

Virus resistance in transgenic tomato expressing satellite RNA of Cucumber mosaic virus 1 :
Genetical aspects and virus resistance

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河辺, 邦正, 岩崎, 真人, 早野, 由里子, 本田, 要八郎, 吉田, 幸二, 眞岡, 哲夫 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001310

サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス 抵抗性トマトに関する研究

第1報 抵抗性トマト系統の作出

河辺 邦正^{1, 2)}・岩崎 真人¹⁾・早野由里子¹⁾・本田要八郎^{1, 3)}
吉田 幸二^{1, 4)}・眞岡 哲夫¹⁾

緒 言

キュウリモザイクウイルス (CMV) は、野菜・花き類を中心に広く発生しており、トマト栽培においては、生産を阻害する難防除ウイルスの一つである。CMV抵抗性トマト品種の作出により、低コスト環境保全型の防除法が確立できると予想されるが、これまでトマトからCMV抵抗性遺伝子は見いだされておらず、抵抗性品種も作出されていない。近年、バイオテクノロジーの進展により、病原体の有する遺伝子を宿主作物に導入して抵抗性を付与する試みがなされてきた (Lomonosoff, 1995)。CMVに対する抵抗性トマトについても、こうした病原体由来の遺伝子導入による抵抗性母本の作出が期待されている。

植物ウイルスの粒子中には、サテライトRNAと呼ばれる低分子のRNAが付随している場合がある。サテライトRNAはウイルス本体の増殖には不可欠なものではないが、あるものはウイルスが寄生した植物の病徴の強弱に関与することが知られている (Roossickら, 1992)。これまで、タバコやトマトにサテライトRNA遺伝子を導入し、ウイルス抵抗性を持った遺伝子組換え植物を作出する研究が世界各地で行われ、付与された抵抗性に関する解析も数多く行われてきた (Baulcombeら, 1986; Gerlachら, 1987; Harisonら, 1987; Jacquemondら, 1988; Masutaら, 1989, 1994; McGarveyら, 1994; Penaら, 1994; Saitoら, 1992; Yieら, 1992, 1993, 1995)。サテライトRNAの研究蓄積のあった北海道農業試験場 (現北海道

農業研究センター) ウイルス病研究室では、サテライトRNA遺伝子を導入したCMV抵抗性トマトの作出が試みられた。

北海道農業試験場 (現北海道農業研究センター) において、吉田 (1989) はCMVによるトマトの病徴発現にサテライトRNAが大きく関与することを報告し、病徴を弱める性質を持つ弱毒性のサテライトRNAを用いてCMV弱毒株を作出した (吉田, 1986)。また、CMV弱毒株をトマト幼苗へ予防接種しておくことによって、CMVによるトマト条斑病が予防できることを圃場試験で実証した (本田ら, 1993)。しかし、弱毒ウイルスによる防除では、定植前のトマト幼苗一つ一つに弱毒ウイルスを接種する作業が必要であるため、さらに簡便な防除法の開発が求められた。そこで筆者らは、吉田 (1989) が弱毒ウイルスの作出に用いたサテライトRNAの相補DNAをクローニングし、このサテライトRNAが植物細胞内で発現するようなDNA、いわば、サテライトRNA遺伝子を構築し、トマト (品種「桃太郎」) に導入してウイルス抵抗性トマトを作出した。本組換えトマトは閉鎖系温室での試験に供試され、その安全性が確認された。しかし、遺伝子導入に用いた「桃太郎」はF₁品種のため、遺伝子組換えトマトの後代系統では、導入した遺伝子とは無関係に形質が分離するという問題が生じた。導入遺伝子により付与されたウイルス抵抗性を詳細に検討しCMV増殖抑制機能を解明するためには、遺伝的に均一であるトマト品種を材料に用いて、再度遺伝子導入を行うことが必要と思われた。そこで本研究では、固定品種である「秋玉」を材料に用いてサテライトRNA遺伝子を導入し、ウイルス抵抗性組換え体の作出を行った。また、その自殖後代系統を用いて導入遺伝子によるウイルス抵抗性とそ

平成13年10月30日 原稿受理

¹⁾ 生産環境部ウイルス病研究室

²⁾ 現国際農林水産業研究センター沖縄支所

³⁾ 現中央農業総合研究センター

⁴⁾ 現果樹研究所リンゴ研究部

の遺伝様式を解析したので報告する。

本研究を行うにあたり、野菜・茶業試験場(現野菜・茶業研究所)の布目司博士にはプライマーを分譲していただいた。また、報告をまとめるにあたり、北海道農業研究センター生産環境部長高橋賢司博士には校閲を、同ウイルス病研究室長福本文良博士には有益な助言を頂いた。ここに記して感謝申し上げる。

材料および方法

1. トマト品種

遺伝子導入用トマト品種は「秋玉」を使用した。またCMVの接種試験には、トマト品種「福寿2号」、「桃太郎」を用いた。植物の栽培は、全て北海道農業試験場(現北海道農業研究センター)非閉鎖系温室で行った。

2. 供試ウイルスおよび接種試験

本研究で用いたサテライトRNAの来歴およびCMV分離株の性状を以下に記す。sat55-1(DDBJ/EMBL/GenBank, accession number AB072502)は、旭川市のヤチヌガラシに感染していたCMV-55-1(サブグループ, 血清型とも不明, 吉田, 1989)から分離された、ヘルパーウイルスの病原性を弱毒化させるサテライトRNAである。sat55-1は、CMV-P7(サブグループII, 血清型P, 吉田, 1989)をヘルパーウイルスとしてタバコで増殖した。接種試験には、CMV-42CM(サブグループI, 血清型Y, 岩崎・稲葉, 1988), CMV-O(n2)(サブグループI, 血清型Y, 吉田, 1986), CMV-Y(サブグループI, 血清型Y, 土崎ら, 1981), CM32(サブグループI, 血清型Y, 山本・石井, 1983), 14CM(サブグループI, 血清型Y, 岩崎ら, 1996), 29CM(サブグループI, 血清型Y, 岩崎ら, 1996)の各分離株を供試した。

遺伝子組換え体のウイルス抵抗性はCMVの接種試験により判定した。ウイルスの接種は、汁液接種とアブラムシ接種により行った。汁液接種は、カーボランダム法により、接種源にはウイルス感染植物汁液または純化ウイルスを用いた。アブラムシ接種は以下の方法で行った。1.5~2時間絶食させたモモアカアブラムシ(*Myzus persicae*)を、感染葉上で2~3分間獲得吸汁させ、接種植物に株当たり6頭を放飼した。8時間後に殺虫剤を散布した。汁液およびアブラムシ接種のいずれにお

いても、感染の有無は接種2~3週間後に確認した。

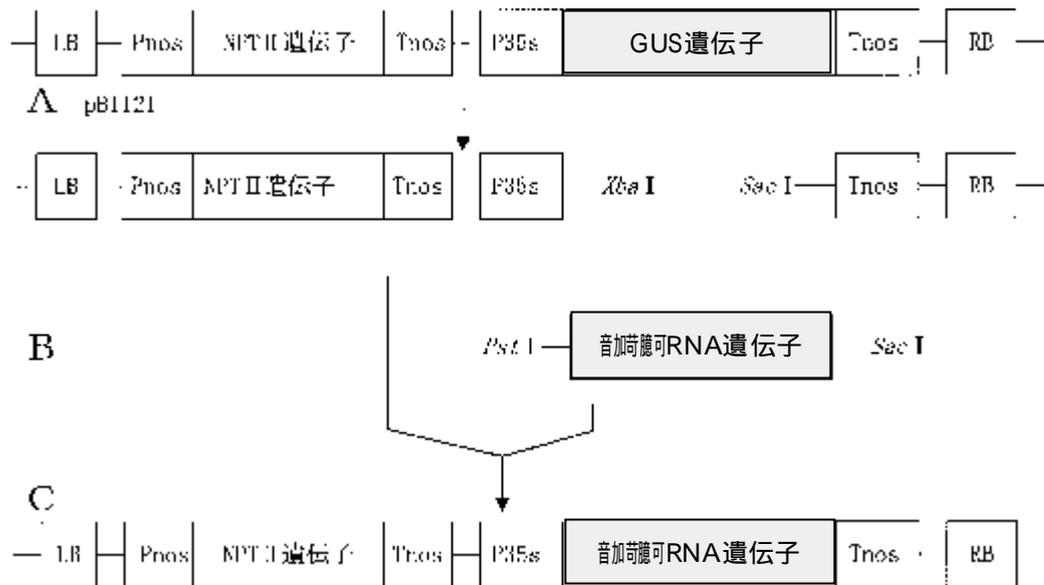
3. CMVの純化およびウイルスRNAの確認

CMVの純化はTochihara(1970)の方法に準じ、以下のように行った。ウイルス感染葉(トマト、タバコ)を、2倍量(V/W)の0.5Mクエン酸緩衝液(pH6.5)と、等倍(V/W)の有機溶媒(ブタノール・クロロホルム, 1:1混合液)とともに磨碎し、高速冷却遠心(10,000rpm, 10分)により上清を分取した。上清に6%(W/V)ポリエチレングリコール(#6,000)を添加し、1時間穏やかに攪拌後、高速冷却遠心を行った。得られたペレットを、2%トリトンX100を含む10mMトリス塩酸(pH8.0)で再懸濁し、高速冷却遠心後に上清を分取した。得られた上清を、24%(W/V)ショ糖溶液を約1/5容入れた超遠心チューブに重層して、超遠心(40,000rpm, 90分間)し、ペレットを10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解して、純化ウイルス溶液とした。全ての操作は4で行った。

ウイルスRNAの確認は、電気泳動により行った。ウイルス溶液に1/5容のCMV試料用緩衝液(0.25Mトリス塩酸, pH8.0, 8% SDS, 40%グリセロール, 0.008%プロモフェノールブルー, 8%2-メルカプトエタノール)を加え、室温で5分間静置し、1.5%アガロースゲルで電気泳動した。泳動緩衝液は、0.1%SDSを含む1×TAEを用いた。泳動後、ゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外光下で観察した。

4. 導入遺伝子の構築

弱毒性のサテライトRNA sat55-1を有するCMV-P7を、タバコ感染葉より純化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Leammler, 1970)を行って、CMV粒子よりサテライトRNAを分離・精製した(Peden and Symons, 1973)。得られたサテライトRNAからGubler and Hoffman(1983)の方法にしたがってcDNAを合成し、あらかじめSmaIで切断したプラスミドベクターpUC119に組み込み、クローニングした。このプラスミドを制限酵素PstIおよびSacIで消化し、サテライトRNA遺伝子断片を得た(第1図)。このDNA断片を、選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子(NPTII)を持ったバイナリーベクターpBI121(TOYOBO)のp-Gルクロニダーゼ(GUS)遺伝子と置換し、置換部分の上流に存在するCaMV



第1図 サテライト遺伝子導入用プラスミドの構築

- A, バイナリーベクターpBI121を制限酵素 XbaIおよび SacI を用いて切断しGUS (β-グルクロニダーゼ) 遺伝子を取り除いた。
- B, サテライトRNA (sat55-1)をクローニングしたpUC119を制限酵素 PstIおよびSacIで処理し, サテライト遺伝子を取り出した。
- C, AおよびBより得たDNA断片のXbaIとPstIの末端を平滑化して, バイナリーベクターの35Sプロモータ (P35s) の下流にサテライト遺伝子を組み込み, 遺伝子導入用プラスミドとした。

35Sプロモータと下流に存在するノパリン合成酵素遺伝子 (NOS) のターミネータにより, 挿入遺伝子が転写される設計とした。(第1図)。

5. 遺伝子導入および選抜

トマトへの遺伝子導入は, アグロバクテリウム法 (Hochemaら, 1983) により行った。前項で作製した遺伝子導入用プラスミドを有するアグロバクテリウム LBA4404株をYEB培地で2日間培養した後, MS培地で5~20倍に希釈し, これをアグロバクテリウム懸濁液とした。50% MS固形培地 (0.23% ゲランガムを含む) 上で無菌的に発芽させたトマト (品種「秋玉」) の子葉および胚軸を約5mmに切断し, アグロバクテリウム懸濁液に5分間浸漬した。余分な懸濁液を除去した後, トマト組織片をMS培地に浸した濾紙上に静置し, 20~25℃で2日間共存培養を行った。共存培養後, トマト組織片を, 植物ホルモンとして1.0mg/lゼアチンおよび0.1mg/lインドール酢酸, 遺伝子導入選択マーカーとして50~100mg/lカナマイシン, アグロバクテリウムの除去用として500mg/l合成ペニシリンを含むMS固形培地に置床し, 20~25℃で7~14日間毎に新しい培地へ移して継

代培養を行い, 再分化の誘導と遺伝子導入細胞の選抜を行った。

形成された不定芽をカルスより切り離し, 植物ホルモンを含まないMS固形培地に移して培養し, 発根を促した。十分に発根した再分化個体はパーミキュライトに移植して馴化した後, 温室で育成した。

6. 導入遺伝子の検出

遺伝子組換え体に導入されたサテライトRNA遺伝子の検出は, トマト幼植物からCTAB法 (Murry and Tompson, 1980) によりDNAを抽出し, これを鋳型としてPCR法により行った。サテライトRNA sat55-1の両末端の塩基配列 (DDBJ / EMBL / GenBank, accession number AB072502, 第2図) をプライマー (Forward, 5'-TTTTGTTTGGAG-3'; Reverse, 5'-GGGTCCTGCTAGAGGA-3') に用いた。また, サテライトRNAと同時に導入したカナマイシン耐性遺伝子 (NPT) の検出は, 以下の方法で行った。-80℃で凍結保存した各品種・系統の幼苗の葉身 (5~20mg) に0.2N NaOHを加えて室温で融解し, ボルテックスで攪拌後, 5,000rpm, 30秒間遠心分離

```

1: GTTTTGTTTG TTGGAGAATT GCGGGBAGGG GTTGTATTCG CGTGAGGATC
51: CCTCACTAGG CGGUGUGGGU UAACUCOCUG CUACGCGGGG UUGGAGACUG
101: CGCUUAGGAC AAGCGGACC UUGGGGGAGC CCACGAGCCG CGUGGGAGCG
151: UAGCGGUUUC CGGUGGGACU GCGCGCGGAG GCCCUCAGCG GUGGAUUJCC
201: ACGCUUCGGU CGAUUUGAGC CCGCGCUCAG UUJGCUAGCA AAACCGGCA
251: CAUGGUUCGC CGUUAUUAUG GAAAUCUGA AAAGAACAGU CUGUUGGUG
301: GUUUCAGUUG ACGACGACG CAGGGAGAGG CUAAAACCUA UAUUGGUCAU
351: GCUGAUCUCC GCGAAUGUCU AGACAUJCCU CUACAGGACC CAAUGGUCAU

```

第2図 サテライトRNA sat55-1の塩基配列

(DDBJ / EMBL / GenBank, accession number AB072502)

して上清を得た。この上清5 μ lに500 μ lの0.1Mトリス緩衝液(pH8.0)を加え、PCR反応用試料とした。PCR反応は、野菜・茶業試験場(現野菜・茶業研究所)育種法研究室布目司氏より提供された同遺伝子を増幅するプライマーセット(Forward, 5'-TCGGCTATGACTGGGCACAACAGA-3'; Reverse, 5'-AAGAAGCGATAGAAGGCGATGCG-3')を用い、(94 $^{\circ}$ C, 150秒)×1サイクル、(90 $^{\circ}$ C, 30秒; 60 $^{\circ}$ C, 45秒; 72 $^{\circ}$ C, 120秒)×45サイクル、(72 $^{\circ}$ C, 5分)×1サイクルの条件で行い、反応液をアガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウムで染色し、紫外光下で観察した。

さらに、遺伝子導入トマトの後代系統のゲノムに組み込まれたサテライトRNA遺伝子の塩基配列を確認するため、後代系統のゲノムDNAを鋳型に、sat55-1を増幅する新たなプライマーセット(AK1, 5'-GTTTTGTTTGTGGAGAATTGC-3'; BK2, 5'-GGTCCTGTAGAGGAATGTC-3')を用いて(94 $^{\circ}$ C, 4分)×1サイクル、(90 $^{\circ}$ C, 1分; 55 $^{\circ}$ C, 2分; 72 $^{\circ}$ C, 3分)×30サイクル、(72 $^{\circ}$ C, 7分)×1サイクルの条件でPCR反応を行い、増幅断片をTAクローニングキット(Invitrogen社)を用いてクローニング後、ジデオキシ法(ダイターミナルシークエンシング反応)によりジェネティックアナライザー310(ABI社)を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の解析にはDNASIS(Ver.7.0, 日立バイオシステムズ)を用いた。

また、サテライトRNAの解析は、試料から抽出したRNAを鋳型に、RT-PCR法でサテライトRNA遺伝子を増幅し、上記と同様な方法で塩基配

列を決定した。RT-PCRは、上記プライマーのうち、BK2を用いて、(42 $^{\circ}$ C, 20分; 99 $^{\circ}$ C, 5分)×1サイクルの逆転写反応を行い、以下上述の条件でPCR反応、塩基配列の決定を行った。

結 果

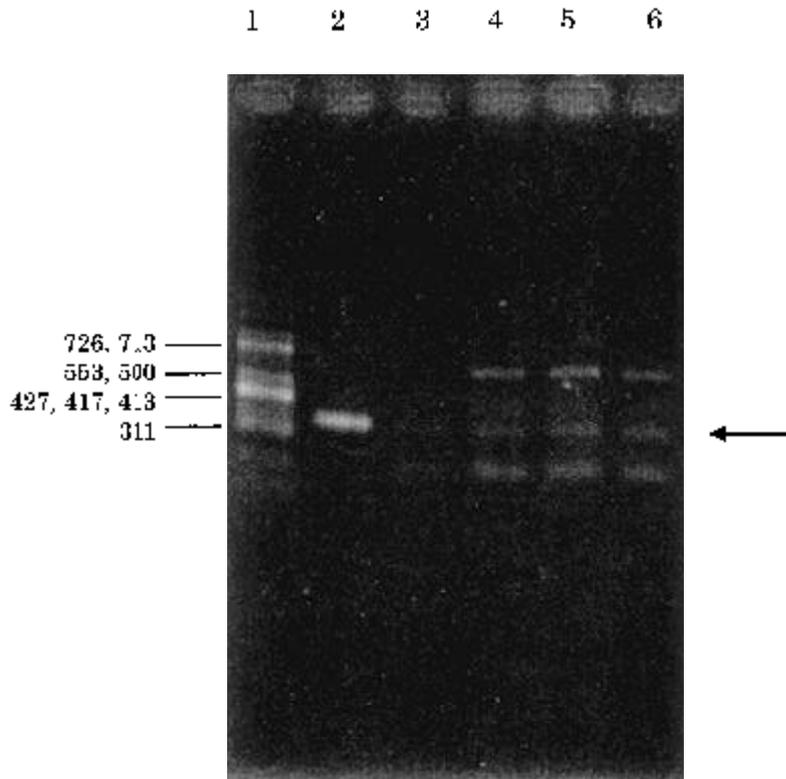
1. 遺伝子導入および導入遺伝子の検出

「秋玉」にアグロバクテリウム法でサテライトRNA遺伝子を導入したところ、カナマイシン耐性の再分化トマト27個体が得られた。この再分化トマトからDNAを抽出し、PCR法でサテライトRNA遺伝子の存在を調べた結果、すべての再分化トマトから同遺伝子が検出された(第3図)。これらの再分化個体を組換えトマト(T₀)として以下の解析に供試した。

2. ウイルス抵抗性系統の選抜

1) 遺伝子組換え体当代(T₀)のウイルス抵抗性

サテライトRNA遺伝子の導入が確認された27個体の組換えトマト(T₀)はそれぞれ挿し木により増殖し、各T₀個体あたり2~4の挿し木株にCMV-42CMを汁液接種して病徴を観察した。その結果、多くの挿し木株は激しい病徴を示し、ウイルス感受性と考えられた。しかし、No.1, 4, 7, 20, 24, 27の6個体に由来する挿し木株は他の遺伝子組換え体に比べて病徴が軽微で、ウイルスに対する抵抗性反応が認められた。抵抗性を示した6個体の遺伝子組換えトマトについて栽培を続け、自家採種を進めた。6個体のうち、No.7とNo.27を除く4個体No.1, 4, 20, 24より自殖種子(組換



第3図 PCRによる遺伝子組換え体T₀からの導入遺伝子 (sat55-1) の検出

1, 174HinfI (TOYOBO); 2, pBI121サテライトRNAのcDNAを組み込んだバイナリベクター; 3: 遺伝子組換え体T₀ 1個体; 4: 同 2個体; 5, 同 3個体; 6, 同 4個体。矢印, 目的とするDNA断片。

第1表 遺伝子組換え体第1代 (T₁) 系統へのCMV接種試験^{a)}

系 統	供試個体数	病 徴 ^{b)}		
		-	+	++
1	9	0	0	9
4	49	0	37	12
20	33	0	0	33
24	26	0	0	26
秋 玉	27	0	0	27

^{a)} CMV-42CMを汁液接種した。

^{b)} -, 無症状; +, 軽症 (軽微なモザイク症状); ++, 重症 (えそ, 子葉の脱落, 激しいモザイク, 黄化, 草丈の短縮)。

え体第1代, T₁) を得ることができた。

2) 遺伝子組換え体第1代 (T₁) のウイルス抵抗性

採種した組換えトマト4個体No. 1, 4, 20, 24の自殖第1代 (T₁) に, CMV-42CMを汁液接種した結果を第1表に示した。No. 4を除くT₀ 3個体に由来するT₁系統は, 接種5~8日後に子葉から第2本葉にえそを生じ, 子葉は早期に脱落

した。その後, モザイク, 細葉や葉のねじれ, 黄化, 草丈の短縮など激しい症状が現れた。対照として用いた「秋玉」も同様な病徴を示したことから, これらT₁系統は全て感受性と考えられた。一方, 4のT₁世代である「No.4系統」は, 激しい病徴と軽微な病徴を示す個体にわかれ, その抵抗性反応は分離した。前者の病徴は感受性と考えられた他のT₁系統と同じであった。これに対

第2表 遺伝子組換えトマトNo.4の第2代(T₂)のウイルス抵抗性

系 統	供試固体数	ウイルスに対する反応 ^{a)}		判 定 ^{b)}
		抵 抗 性	感 受 性	
4-1*	12	10	2	ヘテロ
4-2*	12	5	7	ヘテロ
4-3*	36	36	0	抵抗性ホモ
4-4*	20	16	4	ヘテロ
4-5*	14	12	2	ヘテロ
4-6*	20	6	12	ヘテロ
4-7*	34	34	0	抵抗性ホモ
4-8*	10	9	1	ヘテロ
4-9*	18	16	2	ヘテロ
4-11	19	17	2	ヘテロ
4-12	19	19	0	抵抗性ホモ
4-13	20	17	3	ヘテロ
4-14	18	13	5	ヘテロ
4-15	14	14	0	抵抗性ホモ
4-16	20	16	4	ヘテロ
4-17	18	12	6	ヘテロ
4-18	19	14	5	ヘテロ
4-19	19	17	2	ヘテロ
4-20	13	13	0	抵抗性ホモ
4-21	12	10	2	ヘテロ
4-22	15	9	6	ヘテロ
4-23	21	21	0	抵抗性ホモ
4-24	21	19	2	ヘテロ
4-25	21	0	21	感受性ホモ
4-26	20	20	0	抵抗性ホモ
4-27	20	20	0	抵抗性ホモ
4-28	12	8	4	ヘテロ
4-29	15	9	6	ヘテロ
4-30	15	11	4	ヘテロ
4-31	15	13	2	ヘテロ
4-32	15	11	4	ヘテロ
4-33	20	16	4	ヘテロ
4-34	15	0	15	感受性ホモ
4-35	29	0	29	感受性ホモ
4-36	19	0	19	感受性ホモ
4-37	19	12	7	ヘテロ
4-38	15	0	15	感受性ホモ
4-39	18	18	0	抵抗性ホモ
4-40	17	17	0	抵抗性ホモ
4-41*	21	21	0	抵抗性ホモ
4-42*	21	16	5	ヘテロ

^{a)} CMV-42CMを汁液接種し、病徴観察により判定した。

^{b)} 抵抗性ホモ，全個体が抵抗性；感受性ホモ，全個体が感受性；ヘテロ，感受性と抵抗性の個体が混在。*はT₁でのCMV接種試験で抵抗性を示した個体由来の系統を表わす。

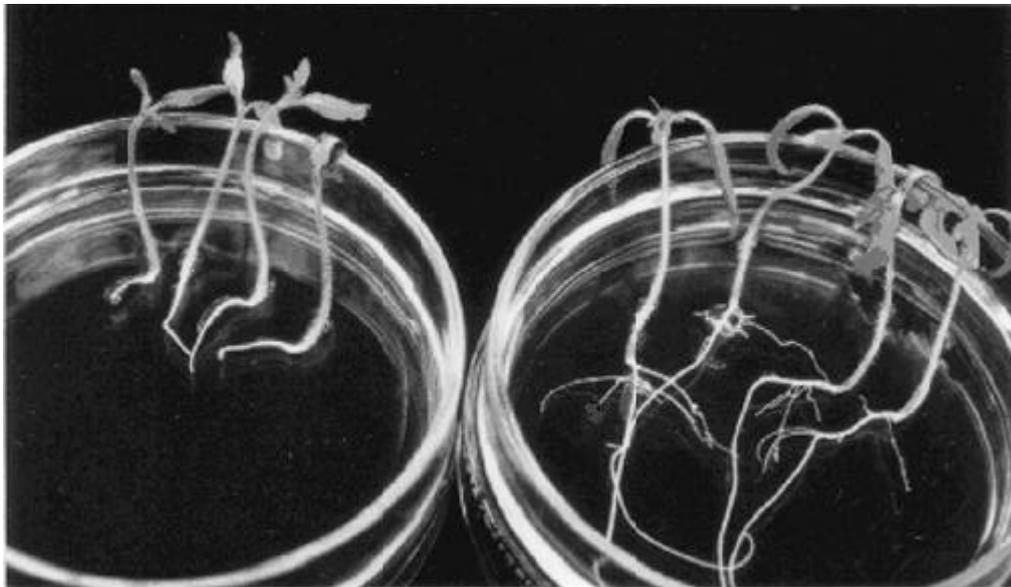
第3表 遺伝子組換えトマト (T_2) のカナマイシン耐性

系 統	ウイルス抵抗性	根の伸長と分岐の程度 ^{a)}	本葉の展開程度 ^{a)}	下胚軸の赤色程度 ^{b)}	カナマイシンに対する反応 ^{c)}
4-7	抵抗性	++	++	+	耐性
4-15	抵抗性	++	++	+	耐性
4-27	抵抗性	++	++	+	耐性
4-25	感受性	+	+	++	感受性
4-35	感受性	+	+	++	感受性
4-38	感受性	+	+	++	感受性
秋玉	感受性	+	+	++	感受性

^{a)} 良好なものは++，不良なものを+とした。

^{b)} 赤色の濃いものを++，薄いものを+とした。

^{c)} 根，本葉の生育状況および下胚軸の赤色程度から判定した。

第4図 遺伝子組換えトマト (T_2) のカナマイシン耐性

左，感受性系統（4-38系統）；右，耐性系統（4-7系統）。

遺伝子組換え体第2代 (T_2) 種子を，カナマイシン100mg/lを含むMS培地上で培養し，播種10日後に観察した。

し，後者は，一部の葉に軽微なモザイク症状が現れたものの，えそは確認されず，CMV無接種の健全株と同程度の生育を示した。

3) 遺伝子組換え体第2代 (T_2) のウイルス抵抗性およびカナマイシン耐性

「No. 4系統」のうち，第1表で抵抗性を示した11個体を無作為に選び，抵抗性無検定の30個体を加えた合計41個体から自殖種子（遺伝子組換え体第2代， T_2 ）を採種し，ウイルス抵抗性を調べた。判定は，全供試 T_2 個体が抵抗性を示した系統を抵抗性ホモ系統，全てが感受性を示した系統を感受性ホモ系統，感受性と抵抗性の個体が混

在するものはヘテロ系統とした。その結果，供試した41系統のうち，11系統が抵抗性ホモ，5系統が感受性ホモ，25系統がヘテロであった。抵抗性を示した T_1 個体に由来する系統は， T_2 世代においても全て抵抗性ホモまたはヘテロで，感受性ホモはなかった（第2表）。

抵抗性ホモ系統 (T_2) を，カナマイシン100mg/lを含むMS培地上で培養したところ，根の伸長と分岐および本葉の展開程度が高く，下胚軸の赤色程度が低く，カナマイシン耐性の特徴を明瞭に示した（第3表，第4図）。一方，感受性ホモ系統は，カナマイシンに耐性を示さなかった（第3

表)。

PCR法でカナマイシン耐性遺伝子(NPT)の有無を調べたところ、抵抗性ホモ系統の全ての個体から約800bpの同遺伝子増幅断片が検出されたが、感受性ホモ系統からは同遺伝子は全く検出されなかった(第5図)。以上から、導入したカナマイシン抵抗性はウイルス抵抗性ととも遺伝し、発現していることが明らかになった。これら抵抗性ホモ系統のうち、T₁個体「No.4-7」に由来するT₂世代「No.4-7系統」(第6図)を選び、抵抗性の遺伝様式を解析する試験に供試した。本系統の作出経過を第7図に示した。

3. 「No.4-7系統」のウイルス抵抗性の遺伝様式

「No.4-7系統」の抵抗性がどのように遺伝するかを調べるため、親系統の遺伝様式を解析した。導入遺伝子をヘテロに持つと推定されたT₀個体「No.4」について、後代の「No.4系統(T₁)」と「No.4-1系統(T₂)」にCMV-42CMを接種し、ウイルス抵抗性の分離を調べた。その結果、どちらの世代においても抵抗性:感受性の分離は3:1の期待値に適合した(第4表)。抵抗性を示した個体は全て軽微なモザイク症状のみを呈し、個体間で病徴の差異は認められなかった。以上により、導入した遺伝子は、その対立遺伝子がトマトのゲノムに存在しないため、見かけ上単一の優性遺伝子と同様な遺伝行動を示していると考えられた。

「No.4-7系統」に由来する組換え体自殖第3代(T₃)から任意抽出した3系統について、同様にCMV抵抗性を調べたところ、3系統の全ての個体は抵抗性を示した(第5表)。以上によって、「No.4-7系統」は抵抗性ホモ個体からなる集団であること、その親である「No.4-7」は抵抗性ホモ個体であることが明らかとなった。そこで、「No.4-7系統」を以下の試験に供試した。

4. 「No.4-7系統」が産生するサテライトRNAの増殖と伝搬

1) 「No.4-7系統」からのサテライトRNA遺伝子の検出

「No.4-7系統」のゲノムDNAを鋳型に、sat55-1を増幅するプライマーセット(AK1およびBK2)を用いてPCR反応を行ったところ、約400bpのバンドが増幅された。増幅断片の塩基配列は導入に用いたsat55-1の塩基配列(第2図)と完全に一致した。

「No.4-7系統」体内におけるサテライトRNA遺伝子の発現を確認するため、「No.4-7系統」から抽出したRNAを鋳型に、RT-PCRを行ったところ、サテライトRNAに相当する約400bpの断片が増幅され、サテライトRNAの存在が確認された。また、「No.4-7系統」にCMV-42CMを汁液接種した病葉からも、RT-PCRで同遺伝子の発現が確認された。

2) サテライトRNAのCMVによる伝搬

組換えトマト「No.4-7系統」体内に産生されているサテライトRNAが、CMVにより他の植物に伝搬するかどうかについて検討した。「No.4-7系統」にCMV-42CMを汁液接種してサテライトRNAをウイルス粒子内に取り込ませ、その発病葉をトマト「福寿2号」とタバコ「キサンチnc」に戻し接種して、病徴の変化を調べた。

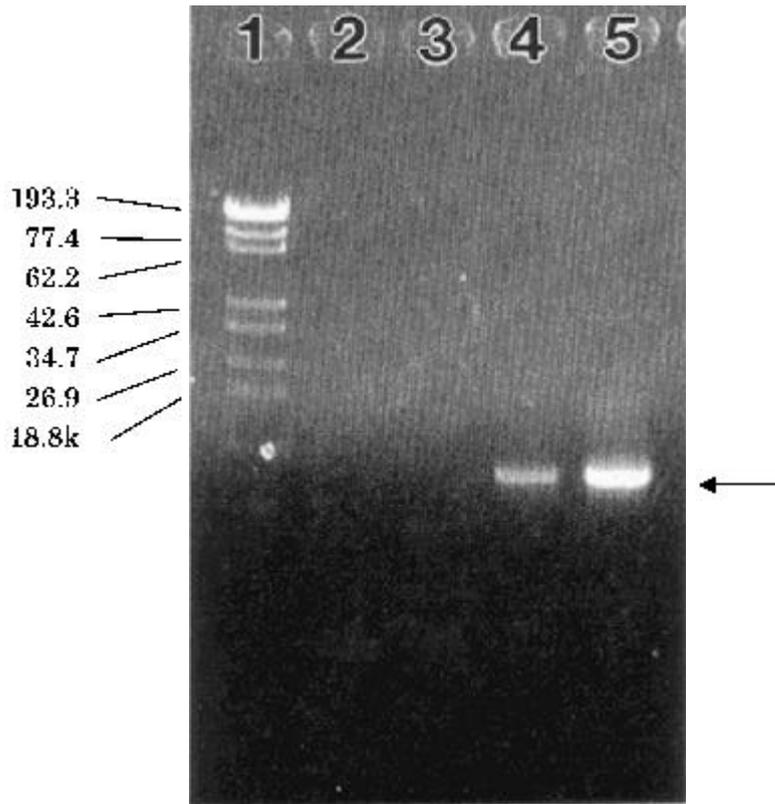
「No.4-7系統」の病葉を汁液接種した「福寿2号」と「キサンチnc」の病徴は、軽微なモザイクのみであったが、CMVのみを感染させた「秋玉」の病葉を汁液接種すると、両植物共に、えそや奇形などの激しい病徴を生じた(第6表)。さらに、「No.4-7系統」の病葉を接種した「キサンチnc」感染葉からCMVを精製し、ウイルスRNAを電気泳動法により調べたところ、サテライトRNAが検出された。「キサンチnc」感染葉からは、RT-PCRによっても同遺伝子の発現が確認され、上記と同様に塩基配列を決定したところ、導入に用いたsat55-1の塩基配列と一致した。

これらの結果から、「No.4-7系統」の植物体内においてサテライトRNAが産生されていること、「No.4-7系統」内のサテライトRNAは接種したCMVのウイルス粒子に取り込まれ、感染植物に伝搬し、さらに感染した植物でのウイルスの病原性発現を抑制することが明らかとなった。

5. 「No.4-7系統」のCMVに対する抵抗性反応の解析

1) 接種ウイルス濃度に対する反応

CMV-42CMの純化ウイルスを用いて、接種するウイルスの濃度と病徴の関係を調べた。0.1, 1, 10, 100 μg/mlに調整した純化ウイルスを、抵抗性の「No.4-7系統」、感受性の「No.4-38系統」(第2表参照)および「秋玉」に汁液接種した。その結果、0.1 μg/mlの接種では、ウイルスはほとんど感染性を示さなかったが、1 μg/ml以上の濃度



第5図 PCR法によるカナマイシン耐性遺伝子 (NPTII) の検出

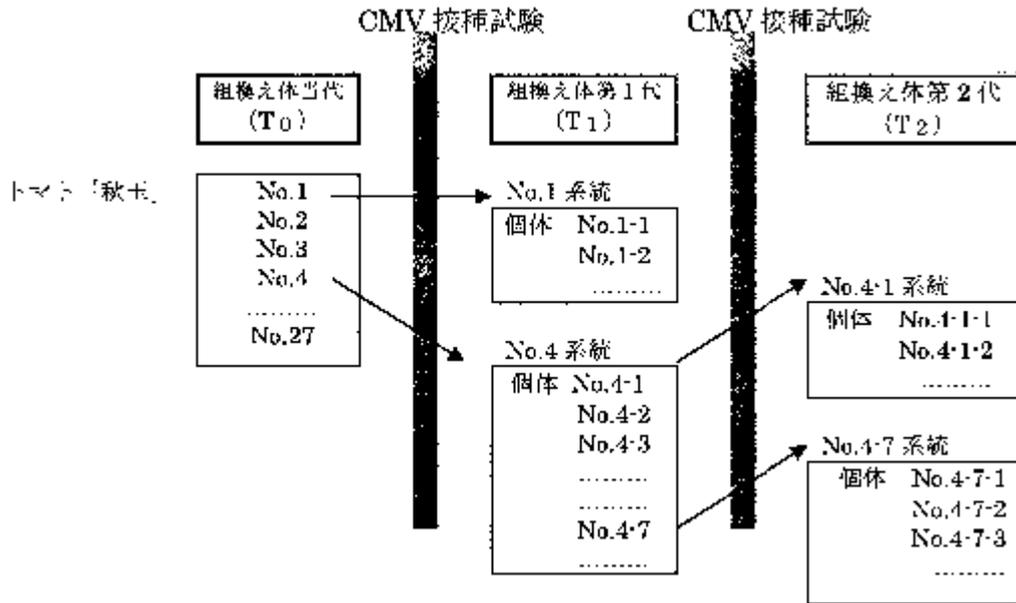
1, StyI (TOYOBO); 2, 秋玉; 3, 4-38系統 (CMV感受性); 4, 4-7系統 (CMV抵抗性); 5, MPTIIを含むプラスミド (pBI121)。矢印: 目的とするDNA断片。



第6図 遺伝子組換えトマト「No.4-7系統」のウイルス抵抗性

左,「秋玉」健全株; 中,「4-7系統」CMV感染株; 右,「秋玉」CMV感染株。

CMV-42CMを汁液接種し, 接種14日後に病徴を観察した。「4-7」(中)は軽いモザイクを生じたが,「秋玉」(右)のような激しい病徴はなく, 秋玉の健全株(左)と同様な生育を示した。



第7図 CMV抵抗性組換えトマト「No. 4-7系統」選抜の経過

第4表 遺伝子組換えトマト「No. 4」のウイルス抵抗性の遺伝様式

系 統	区 分	供試個体数	ウイルスに対する反応 ^{a)}		χ ²	P
			抵 抗 性	感 受 性		
4 系統 (T ₁)	観察値	184	137	47	0.029	0.05 ~ 0.075
	理論値(3:1)	184	138	46		
4 - 1 系統 (T ₂)	観察値	205	144	61	2.47	0.10 ~ 0.25
	理論値(3:1)	205	153.75	51.25		
秋玉	観察値	55	0	55		

^{a)} CMV-42CMを汁液接種し，病徴観察により判定した。

第5表 「No. 4-7系統」の後代系統(T₃)におけるウイルス抵抗性

系 統	供試個体数	ウイルスに対する反応 ^{a)}	
		抵 抗 性	感 受 性
4-7-1	30	30	0
4-7-2	30	30	0
4-7-3	48	48	0
秋玉	15	0	15

^{a)} CMV-42CMを汁液接種し，病徴観察により判定した。

第6表 CMV感染「No. 4-7系統」の戻し接種によるトマトおよびタバコの病徴^{a)}

接種源植物(病徴) ^{b)}	病 徴 ^{b)}	
	トマト「福寿2号」 ^{c)}	タバコ「キサンチnc」 ^{c)}
4-7系統(-/m)	-/m	-/m
秋玉(N/M,n,Mal,St,y)	N/M,n,Mal,St,y	M,N/M,n,Mal,St,y

^{a)} CMV-42CMを汁液接種した。

^{b)} 接種葉の病徴/上葉の病徴。-，無病徴；m，軽微なモザイク；M，モザイク；n，軽微なえそ；N，えそ；Mal，奇形；St，萎縮，y，軽微な黄化；Y：黄化。

^{c)} トマト，タバコともそれぞれ4個体供試した。

第7表 ウイルス接種濃度と遺伝子組換えトマト(T₂)の病徴

系統/CMV濃度	ウイルス接種濃度別病徴 ^{a)}											
	0.1 µg/			1 µg/			10 µg/			100 µg/		
	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++
4-7系統	12	0	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0
4-38系統	12	0	0	2	0	11	0	0	12	0	0	12
秋 玉	11	0	1	0	0	12	0	0	12	0	0	12

^{a)} CMV-42CMを汁液接種した。-，無症状；+，軽症（軽微なモザイク症状）；++，重症（えそ，子葉の脱落，激しいモザイク，黄化，草丈の短縮）。

第8表 アブラムシによるCMV接種試験^{a)}

系 統	供試個体数	病 徴 ^{b)}		
		-	+	++
4-7系統	8	3	5	0
4-38系統	8	5	0	3
秋 玉	8	4	0	4

^{a)} CMV-42CM感染トマト（品種「桃太郎」）を獲得吸汁源とし，モモアカアブラムシを用いて行った。

^{b)} -，無症状；+，軽症（軽微なモザイク症状）；++，重症（えそ，子葉の脱落，激しいモザイク，黄化，草丈の短縮）。

ではほとんどの株が発病した。感受性ホモの「No.4-38系統」と「秋玉」は，えそやモザイクを生じるなど激しい病徴を呈した。これに対し，「No.4-7系統」の病徴はいずれも軽いモザイクを生じる軽微なもので，接種するウイルス濃度が高くても病徴が激しくなることはなかった（第7表）。以上から，「No.4-7系統」の抵抗性は，発病株率を低下させるものではなく，病徴を軽減するものであることが明らかとなった。

2) アブラムシ接種に対する抵抗性およびウイルス抵抗性のアブラムシによる伝搬

(1) アブラムシ接種に対する抵抗性

CMVは，野外ではアブラムシにより非永続的に伝搬されている。そこで，CMVをアブラムシ接種した場合の抵抗性について検討した。CMV-42CM感染トマト（品種「桃太郎」）を獲得吸汁源とし，モモアカアブラムシを用いて接種したところ，「No.4-7系統」の発病株は汁液接種の場合と同様に軽微な病徴のみを示した。これに対し，感受性の「No.4-38系統」および「秋玉」の病徴は激しかった（第8表）。これらの結果から，「No.4-7系統」の抵抗性は，CMVのアブラムシ伝搬に対しても有効であることが明らかとなった。

(2) ウイルス抵抗性のアブラムシによる伝搬

「No.4-7系統」が発現するサテライトRNAは，感染したCMVと共に，汁液接種により他の植物に伝搬され，接種植物でのCMVの病徴発現を抑制していた（第6表参照）。同様な現象が，アブラムシ媒介によっても起きるかを確認するため，モモアカアブラムシによる伝搬試験を試みた。「No.4-7系統」，感受性の「No.4-38系統」および「秋玉」を供試し，各株にCMV-42CMを汁液接種し，接種10日後の感染上葉を獲得吸汁源とし，「福寿2号」にアブラムシ接種を行った。結果を第9表に示した。「秋玉」病葉を吸汁源に用いると，「福寿2号」は激しい病徴を生じたが，「No.4-7系統」病葉を吸汁源に用いた「福寿2号」の病徴は，軽微なモザイクのみであった。これらは汁液接種の結果と一致し，「No.4-7系統」で発現するサテライトRNAは，感染したCMVに取り込まれ，アブラムシにより他の植物に伝搬されて，伝搬先の植物でのCMVの病徴発現を抑制していることが明らかになった。

3) 各種CMV分離株に対する反応

(1) サテライトRNAを持たない分離株の接種
サテライトRNAを持たないCMV分離株（CM32，14CM，29CM）を用い，これらに感染した「キサンチnc」を「No.4-7系統」に汁液接種したところ，

第9表 アブラムシによる戻し接種試験^{a)}

獲得吸汁源 ^{b)}	反 復	接種個体数	トマト「福寿2号」の病徴 ^{c)}		
			-	+	++
4-7系統		6	3	3	0
		6	4	2	0
		6	2	4	0
4-38系統		6	3	0	3
		6	1	0	5
		6	3	0	3
秋 玉		6	0	0	6
		6	0	0	6
		6	1	0	5

^{a)} モモアカアブラムシを用いトマト「福寿2号」へ接種した。

^{b)} CMV-42CM感染葉を用いた。

^{c)} -, 無症状; +, 軽症(軽微なモザイク症状); ++, 重症(えそ, 子葉の脱落, 激しいモザイク, 黄化, 草丈の短縮)。

第10表 サテライトRNAを持たないCMVに対するウイルス抵抗性試験^{a)}

CMV分離株	系 統	供試個体数	病 徴 ^{b)}		
			-	+	++
CMV-CM32	4-7系統	8	0	8	0
	秋 玉	8	0	0	8
CMV-14CM	4-7系統	8	0	8	0
	秋 玉	8	0	0	8
CMV-29CM	4-7系統	8	0	8	0
	秋 玉	8	0	0	8

^{a)} 各分離株に感染したタバコ「キサンチnc」を汁液接種した。

^{b)} -, 無症状; +, 軽症(軽微なモザイク症状); ++, 重症(えそ, 子葉の脱落, 激しいモザイク, 黄化, 草丈の短縮)。

第11表 モザイク症状を引き起こすサテライトRNAを有するCMVに対するウイルス抵抗性試験^{a)}

系 統	供試個体数	病 徴 ^{b)}			
		-	+	++	+++
4-7系統	8	0	0	8	0
秋 玉	8	0	0	0	8

^{a)} CMV-Y感染タバコ「キサンチnc」を汁液接種した。

^{b)} -, 無症状; +, 軽症(軽微なモザイク症状); ++, 重症(えそ, 子葉の脱落, 激しいモザイク, 黄化, 草丈の短縮); +++, えそ症状を呈し激しいものは枯死。

「No.4-7系統」はいずれも軽微なモザイク症状のみを示した(第10表)。以上から、「No.4-7系統」はサテライトRNAを持たないCMV分離株に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。

(2) モザイク症状を引き起こすサテライトRNAを有する分離株の接種

CMV-Y(土崎ら, 1981)はトマトにモザイク症

状を引き起こすサテライトRNAを有している。CMV-Y感染「キサンチnc」を汁液接種した「No.4-7系統」は, 感染初期には明瞭な黄色斑紋, 萎縮, 奇形など, 感受性の「秋玉」と同様の病徴を示したが, 接種2~3週間を経過すると, 葉身の黄斑症状は残ったものの, その生育は回復した(第11表)。一方, 「秋玉」では強度のえそ症状が発生し, 一

第12表 えそ性のサテライトRNAを有するCMVに対するウイルス抵抗性試験

接種方法	系 統	供試個体数	病 徴 ^{c)}			
			-	+	++	+++
汁液接種 ^{a)}	4-7系統	10	0	0	3	7
	4-38系統	10	1	0	0	9
	秋 玉	10	0	0	2	8
アブラムシ接種 ^{b)}	4-7系統	12	6	0	1	5
	4-38系統	12	7	0	1	4
	秋 玉	12	7	0	0	5

a) CMV- α (n2) 感染タバコ「キサンチnc」を接種源に用いた。

b) モモアカアブラムシを用いて行った。

c) -, 無症状; +, 軽症 (軽微なモザイク症状); ++, 重症 (えそ, 子葉の脱落, 激しいモザイク, 黄化, 草丈の短縮); +++, えそ症状を呈し激しいものは枯死。

部の株は枯死した。以上から、「No.4-7系統」はCMV-Yに対しては、感染初期には感受性反応を示すものの、感染後症状の軽減がみられることが判明した。また、「No.4-7系統」で導入遺伝子から発現しているサテライトRNAと、接種したCMV-YのサテライトRNA間で、増殖の競合が起きていることが示唆された。

(3) えそ性のサテライトRNAを有する分離株の接種

トマト条斑病を引き起こすCMVは、えそ性のサテライトRNAを有することが知られている(吉田, 1986)。えそ性のサテライトRNAを有するCMV- α (n2)を「No.4-7系統」に感染させ、「No.4-7系統」のえそ性サテライトRNAに対する反応を調べた。汁液接種はタバコ「キサンチnc」感染葉を接種源に用い、アブラムシ接種はモモアカアブラムシを用いた。その結果「No.4-7系統」は、感受性の「No.4-38系統」および「秋玉」と同様なえそ症状を呈し、枯死する株が多数観察された(第12表)。以上から、「No.4-7系統」はCMV- α (n2)のようなえそ性のサテライトRNAに対しては抵抗性を示さないことが明らかとなった。

考 察

1. 抵抗性ホモ個体「No.4-7系統」の選抜

弱毒性のサテライトRNA sat55-1を遺伝子導入した結果得られた遺伝子組換え体当代(T_0)27個体全てから、sat55-1遺伝子がPCRで確認された。このうち、6個体(No.1, 4, 7, 20, 24, 27)でCMV接種に対し病徴の軽減が認められ、これらは導入した同遺伝子による抵抗性であると推測され

た。一方で、導入遺伝子は確認されたものの、病徴の軽減が見られなかった T_0 世代個体もあった。これらは、多くの遺伝子組換え植物で観察されているように(Matzkeら, 1998)、トマト染色体上の挿入部位の違いにより、発現効率に差異が生じたためと考えられる。また、再分化個体において導入遺伝子の入った細胞と入っていない細胞のキメラ状態が生じ、加えて、導入遺伝子を有する細胞の存在比率が低いために導入遺伝子の発現量が低く、十分な抵抗性を持つことが出来なかった可能性も考えられる。

アグロバクテリウム法による遺伝子導入では、導入遺伝子の染色体への挿入位置は不特定で、対となる染色体上に導入遺伝子が存在しないため再分化個体は遺伝的にヘテロとなり、付与された形質の評価・解析の素材としては不適である(Chyira, 1986; Albertsら, 1989)。さらに、遺伝子組換え体は培養と再分化を経由して作出されるので、この間のストレスが形質に影響を与えることも予想される。本研究においても、抵抗性を示した T_0 世代6個体のうち2個体は葉の肥厚などの明らかな形態異常を示し、着果はしたものの種子は得られなかった。遺伝子組換えトマトのCMV抵抗性を適正に評価するためには、培養・再分化による影響を受けるおそれのない、通常の種子から発芽した植物体で行うことが望ましいと考えられた。そこで、CMVによる病徴の軽減が見られた遺伝子組換えトマト当代(T_0)の自殖後代系統のウイルス抵抗性を解析し、CMV抵抗性遺伝子をホモに持つ遺伝子組換え体「No.4-7」を選抜した。

2. 「No.4-7系統」の抵抗性の機作

「No.4-7」の母集団である「No.4系統」および「No.4-1系統」での抵抗性：感受性の分離は3:1の期待値に適合した。これらの集団のうち、抵抗性を示した個体群においては病徴の差が認められず、抵抗性ホモ個体とヘテロ個体とを区別することはできなかった。したがって遺伝子組換え体「No.4-7」におけるサテライトRNA遺伝子は、見かけ上、単一の優性遺伝子と同様な遺伝行動を示していると考えられた。

「No.4-7系統」から産生される導入遺伝子由来のサテライトRNAは、導入に用いたサテライトRNAと塩基配列が同一で、汁液接種（第6表）およびアブラムシ接種（第9表）で感染したCMV粒子に取り込まれて伝搬され、伝搬先の植物においても病徴発現を抑制する働きを失わないことが示された。以上の結果は、Masutaら（1989）による報告と一致した。

吉田（1986）は、弱毒性のサテライトRNAを電気泳動により精製し、CMVと同時に接種したところ、ウイルスの弱毒化が認められたことを報告している。本研究でみられた病徴発現の抑制効果も「No.4-7系統」が産生する弱毒サテライトRNAがCMVに取り込まれて弱毒化した結果と考えられ、自然界に存在するサテライトRNAを用いた吉田の研究（1986）と同じ結果が、遺伝子組換え体由来のサテライトRNAでも得られることが明らかになった。

しかし、CMVが既にサテライトRNAを持っている場合は、病徴発現の抑制効果は必ずしも充分ではなかった（第12表）。これは、遺伝子組換え体由来のサテライトRNAと外来のCMVのサテライトRNAの間に複製の競合があり、遺伝子組換え体由来のサテライトRNAが充分な抑制効果を示すまでには増殖できなかったものと考えられる。以上から、「No.4-7系統」は、侵入してくるウイルスのサテライトRNAの有無やその性状に応じて抵抗性に差があることが判明した。

サテライトRNAによる病徴軽減効果は、サテライトRNAの増殖に伴うCMV側の増殖抑制によると推測されている。しかしながら、遺伝子組換え植物中においてウイルスの増殖が抑制されないにもかかわらず、病徴軽減効果がみられた例も報告されており（Harrisonら、1987）、そのメカニズムはまだ解明されていない。今後「No.4-7系統」

とさまざまなCMV分離株の組み合わせによる病徴軽減効果を調べることにより、サテライトRNAによる病徴軽減のメカニズムの解明に向けて、さらに研究を進めていく必要がある。

3. 「No.4-7系統」の利用

本研究では、遺伝子導入により付与された形質を適正に評価する必要から、遺伝的に均一であるトマト品種「秋玉」を材料に用いた。しかしながら「秋玉」の品質は、現在流通している「桃太郎」等の主要品種に比較すると優れているとはいえない。今後は、「No.4-7系統」を交配母本として、果実品質を高めたCMV抵抗性品種の作出が必要である。現在非閉鎖系圃場において、「No.4-7系統」の安全性評価試験を実施しており、種苗法に基づく登録を検討中である。

摘 要

CMVの弱毒サテライトRNA sat55-1を遺伝子導入した遺伝子組換えトマトから、サテライトRNA遺伝子を持つカナマイシン耐性の再分化トマトを得た。自殖種子の後代から、ウイルス抵抗性系統の選抜を行い、抵抗性遺伝子をホモに持つ「No.4-7系統」を作出した。ウイルス抵抗性の分離パターンから、「No.4-7系統」に導入された遺伝子は単一の優性遺伝子と同様な遺伝行動を示していると考えられた。導入遺伝子由来のサテライトRNAは、自然界の弱毒サテライトRNAと同様、感染したCMVに取り込まれて伝搬され、伝搬先の植物においても病徴発現を抑制した。「No.4-7系統」のウイルス抵抗性は、侵入してくるウイルスにより差がみられた。競合するサテライトRNAを持たないCMVに対しては有効であると考えられた。作出した「No.4-7系統」の安全性評価試験を実施し、種苗法に基づく登録を検討中である。

引用文献

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1989): *Molecular biology of the cell*. 2nd Ed. p.1137-1186, Garland Publishing Inc, New York.
- Baulcombe, D., Saunderson, G. R., Revan, M. W., Mayo, M. A. and Harrison, B. D. (1986): Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed

- plants. *Nature*, 321, 446-449.
- Chyi, Y.S., Jorgenson, R.A., Goldstein, D., Tanksley, S.D. and Loaiza-Figueroa, F. (1986): Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.*, 204, 64-69.
- Gerlach, W. L., Llewellyn D. and Haseloff, J. (1987): Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ring spot virus. *Nature*, 328, 799-802.
- Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25, 263-269.
- Harrison, B. D., Mayo, M. A. and Baulcombe, D. C. (1987): Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature*, 328, 799-802.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 197-180.
- 本田要八郎, 吉田幸二, 後藤忠則 (1993): トマト条斑病常発地域における弱毒ウイルス予防接種による防除効果. 北日本病虫研報. 44, 56-58.
- 岩崎真人, 稲葉忠興 (1988): カボチャ台接木キュウリの萎凋株から分離されたキュウリモザイクウイルスおよびズッキーニ黄斑モザイクウイルス. 四国植物防疫研究. 23, 61-71.
- 岩崎真人, 山本孝誦, 稲葉忠興 (1996): ウイルスによるカボチャ台接木キュウリの萎凋症に関する研究. 四国農業試験場報告. 60, 1-88.
- Jacquemond, M., Ameselem, J. and Tepfer, M. (1988): A gene coding for a monomeric form of cucumber mosaic virus satellite RNA confers tolerance to CMV. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1, 311-316.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Lomonosoff, G. P. (1995): Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Ann. Rev. Phytopath.* 33, 323-343.
- Masuta, C., Komari, T. and Takanami, Y. (1989): Expression of cucumber mosaic virus satellite RNA from cDNA copies in transgenic tobacco plants. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 55, 49-55.
- Masuta, C., Hayashi, Y., Suzuki, M., Kuwata, S., Takanami, Y. and Koiwai, A. (1994): Protective effect of a satellite RNA expressed in transgenic plants on disease incidence after inoculation of cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 60, 228-232.
- Matzke, A.J. and Matzke, M.A. (1998): Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1(2), 142-149.
- McGarvey, P.B., Montasser, M.S. and Kaper, J.M. (1994): Transgenic tomato plants expressing satellite RNA are tolerant to some strains of cucumber mosaic virus. *American Soc. Horticul. Sci.*, 119, 642-647.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.*, 8, 4321-4325.
- Peden, K.Q.C. and Symons, R.H. (1973): Cucumber mosaic virus contain a functionally divided genome. *Virology*, 63, 252-262.
- Pena, L., Trad, J., Diaz-Ruiz, J.R., McGarvey, P.B. and Kaper, J.M. (1994): Cucumber mosaic virus protection in transgenic tobacco plants expressing monomeric, dimeric or partial sequences of a benign satellite RNA. *Plant Sci.*, 100, 71-81.
- Roossnick, M.J., Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992): Satellite RNAs of plant viruses. *Microbiol. Rev.*, 56, 265-279.
- Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992): Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.
- Tochihara, H. (1970). Some properties of chrysanthemum mild mottle virus, and comparison of this virus with cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 36, 1-10.

土崎常男, 後藤忠則, 藤沢一郎, 吉田幸二 (1981) 北海道のマメ科植物, 野菜に発生するウイルス病について. 北海道農試研報131, 71-93.

山本孝諦, 石井正義 (1983): 感染キュウリ品種からのカボチャモザイクウイルスおよびキュウリモザイクウイルスのアブラムシによる伝搬. 日本植物病理学会報. 49, 508-513.

Yie, Y., Zhao, F., Zhao, S. Z., Liu, Y. Z., Liu, Y. L. and Tien, P. (1992): High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivar G-140. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5(6), 460-465.

Yie, Y. and Tien, P. (1993): Plant virus satellite RNAs and their role in engineering

resistance to virus diseases. *Seminars in Virology*, 4, 363-368.

Yie, Y., Wu, Z. X., Wang, S. Y., Zhao, S. Z., Zhang, T. Q., Yao, G. Y. and Tien, P. (1995): Rapid production and field testing of homozygous transgenic tobacco lines with virus resistance conferred by expression of satellite RNA and coat protein of cucumber mosaic virus. *Transgenic Research*, 4, 256-263.

吉田幸二 (1986): サテライトRNA置換による弱毒CMVの作出. *植物防疫*. 40, 510-515.

吉田幸二 (1989): 北海道に発生する cucumovirus 並びにキュウリモザイクウイルスのサテライトRNAに関する研究. 北海道大学学位論文. pp285.

Virus resistance in transgenic tomato expressing satellite RNA of Cucumber mosaic virus

1 : Genetical aspects and virus resistance

Kunimasa KAWABE, Mabito IWASAKI, Yuriko HAYANO-SAITO,
Yohachiro HONDA, Koji YOSHIDA and Tetsuo MAOKA

Summary

The complementary DNA of a symptom suppressor strain of Cucumber mosaic virus (CMV) satellite RNA were transformed into a Japanese cultivar of tomato, 'Shugyoku', to obtain CMV resistant tomato. The resistance of transgenic plants was examined in second generation of self-crossed lines which have satellite cDNA at a single locus in homozygous. A highly resistant line, 'No.4-7' shows only very mild symptom when inoculated with virulent CMV isolates with no satellite RNA. When CMV-Y containing satellite RNA of yellow mosaic type was inoculated, the 'No.4-7' shows symptoms in early phase of infection. However, two or three weeks after inoculation, the transgenic line recovers the growth and

shows only mild mosaic symptom. The 'No. 4-7' shows no resistance against CMV with necrogenic satellite RNA. The virulent CMV isolates become attenuated through multiplication in the transgenic tomato. This indicates that the inoculated CMV acquires the satellite RNA in the transgenic tomato. After the acquisition by CMV, the satellite RNA of transgenic tomato is aphid-transmissible to non-transgenic tomato or tobacco with CMV. The transgenic tomato is considered to produce novel satellite RNA with the same nature as existing viral RNA in the field. The biosafety assessment of transgenic tomato line, 'No. 4-7' will be undertaken to develop commercial CMV resistant line.