

遺伝子組換えトマトを利用したモザイク病 (CMV) 抵抗性トマト素材系統 'AT-CM01' の開発

齊藤 猛雄・佐藤 隆徳*・松永 啓**・吉田 建実*・
斎藤 新・山田 朋宏・門馬 信二***

(平成 18 年 9 月 30 日受理)

Development of a Cucumber Mosaic Virus (CMV) Resistant Tomato Line 'AT-CM01' from a Transgenic Plant Expressing the Coat Protein Gene of CMV

Takeo Saito, Takanori Sato, Hiroshi Matsunaga, Tatemi Yoshida, Atsushi Saito,
Tomohiro Yamada and Shinji Monma

I 緒 言

キュウリモザイクウイルス (CMV) によるトマトのモザイク病を防除するために、交雑育種による抵抗性品種の育成が古くから試みられ、*Lycopersicon chilense*, *L. chimielewskii*, *L. peruvianum* や *Solanum lycopersicoides* 等、いくつかの近縁種で抵抗性素材が見出されてきた(栗山ら, 1971; Phills ら, 1977; 岡本ら, 1996, 1998; Abad ら, 2000)。しかしながら、抵抗性の遺伝様式が複雑なことや栽培種との交雑不親和性のために栽培種への抵抗性導入は成功していない (Provvidenti ら, 1995)。

一方、遺伝子組換えはウイルス病抵抗性植物を作出する技術として注目され、トマトにおいても CMV 外被タンパク質遺伝子を導入したモザイク病 (CMV) 抵抗性組換えトマトの開発が実施されてきた (Fuch ら, 1996; Ilardi ら, 2001)。野菜茶業研究所においても 1992 年から当該研究に取り組み、CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した遺伝子組換えトマトを作出し (佐藤ら, 1992)、その抵抗性を確認するとともに種々の環境に対する安全性の評価を行い (佐藤ら, 1993a, b, Sato ら, 1994, 1995, 1997)、1997 年に開放系における栽培が認められるに至った。

環境への安全性評価試験を終了した組換えトマト系統 (No. 1208) は完熟出荷には不向きな F₁ 品種である 'サターン' (タキイ種苗株式会社) に遺伝子導入を図った後代であるため、諸形質が分離するほか果実が軟らかいという欠点があった。そこで、完熟出荷向け品種と交雑した後代について諸形質の固定を図り、完熟出荷向け高品質トマト品種を育成しようとした。その結果、モザイク病 (CMV) 抵抗性の素材系統を開発したのでその経過と特性を報告する。

II 育成経過

'サターン' へ CMV 外被タンパク質遺伝子を導入して得られた組換えトマト後代系統 'No.1208-3 (R₀)' を父親、完熟出荷向け品種である 'おどりこ' (株式会社サカタのタネ) を母親として 1996 年に交雑した。1997 年以降、後代について、導入した CMV 外被タンパク質遺伝子の有無を PCR により確認するとともに果実形質等の一般実用形質に着目して選抜と自殖を繰り返した。その結果、完熟出荷向け高品質トマト品種という当初目標の達成には至らなかったものの、安定したモザイク病 (CMV) 抵抗性を示し生食用トマト品種育成の素材として利用可能な固定系統 OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7-5 を選抜

〒 514-2392 三重県津市安濃町草生 360

野菜育種研究チーム

* 現 企画管理部

** 現 長野県中信農業試験場

*** 現 所長

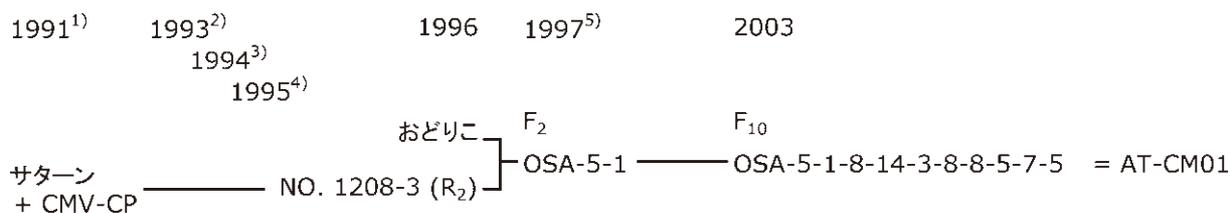


図-1 'AT-CM01' の育成図

- 1) 'サターン' へのCMV外被タンパク質遺伝子 (CMV-CP) 導入試験開始
- 2) 閉鎖系における安全性評価試験開始
- 3) 非閉鎖系における安全性評価試験開始
- 4) 隔離圃場における安全性評価試験開始
- 5) 開放系における栽培認可

し, 'AT-CM01' と系統名を付した (図-1)。

III 品種特性

1 材料および方法

a 2002年度春夏作

CMV検定試験には, F₈世代のOSA-5-1-8-14-3-8-8, 対照品種として'桃太郎8'(タキイ種苗株式会社), 'おどりこ', 'メリーロード'(株式会社サカタのタネ)および'サターン'を供試した。2002年3月15日に育苗箱へ播種し, 適宜間引きした。本葉が1~2枚展開した4月3日に次の手順でCMVを接種した。サブグループIに属するCMV-O系に罹病したタバコ葉をリン酸緩衝液(pH7.0, 0.1%チオグリコール酸を含む)とともに磨砕後, 大きな磨砕残渣をピンセットで除去してCMV接種液とした。第1本葉へカーボランダム(1200メッシュ)をふりかけ, CMV接種液をつけた綿球を軽くこすりつけた後, 接種液とカーボランダムを蒸留水で洗い流した。調製から接種までの間, CMV接種液は氷上で保冷した。CMV無接種区の株にはCMV接種液の代わりにリン酸緩衝液を同様に処理した。接種16および28日後に各個体についてモザイク症状の有無を調査するとともに, 生育状況を調査した。OSA-5-1-8-14-3-8-8については46株, 対照品種については19から20株にCMVを接種した。

一般特性の調査には, CMV検定と同じ品種・系統を供試した。2002年3月7日に播種し, 3月28日に直径10.5cmのポットへ移植して育苗した。4月16日に1区5株の2反復で露地圃場へ定植した。畝幅180cm, 株間40cm, 条間70cmの2条植えとし, 畝面は黒ポリエチレンフィルムでマルチングした。成分量でN: 15kg/10a, P₂O₅: 12.9kg/10aおよびK₂O: 15kg/10aをロング424(全農)で施用するとともに, 炭酸苦土石灰: 100kg/10aおよび過磷酸石灰: 133kg/10aを施用した。栽培は, 自根の主枝1本仕立てとした。遺伝資源特性調査マニュアル第4

分冊(農業生物資源研究所, 1992)に準拠し, 平成4年度種苗特性分類調査報告書(日本種苗協会, 1993)を参考にして植物体の特性, 果実の外観および品質に関する特性を調査した。

b 2002年度秋冬作

F₉世代のOSA-5-1-8-14-3-8-8-5, 対照品種として'桃太郎8', 'おどりこ', 'サターン'および'秋玉'(野菜試験場)を供試した。2002年8月7日に播種し, 8月23日に直径10.5cmのポットへ移植して育苗した。第4本葉が展開した9月3日に2002年度春夏作と同様の方法でCMVを接種した。ただし, 接種は第4本葉の最先端にある小葉のみに対して行った。各品種・系統について15株にCMVを接種し, 無接種区も15株とした。9月17日にモザイク症状の有無を調査した後, CMV接種区, 無接種区ともに1区5~6株の2反復でファイロンハウス内へ定植した。定植方法および施肥量は2002年度春夏作と同様とした。なお, 低温期は温風暖房機で加温し, 暖房開始温度は15℃とした。

草丈, 節間長, 収穫開始日および枯死株率を調査するとともに, 果実の特性を調査した。果実の堅さについては, EZ Test(島津製作所)を用い, 果実赤道部を直径20mmのディスク状プランジャーにより100mm/minの速さで5mm圧縮した場合の応力(N)を測定した。また, 10月12日に各品種・系統についてCMV接種区および無接種区からそれぞれ6株の本葉を採取し, ELISAによるCMVの検出を試みた。ELISAはCMV検出用試薬(日本植物防疫協会研究所)を用い, 高橋(1988)の方法に従った。405nmにおける吸光度を1420マルチラベルカウンター(ARVO SX, WALLAC社)にて測定した。CMV接種区の試料における吸光度が対照区における吸光度の3倍を超える場合を, CMV陽性と判定しCMVが検出されたと判断した。

c 2003 年度春夏作試験

2002 年度春夏作と同様に試験を行った。F₁₀ 世代の OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7, 対照品種として '桃太郎 8', 'おどりこ', 'サターン' および '秋玉' を供試した。2003 年 3 月 7 日に播種し, 3 月 27 日に鉢上げした。第 4 本葉が展開した 4 月 8 日に CMV を汁液接種し, 4 月 22 日に露地圃場へ 1 区 5 ~ 6 株の 2 反復で定植した。CMV 発病株率等を調査した。

d 2003 年度秋冬作試験

2002 年度秋冬作と同様に試験を行った。F₁₁ 世代に当たる OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7-5 ('AT-CM01'), 対照品種として '桃太郎 8', 'おどりこ' および 'サターン' を供試した。2003 年 9 月 9 日に播種し, 9 月 25 日に鉢上げした。第 4 本葉が展開した 10 月 9 日に CMV を汁液接種し, 10 月 23 日に青枯病汚染圃場のビニールハウス内へ 1 区 10 株の 2 反復で定植した。CMV, ToMV および青枯病発生率を調査した。

e 導入遺伝子の確認

F₇ 世代の OSA-5-1-8-14-3-8 と '桃太郎 8' を供試した。2001 年 3 月 7 日播種, 4 月 23 日に定植し, 自根の主枝 1 本仕立て栽培とした。収穫盛期にある 6 月に各品種から小葉を採取し, サザンプロット分析に供した。Murray ら (1980) の方法に従って抽出した DNA (7 μ g/lane) を制限酵素 *Pst* I で消化し, 0.8% アガロースゲルで分離した。ゲルはアルカリブロットニング (Sambrook ら, 1989) によりナイロン膜 (Nylon Membranes, positively charged, ロシユ・ダイアグノスティックス社) に転写し, 2 x SSC で洗浄後, 風乾し, ハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーション, 洗浄等は DIG 標識核酸検出キット (ロシユ・ダイアグノスティックス社) を用いて行い, CDP-Star (Amersham LIFE SCIENCE 社) による化学発光をポラロイドフィルムに感光させた。プローブには, CMV 外被タンパク質遺伝子の 620bp 部分 (図-4) を PCR DIG Probe Synthesis Kit (ロシユ・ダイアグノスティックス社) を用いて DIG 標識したものを使用した。標識の際は, トマトの形質転換に用いたプラスミド YI-25 (Yoshioka ら, 1992) の DNA を鋳型に, 2 種のプライマー, 5'-CTTTCGCGACTTAACAAGACGTTAG-3' および 5'-CTTCAGACAGTTTATAGCAGAACTG-3' を用いて PCR を行った。PCR の条件は, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 93 $^{\circ}$ C 1 分 \rightarrow 65 $^{\circ}$ C 1 分 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 分を 32 回, 72 $^{\circ}$ C 5 分とした。

2 結果と考察

a モザイク病 (CMV) 抵抗性

2002 年度春夏作では, F₈ 世代の OSA-5-1-8-14-3-8-8 は接種 28 日後の発病株率が約 33% と対照品種の 100% と比較して低かった。また, CMV を接種しなかった場合と同程度の生育を示した。これらのことから選抜系統はモザイク病 (CMV) に対し免疫性ではないものの高い抵抗性を示すと判断された (表-1)。

2002 年度秋冬作では, 定植時 (CMV 接種 14 日後) には対照品種 4 点のすべての株でモザイク症状が確認

表-1 供試品種・系統の CMV 抵抗性検定結果 (2002 年度春夏作)

品種・系統名	CMV 接種株数	接種 16 日後		接種 28 日後	
		発病株率 (%)	生育状況	発病株率 (%)	生育状況
OSA-5-1-8-14-3-8-8	46	28.3	同	32.6	同
桃太郎 8	20	85.0	劣	100.0	劣
おどりこ	19	89.5	劣	100.0	劣
メリーロード	20	100.0	劣	100.0	劣
サターン	19	100.0	劣	100.0	劣

本葉が 1 ~ 2 枚展開した時期にある苗の第 1 本葉へ CMV を接種した。発病株率: モザイク症状が観察された株を発病株とし, その割合を算出した。

生育状況: CMV 無接種区と比較して同等 (同) または劣る (劣) を調査した。

表-2 供試品種・系統の CMV 抵抗性検定結果 (2002 年度秋冬作)

品種・系統名	定植株数 CMV 接種区	発病株率 (%)		CMV 検出株率 (%)
		接種 14 日後	接種 35 日後	
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5	12	0.0	16.7	16.7
桃太郎 8	12	100.0	100.0	100.0
おどりこ	10	100.0	100.0	100.0
サターン	10	100.0	100.0	100.0
秋玉	10	100.0	100.0	100.0

本葉が 4 枚展開した時期にある苗の第 4 本葉最先端の小葉のみへ CMV を接種した。

発病株率: モザイク症状が観察された株を発病株とし, その割合を算出した。

CMV 検出株率: ELISA で CMV が検出された株の割合を算出した。

表-3 CMV 接種が供試品種・系統の生育および果実特性に及ぼす影響 (2002 年度秋冬作)

品種・系統名	草丈* (%)	節間長* (%)	果の揃い	果色の濃淡	果実の堅さ* (%)	糖度 (Brix)
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5	92.2	92.3	中	中	105.4	5.0
桃太郎 8	81.1	73.7	やや不良	やや淡	130.1	5.8
おどりこ	75.2	89.8	やや不良	中	128.5	5.3
サターン	82.5	82.2	やや不良	やや淡	130.9	4.9

*: CMV 接種区データを, 無接種区との対比 (%) で示した。



図-2 OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 の CMV 抵抗性
 ‘桃太郎 8’ (a 左および b) は激しいモザイク症状であるのに対し、OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 (a 右および c) は無病徴である。
 2002 年 8 月 7 日播種, 9 月 3 日 CMV 接種, 9 月 17 日定植, 10 月 17 日撮影。

されたが, F_9 世代の OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 は無病徴であり, モザイク病 (CMV) 抵抗性であると判断された (表-2)。定植後, CMV を接種した対照品種では激しいモザイク症状を発生し, 生育の抑制や収量低下が認められたが, OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 では CMV 接種 35 日後に約 17% が発病したものの残る個体は発病せず, 高いモザイク病 (CMV) 抵抗性を有すると判断された (表-2, 図-2)。定植約 1 カ月後に ELISA による CMV の検出を試みたところ, 無病徴の株からは CMV は検出されなかった (表-2)。CMV 接種区における供試品種・系統の生育および果実特性を表-3 に示す。CMV を接種すると, 供試したすべての品種・系統で草丈が低くなったが, その低下程度は対照品種で顕著であった。また, CMV 接種区では果実の揃いが悪くなるとともに果色が薄くなる

傾向にあったが, その傾向は OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 が対照品種よりも弱く, 果実形質は良好であった。一方, 対照品種は CMV 接種区では果実の堅さが増加し, ゼリー部が少なくなった。CMV 接種区では無接種区よりも収穫始期が遅れ, 収量が低下する傾向にあり, 特に収量の低下は対照品種で顕著であった (表-4)。CMV 接種区においては OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 の良果収量および総収量が対照品種よりも高かった。このように, 対照品種では CMV 接種によって明らかな生育の抑制および収量の低下が認められたのに対し, OSA-5-1-8-14-3-8-8-5 の生育や収量に及ぼす CMV 接種の影響は小さく, 高いモザイク病 (CMV) 抵抗性を示した。

2003 年度春夏作では, F_{10} 世代の OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7 は供試した 12 個体すべてが ELISA では CMV 陽性

表-4 CMV 接種が供試品種・系統の収量特性に及ぼす影響 (2002 年度秋冬作)

品種・系統名	開花 始期*	収穫 始期*	収量		良果率 (%)	良果平均 重 (g)	良果数 (個/株)	くず果数 (個/株)			
			(kg/a)	(%)**				チャック・窓あき果	奇形果	小果	その他
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5	+1	+6	695	79	49.0	158	10.7	0.0	0.4	21.9	0.3
桃太郎 8	0	+5	492	39	16.7	139	5.8	1.5	1.0	17.6	0.7
おどりこ	+1	-3	436	38	11.1	129	3.8	1.6	1.2	23.5	0.1
サターン	0	+3	640	47	25.9	168	8.1	1.3	0.8	23.0	0.2

*：無接種区対比±日

**：CMV 接種区のデータを、無接種区との対比 (%) で示した。

表-5 供試品種・系統の CMV 抵抗性検定結果 (2003 年度春夏作)

品種・系統名	定植株数 CMV 接種区	発病株率 (%)		CMV 検出 株率 (%)
		接種 14 日後	接種 50 日後	
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7	12	0.0	0.0	100.0
桃太郎 8	12	100.0	100.0	100.0
おどりこ	10	100.0	100.0	100.0
サターン	10	100.0	100.0	100.0
秋玉	10	100.0	-	-

本葉が4枚展開した時期にある苗の第4本葉最先端の小葉のみへ CMV を接種した。

発病株率：モザイク症状が観察された株を発病株とし、その割合を算出した。

CMV 検出株率：CMV 接種 50 日後に、ELISA で CMV が検出された株の割合を算出した。

表-6 供試品種・系統の CMV 抵抗性検定結果 (2003 年度秋冬作)

品種・系統名	定植株数 CMV 接種区	CMV 検出株率 (%)			
		接種 14 日後	接種 50 日後	接種 80 日後	接種 140 日後
AT-CM01	20	0.0	45.0	45.0	45.0
桃太郎 8	20	100.0	100.0	100.0	100.0
おどりこ	20	100.0	100.0	100.0	100.0
サターン	20	100.0	100.0	100.0	100.0

本葉が4枚展開した時期にある苗の第4本葉最先端の小葉のみへ CMV を接種した。

CMV 検出株率：ELISA で CMV が検出された株の割合を算出した。

AT-CM01 = OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7-5

表-7 供試品種・系統の生育特性 (2002 年度春夏作)

品種・系統名	定植 株数	第1花 開花日	草丈 (cm)	節間長 (cm)	収穫 開始日	枯死種 率 (%)
桃太郎 8	10	5/4	136.5	4.6	6/27	0.0
おどりこ	10	5/1	159.5	4.9	6/23	20.0
メリーロード	10	5/2	150.0	4.8	6/24	50.0
サターン	10	5/2	143.6	4.1	6/22	10.0

草丈および節間長は6月13日に、枯死株率は8月13日に調査した。一般特性調査区のデータ。

と判定されたものの無病徴であった (表-5)。2003 年度秋冬作では、CMV を接種した対照品種3点合計 60 個体すべてで CMV が検出されたが、F₁₁ 世代の OSA-5-1-8-14-3-8-8-5-7-5 ('AT-CM01') では、CMV を接種した 20 個体のうち 9 個体でのみ CMV が検出され、抵抗性を示すことが明らかとなった (表-6)。

このように、育成系統は試験年次および作型が異なっても安定した CMV 抵抗性を示すことが明らかとなった。

b 一般特性

2002 年度春夏作では、定植後に白絹病が観察されたほか、梅雨期以降にはかいよう病が発生し、茎が割れて

不定根を発生する個体が観察された。さらに、青枯病の発生も観察された。選抜系統は、非心止まり性で草丈および節間長は対照品種と同等であったが、収穫開始日はやや遅く晩生であった (表-7)。選抜系統の完熟果色は桃色で果実肩部は緑色を帯びていた。果実がやや小さ

表-8 供試品種・系統の果実特性 (2002 年度春夏作)

品種・系統名	良果 数	良果重 (g)	1 果重 (g)	くず果 数	くず果重 (g)	果形	果色	果頂部 の形	肩部 緑色	糖度 (Brix)
桃太郎 8	12.1	2143	177.0	3.6	268	やや扁平	桃	平滑	有	5.8
おどりこ	11.0	2026	184.6	4.7	354	やや扁平	桃	平滑	有	5.3
メリーロード	14.0	2290	163.4	7.0	373	やや扁平	桃	平滑	有	5.3
サターン	13.3	2448	184.3	3.1	193	やや扁平	桃	平滑	有	5.0

100g 以上の果実を良果、100g 未満の果実をくず果とした。

選抜系統については選抜個体の数値を、対照品種は1株当りの平均値を示した。

一般特性調査区のデータ。

表-9 供試品種・系統の生育・形態特性 (2002年度秋冬作)

品種・系統名	草丈 (cm)	節間長 (cm)	第1果房ま での葉数	1花房当た りの花数	花房形	果柄の 離層	巻葉性	心止まり株 発生率 (%)	草勢
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5	139.3	7.6	8.9	6.0	単純 + 混合	有	中	0.0	中
桃太郎 8	140.8	8.3	8.8	4.7	単純	有	中	25.0	中
おどりこ	149.3	6.4	8.5	5.7	単純	有	中	0.0	やや強
サターン	147.5	7.6	8.4	5.9	単純	有	中	0.0	中
秋玉	149.3	6.8	10.7	6.2	単純	有	中	100.0	中

草丈および節間長は10月28日に調査した。
CMV無接種区のデータ。

表-10 供試品種・系統の果実特性 (2002年度秋冬作)

品種・系統名	果形	果頂部 の形	果の揃い	肩部の 緑色	果皮の 色	果色の 濃淡	子室数	完熟 果色	果実の 堅さ (N)	糖度 (Brix)
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5	やや扁平～球形	平滑	中	有	透明	中	4.7	桃	30.6	4.7
桃太郎 8	やや扁平	平滑	中	有	透明	中	5.7	桃	33.5	5.7
おどりこ	やや扁平	平滑	中	有	透明	中	5.7	桃	31.3	5.7
サターン	やや扁平	平滑	中	有	透明	中	5.2	桃	28.8	5.2
秋玉	やや扁平	平滑	中	有	透明	淡	5.7	桃	29.5	5.7

CMV無接種区のデータ。

いものの収量は多く、糖度は‘桃太郎8’や‘おどりこ’と同程度であった(表-8)。

2002年度秋冬作のCMVを接種していない試験区における供試品種・系統の生育・形態特性を表-9に、また果実特性を表-10に示す。F₉世代のOSA-5-1-8-14-3-8-8-5の生育・形態特性は対照品種とはほぼ同様であったが、花房形が単純型を示す個体と混合型を示す個体が混在した。果実はやや球形になる傾向があり、果実の堅さおよび糖度の点で‘桃太郎8’や‘おどりこ’にやや劣る傾向にあった。選抜系統の開花始期は対照品種と同等であったが、収穫始期は対照品種よりも遅れる傾向にあった。また、果色がやや薄く果実が小さい傾向にあり、良果率および収量性は対照品種よりも劣った(表-11, 図-3)。なお、2003年度秋冬作の試験から、‘AT-CM01’はToMVに容易に自然感染し、抵抗性を持たないことが明らかになったが、青枯病に対しては‘おどりこ’や‘サターン’よりも強く‘桃太郎8’

と同程度の抵抗性を有することが明らかになった(表-12)。トマト青枯病抵抗性については相加的効果を有する遺伝子の関与が報告されていることから(Acostaら, 1964; Monmaら, 1997), ‘おどりこ’および‘サターン’が保有する効果の小さな抵抗性遺伝子が‘AT-CM01’で集積され抵抗性を示したと推察されるが、詳細を明らかにするには今後の検討が必要である。

c 導入遺伝子の確認

導入したCMV外被タンパク質遺伝子の交雑後代における存在はPCRによって確認されていたが(Satoら, 1997), 存在状況をより明らかにするためにサザンブロット分析を行った。形質転換に用いたプラスミドYI-25におけるPst Iサイトとプローブの位置から(図-4), サザンブロット分析におけるバンド数は導入遺伝子のコピー数を示すと判断される。OSA-5-1-8-14-3-8を用いたサザンブロット分析の結果, 2本のバンドが検出された

表-11 供試品種・系統の収量特性 (2002年度秋冬作)

品種・系統名	開花 始期	収穫 始期	良果収量 (kg/a)	総収量 (kg/a)	良果率 (%)	良果 平均重(g)	良果数 (個/株)	くず果数(個/株)			
								チャック・窓あき果	奇形果	小果	その他
OSA-5-1-8-14-3-8-8-5	9/24	11/30	525	884	59.4	150	13.6	0.3	0.2	29.3	0.3
桃太郎 8	9/24	11/22	952	1249	76.2	175	21.2	2.0	0.3	6.6	2.2
おどりこ	9/22	11/25	768	1141	67.4	176	17.0	1.9	0.3	16.2	1.0
サターン	9/23	11/29	1059	1350	78.4	200	20.6	1.9	0.4	13.4	1.0
秋玉	10/ 1	12/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CMV無接種区のデータ。



図-3 育成系統 'AT-CM01' の着果状況
2003年12月13日撮影。

表-12 供試品種・系統の青枯病および ToMV
発生状況 (2003年度秋冬作)

品種・系統名	全定植 株数	青枯病 枯死株率 (%)	ToMV 発病株率 (%)
AT-CM01	40	0.0	100.0
桃太郎 8	40	0.0	5.0
おどりこ	40	100.0	-
サターン	40	100.0	-

発病株率：ELISA で ToMV が検出された株を発病株とし、その割合を算出した。

-：枯死のため調査せず。

CMV 無接種区区データ。

青枯病汚染圃場のビニールハウス内へ2003年10月23日に定植した。
AT-CM01 = OSA-5-1-8-14-3-8-5-7-5

ことから (図-5)、2コピーの CMV 外被タンパク質遺伝子を有することが確認された。なお、当育成系統の初期分離世代において、CMV 外被タンパク質遺伝子を持つ個体と持たない個体は遺伝学的に1遺伝子座として扱うべき分離比で出現した(データ略)。これらのことから、当該育成系統においては CMV 外被タンパク質遺伝子が染色体上の近傍2ヶ所に挿入されたと推察される。

IV 総合考察

外来遺伝子を導入した作物は、それまでの常識では予期できぬ形質・特性が現れる可能性が考えられることから、遺伝子組換え体の特性と生態系に与える影響について、慎重に評価することが求められている (田部井ら, 1994)。本研究で用いた遺伝子組換えトマトについても、環境に対する安全性評価が、閉鎖系および非閉鎖系において、当時の科学技術庁の「組換え DNA 実験指針」(科学技術庁, 1991) に従い実施され、模擬的環境利用下および開放系においては農林水産省の「農林水産分野における組換え体の利用のための指針」(農林水産省,

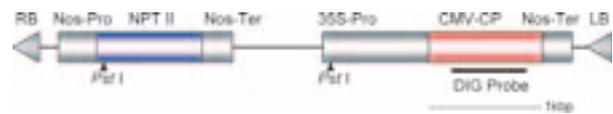


図-4 プラスミド YI-25 の T 領域
図示していない部分は、pBI121 (Jefferson ら, 1987) と同じである。
ノバリン合成酵素 (Nos) のプロモーター (Pro)、ターミネーター (Ter) およびカリフラワーモザイクウイルス 35S (35S) のプロモーターを示す。カナマイシン耐性遺伝子 (NPT II) および CMV 外被タンパク質遺伝子 (CMV-CP) を示す。
制限酵素 Pst I のサイトおよびプローブの位置を示す。

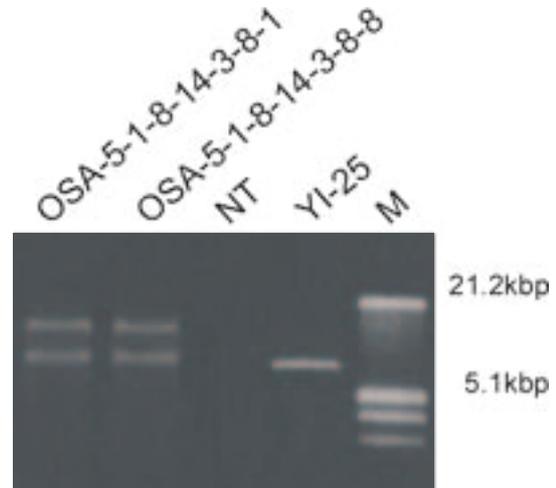


図-5 サザンブロット分析による CMV 外被タンパク質遺伝子の検出

選抜系統 OSA-5-1-8-14-3-8-1, OSA-5-1-8-14-3-8-8 および対照である非形質転換トマト '桃太郎 8' (NT) のゲノム DNA (7μg/lane) と YI-25 のプラスミド DNA を制限酵素 Pst I で消化後、電気泳動し、ナイロン膜へブロットングした。CMV 外被タンパク質遺伝子を検出できるように DIG ラベルして作製したプローブでハイブリダイズした。M は分子量マーカー。

1992) に従って行われた。その結果、1997年には開放系における栽培が認められたので、組換えトマトをモザイク病 (CMV) 抵抗性育種素材とした実用育種に取り組んだ。

外来遺伝子として CMV 外被タンパク質遺伝子を導入することによってモザイク病 (CMV) 抵抗性を示し、後代でも抵抗性を発揮することが明らかにされていたので (佐藤ら, 1993b; Satoら, 1994, 1995)、モザイク病 (CMV) 抵抗性個体の選抜には接種検定を行わずに CMV 外被タンパク質遺伝子を PCR で確認するというマーカー選抜を実施した。これにより、ウイルスを扱う労力を軽減することが可能となり、モザイク病 (CMV) 抵抗性以外の形質の評価に労力を集中することができた。今後は野菜茶業研究所においても種々の形質に連鎖したマーカーを開発し、育種を効率化していく予定である (Fukuoka, 2005)。

現在、トマトにおいては CMV を媒介する昆虫の薬剤

防除の徹底等により、CMVによる被害が顕在化することは少ない。しかしながら、諸情勢の変化によりトマトへのモザイク病（CMV）抵抗性の付与が重要になった場合には当該育成系統の育種素材としての利用が期待される。なお近年、ナント種苗からCMVに抵抗性を示す品種‘ティンカーベル’が発表された（越智, 2006）。当品種については育種素材や育成経過等の詳細は不明であるが、‘AT-CM01’との抵抗性程度の比較が必要であろう。このように、‘AT-CM01’はモザイク病（CMV）抵抗性の機構解明のための実験植物としての利用にも有効であろう。なお‘AT-CM01’の栽培は、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」の国内担保法である「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が2004年に施行されたため、今後は当該法律に従って実施する必要がある。

V 摘 要

- 1) ‘AT-CM01’は遺伝子組換え技術によりCMV外被タンパク質遺伝子を導入したトマトを育種素材としたモザイク病（CMV）抵抗性の固定系統である。
- 2) ‘AT-CM01’はF₁₁世代においても有効なモザイク病（CMV）抵抗性を示す。
- 3) ‘AT-CM01’はCMV外被タンパク質遺伝子を2コピー有する。
- 4) ‘AT-CM01’の草丈や節間長は‘桃太郎8’とほぼ同等であるが、収穫開始は‘桃太郎8’や‘おどりこ’よりもやや遅い傾向にある。果形はやや扁平、果色は桃色で、果実外観は‘桃太郎8’、‘おどりこ’や‘サターン’とほぼ同等であるが1果重が小さい傾向にあり、‘桃太郎8’や‘おどりこ’に比べて果実がやや軟らかい。
- 5) ‘AT-CM01’はモザイク病（CMV）抵抗性であるためCMV感染時の生育や収量の減少は対照品種よりも少ないものの収量は低い。秋冬作におけるCMV非感染時の収量は対照品種よりも劣るが、春夏作では良好な収量を示す。
- 6) ‘AT-CM01’はToMV抵抗性は持たないが、‘桃太郎8’程度の青枯病抵抗性を有する。
- 7) ‘AT-CM01’の栽培は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従って実施する必要がある。

引用文献

- 1) Abad, J., G. Anastasio, A. Fraile and F. Garcia-Arenal (2000) : A search for resistance to cucumber mosaic virus in the genus *Lycopersicon*. *J. Plant Path.*, **82**, 39–48.
- 2) Acosta, J. C., J. G. Gilbert and V. L. Quinon (1964) : Heritability of bacterial wilt resistance in tomato. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **84**, 455–462.
- 3) Fuch, M., R. Provvidenti, J. L. Slightom and D. Gonsalves (1996) : Evaluation of transgenic tomato plants expressing the coat protein gene of cucumber mosaic virus strain WL under field conditions. *Plant Disease*, **80**, 270–275.
- 4) Fukuoka, H. (2005) : Development and utilization of genome information in vegetable crops. Gamma Field Symposia (in press).
- 5) Iardi, V. and M. Barba (2001) : Assessment of functional transgene flow in tomato fields. *Mol. Breed.*, **8**, 311–315.
- 6) Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan (1987) : GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO. J.*, **6**, 3901–3907.
- 7) 栗山尚志・国安克人・望月英雄 (1971) : 種間交雑の利用によるトマト耐病性育種に関する研究. 園試報B., **11**, 33–60.
- 8) Monma, S., Y. Sakata and H. Matsunaga (1997) : Inheritance and selection efficiency of bacterial wilt resistance in tomato. *JARQ*, **31**, 195–204.
- 9) Murray, M. G. and W. F. Thompson (1980) : Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321–4325.
- 10) 越智康治 (2006) : ティンカーベル. 日本園芸生産研究所編, 蔬菜の新品種, p43. 誠文堂新光社, 東京.
- 11) 岡本潔・矢ノ口幸夫 (1996) : トマトのCMV抵抗性育種に関する研究 (第1報) CMV抵抗性素材の検索. 園学雑, **65**別1, 192–193.
- 12) 岡本潔・矢ノ口幸夫 (1998) : トマトのCMV抵抗性育種に関する研究 (第2報) *L. esculentum* と *L. chilense* との種間雑種の作出とその後代のCMV抵抗性. 園学雑, **67**別2, 250.
- 13) Phills, B. R. R., R. Provvidenti and R. W. Robinson (1997) : Reaction of *Solanum lycopersicoides* to viral diseases of tomato. *Tomato Genet. Coop.*, **27**, 18.
- 14) Provvidenti, R. and D. Gonsalves (1995) : Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus in a transgenic tomato line expressing the coat protein gene of the white leaf strain. *J. Heredity*, **86**, 85–88.
- 15) Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) : Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 16) 佐藤隆徳・花田薫・平井正志 (1992) : CMV外被タンパク質遺伝子のトマト (*Lycopersicon esculentum*) への導入. 園学雑, **61**別2, 262–263.
- 17) 佐藤隆徳・福本文良・花田薫・寺見文宏・今井剛・平井正志 (1993a) : CMV外被タンパク質遺伝子導入トマトにおけるウイルス抵抗性の発現. 育種, **43**別1, 107.
- 18) 佐藤隆徳・福本文良・花田薫・寺見文宏・今井剛・平井正志 (1993b) : CMV外被タンパク質遺伝子導入トマトの後代におけるウイルス抵抗性の発現. 園学雑, **62**別2, 234–235.
- 19) Sato, T., F. Fukumoto, K. Hanada, F. Terami, T. Imai and M. Hirai (1994) : Cucumber mosaic virus resistance in transgenic tomato plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein gene. XXIVth International Horticultural Congress,

- Kyoto. Abstracts, p171.
- 20) Sato, T., F. Fukumoto, K. Hanada, F. Terami, T. Imai and M. Hirai (1995) : Resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tomato plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein gene. 1st International Symposium on *Solanacea* for Fresh Market, 28 – 31, March 1995, Malaga, Spain, Abstracts, p139.
- 21) Sato, T., F. Fukumoto, M. Nagata, H. Yamazaki, K. Hanada, F. Terami, T. Imai and M. Hirai (1997) : Safety assessment of transgenic tomato plants expressing a coat protein gene of cucumber mosaic virus. 4th International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms, Tsukuba. Abstracts, 351 – 355.
- 22) 田部井豊・大澤勝次・西村繁夫・花田薫・吉岡啓子・藤沢一郎・中島臯介 (1994) : CMV外被タンパク質遺伝子を導入した組換えメロンの閉鎖系温室および非閉鎖系温室における環境に対する安全性評価 (I). 育種, **44**, 101 – 105.
- 23) 高橋義行 (1988) : 植物ウイルス病の血清学的診断法 (2) ELISA法 – その特徴と実施上の注意点 – . 植物防疫, **42**, 88 – 92.
- 24) Yoshioka, K., K. Hanada, Y. Nakazawa, Y. Minobe, T. Yakuwa and K. Oosawa (1992) : Successful transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. *Japan J. Breed.*, **42**, 277 – 285.
- 25) 科学技術庁 (1992) : 組換えDNA実験指針, 1 – 245. 科学技術庁, 東京.
- 26) 日本種苗協会 (1993) : 1. トマト特性審査基準 (案). 平成4年度種苗特性分類調査報告書, 1 – 22, (社) 日本種苗協会. 東京.
- 27) 農業生物資源研究所 (1992) : 「トマト」. 遺伝資源特性調査マニュアル第4分冊野菜類, 403 – 416. 農業生物資源研究所. つくば.
- 28) 農林水産省 (1992) : 農林水産分野等における組換え体の利用のための指針, 1 – 67. 農林水産省. 東京.

Development of a Cucumber Mosaic Virus (CMV) Resistant Tomato Line 'AT-CM01' from a Transgenic Plant Expressing the Coat Protein Gene of CMV

Takeo Saito, Takanori Sato, Hiroshi Matsunaga, Tatemi Yoshida, Atsushi Saito,
Tomohiro Yamada and Shinji Monma

Summary

'AT-CM01' is a new inbred line of tomato selected from a cross between a commercial cultivar 'Odoriko' (Sakata Seed Corp.) and an offspring of the transgenic plants of 'Saturn' (Takii & Co., Ltd.) transformed with the coat protein gene of cucumber mosaic virus (CMV). 'AT-CM01' having two copies of the coat protein gene shows a high level of resistance to CMV.

The plant characteristics of 'AT-CM01' in comparison to several commercial cultivars, 'Momotaro 8' (Takii & Co., Ltd.), 'Odoriko' and 'Saturn', are as follows: (1) plant height and inter-node length are moderate, (2) mature fruit is pink in color and slightly flattened in shape, (3) fruit is slightly smaller in size with softer flesh, (4) time of harvesting is later, and (5) it is as highly resistant to bacterial wilt as 'Momotaro 8', but not resistant to ToMV.

'AT-CM01' should be used according to the law concerning the conservation and sustainable use of biological diversity through regulations on the use of living modified organisms.