

図 1-2. 組換え体(WKS82/130-4-1)の花及び花卉

次に宿主及び組換え体の花卉、葉及び根中に存在するアントシアニジン进行分析した。

[実験方法]

無作為に選んだ宿主及び組換え体の各 1 株より 0.5 g 分の花卉、葉及び根を採取し、凍結乾燥後、0.05 % TFA を含む 50 %アセトニトリルで抽出した。アントシアニジンは、前記抽出物のうち 0.025 g の花卉、葉あるいは根に相当する量を乾固し、0.2 ml の 6N 塩酸で 100℃、20 分間加水分解した後 0.2 ml の 1-ペンタノールで抽出することによって得た。得られたアントシアニジンを HPLC により分析した（分析回数は 3 回）。

[結果と結論]

結果を表 2 に示した。組換え体の花卉及び葉において宿主にはないデルフィニジンが検出された。一方、根においてデルフィニジンは検出されなかった。

表 2. 宿主及び組換え体の各部位におけるアントシアニジン分析

① 花卉におけるアントシアニジン分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
デルフィニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	0.0	55.8
シアニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	72.6	5.9
ペラルゴニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	0.0	0.0

② 葉におけるアントシアニジン分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
デルフィニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	0.0	5.7
シアニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	80.9	5.5
ペラルゴニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	0.0	0.0

③ 根におけるアントシアニジン分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
--	---------------	-------------------------

## 別添資料 4

デルフィニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	0.0	0.0
シアニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	2.7	9.5
ペラルゴニジン ( $\mu\text{g/g}$ )	0.0	0.0

さらに、宿主及び組換え体の花卉、葉及び根中に存在するその他フラボノイド色素であるフラボノールを分析した。

[実験方法]

無作為に選んだ宿主及び組換え体の各 1 株より 0.5 g 分の花卉、葉及び根を採取し、凍結乾燥後、0.1 % TFA を含む 50 %アセトニトリルで抽出した。フラボノールは、前記抽出物のうち 0.03 g の花卉、葉あるいは根に相当する量を乾固し、 $\beta$ -グルコシダーゼ及びナリンゲナーゼで 30℃、一晩処理した後、等量の 0.1%TFA を含む 90%アセトニトリルで抽出することによって得た。得られたフラボノールを HPLC により分析した (分析回数は 3 回)。

[結果と結論]

結果を表 3 に示した。組換え体の花卉及び葉において宿主にはないミリセチンが検出された。一方、根においてはいずれのフラボノールも検出されなかった。

表 3. 宿主及び組換え体の各部位におけるフラボノール分析

① 花卉におけるフラボノール分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
ミリセチン ( $\mu$ g/g)	0.0	920.0
ケルセチン ( $\mu$ g/g)	2791.0	157.0
ケンフェロール ( $\mu$ g/g)	95.0	4.0

② 葉におけるフラボノール分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
ミリセチン ( $\mu$ g/g)	0.0	387.0
ケルセチン ( $\mu$ g/g)	768.0	122.0
ケンフェロール ( $\mu$ g/g)	39.0	0.0

③ 根におけるフラボノール分析

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
--	---------------	-------------------------

## 別添資料 4

ミリセチン( $\mu$ g/g)	0.0	0.0
ケルセチン( $\mu$ g/g)	0.0	0.0
ケンフェロール( $\mu$ g/g)	0.0	0.0

## (2)形態及び生育特性の調査

### [目的]

宿主及び組換え体の生育特性として草丈、節数、開花時期について、形態特性として花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅について、その他特性として花の香りについて調査し、比較する。

### [実験方法]

平成 17 年 2～5 月にサントリー特定網室にて実施した。

特定網室内に定植した宿主及び組換え体について、草丈、節数、開花時期、花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅、花の香りを調査した。

なお、1 個体につき 1 茎あるいは 1 花について上記調査を行った。

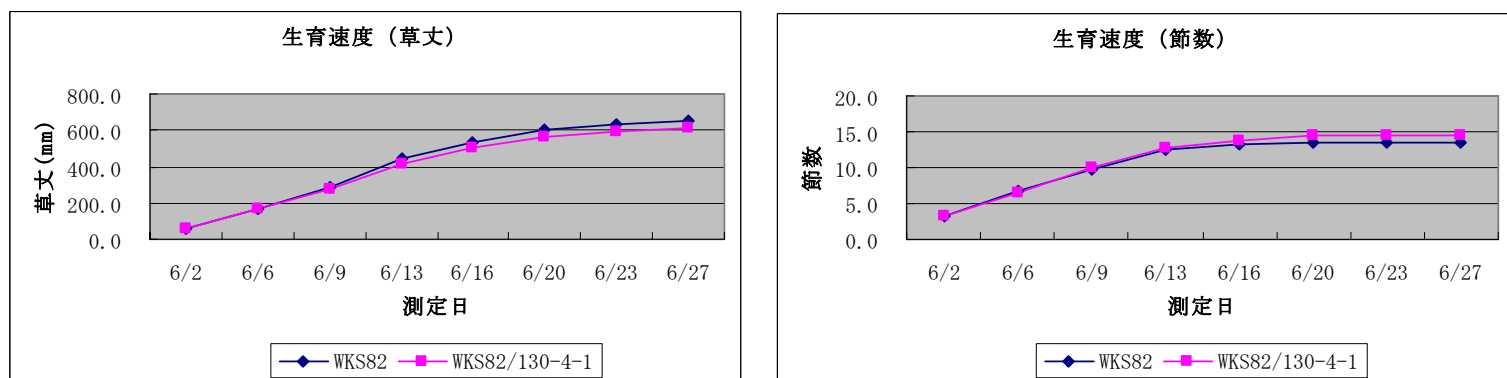
- 1) 草丈、節数:各系統 10 個体について、定植から約 3 ヶ月後に同時にピンチを行い、その後出芽した新芽について 1 週間に 2 回、草丈及び節数を測定した。
- 2) 開花時期:各系統 10 個体について、定植から約 3 ヶ月後に同時にピンチを行い、その後出芽した新芽より得られた花について開花日を測定した。なお、バラの品種登録で定められた開花状態となった日を開花日とし、最初に開花した個体の開花日を開花開始日、最後に開花した個体の開花日を開花終了日として開花時期を測定した。
- 3) 花の直径:各系統 10 個体の花の直径を測定した。
- 4) 花弁数:各系統 10 個体の花の花弁数を測定した。
- 5) 葯数:各系統 10 個体の花の葯数を測定した。
- 6) 葯長、葯幅;各系統 10 個体の花から葯を採取し、無作為に選んだ 20 個の葯の長さ と幅を測定した。
- 7) 花の香り:各系統の花 1 輪をサンプルバッグ(材質 PET)に封入して純空気を充填し、室温に 6 時間放置後のヘッドスペースガスを「島津におい識別装置 FF-2A(島津製作所)」にて測定し、においの違いを分析した(分析回数は 2 回)。

### [結果と結論]

#### イ. 草丈、節数

図 2 に宿主及び組換え体の草丈及び節数の経時変化を示した。宿主と組換え体間

で草丈及び節数の経時変化に統計的有意差(Student  $t$  検定、危険率 5%水準)は認められなかった。



※いずれも 10 茎の平均値をプロットしている。

図 2. 草丈及び節数の経時変化

ロ. 開花時期

結果を表 4 に示した。宿主と組換え体間で開花時期に差異は認められなかった。

表 4. 開花時期

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
開花時期	6/28~7/3	6/28~7/4

ハ. 花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅

結果を表 5 に示した。調査した形質のうち、花の直径、葯数、葯長、葯幅については、宿主と組換え体間で統計的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%水準)は認められなかった。しかし、花弁数においては宿主と組換え体間で統計的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%水準)が認められた。

表 5. 形態特性のまとめ

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
花の直径 (cm)	9.2 ± 0.8	8.6 ± 0.8
花弁数	33.2 ± 7.1	25.2 ± 2.9*
葯数	100.3 ± 24.0	116.3 ± 7.6



葯長 (mm)	3.8±0.2	3.9±0.2
葯幅 (mm)	1.8±0.0	1.9±0.1

\*: 宿主との間に統計的有意差あり

※いずれも 10 花の平均値を示している。

## ニ. 花の香り

結果を図 3 に示した。宿主及び組換え体間で花の香りに違いがあるかどうかについては、臭気寄与(単位: 臭気指数相当値)にて判断した。なお臭気寄与とは、においの質と強度の寄与具合を示したもので、「臭気指数 10」とはそのにおいを 10 倍に薄めると匂わなくなる程度の強さを示し、「臭気指数 20」は同 100 倍、「臭気指数 30」は同 1000 倍の強さを示す。この結果より、宿主と組換え体間で花の香りの質及び強さにおいて違いは認められなかった。

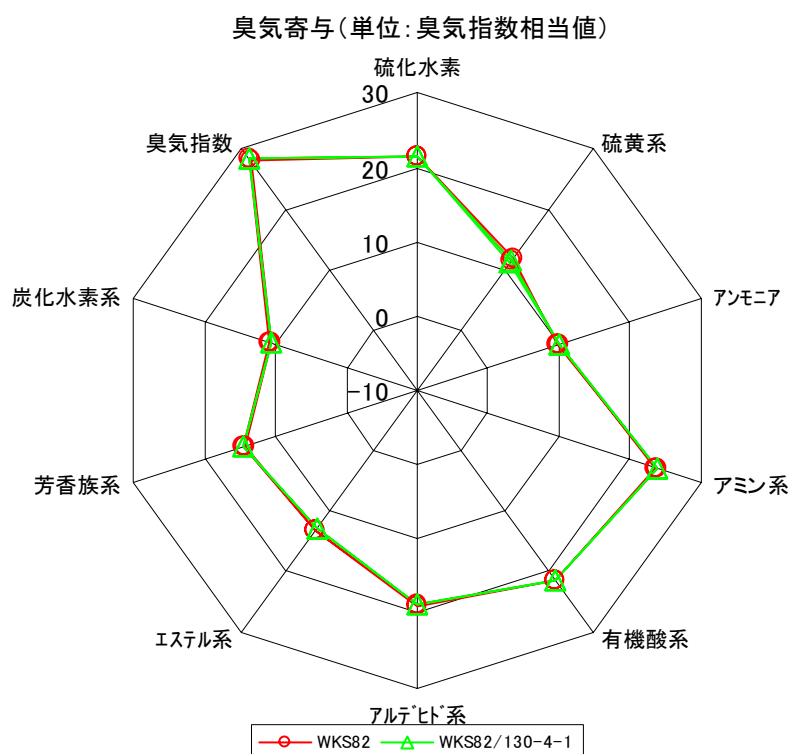


図 3. 島津におい分析装置における花の香りの比較

### (3) 生育初期における低温又は高温耐性の調査

#### [目的]

宿主及び組換え体の生育初期における低温又は高温耐性について調査し、比較する。

#### [実験方法]

宿主及び組換え体の幼苗(図4)を各10株ずつ、低温あるいは高温に設定した人工気象器(BIOTRON NC350、NK System)内で1ヶ月間栽培し、それぞれの新芽における生育速度を観察した。低温条件は5°C、3.5klx、昼間12時間、夜間12時間とし、高温条件は35°C、3.8klx、昼間14時間、夜間10時間とした。人工気象器内に設置後、2週間ごとにそれぞれ草丈を測定した。

#### [結果と結論]

結果を図5に示した。低温条件下、高温条件下ともに、宿主及び組換え体間で新芽の生育速度に統計的有意差(Student *t* 検定、危険率5%水準)は認められなかった。よって、低温耐性、高温耐性ともに宿主と組換え体間で差異はないと考えられた。

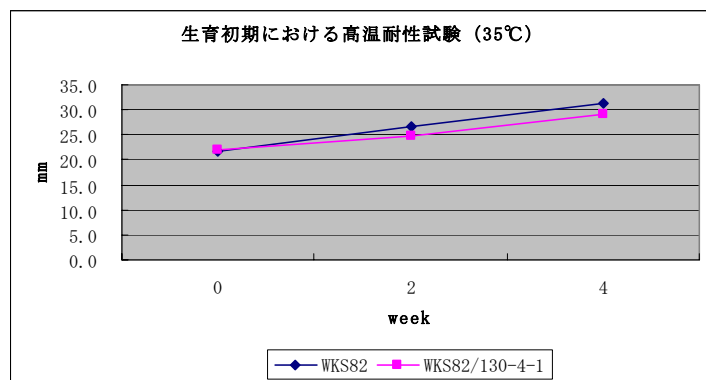
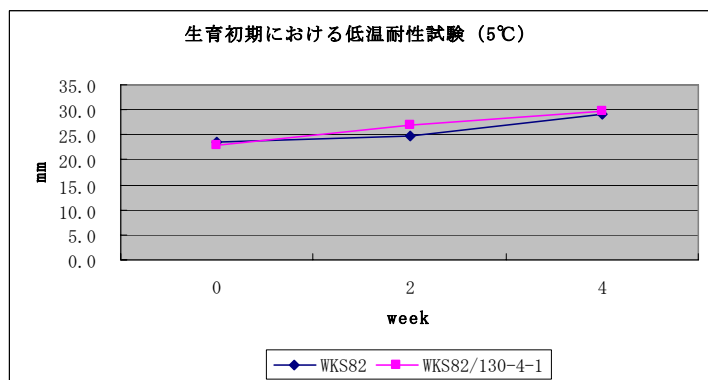
低温(5°C)



高温(35°C)



図 4. 低温又は高温耐性試験に使用した幼苗



※いずれも 10 芽の平均値をプロットしている。

図 5. 低温あるいは高温条件下における幼苗の生育速度

## (4) 生殖・繁殖特性の調査

## イ. 花粉の存在及び充実率

## [目的]

組換え体の花粉の有無及び充実率を調べ、宿主と比較することにより遺伝子導入による花粉形成への影響を調査する。

## [実験方法]

平成 17 年 6～7 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主、組換え体それぞれ 10 個体の花について肉眼にて葯の存在を確認した。ついで葯内部の花粉を取り出し、酢酸カーミンによって染色後、各個体 300 個の花粉について、実体顕微鏡 (LEICA MZFLIII) によりその充実度を観察した。

なお、1 個体につき 1 花について上記調査を行った。

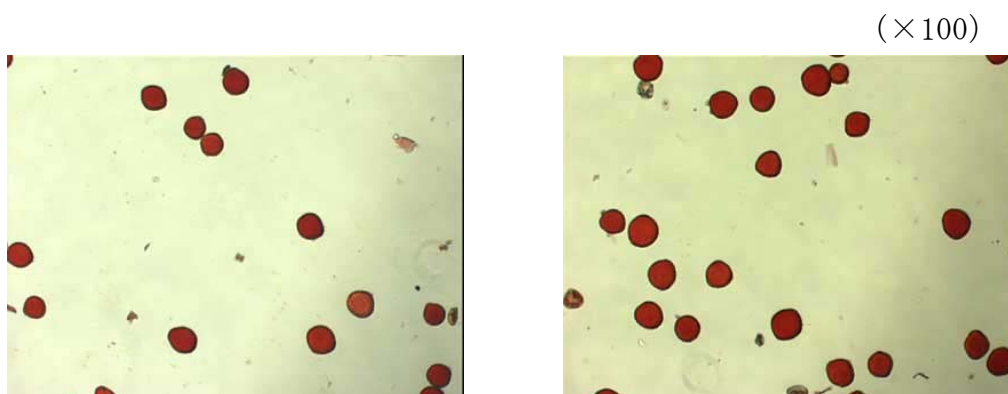
## [結果と結論]

結果を表 6 及び図 6 に示した。宿主及び組換え体ともに花粉の存在が認められた。さらに、宿主及び組換え体間で花粉の充実率に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

表 6. 花粉の存在率及び充実率

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
葯の存在率 (%)	100	100
花粉の充実率 (%)	81.3 ± 4.9	83.3 ± 3.8

※いずれも 10 花の平均値を示している。



宿主(WKS82)

組換え体(WKS82/130-4-1)

図 6. 宿主及び組換え体における花粉の染色

## ロ. 花粉の発芽

## [目的]

前項で宿主、組換え体ともに花粉の存在及び充実が認められたので、それらの花粉の発芽について調査する。

## [実験方法]

平成 17 年 6～7 月にサントリー特定網室にて実施した。

花粉の発芽を調査する培地としては、ほう酸培地(ショ糖濃度 10%、ほう酸濃度 50ppm、寒天濃度 1%)を用いた。宿主、組換え体それぞれ 10 個体の花より花粉を採取した。採取した花粉を培地に置床後、25℃で 2 時間培養し、各個体 100 個の花粉について実体顕微鏡(LEICA MZFLⅢ)により花粉管の伸長を観察した。

なお、1 個体につき 1 花について上記調査を行った。

## [結果と結論]

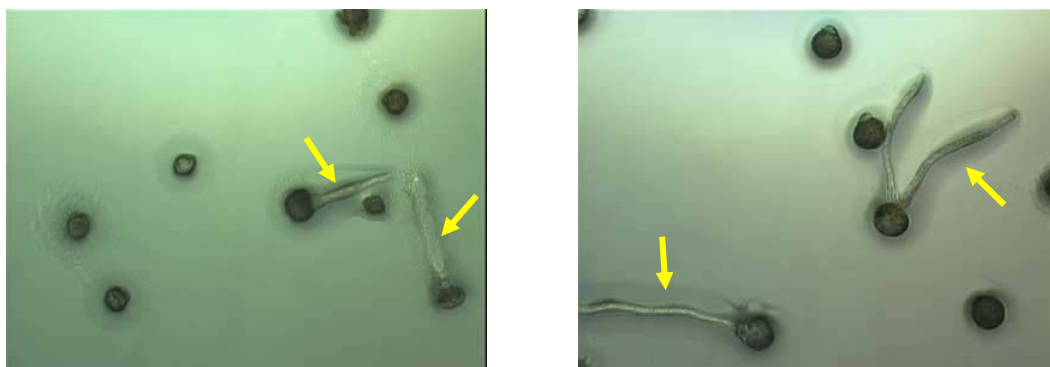
結果を表 7 及び図 7 に示した。宿主及び組換え体ともにほう酸培地上で花粉の発芽が認められた。宿主及び組換え体間で花粉の発芽率に統計的有意差(Student *t* 検定、危険率 5%水準)は認められなかった。

表 7. 花粉の発芽率

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
花粉の発芽率(%)	27.2±8.6	31.0±8.3

※いずれも 10 花の平均値を示している。

(×100)



宿主(WKS82)

組換え体(WKS82/130-4-1)

図 7. 宿主及び組換え体における花粉の発芽

## ハ. 花粉の形態

## [目的]

顕微鏡にて組換え体の花粉の形態を観察し、宿主と比較することにより遺伝子導入による花粉形態への影響を調査する。

## [実験方法]

平成 17 年 6～7 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主、組換え体それぞれ 10 個体の花より花粉を取り出し、各個体 20 個の花粉について大きさ(直径)を計測するとともに光学顕微鏡 (LEICA DM6000 B) にてその形態を観察した。

なお、1 個体につき 1 花について上記調査を行った。

## [結果と結論]

結果を表 8 及び図 8 に示した。宿主及び組換え体間で花粉の大きさに統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。また、形態にも違いは認められなかった。

表 8. 花粉の大きさ (計測花粉数: 各 200 個)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
花粉の直径 ( $\mu\text{m}$ )	47.3 $\pm$ 2.0	47.8 $\pm$ 1.1

※いずれも 10 花の平均値を示している。

(×200)



宿主(WKS82)



組換え体(WKS82/130-4-1)

図 8. 宿主及び組換え体における花粉の形態

## ニ. 切り花における送風による花粉飛散距離の測定

### [目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在が認められたので、送風によるそれらの花粉の飛散距離について調査する。

### [実験方法]

平成 17 年 5 月にサントリー閉鎖系温室にて実施した。

宿主及び組換え体から開花後数日を経た、葯の開裂が確認できた花を採取し、500ml 容フラスコにいけた(各 3 本)。花粉を捕捉するためにワセリンをスライドガラスに均一に塗り、フラスコを中心から 10cm 毎に 150cm 距離まで置いた(図 9、10)。固定した扇風機(風速 4m / 秒)でフラスコの後方 50cm の距離からスライドガラスの方向に風を送り、花粉を飛ばした。15 時間送風後、スライドガラスを回収し、ワセリンに捕捉された花粉の数を実体顕微鏡(LEICA MZFLIII)により観測した。

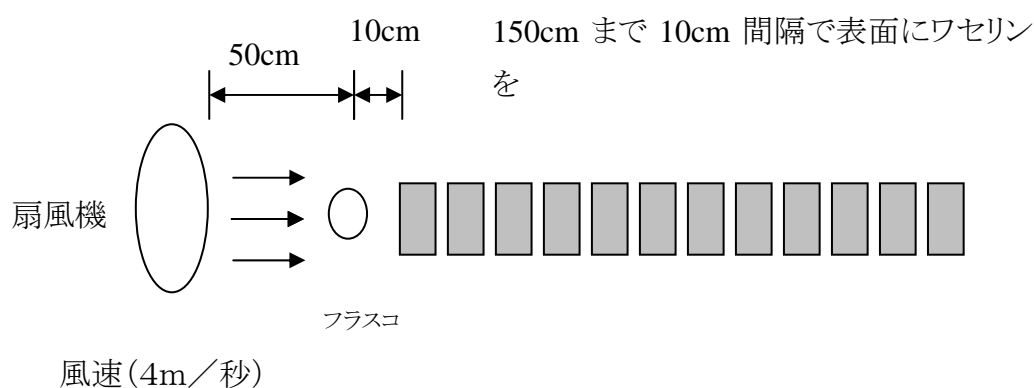


図 9. 切り花における送風による花粉飛散距離測定実験の概略図

### [結果と結論]

宿主、組換え体ともにいずれの距離においても送風による花粉の飛散は観察されなかった。





宿主 (WKS82)

組換え体 (WKS82/130-4-1)

図 10. 宿主及び組換え体の切り花における花粉飛散試験

### (5) 交雑性の調査

#### イ. 花粉の稔性

##### (イ) 園芸種との人工交配試験

###### [目的]

宿主、組換え体ともに花粉の存在及び発芽活性が認められたので、園芸種に対するこれらの花粉の稔性について調査する。

###### [実験方法]

平成 17 年 3~6 月にサントリー特定網室及び日本植生特定網室にて実施した。

常法に従い、園芸種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に宿主あるいは組換え体の花粉を付着させた。その後、他の花粉が付着しないように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した (図 11)。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケータ内で 1 日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。

交雑母本として、グランディ・フロラ系四季咲きバラ品種「クイーンエリザベス」、フロリバンダ系四季咲きバラ品種「ゴールドバニー」を用いた。

交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子 (パンジー-F3' 5' H 遺伝子) を検出した。

###### [結果と結論]

結果を表 9 に示した。結実率は、宿主及び組換え体間でほとんど差異は認められなかった。さらに組換え体との交配により得られた種子を解析した結果、これらの種子からは導入遺伝子は全く検出されなかった。このことから、花粉の受精能力については宿主と組換え体間で差異はないものの、組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子は後代に伝達されないことが示唆された。

表 9. 人工交配による園芸種との結実率及び導入遺伝子の検出率

## 別添資料 4

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-4-1)			
	結実数/交配花数	結実率 (%)	結実数/交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子検出種子数 / 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
クイーンエリザベス	19/20	95	19/20	95	0/94	0
ゴールドバニー	16/20	80	14/20	70	0/94	0



開花直前

除雄



袋か



結