NGS 解析および生物検定を用いたジオウ類に感染する植物ウイルスの探索

一木 (植原) 珠樹¹・長岡 (中蘭) 栄子²・山口 真輝³・大橋 美保¹・古平 栄一^{4,5}・
小島 正明⁴・五十嵐元子³・花田 薫¹・菱田 敦之³・藤川 貴史^{2*}

ABSTRACT

UEHARA-ICHIKI, T.¹, NAKAZONO-NAGAOKA, E.², YAMAGUCHI, M.³, OHASHI, M.¹, KODAIRA, E.^{4,5}, KOJIMA, M.⁴, IGARASHI, M.³, HANADA, K.¹, HISHIDA, A.³ and FUJIKAWA, T.^{2*} (2018). Next-generation sequencing and bioassay of viruses in *Rehmannia glutinosa*. Jpn. J. Phytopathol. 84: 151–157.

Chinese foxglove and glutinous rehmannia are major cultivated lines of *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et C.A.Mey., which belongs to the family Rehmanniaceae, and their roots are widely used with other medicinal herbs as traditional natural medicine. These plants are grown by vegetative propagation; therefore, once plant pathogenic viruses infect to these plants, the pathogens remain in the plant and affect root quality and yield. Since identification of pathogenic viruses in the plants is fundamental to controlling viral diseases, we used a bioassay and next-generation sequencing (NGS) to investigate plant viruses infecting Chinese foxglove and glutinous rehmannia in Toyama Prefecture in Japan. *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) and *Cucumber mosaic virus* were detected with NGS and isolated by bioassay from Chinese foxglove. Several contigs of nucleotide sequences of six plant viruses such as *Amazon lily mild mottle virus* (ALIMMV), BBWV2, *Citrus leaf blotch virus* (CLBV), *Cnidium vein yellowing virus* (CVYV), *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) and *Youcai mosaic virus* (YoMV) were detected with NGS from glutinous rehmannia. Of these, BBWV2, PIAMV and YoMV were successfully isolated by bioassay, and partial genome sequences of ALIMMV, CLBV and CVYV were detected by RT-PCR. Back inoculation of virus-free host plants with the individual isolated viruses showed that infected Chinese foxglove exhibited mild yellowing and mosaic symptoms, but glutinous rehmannia did not have any symptoms in single viral infection. These results suggest that in fields, latent infections of glutinous rehmannia with these viruses should be considered important for controlling secondary infection of any neighboring or rotation crops. This report is the first of BBWV2, PIAMV and YoMV as causal agents of viral diseases in Chinese foxglove and glutinous rehmannia in Japan.

(Received December 26, 2017; Accepted March 12, 2018)

Key words: next-generation sequencing, bioassay, virus, glutinous rehmannia, Chinese foxglove

緒 言

ジオウ (地黄, 学名 ; *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et C.A.Mey.) は, ジオウ科に属する栄養繁殖性の多年生植物で, 根部などの形態の違いによりカイケイジオ

ウ (英名 Chinese foxglove) とアカヤジオウ (英名 Glutinous rehmannia) の 2 系統に分けられ, わが国で栽培されている。ジオウの根部は乾燥して漢方薬の原料として加工され, 一部を種根として翌年の栽培用に保存する。わが国では毎年約 400 トンが漢方薬の原料として使用されるが, その多く

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター (〒 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2) Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-2 Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

² 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門 生産・流通研究領域 (〒 305-8605 茨城県つくば市藤本 2-1) Institute of Fruit Tree and Tea Science, 2-1 Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

³ 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 北海道研究部 (〒 096-0065 北海道名寄市字大橋 108-4) Hokkaido Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, 108-4 Ohashi, Nayoro, Hokkaido 096-0065, Japan

⁴ 武田薬品工業株式会社 京都薬用植物園 (〒 606-8134 京都府京都市左京区一乗寺竹ノ内町 11) Takeda Garden for Medicinal Plant Conservation, Kyoto, Takenouchi-cho 11, Ichijoji, Sakyo-ku, Kyoto 606-8134, Japan

⁵ 北里大学薬学部附属薬用植物園 (〒 252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1) Medicinal Plant Garden, School of Pharmacy, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Minami, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

* Corresponding author (E-mail: ftakashi@affrc.go.jp)

は中国からの輸入品である。しかし中国では、近年の経済発展による需要量の増加や人件費の高騰、環境保全などを目的とした輸出制限が行われている。その結果、輸入価格が上昇しており、それに対応した国内自給が可能となるようわが国のジョウの産地開発が進められている。

これまでわが国のジョウについては経験的にモザイク症状や萎縮症状が見られた株はウイルスに感染していると考えられているが、感染するウイルス種についてはキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) やタバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*, TMV) などの報告(李ら, 1981) があるのみで、網羅的な探索は報告されていない。栄養繁殖中に植物ウイルスやウイロイドといった病原体が一旦感染すると、その病原体を防除し取り除くことは極めて困難であり、その結果、作物の減収や品質の低下を引き起こす。このため、ジョウにおいても植物ウイルスやウイロイドに対する効果的な対策を立てる必要があり、そのための基礎知見として、ジョウに感染し病害を引き起こすようなウイルス種やウイロイドについて正確に把握することが重要である。そこで、次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的遺伝子検査と、指標植物を用いた生物検定を併用して、国内栽培されているジョウに感染しているウイルスの探索を行った。その結果、今までジョウでは報告のない種を含む数種ウイルスの感染を検出・同定したので報告する。

材料および方法

次世代シーケンサーによる網羅的解析 網羅的遺伝子検査のための材料として、2015年に富山県で栽培されているカイケイジョウとアカヤジョウのモザイク症状を示している数株 (Fig. 1A, B) からそれぞれ葉を採取し凍結保存した。採取した葉から、RNeasy plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) によって total RNA を抽出した。total RNA 中のリボソーム RNA のほとんどは、RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) を用いて取り除いた。次いで、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific) の手順に従ってライブラリーを作製した。さらにライブラリーを Ion PGM Hi-Q OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Ion OneTouch 2 System (Thermo Fisher Scientific) 上で RNA-Seq 用鋳型サンプルに調製した。この鋳型サンプルを Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) および 316 Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Ion PGM 次世代シーケンサー (Thermo Fisher Scientific) 上で塩基配列の解読に供試した。得られた配列の解析は、CLC genomics Workbench version

9.5.3 (CLC bio, Filgen) を用いて行った。

指標植物を用いた生物検定 ジョウに感染している植物ウイルスを分離するため、採取した葉をリン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.0) で磨碎して *Nicotiana benthamiana* および *Chenopodium quinoa* に接種後、約 24°C の温室にて育成し、病徴を示した植物体を用いて、単病斑分離を行った。

単病斑分離を3回繰り返すことによって得られたウイルスについては、NGS による解析結果からウイルス種を推定し、NGS の解析結果から得られた塩基配列情報を基に設計したプライマーを主に用いて RT-PCR を行い、得られた増幅産物をダイレクトシーケンス法で解析して種の特定制を行った。RT-PCR は PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Takara, Shiga, Japan) を用いてプロトコールに従い逆転写反応 (50°C, 30 min, 94°C, 2 min) を行った後、アニーリング温度と伸長反応時間を変えて PCR を行った (Table 1)。種が特定できたウイルス分離株については接種用に調製した後述するウイルスフリージョウに汁液接種を行った。

ジョウの調製および再接種による病原性の確認 ジョウ類は野外で長期間栽培される上に通常株分けによる繁殖を行うため、植物ウイルスに感染していない株を栽培現場から入手することは困難であると考えられた。そこで、ウイルスに感染していないジョウ類を入手することを目的に、武田薬品工業の薬用植物園で系統維持を目的として茎頂培養されてきたカイケイジョウおよびアカヤジョウの数個体を対象に、NGS を用いて、富山県で採取した試料と同様の条件で網羅的遺伝子検査解析を行った。その結果に基づいて植物ウイルスゲノムの塩基配列断片が得られない (Data not shown) ことを確認した個体を、MS 培地の基本成分を半量にした培地 (ショ糖 1%, ゲランガム 0.3% を追加添加, pH 5.6) に移植して約 24°C で 4 週間培養後した。その後オートクレーブ滅菌済みのバーミキュライトに移植して約 3 週間馴化したものをウイルスフリー株として接種試験に供試した。接種後のジョウは約 24°C に維持された温室で生育させ、感染の有無は病徴の観察および特異的プライマーを用いた RT-PCR によって確認した。

結 果

次世代シーケンサーによるウイルス断片の検出 カイケイジョウについては約 280,000 リード断片 (平均長 120 nt)、アカヤジョウについては、約 300,000 リード断片 (平均長 150 nt) の RNA 由来配列を得た。さらに、Phred クオリティスコア ≤ 20 (99% 精度以上) の高精度な配列断片のみを選んだ後、150 nt 以上のサイズとなるような RNA コンティグを作成した。カイケイジョウでは 407 個の RNA コンティグ

Table 1. Primers and conditions used in confirmatory PCR for the detection of corresponding viruses

Primer	Sequence	Accession no. or reference for primers	Product size (kb)	PCR condition	
				3-step cycling ^{b)}	Final extension ^{c)}
ALiMMV F1056	TAAATCGGTACGTAAAAGGAA	AB724115	1.3	94°C, 30 s,	72°C, 5 min
ALiMMV R2335	ACGACTACAGTTTAAAGAAAC			51°C, 30 s, 72°C, 2min	
BBW25	AATGARRTKGTNCTCAAYTA	(一木ら, 2016)	2	94°C, 30 s,	
BBW2cpR	TTAATGGGRGGCTAGTGACC			50°C, 30 s, 72°C, 2 min	
CLBV F5828	<u>G</u> GGCAAAGTGATGGAATGTCTG ^{a)}	JN983456	2.4	94°C, 30 s,	
CLBV R8408	TGGCTCCCATGACTCTCAGAT			55°C, 30 s, 72°C, 3 min	
CPTALL5 (CMV F)	YASYTTTDRGGTTCAATTCC	(Choi <i>et al.</i> , 1999)	0.9	94°C, 30 s,	
CPTALL3 (CMV R)	GACTGACCATTTTAGCCG			50°C, 30 s, 72°C, 1 min	
CVYVF3398	CAGATCAGATAGCAGCGGAG	KR011028	3.5	94°C, 30 s,	
CVYVR6844	AGCCCTTTGCTGCCACAGTG			55°C, 30 s, 72°C, 3 min	
PIAMV F5420	CGCCATGACCTTCCAAGTCT	LC155795	0.6	94°C, 30 s,	
PIAMV R6102	GGTCGTAGGCTTATTA ^{a)} AAACGGT			50°C, 30 s, 72°C, 1 min	
YoMV F	AGTATAGATATAGACCGGAG	(一木ら, 2016)	0.6	94°C, 30 s,	
YoMV R	ATTACACCGTAAGTATATCTC			50°C, 30 s, 72°C, 1 min	

a) Underlined letter indicates base differs from reference nucleotide.

b) No. of cycles was 25.

c) After the final extension, reaction samples were held at 12°C.

(平均長 : 362 nt, 中央値 : 269 nt) が得られ, アカヤジオウでは 1222 個の RNA コンティグ (平均長 : 378 nt, 中央値 : 324 nt) が得られた. これらコンティグを, NCBI の Nucleotide BLAST で同源性検索を行った.

NCBI の Nucleotide BLAST で得られた結果のうち, 複数のコンティグで期待値 (e-value) が 1×10^{-20} 以下の値でヒットした植物ウイルスは, 以下の通りであった. カイケイジオウからはファバウイルス属ソラマメウイルトウイルス 2 (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV2) とククモウイルス属キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) の 2 種であり, アカヤジオウからは, アヌラウイルス属アマゾンユリ微斑ウイルス (*Amazon lily mild mottle virus*, ALiMMV), ソラマメウイルトウイルス 2, シトリウイルス属 *Citrus leaf blotch virus* (CLBV), セコウイルス科に属する *Cnidium vein yellowing virus* (CVYV) (Yoo *et al.*, 2015), ポテックスウイルス属オオバコモザイクウイルス (*Plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV) およびトバモウイルス属アブラナモザイクウイルス (*Youcai mosaic virus*, YoMV) の 6 種がヒットした (Table

2). ウイロイドの断片はカイケイジオウ, アカヤジオウいずれからも検出されなかった.

ウイルスの分離とジオウでの病原性 富山県で栽培されているカイケイジオウおよびアカヤジオウの葉の粗汁液をそれぞれ *N. benthamiana* および *C. quinoa* に接種したところ, モザイクやえそ斑点症状を示した. 引き続き単病斑分離を行い, 分離できたウイルスについて, Table 1 に示したプライマーによる RT-PCR を行い, PCR 産物のダイレクトシーケンシングによる確認を行ったところ, カイケイジオウからはソラマメウイルトウイルス 2 とキュウリモザイクウイルスの 2 種類, アカヤジオウからはソラマメウイルトウイルス 2, オオバコモザイクウイルス, アブラナモザイクウイルスの 3 種類が分離された. そこで, これらのウイルスの病原性を確認するため, それぞれカイケイジオウおよびアカヤジオウのウイルスフリー株に汁液接種した.

汁液接種の結果を Fig. 1 と Table 3 に示した. 接種約 2 週間後から, キュウリモザイクウイルスを接種したカイケイジオウでは軽いモザイクや黄化が, ソラマメウイルトウイ

Table 2. Viral sequences returned by Blastn search using contig sequences as queries

Sample plant name	Reference virus genus	Reference virus name	Accession Nos. for reference sequence
Chinese foxglove	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>	AB051386, AB018701, AB018698, AB013615, JX575182, KC625494, FJ485685, KX234809, JX993908, KJ789403, KM076648, KC625515, KX686589, KC625516, AF149425
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	AJ517802, LC066417, LC066409, LC066517, LC066451, LC066500, HQ874434, EF202596
Glutinous rehmannia	<i>Anulavirus</i>	<i>Amazon lily mild mottle virus</i>	AB724113, AB724114, AB724115
	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>	AB051386, KX234810, KT246496
	<i>Citricivirus</i>	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	JQ013956, JN983456
	<i>Secoviridae</i> ^{a)}	<i>Cnidium vein yellowing virus</i>	KR011028
	<i>Potexvirus</i>	<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	LC155795, KU697313
	<i>Tobamovirus</i>	<i>Youcai mosaic virus</i>	AB261175, D38444

a) Genus is unassigned.

Table 3. Symptoms and RT-PCR results of back-inoculation of virus-free host plants

Plant inoculated	Inoculum	Symptoms ^{a)}	RT-PCR ^{b)}
Chinese foxglove	Broad bean wilt virus 2	m, y	+
	Cucumber mosaic virus	M, Y	+
Glutinous rehmannia	Broad bean wilt virus 2	—	+
	Plantago asiatica mosaic virus	—	+
	Youcai mosaic virus	—	+

a) M: mosaic, Y: yellowing, m: mild mosaic, y: mild yellowing, —: absent; b) +: detected

ルス 2 を接種したカイケイジョウではより軽いモザイクや黄化が接種上位葉に生じた一方で (Fig. 1D および Table 3), アカヤジョウでは, 接種 3 週間以上生育させても, いずれのウイルスも単独接種では肉眼で判別できる病徴を引き起こさなかった (Fig. 1E および Table 3). RT-PCR および電気泳動により感染を確認したところ, カイケイジョウ, アカヤジョウいずれも接種上位葉で接種したウイルスの予測サイズのバンドが明瞭に認められ, 感染が確認された (Fig. 1F, Table 3).

カイケイジョウからは, NGS 解析, 生物検定いずれの方法でもキュウリモザイクウイルスとソラメメウィルトウイルス 2 の 2 種が検出, 分離されたのに対して, アカヤジョウからは NGS 解析で検出された 6 種のウイルスのうち, 生物検定により分離できたウイルスは 3 種であった. そこで, NGS 解析で検出できたものの, 分離できなかったアマゾンユリ微斑ウイルス, *Citrus leaf blotch virus* および *Cnidium vein yellowing virus* について, 富山県で栽培されているアカヤ

ジョウから total RNA を抽出して RT-PCR および電気泳動を行ったところ, 予測されたサイズの位置に明瞭なバンドが認められた (Fig. 1G). この増幅産物をダイレクトシーケンス法で解析し, 得られた配列を Nucleotide BLAST で検索したところ, アマゾンユリ微斑ウイルスは Query cover 85%, Identity 80%, 期待値 (e-value) 0 で Accession No. AB724115 (アマゾンユリ微斑ウイルス) に, *Citrus leaf blotch virus* は Query cover 100%, Identity 82%, e-value 0 で Accession No. JN983456 (*Citrus leaf blotch virus*) に, *Cnidium vein yellowing virus* は Query cover 99%, Identity 85%, e-value 0 で Accession No. KR011028 (*Cnidium vein yellowing virus*) にヒットした (アマゾンユリ微斑ウイルス; Accession No. LC371931, *Citrus leaf blotch virus*; Accession No. LC371929, *Cnidium vein yellowing virus*; Accession No. LC371930).

考 察

富山県で採集したジョウは, いずれも 1 年に 1 度株分け

Fig. 1. **A** and **B** Typical mosaic symptoms on leaves of naturally infected plants. **A** Chinese foxglove. **B** Glutinous rehmannia. **C** Leaf of virus-free Chinese foxglove. **D** Upper leaf of Chinese foxglove 3 weeks after inoculation with CMV. **E** Upper leaf of glutinous rehmannia 3 weeks after inoculation with BBWV2. **F** RT-PCR detection of BBWV2, PLAMV and YoMV from upper leaf of glutinous rehmannia 3 weeks after back inoculation. **G** RT-PCR detection of ALiMMV, CLBv and CVYV in glutinous rehmannia collected from Toyama Prefecture. Primers are given in Table 1.

により維持されてきたものであり、聞き取り調査によるとアカヤジオウは少なくとも約7年間、カイケイジオウは30年以上野外で継続して栽培されていた。カイケイジオウの方が長期にわたり野外で継代栽培されているのにもかかわらず、見いだされたウイルス種が少なかったが、ウイルスが感染した際には、軽い黄化やモザイクを示した。一方アカヤジオウは、単独接種では肉眼で判別可能な病徴は示さなかった。アカヤジオウについては、単独感染の場合、病徴を示さない可能性が示唆されたことから、アカヤジオウを栽培管理する際には圃場周辺の作物や輪作作物への二次感染防止にも注意が必要と考えられる。実際の栽培現場ではカイケイジオウの方がアカヤジオウよりも広く栽培されていることから、ジオウ産地におけるウイルスの混合感染や病害の発生状況などを把握し、被害状況や病原ウイルス種に対応した防除対策を立てることが重要であると考えられる。また、今回薬用作物に感染しているウイルスを、NGS解析と生物検定を組み合わせて探索した結果、指標植物が示す病徴や分離だけでは特定が困難なウイルスについて、NGS解析から得られた塩基配列情報とその結果に基づくRT-PCRが迅速な検出・同定に非常に有効であること、また、今回分離できたウイルス以外にも、植物ウイルスが感染している可能性を推察できることが示された。

今回分離ができなかったアマゾンユリ微斑ウイルスは、ツルナ、ササゲおよびアカザなどに (Fuji *et al.*, 2013), *Cnidium vein yellowing virus* はセンキュウ及び *N. benthamiana* に感染し病徴を生じさせることが確認されている (Yoo *et al.*, 2015)。また *Citrus leaf blotch virus* はカンキツ類から見いだされたウイルスであるが、近年オウトウや、タバコ属の植物にも感染することが示唆されている (Harper *et al.*, 2008; Guardo *et al.*, 2009)。これらのウイルスについては、ジオウが属するゴマノハグサ科の植物への感染は報告されていないが、今回、ゲノムの一部の配列が確認されたことにより、ゴマノハグサ科の植物も宿主となりうることが示唆され、これらのウイルスの宿主範囲がより広いものである可能性が示された。

今後も本手法を用いることで、わが国の薬用作物種に感染するウイルスを網羅的に探索し、薬用作物の生産阻害要因の一つとなり得るウイルス病害に関する情報を提供だけでなく、これまで認知されていなかった植物ウイルスをも新たに見いだされることが期待できる。モザイク症状を示すジオウからソラマメウイルトウイルス2、オオバコモザイクウイルスおよびアブラナモザイクウイルスが検出、分離されたのは今回の報告が初めてであるが、アブラナモザイクウイルスについては、李ら (1981) が見出した当時

のタバコモザイクウイルスであった可能性も考えられる。なお *Citrus leaf blotch virus* についてはカンキツ斑点ウイルス、*Cnidium vein yellowing virus* についてはセンキュウ葉脈黄化ウイルスと和名を提案し、今回報告した複数種のウイルス感染により引き起こされるジオウの病名を、ジオウモザイク病と提案したい。

ジオウに関しては、ウイルスが感染することによる収獲物への影響は Matsumoto ら (1988, 1989) の報告があるのみで、十分に解明されていない。感染しているウイルス種を明らかにし、費用対効果の高い防除対策を立てるためには、ウイルス感染がジオウの品質や収量に及ぼす影響も今後詳細に解明していくべきだろう。

摘 要

ジオウ (地黄) は、わが国では漢方薬の原料として使用されるが、そのウイルス病害の実態は十分明らかにされていない。そこで次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的遺伝子検査と、指標植物を用いた生物検定を併用して、富山県で栽培されているカイケイジオウおよびアカヤジオウに感染しているウイルスの探索を行った。カイケイジオウではソラマメウイルトウイルス2とキュウリモザイクウイルスの2種、アカヤジオウではアマゾンユリ微斑モザイクウイルス、ソラマメウイルトウイルス2、*Citrus leaf blotch virus*、オオバコモザイクウイルス、アブラナモザイクウイルスおよび *Cnidium vein yellowing virus* の6種のウイルスの塩基配列断片が検出され、生物検定ではカイケイジオウからソラマメウイルトウイルス2とキュウリモザイクウイルスの2種、アカヤジオウからはソラマメウイルトウイルス2、オオバコモザイクウイルスおよびアブラナモザイクウイルスの3種が分離された。分離されたウイルスを単独でウイルスフリーのカイケイジオウとアカヤジオウそれぞれに接種したところ、カイケイジオウでは軽微な病徴が観察されたが、アカヤジオウは肉眼で判別できる病徴は示さなかった。ウイルスに感染していても、アカヤジオウは病徴を示さない可能性があり、アカヤジオウを栽培管理する際には圃場周辺の作物や輪作作物への二次感染防止にも注意が必要と考えられる。

またアカヤジオウから分離できなかったアマゾンユリ微斑モザイクウイルス、*Citrus leaf blotch virus* および *Cnidium vein yellowing virus* についても、NGSの結果を基に設計したプライマーを用いて、富山で採集したアカヤジオウを対象にRT-PCRを行い、得られた増幅産物の配列をNucleotide BLASTで解析した結果、それぞれのウイルスがアカヤジオウに感染している可能性が示唆された。モザイク症状を示

すジオウからソラマメウイルス2, オオバコモザイクウイルスおよびアブラナモザイクウイルスが検出, 分離されたのは今回の報告が初めてである. これら複数種のウイルス感染により引き起こされるジオウの病名を, ジョウモザイク病と提案したい. また, *Citrus leaf blotch virus* についてはカンキツ斑点ウイルス, *Cnidium vein yellowing virus* についてはセンキュウ葉脈黄化ウイルスと和名を提案したい.

謝 辞

本研究を行うにあたり, 辰尾良秋氏, 高尾泰昌氏, 村上芳哉氏および黒崎文也氏 (富山大学薬学部薬用植物園) の方々にジオウ採集の際に協力をいただきました. また論文の執筆の際には国立研究開発法人 農研機構 遺伝資源センターの佐藤豊三氏に助言をいただきました. 本研究は「農業生物資源ジーンバンク事業」の資金で実施しました.

引用文献

- Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M. and Ryu, K.H. (1999). RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol. Methods* 83: 67–73.
- Fuji, S., Kikuchi, M., Ueda, S., Toda, T., Furuya, H., Fukumoto, F. and Hanada, K. (2013). Characterization of a new anulavirus isolated from Amazon lily plants. *Arch Virol.* 158: 201–206.
- Guardo, M., Petere, O., Castellano, M.A., Savino, V. and Caruso, A. (2009). A new herbaceous host of *Citrus leaf blotch virus*. *J. Plant Pathol.* 91: 485–488.
- Harper, S.J., Chooi, K.M. and Pearson, M.N. (2008). First report of *Citrus leaf blotch virus* in New Zealand. *Plant Dis.* 92: 1470.
- 一木 (植原) 珠樹・藤 晋一・杉本るり子・大橋美保・薮中恭子・北谷桃子・山下一夫・花田 薫・青木孝之 (2016). 農業生物資源ジーンバンクが保有する植物ウイルス株の外被タンパク質遺伝子の検出とその利用. *日本微生物資源学会誌* 32: 39–47.
- 李 準瑋・山下修一・土居養二・與良 清 (1981). 薬用植物ウイルス病の研究 (2) アカヤジオウ, ジギタリス, ハッカ, チョウセンアサガオなどのウイルス病について. *日植病報* 47: 137. (講要)
- Matsumoto, M., Shoyama, Y. and Nishioka, I. (1988). Effects of bacterial and virus infection on iridoid glycoside contents in *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *purpurea* Makino. *Shoyakugaku Zasshi* 42: 329–332.
- Matsumoto, M., Shoyama, Y., Nishioka, I., Iwai, H. and Wakimoto, S. (1989). Identification of viruses infected in *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *purpurea* Makino and effect of virus infection on root yield and iridoid glycoside contents. *Plant Cell Reports* 7: 636–638.
- Yoo, R.H., Zhao, F., Lim, S., Igori, D., Kim, S.M., An, T.J., Lee, S.H. and Moon, J.S. (2015). The complete genome sequences of two isolates of *cnidium vein yellowing virus*, a tentative new member of the family Secoviridae. *Arch Virol.* 160: 2911–2914.