

実績書別添資料 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) H24 年度は、開花直前に低温の日があるなどして、開花日に多少のバラつきが見られたが、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 7 日であった。そして、試験に用いたイネのおよそ半分が開花したのは、8 月 11 日であり、H24 年度の開花日は 8 月 11 日とした。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：右写真図 1 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 2A, 2B, 2C 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 10 日の午前 11 時から開花のピークが過ぎた 8 月 13 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。

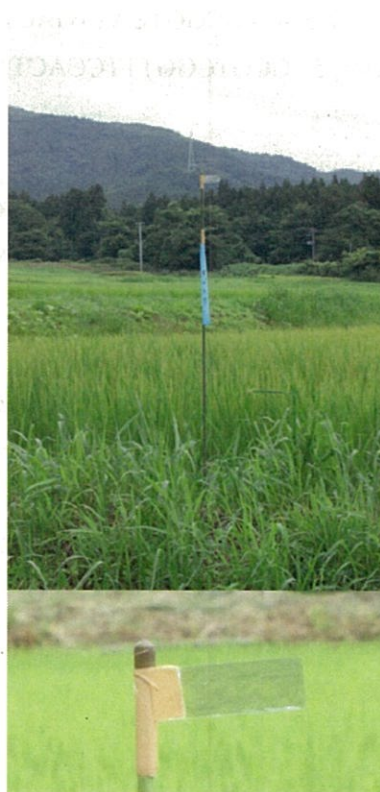


図 1 花粉トラップの写真

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研究科内の遺伝子組換え実験室（PIP 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

図 2A

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・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。

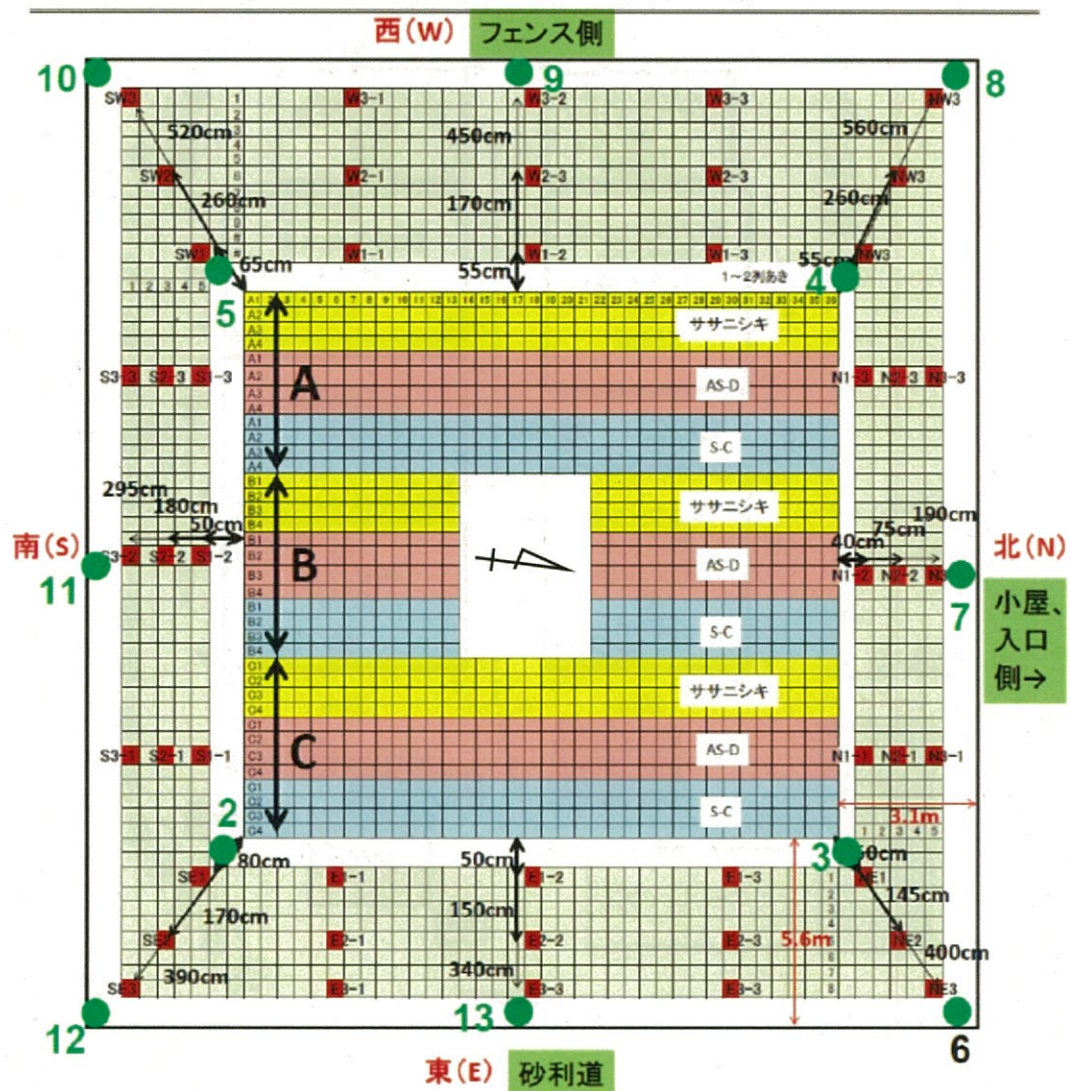


図 2B

花粉の飛散状況の確認に関する、花粉トラップ設置位置
 栽培区画外・隔離圃場内設置位置

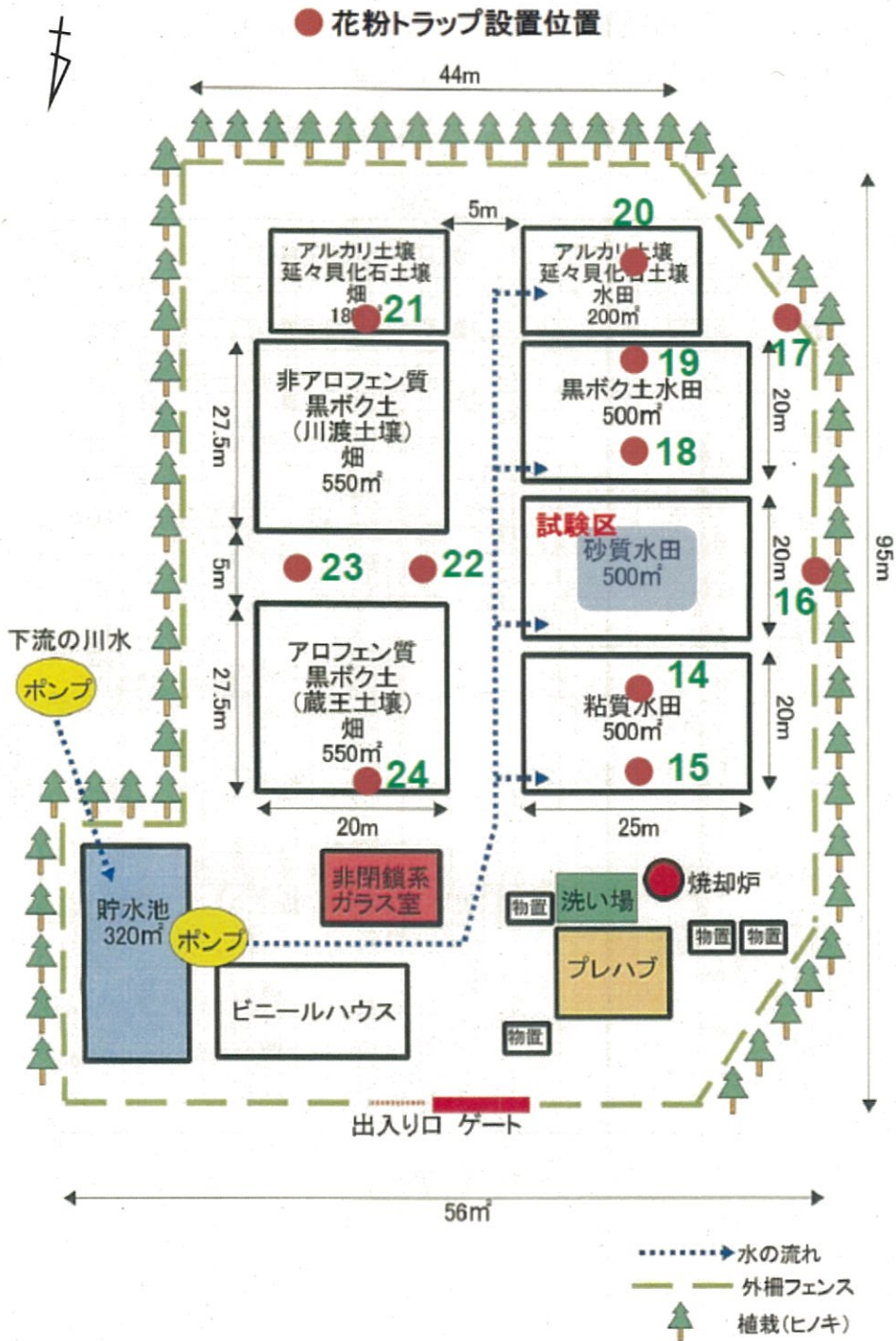
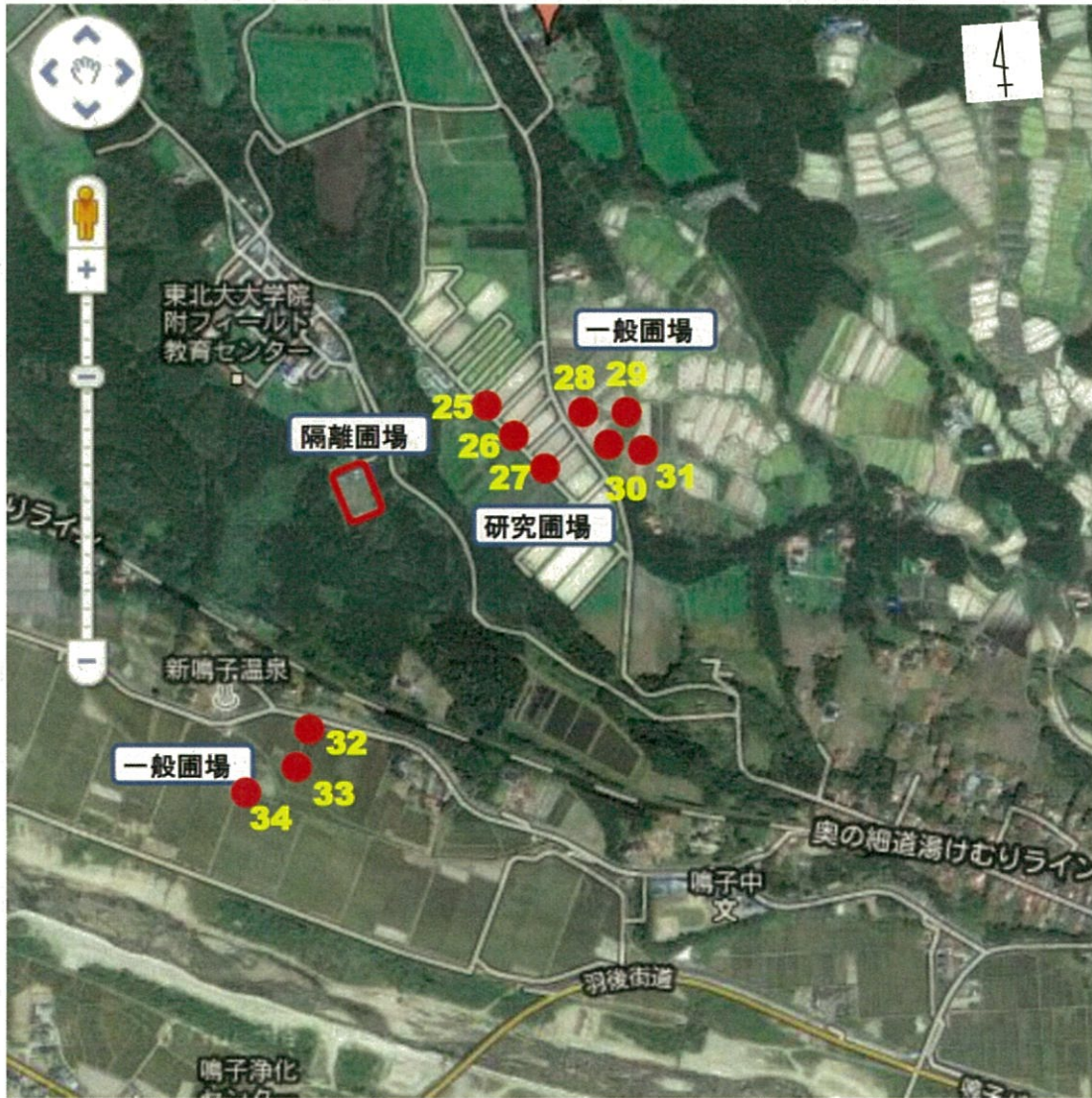


図 2C

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

結果

まず、図3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3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3矢印の位置に見えるバンド;約400 bp)が増幅されないことが分かる。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ので、遺伝子が増幅される。次に、本方法に検定の精度を確認するために、非組換えイネ、組換えイネ S-C、AS-D の各系統の花粉を、各々の花粉トラップに付着させ、それら付着した花粉1~3粒を回収し、上記方法により、組換えイネ由来であるかを検定した。検定は、各々24サンプルを対象に行ったところ、非組換えイネ・ササニシキでは、24サンプル中24サンプルでハイグロマイシン耐性遺伝子は検出されなかった(検出効率100%)。なお、24サンプル全てで tubulin 遺伝子の増幅を確認した。また、S-C 系統、ならびに AS-D 系統に関しては、24サンプル中24サンプルでハイグロマイシン耐性遺伝子が検出され、検出効率はいずれも100%であり、本方法による検出感度は十分に高いと考えられた。

図2A~2C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1~13:図2A)、隔離圃場内の試験区外の防鳥網の外側(番号14~24:図2B)、及び、近隣の研究圃場(番号25~27:図2C)、一般圃場(番号28~34:図2C)の計34箇所に設置し、開花時の8月10日~13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11日~13日に採取し、検定した結果を示した。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、図4A, 4B)。栽培区画の中心である設置番号1では、81.7%の割合で、また栽培した組換えイネからもっとも近くに設置した設置番号2、3では、各々78.4%、85.9%の割合で花粉が検出された。また、組換えイネから離れた防鳥網内側では、3-17%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、飛散した花粉数は著しく減少したが、栽培区画からの距離が30m(設置番号17、20、21、23、24)地点でも、非組換えイネ由来の花粉ではあったが、飛散が認められた。なお、組換えイネ由来の花粉は、栽培区画からの距離が10m(設置番号14、18)、15m(設置番号16)の地点でのみ検出された。また、隔離

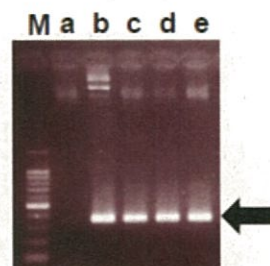


図3

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

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。これらの地点では、多くの花粉がトラップされていたが、組換えイネの花粉は検出されなかった。なお、トラップされた花粉（非組換え体由来）が、隔離圃場の試験区で栽培したササニシキ由来の花粉であるか否かに関しては、判定できない。

なお、開花期間中の栽培区画内の平均風速（5分毎の平均）は最大で1.3 m/s、平均風速は0.3 m/sであった。最大瞬間風速が、3.0 m/sを超えた時間帯を表2に示した。

表1

H24年度 設置番号	栽培区からの 最短距離(m)	トラップされた花粉数			検出された組換えイネの花 粉サンプル総数/検定した サンプル総数(%)	8月11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12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13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11日	8月12日	8月13日					8月11日	8月12日	8月13日
1	1.2	225	306	188	196/240(81.7)	59/72	82/96	55/72	81.9	85.4	76.4
2	0.6	198	393	98	163/208(78.4)	53/72	79/96	31/40	73.6	82.3	77.5
3	0.6	207	162	67	134/156(85.9)	61/72	51/60	22/24	84.7	85.0	91.7
4	0.6	162	54	88	17/105(16.2)	7/54	3/21	7/30	13.0	14.3	23.3
5	0.6	72	273	338	32/216(14.8)	3/24	16/96	13/96	12.5	16.7	13.5
6	4	108	348	56	12/156(7.7)	4/40	7/96	1/20	10.0	7.3	5.0
7	2	387	138	276	13/244(5.3)	4/96	3/52	6/96	4.2	5.8	6.3
8	5.7	162	123	81	7/130(5.4)	3/59	3/42	1/29	5.1	7.1	3.4
9	4.8	297	42	65	15/135(11.1)	11/96	1/15	3/24	11.5	6.7	12.5
10	5.3	63	96	23	7/67(10.4)	2/21	3/36	2/10	9.5	8.3	20.0
11	3	97	91	102	14/107(13.1)	5/35	7/36	2/36	14.3	19.4	5.6
12	4	81	68	134	3/107(2.8)	1/32	0/27	2/48	3.1	0.0	4.2
13	3.6	288	192	203	21/240(8.8)	8/96	5/72	8/72	8.3	6.9	11.1
14	10	43	9	32	3/26(11.5)	2/12	0/3	1/11	16.7	0	9.1
15	20	3	11	9	0/8(0)	0/1	0/4	0/3	0	0	0
16	15	18	14	26	2/20(10.0)	0/6	1/5	1/9	0	20	11.1
17	30	0	9	7	0/7(0)	0/0	0/4	0/3	0	0	0
18	10	6	5	28	1/13(7.7)	0/2	0/2	1/9	0	0	11.1
19	20	2	1	11	0/10(0)	0/5	0/1	0/4	0	0	0
20	30	4	6	7	0/8(0)	0/2	0/3	0/3	0	0	0
21	30	1	2	3	0/4(0)	0/1	0/1	0/2	0	0	0
22	15	12	3	0	0/7(0)	0/5	0/2	0/0	0	0	0
23	30	1	10	0	0/5(0)	0/1	0/4	0/0	0	0	0
24	30	12	6	0	0/8(0)	0/5	0/3	0/0	0	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)	トラップされた花粉数			検出された組換えイネの花 粉サンプル総数/検定した サンプル総数(%)	8月11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12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13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11日	8月12日	8月13日					8月11日	8月12日	8月13日
25	260	175	208	76	0/111(0)	0/43	0/48	0/20	0	0	0
26	270	245	189	43	0/104(0)	0/48	0/44	0/12	0	0	0
27	300	135	93	121	0/104(0)	0/40	0/28	0/36	0	0	0
28	400	565	681	239	0/144(0)	0/48	0/48	0/48	0	0	0
29	480	455	876	307	0/144(0)	0/48	0/48	0/48	0	0	0
30	430	305	913	148	0/136(0)	0/48	0/48	0/40	0	0	0
31	470	412	507	97	0/120(0)	0/48	0/48	0/24	0	0	0
32	400	156	205	288	0/118(0)	0/30	0/40	0/48	0	0	0
33	480	278	138	178	0/120(0)	0/48	0/24	0/48	0	0	0
34	520	89	67	237	0/90(0)	0/24	0/18	0/48	0	0	0

表2 開花期間中（8月7日～8月13日）において、最大瞬間風速が3.0 m/sを超えた日時

測定日	測定時刻	平均風速	平均風向	最大瞬間	風向	起時
2012/8/7	14:15:00	1	WNW	4.3	NNE	14:11:40
2012/8/7	16:00:00	0.8	WNW	3.5	NE	15:59:05
2012/8/7	17:25:00	0.8	NW	3.5	NE	17:24:28
2012/8/7	17:30:00	1.1	N	3.5	NNW	17:28:56
2012/8/8	10:30:00	1.2	NNW	3.5	NNW	10:25:48
2012/8/9	14:45:00	1.2	SSE	3.5	SSW	14:42:15
2012/8/9	15:05:00	1.3	SSE	3.5	SE	15:00:33
2012/8/9	15:15:00	1.3	SSE	3.5	SSW	15:10:02
2012/8/9	16:20:00	1.3	SSE	3.5	SSW	16:17:14
2012/8/9	16:25:00	1.3	SSE	3.5	SE	16:24:33
2012/8/9	16:30:00	1.3	SSE	3.5	S	16:28:55
2012/8/9	16:35:00	1.2	S	3.5	S	16:32:01
2012/8/9	16:40:00	1.2	SSE	3.5	SE	16:35:49
2012/8/10	18:00:00	1	SSE	3.5	SSW	17:56:39
2012/8/11	11:55:00	1.1	SSE	3.5	SSE	11:51:32
2012/8/12	9:40:00	0.8	SSE	3.5	SW	9:39:53
2012/8/12	9:50:00	1.3	SSE	3.5	SE	9:49:20
2012/8/12	10:10:00	1.2	SSE	3.5	SE	10:06:01

図 4A 花粉飛散割合 (栽培区内)

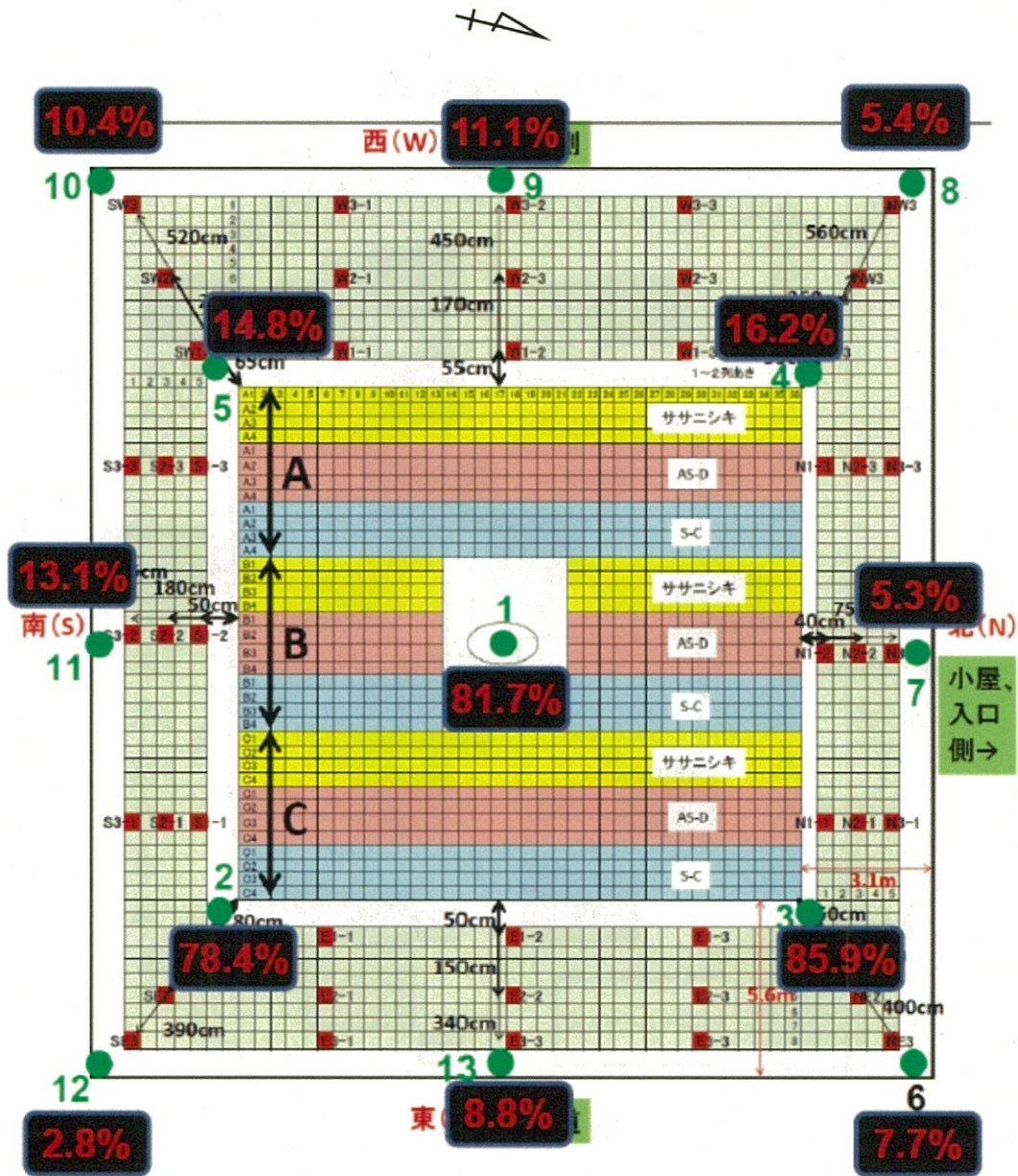
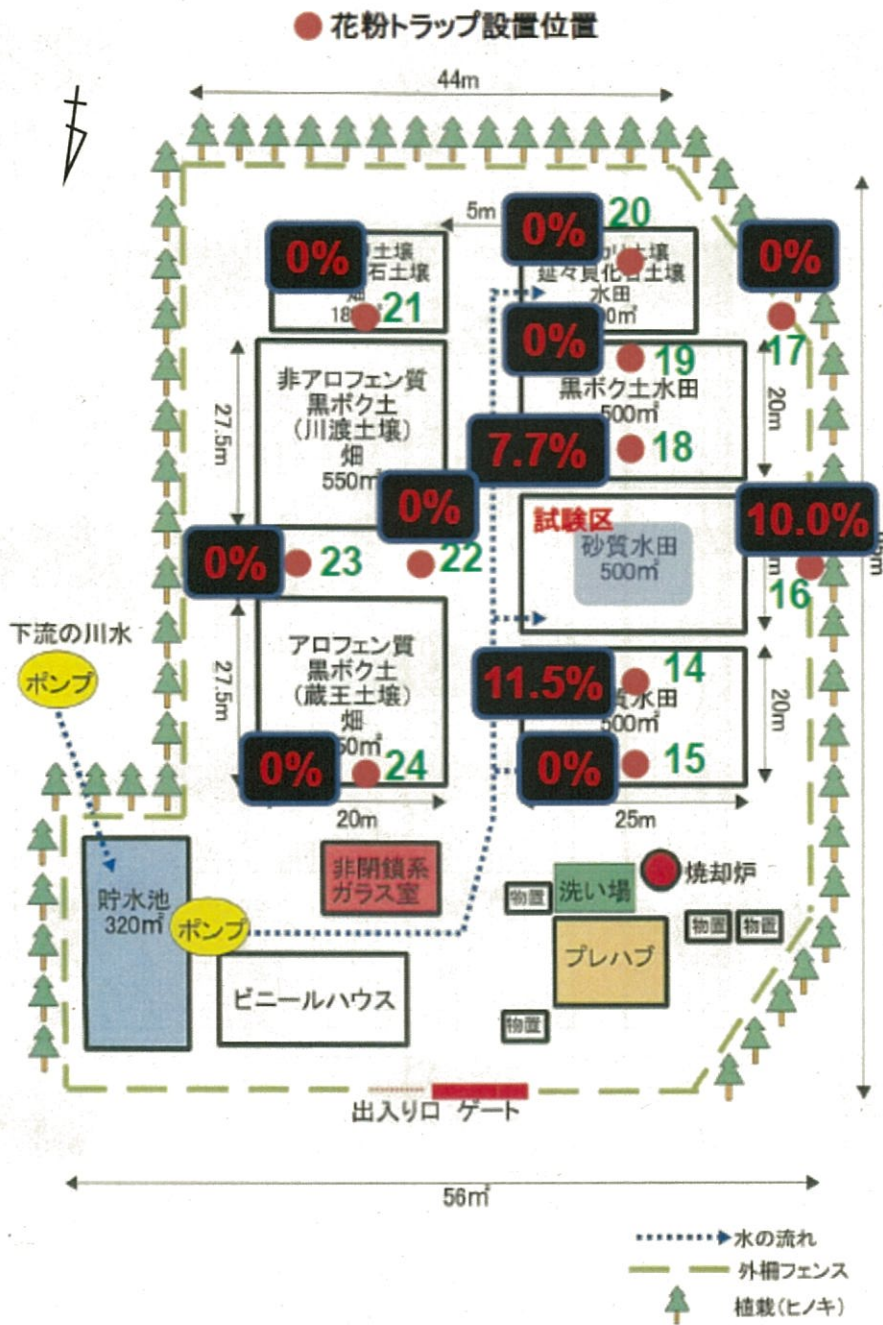


図 4B 花粉飛散割合 (栽培区画外・隔離圃場内)



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。

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2A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5参照）。

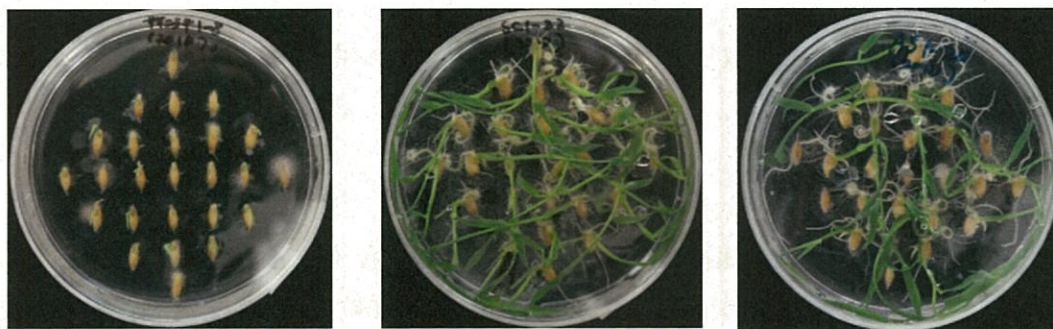
結果

ランダムに抽出した200粒を対象に検定したところ、全ての地点で交雑した種子は検出できなかった（表3）。

表 3

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	0/200	0	W1-1	0/200	0	S1-1	0/200	0	E1-1	0/200	0
N1-2	0/200	0	W1-2	0/200	0	S1-2	0/200	0	E1-2	0/200	0
N1-3	0/200	0	W1-3	0/200	0	S1-3	0/200	0	E1-3	0/200	0
N2-1	0/200	0	W2-1	0/200	0	S2-1	0/200	0	E2-1	0/200	0
N2-2	0/200	0	W2-2	0/200	0	S2-2	0/200	0	E2-2	0/200	0
N2-3	0/200	0	W2-3	0/200	0	S2-3	0/200	0	E2-3	0/200	0
N3-1	0/200	0	W3-1	0/200	0	S3-1	0/200	0	E3-1	0/200	0
N3-2	0/200	0	W3-2	0/200	0	S3-2	0/200	0	E3-2	0/200	0
N3-3	0/200	0	W3-3	0/200	0	S3-3	0/200	0	E3-3	0/200	0
NE-1	0/200	0	NW-1	0/200	0	SW-1	0/200	0	SE-1	0/200	0
NE-2	0/200	0	NW-2	0/200	0	SW-2	0/200	0	SE-2	0/200	0
NE-3	0/200	0	NW-3	0/200	0	SW-3	0/200	0	SE-3	0/200	0

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

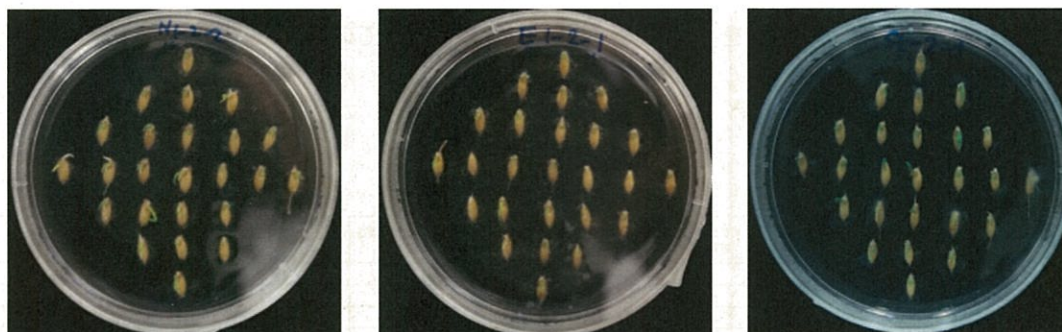


非組み換えイネ

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5 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。

鋤き込みして越冬した組換えイネの発芽力試験

【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 系統種子の鋤込みによる発芽力を調査するため。

【実験方法】

平成 23 年度の隔離圃場における栽培終了後、刈取った組換えイネ S-C 系統、AS-D 系統および非組換えイネ・ササニシキ、各々 5 株を株ごと隔離圃場内の一角に深さ約 1 m の溝を掘り、鋤込みを行った（平成 23 年 9 月 27 日）（図 1）。



図 1 鋤込まれている箇所の様子。図中の土の盛っている箇所の下方、地下約 1 m に鋤込んでいる。土盛りの左側の溝は、鋤込んだ場所と同じ深さの溝を作製した。

鋤込み後、鋤込んだ場所からイネが発芽してくるか否か観察を行った。その後、平成 24 年 5 月 9 日に鋤込んだ場所を掘り返し、種子を回収し、発芽試験を行った。なお、発芽試験は、回収した種子を乾燥後、50°C、3 日間の休眠打破処理を行った後、シャーレーに移して、種子を水に浸して 30°C で 3 日間放置した。その後、発芽した種子の数を調査した。

【結果】

鋤込みを行った平成 23 年 9 月 27 日から平成 24 年 5 月 9 日までの間、鋤込んだ箇所周辺からイネ個体の発芽は認められなかった。平成 24 年 5 月 9 日に回収した種子を観察したところ、大部分の種子にカビが付着し、腐敗していた（図 2）。また、回収した種子の発芽試験を行ったところ、非組換えイネ、組換えイネ S-C 系統、AS-D 系統ともに発芽した種子は認められなかった（図 3）。



図2 回収した組換えイネ S-C 系統の穂の様子



非組換えイネ

S-C系統

AS-D系統

図3 発芽試験の様子。吸水後 30°C で 3 日間放置した後の種子。発芽した種子は認められなかった。