

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ

5 (*gat4621, zm-hra, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)

(DP-098140-6, OECD UI: DP-098140-6) の

隔離ほ場における栽培試験報告書

10

平成 21 年 3 月

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所

15 社団法人農林水産先端技術産業振興センター

デュポン株式会社

## I 目的

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (*gat4621*, *zm-hra*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP-098140-6, OECD UI: DP-098140-6) (以下、本組換えトウモロコシと表記) を隔離ほ場で栽培し、形態や生育の特性、生殖特性及び有害物質の産生性等について調査することにより、本組換えトウモロコシの我が国における生物多様性影響評価をするため、本試験を実施した。

## 10 II 材料及び試験条件

### 1. 供試材料

試験には、本組換えトウモロコシの BC1S1xPH1CA 世代を供試した。なお、対照の非組換えトウモロコシとして、本組換えトウモロコシの育成過程で挿入遺伝子の分離によって生じた Null 系統に、自殖系統 PH1CA をかけ合わせて得られた世代 BC1S1xPH1CA null (以下、非組換えトウモロコシと表記) を供試した。また、花粉源として、商用品種のセシリアを配置した (図 1)。

本組換えトウモロコシに導入した遺伝子は、*gat4621* (除草剤グリホサート耐性を付与) と、*zm-hra* (アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を付与) である。

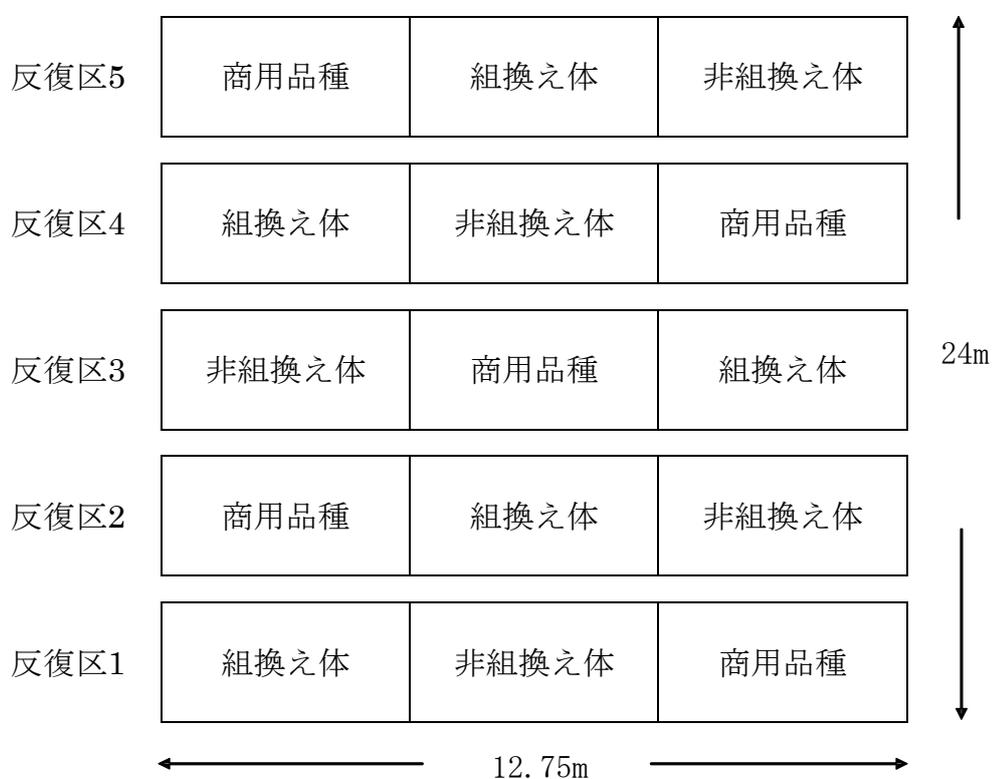
GAT4621 蛋白質は、除草剤グリホサートの NH 基をアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変える。その結果、植物に除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。ZM-HRA 蛋白質は除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けず、本阻害剤の存在下でも酵素活性を示し、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸が合成されるので、植物に除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する。

### 2. 試験区の場所、設計及び栽培管理

本試験は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 (那須) 敷地内の組換え体隔離ほ場 (栃木県那須塩原市千本松 768) で行った。

(1) 試験区の設計

5 試験区は、1プロットを4条 x 10株（条間75cm、株間40cm）とし、本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ及び商用品種セシリアの3品種を1組1反復として5反復で図1のように配置した（それぞれ、合計200個体）。また、本試験では、組換えトウモロコシからの花粉飛散防止のため、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの除雄を行った。そのため、花粉供給源として、商用品種セシリアを試験区及び外周に配置した。なお、商用品種は除雄を行わな  
10 かった。



15 図1 試験区配置図

## (2) 栽培管理

平成 19 年 5 月 31 日に隔離ほ場にトウモロコシ種子を 1 点 3 粒播種し、3 葉期（第 3 葉のカラー（葉身と葉鞘の境界）が見えるようになった段階）～4 葉期（第 4 葉のカラーが見えるようになった段階）に達した 6 月 25 日に 1 本立てにした。開花前に、組換えトウモロコシからの花粉飛散防止のため、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの除雄を行った。収穫は 10 月 4 日に行った。病虫害及び雑草防除管理履歴を以下に示した。

10	5 月 31 日	除草剤ロロックス	全面散布	(253g/10a)
	6 月 8 日	殺虫剤ダイアジノン粒剤	筋撒き	(5.05kg/10a)
	6 月 27 日	除草剤プリグロックス L	畝間処理	(353ml/10a)
	7 月 13 日	除草剤プリグロックス L	畝間処理	(404ml/10a)
	8 月 2 日	殺虫剤ダイアジノン粒剤	筋撒き	(7.58kg/10a)
15	8 月 7 日	殺虫剤モスピラン	筋撒き	(7.58kg/10a)

## III 試験結果

### 1. 遺伝子組換え農作物の形態及び生育特性等

20

#### 1-1. 形態及び生育特性

##### (1) 方法

25

評価は、農林水産省によるトウモロコシの特性分類調査基準を参考に、播種日、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、草型、分けつ数、成熟期、粒色、粒形、稈長、着雌穂高、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、百粒重、地上部生体重の計 19 項目について調査した。各項目の調査個体数は、過去の経験から、統計学的有意差を検出するのに十分な数とした。統計処理が可能な項目については、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t-検定を行った。

30

##### (2) 結果

調査した 19 項目すべてにおいて本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で相違あるいは統計学的な有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。このことから、本試験において調査した本組換えトウモロコシの形態及び生育特性は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

35

## 1－2．生育初期における低温耐性

### (1) 方法

5

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの収穫種子を1プロットあたり10粒ポットに播種した。温室で栽培し、発芽後に1ポット3本立てとした。植物体を3～4葉期まで温室で育成し、冬季の組換え体隔離ほ場内（試験時平均気温4℃、平均最低気温-1℃）で栽培し、7、14、19日目に目視により、低温による障害程度をポットごとに7段階で評価した。試験は、ほ場における1プロットを1反復とする5反復で行い、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間でt検定を行った。

10

### (2) 結果

15

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの植物体はともに低温処理19日目には枯死し、両者間で低温処理における障害程度に統計学的有意差( $P<0.05$ )は認められなかった。このことから、本組換えトウモロコシの生育初期における低温耐性は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

20

## 1－3．成体の越冬性

### (1) 方法

25

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの植物体を収穫期以降も収穫せずには場で栽培を続け、植物体の生育状況を目視により調査した。

### (2) 結果

30

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの植物体は10月下旬にいずれも枯死し、その程度に両者間で相違は観察されなかった。このことから、本組換えトウモロコシの成体の越冬性は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

35

## 1－4．花粉の稔性及びサイズ

## (1) 方法

出穂前の本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの雄穂をプロットごとにそれぞれ採取し、切り穂にして置き、葯から花粉を採集した。花粉を酢酸カーミン液で 180 分以上染色し、各区ごとに適当な視野を選んで写真撮影した。1 プロットあたり 1,500 個以上の花粉について染色の有無を観察し、染色が確認された花粉の割合を算出した。また、花粉のサイズについては 1 プロットあたり、6 花から採取した 10 個の花粉について長径を計測した。各調査は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 5 反復で行い、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t 検定を行った。

## (2) 結果

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの花粉は、いずれも酢酸カーミン液で 99%以上が染色され、両者間で花粉の生体反応活性に統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。また、花粉のサイズ (長径) においても両者間で統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。このことから、本組換えトウモロコシの花粉の稔性及びサイズは、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

### 1 - 5. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

## (1) 方法

種子の生産量に関しては、粒列数、一列粒数及び百粒重を指標として評価を行った。

また、脱粒性に関しては、収穫期の雌穂から自然条件下における種子の脱粒を観察し、脱粒が見られない場合を脱粒性難と評価した。

発芽率に関しては、収穫種子を 1 プロットあたり 60 粒採取し、収穫後数時間以内にポットに播種し、温室で栽培し、播種 20 日後に調査を行った。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 5 反復で行い、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で t 検定を行った。

休眠性に関しては、種子の保存中に何らかの条件により休眠打破が起こることを防ぐため、収穫直後の種子を播種し発芽率を調査し、さらに発芽しない種子の

生存状態を観察して評価した。

## (2) 結果

5 粒列数、一列粒数及び百粒重の全てにおいて統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。このことから、種子の生産量に関して、本組換えトウモロコシは非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。また、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの脱粒性はともに難で、両者同程度であることが示された。発芽率に関しては、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの種子は、いずれも 93%以上の発芽率を示し、両者間で統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。

10 一般にトウモロコシ種子の休眠性はほとんどないと言われている。実際に、収穫後数時間以内の種子を播種して発芽率を調査した上記の試験においても、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの種子の間で統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。

15 以上の結果から、本組換えトウモロコシの種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

## 2. 有害物質の産生性

20

### 2-1. 根から分泌され他の植物に影響を与えるもの (後作試験)

#### (1) 方法

25 収穫期に、試験区の各プロットの4植物体の株元の周囲20~30cmから根圏土壌を採取した。土壌をふるい、植物残渣を取り除き混和した後、各プロットの土壌をそれぞれ20個のポット(幅6cm×6cm、深さ5.5cm)に詰めた。検定作物としてハツカダイコン(品種:アイシクル)を1ポットあたり1粒播種し、温室内(設定20℃)で生育させた。播種7日後に発芽率を調査し、播種14日後にハツカダイコンの植物体を根を含め採取して乾燥させ、その重量を測定した。試験は、ほ場における1プロットを1反復とする5反復で行った。各反復20ポットのうち発芽した植物体の測定値の平均を1反復の値とし、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの栽培土壌の間でt検定を行った。

#### 35 (2) 結果

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの栽培土壌間で、ハツカダイ

コンの発芽率及び乾燥重量において統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。このことから、本組換えトウモロコシの根から分泌され他の植物に影響を与える有害物質の産生性は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

5 2-2. 植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるもの（鋤き込み試験）

(1) 方法

10 収穫期の植物体の地上部を各プロットより採取して乾燥粉末を調製した。これを 0.5% (w/w) の割合で育苗用培土に対し混和して、1プロットあたり 20 個のポット（直径 6.5cm、深さ 8cm）に詰めた。検定作物としてハツカダイコン（品種：アイシクル）をポットあたり 1 粒播種し、温室内（設定 20℃）で生育させた。播種 7 日後に発芽率を調査し、播種 14 日後にハツカダイコンの植物体を根  
15 を含め採取して乾燥させ、その重量を測定した。試験は、ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 5 反復で行った。各反復 20 ポットのうち発芽した植物体の測定値の平均を 1 反復の値とし、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの鋤込み土壌の間で t 検定を行った。

20 (2) 結果

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの植物体鋤込み土壌間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重量において統計学的有意差 ( $P<0.05$ ) は認められなかった。このことから、本組換えトウモロコシの植物体が内部に有し、枯死  
25 した後に他の植物に影響を与える有害物質の産生性は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

2-3. 根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの（土壌微生物相試験）

30 (1) 方法

収穫期に、各プロットの 4 植物体の株元からコアサンプラーを用いて 100ml ずつ土壌を採取してプロットごとに混和した。次に、滅菌水を加えブレンダーを用いて攪拌混合した後、 $10^{-3}$  から  $10^{-6}$  までの土壌希釈液を作成した。希釈平板法により、細菌及び放線菌については PTYG 培地で 7 日間、糸状菌についてはローズベンガル培地で 3 日間、それぞれ 25℃で静置培養した。試験は、  
35 ほ場における 1 プロットを 1 反復とする 5 反復で行い、本組換えトウモロコシ

及び非組換えトウモロコシの栽培土壌における細菌数、糸状菌数及び放線菌数を調査し、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間でt-検定を行った。

## 5 (2) 結果

10 本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシのプロットから採取した土壌中の細菌数、糸状菌数及び放線菌数に統計学的有意差 ( $P < 0.05$ ) は認められなかった。このことから、本組換えトウモロコシの根から分泌され土壌微生物に影響を与える有害物質の産生性は、非組換えトウモロコシと同程度であることが示された。

## IV 結論

15 本組換えトウモロコシ DP-098140-6 の生物多様性影響評価のため、本組換えトウモロコシの形態や生育の特性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、有害物質の産生性について、我が国における隔離ほ場試験を実施して検討した。その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間でその特性に相違は認められなかった。

20 以上のことから、本組換えトウモロコシ DP-098140-6 を我が国において栽培したとしても、生じる環境への影響は既存のトウモロコシ栽培による環境影響を超えるものではないと結論した。