

「 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果 」

[ 目次 ]

1. 概要	1
2. 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果	2
(1) 花色の調査	2
(2) 形態及び生育特性の調査	6
(3) 生育初期における低温又は高温耐性の調査	9
(4) 生殖・繁殖特性の調査	11
(5) 交雑性の調査	16
(6) 有害物質の産生性	23
(7) アグロバクテリウムの葉における残留性	26
(8) 閉鎖系温室並びに特定網室における試験結果のまとめ	27

## 「 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果 」

## 1. 概要

花の色のうち、赤から青、時には黄から橙の色は花卉細胞に含まれるアントシアニンと呼ばれるフラボノイドの配糖体に由来する 경우가ほとんどである。アントシアニンから糖を取り除いた基本骨格（アントシアニン）にはペラルゴニン、シアニン、デルフィニンの3種が知られている。花の色は、その花がどのアントシアニンを含むかでおおむね決定される。ペラルゴニンを含む花は橙色、シアニンを含む花は赤色、デルフィニンを含む花は紫から青色となることが多い。

バラには、ペラルゴニンを含む品種とシアニンを含む品種があるが、デルフィニンを含む品種は存在しない。これは、バラにはデルフィニンを生合成するために必要なフラボノイドのB環の5'位を水酸化するフラボノイド3',5'-水酸化酵素(F3'5'H)の遺伝子が存在しないためである。従って、バラには紫ないし青色の花色の品種は存在しない。

そこで、バラ(*Rosa hybrida*)にパンジー由来のF3'5'H遺伝子とトレニア由来のアントシアニン5-アシル基転移酵素遺伝子を導入することにより、花卉でデルフィニンを蓄積する、フラボノイド生合成経路を改変したバラを分子育種した。

今回はこれらの遺伝子を赤紫色のバラ品種「WKS82」（以下、宿主という）へ導入し、青紫色の花色をもつバラ「WKS82/130-4-1」（以下、組換え体という）が得られたので、平成16～17年にサントリー株式会社構内の閉鎖系温室（以下、サントリー閉鎖系温室という）及び特定網室（以下、サントリー特定網室という）、並びに日本植生株式会社福田下ほ場内の特定網室（以下、日本植生特定網室という）にて本組換え体について生物多様性影響評価を行った。

なお、今回得られた実験結果はすべて自根栽培によるものである。

（注：本資料の図表に記載された全ての情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。）

## 2. 閉鎖系温室並びに特定網室における試験の結果

## (1) 花色の調査

## [目的]

宿主及び組換え体の花卉の色について調査する。

## [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。

宿主、組換え体それぞれ 10 個体の花（各個体につき 1 花）から無作為に 2 枚（各個体より 2 枚ずつで合計 20 枚）の花弁を選んで、目視にて RHS カラーチャート番号を特定した。

## [結果と結論]

結果を表 1 に示した。これらの花色は栄養繁殖を繰り返しても青紫色で、安定的に保持されていた（図 1-2）。

表 1. 花卉の色

	宿主 (WKS82)		組換え体 (WKS82/130-4-1)	
プラスミド	—		pSPB130	
花の色	赤紫		薄青紫	
色グループ名	Purple group Greyed-Purple group		Purple group Violet group	
RHS カラーチャートの色番号	 75-B	5 花	 76-C	1 花
	 75-D	1 花	 84-B	4 花
	 186-D	4 花	 84-C	5 花

RHS : The Royal Horticultural Society



図 1-1. 宿主(WKS82)の花及び花弁



図 1-2. 組換え体(WKS82/130-4-1)の花及び花弁

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)
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弁、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 分の花弁、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 の花弁、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グナーゼで 30°C、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。組換え体の花弁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 花弁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)
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。

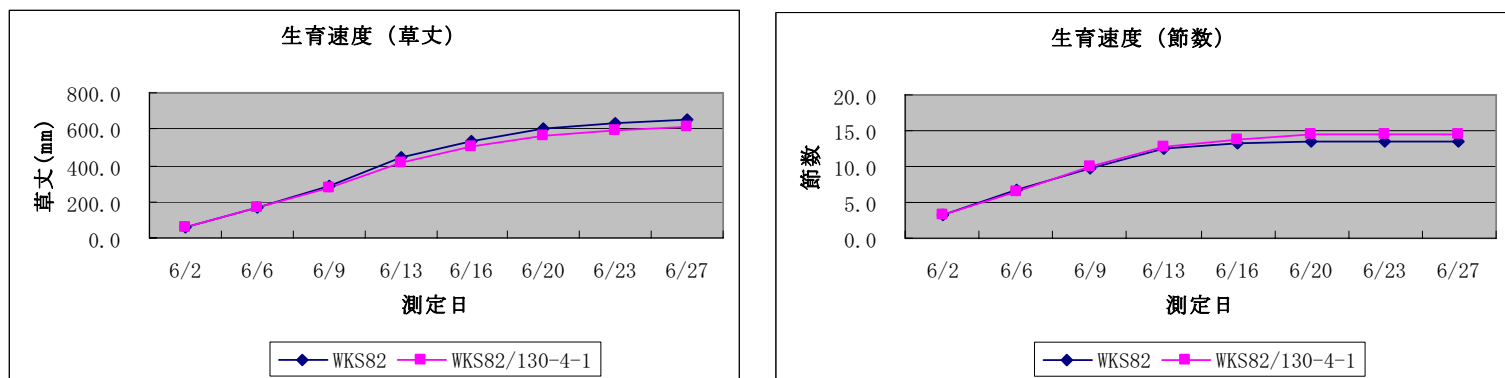
なお、1 個体につき 1 茎あるいは 1 花について上記調査を行った。

- 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 個の葯の長さと同幅を測定した。
- 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。



二. 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。

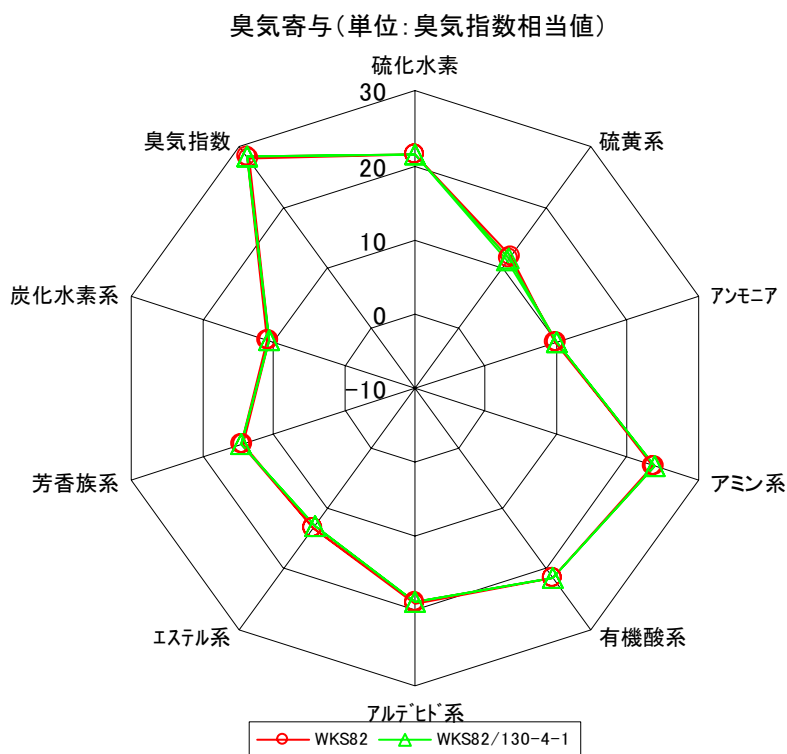


図3. 島津におい分析装置における花の香りの比較

## (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℃、3.5klx、昼間 12 時間、夜間 12 時間とし、高温条件は 35℃、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。

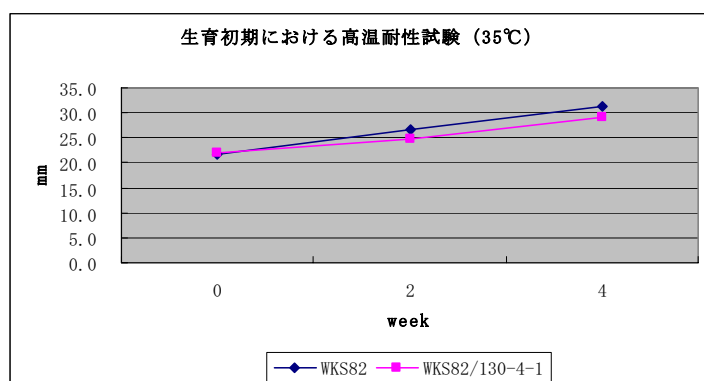
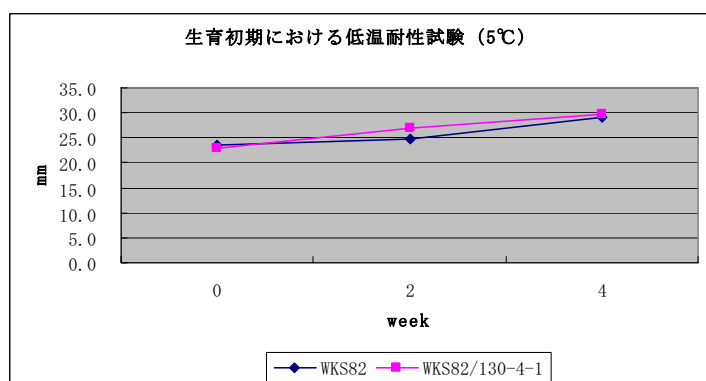
低温（5℃）



高温（35℃）



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。

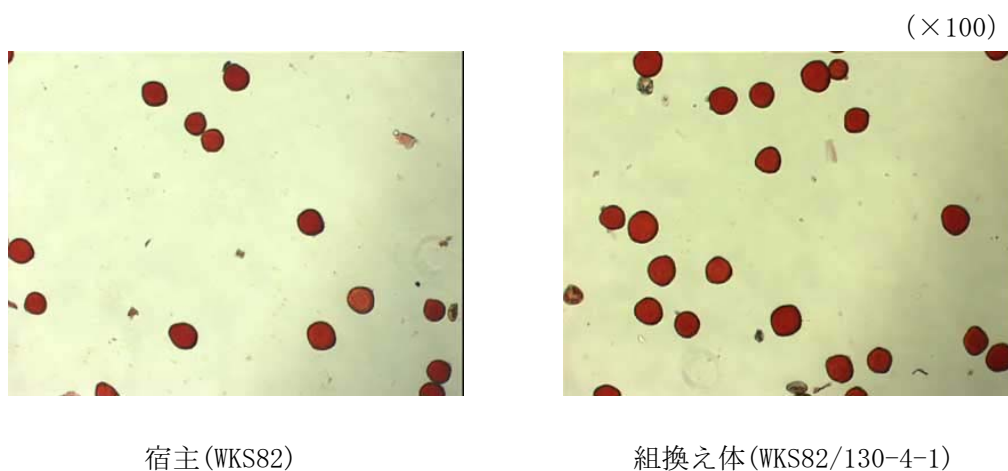


図 6. 宿主及び組換え体における花粉の染色

## 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（シヨ糖濃度 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。

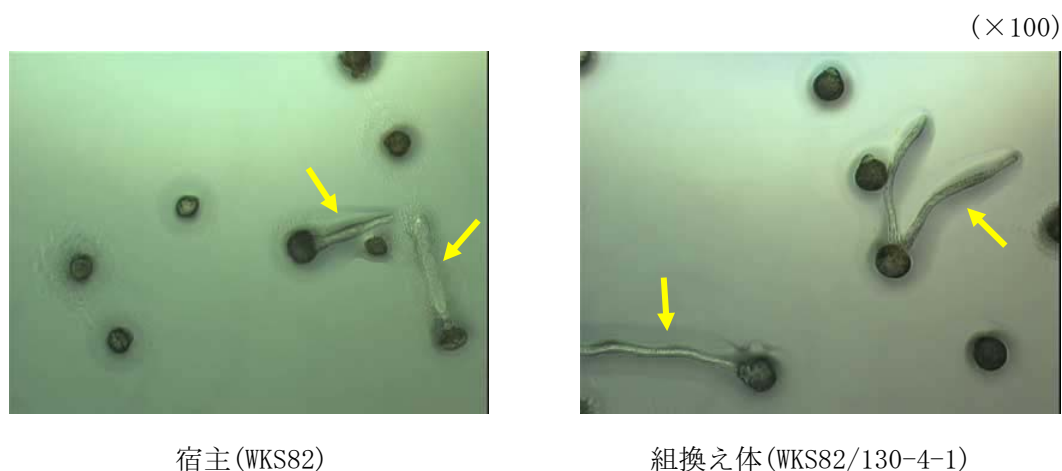


図 7. 宿主及び組換え体における花粉の発芽

## 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。

( $\times 200$ )



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。

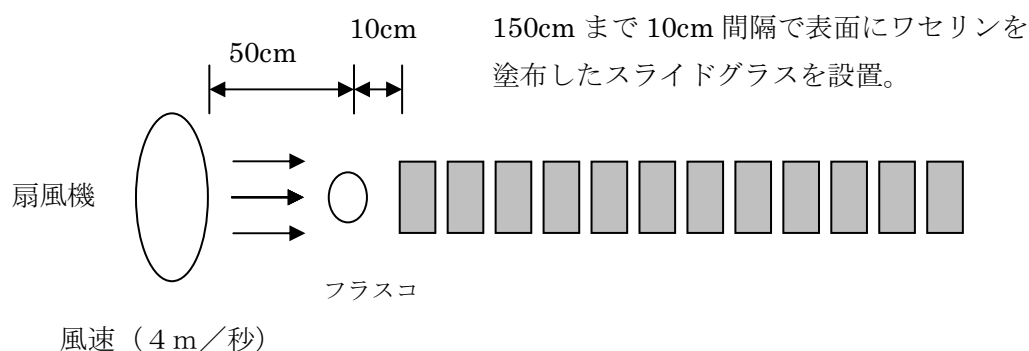


図 9. 切り花における送風による花粉飛散距離測定実験の概略図

### [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

	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



受粉



袋かけ



結実

図 11. 園芸種との人工交配試験

## (ロ) 野生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、野生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 3～5 月にサントリー特定網室にて実施した。

常法に従い、野生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 12)。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、野生種はノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray) を用いた。

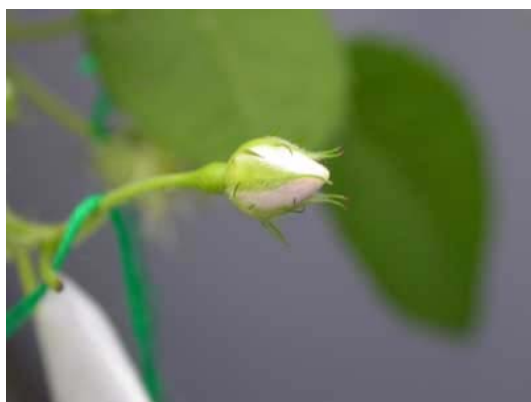
交配後 1 ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子より Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノム DNA を抽出し、さらに REPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR 法にて導入遺伝子 (パンジー-F3' 5' H 遺伝子) を検出した。

## [結果と結論]

結果を表 10 に示した。結実率は宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。さらに組換え体との交配により得られた種子を PCR にて解析した結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。今回得られた種子はノイバラの自殖によるもの、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであると考えられた。よって、本組換え体とノイバラ間での交雑は起こらない、あるいはたとえ交雑したとしても組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

表 10. 人工交配による野生種との結実率及び導入遺伝子の検出率

	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 (%)
ノイバラ	6/152	3.9	12/159	7.5	0/19	0



開花直前



除雄



受粉



袋かけ



結実

図 12. ノイバラとの人工交配試験

## (ハ) 野生種との放蜂による交雑試験

## [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、放蜂による野生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 4 月にサントリー閉鎖系温室にて実施した。

宿主あるいは組換え体とノイバラを約 1.5m 四方の網を張ったかごの中にクロマルハナバチ約 50 頭（ナチュポール・ブラック）とともに入れ、1 週間放飼し、クロマルハナバチによる宿主あるいは組換え体とノイバラとの受粉を行った（図 13）。なお、宿主及び組換え体は 2~3 花が開花した株、ノイバラは除雄は行わず、1 株につき 3~5 割が開花した株を本実験に用いた。

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。

また、AM10:00~PM3:00 の間ビデオ撮影を行い、クロマルハナバチの行動観察を行った。

## [結果と結論]

結果を表 11 に示した。ノイバラを交雑母本とする結実の有無を調査した結果、宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。さらに組換え体を花粉親とした掛け合わせにより得られた種子を PCR にて解析した結果、これら得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。本試験において、クロマルハナバチの行動観察も同時に行ったが、香りが強く、花弁数も少ないノイバラの花に集中的に群がり、ノイバラの花間を行き来することはあっても、宿主あるいは組換え体の花とノイバラの花間を行き来する個体はほとんど認められなかった。このことより、得られた種子は全てこれらクロマルハナバチの行動に伴い、ノイバラ自身の花粉が受粉することにより得られたノイバラの自殖種子、あるいは交雑したが、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであると考えられた。これらのことより、ハチの行動に伴う本組換え体とノイバラ間での交雑は起こらない、あるいはたとえ交雑したとしても組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

表 11. 放蜂による野生種との結実率及び導入遺伝子の検出率

	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 (%)
ノイバラ	9/350	2.6	14/141	9.9	0/25	0



図 13. ノイバラとの放蜂による交雑試験



## (6) 有害物質の産生性

## イ. 組換え体残渣が後作に与える影響

## [目的]

組換え体残渣を土壤中に鋤き込むことによるレタス種子の発芽阻害について宿主と比較し、組換え体残渣が種子発芽へ与える影響を調査する。

## [実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の葉 5g(3 個体から集めた葉をまとめた)をそれぞれ液体窒素中に置き、細かい粉末になるように粉碎した。この粉末をそれぞれ土壌 (100g、赤玉土 : BM-2 : キングパール=4 : 2 : 1) に混ぜた。レタス (*Lactuca sativa*) の種子を、葉の粉碎物を含む土壌を入れたポットに各 25 粒ずつ播種した。各試験区 5 ポットずつとし、合計 125 粒の種子を試験に供した。2 週間後、発芽率及び根を含めた実生の新鮮重を測定した。

## [結果と結論]

結果を表 12 に示した。宿主及び組換え体間で、レタス種子の発芽率と根を含めた実生の新鮮重に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

よって、植物体の残渣がレタス種子発芽に与える影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 12. レタス種子の発芽に対する葉の粉末鋤き込みの影響

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
発芽率 (%)	96.8±3.3	100
実生の平均新鮮重 (mg)	51.2±5.7	53.8±7.1

※いずれも 5 ポットの平均値を示している。



## ロ. 組換え体栽培土壌が後作に与える影響

## [目的]

組換え体栽培土壌におけるレタス種子の発芽阻害について宿主と比較し、組換え体栽培土壌が種子発芽へ与える影響を調査する。

## [実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の根の周辺の土を採取した。レタス (*Lactuca sativa*) の種子をこれらの土壌を入れたポットに 25 粒ずつ播種した。各試験区 5 ポットずつとし、合計 125 粒の種子を試験に供した。2 週間後、発芽率及び根を含めた実生の新鮮重を測定した。

## [結果と結論]

結果を表 13 に示した。宿主及び組換え体の栽培土壌間で、種子の発芽率と根を含めた実生の新鮮重に統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5%水準) は認められなかった。

よって、栽培土壌がレタス種子発芽に与える影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 13. レタス種子の発芽に対する栽培土壌の影響)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
発芽率 (%)	94.4 ± 5.4	96.8 ± 3.3
実生の平均新鮮重 (mg)	89.3 ± 6.5	93.3 ± 22.9

※いずれも 5 ポットの平均値を示している。

## ハ. 土壤微生物相に与える影響

## [目的]

組換え体を栽培した土壤中の微生物数を宿主と比較し、組換え体栽培による土壤微生物相への影響を調査する。

## [実験方法]

平成 17 年 4 月にサントリー特定網室にて実施した。

宿主及び組換え体の栽培土壤中の微生物数を測定した。測定は常法に従い希釈塗布法を用いた。すなわち、採取土壌をよく混和した後、その 30g を秤量し、270ml の生理食塩水とともに 500ml 容三角フラスコ内で振盪した。振盪後、直ちに生理食塩水を用いて  $10^1$  から  $10^4$  倍希釈液を作成し、各希釈液 0.1ml を直径 9cm シャーレの寒天培地上に塗布した。これとは別に、30g の土壌を  $80^\circ\text{C}$  で 24 時間通風乾燥して土壌の含水率を測定した。細菌数測定用培地として、トリプチケースソイ寒天培地 (TSA) を使用し、 $28^\circ\text{C}$ 、3 日間培養後のコロニー数を計測した。真菌数の測定は、ジャガイモ・グルコース寒天培地 (PDA) を使用し、 $25^\circ\text{C}$ 、3 日間培養後のコロニー数を計測した。放線菌測定用培地として、イースト・スターチ寒天培 (YS) を使用し、 $30^\circ\text{C}$ 、6 日間培養後のコロニー数を計測した。いずれの測定にも各試験区培地 5 枚を使用した。得られた結果はすべて乾土 1g 当たりに換算して表示した。

## [結果と結論]

結果を表 14 に示した。細菌、真菌、放線菌のいずれの微生物数についても宿主及び組み換え体栽培土壌間で統計的有意差 (Student *t* 検定、危険率 5% 水準) は認められなかった。

よって、栽培による土壤微生物相への影響は宿主及び組換え体間で差異はないと考えられた。

表 14. 栽培土壌中の土壤微生物数 (cfu/g 乾土)

	宿主 (WKS82)	組換え体 (WKS82/130-4-1)
細菌数 ( $\times 10^6$ )	5.81 $\pm$ 1.46	4.94 $\pm$ 1.74
真菌数 ( $\times 10^3$ )	1.95 $\pm$ 0.11	1.85 $\pm$ 0.33
放線菌数 ( $\times 10^4$ )	2.97 $\pm$ 1.46	2.60 $\pm$ 0.74

※いずれも 5 枚の平均値を示している。

(7) アグロバクテリウムの葉における残留性

[目的]

組換え体におけるアグロバクテリウムの残留の有無を調査する。

[実験方法]

宿主及び組換え体それぞれ 3 個体より採取した 0.04~0.24 g の葉を MM300 (キアゲン) を用いて液体窒素中で軽く破碎した後、2 倍量の滅菌水を加え懸濁し、2 時間以上静置した。この液を YEB 培地に塗布し、28℃で 3 日間培養した。

YEB 培地の組成は、酵母エキス (5g/l)、ペプトン (1g/l)、ショ糖 (1g/l)、硫酸マグネシウム (0.5 g/l)、肉エキス (5 g/l)、寒天 (20 g/l) である。バイナリーベクターを含むアグロバクテリウム以外を除くために抗生物質のリファンピシン (20 mg/l)、テトラサイクリン (20 mg/l) を加えた。

[結果と結論]

宿主及び組換え体由来の抽出物どちらにおいても YEB 培地で生育するコロニーは観察されなかった。従って、組換え体におけるアグロバクテリウムの残留はないと判断した。

## (8) 閉鎖系温室並びに特定網室における試験結果のまとめ

1. 赤紫色のバラ品種「WKS82」に、パンジー由来の F3' 5' H 遺伝子とトレニア由来のアントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子を導入することにより青紫色を呈するバラを作出した。この花色は栄養増殖を繰り返しても安定していた。
2. 花弁、葉及び根中の色素を分析した結果、組換え体の花弁及び葉において宿主にはないデルフィニジン及びミリセチンが検出された。
3. サザン解析及び PCR 解析の結果、導入遺伝子は花弁、葉、茎のゲノム中に組み込まれていることが確認された。
4. 草丈及び節数の経時変化を調査した結果、宿主及び組換え体間で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。また、開花時期についても差異は認められなかった。
5. 形態特性について調査した結果、花の直径、葯数、葯長、葯幅においては宿主及び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、花弁数において宿主及び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。
6. 花の香りについて島津におい分析装置にて分析した結果、宿主及び組換え体間で花の香りの質及び強度において違いは認められなかった。
7. 生育初期における低温・高温耐性を調査した結果、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。
8. 花粉は宿主及び組換え体ともに観察された。花粉の充実率、発芽率において宿主及び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。
9. 花粉の大きさは、宿主及び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。また、形態にも差異は認められなかった。
10. 花粉は宿主及び組換え体ともに観察されたが、送風による花粉の飛散はともに認められなかった。
11. 宿主及び組換え体の園芸種に対する交雑率を人工交配により調査した結果、宿主及び組換え体間で結実率にほとんど差異は認められなかった。さらに、得られた種子を解析したところ導入遺伝子は全く検出されなかった。
12. 宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率を人工交配により調査した結果、宿主及び組換え体のいずれにおいても結実率は極めて低く、これらわずかに得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。
13. 宿主及び組換え体の野生種に対する交雑率を放蜂により調査した結果、宿主及び組換え体のいずれにおいても結実率は極めて低く、これらわずかに得られた種子において組換え体由来の導入遺伝子は全く検出されなかった。

14. 宿主及び組換え体の植物体の鋤き込み試験によるレタス種子の発芽への影響については、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。
15. 宿主及び組換え体の植物体の栽培土壌が後作に与える影響については、宿主及び組換え体の栽培土壌間で差異は認められなかった。
16. 土壌微生物数については、宿主及び組換え体間で差異は認められなかった。
17. 組換え体におけるアグロバクテリウムの残留は認められなかった。

「隔離ほ場試験及び栽培条件検討試験のための隔離ほ場利用計画」

日本植生株式会社隔離ほ場  
組換え体利用に関する実験従事者及び業務安全委員会委員  
(平成 17 年度)

実験従事者

個人名・所属は個人情報につき非開示

安全委員会  
(場内委員)

個人名・所属は個人情報につき非開示

(場外委員)

個人名・所属は個人情報につき非開示

(事務局)

個人名・所属は個人情報につき非開示

表 1. フラボノイド生合成経路を改変したバラ WKS82/130-4-1 の生物多様性影響評価における調査項目の概要

調査項目	特定網 室試験	隔離ほ 場試験	調査方法	結果の概要
1. 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性並びに染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	○  ●		サザン解析により解析した。  移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性を調査予定。	移入された配列は組換え体ゲノム中、4 箇所に存在すると予測された。
2. 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的及び生態学的特性について、自然条件下での個体間及び世代間での形質発現の安定性	○  ●		ノザン解析により解析した。  移入された核酸の複製物の複数世代における形質発現の安定性を調査予定。	移入された遺伝子は組換え体ゲノム中で安定的に発現していた。
3. キメラ解析	●  ●		分子生物学的手法による移入された核酸の組換え体における挿入器官の特定及び栄養増殖による個体間におけるその安定性を調査予定。  自殖後代における移入された核酸の伝達の有無を調査予定。	
4. 花色の安定性	○	●	目視による観察、カラーチャートとの比較により調査した。  隔離ほ場における花色の安定性を調査予定。	組換え体の花色は薄青紫色で安定していた。
5. 形態の特性	○	●	花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅を調査した。  隔離ほ場における形態特性を調査予定。	宿主と組換え体間で花弁数において統計的有意差が認められた。



6. 生育の特性	○	●	草丈、節数、開花時期を調査した。 隔離ほ場における生育特性を調査予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
7. 生育初期における低温及び高温耐性	○		生育初期における低温及び高温耐性について人工気象器を用いて調査した。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
8. 成体の越冬性又は越夏性		●	成体の越冬性、越夏性を調査予定。	
9. 花粉の稔性	○	●	酢酸カーミン染色により花粉の生存を調査した。花粉発芽培地における花粉発芽の有無を調査した。 隔離ほ場における花粉の稔性を調査予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
10. 花粉のサイズ	○	●	花粉のサイズを顕微鏡下で観察した。 隔離ほ場における花粉のサイズを調査予定。	宿主と組換え体間で差異は認められなかった。
11. 種子の生産量	●		種子の生産量を調査予定。	
12. 種子の休眠性及び発芽率	●		種子の休眠性及び発芽率を調査予定。	

<p>13. 交雑率</p>	<p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>●</p> <p>●</p>	<p>○</p> <p>○</p> <p>○</p> <p>●</p> <p>●</p> <p>●</p>	<p>人工交配による園芸種との交雑性を調査した。</p> <p>人工交配による野生種との交雑性を調査した</p> <p>放蜂による野生種との交雑性を調査した。</p> <p>人工交配による園芸種との交雑性を調査予定。</p> <p>人工交配による野生種との交雑性を調査予定。</p> <p>隔離ほ場における自然条件下での野生種との交雑性を調査予定。</p>	<p>宿主と組換え体間で結実率にほとんど差異は認められず、組換え体との交雑種子において導入遺伝子は検出されなかった。</p> <p>宿主、組換え体ともに結実率は極めて低く、交雑も認められなかった。</p> <p>宿主、組換え体ともに結実率は極めて低く、交雑も認められなかった。</p>
<p>14. 有害物質の産生性</p> <p>鋤き込み試験</p> <p>後作試験</p> <p>土壌微生物相試験</p>	<p>○</p> <p>○</p> <p>○</p>	<p>○</p> <p>●</p> <p>○</p> <p>●</p> <p>○</p> <p>●</p>	<p>植物残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響について調査した。</p> <p>隔離ほ場における植物残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響について調査する。</p> <p>植物栽培周辺土壌における種子の発芽への影響について調査した。</p> <p>隔離ほ場における植物栽培周辺土壌における種子の発芽への影響について調査する。</p> <p>植物栽培土壌中の土壌微生物相を希釈平板法により調査した。</p> <p>隔離ほ場における植物栽培土壌中の土壌微生物相を希釈平板法により調査する。</p>	<p>宿主と組換え体間で差異は認められなかった。</p> <p>宿主と組換え体間で差異は認められなかった。</p> <p>宿主と組換え体間で差異は認められなかった。</p>

15. アグロバクテリウムの残存性	○		植物体を摩砕し、希釈平板法によりアグロバクテリウムの残存性を調査した。	組換え体におけるアグロバクテリウムの残存は認められなかった。
16. 訪花昆虫相		●	隔離ほ場における訪花昆虫を観察、調査予定。	
17. 周辺生物相	○	●	隔離ほ場周辺の生物相を調査した。 隔離ほ場周辺の生物相を調査予定。	隔離ほ場周辺の野生種を特定した。

○：実施済み、●：未実施

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

## 隔離ほ場利用計画

隔離ほ場での遺伝子組換えバラ生物多様性影響評価試験の研究調査項目として、次の9項目を検討している。

- (1) 花色の安定性に関する調査
- (2) 形態及び生育特性に関する調査
- (3) 生殖に関する調査
- (4) 交雑性に関する調査
- (5) 種子に関する調査
- (6) 越冬性、越夏性に関する調査
- (7) 有害物質の産生性に関する調査
- (8) 訪花昆虫相の調査
- (9) 周辺生物相の調査

それぞれの項目についての実験計画は以下のとおりである。

### (1) 花色の安定性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの花色の安定性を調査する。

実施時期：平成18年4月から平成18年12月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室C及び屋外A

実施方法：目視、カラーチャート、フラボノイド分析により花色の安定性を調査する。

### (2) 形態及び生育特性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの形態、生育特性について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成18年4月から平成18年12月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室C及び屋外A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラをビニール温室C及び屋外Aで栽培し、生育速度、開花時期、花の直径、花弁数、葯数、葯長、葯幅、花の香りについて調査し、比較する。

### (3) 生殖に関する調査

#### (3) - 1 花粉の充実率及び発芽率の調査

目的：遺伝子組換えバラの花粉の充実率及び発芽率について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 18 年 12 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 C 及び屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラから花粉を採取し、酢酸カーミン染色により花粉の充実率を、花粉発芽培地により花粉の発芽率を調査し、比較する。

### (3) - 2 花粉の大きさ及び形態の調査

目的：遺伝子組換えバラの花粉の大きさ及び形態について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 18 年 12 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 C 及び屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラから花粉を採取し、光学顕微鏡にてその大きさ及び形態を観察し、比較する。

### (4) 交雑性に関する調査

#### (4) - 1 人工交配による園芸種との交雑性の調査

目的：遺伝子組換えバラと園芸種との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：ビニール温室 D 及び屋外 A で栽培した宿主及び遺伝子組換えバラから花粉を採集し、特定網室において人工交配により園芸種（クイーンエリザベス、ゴールドバニー）との交雑性を調査する。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて導入遺伝子の存在の有無を確かめる。さらに、導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

#### (4) - 2 人工交配による野生種との交雑性の調査①

目的：遺伝子組換えバラと野生種（ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス）との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：ビニール温室 D 及び屋外 A で栽培した宿主及び遺伝子組換えバラ（いずれも 4 倍体）から花粉を採集し、特定網室において人工交配により野生種との交雑性を調査する。野生種は、日本に自生し、かつ今日の園芸種の作出に利用されたとされるノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス（いずれも 2 倍体）を用いる。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて本組換え体に特有な遺伝子を増幅する、あるいはフローサイトメトリーを用いて倍数性を調査することにより、交雑の有無を確

認する。交雑が認められた場合、さらに導入遺伝子の存在の有無を確認する。導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

#### (4) - 3 人工交配による野生種との交雑性の調査②

目的：遺伝子組換えバラと野生種（オオタカネバラ）との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：ビニール温室 D 及び屋外 A で栽培した宿主及び遺伝子組換えバラ（いずれも 4 倍体）から花粉を採集し、特定網室において人工交配により野生種（オオタカネバラ）との交雑性を調査する。日本に自生する野生種のほとんどは 2 倍体であるが、オオタカネバラは 4 倍体から 8 倍体まで存在するとされ、倍数性という観点からはオオタカネバラと宿主及び遺伝子組換えバラが交雑する可能性は他の野生種に比べて高いことが考えられる。よって、本試験は野生種にオオタカネバラを用いて実施する。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて本組換え体に特有な遺伝子を増幅し、交雑の有無を確認する。交雑が認められた場合、さらに導入遺伝子の存在の有無を確認する。導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

#### (4) - 4 自然条件下における野生種との交雑性の調査

目的：自然条件下における遺伝子組換えバラと野生種との交雑性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：隔離ほ場内の屋外 B

実施方法：屋外 B において、宿主及び遺伝子組換えバラから 1m、5m の距離に野生種（ノイバラ）を配置（図 2、6 参照）し、自然条件下での野生種との交雑性を調査する。ただし、本試験はこれらが同時期に開花している条件の下で実施する。日本に自生する野生種のうち、ノイバラは国内において最も広く分布し、かつ今日の園芸種の作出に利用された。よって、本試験は野生種にノイバラを用いて実施する。これらに結実が認められた場合、得られた種子を回収後播種し、組換え体との交配により得られた個体について PCR 等の方法を用いて本組換え体に特有な遺伝子を増幅する、あるいはフローサイトメトリーを用いて倍数性を調査することにより、交雑の有無を確認する。交雑が認められた場合、さらに導入遺伝子の存在の有無を確認する。導入遺伝子の存在が認められた場合、これら後代の個体における花粉の稔性等の調査を行う。

(5) 種子に関する調査

目的：(4) の交配試験により得られた種子について調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 22 年 12 月まで

場所：特定網室

実施方法：(4) の交配試験により得られた種子を採取し、種子の生産量、休眠性、発芽率について調査し、宿主と比較する。

(6) 越冬性、越夏性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの越冬性、越夏性を、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 10 月から平成 19 年 4 月まで（越冬性）、平成 18 年 6 月から平成 18 年 12 月まで（越夏性）

場所：人工気象器内あるいは隔離ほ場の屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラを人工気象器内あるいは隔離ほ場の屋外 A で栽培し、冬期間あるいは夏期間における植物体地上部の状態を観察し、宿主と比較する。

(7) 有害物質の産生性に関する調査

目的：遺伝子組換えバラの有害物質の産生性を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 19 年 4 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 D 及び屋外 A

実施方法：宿主及び遺伝子組換えバラの残渣を土壌中に鋤き込むことによる種子の発芽への影響を調査する。宿主及び遺伝子組換えバラの植物栽培土壌が種子発芽へ与える影響及び微生物に与える影響を調査する。

(8) 訪花昆虫相の調査

目的：遺伝子組換えバラへの訪花昆虫相を調査し、宿主と比較する。

実施時期：平成 18 年 4 月から平成 18 年 12 月まで

場所：隔離ほ場のビニール温室 C 及び屋外 A

実施方法：晴天微風日を選び、午前 10 時から午後 3 時までの約 5 時間、宿主及び遺伝子組換えバラに訪花する昆虫の採集と行動観察を行い、訪花昆虫の同定を行う。ビニール温室 C での栽培区については、ビニール温室の出入り口を開放し、同様の方法で訪花昆虫相の調査を行う。

(9) 周辺生物相の調査

目的：隔離ほ場周辺の生物相を調査し、遺伝子組換えバラと交雑可能な植物種の存

在を把握する。

実施期間：平成 18 年 4 月から平成 18 年 7 月まで

場所：隔離ほ場周辺

実施方法：隔離ほ場の周囲に存在する植物を採取し、分類同定する。さらに、隔離ほ場から 1km の圏内におけるバラ科の植物の存在を把握する。



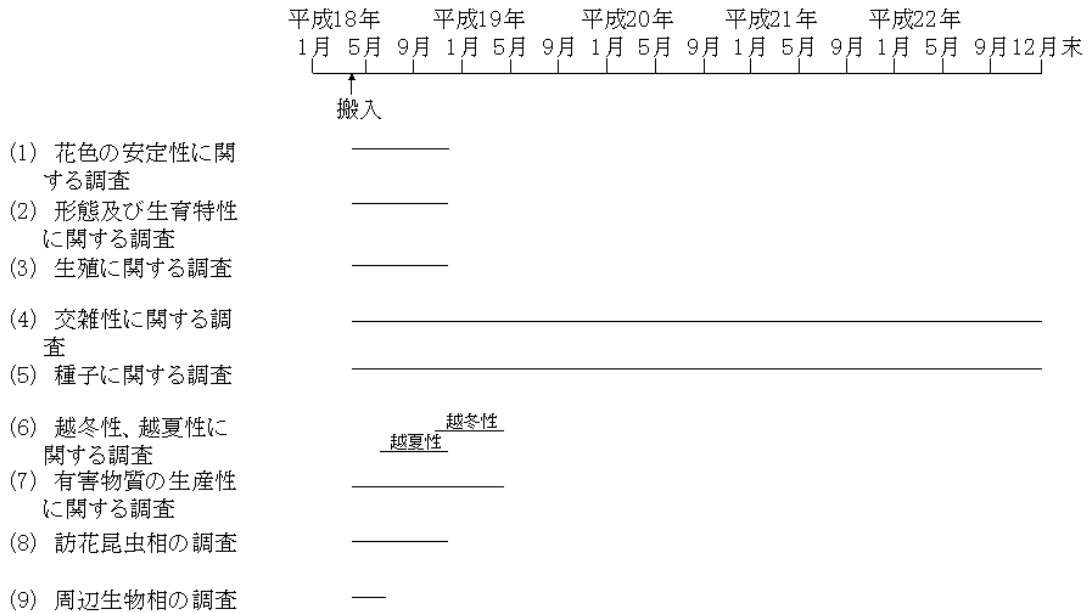


図 1. 調査項目および調査時期

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

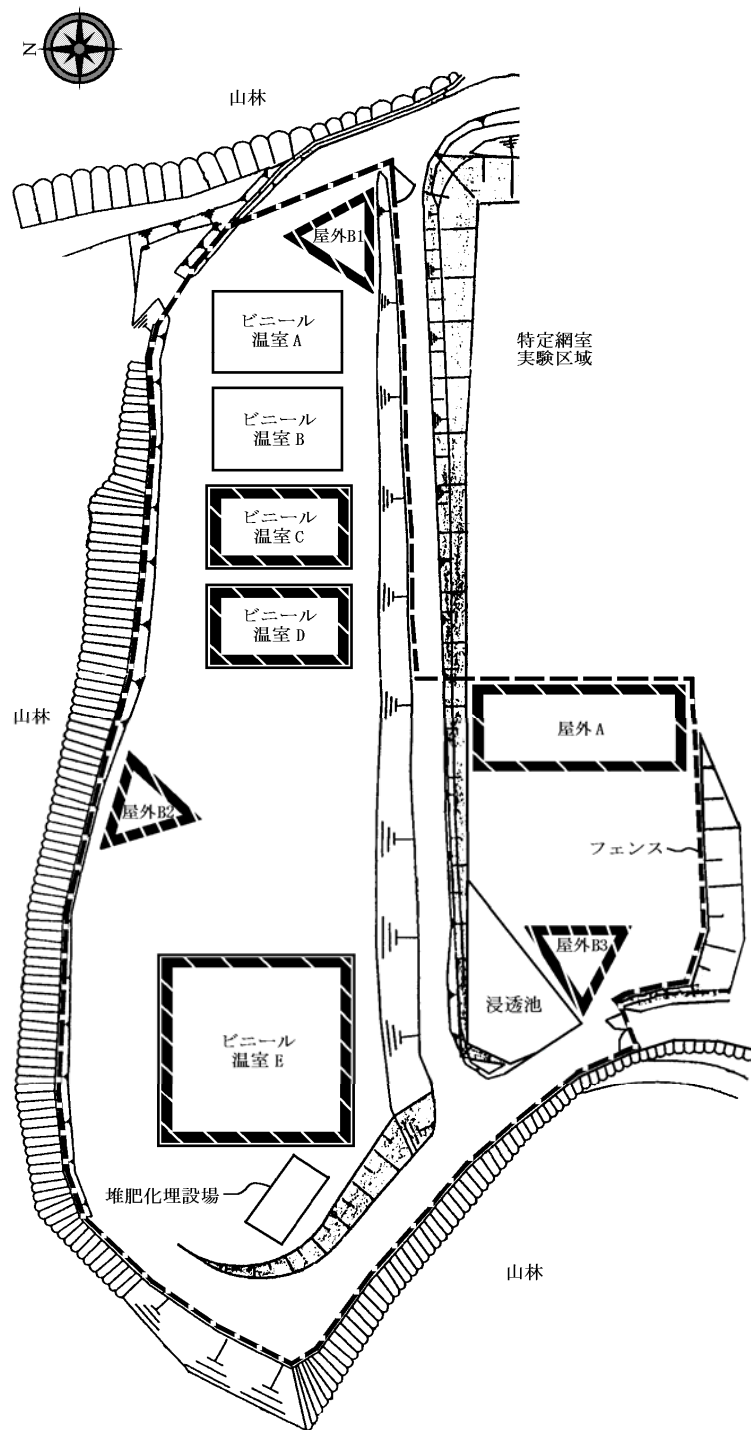


図 2. 日本植生株式会社隔離ほ場全体図

(  は本実験に使用する区画)

※ビニール温室A、Bに交雑試験に用いる園芸種を保管する。

※野外B1-B2、B2-B3、B1-B3間の距離はそれぞれ45m、35m、50mである。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

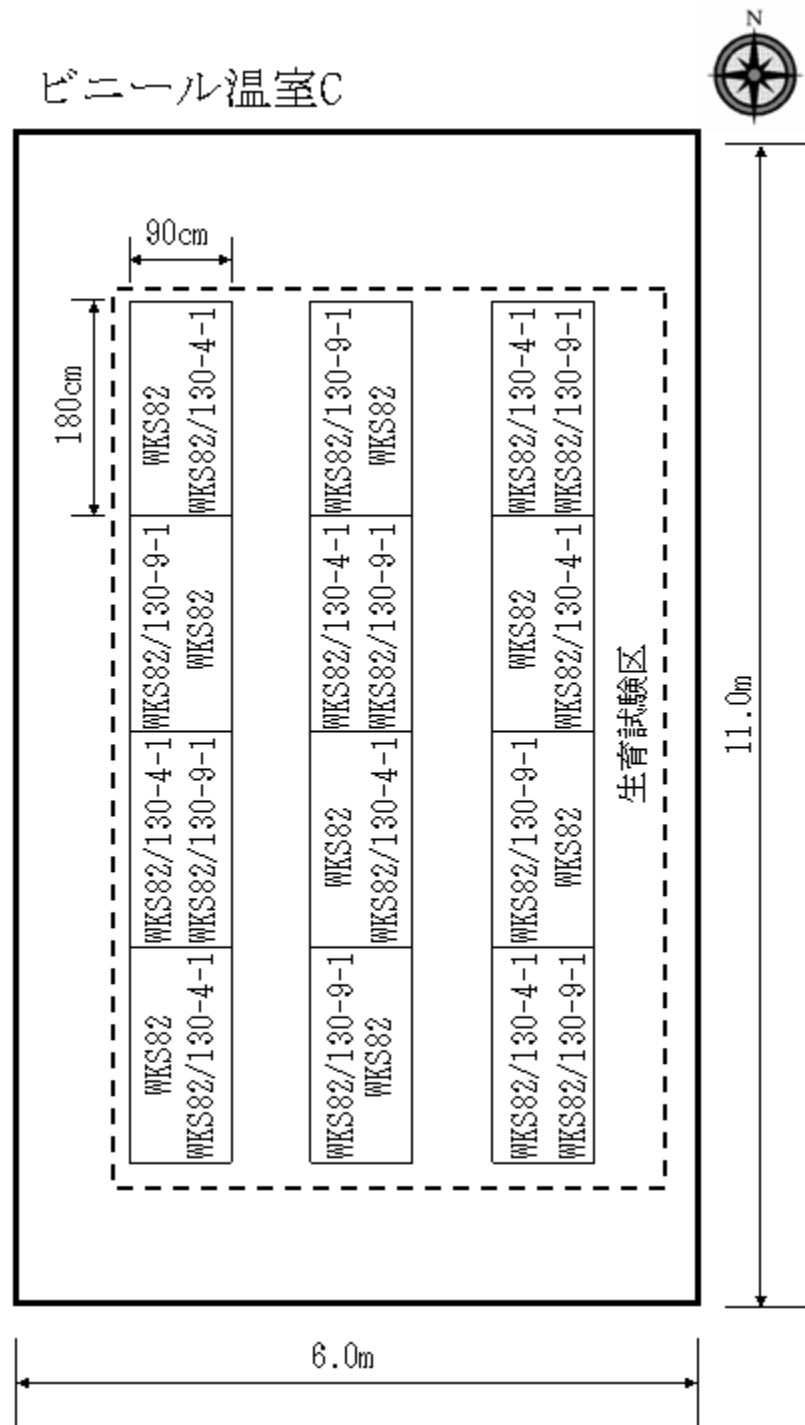


図3. 隔離ほ場試験（ビニール温室C）のバラ配置図

※WKS82/130-9-1は本申請には含まれない。

（注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。）

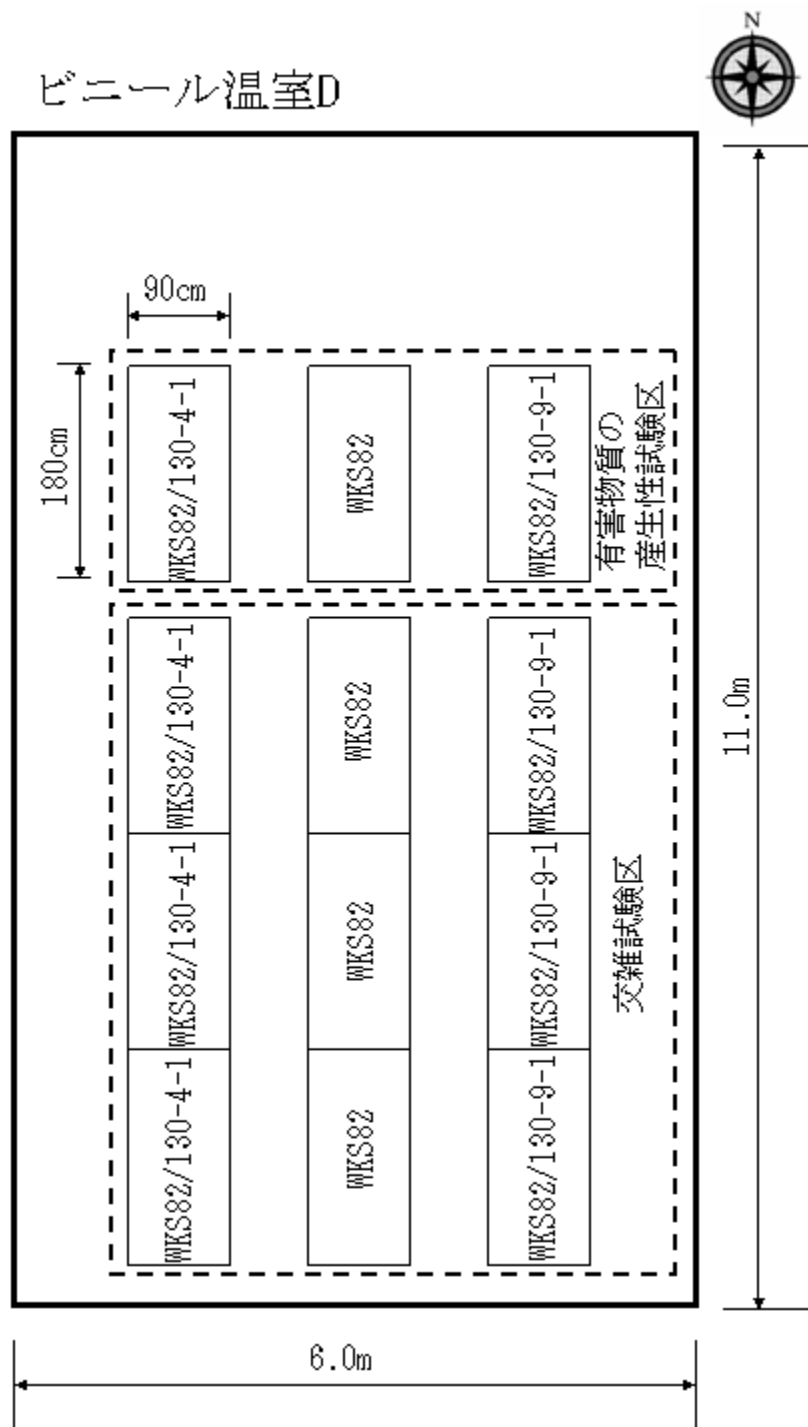


図4. 隔離ほ場試験（ビニール温室D）のバラ配置図

※WKS82/130-9-1は本申請には含まれない。

（注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。）

屋外A

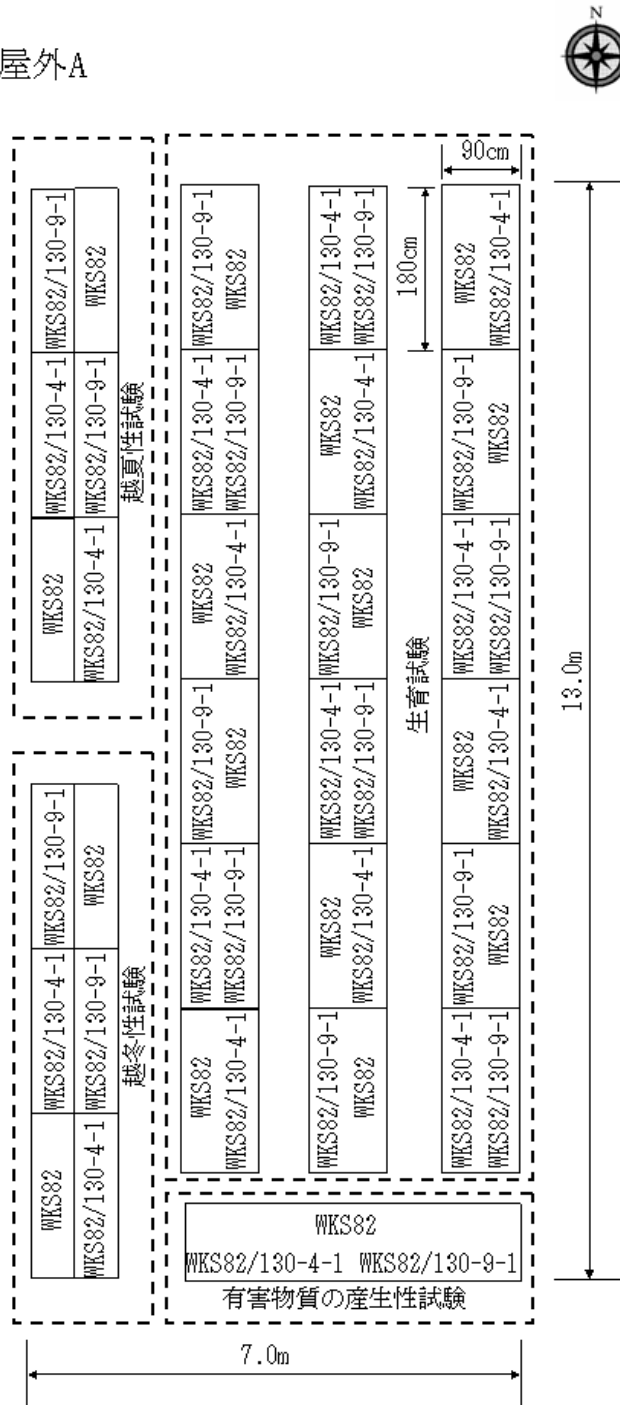


図5. 隔離ほ場試験（屋外A）のバラ配置図

※WKS82/130-9-1 は本申請には含まれない。

（注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。）

## 屋外B1、B2、B3

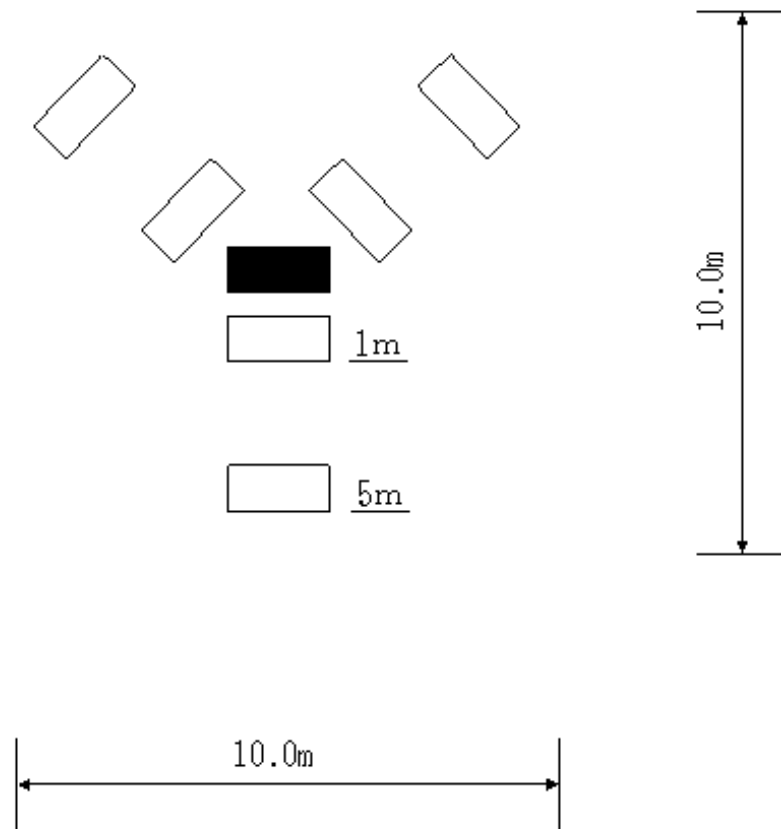
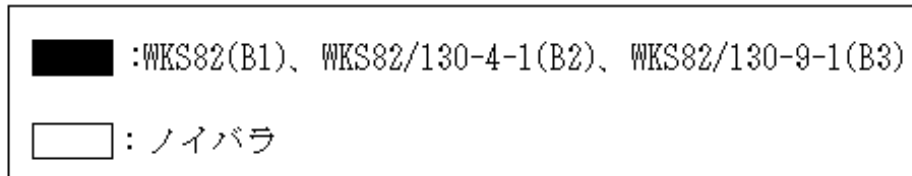


図6. 隔離ほ場試験（屋外B1、B2、B3）のバラ配置図  
※WKS82/130-9-1 は本申請には含まれない。  
（注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。）

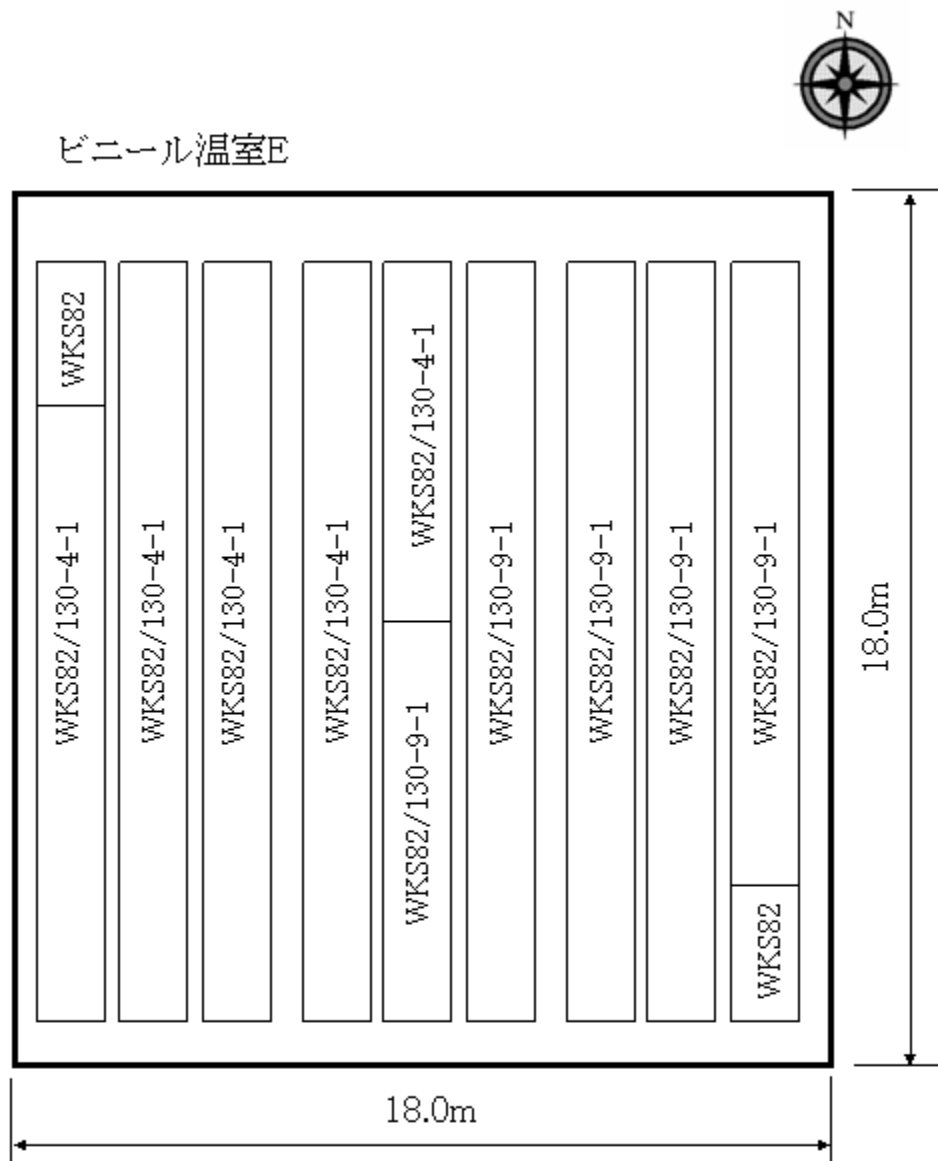


図7. 栽培条件検討試験(ビニール温室E)のバラ配置図

※遺伝子組換えバラの生産に向けて栽培方法を確立するため、当該温室にて栽培条件の検討を行う。

※WKS82/130-9-1は本申請には含まれない。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

「 国外における使用等により得られた情報 」

[ 目次 ]

1. オーストラリアにおける組換えバラ輸入許可書類	1
2. アメリカにおけるWKS82/130-4-1 輸入許可書類	3



1. オーストラリアにおける組換えバラ輸入許可書類

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

[18209 ON XH/XLS] 01:11 DEB 10, 10/11

AQIS

**AUSTRALIAN QUARANTINE AND INSPECTION SERVICE**  
**DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY**

*Quarantine Act 1908 Sect. 13*

**Permit to Import Quarantine Material**

Phone: 02 6072 5037  
Fax: 02 6072 3745  
File Ref:

Permit: 200405067 Valid From: 14 Oct 2003 Valid To: 14 Oct 2005 Page 1 of 2

Importer	Exporter
Florigene Limited 16 Gipps Street Collingwood VIC 3066 Attn: ██████████	Suntory Ltd 1-1-1 Wakayamadai Shimamoto-Cho Mishima-Gun Osaka 618 Japan

**You are authorised to import the following material under the listed conditions**  
*Note: This permit covers AQIS quarantine requirements only.*  
 All imports may be subject to quarantine inspection on arrival to determine compliance with the listed permit conditions and freedom from contamination. Imports not in compliance or not appropriately identified or packaged and labelled in accordance with the import conditions they represent may be subject to seizure, treatment, re-export or destruction at the importer's expense.  
 Additionally, all foods imported into Australia must comply with the provisions of the Imported Food Control Act 1992, and may be inspected and/or analysed against the requirements of the Australia New Zealand Food Standards Code.  
 All imports containing or derived from Genetically Modified material must comply with the Gene Technology Act 2000.

It is the importer's responsibility to identify, and to ensure it has complied with, all requirements of any other regulatory organisations and advisory bodies prior to and after importation including the Australian Customs Service, Therapeutic Goods Administration, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Department of the Environment and Heritage, Food Standards Australia New Zealand and any State agencies such as Departments of Agriculture and Health and Environmental Protection authorities.

Importers should note that this list is not exhaustive.

Import conditions are subject to change at the discretion of the Director of Quarantine. This permit may be revoked without notice.

Commodity Name	Condition Number(s)	Country	End Use
Genetically modified tissue cultures (Petunia hybrida, Rosa x hybrida and Torenia fournieri tissue cultures)	PC0600	Japan	In-vitro

**Conditions**    **Condition Text**

**PC0600**    This Permit allows for the importation of Petunia hybrida, Rosa x hybrida and Torenia fournieri tissue cultures for in-vitro analysis to be used in accordance with the Office of the Gene Technology Regulator (OGTR) Notifiable Low Risk Dealing (NLRD) 09 - Anthocyanins.

1. The issuance of this permit does not imply compliance with the requirements of any other government organisation/s or regulatory bodies (eg OGTR, APVMA FSANZ, etc).
2. A Quarantine Entry must be lodged for all consignments.
3. The importer must confirm all arrangements with AQIS for the arrival inspections.

This permit is printed subject to the condition that fees determined under Section 86E of the Quarantine Act 1908 are paid to the Commonwealth Government.

Authorising Officer (for Director of Quarantine)  
**Printed Name** Margaret Allan

**Date** 17 Mar 2004

100

SKYED064 1XOH-NIYD

17122174 2 19- XVA 10:11 10, 10/11

Permit: **200405067**

Page 2 of 2

**Condition: Condition Text**

4. Transport receptacles must be sterile and rigid; and must be of a visually clear construction to allow inspection of the cultures and media.
5. Growth media must be clear, sterile and not liquid; and it must have been introduced into the containers prior to tissue implantation and growth.
6. Material and growth media must be free from disease symptoms and other extraneous contamination.
7. Growth media must not contain antibiotics or other microbial suppressants.
8. Transport receptacles must be labelled with the botanical name of the plants and the genetic modification.
9. Airfreight or mail shipments should have all documentation (eg. permit or permit number, invoice, manufacturer's declarations and certification where applicable) securely attached to the outside of the package and clearly marked "Attention Quarantine". Alternatively, necessary documentation will need to be presented to AQIS at the time of clearance.
10. All work with the imported plant material, subsequent plant material and any progeny is to be conducted in accordance with the Institutional Biosafety Committee and the OGTR's requirements for the proposed genetic manipulation work.
11. The importer is responsible for payment of all associated AQIS fees and charges.
12. Material must be presented to AQIS on arrival for inspection.
13. All cultures including their growth media must be visually inspected on arrival for signs of fungal and/or bacterial contamination.
14. Contaminated cultures are not to be released from quarantine. If the consignment is contaminated, the importer must be notified and given the option of re-export, destruction or having the contamination identified at their expense.
15. If all of the above conditions are met the material may be released from quarantine to be used in accordance with the relevant OGTR's NLRD regulations. Any proposed release of these species into the environment must also be conducted in accordance with OGTR regulations.
16. On release from quarantine all imported material must be held and used at an OGTR approved PC2 glasshouse and shall not be removed from these premises until a full risk assessment and risk management plan has been developed by OGTR in accordance with the Gene Technology Act 2001.

**End of Condition Text**

Authorising Officer (for Director of Quarantine)  
**Printed Name** Margaret Allan **Date** 17 Mar 2004

2. アメリカにおける WKS82/130-4-1 輸入許可書類

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

