完全に破碎することが重要であると考え、Hoshino et al. (2006)の方法に基づき試験を行った。その結果、本研究において開発した検出法をて、CLVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TPMVdのいずれかのウイロイドが感染したトマト種子1粒を含むバルクサンプルから、各ウイロイドを網羅的に検出することに成功した。この結果から、ポスピウイロイドの種子伝染が危惧されるトマト以外の植物の種子に対する検査法としても有効であると考えられた。一方、種子がウイロイドに汚染されていないことを証明するには、Matsushita and Tsuda (2016)により報告されたポスピウイロイドの各植物における種子伝染率に基づいて適切なサンプルサイズを決定する必要があるであろう。本報で開発した検出法は、サブサンプルサイズ400粒の場合には安定して検出することができたが、将来的にはサブサンプルサイズを1,000粒、またはそれ以上のサブサンプルサイズからウイロイドが検出可能か否かを検討したい。それにより、1サンプル当りのサブサンプル数を削減できるため、検査のさらなる効率化に繋がれると考える。

これまでに開発されたポスピウイロイドの検出法は、電気泳動を伴う通常のRT-PCRを基本としているものが多い（Bostan et al., 2004 ; Verhoeven et al., 2004）。しかし、電気泳動は時間を要すること、作業が複雑であること、また直接PCR産物を扱うことからコンタミネーションの発生リスクを高めてしまうことなどの欠点がある。そのため、信頼性の高い検査を実施するには、電気泳動を必要とする通常のRT-PCRによる検出法は避けるべきだと考える。またTaqMan法を用いたリアルタイムRT-PCRは、一般的にポスピウイロイドの検出法として

有効とされている (Boonham et al., 2004 ; Monger et al., 2010 ; Botermans et al., 2013) . TaqMan 法によるウイロイドの検出法を開発するには, 各ウイロイドに対し少なくとも 1 つの TaqMan プローブと 1 組のプライマーが必要となり, ポスピウイロイドの全 8 種を特定するには, 用意するプライマー・TaqMan プローブの数が多くなってしまい, 経費がかさんでしまう. そのため, 可能な限り少数の検出系により, 短時間で確実にポスピウイロイドを検出する手法が必要である.

SYBR Green 法は, TaqMan 法で必須となる TaqMan プローブが不要であり, RT-PCR 反応にはフォワード及びリバースプライマーを設計するためにウイロイドゲノム上の 2 領域のみを必要とする. そのため, SYBR Green 法は, TaqMan 法で必要となるプライマーとプローブの 3 つの遺伝子領域を必要とせず, ポスピウイロイドの属レベルで保存性の高い遺伝子領域を 2 ヶ所選定すれば良いため, 少数の検出系で多種のポスピウイロイドを検出することが容易である. 本研究では, ポスピウイロイドの各ウイロイドとそれらの変異体の塩基配列を比較することにより, ポスピウイロイドの属レベルで高い保存性を示す遺伝子領域を探索しプライマーを設計した. また SYBR Green 法は, PCR 産物の増幅曲線と解離曲線の 2 つの結果を得ることができる. この解離曲線から各ウイロイドの特異的解離温度を参照することで, 陽性と偽陽性とを容易に区別することができる. さらに PCR 産物のゲル電気泳動やシーケンス解析を実施することも, 偽陽性の識別には有効である. 本報では, 各検出法の特性を考慮し, 1 次スクリーニングにおいて SYBR Green 法を用いて, 検出不能なウイロイド種と変異体を可能な限り無い検出法を開発した. さらに, 2 次スクリーニングではポスピウイロイドの種の識別を行うために高い特異性を有する TaqMan 法を採用した.

実際に, SYBR Green 法においてユニバーサルプライマー (6Pospi-F/R) を用いることにより, CEVd, CLVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd の 7 種のウイロイドを検出することができた. 各 PCR の Ct 値は 14.6–29.5 の範囲であったが, この違いは抽出した鋳型 RNA の量に含まれるウイロイド量が異なるためと考えられた. 一方, Bostan et al. (2004) が開発したポスピウイロイドのユ

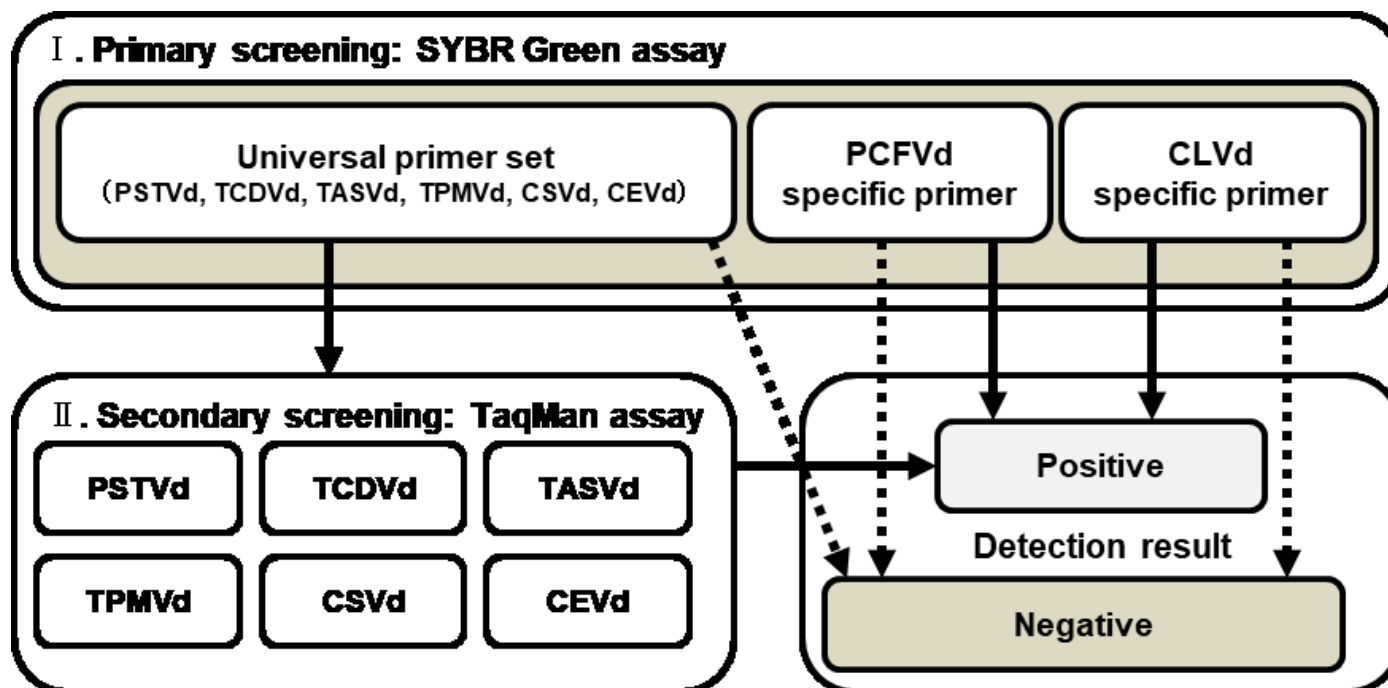
ユニバーサルプライマーセット (Pospiviroid-For/Rev) は、CLVd 及び PCFVd を除く 6 種のウイロイドが検出された。この原因は、このプライマーセットが設計された時点で CLVd 及び PCFVd はまだ発見されておらず、両ウイロイドをプライマー設計時に考慮することができなかったためと考えられた。また、本プライマーセットは非特異的反応が発生した。この要因は、Primer Express Software v3.0.1 による解析結果から、Pospiviroid-For がセルフダイマーを形成することによると推察された。よって、Pospiviroid-For/Rev のプライマーセットは、SYBR Green 法には不適であると考えられた。一方、本報で設計したユニバーサルプライマーセット (6Pospi-F/R) は非特異反応を引き起こさず、7 種のポスピウイロイドを検出した際、陽性・陰性を明確に区別できた。また 1 次及び 2 次スクリーニング法の検出感度は、Boonham et al. (2004) らの TaqMan 法とほぼ同等であり、既報の通常 RT-PCR 法より高感度であった。以上から、本法は既存の方法に比べて高精度にウイロイドを検出できると考えられる。

さらに、CEVd, CLVd, PSTVd, TCDVd 及び TPMVd は、ユニバーサルプライマー (6Pospi-F/R) により得られた各 PCR 産物の解離温度に基づき、ウイロイドの種を識別できた。しかし、CSVd 及び TASVd の解離温度の差は小さく、これら 2 種のウイロイドは区別することができなかった。また、SYBR Green 法は CLVd 及び PCFVd 特異的検出系により、CLVd 及び PCFVd をそれぞれ正確に検出できた。さらにユニバーサルプライマーにより検出された 6 種のウイロイドの種の識別を必要とする場合は、TaqMan 法を用いた 2 次スクリーニングによりウイロイド種を識別することができた。

結論として、本報はトマトに感染し被害を与える 8 種のポスピウイロイドの包括的な検出法を開発した。本検出系は、リアルタイム RT-PCR システムを採用し、1 次及び 2 次スクリーニングの 2 段階から構成される。オーストラリアのクイーンズランド州では輸入トマト種子を原因とした PSTVd の発生報告があり (Brunschot et al., 2014) , ポスピウイロイドを対象とするトマト種子の検査は、国際的な種子の取引や地域間移動の際に非常に重要になっている。また今後、ト

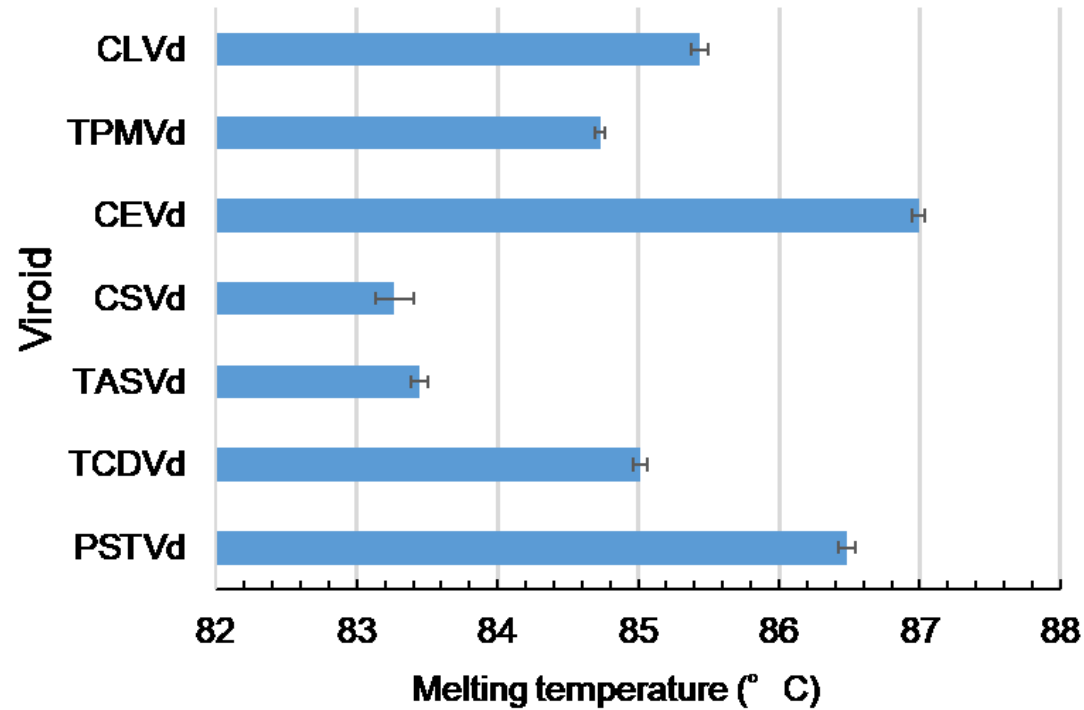
マト以外のポスピウイルスが種子伝染するペチュニア等の他の植物を対象として、本検出法が有効であるか、さらに適用拡大に向け試験が必要である。加えて、検査の信頼性を高めるために、植物由来の RNA を対象とする内部標準、並びに非感染性の陽性コントロールとして *in vitro* 環境下で人工合成した RNA を整備していくことを検討したい。

第 3 章 Fig. 3-1



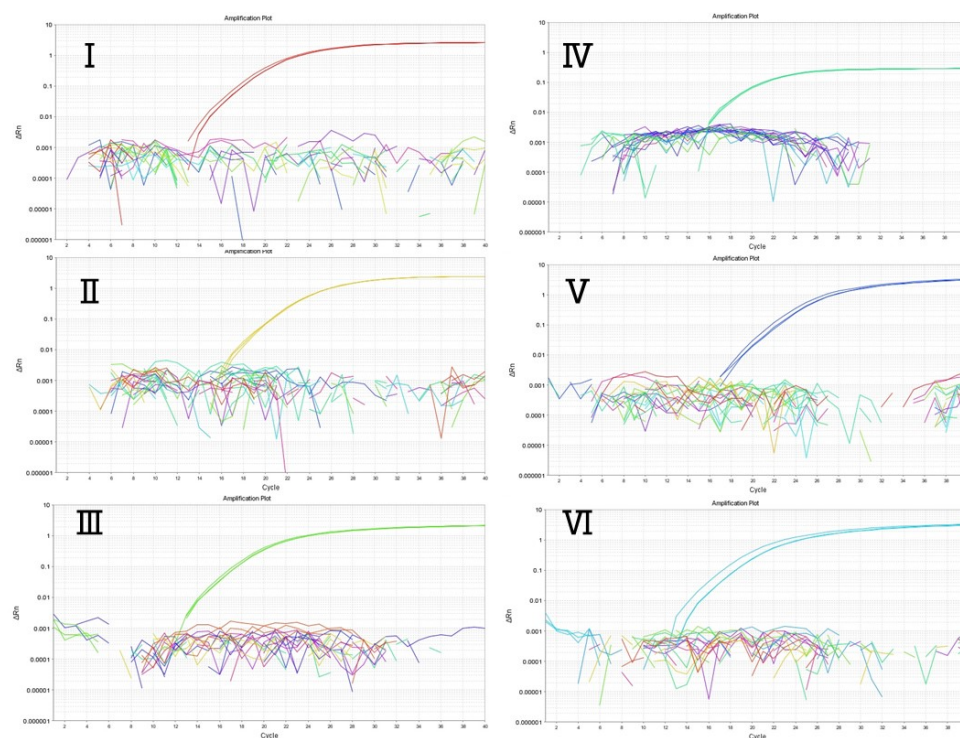
**Fig. 3-1.** Diagram representing the screening process for eight pospivrioids. Solid and dotted lines indicate the positive and negative results, respectively.

第 3 章 Fig. 3-2



**Fig. 3-2.** Mean melting temperature for ten reactions with the universal primer set (6Pospi-F/R) for the detection of CEVd, CSVd, PSTVd, TASVd, TCDVd and TPMVd, CLVd-specific primer (CLV-F1/R3) and PCFVd-specific primer set (PCFVd-8/6Pospi-R) used in the primary screening by SYBR Green real-time RT-PCR method. The mean melting temperatures were as follows: PSTVd, 86.48 °C; TCDVd, 85.01 °C; TASVd, 83.45 °C; CSVd, 83.27 °C; CEVd, 86.99 °C; TPMVd, 84.73 °C; CLVd, 85.44 °C ( $P < 0.05$ ,  $n = 10$ )

第 3 章 Fig. 3-3



**Fig. 3-3.** The results (three replicates per sample) obtained in each assay using the set of specific primer/probe for a viroid species were displayed overlaying in one chart. (I: PSTVd assay, II: TCDVd assay, III: TASVd assay, IV: TPMVd assay, V: CSVd assay, VI: CEVd assay).

**Table 3-1** List of sequences of viroid isolates used to design the primers/probes

Viroid	NCBI accession number (nt)	Host	Origin	Variant numbers
PSTVd	EU862231 (358)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fukushima Prefecture, Japan	60 <sup>a</sup>
TCDVd	AB329668 (359)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hiroshima Prefecture, Japan	11
TASVd	AM777161 (364)	<i>Solanum lycopersicum</i>	J.Th.J. Verhoeven, The Netherlands	20
TPMVd	GQ131573 (359)	<i>Solanum lycopersicum</i>	J.Th.J. Verhoeven, The Netherlands	20 <sup>b</sup>
CLVd	AY372392 (374)	<i>Solanum lycopersicum</i>	J.Th.J. Verhoeven, The Netherlands	27
PCFVd	HQ731652 (348)	<i>Solanum lycopersicum</i>	K. Reanwarakorn, Thailand	30
CSVd	X16408 (354)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Japan	13
CEVd	AB054593 (372)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Japan	22

PSTVd; potato spindle tuber viroid, TCDVd; tomato chlorotic dwarf viroid, TASVd; tomato apical stunt viroid, TPMVd; tomato planta macho viroid, CLVd; colmnea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, CSVd; chrysanthemum stunt viroid, CEVd; citrus exocortis viroid, a; Variants numbers for each pospiviroid registered into this database (GenBank/EMBL/DDBJ). b; Variant numbers of TPMVd including MPVd

**Table 3-2** Primer sets for first screening of eight pospiviroids

Target	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	T <sub>m</sub> ( °C)	Target amplification (Position number)	NCBI accession number
six pospiviroids	6Pospi-F	TCCTGTGGTTCACACCTGACC	59.4	19-39	PSTVd (M88677)
	6Pospi-R	TTCAGTTGTTTCCACCGGGTA	58.9	259-279	
	Pospiviroid-For <sup>a</sup>	ATTAATCCCCGGGGAAACCTGGAG	66.5	89-108	
	Pospi-For2re	ATTAATCCCCGGGGAAACCTG	61.8	89-105	
	Pospi-For3re	ATCCCCGGGAAACCTG	55.0	85-105	
	Pospiviroid-Rev <sup>a</sup>	AGCTTCAGTTGTTTCCACCGGGT	63.9	259-280	
CLVd	CLV-F1	AAGAGCAAGAGCGGTCTCAG	56.1	104-121	CLVd (AY367350)
	CLV-R3	AGGAAAGGAAACCCGAAGAA	56.5	198-217	
PCFVd	PCFV-F8	CCCGAAGCCCGCTTAGG	60.3	34-50	PCFVd (FJ409044)
	6Pospi-R	TTCAGTTGTTTCCACCGGGTA	58.9	259-279	

PSTVd; potato spindle tuber viroid, CLVd; colmnea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, a; Universal primer pair of RT-PCR amplification of the genus Pospiviroid for conventinal RT-PCR (Bostan et al. 2004)

### 第 3 章 Table 3-3

**Table 3-3** Primer and probe sets for six pospiviroids

Target	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Tm ( °C)	Target amplification (Position number)	NCBI accession number
PSTVd	PS-F1	GTGCCCAGCGGYCGAC	64.2	136-151	AB623143
	SM-R1	TAGCCGAAGCGACAGCGC	62.2	242-258	
	P3R	[FAM]CCTGCGGGCGCGAGGAAGGA[TAMRA]	72.3	202-221	
TCDVd	TC-F3	CGGCAGGGAGCTTGTGGAA	63.1	125-143	AB329668
	TC-R2	GCCGAAGCGACAGCGCAAG	66.2	238-256	
	TC-P2	[FAM]CTTCCTTTGCGCGCCACTCGAC[TAMRA]	68.8	206-227	
CSVd	CS-F1	AACGCCTTTTTTCCAATCTTCTTTAGCA	65.4	283-311	DQ409561
	CS-R1	GTCTCGCAGGAGTGGGGTCCTAA	64.5	133-155	
	PU-4	[FAM]TCCTCCAGGTTTCC[MGB]	69.0	94-107	
CEVd	CE-F1	GCARGCAGRAARAGAAARAAGAGGC	69.0	42-66	EF494696
	CE-R2	GATCCGCGGCGACCGAAG	65.8	138-155	
	PU-4	[FAM]TCCTCCAGGTTTCC[MGB]	69.0	99-112	
TASVd	TA-F3	GAGCTTCTCTCTGGAGACT	46.8	242-260	AM777161
	TA-R3	TCGCCCCGAGAGCAAC	57.9	314-329	
	Pospi- -P2	[FAM] ACCCGGTGGAWACA [MGB]	58.0	261-274	
TPMVd	TP-F1	GGGAAACCTGGAGCGAACTG	60.6	97-116	GQ131573
	TPr-R	CGGGCGAGGGTGTGCGAC	62.2	213-229	
	TP-P2R	[FAM]TCTCCCAGACAGGAGTAA[MGB]	68.0	141-158	

PSTVd; potato spindle tuber viroid, TCDVd; tomato chlorotic dwarf viroid, CSVd; chrysanthemum stunt viroid, CEVd; citrus exocortis viroid, TASVd; tomato apical stunt viroid, TPMVd; tomato planta macho viroid, CLVd; colmnea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, [FAM] shows 5' reporter dye. [TAMRA] and [MGB] shows 3' quencher dye.

第 3 章 Table 3-4

**Table 3-4** Detection results of eight pospiviroids in the primary screening

		6Pospi-F/R		CLV-F1/R3	PCFV-F8/6Pospi-R
PCR cycling steps		3	2	3	3
Threshold	Line	0.512	0.512	0.02	0.256
	PSTVd	16.9 <sup>c</sup>	16.9	-	-
	TCDVd	23.0	24.5	-	-
	TASVd	22.3	22.4	-	-
	CSVd	20.0	18.3	-	-
	CEVd	21.2	23.3	-	-
	TPMVd	15.3	14.6	-	-
	CLVd	27.8	29.5	19.4	-
	PCFVd	- <sup>d</sup>	-	-	23.3
	Negative Control <sup>a</sup>	-	37.7	-	-
	NTC <sup>b</sup>	-	-	-	-

PSTVd; potato spindle tuber viroid, TCDVd; tomato chlorotic dwarf viroid, TASVd; tomato apical stunt viroid, CSVd; chrysanthemum stunt viroid, CEVd; citrus exocortis viroid, TPMVd; tomato planta macho viroid, CLVd; colmunea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, a; Healthy tomato, b; non template control (distilled water), c; Mean Ct value of three replicates, d; no detection

### 第 3 章 Table 3-5

**Table 3-5** The detection sensitivity of conventional RT-PCR, SYBR Green, and TaqMan real-time RT-PCR

Target	Detection assay	Primer set	Dilution rate								Nagative Control <sup>b</sup>	Blank <sup>c</sup>	Reference
			1 <sup>a</sup>	5	25	125	625	3,125	15,625	78,125			
PSTVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	20.0 <sup>d</sup>	22.3	23.1	27.3	30.8	37.6	-	-	-	-	In this study
	TaqMan	PS-F1/SM-R1/P3R	19.9	22.6	25.5	30.0	34.5	35.8	-	-	-	-	In this study
		231F/296R/251T	17.0	20.2	23.3	27.4	30.8	33.0	-	-	-	-	Boonham et al. 2004
	RT-PCR	P3/P4	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	Behjatnia et al. 1996
		For/Rev	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	Bostan et al. 2004
TCDVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	26.4	28.9	31.0	33.0	35.1	-	-	-	-	-	In this study
	TaqMan	TC-F3/TC-R2/TC-P2	21.9	24.0	26.4	28.5	30.9	33.8	35.7	-	-	-	In this study
		231F/296R/251T	22.3	24.9	26.2	28.5	30.7	35.3	-	-	-	-	Boonham et al. 2004
	RT-PCR	P3/P4	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	Behjatnia et al. 1996
		For/Rev	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	Bostan et al. 2004
TASVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	24.5	26.5	28.8	31.1	33.5	36.0	-	-	-	-	In this study
	TaqMan	TA-F3/TA-R3/Pospi-P2	22.4	24.6	27.0	29.2	31.9	34.01	36.2	-	-	-	In this study
	RT-PCR	For/Rev	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	Bostan et al. 2004
TPMVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	20.4	22.7	24.1	25.7	28.6	29.4	32.3	-	-	-	In this study
	TaqMan	TP-F1/TPr-R/TP-P2R	20.2	22.5	25.1	27.5	29.8	32.2	34.5	-	-	-	In this study
	RT-PCR	For/Rev	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	Bostan et al. 2004
CSVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	22.6	24.7	27.0	29.4	31.6	34.7	-	-	-	-	In this study
	TaqMan	CS-F1/CS-R1/PU-4	22.8	25.7	27.9	30.4	32.8	35.5	37.1	-	-	-	In this study
	RT-PCR	For/Rev	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	Bostan et al. 2004
CEVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	23.5	25.8	28.3	30.4	32.7	36.5	-	-	-	-	In this study
	TaqMan	CE-F1/CE-R2/PU-4	21.8	24.0	26.3	28.9	31.2	32.7	-	-	-	-	In this study
	RT-PCR	For/Rev	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	Bostan et al. 2004
CLVd	SYBR Green	6Pospi-F/R	21.5	23.6	26.7	29.5	31.3	35.7	-	-	-	-	In this study
		CLV-F1/R3	19.9	22.3	24.5	27.4	30.2	32.8	36.3	-	-	-	In this study
	RT-PCR	Vid-FW/RE	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	Verhoeven et al. 2004
PCFVd	SYBR Green	PCFV-F8/6Pospi-R	21.6	23.3	25.7	28.5	30.6	33.8	36.5	-	-	-	In this study
	RT-PCR	AP-FW1/RE2	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	Verhoeven et al. 2009

PSTVd; potato spindle tuber viroid, TCDVd; tomato chlorotic dwarf viroid, TASVd; tomato apical stunt viroid, TPMVd; tomato planta macho viroid, CSVd; chrysanthemum stunt viroid, CEVd; citrus exocortis viroid, CLVd; colmnea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, a; Nuclec acid extracted from PSTVd before serial dilution, b; Healthy tomato, c; Distilled water, d; Mean Ct value of three replicates, +; Positive, -; Negative

第 3 章 Table 3-6

**Table 3-6** Detection of pospiviroids in tomato seeds using the primary screening

Sample classification	Sample No.	The primary screening (SYBR Green)		
		6Pospi-F/R	PCFV-F8/6Pospi-R	CLV-F1/R3
PSTVd <sup>a</sup>	1	25.5 <sup>e</sup> (86.58) <sup>f</sup>	-	-
	2	26.1 (86.58)	-	-
	3	25.4 (86.59)	-	-
	4	25.2 (86.43)	-	-
TASVd <sup>a</sup>	1	33.0 (83.75)	-	-
	2	30.6 (83.60)	-	-
	3	35.3 (83.78)	-	-
	4	35.9 (83.74)	-	-
TPMVd <sup>a</sup>	1	25.8 (84.79)	-	-
	2	25.1 (84.64)	-	-
	3	27.3 (84.64)	-	-
	4	25.5 (84.49)	-	-
PCFVd <sup>a</sup>	1	- <sup>g</sup>	32.9 (84.80)	-
	2	-	35.5 (84.64)	-
	3	-	33.5 (84.64)	-
	4	-	33.4 (84.49)	-
CLVd <sup>a</sup>	1	32.8 (85.15)	-	33.7 (84.40)
	2	33.9 (84.86)	-	33.9 (84.26)
	3	35.3 (84.85)	-	34.1 (84.25)
	4	34.1 (84.70)	-	34.1 (84.10)
Positive Control <sup>b</sup>		16.5 (86.33 <sup>h</sup> )	21.1 (84.39)	23.1 (84.55)
Negative Control <sup>c</sup>		-	-	-
NTC <sup>d</sup>		-	-	-

PSTVd; potato spindle tuber viroid, TCDVd; tomato chlorotic dwarf viroid, TASVd; tomato apical stunt viroid, TPMVd; tomato planta macho viroid, CSVd; chrysanthemum stunt viroid, CEVd; citrus exocortis viroid, CLVd; colmea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, a; one tomato seed infected with a viroid was mixed with 399 healthy tomato seeds., b; Infected leaf tissue infected with a single viroid in PSTVd, CLVd and PCFVd, c; 400 healthy tomato seeds, d; non template control (distilled water), e; Mean Ct value of three replicates, f; mean of melting temperature (°C) when detecting target viroid, g; no detection, h; mean melting temperature (°C) of PSTVd.

第 3 章 Table 3-7

**Table 3-7** Detection of pospiviroids in tomato seeds using the secondary screening

Sample classification	Sample No.	The secondary screening (TaqMan)					
		PSTVd assay	TCDVd assay	CSVd assay	CEVd assay	TASVd assay	TPMVd assay
PSTVd <sup>a</sup>	1	22.2 <sup>e</sup>	-	-	-	-	-
	2	21.9	-	-	-	-	-
	3	21.1	-	-	-	-	-
	4	21.4	-	-	-	-	-
TASVd <sup>a</sup>	1	- <sup>f</sup>	-	-	-	23.6	-
	2	-	-	-	-	22.5	-
	3	-	-	-	-	24.8	-
	4	-	-	-	-	25.0	-
TPMVd <sup>a</sup>	1	-	-	-	-	-	23.5
	2	-	-	-	-	-	23.9
	3	-	-	-	-	-	22.0
	4	-	-	-	-	-	22.0
PCFVd <sup>a</sup>	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
CLVd <sup>a</sup>	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
Positive Control <sup>b</sup>		18.0	19.7	20.7	26.8	15.9	13.7
Negative Control <sup>c</sup>		-	-	-	-	-	-
NTC <sup>d</sup>		-	-	-	-	-	-

PSTVd; potato spindle tuber viroid, TCDVd; tomato chlorotic dwarf viroid, TASVd; tomato apical stunt viroid, TPMVd; tomato planta macho viroid, CSVd; chrysanthemum stunt viroid, CEVd; citrus exocortis viroid, CLVd; colmnea latent viroid, PCFVd; pepper chat fruit viroid, a; one tomato seed infected with a viroid was mixed with 399 healthy tomato seeds., b; Infected leaf tissue infected with a single viroid in eight viroids, c; 400 healthy tomato seeds, d; non template control (distilled water), e; Mean Ct value of three replicates, f; no detection

## 第 4 章

tomato planta macho viroid 及び potato spindle tuber viroid の  
感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違

Differences in dynamics of horizontal transmission of Tomato planta macho viroid  
and Potato spindle tuber viroid after pollination with viroid-infected pollen.

*Hironobu Yanagisawa and Yosuke Matsushita*

*Virology* (2018) 516:258-264

## 要約

ウイロイドの花粉伝染は後代種子，並びに受粉された植物への伝染を引き起こすため重要な伝染経路の 1 つである．本報において，ペチュニアの感染花粉を介して TPMVd は水平伝染する一方，PSTVd は水平伝染しないことが明らかとなった．本章では，ティッシュプリンティングハイブリダイゼーションを用いて，感染花粉授粉後の花器官におけるウイロイドの分布の変遷を経時的に観察した．その結果，花粉に感染した TPMVd は授粉した柱頭だけでなく花柱や子房で検出された．一方，PSTVd は柱頭や花柱上部では検出されたが，子房では検出されなかった．これらのことから，花粉管の伸長に伴い，ウイロイドが花柱下部や子房で感染することがウイロイドの水平伝染の起点になっていると示唆された．また，健全トマトの柱頭にペチュニアの TPMVd 感染花粉を授粉したところ，TPMVd はトマトに水平伝染した．異種間交配では通常受精しないため，ウイロイドの水平伝染は受精前に授粉した植物体に感染したと考えられた．

**キーワード：**TPMVd, PSTVd, 花粉管, 水平伝染, 垂直伝染, ペチュニア, トマト, 雌しべ, 柱頭, 子房

## 序論

多種のウイルス及びウイロイドが、花粉を介し後代の種子や受粉個体へ伝染することが報告されており、感染花粉から後代の種子へ伝染する経路を垂直伝染、受粉した母体に伝染する経路を水平伝染と定義されている (Card et al., 2007 ; Mink, 1993) . これまでに 15 属及び 1 種の暫定種からなる 45 種のウイルス、並びに 5 属 6 種のウイロイドが垂直伝染及び水平伝染の双方、またはいずれかの様式で伝染することが明らかになっている (Barba et al., 2007 ; Card et al., 2007) . ラズベリーに被害をもたらすラズベリー黄化ウイルス (raspberry bushy dwarf virus) は、感染花粉が健全母株の柱頭に受粉した後、花粉管が柱頭に貫入した際、ウイルスが柱頭に感染することが引き金となり、全身感染を引き起こした (Isogai et al., 2014) . 同様にリンドウ子房輪紋ウイルス (gentian ovary ring-spot virus) は、受粉後柱頭における感染が主因となり、全身感染する (Isogai et al., 2017) . これらの結果から、ウイルス感染花粉が柱頭に貫入することが重要な要因となり、水平伝染を引き起こすことが示された.

ウイロイドは植物病原体の中で最小の病原体であり、長さ 246~475 nt の一本鎖環状 RNA からなり、ゲノム上にタンパク質をコードしない (Flores et al., 2011 ; Hadidi et al., 2017) . ポスピウイロイド科に属するポスピウイロイド属は、以下の 9 種が含まれる ; CSVd, CEVd, CLVd, IVd1, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd 及び TPMVd. これらのウイロイド種のうち、IVd1 を除く 8 種のウイロイドは主にナス科及びキク科植物に感染し、ジャガイモ、トマト、キク等の経済的に重要な作物に対し甚大な被害をもたらす (Hadidi et al., 2017) . 特に、PSTVd 及び CSVd は、ジャガイモ及びトマトにおいて、感染花粉を介して垂直及び水平伝染の両方を引き起こす (Fernow et al., 1970 ; Kryczyński et al., 1988 ; Matsushita and Tsuda, 2014 ; Singh et al., 1992) . これまでの研究により、ウイロイドは胚形成以前に生殖細胞の発達段階で、胚珠や花粉を介して直接的又は間接的に胚に運ばれることによって垂直伝染が成立することが示された (Matsushita and Tsuda, 2014) . また、ウイロイドは感染花粉の精核及び栄養核に局在し、花粉内部のウイロイドが水平伝染の重要な因子であることが示された (Matsushita and Yanagisawa, 2017) . しかし、授粉後に花粉内のウイロイドが母本植物にどのように感染し、その後全身感染に至る感染様式は不明であ

る。また、授粉後に花粉は柱頭で発芽し、花粉管が花柱内の伝達組織をとおり子房に到達する。その後、花粉管は胚珠に到達し受精に至るが、ウイロイドの水平伝染に受精の段階が必須か知られていない。

TPMVd はメキシコにおいてはじめて発見され、トマトに激しい矮化、萎縮症状を呈し、結果として果実収量の減少させた (Galindo et al., 1982)。この TPMVd のペチュニアにおける垂直伝染率は 90%以上と極めて高率であったが、PSTVd の垂直伝染率は約 20%と低率であった (Yanagisawa and Matsushita, 2017)。また、本研究において、TPMVd はペチュニアにおいて感染花粉を介して水平伝染を引き起こす一方で、PSTVd は水平伝染しないことを見出した。それゆえ、ウイロイドの水平伝染はどのように引き起こされるのか、その伝染のメカニズムを解明するため、感染花粉授粉後の花器官における TPMVd 及び PSTVd の分布を比較した。当該目的を達成するため、ウイロイド毎に感染花粉授粉後のペチュニアの花芽及び果実内における分布をティッシュプリンティングハイブリダイゼーション及び RT-PCR を用いて調査した。さらに、水平伝染が成立するためには、受精の過程が必要とするか判断するため異種植物間で交配を行った。

## 材料及び方法

### 供試植物及び生育条件

ペチュニア ‘Vacara’ 苗は、第 2 章に記載した方法に準じ、TPMVd 及び PSTVd を汁液接種により接種した (Yanagisawa and Matsushita, 2017)。接種源は、TPMVd (accession no. GQ131573, 359 nucleotides ; Verhoeven et al., 2011) 又は PSTVd (accession no. EU862231, 358 nucleotides ; Matsushita et al., 2010) の感染トマト ‘Rutgers’ 葉 0.5 g をサンプル重量の 10 倍容量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用いて磨砕液を準備した。接種するペチュニア苗は本葉が 4 葉展開した段階で、各ウイロイドを汁液接種により 3 株ずつ接種した。そして、未接種及び接種後のペチュニア苗は 16/8 時間の明暗条件、室温 25–27°C に設定したグロスチャンバー内で生育させた。各ウイロイドを接種した植物の感染確認は、接種 2 ヶ月後に最上位葉を採取し、リアルタイム RT-PCR を用いて検出し

た．接種後 3 ヶ月以上経過後に，各ウイロイドの感染ペチュニア苗から花粉を採集し，授粉に用いた．同時に，採集した花粉に各ウイロイドが感染していることを確認するため，同様にリアルタイム RT-PCR により検出を行った．

### ウイロイドの感染確認に用いた RT-PCR

接種したペチュニア苗からトータル RNA を抽出し，第 3 章において開発した SYBR Green 法を用いたリアルタイム RT-PCR によりペチュニア植物体内で複製した TPMVd 及び PSTVd を検出した (Yanagisawa et al., 2017) . また，ペチュニア花粉の内部標準としてペチュニアのモノサッカライドトランスporter1 の mRNA (*pmt1*; accession no. AF061106, Ylstra et al., 1998) 上に，検出用プライマーセット (MT-1: 5'-GTC CTC TTC AAG ACT CTG GGA TT-3' ; MT-2, 5'-GTA CCA CAA ATC CAG CAA AGA AG-3') を設計した．ウイロイド検出をリアルタイム RT-PCR を実施した際に，同時に当プライマーセットを用いて，ペチュニア花粉内の mRNA を第 3 章において用いた通常 RT-PCR を用いて検出した (Yanagisawa et al., 2017) .

### ウイロイド感染花粉の発芽率

TPMVd 及び PSTVd 花粉ペチュニア苗，並びに非感染ペチュニア苗から採集した花粉をそれぞれ 15%スクロース及び 1.5%寒天を含む平面培地上で 25℃の条件で培養を行った．花粉の発芽率は発芽培養 24 時間後に調査し，非感染ペチュニア花粉の発芽率と各ウイロイドの感染花粉の発芽率をスチールの多重比較検定を用いて有意差の有無を比較した (Steel, 1959) .

### 花粉のウイロイド感染率

TPMVd 及び PSTVd にそれぞれ感染したペチュニア苗に形成された花粉のウイロイド感染率を調査するため，上述のとおりウイロイド感染ペチュニア苗から花粉を採集し，液体発芽培養液中で培養した (Hirano and Hoshino, 2009) . 培養開始 24 時間後に，先細に加工したマイクロチップを装着した 10 µl 容量マイクロピペットを用いて，発芽花粉 1 粒を含む 2 µl の培養液を採取した．この花粉 1 粒を含む溶液を PCR チューブに分注した 5 µl の RNase フリー水に添加し

た．この作業は，光学顕微鏡 model M125 (Leica, Wetzlar, Germany) を使用し，顕微鏡下で実施した．この溶液は花粉管を破壊するため 95°C，10 分間のヒートショックを行い，溶液総量 7  $\mu$ l のうち 3.5  $\mu$ l は，上述のリアルタイム RT-PCR によるウイロイド検出のための鋳型として供試した．同時に，残りの 3.5  $\mu$ l は，ペチュニア花粉の内部標準として花粉特異的である *pmt1* mRNA の存在を確認するため，RT-PCR の鋳型として使用した．TPMVd 及び PSTVd 感染花粉の感染率の差について，ステューデントの *t* 検定を用いて有意差の有無を確認した (Student, 1908) ．

### 同種及び異種植物間における TPMVd 及び PSTVd の水平伝染

ウイロイド感染花粉を授粉した後の雌しべ及び着果した果実内における TPMVd 及び PSTVd の分布を調査するために，TPMVd 及び PSTVd 感染苗の他，健全区として健全苗からそれぞれ採取した花粉を用いて，健全植物の柱頭に授粉した．また，自家受粉を避けるため，授粉前に母体となる植物の葯を全て除去した．採取した各花粉を未使用の綿棒に乗せ，健全ペチュニアの柱頭に授粉した．授粉した雌しべは，柱頭，花柱及び子房にそれぞれ切り分けて採取した．また，受精後に着果した果実を採取し，果実を萼，果皮，胎座，種子及び果柄にそれぞれ切り分けて採取した．これらのサンプルを採取する際，ウイロイドの混入を避けるため，未使用のカミソリ及びメスをその都度換えて採取した．次に，感染花粉を授粉した後に全身感染を引き起こしているか確認するために，感染花粉を健全ペチュニア苗に授粉し，着果した果実の果柄を授粉 2 及び 3 週間後に，授粉した植物の上位葉を授粉 1，2，3 ヶ月経過時点で採取した．採取したサンプルは，それぞれ上述のリアルタイム RT-PCR を用いて各ウイロイドの有無を検定した．

次に，異種植物間においてウイロイドが水平伝染を引き起こすか調査するために，TPMVd 感染ペチュニア花粉と健全トマト花粉‘マイクロトム’を混合した花粉を健全トマト ‘マイクロトム’ の柱頭に授粉した．混合花粉は，TPMVd 感染ペチュニア花粉と健全トマト花粉をそれぞれ 0.5 g ずつ採取した後，混和して準備した．また上記と同様に，授粉前に健全トマトの葯は全て除去し授粉を実施した．混合花粉は未使用の綿棒に乗せ，健全トマトの柱頭に授粉した．その

後、授粉したトマトの雌しべを採取し、柱頭と子房に切り分けて回収した。また、ウイロイドが全身感染を引き起こすか確認するために、形成された果実及び上位葉を採取して、リアルタイム RT-PCR を用いて検定した。検定の結果、上位葉からウイロイドが検出された場合には、これらの葉を接種源として上述の方法を用いて、トマト‘Rutgers’に接種し感染性の有無を調査した。

### ハイブリダイゼーション用プローブ作製

TPMVd 及び PSTVd のジゴキシゲニン (DIG) 標識マイナス鎖 RNA プローブを作製するため、Matsushita and Tsuda (2014) の方法に準じて、TPMVd (359 nt ; accession no. GQ131573) 及び PSTVd (358 nt ; accession no. EU862231) のいずれかのウイロイドゲノム全長を含むプラスミドを制限酵素サイト *Sa*II により線状にした。その後、DIG-11-UTP ヌクレオチドミックス (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) 及び T7 RNA ポリメラーゼ (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて *in vitro* 転写により RNA プローブを作製した。

### ティッシュプリンティングハイブリダイゼーション

ウイロイド感染花粉授粉後の柱頭、花柱、子房、並びに着果した果実における TPMVd 及び PSTVd の分布パターンを調査するため、ティッシュプリンティングハイブリダイゼーションを実施した。そのため、TPMVd 及び PSTVd 感染ペチュニア苗から採取した花粉、並びに非感染ペチュニア苗から採取した花粉を各試験区あたり 24 株の健全ペチュニア苗に授粉した。授粉した雌しべは、授粉 4 時間及び 24 時間後に各試験区につき 20 サンプルを採取し、授粉 24 日後の果実を各試験区当り 20 個採取した。採取試料は、メンブレン (Hybond-N+ membranes, GE Healthcare Life Sciences, Tokyo, Japan) にプリンティングするため、雌しべ及び果実を半分に切断し、切断面をメンブレンに押し付けた (Fig. 4-1, A 及び 4-2, A) 。プリンティングしたメンブレンは、既報の手法に準じ実施した (Ye and Varner, 1991) 。ウイロイドの検出には、上記で作製した TPMVd 及び PSTVd の DIG ラベリングマイナス鎖 RNA プローブを用いた。発色は、BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を使用した。

## 結果

### 感染花粉を介した TPMVd 及び PSTVd の水平伝染の可否

TPMVd 及び PSTVd がペチュニア花粉を介した水平伝染を引き起こすか評価するため、ウイロイド感染花粉を健全ペチュニアの柱頭に授粉して、その後リアルタイム RT-PCR を用いて授粉後の雌しべ、並びに母株の上位葉からウイロイドの検出を行った。その結果、TPMVd は果実の果柄から、授粉 2 週間後に 24 サンプルの内 2 サンプルで、3 週間後には 24 サンプル中 11 サンプルで検出された。一方、PSTVd は果柄から検出されなかった (Table 4-1)。そして、授粉 3 ヶ月後には、TPMVd は 24 株中 20 株の上位葉で検出されたが、PSTVd は検出されることは無かった。さらに、RT-PCR により陽性となった苗に感染したウイロイドの感染性を確認するため、陽性個体の上位葉を接種源として用い、健全トマトに汁液接種した。その結果、接種後 1 ヶ月が経過したトマト苗は株全体の矮化、葉の奇形及び退緑等のウイロイド様の症状が認められた (データ未掲載)。以上のことから、TPMVd は感染花粉により全身感染を引き起こし、結果として水平伝染した。一方、PSTVd は水平伝染しなかった。

### 感染花粉の発芽率及び感染率

TPMVd 感染、PSTVd 感染、並びに非感染ペチュニア苗から花粉を採取し花粉の平均発芽率を調査したところ、それぞれ 77.3%、72.0%、76.0%であった (Table 4-2)。これらの各区の発芽率に有意差は認められなかった。これらのことから、ウイロイドの種間、並びに感染による花粉発芽への影響は認められなかった。同様に花粉のウイロイドの平均感染率は、TPMVd は 93.3%、PSTVd は 83.3%であった。これらの 2 種のウイロイド間の花粉感染率には有意な差は認められなかった (Table 4-3)。以上の結果をまとめると、TPMVd 及び PSTVd 感染花粉の発芽率及び感染率に差は認められず、TPMVd 及び PSTVd 間に生じた水平伝染性の相違は、花粉側に関連した要因では無いことが確認された。

### TPMVd 及び PSTVd の授粉後の雌しべにおける分布

花粉を介したウイロイドの水平伝染は、授粉後の雌しべにおけるウイロイドの分布の違いによるものか不明であった。それゆえ、ペチュニアにおいて、授粉から受精に至るまでの TPMVd 及び PSTVd の雌しべにおける分布を RT-PCR 及びティッシュプリンティングハイブリダイゼーションを用いて調査した。ティッシュプリンティングハイブリダイゼーションの結果、TPMVd は授粉後 4 時間で柱頭から花柱上部まで侵入し、24 時間後には子房に達した (Fig. 4-1)。一方、PSTVd は柱頭のみで検出された。同様に RT-PCR による結果からも、授粉 24 時間後には TPMVd は雌しべの全ての部位から検出された (Table 4-4)。しかし PSTVd は、花柱下部や子房から検出されなかった。さらに、TPMVd 又は PSTVd 感染花粉を授粉し 24 時間が経過したサンプルは、花粉の内在性コントロールとして用いた *pmt1* mRNA が全て検出された (Table 4-4)。このことから、全サンプルにおいて花粉管が子房に到達したことが確認された。以上のことから、花粉管が雌しべ内を伸長する過程で、花粉内に存在する PSTVd 濃度が減少したことにより、子房から PSTVd が検出されなかったと推察された。

次に、種子形成期である授粉 24 日後の果実をティッシュプリンティングハイブリダイゼーション及び RT-PCR を用いて調査した。その結果、TPMVd は萼、果皮、胎座、種子及び果柄から検出された (Table 4-4 ; Fig. 4-2)。一方、PSTVd は種子からのみ検出された。これらの結果から、TPMVd の水平伝染成立には萼、果皮、又は胎座等の母株由来の組織に感染する必要があると考えられた。また、種子は受精後に成熟するにつれて、徐々に母株の組織から分離することが知られている。そのため、感染花粉を介して種子に感染したウイロイドは垂直伝染を引き起こすが、感染した種子が原因となり水平伝染に至る可能性は低いと推察された。

### 異種植物間における花粉を介した TPMVd の水平伝染

ウイロイドの水平伝染に受精段階が必要か確かめるため、TPMVd 感染ペチュニア花粉と健全トマト花粉の混合花粉を用意し、健全トマトの柱頭に授粉した。そして、授粉した健全トマトの柱頭、子房、並びに授粉により着果した果実の果柄と苗の上位葉から、それぞれリアルタイム RT-PCR を用いて TPMVd を検出した。その結果、授粉 24 時間後に TPMVd はトマトの子房から検出された

(Table 4-5) . 同時に、ペチュニア花粉由来の *pmt1* mRNA はトマトの子房から検出された。また授粉 5 週間後では、授粉後により形成された果実の萼から TPMVd が検出された。さらに 2 ヶ月後にはトマト苗の上位葉でも TPMVd が検出された (Table 4-5) . これらのことから、TPMVd は異種植物間の交配においても水平伝染を引き起こすことが明らかとなった。さらに、ペチュニア感染花粉を介して全身感染したトマト苗の上位葉を接種源として、トマトに戻し接種を行った。その結果、接種 1 ヶ月後にはトマトに株全体の矮化、葉の奇形や退緑等のウイロイド様症状が認められた。さらに接種したトマト苗からリアルタイム RT-PCR により、TPMVd を検出することができた (データ未掲載) . この交配試験により、感染ペチュニア花粉からトマトへの TPMVd の水平伝染には、受精過程は必須ではないと推察された。

## 考察

本研究において、ウイロイド感染花粉をペチュニア及びトマトの柱頭に授粉した後、雌しべにおける TPMVd 及び PSTVd の分布を比較した。その結果、TPMVd は花粉管から移行したウイロイドが花柱下部から子房において感染し、結果的に全身感染を引き起こすことが示唆された。一方で、PSTVd は花柱下部から子房において感染しないため、水平伝染しないと考えられた。また、ティッシュプリンティングハイブリダイゼーション及びリアルタイム RT-PCR を用いて、感染花粉を授粉した後の雌しべにおけるウイロイドの分布を調査した。その結果、TPMVd は花粉管の伸長に伴い花柱から子房において検出された (Table 4-4 ; Fig. 4-1) , さらに果実内の胎座等の母体由来の組織から検出された (Fig. 4-2) . これらのことから、ウイロイドは花粉管から移行し花柱や子房に感染することで、TPMVd の水平伝染が引き起こされることが示唆された。一方、PSTVd は感染花粉から花粉管が伸長した際、花柱下部や子房から検出されることはなかった (Table 4-4) . そして、PSTVd は授粉した母体へ感染することは無く、花粉を介した水平伝染は確認されなかった (Table 4-1) . それゆえ、ウイロイドの水平伝染の成立には、感染花粉の花粉管の伸長の際に、花柱下部から子房にかけてウイロイドが感染する過程が重要な役割を果たしている。さらに、トマトの柱頭に TPMVd 感染ペチュニア花粉を授粉した。その結果、

TPMVd はまず果実に感染し、さらに時間が経過すると授粉した母体は全身感染を引き起こした (Table 4-5) . ナス科植物において異種間交配を行った場合、花粉管は花柱を経て子房に到達するが、花粉管は胚珠に到達する前に停止するとされる (Baek et al., 2015) . さらに peach latent mosaic viroid は感染花粉を介して水平伝染を引き起こしたが、垂直伝染を引き起こさなかったとの報告がある (Barba et al., 2007) . 以上のことから、受精過程がウイロイドの水平伝染に必須でないことが推察された. また、これらの調査結果から、花粉管が胚珠に侵入しなくとも水平伝染が生じるという仮説が裏付けられる.

これまでの研究において、TPMVd は感染した花粉内の精核及び栄養核に局在することを見出した (Matsushita and Yanagisawa, 2017) . またウイロイド感染花粉の表面を洗浄し、得られた洗浄液を健全トマトに接種したが感染しなかったことから (データ未掲載) , 水平伝染は花粉の表面に存在するウイロイドが原因ではないと推察される. したがって、花粉粒子内に存在するウイロイドが水平伝染の重要な要因であると考えられた. 花粉管は花柱の伝達組織を通過し、続いて胚珠に入る (Geitmann and Palanivelu, 2007) . そのため、花粉管から持ち込まれた TPMVd は子房に感染し、その結果として水平伝染が成立すると推察される. 花粉管が伸長する際、花粉の伸長に必要な成分は、花粉管の先端においてエクソサイトーシス及びエンドサイトーシスによって輸送される (Cheung and Wu, 2008 ; Hepler et al., 2001) . そのため、花粉管伸長に必要な成分と混在したウイロイド RNA は、過剰な花粉管の成長成分が排出される際に、花粉管の外へ放出される可能性がある. また現時点では、ウイロイドが花粉管から花柱の伝達組織にどのように移行するのかは不明であり、今後の研究でさらに調査が必要である.

受精後の胚珠は、周辺組織と連結する原形質連絡の欠如により独立し、また胚はカロース層によって母体植物から物理的に分離され、カロースバリアが発達する (Mink, 1993 ; Singh and Mathur, 2004) . 花粉内の精核に存在するウイロイドは、花粉管を通り直接的に胚嚢に侵入する (Matsushita and Tsuda, 2014) . それゆえ、受精後に胚珠から胎座にウイロイドが伝染することは困難であると考えられる. さらに、シンクソース関係によると (Wardlaw,

1990) , 開花後の胚珠及び発達中の種子内の胚は生殖ステージにおける主なシンクであることから、栄養成分が胚の外部や胚珠から胎座へ逆流することは困難であると推察される。したがって、胚珠及び胚に存在するウイロイドは、移行することは困難であるため、胚珠に感染するウイロイドが逆流することによって水平伝染が引き起こされる可能性は低いと考えられる。さらに、これらの結果から、ウイロイドは花粉管から花柱組織へ移行した後、子房に伝搬され全身感染をもたらすという仮説を支持するものであった。

PSTVd 及び TPMVd 間の花粉の感染率に差は認められず (Table 4-3) , 感染花粉の発芽率は 70%を超え、未感染花粉の発芽率と同等であった (Table 4-2) . これらの観察結果から、ウイロイド感染は花粉発芽率、又は花粉管の伸長に影響していないと考えられる。さらに組織化学的な解析により、PSTVd 及び TPMVd の両ウイロイドは、感染花粉内の精核及び栄養核に局在することが示され、花粉粒子内のウイロイドの分布には、これらの 2 種ウイロイド間に差は認められなかった (Matsushita and Tsuda, 2014 ; Matsushita and Yanagisawa, 2017) . また各ウイロイド感染花粉から作製した接種源をもとに 3 株の健全トマトに接種した結果、全ての接種したトマトは各ウイロイドに感染した (データ未掲載) . そのため、花粉粒子内の両ウイロイドは植物に感染する活性を有していると推察された。しかしながら、PSTVd 感染花粉は花柱から子房に花粉管が伸長し子房に到達したが、PSTVd は花柱下部や子房から検出されることは無かった (Table 4-3) . さらに、異なる検出法として Pospil-FW/RE (Verhoeven et al., 2004) 及び P1/P2 (Gross et al., 1978) の 2 組のプライマーセットを用いた通常の RT-PCR によっても検出を試みたが、同様に花柱下部や子房から PSTVd は検出されなかった (データ未掲載) . これらの結果はいずれも、PSTVd が水平伝染を引き起こしにくいことを強く支持し (Table 4-1) , 花粉管が花柱の伝達組織を通して伸長するにつれ、花粉管内の PSTVd の量が徐々に減少している可能性を示唆している。以上のことから、花粉粒子内の PSTVd 濃度は、RT-PCR 及びティッシュプリンティングハイブリダイゼーションの検出限界以下にまで低下したと考えられた。しかしながら、PSTVd は受精後の種子から検出された (Table 4-4) . このことから、花粉に残存した少量の PSTVd

が胚珠に到達し、種子形成に伴ってウイロイドが複製したと考えられる。それゆえ、PSTVd は子房に十分な量のウイロイドが到達することができないために、水平伝染を引き起こすことができなかったと推察された。

各ウイロイドの感染ペチュニアから採取した花粉のウイロイド感染率は 80% 以上と極めて高く (Table 4-3) , 感染花粉の発芽率は PSTVd と TPMVd の間で有意差は認められなかった (Table 4-2) . それにも関わらず、PSTVd の垂直伝染率は 20% と低く、TPMVd の垂直伝染率は 90% を超えていた (Yanagisawa and Matsushita, 2017) . さらに、授粉 24 時間に検定した花柱及び子房のサンプルからはいずれも PSTVd は検出されなかったが、授粉 24 日後には果実内の種子からウイロイドが検出された。これらの結果から、PSTVd の濃度が RT-PCR の検出限界よりも低下するにも関わらず、受精後の種子の発達に伴い PSTVd の複製が十分に行われたため、RT-PCR で再び検出できる濃度に増加したと推察された。また、これらの結果は、受精直後に PSTVd が検出されなかったが、胚珠の発達の際に PSTVd の特異的シグナルが増加したことを示すこれまでの先行研究の結果とも一致した (Matsushita and Tsuda, 2014) . 上述のとおり、花粉内の PSTVd の濃度は花粉管の伸長中に徐々に減少し、花柱下部では検出されなかった。しかし、感染ペチュニアから採取した感染花粉を液体培地で発芽させた際には、花粉発芽後もウイロイドは消失することは無かった (Table 4-3) . これらの結果から、花粉内の PSTVd は花粉管が花柱を通過する場合のみ消失することが示唆された。ウイロイド RNA は、植物細胞における RNA サイレンシングの標的であり、低分子二本鎖 RNA (siRNA) を産生するための Dicer-like タンパク質による切断の標的となる (Itaya et al., 2001 ; Kovalskaya and Hammond, 2014) . したがって、ウイロイド RNA は、花柱における RNA サイレンシングにより分解が生じている可能性がある。ウイロイド RNA の分解機構に RNA サイレンシングが関与していることを確認するには、ウイロイド由来の siRNA を検出する必要があるが、現時点では、花粉管が花柱を通過した際、なぜ PSTVd は消失し、TPMVd が消失しないのかは不明である。TPMVd が一貫して花柱及び子房に存在可能であることを考慮すると、花柱には PSTVd を配列特異的に分解するシステムがあると推察された。

本研究では、PSTVd 及び TPMVd のそれぞれ 1 変異体の間で水平伝染性に差異が認められた。しかし、PSTVd 及び TPMVd の両ウイロイドには多くの変異体が GenBank/EMBL/DDBJ に登録されている (Yanagisawa et al., 2017)。ウイルス・ウイロイドの系統及び宿主植物の組合せは、種子伝染率に影響を示す (Roberts et al., 2003)。またウイロイドの構造モチーフは宿主植物における RNA サイレンシング、病原性、ウイロイドの移行及び複製力に関与することが知られている (Flores et al., 2009 ; Owens and Hammond, 2009 ; Takeda and Ding, 2009)。したがって、ウイロイドが水平伝染するか否かは、ウイロイドの変異体の構造を決定する塩基配列に影響を受けると推察される。それゆえ、本試験で供試した PSTVd 以外の PSTVd 変異体の中に水平伝染を引き起こす変異体が存在する可能性が考えられる。

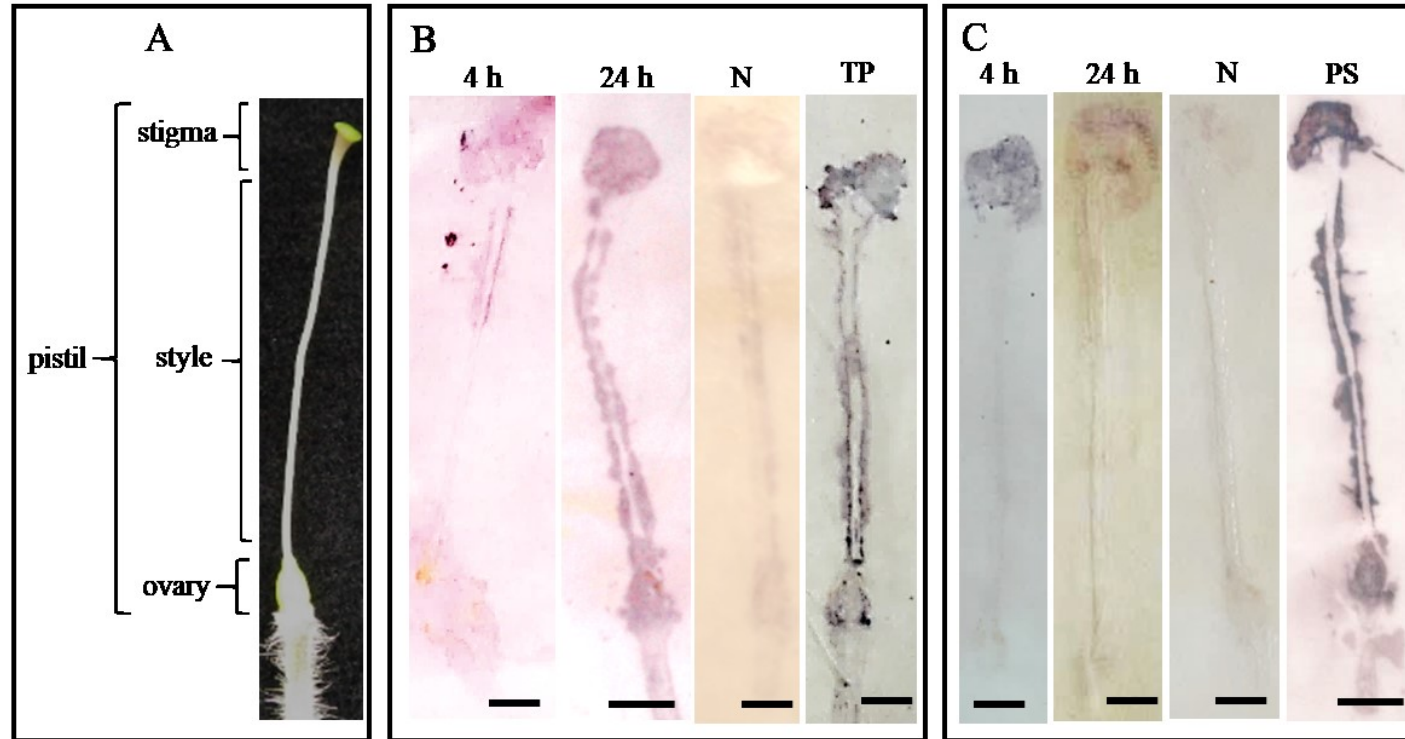
花粉を介した異種植物間のウイルス感染に関して、リンドウ子房輪紋ウイルス (gentian ovary ring-spot virus) はリンドウ (*Gentiana triflora* ; リンドウ科) の感染花粉により *N. benthamiana* (ナス科) に伝染し、異種植物間においてウイルスが水平伝染を引き起こすことが報告された (Isogai et al., 2017)。本研究において、TPMVd 感染ペチュニア花粉をトマトに授粉することにより、TPMVd はトマトへ水平伝染を引き起こした (Table 4-5)。これらの結果は、ウイロイドが自然界及び栽培中に水平伝染により、他の植物種に感染する可能性を示唆している。この伝染経路はウイロイドが新たな感受性植物と接することにより、ウイロイドの宿主範囲を拡大する機会をもたらしていると考えられる。さらに、新たな宿主へ感染したウイロイドは、新たなウイロイド変異体を生じさせる (Kawaguchi-Ito et al., 2009 ; Matoušek et al., 2008 ; Matsushita and Kumar, 2009 ; Suzuki et al., 2017 ; Yanagisawa and Matsushita, 2017)。それゆえ、ウイロイド感染花粉を通して新たな宿主への水平伝染することによって、新たなウイロイド変異体を産生する可能性がある。

一般の農産物の栽培施設では、授粉効率を高める目的でマルハナバチが広く用いられている。しかしながら、TASVd 及び TCDVd の 2 種ウイロイドは、マルハナバチの下顎に付着したウイロイドを含む汁液を通して、虫媒伝染することが報告されている (Antignus et al., 2007 ; Matsuura et al., 2010)。あるいは、

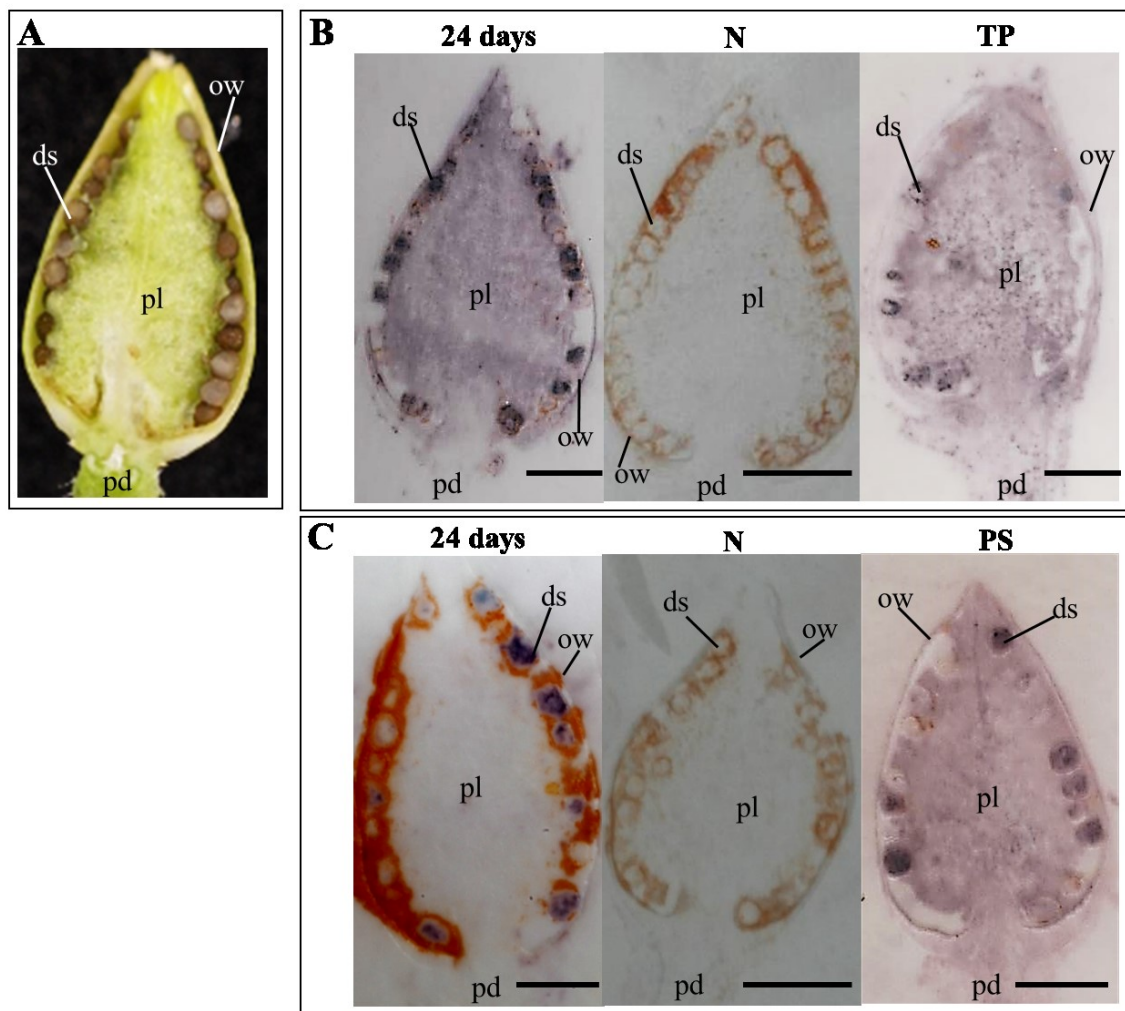
タバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus) 及び pepino mosaic virus の場合、マルハナバチにより運ばれたウイルス感染花粉を介して水平伝染を引き起こしている可能性がある (Okada et al., 2000 ; Shipp et al., 2008) . さらに本研究において、TPMVd が同種植物間及び異種植物間において水平伝染することを確認した (Table 4-5) . そして、異種花粉が授粉された場合であっても、花粉管は花柱の基部まで伸長し、続いて珠柄まで到達する (Shimizu and Okada, 2000) . そのため、複数種の植物の間でマルハナバチによる授粉が行われた場合、無作為に新たな植物へウイロイド感染花粉が分散させ、ウイロイドの拡散を助長させる可能性があるであろう.

結論として、本研究ではウイロイドが花粉を介して水平伝染を引き起こす伝染経路について示した. 具体的には、花粉管が花柱を通過する際に花粉内のウイロイドが花柱へ移行し、最終的に子房に感染することによって、水平伝染が成立することが推察された. 対照的に、PSTVd はペチュニアにおいて花粉による水平伝染は生じず、花粉管が花柱内の伝達組織を伸長する間に花粉内のウイロイドが消失した. このことから、花粉管が花柱内の伝達組織を通過する際に花粉管内のウイロイド濃度を減少させる機構が存在すると推察される.

第 4 章 Fig. 4-1



**Fig. 4-1.** Tissue-printing hybridization using digoxigenin-labeled antisense probes for TPMVd and PSTVd to detect viroids in the carpels of petunia plants after stigma were pollinated with viroid-infected pollen. (A) Carpel of a petunia plant before tissue printing. (B) Carpels pollinated with TPMVd-infected pollen grains at 4 and 24 hours after pollination. N, healthy carpel used as a negative control; TP, TPMVd-infected carpel used as a positive control. (C) Carpels pollinated with PSTVd-infected pollen grains at 4 and 24 hours after pollination. N, healthy carpel used as a negative control; PS, PSTVd-infected carpel used as a positive control. Bar, 2 mm.



**Fig. 4-2.** Tissue-printing hybridization using digoxigenin-labeled antisense probes for TPMVd and PSTVd to detect viroids in the ovaries of petunia plants after stigma were pollinated with viroid-infected pollen. (A) Longitudinal section of the ovary of a petunia plant before tissue printing. (B) Ovary pollinated with TPMVd-infected pollen at 24 days after pollination. N, healthy ovary used as a negative control; TP, TPMVd-infected ovary used as a positive control. (C) Ovary pollinated with PSTVd-infected pollen at 24 days after pollination. N, healthy ovary used as a negative control; PS, PSTVd-infected ovary used as a positive control; pl, placenta; ds, developing seed; ow, ovary wall; pd, peduncle. Bar, 2 mm.

第 4 章 Table 4-1

**Table 4-1** Rates of TPMVd and PSTVd infection in pedicels and upper leaves of petunia plants pollinated with viroid-infected pollen.

viroid	pedicel <sup>a</sup>		upper leaf <sup>b</sup>		
	2 weeks <sup>c</sup>	3 weeks	1 month	2 months	3 months
TPMVd	2/24 <sup>d</sup> (0/6, 1/6, 1/6, 0/6 <sup>e</sup> )	11/24 (2/6, 4/6, 3/6, 2/6)	0/24 (0/6, 0/6, 0/6, 0/6)	10/24 (2/6, 3/6, 3/6, 2/6)	20/24 (4/6, 5/6, 5/6, 6/6)
PSTVd	0/24 (0/6, 0/6, 0/6, 0/6)	0/24 (0/6, 0/6, 0/6, 0/6)	0/24 (0/6, 0/6, 0/6, 0/6)	0/24 (0/6, 0/6, 0/6, 0/6)	0/24 (0/6, 0/6, 0/6, 0/6)

a; TPMVd or PSTVd was detected in the pedicel of the fruit formed after pollination with viroid-infected pollen., b; TPMVd or PSTVd was detected in shoots extended after pollination with viroid-infected pollen., c; Elapsed time after pollination., d; Number of samples containing viroids / number of samples tested. e; The experiments were conducted four times with six samples each.

**Table 4-2** Germination rates of TPMVd- and PSTVd-infected petunia pollen grains.

Test No.	TPMVd-infected pollen	PSTVd-infected pollen	Healthy pollen
1	39 <sup>a</sup>	40	39
2	40	36	31
3	43	38	41
4	40	33	39
5	37	34	39
6	33	35	39
av	38.7 (77.3) <sup>b</sup> <sup>ns</sup>	36 (72.0) <sup>ns</sup>	38 (76.0)

a; Number of germinated pollen grains among 50 pollen grains., b; Average germination rate (%)., ns; No significant difference relative to uninfected pollen (Steel's multiple comparison test,  $p < 0.05$ ).

**Table 4-3** Rate of viroid infection of pollen grains obtained from petunia plants infected with TPMVd or PSTVd.

Test No.	TPMVd-infected pollen	PSTVd-infected pollen
1	56 <sup>a</sup>	54
2	54	47
3	58	49
av	56 (93.3 <sup>b</sup> )	50 (83.3) <sup>ns</sup>

a; Number of viroid-infected pollen grains detected by using RT-qPCR analysis among 60 pollen grains. *Petunia hybrida* putative monosaccharide transporter mRNA (pmt1; accession no. AF061106) used as an internal control was detected in all pollen grains by using RT-PCR analysis., b; Average viroid infection rate of pollen (%)., ns; No significant difference compared with TPMVd-infected pollen (Student's t-test,  $p < 0.05$ ).

第 4 章 Table 4-4

**Table 4-4** Rates of TPMVd and PSTVd infection of various parts of pistils and of fruits of petunia plants pollinated with viroid-infected pollen.

Viroid	Pistil part	Elapsed time after pollination								Fruit part	24 days Viroid detection
		1 h		3 h		12 h		24 h			
		Viroid detection	Internal control	Viroid detection	Internal control	Viroid detection	Internal control	Viroid detection	Internal control		
TPMVd	Stigma	18 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	18	18	18	18	18	18	Calyx	17
	Upper style	0	0	4	4	18	18	18	18	Ovary wall	18
	Lower style	0	0	0	0	18	18	18	18	Placenta	18
	Ovary	0	0	0	0	18	18	17	18	Developing seed	18
										Peduncle	18
PSTVd	Stigma	18	18	18	18	18	18	18	18	Calyx	0
	Upper style	0	0	0	5	1	18	4	18	Ovary wall	0
	Lower style	0	0	0	0	0	18	0	18	Placenta	0
	Ovary	0	0	0	0	0	13	0	18	Developing seed	18
										Peduncle	0

Experiments were conducted three times with six samples each ( $n = 18$  total). Total numbers are shown., a; Number of samples containing viroid among 18 total samples tested., b; Number of samples positive for *Petunia hybrida* putative monosaccharide transporter mRNA (pmt1; accession no. AF061106; used as an internal control) among 18 total samples tested.

第 4 章 Table 4-5

**Table 4-5** Rates of TPMVd infection in calyx and upper leaves of tomato plants pollinated with a mixture of TPMVd-infected petunia pollen and healthy tomato pollen.

Stigma			Ovary		Calyx <sup>c</sup>		Upper leaf <sup>d</sup>	
24 h <sup>c</sup>					3 weeks	5 weeks	1 month	2 months
Test No.	Viroid detection	Internal control	Viroid detection	Internal control	Viroid detection		Viroid detection	
1	8/8 <sup>a</sup>	8/8 <sup>b</sup>	4/8	4/8	0/18 <sup>f</sup>	7/18	0/6	5/6
2	8/8	8/8	4/8	4/8	3/18	9/18	0/6	5/6
3	8/8	8/8	5/8	5/8	0/18	8/18	0/6	3/6
Total <sup>g</sup>	24/24	24/24	13/24	13/24	3/54	24/54	0/18	13/18

a; Number of TPMVd-detected plants / number of plants pollinated., b; Number of plants positive for a pollen-specific internal control / number of plants pollinated., c; TPMVd was detected in the calyx of fruit formed after pollination with a mixture of viroid-infected petunia and healthy tomato pollen grains., d; TPMVd was detected in shoots extended after pollination., e; Elapsed time after pollination., f; Number of TPMVd-affected fruits / total number of fruits formed after pollination., g; The experiments were conducted four times with six samples.

## 第5章

花粉を介した水平及び垂直伝染への tomato planta macho viroid 及び potato spindle tuber viroid の左末端領域の影響

**The influence of terminal left domain on horizontal and vertical transmissions of tomato planta macho viroid and potato spindle tuber viroid through pollen.**

*Hironobu Yanagisawa, Teruo Sano, Shu Hase and Yosuke Matsushita*

**Submit**

## 要約

数種のウイロイドは、感染花粉を介し垂直及び水平伝染を引き起こすことが知られている。これらのウイロイドのうち、TPMVd はペチュニアにおいて高頻度に水平伝染するが、PSTVd は水平伝染しない。水平伝染に関与するウイロイドゲノム上の領域を特定するため、TPMVd 及び PSTVd 間で左末端及び病原性領域を置換したウイロイドキメラを作製した。その結果、TPMVd の左末端及び病原性領域を含む場合は水平伝染を引き起こし、PSTVd のこれらの領域を有する場合は水平伝染しなかった。さらに TPMVd の左末端領域のみを有した PSTVd の場合も水平伝染した。また TPMVd の左末端領域を有するウイロイドキメラは他のウイロイドキメラや PSTVd 野生株よりも、高い垂直伝染率であった。これらの知見は、左末端領域が花粉を介した水平及び垂直伝染に影響し得ることを示すものである。

**キーワード:** TPMVd, PSTVd, 花粉伝染, 左末端領域, 病原性領域, 水平伝染, 垂直伝染

## 序論

花粉伝染はウイルス及びウイロイドが感染拡大するための主要な伝搬様式の 1 つである。花粉伝染には受粉後に 2 つの経路があり、花粉を介して後代に伝染することを垂直伝染、また花粉から母体への伝染することを水平伝染と定義されている (Barba et al., 2007 ; Card et al., 2007 ; Mink, 1993) . ウイロイドは経済的に重要な病原体で、植物検疫上もリスクの高い病原体として位置づけられている。ウイロイドは、長さ 246~475 nt からなる環状一本鎖 RNA のみで構成される最小の植物病原体であり、ポスピウイロイド科及びアブサンウイロイド科の 2 科に分類される (Hadidi et al., 2017 ; Hammann and Steger, 2012) . ポスピウイロイド科に分類されるポスピウイロイド属には 9 種のウイロイド (CSVd, CEVd, CLVd, IVd1, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd 及び TPMVd) が属する。当属の花伝染については、PSTVd がジャガイモ、トマト及びペチュニアにおいて垂直伝染した (Fernow et al., 1970 ; Hadidi et al., 2003 ; Kryczyński et al., 1988 ; Singh et al., 1992) . また、CSVd はトマトにおいて垂直伝染した (Kryczyński et al., 1988) . さらに TPMVd 及び PCFVd がペチュニアにおいて垂直伝染することを本論文の第 2 章で明らかにした (Yanagisawa and Matsushita, 2017) . 一方、PSTVd はジャガイモ及びトマトにおいて (Kryczyński et al., 1988 ; Singh et al., 1992) , CSVd はトマトにおいて水平伝染した (Kryczyński et al., 1988) . さらに、TPMVd がペチュニアにおいて水平伝染することを本論文の第 4 章において見出した (Yanagisawa and Matsushita, 2018) .

ウイロイドは、花粉内において精核及び栄養核に局在し、柱頭に授粉後に花粉管の伸長と共に花柱を通り、最終的に母本の胚珠に到達することにより、結果的にウイロイドの垂直伝染が成立することが推察された (Matsushita and Tsuda, 2014 ; Matsushita and Yanagisawa, 2018) . 一方、第 4 章においてウイロイドの水平伝染が成立するには、花粉管が母本の花柱及び子房において感染すること重要であることが推察された (Yanagisawa and Matsushita, 2018) . また、花粉管が伸長する過程で、花柱下部から子房において花粉管からウイロイドが漏れ出すと考えられた。また興味深いことに、花粉管が胚珠に到達しない

にも関わらず、ウイロイドは水平伝染した。すなわち、ウイロイドの水平伝染の成立には必ずしも受精過程を必須としないことが示された。

ポスピウイロイドのゲノムは、5つの構造ドメイン（TL, P, C, V, TR）から構成されている（Hadidi et al., 2017）。これまでの研究において、TL, P 及び V 領域の3領域のうち、1つの領域のみ又は複数の領域が関連し病原性に影響を与えていることが示された（Hammann and Steger, 2012 ; Owens and Hammond, 2009 ; Tsushima et al., 2016）。さらに、Owens et al. (2009) は、TL 及び P 領域が複合的に病原性に影響を与え、そのうち TL 領域が P 領域よりも病原性に強い影響を与えることを報告した。一方で P 及び V 領域は感染性に大きな影響力を持ち（Owens et al., 1991 ; Hu et al., 1996）、PSTVd では C 領域の 1 塩基の変異が、タバコ（*N. tabacum*）への感染の可否を決定した（Wassenegger et al., 1996）。また TL 及び C 領域は共に複製能に大きく関与するが、全身移行に関与する塩基は、全ての領域に散在した（Zhong et al., 2008）。したがって、各領域の塩基配列の相違は、ウイロイドの生物学的特性に大きく関与することが示された。

PSTVd 及び TPMVd は、トマトにおいて矮化や葉の退緑等の甚大な被害をもたらす（Galindo et al., 1982 ; Hadidi et al., 2017）。第 4 章で示したように、TPMVd はペチュニアにおいて感染花粉を介して垂直及び水平伝染するが、PSTVd は水平伝染せず垂直伝染のみすることが明らかとなった。そのため、これら 2 種のウイロイドにおける垂直及び水平伝染性の違いを決定している遺伝子領域が存在すると考えられた。それゆえ、花粉伝染に関与する遺伝子領域を特定するため、TPMVd 及び PSTVd 間で TL 及び P 領域を置換したウイロイドキメラを使用し、授粉後の花器官における分布の違いを比較した。また授粉後の花芽の雌しべ、並びに授粉後に着果した果実内の各ウイロイドキメラの分布を調査した。さらに、各ウイロイドキメラの垂直伝染率を比較するため、各ウイロイドキメラの感染ペチュニア花粉を健全母体に授粉後に得られた後代種子を使用し、リアルタイム RT-PCR を用いて発芽した苗から各ウイロイドキメラを検出した。

## 材料及び方法

### TPMVd 及び PSTVd 間のウイロイドキメラの感染性 cDNA クローンの作製

TPMVd 及び PSTVd 間のウイロイドキメラを作製するため、TPMVd (accession no. GQ131573, 359 nt ; Verhoeven et al., 2011b) 及び PSTVd (EU862231, 358 nt ; Matsushita et al., 2010) との間で塩基配列を置換した。PS/TP-TLP は、PSTVd の TL 及び P 領域 (1-72, 286-358) から TPMVd のそれらの領域 (1-72, 285-359) に置換した (Fig. 5-1) 。対照的に、TP/PS-TLP は TPMVd の TL 及び P 領域 (1-72, 285-359) から、PSTVd のそれらの領域 (1-72, 286-358) に置換した。さらに、TP/PS-TL は、TPMVd の TL 領域 (1-46, 314-359) から PSTVd の TL 領域 (47-72, 285-313) に置換し、同様に PS/TP-TL は PSTVd の TL 領域 (1-44, 314-358) から TPMVd の TL 領域 (1-46, 314-359) に置換した。一方、野生型の TPMVd 及び PSTVd の塩基配列は比較対照として用いた。また 5'末端に T7 プロモーターの遺伝子配列を付加した。さらに、ウイロイドキメラの塩基配列を含む cDNA を増幅するために、5'末端にクローニングベクター (pUCFk, FASMAC CO., LTD, Japan) の塩基配列 (5'-TCCGATCTGAT-3') 及び 3'末端には同様に塩基配列 (5'-GGAAGAGCACACGTCTGAACTC-3') を付加した。これらの 4 種のウイロイドキメラを含む 6 種のウイロイド配列の cDNA は gBlocks gene fragments amplification technology (Integrated DNA Technologies, USA) を利用して合成した。続いて、Matsushita and Penmetcha (2009) の方法に従って、これらの合成した cDNA から RNA を転写し、植物体への接種源として使用した。

### 各ウイロイドキメラの感染性 cDNA クローンの接種

各ウイロイドキメラの *in vitro* 転写 RNA は、第 2 章に記した汁液接種法に準じてペチュニア 'Vacara' に接種した (Yanagisawa and Matsushita, 2017) 。接種源は、5 µg の *in vitro* 転写 RNA を用いて、本葉が 4 葉展開した苗 3 株に接種した。接種後のペチュニア苗は、16/8 時間の明暗条件で、室温 25–27°C に設定したグロスチャンバー内で 4 ヶ月以上育成させた。

## ウイロイドキメラの感染性の確認

各ウイロイドキメラがペチュニア苗に感染しているか確認するため、接種 2 ヶ月後にペチュニア苗の最上位葉を採取し、RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Germany) を用いてキット付属のプロトコールに従いトータル RNA を抽出した。抽出 RNA は、第 3 章において開発したポスピウイロイドのユニバーサルプライマー (6Pospi-F/R) を用いたリアルタイム RT-PCR により各ウイロイドを検出した (Yanagisawa et al., 2017) 。また、接種後 4 ヶ月以上が経過した後、ウイロイドキメラに感染したペチュニア苗から花粉を採取し、第 4 章において用いた授粉方法に準じて、健全ペチュニアに授粉した。また花粉管の伸長状況を把握するため、ペチュニア花粉の内在性コントロールとしてモノサッカライドトランスporter1 (*pmt1* ; accession no. AF061106, Ylstra et al., 1998) の mRNA を第 4 章の方法に準じて検出した (Yanagisawa and Matsushita, 2018) 。

## ペチュニアに感染したウイロイドキメラのクローニング及びシーケンス解析

シーケンス解析のために 2 組のプライマーセットを用いて RT-PCR を実施した。RT-PCR には、P1/P2 プライマーセット (Gross et al., 1978) , 並びに 2 組目のプライマーセットとして新たに設計した PV87-F:5'-GGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCG-3' 及び PV68-R; 5'-GGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGAG-3' を使用した。これらのプライマーにより各ウイロイドキメラの全長配列となる PCR 産物を得るため、One step RT-PCR kit (QIAGEN, Germany) を用いて RT-PCR を行い、得られた PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) により精製した。精製後の PCR 産物は、Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Takara, Japan) に付属する pUC118 ベクターに挿入し、コンピテントセルは *E. coli* DH5 $\alpha$  cells (Takara, Japan) を用いて、クローニングを実施した。シーケンス解析は、ABI 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) を使用した。

## 花粉内の各ウイロイドキメラの感染性及び感染濃度

各ウイロイドキメラ，並びに野生株の TPMVd 及び PSTVd に感染した花粉の感染力を調査した．そのため，各ウイロイドに感染したペチュニア苗から 50 mg の花粉を採取した．採取した花粉は 1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.5）で磨砕した．得られた花粉の磨砕液をさらにリン酸緩衝液で 10 倍に希釈し，その後同様に 100 倍から 10,000 倍まで希釈した．これらの磨砕溶液を接種源として使用して，希釈溶液ごとに 3 株のトマト ‘Rutgers’ に汁液接種した．接種後のトマト苗は，16/8 時間の明暗条件で，室温 25–27°C に設定したグロスチャンバー内で生育させた．その後，これらのトマト苗にウイロイド様の病徴が現れるか経過観察すると共に，上記のリアルタイム RT-PCR による検出法を用いてウイロイドへの感染の有無を確認した．

次に，花粉に存在するウイロイドの濃度を比較するため，各ウイロイド，並びにウイロイドキメラに感染したペチュニア苗から 50 mg の花粉をそれぞれ採取した．花粉は，接種 8 ヶ月経過した時点で採取した．花粉からの RNA 抽出には，第 3 章で用いた方法に従って実施した（Yanagisawa et al., 2017）．その後，抽出した RNA のうち，100 ng の RNA を鋳型として，第 3 章で開発した 6Pospi-F/R プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR によって，ウイロイドを検出した（Yanagisawa et al., 2017）．また，ペチュニアの内部標準 RNA であるアクチン 11（accession no. SGN-U208507（At3 g12110.1）；Solanaceae Genomics Network（SGN）and Arabidopsis TAIR databases のアクセッション番号）は，Mallona et al.（2010）の方法に従いリアルタイム RT-PCR を用いて検出した．

## ペチュニアの花粉を介した各ウイロイドキメラの水平伝染

PS/TP-TLP，PS/TP-TL 及び TP/PS-TL に感染したペチュニア苗から採取した花粉を健全ペチュニアに授粉し，授粉後の子房及び果実内におけるウイロイドの分布を調査した．授粉の手順は，第 4 章に示した授粉方法に準じた（Yanagisawa and Matsushita, 2018）．また，接種 4，6，及び 8 ヶ月後に採取した花粉をそれぞれ授粉に使用した．感染花粉の授粉に使用した健全ペチュニア苗は，発芽後 2 ヶ月間生育した苗を使用した．そして，授粉から 24 時間経過した後雌しべを採取し，柱頭，花柱及び子房に切り分けて採取した．また，授

粉によって形成した果実は、種子、胎座、果皮、萼及び果柄に切り分けて採取した。その後、これらの各組織から上記のリアルタイム RT-PCR を用いてウイロイドの存在の有無を確認した。

着果した果実の胎座又は萼からウイロイドキメラが検出された場合、これらの組織を接種源として感受性トマトに接種し、ウイロイドキメラが感染性を有していることを確認した。さらに、これらの組織から RNA を抽出して、P1/P2 及び PV68/87 プライマーセットにより RT-PCR をそれぞれ実施した。そして得られた PCR 産物をもとに、上記の方法に準じてクローニングを行い、水平伝染したウイロイドキメラの塩基配列と授粉した花粉に感染したウイロイドキメラの塩基配列を比較した。

### **ペチュニアにおける花粉を介した各ウイロイドキメラの垂直伝染**

各ウイロイドキメラ、並びに野生株の TPMVd 及び PSTVd の感染花粉を介した種子伝染率を調査した。そのため、接種 4, 6, 8 ヶ月後の各感染ペチュニア苗から感染花粉を採取し、健全ペチュニアの雌しべの柱頭に授粉した。授粉に用いた健全ペチュニア苗は、発芽後 2 ヶ月間生育させた苗を使用した。授粉後、果実の成熟を待って、種子を採種し、第 2 章で用いた方法に準じて播種を行った (Yanagisawa and Matsushita, 2017)。また、垂直伝染率を調査するため、第 3 章において開発したリアルタイム RT-PCR による検出方法を使用して

(Yanagisawa et al., 2017)、発芽苗から各ウイロイドキメラ、並びに野生株の TPMVd 及び PSTVd を検出した。さらに後代の苗に感染したウイロイドキメラの塩基配列を確認するために、上記と同法によりシーケンス解析を行った。

## **結果**

### **ペチュニア及びトマトへのウイロイドキメラの感染性及び病徴**

TPMVd-PSTVd 間の 4 種のウイロイドキメラの転写 RNA をペチュニアに接種した。4 種のウイロイドキメラとは、TP/PS-TLP (TPMVd に PSTVd の TL 及び P 領域を挿入)、TP/PS-TL (TPMVd に PSTVd の TL 領域のみを挿入)、PS/TP-TLP (PSTVd に TPMVd の TL 及び P 領域を挿入)、PS/TP-TL (PSTVd に TPMVd の TL 領域のみを挿入) であった。接種から 2 ヶ月が経過したペチュニ

ア苗は、リアルタイム RT-PCR を用いて、各ウイロイドが感染したか調査した。その結果、PS/TP-TLP, PS/TP-TL 及び TP/PS-TL の 3 種のウイロイドキメラ、並びに野生株の TPMVd 及び PSTVd は検出されたが、TP/PS-TLP は検出されなかった (Fig. 5-1) 。また、ウイロイドキメラが感染したペチュニア苗はいずれも無病徴感染であった。しかし、これらの感染ペチュニアの葉を接種源として感受性トマトに接種したところ、矮化、葉の退緑、黄化等の症状が現れた (データ未掲載) 。また、これらの病徴の程度は、野生株の TPMVd 及び PSTVd による病徴と同等であった。

### ペチュニアに感染したウイロイドキメラの塩基配列

ペチュニアに感染後のウイロイドキメラの塩基配列を解析するために、サンプル毎に 5 つの cDNA クローンを選抜しシーケンス解析を実施した。接種 2 ヶ月後調査した結果、PS/TP-TLP は 3 nt (T<sub>14</sub> → G, A<sub>62</sub> に A の挿入, T<sub>167</sub> → C) の変異が認められた (Fig. 5-1) 。同様に、TP/PS-TL は 2 塩基 (T<sub>177</sub> → C, G<sub>229</sub> → C) , 並びに PS/TP-TL は 4 塩基 (T<sub>6</sub> → A, C<sub>84</sub> → T, T<sub>86</sub> → C, C<sub>358</sub> → T) の変異が生じた。さらに、接種 8 ヶ月後にも各ウイロイドキメラが塩基配列を維持しているか調査した。その結果、新たな変異は認められず、ウイロイドキメラの塩基配列は、安定して維持・複製されていることが示唆された。

### 感染ペチュニアの花粉内におけるウイロイドキメラの濃度

接種 8 ヶ月が経過した各ウイロイドキメラの感染ペチュニア苗から感染花粉を採取して、感受性トマトへの感染性試験、並びにリアルタイム RT-PCR を用いて花粉のウイロイド量を比較した。また、予備試験において接種 8 ヶ月後の花粉を使用した場合に水平及び垂直伝染が高率に観察された。そのため、本試験では、接種 8 ヶ月後の感染花粉を使用し調査を実施した。

感染ペチュニアから採取した花粉の磨砕液を接種源として感受性トマトに汁液接種を行った。その結果、野生株の TPMVd 及び PSTVd と 3 種の各ウイロイドキメラは、いずれも 10<sup>-1</sup> まで感染した (Table 5-1) 。このことから、接種から 8 ヶ月の段階で、感染花粉中のウイロイドの感染性に差は認められなかった。また、同じサンプルの感染花粉中のウイロイド濃度をリアルタイム RT-PCR を

用いて解析した。その結果、野生株のウイロイドを含む 5 種のウイロイドの感染花粉のウイロイド量は、ほぼ同等であったが、PS/TP-TL の感染花粉のウイロイド量は、他のウイロイドに比べて濃度が高い傾向にあった (Table 5-2)。

### 感染花粉授粉 24 時間後のウイロイドキメラの雌しべにおける分布

ウイロイドの感染花粉を授粉した後の雌しべにおけるウイロイドの分布を調査するため、健全ペチュニアに授粉した。授粉から 24 時間経過後に、雌しべを柱頭、花柱、子房の各組織に切り分けて採取した (Fig. 5-2A)。そして、これらの各サンプルから RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を用いて、各ウイロイドキメラを検出した。この調査は、ウイロイドキメラ毎に 1 試験当たり 9 個の雌しべを供試し、計 3 回試験を実施した。その結果、接種後 8 ヶ月経過時に感染花粉 (8 months post infection ; 8 mpi) を授粉した場合、PS/TP-TLP は柱頭、花柱、子房のいずれからも検出され、授粉 24 時間後にはウイロイドキメラが子房に到達した (Table 5-3)。PS/TP-TLP は、6 mpi の花粉を授粉した場合、供試した子房全てから検出され、4 mpi の花粉を授粉した場合でも、27 サンプル中 19 サンプル (約 70%) の子房から検出された。同様に、PS/TP-TL は、8 mpi を授粉した際、柱頭 ; 100%, 花柱 ; 100%, 子房 ; 約 70% で検出された。また PS/TP-TL の 6 mpi の花粉を授粉した場合には、子房における検出率はやや低下し (約 60%), 4 mpi の花粉ではさらに低下 (約 20%) した (Table 5-3)。これらの結果から、PS/TP-TL の子房への到達率は PS/TP-TLP の到達率に類似したが、やや低率であった。一方で、TP/PS-TL の結果は対照的であった。TP/PS-TL の 8 mpi の花粉を授粉した場合には、柱頭からは全て検出されたが、花柱では 27 サンプル中 1 サンプルのみ (約 4%) 検出されたのみで、子房からは全く検出されなかった。また、4 mpi 及び 6 mpi の花粉の場合にも TP/PS-TL は子房から検出されることはなかった (Table 5-3)。このことから、TP/PS-TL の花柱や子房におけるウイロイドの検出率が、他の 2 種のウイロイドキメラよりも著しく低かった。

### 感染花粉授粉 24 日後のペチュニア果実内におけるウイロイドキメラの分布

感染花粉授粉によって形成されたペチュニアの果実内の各組織におけるウイロイドキメラの分布を調査した。授粉 24 日後に果皮，胎座，種子，萼及び果柄に切り分け採取し（Fig. 5-2B），上記と同じ方法を用いてウイロイドキメラの有無を調査した。本調査では，ウイロイドキメラ毎に 1 試験あたり 6 個の果実を用い，計 2 回試験を実施した。

PS/TP-TLP の 8 mpi の感染花粉を授粉した場合，果皮；100%（陽性サンプル数/検定数=12/12，以下同様），胎座；100%（12/12），種子；100%（12/12），萼；75%（9/12），果柄；約 67%（8/12）で検出された（Table 5-4）。また，PS/TP-TLP は，6 mpi 及び 4 mpi の花粉を授粉した場合，8 mpi の感染花粉を授粉した時よりも，各組織における感染率がやや低率であった。一方，PS/TP-TL の 6 mpi 及び 8 mpi の花粉を授粉した場合，PS/TP-TLP の結果に類似した結果が得られた。しかしながら，PS/TP-TL の 4 mpi の花粉を授粉した場合では，種子から 50%（6/12）検出された以外，他の各組織から検出されず，果実内の組織への感染は大幅に低かった。対照的に，TP/PS-TL の果実内の各組織からの検出率は極めて低率であった。具体的には，TP/PS-TL は 8 mpi の感染花粉を授粉した場合でも，種子からは検出されたが，他の組織からは検出されることは無かった（Table 5-4）。以上の結果から，PS/TP-TLP は果実内の各組織への感染率が最も高く，次に PS/TP-TL が高く，TP/PS-TL は最も低かった。しかし，TP/PS-TL では，種子からのみ比較的高率に（約 17%（2/12）～50%（6/12））検出されており，異なる感染機構が関与していることが示唆された。

次に，胎座及び萼から検出された PS/TP-TLP 及び PS/TP-TL の 2 種のウイロイドキメラの塩基配列を花粉に感染した各ウイロイドキメラの塩基配列と比較した。その結果，いずれのウイロイドキメラも塩基配列に差は無く，ペチュニア感染時に認められた突然変異は，水平伝染後も安定して維持されていた。

### ウイロイド感染花粉授粉によるウイロイドキメラの垂直伝染

上記の結果から，TL 及び P 領域が感染花粉を介した水平伝染能，特に TL 領域が P 領域よりも水平伝染能に強く関与することが明らかとなった。そこでさらに，TL 及び/又は P 領域がウイロイドの垂直伝染に関与するか調査した。上記と同法を用いて，3 種のウイロイドキメラ，並びに野生株の TPMVd 及び

PSTVd の 4, 6, 8 mpi の感染花粉を健全ペチュニアに授粉した。授粉したペチュニアは、グロスチャンバー内で生育させ、その後採種した。そして、毎ウイロイドキメラの種子を 100 粒ずつ播種した。その後、発芽した後代の苗について、ウイロイドに感染しているカリアルタイム RT-PCR により調査した。本試験は 2 回実施した。その結果、水平伝染の場合と同様に、PS/TP-TLP は最も高い垂直伝染率を示した。PS/TP-TLP の 8, 6 及び 4 mpi の感染花粉による垂直伝染率は、それぞれ 92.6%, 86.3%, 及び 54.9%と高率であった (Table 5-5) 。これらの垂直伝染率は、TPMVd の野生株よりも僅かに低率であった。また PS/TP-TL は、3 種のウイロイドキメラの中で 2 番目に垂直伝染率が高かった。具体的には、PS/TP-TL の 8, 6 及び 4 mpi の感染花粉を授粉した際の垂直伝染率は、それぞれ 54.45%, 4.7%及び 3.2%であった。これら 2 種のウイロイドキメラ間の垂直伝染率には、水平伝染の結果よりも大きな差が生じた。PS/TP-TL の 8 mpi の花粉を授粉した時の種子伝染率は、PSTVd の種子伝染率よりも高率であったが、一方で 6 及び 4 mpi の感染花粉を授粉した場合は、PSTVd よりも低率であった。また TP/PS-TL の 8, 6 及び 4 mpi の感染花粉を授粉した時の垂直伝染率は、それぞれ 4.7%, 1.2%及び 1.7%となり、全ての期間を通して低率であった (Table 5-5) 。

さらに、垂直伝染した後代のペチュニア苗に感染する各ウイロイドキメラの塩基配列を解析した。その結果、後代の苗に感染する各ウイロイドキメラの塩基配列は、花粉親に感染したウイロイドキメラの塩基配列を維持していた。

## 考察

ウイロイドは自己複製し、タンパク質をコードしない剥き出しの RNA から構成されており、1 塩基の変異であっても宿主植物における複製及び移行等の機能に劇的な変化を誘導することがある (Hadidi et al., 2017 ; Kovalskaya and Hammond, 2014 ; Zhong et al., 2008) 。このことは、特定の塩基配列及び／又は構造が、花粉を介したウイロイドの水平及び垂直伝染に影響を与える可能性があることを示唆している。例として、感染母体を介した種子伝染の場合、PSTVd 及び TCDVd 間の塩基配列はポスピウイロイドの中で最も類似しているにも関わらず、PSTVd は胚珠に侵入できたが TCDVd は侵入できなかった

(Matsushita et al., 2011) . その結果, PSTVd のみが種子伝染を引き起こした. さらに, CBVd-1 の場合, ウイロイドゲノムの 5 番目のループ内の 25 番目の 1 塩基の突然変異が, 種子伝染を引き起こす因子となっていると報告された (Tsushima and Sano, 2018) . 一方, 第 4 章の結果から, TPMVd の 1 変異体は花粉を介して水平伝染を引き起こすのに対して, PSTVd の 1 変異体は水平伝染しないことが明らかとなった (Yanagisawa and Matsushita, 2018) . また TPMVd 及び PSTVd の塩基配列は, 比較的高い相同性を有している. そのため, ウイロイドゲノム上の特定の塩基配列及び／又は構造が, 感染花粉を介した水平及び／又は垂直伝染性を決定している可能性が考えられた.

本研究では, 効率的に水平伝染する TPMVd の遺伝子領域に着目し, TPMVd –PSTVd 間で遺伝子領域を置換し, ウイロイドキメラを作製した. そして, これらのウイロイドキメラの内, TPMVd の TL 及び P 領域を持つウイロイドキメラが, 感染花粉を介して効率的に花柱から子房に伝染することを見出した. また, TPMVd の TL 領域のみを有するウイロイドキメラは, 2 番目に高い水平伝染率を示すことが確認された. さらに, TPMVd の TL 領域を有する 2 種のウイロイドキメラは, いずれも感染花粉を介して高い垂直伝染率を示した. これらのことから, 感染花粉を介した TPMVd の水平及び垂直伝染には, TPMVd の TL 領域が主因となり, 次いで TPMVd の P 領域が第 2 の因子として機能していると結論付けた.

第 4 章において得られた研究結果から, ウイロイドの水平伝染の成立には花粉管の伸長過程で, ウイロイドが花柱から子房において伝染することが重要であることが示唆された (Yanagisawa and Matsushita, 2018) . 本研究において, PS/TP-TLP 及び PS/TP-TL は, 授粉 24 時間後に花柱から子房において高率に検出された (Table 5-3) . さらに, これらの 2 種のウイロイドキメラは, 果実内の種子だけでなく, 果皮, 胎座, 萼及び果柄からも検出され, 水平伝染が引き起こされた (Table 5-4) . 対照的に, TP/PS-TL は, 授粉後に花粉管は子房に到達したにも関わらず, 子房からウイロイドが検出されることはなかった. そして, 着果した果実の果皮, 胎座, 萼及び果柄からも, ウイロイドは検出されなかった. 各ウイロイドキメラを機械的接種し, 8 ヶ月経過した時点の 3 種のウイロイドキメラ間の花粉の感染性には, 明瞭な差は認められなかった (Table 5-

1 及び -2) . この結果から、花粉を介した水平及び垂直伝染能に見られる相違は、TL 領域が受粉後の水平伝染の成立に何らかの重要な影響を有していることが示唆された。例として、TL 領域は、花器官における花粉管伸長時のウイロイドの複製や蓄積、若しくはウイロイドの安定性に影響を与えている可能性が考えられた。

これまでの研究では、機械的接種により感染した宿主植物におけるウイロイドのゲノム構造、及び複製／蓄積、若しくは感染性について解析が主に進められている。これらの研究により、PSTVd 及び CEVd では P 領域が病原性を決定する因子として最初に同定され、その後 V 領域も感染初期、又は複製過程に影響を与えることが示された (Schnölzer et al., 1985 ; Visvader and Symons, 1985 ; Keese and Symons, 1885) . また、TASVd 及び CEVd 間でウイロイドキメラを用いることにより、複数の遺伝子領域が複製／蓄積、並びに病徴の重篤化に重要な役割を持つことが示された。具体的には、矮化症状には TL 及び P 領域が、複製／蓄積には V 及び TR 領域が関与することが明らかとなった (Sano et al., 1992) . 近年、TPMVd の強毒株及び弱毒株の間のウイロイドキメラを用いて、TR 領域の 1 塩基がトマトにおける病原性を決定する因子であることが同定されたが、この塩基の相違は複製／蓄積には影響を与えていなかった (Li et al., 2017) . また、Zhong et al. (2008) は、PSTVd ゲノムのループ構造に着目し、PSTVd の TL 及び C 領域のループ構造が複製能に影響を与え、全領域のループ構造が全身移行に関与することを報告した。さらに、同じ研究チームによる最新の解析により、V 領域の 19 番目のループ構造が、感染葉の中の葉肉の柵状細胞から葉肉細胞への感染拡大に重要な役割を有することが示された (Takeda et al., 2018) . このように病徴の重篤化には、しばしば P 及び／又は TL 領域が関与し、複製／蓄積若しくは移行能には、V 又は TR 領域が影響を与えるとされてきた。これらの知見とは対照的に、本研究では TPMVd の水平及び垂直伝染に関与する遺伝子領域は、V や TR 領域ではなく、TL 及び P 領域であることを特定した。本研究は、ウイロイドの花粉伝染に含まれる水平及び垂直伝染という異なる 2 種の伝染過程に焦点を絞り調査を行った。このうち、水平伝染では花粉内に感染したウイロイドが、受粉後の花粉管伸長の過程で雌しべの組織へ移行し、花器組織へ感染が広がることにより成立することが示唆

された。一方、垂直伝染は、花粉内に感染したウイロイドが、受粉後に花粉伸長に伴い子房に到達し、その後受精することで後代種子に侵入することにより成立すると考えられている (Fig. 5-2)。すなわち、受粉後又は花粉管の伸長過程で花粉管からウイロイドが花柱及び子房の組織へ移行・感染することが要因と推察され、伸長する花粉管内でのウイロイドの複製能及び／又は細胞間移行能が、感染花粉を介した水平及び垂直伝染が成立するか否かの重要な要因となっていると考えられる。これまでの研究により見出された知見は、機械的接種により感染した植物の栄養組織におけるウイロイドの挙動を研究してきたものである。一方、本研究において示した結果は、花器官におけるウイロイドの挙動を調査することにより得られた結果である。それゆえ、既報のウイロイドの挙動についての報告事例とは異なる要因を含んでいる可能性が考えられる。

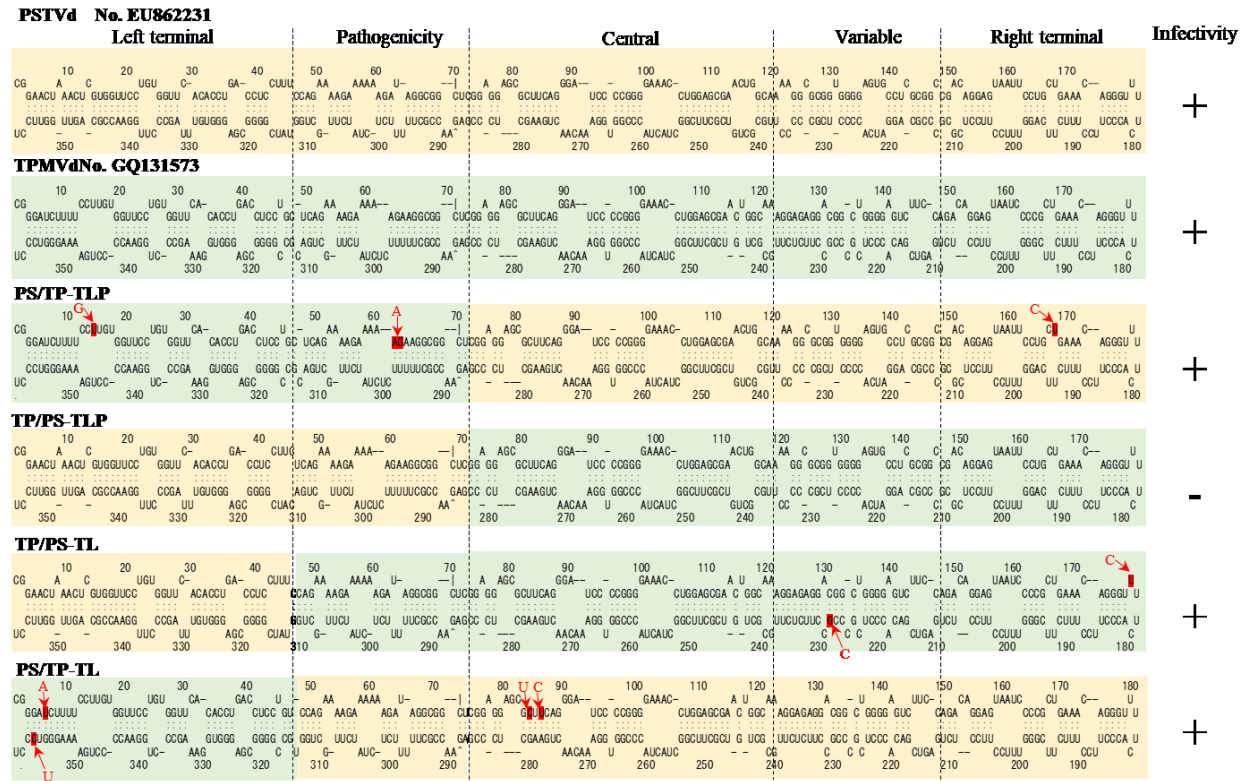
ポスピウイロイドの垂直伝染率は、ポスピウイロイドの種及び宿主植物の種類に依存する (Matsushita and Tsuda, 2016)。第 2 章 Table 2-4 において、TPMVd の 1 変異体の垂直伝染率は、PSTVd の 1 変異体の垂直伝染率 (～20%) と比較し極めて高い伝染率 (～90%) であることを明らかにした (Yanagisawa and Matsushita, 2017)。本研究において、TL 領域の塩基配列及び／又は遺伝子構造は、水平伝染だけでなく、垂直伝染にも関与することが示唆された。まず、花粉を介した垂直伝染が成立するには、ウイロイドは花粉形成前の孢子形成組織に移行し、複製する必要がある (Matsushita and Tsuda, 2014 ; Matsushita and Yanagisawa, 2018)。しかしながら、8 mpi の感染花粉中の全てのウイロイドキメラの感染力及びウイロイドの濃度には明瞭な差は無かった。このことから、全てのウイロイドキメラは、孢子形成組織に感染し複製することができ、最終的に花粉内の精核に局在した。したがって、これらの知見は、TL 領域が受粉後に垂直伝染の成立に何らかの影響を有していることが示唆された。一方、TP/PS-TL の垂直伝染率は、他の 2 種のウイロイドキメラよりも極めて低率であった。第 4 章の結果から、花粉内の PSTVd は花粉管が花柱や子房を通過したにも関わらず検出されなかった (Table 4-4) (Yanagisawa and Matsushita, 2018)。つまり、PSTVd 濃度は、受粉後にリアルタイム RT-PCR の検出限界以下まで低下したことが原因となり、垂直伝染率が低下したと推察された。この PSTVd において認められた現象は、TP/PS-TL においても同様の結果が確認された

(Table 5-3) . したがって、PSTVd の TL 領域には、花粉管の伸長中に花粉内のウイロイドの消失及び垂直伝染を不能にする原因があると推察される. 花粉管の伸長に伴って PSTVd が消失するメカニズムを解明するためには、今後さらなる研究が必要である.

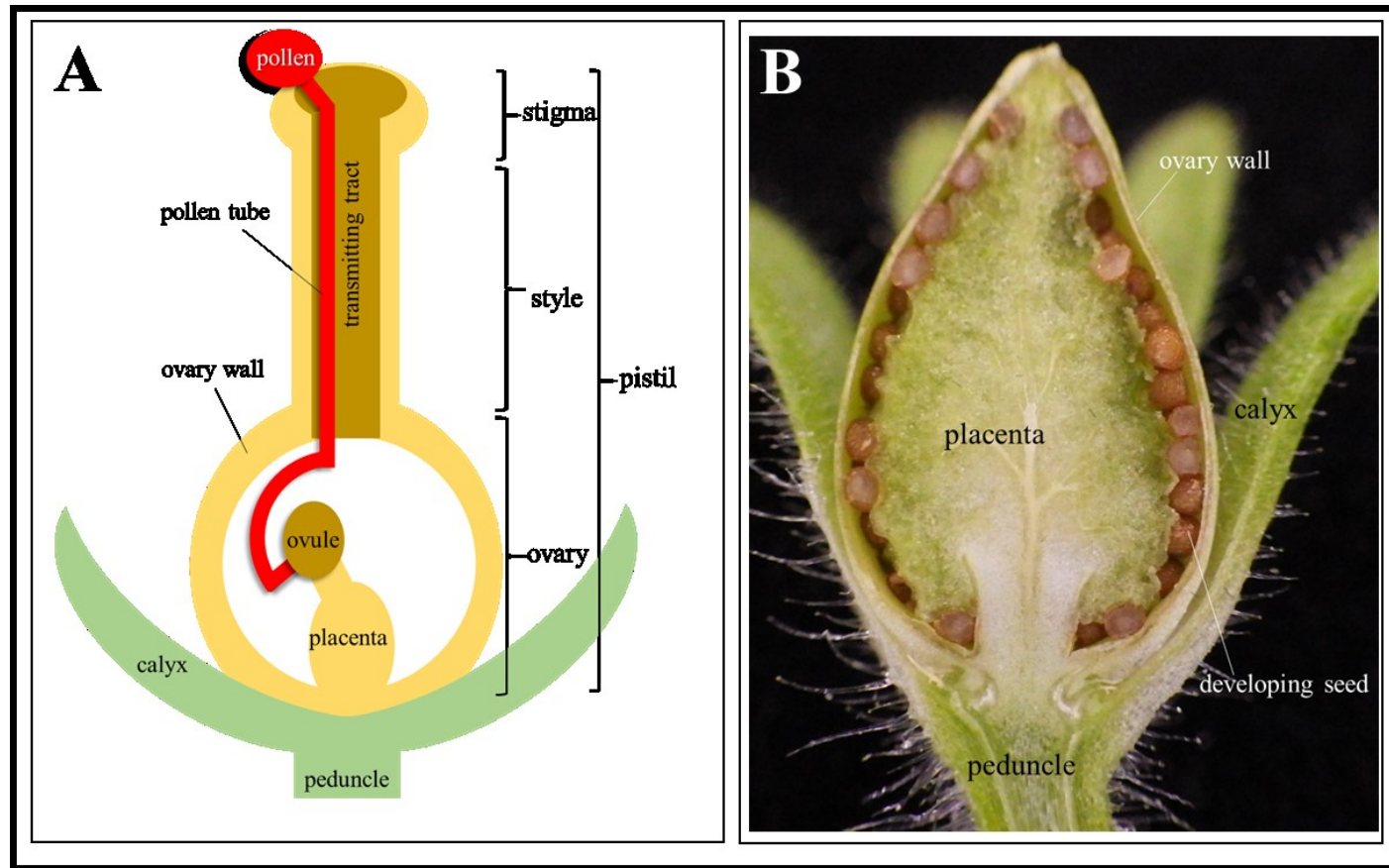
種子伝染にはウイルス感染からの経過時間が影響し、感染初期には種子伝染は起こりにくい (Mink, 1993 ; Wang and Maule, 1994) . そのため、接種からの経過時間による影響を考慮するため、各ウイロイドキメラの 4, 6, 8 mpi の感染花粉を用いて水平及び垂直伝染の試験を実施した. PS/TP-TLP 及び PS/TP-TL は、4 mpi の感染花粉よりも 8 mpi の感染花粉を授粉した場合の方が、より高率的に子房においてウイロイドキメラが検出された (Table 5-3) . 同様に、8 mpi の感染花粉を授粉した場合、これらのウイロイドキメラは、より高頻度に果皮、胎座、萼及び果柄に感染していた (Table 5-4) . さらに、8 mpi の垂直伝染率は、4 mpi の垂直伝染率よりも著しく高率であった (Table 5-5) . これらの垂直伝染した後代の苗と親株に感染したウイロイドキメラの塩基配列は同一であったことから、時間の経過に伴う垂直伝染率の増加は、突然変異による影響ではないことを示している. したがって、感染からの経過時間に応じて、花粉を介したウイロイドの水平及び垂直伝染が上昇することが示唆された. PSTVd が *N. benthamiana* に感染した場合、感染初期には PSTVd は茎頂分裂組織及び花芽分裂組織に侵入することができなかったが、感染後期には侵入することができた (Di Serio et al., 2010) . 花粉へのウイロイド感染が必要であることを考慮すると、配偶子形成前に花芽分裂組織へウイロイドが侵入するためには、十分な感染期間が必要であると推察される. これらのことから、感染初期から経時的に花粉内のウイロイドの濃度を比較する必要があると考える.

結論として、本研究において、ウイロイドの効率的な水平及び垂直伝染を決定するウイロイドの構造的な因子は、TL 及び P 領域に存在していることが示唆された. また、TPMVd の TL 及び P 領域のうち、特に TL 領域が花粉を介した水平伝染だけではなく垂直伝染にも重要な役割を果たしていると推察される.

第 5 章 Fig. 5-1



**Fig. 5-1.** Secondary structure of each viroid chimera recombined from tomato planta macho viroid (TPMVd, accession no. GQ131573) and potato spindle tuber viroid (PSTVd, accession no. EU862231). Pale yellow and pale green boxes indicate sequences of PSTVd and TPMVd, respectively. The base marked in red is where the mutation occurred. The infectivity column indicates the infectivity of each viroid or chimera in petunia plants.



**Fig. 5-2.** (A) Pollen tube pathway in petunia plant 24 hours after pollination. (B) The cross-sectional view of a petunia fruit 24 days after pollination.

**Table 5-1** Infectivity of petunia pollen grains infected by each of viroid constructs in tomato plants.

Viroid or chimera name	Dilution of inocula (infected pollen extracts)				
	10 <sup>0a</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
TPMVd	3/3 <sup>b</sup>	3/3	0/3	0/3	0/3
PSTVd	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
PS/TP-TLP	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
TP/PS-TL	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
PS/TP-TL	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3

a; Inocula obtained from 50 mg petunia pollen grains homogenized in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)., b;  
 Number of viroid-infected tomato plants / number of tomato plants inoculated with viroid-infected pollen grains.

第 5 章 Table 5-2

**Table 5-2** Viroid concentration of petunia pollen grains infected by TPMVd, PSTVd, and three viroid chimeras.

Viroid or chimera name	Test no.	Viroid detection in petunia pollen grains		Internal control of actin 11 mRNA in petunia pollen grains	
		Viroid detection (Ct)	Average of Ct	Internal control (Ct)	Average of Ct
TPMVd	1	24.0 <sup>a</sup>	16.1 <sup>b</sup>	20.2 <sup>a</sup>	20.9 <sup>b</sup>
	2	11.0		21.1	
	3	13.4		21.3	
PSTVd	1	20.6	16.1	20.1	20.1
	2	14.2		20.1	
	3	13.7		20.2	
PS/TP-TLP	1	19.1	14.1	19.8	20.1
	2	11.5		20.3	
	3	11.5		20.3	
TP/PS-TL	1	20.2	15.6	19.8	20.3
	2	13.2		20.9	
	3	13.2		20.3	
PS/TP-TL	1	15.1	11.8	20.2	20.5
	2	10.4		20.8	
	3	9.8		20.6	

50 mg of pollen was collected from seedlings infected with each viroid. Pollen grains were collected 8 months after inoculation. RNA was extracted from these pollen grains, and 100 ng RNA was used as a template for the detection of viroids and action 11 of mRNA in petunia pollen grains using RT-qPCR assays., a; Mean Ct value of three replications of same template., b; Mean Ct value of three tests.

第 5 章 Table 5-3

**Table 5-3** Infection rates of each viroid chimera in various parts of the pistils of petunia plants at 24 hours after pollination using pollen grains collected at different periods after inoculation.

Chimera name	Part of pistil	Elapsed time after inoculation <sup>a</sup>					
		4 months		6 months		8 months	
		Viroid detection	Internal control	Viroid detection	Internal control	Viroid detection	Internal control
PS/TP-TLP	Stigma	27/27 <sup>b</sup> (9/9 <sup>c</sup> 9/9, 9/9)	27/27 <sup>c</sup> (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
	Style	23/27 (7/9, 9/9, 7/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
	Ovary	19/27 (6/9, 7/9, 6/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
TP/PS-TL	Stigma	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
	Style	2/27 (0/9, 0/9, 2/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	0/27 (0/9, 0/9, 0/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	1/27 (0/9, 1/9, 0/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
	Ovary	0/27 (0/9, 0/9, 0/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	0/27 (0/9, 0/9, 0/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	0/27 (0/9, 0/9, 0/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
PS/TP-TL	Stigma	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
	Style	18/27 (5/9, 6/9, 7/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)
	Ovary	5/27 (2/9, 2/9, 1/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	16/27 (4/9, 6/9, 6/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)	19/27 (7/9, 7/9, 5/9)	27/27 (9/9, 9/9, 9/9)

a; Pollen grains collected at 4, 6, and 8 months after inoculations of petunia plants were then used to pollinated healthy petunia plants. Healthy petunia seedlings grown for 2 months after seeding were pollinated with infected pollen grains, and then the pistils were collected 24 hours after pollination of the healthy plants., b; Number of samples containing viroids / number of samples tested., c; The experiments were conducted three times with nine samples each., d; Number of samples positive for *Petunia hybrida* putative monosaccharide transporter mRNA (accession no. AF061106; used as an internal control) among the 18 total samples tested.

**Table 5-4** Infection rates of each of viroid chimera in the fruit parts of petunia plants after pollination using pollen grains collected at different periods after inoculation.

Chimera name	Part of fruit	Elapsed time after inoculation <sup>a</sup>		
		4 months	6 months	8 months
		Viroid detection	Viroid detection	Viroid detection
PS/TP-TLP	Ovary wall	9/12 <sup>b</sup> (4/6 <sup>c</sup> , 5/6)	8/12 (3/6, 5/6)	12/12 (6/6, 6/6)
	Placenta	11/12 (5/6, 6/6)	9/12 (5/6, 4/6)	12/12 (6/6, 6/6)
	Developing seed	12/12 (6/6, 6/6)	12/12 (6/6, 6/6)	12/12 (6/6, 6/6)
	Calyx	4/12 (1/6, 3/6)	5/12 (3/6, 2/6)	9/12 (5/6, 4/6)
	Peduncle	6/12 (2/6, 4/6)	2/12 (1/6, 1/6)	8/12 (5/6, 3/6)
TP/PS-TL	Ovary wall	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)
	Placenta	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)
	Developing seed	6/12 (2/6, 4/6)	2/12 (0/6, 2/6)	4/12 (3/6, 1/6)
	Calyx	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)
	Peduncle	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)	0/12 (0/6, 0/6)
PS/TP-TL	Ovary wall	0/12 (0/6, 0/6)	12/12 (6/6, 6/6)	12/12 (6/6, 6/6)
	Placenta	0/12 (0/6, 0/6)	12/12 (6/6, 6/6)	12/12 (6/6, 6/6)
	Developing seed	6/12 (3/6, 3/6)	12/12 (6/6, 6/6)	12/12 (6/6, 6/6)
	Calyx	0/12 (0/6, 0/6)	4/12 (3/6, 1/6)	6/12 (2/6, 4/6)
	Peduncle	0/12 (0/6, 0/6)	3/12 (2/6, 1/6)	5/12 (2/6, 3/6)

a; Pollen grains collected at 4, 6 and 8 months after inoculations of petunia plants were then used to pollinate healthy petunia plants. Healthy petunia seedlings grown for 2 months after seeding were pollinated with the infected pollen grains., b; Total number of samples containing viroids / total number of samples tested., c; The experiments were conducted twice with six samples each.

第 5 章 Table 5-5

**Table 5-5** Vertical transmission rates of each viroid chimera through viroid chimera-infected pollen using pollen grains collected at different periods after inoculation.

Viroid or chimera name	Elapsed time after inoculation <sup>a</sup>					
	4 months		6 months		8 months	
	Viroid detection	Transmission rate (%)	Viroid detection	Transmission rate (%)	Viroid detection	Transmission rate (%)
TPMVd	162/185 <sup>b</sup> (78/92 <sup>c</sup> , 84/93)	85.57 <sup>d</sup>	188/188 (94/94, 94/94)	100.0	142/144 (48/48, 94/96)	98.6
PSTVd	35/195 (19/100, 16/95)	18.0	43/187 (22/93, 19/94)	23.0	58/187 (19/92, 39/95)	31.0
PS/TP-TLP	106/193 (57/100, 49/93)	54.9	164/190 (80/95, 84/95)	86.3	174/188 (88/94, 86/94)	92.6
TP/PS-TL	4/233 (1/100, 3/133)	1.7	2/168 (0/94, 2/94)	1.0	9/190 (6/95, 3/95)	4.7
PS/TP-TL	6/186 (2/93, 4/93)	3.2	9/190 (3/95, 6/95)	4.7	104/191(49/96, 55/95)	54.45

a; Pollen grains collected at 4, 6 and 8 months after inoculation of petunia plants were then used to pollinated healthy petunia plants. Healthy petunia seedlings grown for 2 months after seeding were pollinated with infected pollen grains., b; Total number of samples containing viroids / total number of samples tested., c; The experiments were conducted twice with germinated seedlings from seeds collected from fruits formed after pollination with infected pollen grains., d Vertical transmission rate (%) = (total number of samples containing viroids / total number of samples tested)×100

## 第6章

### 総合考察

近年、国際的な種苗類の流通に伴う国を超えた移動によって、世界各地のトマト、ピーマン等の果菜類において、ポスピウイロイドの感染による甚大な被害が報告されている（Lebas et al., 2005 ; Ling and Bledsoe, 2009 ; Ling and Zhang, 2009 ; Nixon et al., 2010 ; Reanwarakorn et al., 2011 ; Steyer et al., 2009 ; Verhoeven et al., 2007, 2011a 及び 2016）．一方、ツルハナナス、ペチュニア、ホウズキ、チョウセンアサガオ、ダリア、ペピーノ、*Cestrum* spp.等の観葉植物において、無病徴感染するポスピウイロイドの発見事例が相次いでいる（Brunschot et al., 2014 ; Luigi et al., 2011 ; Mertelik et al., 2010 ; Tsushima et al., 2011 ; Ward et al., 2010）．これらの新たな地域におけるウイロイドの発生は、ウイロイドに感染した種子及び無病徴感染した苗に気付かずに、種苗が流通されることが主因である（Kovalskaya and Hammond, 2014 ; Owens and Verhoeven, 2009）．実際に、ウイロイドの感染種子や無病徴感染した観葉植物が原因となり、ウイロイドの侵入・被害を引き起こした事例が多数報告されている（Brunschot et al., 2014 ; Hadidi, 2003 ; Matsushita et al., 2010 ; Shiraishi et al., 2013 ; Verhoeven et al., 2007）．そこで、本研究では、ポスピウイロイドの包括的検出法を開発すると共に、花粉を介した垂直及び水平伝染機構を解明することによって、植物検疫制度の向上を図りポスピウイロイドの国内への侵入リスクの低減、並びにウイロイドフリーの健全種苗の確保に寄与することを目的に実施した．

### ポスピウイロイドの宿主範囲及び種子伝染と植物防疫法施行規則への検査対象植物の追加提案

ポスピウイルスに含まれるウイルス種の内、TPMVd 及び PCFVd は宿主範囲及び種子伝染についての情報が少ない。そこで、まずこれら 2 種ウイルスの宿主範囲を調査した。その結果、TPMVd 及び PCFVd は、それぞれ 16 種、15 種の植物に感染することを確認した（第 2 章、Table 2-2）。これまでに報告のあった宿主植物は、実験植物として用いられる数種のナス科植物に限られていた（Galindo et al., 1982・1986；Verhoeven et al., 2009）。しかし本調査により、農作物として用いられる新たなナス科植物へ感染し、TPMVd はキク科のシュンギクにも感染した（第 2 章、Table 2-2）。これら感染植物の中で、両ウイルス共に明瞭な病徴が認められたのは、トマト及びジャガイモのみであり、その他の植物では全て無病徴感染であった。そのため、他のポスピウイルス同様に、トマト及びジャガイモに甚大な被害を引き起こすと考えられる。一方、トマト及びジャガイモ以外の感染植物では、ウイルスの感染に気付くことは困難であると推察される。

TPMVd 及び PCFVd のトマトにおける種子伝染を調査し、供試した 4 品種のトマトの内、1 品種のみで初めて確認された（第 2 章、Table 2-3）。これらの 2 種ウイルスは、これまでに複数の国々で同時に発生しており（Ling and Bledsoe, 2009；Ling and Zhang, 2009；Reanwarakorn et al., 2011）、流通するトマト種子からの検出事例もある（Chambers et al., 2013）。本試験で TPMVd 及び PCFVd のトマトにおける種子伝染が認められたことから、これらのウイルスの感染種子が流通したことが要因となり、新たな地域におけるウイルスの発生が引き起こされた可能性が高い。また、これまでに CLVd, PSTVd, TASVd の 3 種がトマトにおいて種子伝染することが知られていたが（Antiguns et al., 2007；Matsushita and Tsuda, 2016）、本研究により、TPMVd 及び PCFVd の種子伝染が新たに確認されたことから、ポスピウイルスに属する多くのウイルスがトマトにおいて種子伝染するこ

とになる。それゆえ、トマト種子を検査する場合には、ポスピウイルスを包括的に検査すべきだと考える。

また、ペチュニアを用いたウイルス感染植物と健全植物間の交配試験により、感染種子親×感染花粉親の場合、TPMVd、PCFVd、PSTVdの3種共に高率（91%以上）に種子伝染した（第2章、Table 2-4）。しかし、感染花粉を介した種子伝染率は、TPMVdでは91.8%と高率であったが、PSTVdは20.8%と低率であった（第2章、Table 2-4）。これまでの研究により、種子伝染は、病原体の種や系統、宿主植物の種や品種が影響するとされている（Bos, 1983 ; Matsushita and Tsuda, 2016 ; Mink, 1993）。このことから、ウイルス種の違いが種子伝染性に強く影響していると考えられる。一方で、植物種及び品種も種子伝染の可否に大きく関与している（第2章、Table 2-2）。ウイルスが種子伝染するか否かは、種子形成期にウイルスが胎座だけでなく胚珠に感染できるかが鍵となり、植物種により胚珠への侵入の可否に大差が生じる（Matsushita and Tsuda, 2016）。そのため、後代にウイルスを伝染させないための植物側の防御機構について、今後さらに研究を進める必要がある。そして将来、種子伝染させない品種の開発に繋げたい。

上記のとおり、ポスピウイルスに属するウイルス種は、トマトやペチュニアにおいて高率に種子伝染した。そのうち、TPMVd及びPCFVdは、現時点では農業現場や苗として流通するペチュニアからの発見事例はないが、トマトからの発見事例は複数回報告されている（Ling and Bledsoe, 2009 ; Ling and Zhang, 2009 ; Reanwarakorn et al., 2011）。そのため、これらのウイルスがトマト種子に感染し、持ち込まれる可能性がある。本報により、これら2種ウイルスの種子伝染が初めて確認されたことから、植物防疫法施行規則別表二の二（第九条関係）の輸出国に

おける検査を求める対象植物として「トマト種子」を追加することにより、これらウィロイドの発生国からのトマト種子を介した国内への侵入を阻止すべきであろう。

### ポスピウロイドの全 8 種の包括的検出法の開発と評価

本報では、リアルタイム RT-PCR を用いて、SYBR Green 法による 1 次スクリーニングと TaqMan 法による 2 次スクリーニングの 2 段階からなる検出法を考案した（第 3 章，Fig. 3-1）。SYBR Green 法を用いた 1 次スクリーニングは、ポスピウロイド全 8 種を検出することができた（第 3 章，Table 3-4）。また SYBR Green 法では、各ウィロイドに特異的な解離温度を有することが確認された（第 3 章，Fig. 3-2）。この特異的な解離温度からウィロイド種の推定が可能である他、増幅曲線上で非特異的増幅が生じた場合には、解離温度を元にウィロイド由来の増幅であることを明確に判別できた。TaqMan 法では、増幅曲線の結果から非特異的増幅か否かを判断することは困難であるが、SYBR Green 法では低濃度であっても、解離温度を確認することで、陽性／陰性が判別しやすいと考えられる。

また、TaqMan 法を用いた 2 次スクリーニングは、ウィロイド種をより正確に識別することを目的として構築した。実際に、ユニバーサルプライマーで検出される 6 種のウィロイドを正確に識別することができた（第 3 章，Fig. 3-3）。そして、1 次スクリーニングの CLVd 及び PCFVd の特異的検出系の結果と併せて、8 種のウィロイドの種の識別ができた。これまでに報告された既存の検出法には、ポスピウロイドの一部のウィロイド種の識別は可能であったが（Boonham et al., 2004 ; Botermans et al., 2012 ; Monger et al., 2010），シーケンス解析を行わなければウィロイド種の特定は困難であった。またシーケンス解析を行うには、一定濃度以上のウィロイド量が必要であるため、シーケンス解析が困難な状況も想定され

る。これらの状況を踏まえ、SYBR Green 法により 1 次スクリーニングを通常の検査法として実施し、陽性となった検体のみ TaqMan 法による 2 次スクリーニングを行うことにより、効果的且つ経済的に検査を実施できると考える。さらに、リアルタイム PCR を採用したことで、通常の PCR では必要となる電気泳動が不要なため、省力化が図られる他、PCR 産物を扱わないため、コンタミネーションの発生リスクを低減できる利点がある。また SYBR Green 法は、プライマーのみで反応を行うことができるため、TaqMan 法に比べ安価であることから、経済的である。

上記のとおり開発した検出法により、本研究で新たに種子伝染の確認された TPMVd, PCFVd に加え（第 2 章, Table 2-3）, これまでに種子伝染するウイロイド 3 種（CLVd, PSTVd, TASVd）を 400 粒のトマト種子に各ウイロイドの感染トマト種子 1 粒を混合したバルクサンプルから、各ウイロイドを検出し、ウイロイド種の特定も可能であった。本法による検査を実施することにより、ウイロイドの侵入・拡散のリスクを低減することに貢献できると期待する。また、本試験ではトマト種子を対象とした試験のみであったが、第 2 章において種子伝染が確認されたペチュニアやこれまでに種子伝染の報告のあったピーマン等の種子においても、本法が有効であるか検証する必要があると考える。また本試験ではサブサンプルサイズを 400 粒とし試験を実施したが、検査に使用する種子数は 3,000 粒以上である。そのため、さらに検査効率を図るため、サブサンプルサイズを 1,000 粒まで拡大した場合でも、本法により検出可能かが今後の課題である。

## **ポスピウイロイドの水平伝染メカニズム**

### **1 感染花粉によるウイロイドの水平伝染は、花柱～子房で感染できるかが鍵である**

第2章において、TPMVdのペチュニアにおける垂直伝染率は極めて高率（約90%）であるのに対し、PSTVdの垂直伝染率は低率（約20%）であった（第2章, Table 2-4）。この伝染率の違いに着目し、感染花粉受粉後のTPMVd及びPSTVdの動態に差がある可能性が考えられ、TPMVd及びPSTVdの感染花粉後の分布を比較することにより、伝染メカニズムの解明を試みた。

TPMVdは、感染花粉授粉後に花粉管伸長に伴い花柱から子房で検出された（第4章, Table 4-4 及び Fig. 4-1）。その後、TPMVdは胎座等の母体由来の組織に感染拡大し、最終的に全身感染に至ったと推察された（第4章, Table 4-1 及び Fig. 4-2）。一方、PSTVdの場合、感染花粉の花粉管が伸長時に、PSTVdが花柱において検出できなくなり、水平伝染は起きなかった（第4章, Table 4-1 及び Fig. 4-4）。このウイロイドの動態の違いから、ウイロイドの水平伝染には、感染花粉の花粉管の伸長の際に花柱下部から子房において、ウイロイドが感染できるか否かが重要であると推察された。一方、花粉管の伸長の際、花粉管の先端においてエクソサイトーシス及びエンドサイトーシスによって花粉伸長に必要な物質が輸送されることが知られている（Cheung and Wu, 2008 ; Hepler et al., 2001）。この花粉管伸長の必要物質に含まれたウイロイドRNAが、花粉管の成長成分の排出作用に伴って、花粉管外へ放出される可能性が考えられる。しかし、花粉管から花柱の伝達組織へのウイロイドの感染機構について、今後さらに調査を進める必要がある。

## 2 ポスピウイロイドは異種植物間においても感染花粉により水平伝染する

次に、水平伝染に受精過程が必要か確認するため、トマト苗と感染ペチュニア花粉を用いて異種間交配を実施した。その結果、トマト柱頭にTPMVd感染ペチュニア花粉を授粉した後、初めにTPMVdは果実に感染し、その後全身感染を引き起こ

した（第4章，Table 4-5）．このことから，受精前に花粉管から花柱や子房へウィロイドが伝染していると推察される．そのため，栽培施設内には他のウィロイドの宿主となり得る植物を栽培した場合，感染花粉が飛散し異種の植物へ感染する可能性があるため，同一施設内に異なる植物の混植は避ける必要があると考える．

### 3 PSTVd の感染花粉のウィロイド濃度は受粉後の花柱で減少する

PSTVd は花粉内のウィロイド濃度が花粉管の伸長中にリアルタイム RT-PCR の検出限界以下まで減少した（第4章，Table 4-4）．この現象は，感染花粉を液体培地で発芽させるだけでは認められなかった（第4章，Table 4-3）．このことから，感染花粉の発芽管が花柱の伝達組織を通過することにより，花粉内のウィロイドが減少すると推察した．この花粉管伸長中のウィロイドの減少の要因として，ウィロイド RNA が RNA サイレンシングの標的とされ，Dicer-like タンパク質によって切断される可能性が考えられる（Itaya et al., 2001 ; Kovalskaya and Hammond, 2014）．今後花柱におけるウィロイド由来 siRNA を調査し，ウィロイド RNA の分解に RNA サイレンシングが関与するか調査する必要があるであろう．また花粉管伸長中に TPMVd は消失しないが，PSTVd は消失したことから，花柱組織には PSTVd 配列を特異的に消化させる分解機構が存在する可能性が考えられる．この分解機構を特定することにより，ウィロイドの感染を抑制させることが可能になると考えられ，今後さらに研究を進めたい．

### 4 ウィロイドの水平伝染には左末端領域が関与する

第2章及び第4章の結果より，TPMVd は感染花粉を介して高率に垂直及び水平伝染する一方で，PSTVd は水平伝染せず TPMVd 比べ低率に垂直伝染のみを引き起

こすことが明らかとなった。これまでの研究により、1塩基の違いによって、宿主植物における複製及び移行等の諸性質が劇的に変化を誘導することが示されている (Hadidi et al., 2017 ; Owens et al., 1995 ; Zhong et al., 2008) 。そして、病原性には TL, P 及び V 領域の 3 領域が関与し、TL 領域は P 領域よりも病原性に強い影響を与える (Hammann and Steger, 2012 ; Owens and Hammond, 2009 ; Tsushima et al., 2016) 。上記のように、これまでに行われてきたウイロイドゲノムの機能解析は、接種植物体における感染能、複製能、移行能及び病原性等について研究されてきたものがほとんどである。本研究では、花粉を介した伝染性に関わる遺伝子領域を探索しており、これまでに類がなく、新たな着眼点に立ったゲノム上の機能解析である。

第 5 章では、花粉伝染に関与するウイロイドゲノムの遺伝子領域を特定することを目的に、TPMVd-PSTVd 間で TL 及び P 領域を置換したウイロイドキメラを作製した。これらのウイロイドキメラの授粉後の花器管、並びに授粉後に発達した果実内の分布を調査すると共に垂直伝染率を比較した。その結果、TPMVd 由来の TL 領域を有するウイロイドキメラは感染授粉後に子房において高率に検出され、最終的に水平伝染し、さらに高率に垂直伝染も引き起こした (第 5 章, Table 5-3, -4 及び-5) 。対照的に、TP/PS-TL は、花粉管が子房に到達しても、子房では検出されず、果実内の種子からのみ検出され、垂直伝染率は、極めて低率であった。これらのことから、TPMVd の TL 領域は水平伝染及び垂直伝染に重要な役割を持つと考えられる。

これまで花粉伝染には、花粉の感染率、並びに花粉内のウイロイドの感染力、ウイロイド濃度、子房内での複製能、さらには細胞間移行能に依存すると予想されていた。しかし本研究の結果から、感染花粉の感染率やウイロイド濃度には大きな差

は認められなかった（第4章，Table 4-3；第5章，Table 5-1 及び-2）。またウイロイドの種間で花粉の発芽能や感染率に差は認められなかった（第4章，Table 4-2）。これらのことから，TL 領域の塩基配列の相違が，受粉後の複製効率の差を生じさせ，水平及び垂直伝染を引き起こすか否かに影響を及ぼしていると推察する。

また，花粉内に存在する PSTVd は花粉管が花柱を伸長する際に消失し，ウイロイド濃度はリアルタイム RT-PCR の検出限界以下まで低下し，水平伝染せず垂直伝染も低率となった（第2章，Table 2-4；第4章，Table 4-4）。そして，TP/PS-TL においても PSTVd と同様の現象が確認された（第5章，Table 5-1 及び-5）。このことから，TL 領域は花粉内のウイロイドが花柱において存続できるか否かに大きく関与すると考えられる。これまでの試験において供試した PSTVd は，1 つの変異体のみであったが，PSTVd には多くの変異体が存在する（第2章，Table 2-1）。そのため，TPMVd の TL 領域に類似する遺伝子配列を有する PSTVd を探索することにより，さらに詳細な花粉伝染に関与する遺伝子領域の特定を実施したいと考える。

本論文では，これまで不明であったウイロイド種における種子伝染・宿主範囲が明らかになると共に，これらの感染植物を排除するためのポスピウイロイド8種全てを検出し，種の識別まで可能な検出法を構築した。さらに，ポスピウイロイドの感染花粉を介した感染メカニズムを明らかにすると共に，ポスピウイロイドの花粉伝染に関与するウイロイドゲノム上の遺伝子領域の特定に至った。以上のことから，本論文は，国内外のポスピウイロイド感染植物の拡散防止，並びに農業生産環境下における新たな感染植物の発生抑制に対して，植物検疫制度の向上に繋がる科学的根拠を示している。

## 摘要

農業生産に用いる多くの種苗は海外で生産され国内に輸入されている。それらの海外産種苗に国内未発生の病原体が紛れて侵入することが危惧される。トマト等ナス科作物に甚大な被害を引き起こすポスピウイロイドは、種子伝染、無病徴感染、花粉伝染等により発生地域が拡大し世界的な問題となっている。そこで本研究はポスピウイロイドの包括的検出法の開発と、花粉を介した垂直・水平伝染機構の解明を目的とし、①tomato planta macho viroid (TPMVd) 及び pepper chat fruit viroid (PCFVd) の宿主範囲・種子伝染、②ポスピウイロイド全8種の遺伝子診断による包括的検出法の開発、③TPMVd 及び potato spindle tuber viroid (PSTVd) の感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違、④花粉を介した水平・垂直伝染に及ぼすウイロイドゲノムの左末端領域の影響について検討した。

### ① TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲・種子伝染性

TPMVd と PCFVd は宿主範囲や種子伝染能の不明なウイロイド種である。そこで植物検疫の検査対象となる植物種の特定を行うため、両ウイロイドの宿主範囲及び種子伝染の有無を調査した。国内へ種子として輸入量の多い10属32種の植物種に接種した結果、TPMVd と PCFVd はそれぞれ16, 15種に感染した。これらの感染植物の内、両ウイロイド共にトマトやジャガイモでは明瞭な病徴が生じ、ピーマン果実は小型化・奇形したが、その他の植物では全て無病徴感染であった。次に TPMVd と PCFVd のトマトにおける種子伝染率はそれぞれ4.4 及び1.4%であった。さらにペチュニアを用いて感染植物と健全植物間の交配試験を行い、花粉親及び種子親の種子伝染への影響を調査した。両親感染の場合、TPMVd, PCFVd, PSTVd の種子伝染率はいずれも高率(>90%)であった。種子親のみ感染の場合、100,

65.3, 97.7%であり、花粉親のみ感染の場合、91.8, 69.2, 20.8%であった。以上から TPMVd と PCFVd の新たな宿主植物及び種子伝染する植物が明らかになった。またいずれのウィロイドでも種子親が感染していた場合種子伝染率は高率である一方、花粉を介した種子伝染率は3種ウィロイド間に大差が生じた。

## ② ポスピウィロイド全8種の遺伝子診断による包括的検出法の開発

各国の植物検疫機関はポスピウィロイド全種を検査対象とする検査法を必要としている。そこでリアルタイム RT-PCR を用いた全8種の網羅的検出法、並びに種の識別法を開発した。本法は SYBR Green 法による1次スクリーニングと TaqMan 法による2次スクリーニングの2段階で構成した。1次スクリーニングは、3つの反応系（6種ウィロイドに対応したユニバーサルプライマー、並びに CLVd 及び PCFVd 特異的プライマー）で PCR を行い、CLVd 及び PCFVd の識別と、残る6種を検出できた。次に2次スクリーニングは、ユニバーサルプライマーで検出した6種ウィロイドの種の識別ができた。さらに、種子伝染するウィロイド5種について、399粒の健全トマト種子に1粒の各ウィロイドの感染トマト種子を混合したサンプルから各ウィロイドを検出・識別できた。以上より、種子からのウィロイド検出が可能な、高感度で高精度の検出法を開発できた。

## ③ TPMVd 及び PSTVd の感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違

花粉伝染には感染花粉から後代種子への伝染（垂直伝染）と授粉した母体への伝染（水平伝染）があるが、花粉内のウィロイドが受粉した母体へどのように感染するのか未解明である。①の結果から TPMVd は高率に垂直伝染したが、PSTVd は低率であったため、受粉後の2種ウィロイド間には動態に差があると考えた。そこで感染花粉受粉後の伝染メカニズムを解明するため、授粉後の TPMVd と PSTVd の分布を比較した結果、TPMVd は花粉管伸長に伴い花柱や子房で検出され、その後

胎座等においても検出された。PSTVdは花粉管が花柱を伸長した際、子房から検出されず水平伝染しなかった。それゆえ感染花粉の花粉管から漏れ出したウイロイドが花柱や子房に感染するか否かが重要であると推察した。

#### ④ 花粉を介した水平・垂直伝染に及ぼすウイロイドゲノムの左末端領域の影響

花粉伝染に関与するウイロイドゲノムの遺伝子領域を特定するため、TPMVd－PSTVd間でTL及びP領域を置換したキメラを作製し、授粉後の水平及び垂直伝染を調査した。その結果、TPMVdのTL領域を有するウイロイドキメラは授粉後に花柱から子房に高率に到達し水平伝染を引き起こし、高率に垂直伝染した。またPSTVdのTL領域を有するウイロイドキメラは花粉管が花柱を伸長する際に消失した。そのため、TL領域はウイロイドの垂直及び水平伝染に対し重要な因子を有している可能性がある。

以上から、開発したポスピウイロイドの包括的検出法により感染植物を排除すると共に、感染花粉を介した垂直及び水平伝染の感染機構を解明したことで、感染拡大の防止に繋げることができる。本研究は、ポスピウイロイドの国内への侵入、並びに感染植物の拡散の阻止に向けた植物検疫制度の向上に資する基礎的情報を示した。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり，多くの方々にご支援ご指導頂き，その感謝の意をここに記す．

山形大学農学部准教授長谷修博士には，指導教官として，課程博士への入学準備段階からご指導と暖かい励ましを頂き，また本論文の御校閲を賜りました．同大学農学部准教授小林隆博士には，副指導官として実験遂行にあたり，終始激励を賜った．弘前大学農学生命科学部教授佐野輝男博士には，副指導官として試験計画，並びに実験遂行にあたる問題解決に多分なご指導・ご助言を頂く共に，本論文の御校閲を賜った．また課程博士入学時に副指導官となって頂いた岩手生物工学研究センター関根健太郎博士（現：琉球大学農学部准教授）には，植物防疫所在籍時より病理実験の基礎をご指導頂いた上，博士課程への入学を後押し頂き，また実験計画立案に多くのご助言を賜った．

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター 津田新哉博士（現：法政大学生命科学部教授）には，博士論文に係る研究計画の立案，並びに海外の雑誌への論文投稿にあたりご指導頂き深謝する．野菜花き研究部門 松下陽介博士には，ウイロイドに係る研究において，基礎から御丁寧にご教授頂き，また当論文の試験計画から論文執筆にあたり，多大なご指導を賜り感謝申し上げます．また，本論文に係る試験の遂行にあたり，中央農業研究センター 大藤泰雄博士，久保田健嗣博士，富高保弘博士（現：九州沖縄農業研究センター），成田祐美氏，佐藤淳子氏，松村由美子，並びに種苗管理センター 佐藤仁敏博士には，終始ご協力を頂いた．

また、農林水産省植物防所 君島悦夫博士，藤原裕治統括検疫官，本蔵洋一統括検疫官，志岐悠介検疫官，大石盛伝検疫官，高上直樹検疫官，石井一考検疫官，上松寛検疫官，小牟田健慈検疫官，大矢仁志検疫官には，植物防疫所在籍時より，植物検疫の精度向上のため一丸となり調査研究の遂行にあたり，またご支援いただき，本論文に至ることができた．

本論文に供したウイロイド感染植物を提供頂いた J. T. J. Verhoeven 博士（Naktuinbouw, オランダ）及び K. Reanwarakorn 博士（Kasetat University, タイ）に感謝する．なお，農林水産省平成 23-25 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業（課題番号：2309）「我が国の重要な農作物に被害を与えるウイロイド病の侵入リスク管理措置の確立」，並びに平成 27 年度委託プロジェクト研究「温暖化適応・異常気象対応のための研究開発」「有害動植物の検出・同定技術の開発」の予算により実施した．

最後に，課程博士への入学を怪訝な顔一つせず許してくれ，また 3 人の育児で多忙な時期に私の勝手を許してくれた妻の柳澤千春には，心より感謝したい．

## 引用文献

- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M. (2007). Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Disease*, 91(1), 47–50.
- Baek, Y.S., Covey, P.A., Petersen, J.J., Chetelat, R.T., McClure, B., Bedinger, P.A. (2015). Testing the SI  $\times$  SC rule: pollen-pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum* section *Lycopersicon*, Solanaceae). *American Journal of Botany*, 102(2), 302–311.
- Barba, M., Ragozzino, E., Faggioli, F. (2007). Pollen transmission of Peach latent mosaic viroid. *Journal of Plant Pathology*, 89(2), 287–289.
- Behjatnia, S.A.A., Dry, I.B., Krake, L.R., Condé, B.D., Connelly, M.I., Randles, J.W. (1996). New Potato spindle tuber viroid and Tomato leaf curl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. *Phytopathology*, 86(8), 880–886.
- Boonham, N., Gonzáles, P.L., Mendez, M.S., Lilia, P.E., Blockly, A., Walsh, K., Barker, I., Mumford, R.A. (2004). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116(2), 139–146.

Bos, L. (1983). Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Horticulturae*, 127, 11–29.

Bostan, H., Nie, X., Singh, R.P. (2004). An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids. *Journal of Virological Methods*, 116(2), 189–193.

Botermans, M., van de Voseenberg, B.T., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. (2013). Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187(1), 43–50.

Branch, A.D., Robertson, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, 223(4635), 450–455.

Brunschot S.L.V., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A., Thomas, J.E. (2014). An outbreak of potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1), 1–7.

Card, S.D., Person, M.N., Clover, G.R.G. (2007). Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology*, 36(5), 455–461.

Chambers, G.A., Seyb, A.M., Mackie, J., Constable, F.E., Rodoni, B.C., Letham, D. (2013). First report of Pepper chat fruit viroid in traded tomato seed, an interception by Australian biosecurity. *Plant Disease*, 97(10), 1386.

- Cheung, A.Y., Wu, H-M. (2008). Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 547–572.
- Chung, B.N., Pak, H.S. (2008). Seed transmission of Chrysanthemum stunt viroid in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 24(1), 31–35.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19–21.
- Di Serio, F., Martínez de Alba, A.E., Navarro, B.A., Gisel, A., Flores, R. (2010). RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *Journal of Virology*. 84(5), 2477–2489.
- Diener, T.O. (Ed.) (1987). *The Viroids*. Plenum Press, New York. 344 pp.
- Diener, T.O., Raymer, W. B. (1971). Potato spindle tuber ‘virus’. *CMI/AAB Description Plant Viruses*, 66, 4.
- Ding, B., Itaya, A. (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(1), 7–20.
- Ding, B. (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 105–131.

- Fernow, K.H., Peterson, L.C., Plaisted, R.L. (1970). Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected potato plants. *American Potato Journal*, 47(3), 75–80.
- Flores, R., Di Serio, F., Navarro, E., Owens, R.A. (2011). Viroids and viroid disease of plants. In: *Studies in Viral Ecology: Microbial and Botanical Host Systems 1*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 307–342.
- Flores, R., Gas, M.E., G., Molina-Serrano, D., Nohales M.A., Carbonell, A., Gago, S. (2009). Viroid replication: Rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses*, 1(2), 317–334.
- Galindo, J., Lopez, M., Aguilar, T. (1986). Significance of *Myzus persicae* in the spread of tomato planta macha viroid. *Fitopatologia Brasileira*, 2, 400–410.
- Galindo, J., Smith, D.R., Diener, T.O. (1982). Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72(1), 49–54.
- Geitmann, A., Palanivelu, R. (2007). Fertilization requires communication: Signal generation and perception during pollen tube guidance. *Floriculture Ornamental and Biotechnology*, 1, 77–89.
- Gottsberger, R.A., Suárez-Mahecha, B. (2010). Detection of *Citrus exocortis* viroid on *Solanum jasminoides* plantlets from an Austrian nursery. *Plant Pathology*, 59(6), 1159.

- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Rada, M., Alberty, H., Sanger, H.L. (1978).  
Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*,  
273(5659), 203–208.
- Hadidi, A., Flores, R., Palukaitis, P., Randles, J. (Eds.) (2017). *Viroids and Satellites*,  
Academic Press, 716 pp.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (Eds.) (2003). *Viroids*. Collingwood,  
Victoria: CSIRO Publishing. 377 pp.
- Hammann, C., Steger, G. (2012). Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biology*,  
9(6), 809–819.
- 初田和雄 (2013). 野菜種苗産業の現状と今後の国際戦略, *JATAFF ジャーナル*, 1  
(9) , 2–7.
- Hepler, P.K., Vidali, L., Cheung, A.Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants.  
*Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 159–187.
- Hirano, T., Hoshino, Y. (2009). Detection of changes in the nuclear phase and evaluation of  
male germ units by flow cytometry during in vitro pollen tube growth in *Alstroemeria*  
*aurea*. *Journal of Plant Research*, 122(2), 225–234.

- Hoshino, S., Okuta, T., Isaka, M., Tsutsumi, N., Miyai, Ikeshiro, T., Saito, N., Ohara, T., Takahashi, T. (2006). Detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in tomato and potato seeds. Research bulletin of the Plant Protection Service Japan, 42, 75–79.
- Hu, Y., Feldstein, P.A., Bottino, P.J., and Owens, R.A. (1996). Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. Virology, 219, 45–56.
- Isogai, M., Kamata, Y., Ando, S., Kamata, M., Shirakawa, A., Sekine, K. Yoshikawa, N. (2017). Horizontal pollen transmission of Gentian ovary ring-spot virus is initiated during penetration of the stigma and style by infected pollen tubes. Virology, 503, 6–11.
- Isogai, M., Yoshida, T., Nakanowatari, C., Yoshikawa, N. (2014). Penetration of pollen tubes with accumulated Raspberry bushy dwarf virus into stigmas is involved in initial infection of maternal tissue and horizontal transmission. Virology, 452–453, 247–253.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., Ding, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 14(11), 1332–1334.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., Iwanami, T., Nakahara, K., Hataya, T., Ito, T., Isaka, M., Kano, T. (2002). Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. Phytopathology, 92(5), 542–547.

Kawaguchi-Ito, Y., Li, S.F., Tagawa, M., Araki, H., Goshono, M., Yamamoto, S. (2009).

Cultivated grapevines represent a symptomless reservoir for the transmission of Hop stunt viroid to hop crops: 15 years of evolutionary analysis. *PloS One*, 4(12), e8386.

Keese, P., Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(14), 4582–4586.

Kovalskaya, N., Hammond, R.W. (2014). Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science*, 228, 48–60.

Kryczyński, S., Paduch-Cichal, E., Skrzeczkowski, L.J. (1988). Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121(1), 51–57.

Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z., Alexander, B.J.R. (2005). Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australasian Plant Pathology*, 34(2), 129–133.

Li, R., Padmanabhana, C., Ling, K-S. (2017). A single base pair in the right terminal domain of tomato planta macho viroid is a virulence determinant factor on tomato. *Virology*, 500, 238–246.

- Ling, K.S., Bledsoe, M. (2009). First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93(8), 839.
- Ling, K.S., Zhang, W. (2009) First report of a natural infection of Mexican papita viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid in greenhouse tomatoes in Mexico. *Plant Disease*, 93(11), 1216.
- Luigi, M., Luison, D. Tomassoli, L., Faggioli, F. (2011). First report of Potato spindle tuber and Citrus exocortis viroids in *Cestrum* spp. in Italy. *New Disease Reports*, 23, 4.
- Luigi, M., Zindovic, J., Stojanovic, I., Faggioli, F. (2016). First report of potato spindle tuber viroid in Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 98(1), 184.
- Mallona, I., Lischewski, S., Weiss, L., Hause, B., Egea-Cortines, M. (2010). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*, 10, 4.
- Mano, J., Shigemitsu, N., Futo, S., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A. (2009). Real-Time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying unapproved genetically modified crops in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 26–37.

- Martínez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J., Yucel, I., Smith, D.R., Diener, T. O. (1996). Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9397–9401.
- Matoušek, J., Orctová, L., Škopek, J., Pešina, K., Steger, G. (2008). Elimination of hop latent viroid upon developmental activation of pollen nucleases. *Biological Chemistry*, 389(7), 905–918.
- Matsushita, Y., Tsuda, S. (2014). Distribution of Potato spindle tuber viroid in reproductive organs of petunia during its developmental stages. *Phytopathology*, 104(9), 964–969.
- Matsushita, Y., Tsuda, S. (2015). Host ranges of Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plants. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 193–197.
- Matsushita, Y., Tsuda, S. (2016). Seed transmission of Potato spindle tuber viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid, and Columnea latent viroid in horticultural plant. *European Journal of Plant Pathology*, 154(4), 1007–1011.
- Matsushita, Y., Kanda, A., Usugi, T., Tsuda, S. (2008). First report of a Tomato chlorotic dwarf viroid disease on tomato plants in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 74(2), 182–184.

- Matsushita, Y., Penmetcha, K.K.R. (2009). In vitro-transcribed chrysanthemum stunt viroid RNA is infectious to chrysanthemum and other plants. *Phytopathology*, 99(1), 58–66.
- Matsushita, Y., Tsuda, S. (2014). Distribution of potato spindle tuber viroid in reproductive organs of petunia during its developmental stages. *Phytopathology*, 104(9), 964–969.
- Matsushita, Y., Tsukiboshi, T., Ito, Y., Chikuo, Y. (2007). Nucleotide sequences and distribution of Chrysanthemum Stunt Viroid in Japan. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 76(4), 333–337.
- Matsushita, Y., Usugi, T., Tsuda, S. (2009). Host range and properties of Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 124(2), 349–352.
- Matsushita, Y., Usugi, T., Tsuda, S. (2010). Development of a multiplex RT-PCR detection and identification system for Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 128(2), 165–170.
- Matsushita, Y., Usugi, T., Tsuda, S. (2011). Distribution of tomato chlorotic dwarf viroid in floral organs of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), 441–447.
- Matsushita, Y., Yanagisawa H. (2018). Distribution of Tomato planta macho viroid in germinating pollen and transmitting tract. *Virus Genes*, 54(1), 124–129.

松下陽介, 津田新哉 (2010a). 侵入に警戒を要するポスピウイルス, その特徴と海外の発生事例. 植物防疫, 64(7), 484–488.

松下陽介, 津田新哉 (2010b). トマト退緑萎縮病病原ウイルスの宿主範囲等の諸性質. 植物防疫, 64(1), 27–30.

Matsuura, S., Matsushita, Y., Kozuka, R., Shimizu, S., Tsuda, S. (2010). Transmission of Tomato chlorotic dwarf viroids by bumblebees (*Bombus ignitus*) in tomato plants. European Journal of Plant Pathology, 126(1), 111–115.

Mehle, N., Seljak, G., Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Prezelj, N., Ravnikar, M. (2010). Chrysanthemum stunt viroid newly reported in Slovenia. New Disease Reports, 21, 2.

Mertelik, J., Kloudova, K., Cervena, G., Necekalova, J., Mikulkova, H., Levkanicova, Z., Dedic, P., Ptacek, J. (2009). First report of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in *Brugmansia* spp., *Solanum jasminoides*, *Solanum muricatum* and *Petunia* spp. in the Czech Republic. New Disease Reports, 19, 27.

Mink, G.I. (1993). Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. Annual Review of Phytopathology, 31, 375–402.

Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Marn, M. V., Plesko, I. M., Molinero-Demilly, V. (2010). Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. Journal of Virological Methods, 169(1), 207–210.

- Nixon T., Glover, R., Mathews-Berry, S., Daly, M., Hobden, E., Lambourne, C., Harju, V., Skelton, A. (2010). Columnea latent viroid (CLVd) in tomato: the first report in the United Kingdom. *Plant Pathology*, 59(2), 392.
- Okada, K., Kusakari, S., Kawaratani, M., Negoro, J., Ohki, S., Osaki, T. (2000). Tobacco mosaic virus is transmissible from tomato to tomato by pollinating bumblebees. *Journal of Virological Methods*, 66(1), 71–74.
- Owens, R.A., Chen, W., Hu, Y., Hsu, Y-H. (1995). Suppression of potato spindle tuber viroid replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology*, 208, 554–564.
- Owens, R.A., Hammond, R.W. (2009). Viroid pathogenicity: one process, many faces. *Viruses*, 1(2), 298–316.
- Owens, R.A., Thompson, S.M., Steger, G. (1991). Effects of random mutagenesis upon potato spindle tuber viroid replication and symptom expression. *Virology*, 185, 18–31.
- Owens, R.A., Verhoeven, J.Th.J. (2009). Potato spindle tuber. *The Plant Health Instructor*, (DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0804-01).
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S., Porsoongnum, J. (2011). First report of natural infection of Pepper chat fruit viroid in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24, 6.

Roberts, I.M., Wang, D., Thomas, C.L., Maule, A.J. (2003). Pea seed-borne mosaic virus seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. *Protoplasma*, 222(1-2), 31–43.

佐野輝男 (2007). ウイロイド(Viroid). 植物防疫, 61(11), 660–664.

Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., Owens, R.A. (1992). Identification of multiple structural domains regulation viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10104–10108.

Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H., Sängler, H.L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *The EMBO Journal*, 4(9), 2181–2190.

Shimizu, K.K., Okada, K. (2000). Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. *Development*. 127(20), 4511–4518.

Shipp, J.L., Buitenhuis, R., Stobbs, L., Wang, K., Ferguson, G. (2008). Vectoring of Pepino mosaic virus by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology*, 153(2), 149–155.

- Shiraishi, T., Maejima, K., Komatsu, K., Hashimoto, M., Okano, Y., Kitazawa, Y., Yamaji, Y., Namba, S. (2013). First report of tomato chlorotic dwarf viroid from symptomless petunia plants (*Petunia* spp.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 79(3), 214.
- Singh, D., Mathur, S.B. (2004). *Histopathology of seed-borne infections*. CRC Press, New York. 296pp.
- Singh, R.P. (1970). Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Journal of Potato Research*, 47(6), 225–227.
- Singh, R.P., Dilworth, D.A. (2009). Tomato chlorotic dwarf viroid in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *European Journal of Plant Pathology*, 123(1), 111–116.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Ao, X., Singh, M., Baranwal, V.K. (2009). Citrus exocortis viroid transmission through commercially-distributed seeds of *Impatiens* and *Verbena* plants. *European Journal of Plant Pathology*, 124(4), 691–694.
- Singh, R.P., Boucher, A., Somerville, T.H. (1992). Detection of Potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76(9), 951–953.
- Steel, R.G.D. (1959). A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. *Biometrics*, 15, 560–572.

Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T., Hobden, E. (2009). Columnnea latent viroid (CLVd): first report in tomato in France. *New Disease Reports*, 20, 4.

Student (W.S. Gossett). (1908). The probable error of a mean, *Biometrika*, 6, 1–25, reprinted on pp.11–34 in “Student’s” *Collected Papers*, Edited by E.S. Pearson and John Wishart with a Foreword by Launce McMullen, Cambridge Press for the *Biometrika Trustees*, 1942.

Suzuki, T., Fujibayashi, M., Hataya, T., Taneda, A., He, Y-H., Tsushima, T., Duraisamy, G.S., Siglová, K., Matoušek, J., Sano, T. (2017). Characterization of host-dependent mutations of apple fruit crinkle viroid replicating in newly identified experimental hosts suggests maintenance of stem–loop structures in the left-hand half of the molecule is important for replication. *Journal of General Virology*, 98(3), 506–516.

Takeda, R., Ding, B. (2009). Viroid Intercellular Trafficking: RNA Motifs, Cellular Factors and Broad Impacts. *Viruses*, 1(2), 210–221.

Takeda, R., Zirbel, C.L., Leontis, N.B., Wang, Y. Ding, B. (2018). Allelic RNA motifs in regulating systemic trafficking of potato spindle tuber viroid. *Viruses*, 10(4), 160, (doi:10.3390/v10040160).

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Tsushima, D., Tsushima, T., Sano, T. (2016). Molecular dissection of a dahlia isolate of potato spindle tuber viroid inciting a mild symptoms in tomato. *Virus Research*, 214, 11–18.
- Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., He, Y.H., Raj, A.P.C., Sano, T. (2011). Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *Journal of General Plant Pathology*, 77(4), 253–256.
- Tsushima, T., Sano, T. (2018). A point-mutation of *Coleus blumei* viroid 1 switches the potential to transmit through seed. *Journal of Virology*, (DOI 10.1099/jgv.0.001013).
- Verhoeven, J.Th.J., Botermans, M., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W. (2011a). First report of Pepper chat fruit viroid in capsicum pepper in Canada. *New Disease Reports*, 23, 15.
- Verhoeven, J.Th.J., Botermans, M., Meekes, E.T.M., Roenhorst, J.W. (2012). Tomato apical stunt viroid in the Netherland: most prevalent pospiviroid in ornamentals and first outbreak in tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 803–810.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W. (2008). First report of *Solanum jasminoides* infected by *Citrus exocortis* viroid in Germany and the Netherlands and Tomato apical stunt viroid in Belgium and Germany. *Plant Disease*, 92(6), 973.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Botermans, M., Roenhorst, J.W. (2010).

Epidemiological evidence that vegetatively propagated, solanaceous plant species act as sources of Potato spindle tuber viroid inoculum for tomato. *Plant Pathology*, 59(1), 3–12.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A., Roenhorst, J.W. (2004). Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columnea* latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 110(8), 823–831.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W. (2007). First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: *Citrus exocortis* viroid in *Verbena* sp., *Potato spindle tuber viroid* in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*, and *Tomato api*. *New Disease Reports*, 15, 7.

Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., Flores, R. de la Peña, M. (2009). Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. *Virus Research*, 144(1), 209–214.

Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Owens, R.A. (2011b). Mexican papita viroid and tomato planta macho viroid belong to a single species in the genus Pospiviroid. *Archives of Virology*, 156(8), 1433–1437.

- Verhoeven, J.Th.J., Westenberg, M., van Ede, E.P.M., Visser, K., Rosenhorst, J.W. (2016). Identification and eradication of potato spindle tuber viroid in dahlia in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 146(2), 443–447.
- Visvader, J.E., Symons, R.H. (1985). Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Research*. 13(8), 2907–2920.
- Visvader, J.E., Symons, R.H. (1986). Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. *The EMBO Journal*, 5(9), 2051–2055.
- Wang, D., Maula, A.J. (1992). Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seed-borne mosaic virus. *Journal of General Virology*, 73(7), 1615–1620.
- Ward, L.I., Tang, J., Veerakone, S., Quinn, B.D., Harper, S.J., Delmiglio, C., Clover, G.R.G. (2010). First Report of *Potato spindle tuber viroid* in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*) in New Zealand, *Plant Disease*, 94(4), 479.
- Wardlaw, I.F. (1990). Tansley Review No. 27 The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist*, 116(3), 341–381.

- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmer, S., Gast, F.-U., Riedel, L., Sanger, H.L. (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.
- Yanagisawa, H., Matsushita, Y. (2017). Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 211–217.
- Yanagisawa, H., Matsushita, Y. (2018). Differences in dynamics of horizontal transmission of Tomato planta macho viroid and Potato spindle tuber viroid after pollination with viroid-infected pollen. *Virology*, 516, 258–264.
- Yanagisawa, H., Shiki, Y., Matsushita, Y., Ooishi, M., Takaue, N., Tsuda, S. (2017). Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 11–23.
- Ye, Z-H., Varner, J.E. (1991). Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant Cell*, 3(1), 23–37.
- Ylstra, B., Garrido, D., Busscher, J., van Tunen, A.J. (1998). Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiology*, 118(1), 297–304.

Zhong, X., Archual, A.J., Amin, A.A., Ding, B. (2008). A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell*, 20(1), 35–47.