

実績報告書別添資料 1

1. 飛散試験

目的

隔離圃場内の試験区で栽培している組換えイネ S-C 系統、及び AS-D 系統の開花時における花粉の飛散状況を確認するため。

方法

(1) H23 年度は、7 月末からの低温の影響を受け例年の開花時期よりも遅れ、試験に用いた組換えイネの開花が最初に確認されたのは S-C 系統、及び AS-D 系統ともに 8 月 13 日であった。そこで予め準備しておいた花粉トラップ（飛散した花粉が吸着できるように薄くワセリンを塗ったガラスプレート[2.5 cm x 7.5 cm]を棒に装着した装置：右写真参照）を、隔離圃場内、および隔離圃場外の近隣の研究圃場、一般圃場に設置した。設置場所は、図 1A, 1B, 1C に示した。この花粉トラップの設置は、開花が確認された 8 月 13 日の午前 11 時から開花のピークが過ぎた 8 月 16 日午前 11 時までの期間行った。ガラスプレートを毎日午前 11 時に回収し、回収と同時に、新たにワセリンを塗ったプレートを棒に装着した。回収したプレートは、回収後直ちに密閉した容器に移し、花粉の検定を行うまで、4°C で保存した。



回収したプレートに付着した花粉の分析は、東北大学大学院生命科学科内の遺伝子組換え実験室（P1P 実験室）にて行った。花粉が組換えイネ由来であるか否かについての検定は、組換えイネのみが有するハイグロマイシン耐性遺伝子が花粉 DNA 中に含まれているか否かの検出方法により行った。具体的には、ガラスプレートに付着した花粉を光学顕微鏡下で注射針を用いてかき取り（1~3 粒程度）、かき取った各花粉から抽出した DNA をテンプレートに、ハイグロマイシン耐性遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いた PCR（Polymerase Chain Reaction）法により検定を行った。また検査した花粉がイネ由来であるか否かに関しては、イネ特異的な配列を有する tubulin（真核生物が有する微小管や中心体を形成するタンパク質）の DNA の存在の有無を PCR 法により調べた。以下に花粉からの DNA の抽出方法、用いたプライマーの配列、ならびに PCR の反応条件記す。

DNA 抽出条件

かき取った花粉 1~3 粒程度を、3 μ L の抽出液 (10 mM Tris/HCl [pH8.0], 10 mM EDTA, 0.01% SDS, 0.2 mg/ml Proteinase K) に懸濁し、37°C、60 min、そして 95°C、10 min の処理を行うことで DNA 抽出を行った。

プライマー配列

①ハイグロマイシン耐性遺伝子検出用プライマー

forward; 5'-CAGCGGTCATTGACTGGAGC-3'

reverse; 5'-GCGTCGGTTTCCACTATCGG-3',

②Tubulin 検出用プライマー

forward; 5'-TACCGTGCCCTTACTGTTCC-3'

forward; 5'-CGGTGGAATGTCACAGACAC-3'

PCR 条件

1 μ l; 10 \times Ex Taq Buffer, 0.8 μ l; dNTP Mixture (各 2.5 mM), 1.2 μ l; MgCl₂ (25 mM), 0.075 μ l; Ex Taq (Takara), 0.25 μ l; Forward primer (20 mM), 0.25 μ l; Reverse primer (20 mM), 4.925 μ l; dH₂O, 1.5 μ l; DNA sol. (Total 10 μ l)

PCR 反応は iCYCLER (BioRad, CA, USA) を使用し、以下のプログラムで行った。

熱変性 98°C 3分

[熱変性 98°C 20秒、アニーリング 50~64°C 30秒、伸長 72°C 2分] \times 40

伸長 72°C 5分

結果

まず、図 2 に非組換えイネであるササニシキ、形質転換に用いた CPD 光回復酵素を含むプラスミド DNA、形質転換に用いたプラスミド DNA、そして本試験に用いた組換えイネ S-C と AS-D の DNA を抽出し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を増幅するプライマーを用いて PCR 反応で増幅し、泳動した結果を示した。図 2 から分かるように、非組換えイネのササニシキはハイグロマイシン耐性遺伝子を持たないので、その遺伝子（図 2 矢印の位置に見えるバンド；約 400 kb）が増幅されることが分かる。一方、組換えイネである S-C と AS-C はハイグロマイシン耐性遺伝子を有しているため、遺伝子が増幅される。この方法により、まず回収した花粉から抽出した DNA を鋳型に、ハイグロマイシン耐性遺伝子を増幅するプライマーを用いて PCR 反応を行い、電気泳動から、その花粉が組換えイネ由来であるか否かを検定した。

図 1A~1C には、花粉トラップを設置した場所を示した。花粉トラップは、隔離圃場内の試験区内の防鳥網の内側（番号 1~12：図 1A）、隔離圃場内の試験区外の防鳥網の外側（番号 13~20：図 1B）、及び、近隣の研究圃場（番号 21~23：図 1C）、一般圃場（番号 24~30：図 1C）の計 30 箇所を設置し、開花時の 8 月 13 日~16 日にかけてサンプリングを行い、検定を行った。

表 1 には、8 月 14 日~16 日に採取し、検定した結果の合計を示した。組換えイネを栽培した隔離圃場内の試験区の防鳥網内では、組換えイネからの距離に応じて花粉が検出された（表 1）。栽培した組換えイネからもっとも近くに設置した約 0.6 m では 70-80%、栽培区画から離れた防鳥網内側では、7-26%の花粉の飛散が検出された。一方、隔離圃場内の防鳥網外の設置箇所では、飛散した花粉数は減少したが、栽培区画からの距離が 2.5、3.5、5、22.5、25 m の地点で組換えイネの花粉は検出された。また、隔離圃場外の近隣の研究圃場、ならびに一般圃場付近にも花粉トラップを設置し、検定を行ったが、組換えイネの花粉は検出されなかった。なお、開花期間中の栽培区画内の平均風速は 1.3 m/s 以下であった。

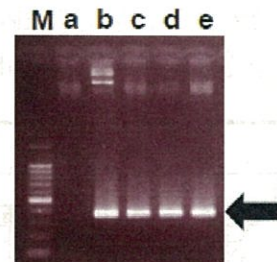


図 2

- M: マーカー
- a: 非組換えイネササニシキ
- b: CPD光回復酵素を含むプラスミド
- c: 形質転換に用いたプラスミド
- d: 組換えイネS-C
- e: 組換えイネAS-D

図 1A

花粉の飛散状況の確認に関する、花粉トラップ設置位置（隔離圃場内）

隔離圃場内・栽培区画内設置位置

図中の緑色の○がトラップ設置位置を示す。

図中の赤印位置は、交雑試験用のサンプリング位置を示す。

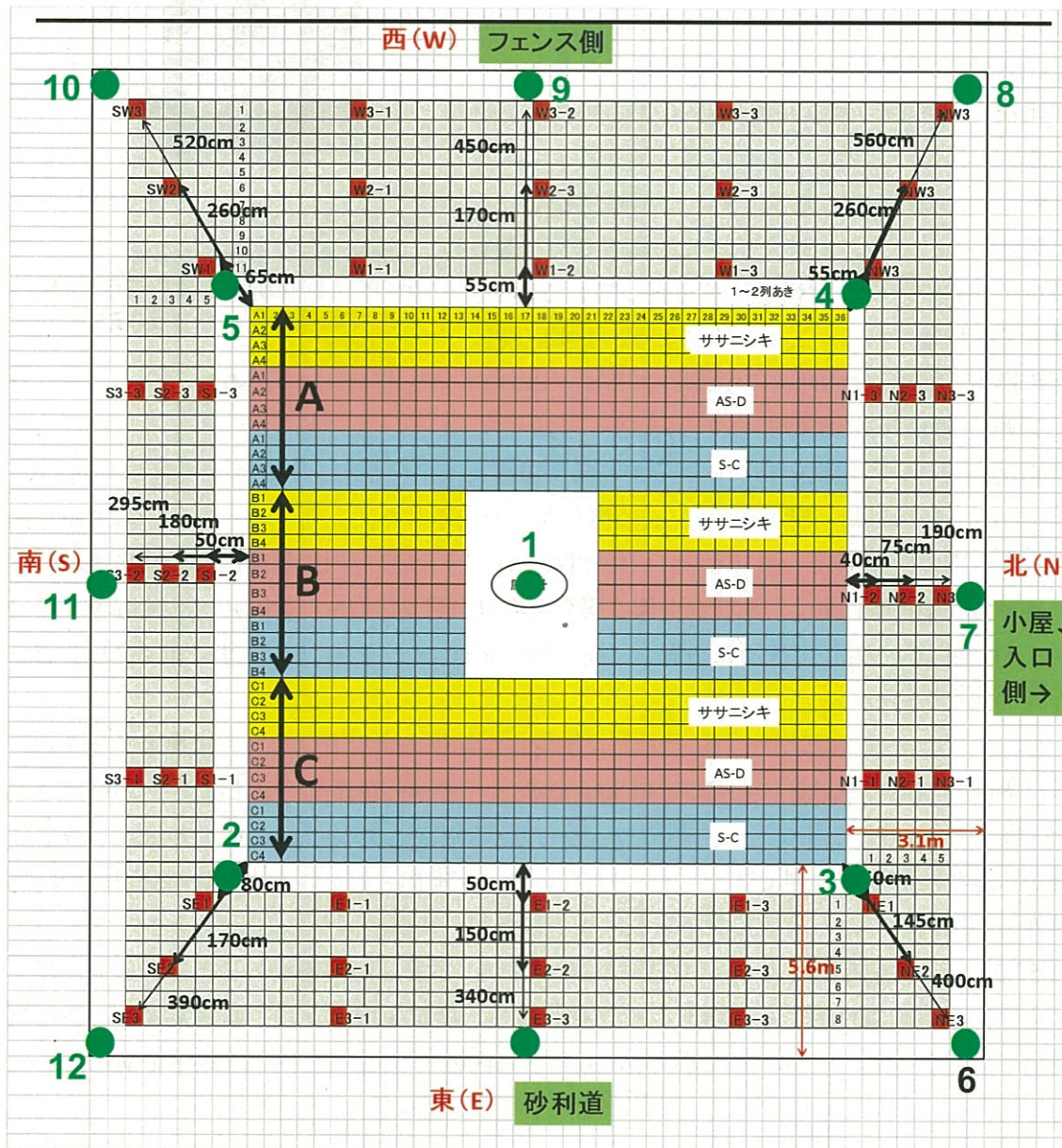


図 1B

花粉の飛散状況の確認に関する、花粉トラップ設置位置（隔離圃場内外）
隔離圃場内設置位置

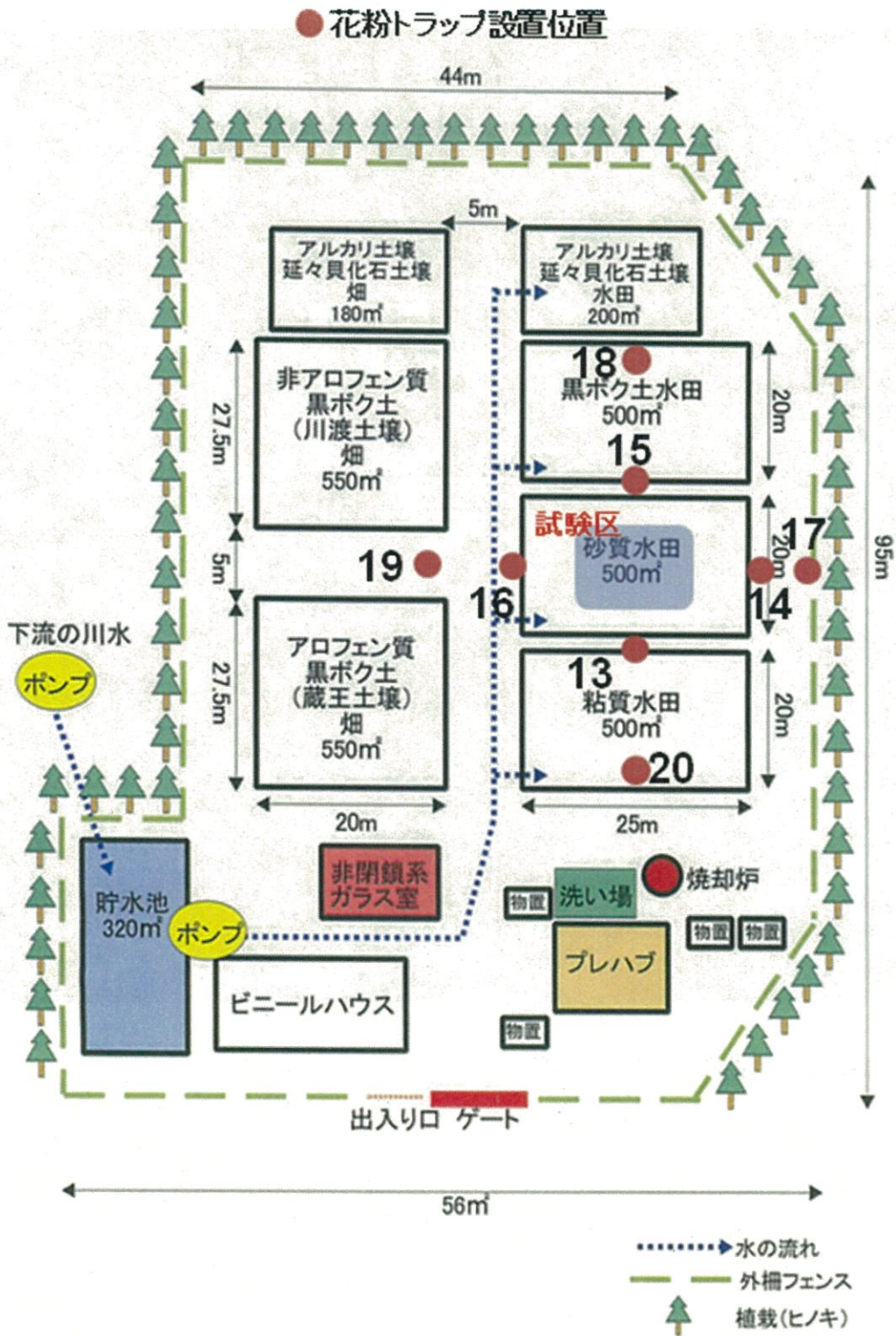
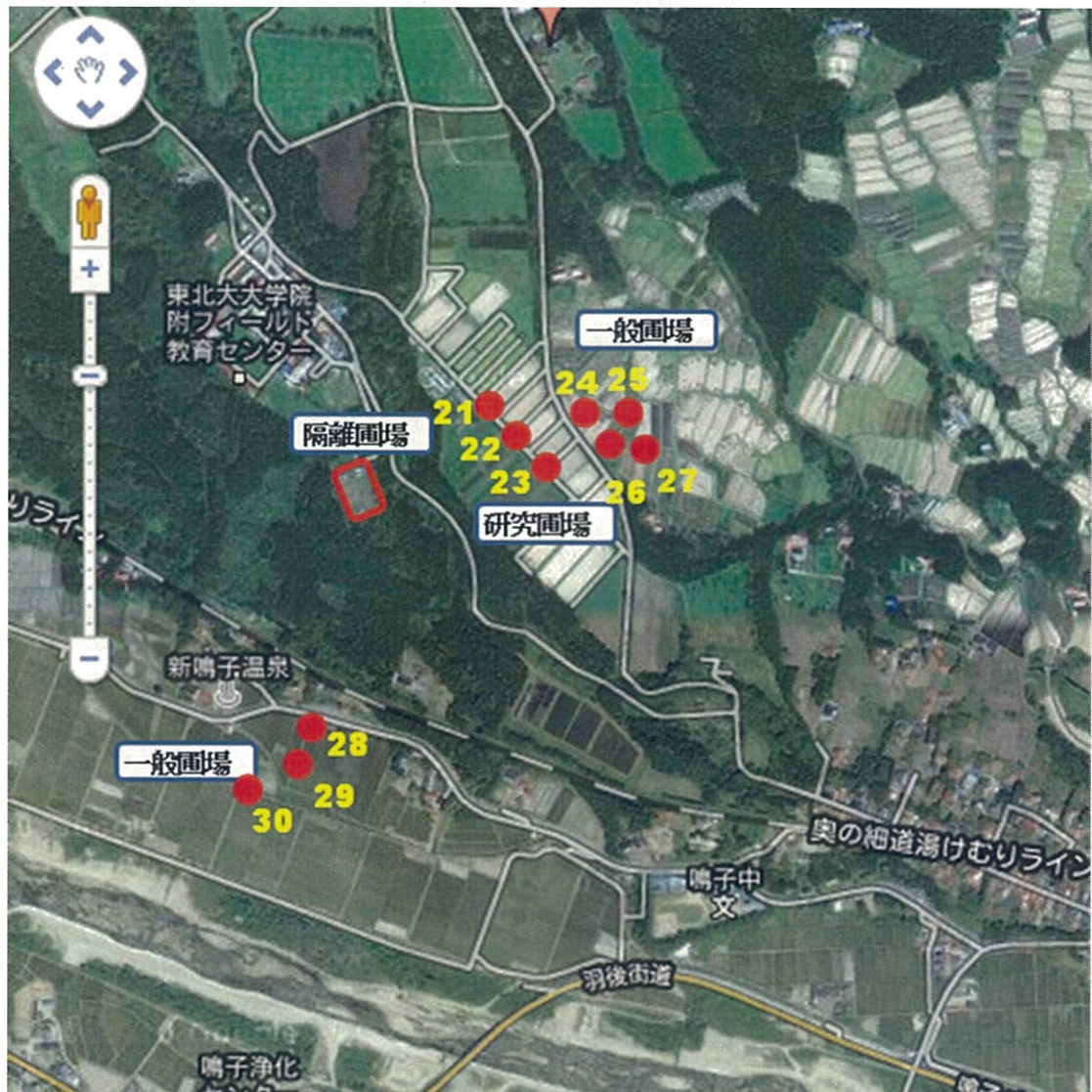


図 1C

花粉の飛散状況の確認に関する、花粉トラップ設置位置（隔離圃場内外）
隔離圃場外（研究圃場・一般圃場）設置位置



赤○が設置位置、番号はトラップ番号

表1

設置番号	栽培区からの最短距離(m)	花粉数			検出された組換えイネの花粉サンプル数/検定したサンプル数	%	8月14日			8月15日			8月16日		
		8月14日	8月15日	8月16日			検出された組換えイネの花粉/検定したサンプル数			%					
							8月14日	8月15日	8月16日	8月14日	8月15日	8月16日			
1	1.2	372	187	220	212/288	73.6	71/96	61/96	80/96	74.0	63.5	83.3			
2	0.6	277	140	137	187/288	64.9	44/96	68/96	75/96	45.8	70.8	78.1			
3	0.6	112	40	57	144/161	70.8	69/96	23/30	22/35	71.9	76.7	62.9			
4	0.6	370	152	202	65/282	23.0	15/96	21/90	29/96	15.6	23.3	30.2			
5	0.6	232	155	271	75/288	26.0	25/96	31/96	19/96	26.0	32.3	19.8			
6	4	215	95	80	18/211	8.5	7/96	6/65	5/50	7.3	9.2	10.0			
7	2	72	60	25	29/111	26.1	12/48	13/48	4/15	25.0	27.1	26.7			
8	5.7	155	65	132	17/255	7.6	5/90	4/48	8/87	5.6	8.3	9.2			
9	4.8	201	81	93	30/257	11.7	9/96	15/96	6/65	9.4	15.6	9.2			
10	6	267	101	123	19/247	7.7	7/96	6/61	6/90	7.3	9.8	6.7			
11	3	189	72	78	44/184	23.9	20/90	11/48	13/46	22.2	22.9	28.3			
12	4	259	88	67	26/171	15.2	15/96	7/40	4/35	15.6	17.5	11.4			
13	2.5	10	60	55	22/106	20.8	2/10	9/40	7/31	20.0	27.1	14.6			
14	6.5	7	0	2	0/9	0	0/7	0/0	0/2	0	0	0			
15	3.5	81	65	21	17/100	17.0	6/40	10/45	1/15	15.0	22.2	7			
16	5	59	32	29	9/69	13.0	4/31	3/23	2/15	12.9	13.0	13			
17	10	5	10	5	0/20	0	0/5	0/10	0/5	0	0	0			
18	23.5	5	12	17	0/34	0	0/5	0/12	0/17	0	0	0			
19	25	48	43	32	10/69	14.5	5/29	3/25	2/15	17.2	12.0	13.3			
20	22.5	30	7	7	2/44	5	2/11	0/7	0/7	6.7	0	0			
隔離圃場外での花粉飛散試験の結果															
設置番号	栽培区からの最短距離(m)	花粉数			検出された組換えイネの花粉サンプル数/検定したサンプル数	%	8月14日			8月15日			8月16日		
		8月14日	8月15日	8月16日			8月14日	8月15日	8月16日	8月14日	8月15日	8月16日			
21	260	185	145	110	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
22	270	192	115	127	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
23	300	172	97	98	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
24	400	287	195	370	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
25	480	1295	1277	1192	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
26	430	555	392	520	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
27	470	1017	490	622	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
28	400	1090	705	492	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
29	480	730	445	305	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0
30	520	387	180	137	0/144	0	0/48	0/48	0/48	0	0	0	0	0	0

2. 交雑試験

組換えイネを栽培した隔離圃場内の栽培区画内で、組換えイネの周囲に野生型ササニシキを栽培し、組換えイネから飛散した花粉が、周囲のササニシキと受精して交雑したか否かを検定した（検定中）。

方法

試験区の周囲で栽培した非組換えイネ・ササニシキから種子を距離毎に収穫した（図1A参照）。収穫した交雑試験株の種子から、ランダムに約200粒を抽出し、殺菌処理した後、50 mg l⁻¹のハイグロマイシンを含むMS培地に播種した。播種後、28°Cの気象器で10日間育成し、組換えイネと同様の生育を示したものを生存数として数えた（図3参照）。

結果

現時点（平成24年1月15日時点）ではまだ、予定している検定用種子の交雑検定試験は終了していない。表2には現時点までの結果を示す。

表2

位置番号	ハイグロマイシン耐性 個体/検体数	%	位置番号	ハイグロマイシン耐性 個体/検体数	%	位置番号	ハイグロマイシン耐性 個体/検体数	%	位置番号	ハイグロマイシン耐性 個体/検体数	%
N1-1	0/25		W1-1	0/25		S1-1	0/25		E1-1	0/25	
N1-2	0/25		W1-2	0/25		S1-2	0/25		E1-2	0/25	
N1-3	-		W1-3	-		S1-3	-		E1-3	-	
N2-1	0/25		W2-1	0/25		S2-1	0/25		E2-1	0/25	
N2-2	0/25		W2-2	0/25		S2-2	0/25		E2-2	0/25	
N2-3	-		W2-3	-		S2-3	-		E2-3	-	
N3-1	0/25		W3-1	0/25		S3-1	0/25		E3-1	0/25	
N3-2	0/25		W3-2	0/25		S3-2	0/25		E3-2	0/25	
N3-3	-		W3-3	-		S3-3	-		E3-3	-	
NE-1	0/25		NW-1	0/25		SW-1	0/25		SE-1	0/25	
NE-2	0/25		NW-2	0/25		SW-2	0/25		SE-2	0/25	
NE-3	-		NW-3	-		SW-3	-		SE-3	-	

現時点では、隔離圃場内の試験区で栽培した組換えイネの飛散した花粉が周囲の非組み換えイネと交雑した種子は認められていない。

図 3

非組換えイネ、組換えイネの種子のハイグロマイシン添加培地での生育

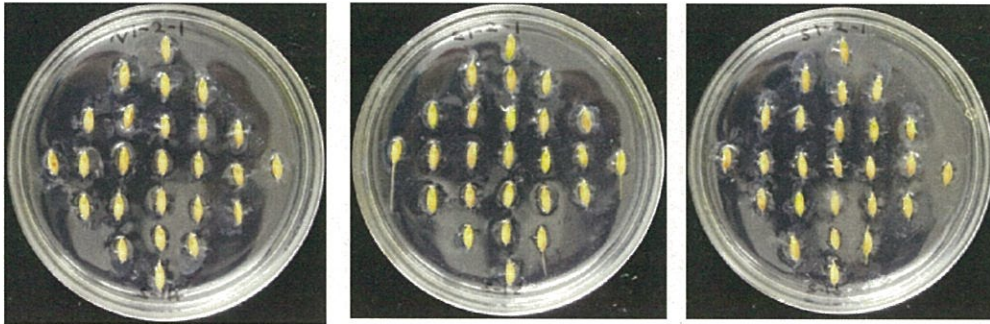


非組み換えイネ

組換えイネ (S-C)

組換えイネ (AS-D)

交雑試験の一部の様子



N1-2-区画

E1-2-区画

S-1-2-区画

図 3 交雑試験: 上段の写真は、ハイグロマイシン添加培地で非組み換えイネ(ササニシキ)、および組換えイネ S-C、AS-D 発芽生育させた時の様子。下段の写真は、サンプリングした交雑試験用のイネの試験結果の様子の一部。