

ツルマメと遺伝子組換えグリホサート耐性ダイズ との雑種の性質の解明

久保 明弘、青野 光子、中嶋 信美、西沢 徹、玉置 雅紀、佐治 光

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

(独) 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター

本論文は、下記の論文の和訳である。

Akihiro Kubo, Mitsuko Aono, Nobuyoshi Nakajima, Toru Nishizawa, Masanori Tamaoki, Hikaru Saji (2013) Characterization of hybrids between wild and genetically modified glyphosate-tolerant soybeans. *Plant Biotechnology*, 30 (4): 335-345

略語：CP4 EPSPS, *Agrobacterium* sp. CP4 株から単離された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ; GM, 遺伝子組換えの; OECD, 経済協力開発機構; PCR, ポリメラーゼ連鎖反応; QTL, 量的形質遺伝子座.

要旨

遺伝子組換え (GM) ダイズの日本における開放系利用のための最初の承認で、ツルマメと GM または非 GM ダイズとの雑種についての情報が益々重要になった。そこで、我々は閉鎖系温室でツルマメと GM または非 GM ダイズとの様々な雑種を作成し、性質を調べ、*cp4 epsps* 導入遺伝子の遺伝と、雑種に与える影響を調べた。雑種は *cp4 epsps* 遺伝子をメンデル式に受け継いだ。この遺伝子は、安定に発現し、機能のあるタンパク質を産生し、雑種にグリホサート耐性を与えた。我々はまた、雑種第 2 代 (F_2) と、2 回、戻し交配した雑種 (BC_2F_2) の種子の発芽率と生存率を、 4°C で 3 ヶ月間の処理の後で調べた。雑種は低温処理後、ツルマメと類似した発芽特性を示した。 BC_2F_2 種子の大部分は休眠種子として生き残った。生存率に与える *cp4 epsps* 遺伝子の影響はなかった。さらに我々は、雑種の形態、開花期、繁殖力を調べた。全体として、 F_1 、 F_2 及び F_3 雑種は、ツルマメとダイズの中間の形態、開花期、繁殖力の表現型を示し、 BC_2F_2 雑種の表現型はツルマメの表現型と類似していた。GM 雑種と、それに対応する非 GM 雑種との比較では、繁殖力における有意差は見出されなかった。我々は、ツルマメとダイズ由来の遺伝子をそれぞれ半分ずつ含む雑種は、ツルマメとダイズの中間の適応度を示すのに対し、 BC_2F_2 雑種はツルマメに類似した適応度を持つということを提唱する。また、*cp4 epsps* 遺伝子は、安定に遺伝するが、グリホサート処理なしでは適応度に影響を与えないということを提唱する。

キーワード : *cp4 epsps*, 適応度, 除草剤耐性, 遺伝子浸透, ツルマメ.

緒言

遺伝子組換え (GM) 作物の全栽培面積は世界的に増加している。2011 年には 29 カ国で 1 億 6 千万ヘクタールの GM 作物が植えられ、世界の農耕地の約 11% を占めている (James 2011)。優占的な GM 作物は除草剤耐性ダイズで、2011 年に 7 千 540 万ヘクタールを占めた (James 2011)。GM 作物の可能性のある環境影響 (Dale ら 2002) は、侵入性、雑草性、毒性、及び GM 作物からその近縁野生種への導入遺伝子の遺伝子浸透 (Warwick ら 2009) を含む生物多様性に対するリスクを含んでいる。ツルマメ (*Glycine soja* Siebold & Zucc.) は、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) と交雑可能で、東アジアに自生しているが、そこではまだ GM ダイズは商業栽培されていない。しかしながら日本では多くの GM ダイズの種子が搾油等のために主にアメリカ合衆国から輸入されており、そこではアメリカ合衆国農務省によると 2011 年にダイズ栽培面積の 94% に GM ダイズが植えられた (<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/Acre/Acre-06-30-2011.pdf>)。日本の農林水産省は、2009、2010、及び 2011 年度に、いくつかの日本の輸入港の近くで少数の逸出した GM ダイズの植物を同定した (http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/index.html)。日本に輸入される GM ダイズの品種は第一種使用が承認されているが、それはカルタヘナ議定書に基づく日本国内法 (http://www.bch.biodic.go.jp/english/e_index.html) の下で、日本における改

変された生物の拡散防止措置を執らない使用のことである。いくつかの品種は日本での栽培が承認されている。日本で最初に第一種使用が承認された GM ダイズは、除草剤のグリホサートに耐性のダイズ品種 (*cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.; 40-3-2, OECD UI:MON-Ø4Ø32-6) で、グリホサート耐性を与えるために *Agrobacterium* sp. の CP4 株から単離された 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シターゼをコードする *cp4 epsps* 遺伝子を持っている。2005 年にその日本での第一種使用を承認する際に、生物多様性影響評価検討会は利用可能な科学的根拠を充実させるため、次の情報の収集を求めた：(i) 自然環境下におけるダイズとツルマメの交雑率、(ii) ダイズとツルマメの雑種後代の適応度、(iii) この組換えダイズとツルマメとの交雑率及び雑種後代における当該組換え遺伝子の適応度、(iv) ツルマメの地理的な遺伝的変異等、(v) (i)から(iv)を踏まえた遺伝子の挙動に関するモデルの作成 (http://www.bch.biodic.go.jp/download/en_lmo/Soybean40_3_2enRi.pdf)。ダイズからツルマメへの花粉流動を介した交雑率は、野外で実験的に評価されてきた。Nakayama と Yamaguchi (2002) は、在来ダイズ品種の丹波黒と京都府由来のツルマメ系統との平均交雑率 0.73% を報告した。Mizuguti ら (2009, 2010) は、承認済み GM ダイズ (40-3-2 系統) に由来する GM ダイズ品種と、つくばのツルマメ集団との交雑率 0~0.097% を報告した。Kuroda ら (2010) は、ツルマメとダイズの形態学的中間型を日本の自生地で見つけた。ツルマメとダイズの雑種が野外開放系で生じる可能性があるため、そのような雑種の性質の解明は東アジアにおける GM ダイズの環境リスク評価のための貴重な科学的情報を与えることになる。

本研究で、我々はツルマメ系統と、40-3-2 系統由来の GM ダイズ品種またはその親系統の非 GM 品種との間で、様々な雑種を作成した。そして、これらの雑種の性質を閉鎖系温室で調べ、*cp4 epsps* 遺伝子の遺伝と影響を調べた。

材料と方法

植物材料

GM ダイズ品種 A3244RR と A3525RR、及びそれらのそれぞれに対応する親系統の非 GM 品種である A3244 と A3525 は、モンサント・カンパニー (米国ミズーリ州セントルイス) より提供された。A3244RR と A3525RR は、導入遺伝子 *cp4 epsps* についてホモ接合であり、モンサント・カンパニーにより開発された、除草剤グリホサート耐性ダイズ (*cp4 epsps*, *Glycine max* (L.) Merr.; 40-3-2, OECD UI:MON-Ø4Ø32-6) の子孫である。40-3-2 GM ダイズ系統は、1 コピーの完全な *cp4 epsps* 遺伝子と、一緒に安定に遺伝する、この遺伝子の二つの不活性化断片を含んでいる (http://www.bch.biodic.go.jp/download/en_lmo/Soybean40_3_2enRi.pdf)。ツルマメ系統の那須-5 と JP110755 の種子は、農業生物資源研究所 (NIAS) のジーンバンクより入手した。那須-5 と JP110755 は、それぞれ青森県と広島県に由来する。これらの系統の純系 (純系那須-5 と純系 JP110755) は、加賀秋人博士 (NIAS) により開発され、提供された。

植物栽培と雑種の作成

本研究における栽培は、当研究所（茨城県つくば市）の閉鎖系温室で実施した。その閉鎖系温室は自然光下で 25°C、相対湿度 70% に設定した。2005 年に、ツルマメ系統（那須-5 及び JP110755）に GM（A3244RR 及び A3525RR）と非 GM（A3244 及び A3525）品種の花粉を人工的に授粉することにより、8 種類の雑種第一代（F₁）の雑種を作成した。ツルマメの種子の休眠を打破するため、播種前にニッパーで臍から遠い種皮の小部分を擦りむくことにより、部分的な種皮除去を行った。親の植物は、赤玉（小）、バーミキュライト及びスーパーソイル 1 号（三井東圧肥料、東京）を 2:1:1 の比率で含む混合培土を入れたワグネルポット（1/10,000 a）で育てた。肥料は、発芽後 4 週間後より週に 2 回、1:2,000 に希釈したハイポネックス 6-10-5（ハイポネックスジャパン、大阪）を与えた。日長は、メタルハイドランプの補光で 15 時間になるようにした。蔓は、各鉢に立てた 3 本の支柱に巻き付くようにした。ツルマメの花芽形成は、植物を覆う箱を用いて、短日処理（8 時間/日）で誘導した。全 8 種類の F₁ 雑種は、性質を調べ自家受粉により雑種第二代（F₂）の種子を生産するため、2006 年 5 月 22 日に親系統と共に播種した。休眠を打破するため、F₁ 雑種種子を播種前にツルマメと同様に処理し、CP4 EPSPS タンパク質の試験を行った（後述）。栽培は前述のように行った。ただし、異なる鉢（直径 18 cm、高さ 15 cm）を用い、補光は自然光下で花芽形成を誘導するために 7 月 7 日に終了した。F₁ の実生は初期成長段階で蔓を持たないので、自家受粉した種子に由来する蔓のある実生は除去した。温室内のすべての鉢の位置を週に 2 回、変えた。F₂ 植物の性質を調べ、雑種第三代の F₃ 種子を自家受粉で生産するため、（那須-5 × A3244）F₂ 及び（那須-5 × A3244RR）F₂ 雑種を A3244 及び A3244RR と共に、補光した閉鎖系温室で 2007 年 5 月 25 日に播種した。（那須-5 × A3244）と那須-5 及び A3244 との追加的な比較を、補光なしの別の制御温室で実施した。2007 年に播種した種子は、2006 年に育成したすべての親植物から集めたものである。その種子は、小さな鉢（直径 11 cm、高さ 7 cm）に播種し、播種後 36 日後に実生をワグネルポット（1/10,000 a）に移植した。他の生育条件は前述の通りである。2008 年 5 月 23 日に、性質を調べるため、（那須-5 × A3244RR）F₃ 雑種を那須-5 及び A3244RR と共に閉鎖系温室で播種した。2007 年に各系統で最も多くの種子をつけた親から収穫した種子を播種に用いた。選択した F₃ 雑種の種子のプールは、*cp4 epsps* 遺伝子の分離を調べた際に、GM と非 GM の両方の種子を含んでいた。生育条件は親の F₂ 雑種に用いたのと同じである。ただし、移植は播種後 47 日後に行い、補光は 9 月 25 日に終了した。F₂ 及び F₃ 種子は、柔らかい種皮を持っており、休眠を打破する処理を必要とせず発芽した。2007 年に、1 回、戻し交配した雑種第一代の雑種（BC1F₁）で *cp4 epsps* 遺伝子を含むものを、F₁ 雑種の作成で述べた方法により、2 種類だけ、（JP110755 × A3244RR）F₁ または（JP110755 × A3525RR）F₁ から JP110755 への人工授粉で、作成することに成功した。花芽を誘導するため、全親系統に短日処理を行った。2008 年に、2 回、戻し交配した雑種第一代の雑種（BC2F₁）で、やはり *cp4 epsps* 遺伝子を含むものを作成するために、BC1F₁ 雑種の作成で述べた方法で、2007 年に得られた二つの BC1F₁ 雑種系統を JP110755 に戻し交配した。2009 年 6 月 5 日に、BC2F₁ 植物の性質を調べ、2 回、戻し交配した雑種第二代の雑種（BC2F₂）の種子を自家受粉で生産するため、（JP110755 × A3525RR）BC2F₁ 種子を JP110755 及び A3525RR と共に、閉鎖系温室内のワグネルポットに播種した。2008 年に作成した（JP110755

× A3525RR) BC2F₁ のすべての種子を播種し、また、その BC2F₁ 雑種の種子親に自家受粉でできたツルマメ種子を播種に用いた。生育条件は F₃ 雑種に用いたものと同じである。ただし、補光は行わなかった。また、ツルマメと雑種のそれぞれ 2 及び 3 個体の長く生育した植物を 2010 年 2 月 3 日より後に灌水しないことにより枯らした。2010 年 5 月 28 日に、BC2F₂ 植物の性質を調べるため、(JP110755 × A3525RR) BC2F₂ 種子を JP110755 及び A3525RR 種子と共に閉鎖系温室で播種した。2009 年に各系統の最も多くの種子をつけた親から収穫した種子を播種に用いた。生育条件は BC2F₁ 雑種に用いたものと同じである。ただし、赤玉(中)、バーミキュライト及びクレハ培養土(クレハ、東京)を 2:1:1 の比率で含む混合培土を用い、灌水は植物が枯れるまで続けた。すべての戻し交配系統 (BC1F₁、BC2F₁ 及び BC2F₂) は、播種前に CP4 EPSPS タンパク質の存在について調べた (方法は次節に記載)。この処理により、種子の休眠が打破された。2009 年に、補光はしなかったが、2005 年の F₁ 雑種作成で述べた方法を用いて、A3244RR 及び A3244 の花粉による純系那須-5 及び純系 JP110755 の人工授粉により、4 種類の F₁ 雑種を作成した。用いた純系ツルマメ系統は NIAS ジーンバンクの種子から 7 世代目の植物であった。2010 年 6 月 4 日に、これら 4 種類の F₁ 雑種と親系統を、性質を調べるため、休眠打破後、播種した。生育条件は BC2F₂ 雑種に用いたものと同じである。

cp4 epsps 遺伝子の遺伝の研究

(那須-5 × A3525RR) F₂ と cp4 epsps 遺伝子の分離に基づいて選択した(那須-5 × A3244RR) F₃ の各 60 粒の種子を播種した。それぞれ、57 及び 60 の発芽した実生を、鉢 (直径 11 cm、高さ 7 cm) で移植せずに育てた。他の生育条件は、前節で述べた(那須-5 × A3244RR) F₂ 植物に用いたものと同じである。実生における CP4 EPSPS タンパク質の有無を調べるため、初生葉の先端 (約 1 mm) を切り落とし、乳鉢と乳棒で 3-4 ml の脱イオン水の中ですりつぶした。祖抽出液は、Reveal for CP4 (ネオゲン、米国ミシガン州ランシング) を用いて、免疫クロマトグラフィーのラテラルフローアッセイでテストした。試験紙のサンプル側を約 5 分間、祖抽出液に浸けて、CP4 EPSPS に特異的な線が現れるか調べた。(那須-5 × A3244RR) F₂ 及び(那須-5 × A3244RR) F₃ 植物 (前節) の栽培中にも、cp4 epsps 遺伝子の分離比を初生葉の免疫クロマトグラフィーで調べた。(JP110755 × A3525RR) BC2F₂ 種子も、cp4 epsps 遺伝子の分離比を調べるために用いた。種子における CP4 EPSPS タンパク質の有無を調べるために、臍から遠い種皮に包まれた子葉の小部分を初生葉の代わりに用いた。

cp4 epsps 遺伝子の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により行った。本葉を切り取り、植物成分を FTA プラントセーバーカードまたは FTA クラシックカード (ワットマン、米国ニュージャージー州クリフトン) に、葉をカードに押しつけることにより移した。カードが乾いてから、移した植物成分の付いたカードから直径 2 mm のディスクを打ち抜いた。そのディスクをマイクロチューブに入れ、FTA 精製試薬(ワットマン)で説明書に従って精製し、PCR にかけた。PCR プライマーは EPSPS7 (5'-AAGA ACTCCGTGTTAAGGAAAGCGA-3') と EPSPS8 (5'-AGCCTTAGTGTTCGAGAGTTCGAT-3') で、それらは cp4 epsps 遺伝子内の配列に一致している。Blend Taq (東洋紡、大阪) を PCR に用いた。サーモサイクラーの条件

は、94°C、3 分の後、35 サイクルの 94°C、1 分、60°C、1 分、72°C、2 分、及び 72°C、10 分の最後の終了ステージである。PCR 産物は、1.8%アガロースゲルで電気泳動し、*cp4 epsps* 遺伝子の増幅産物に相当する 320 bp のバンドを可視化するために、臭化エチジウムで染色した。

実生のグリホサート耐性試験は、播種後 45~67 日後に、脱イオン水で 1:200 に希釈した 41.0%イソプロピルアンモニウム *N*- (ホスホノメチル) グリシナート (ラウンドアップ; 日産化学工業、東京) をじょうろで葉にかけ、十分に濡らし、約 1 週間後に耐性を評価することにより行った。

種子の低温耐性の調査

(那須-5 × A3525RR) F₂ 及び(那須-5 × A3525) F₂ 雑種、並びに那須-5、A3525RR 及び A3525 の無傷の種子を、赤玉 (小)、バーミキュライト及びスーパーソイル 1 号を 2:1:1 の比率で含む混合培土を入れた鉢 (直径 11 cm、高さ 7 cm) に播種した。十分に灌水し、乾燥を防ぐためにポリ袋で覆い、3 ヶ月間 4°C で暗い部屋に置き、その後、閉鎖系温室で発芽率を 1 ヶ月間、調査した。生育条件は、(那須-5 × A3525RR) F₂ (前述) に用いたものと同じである。発芽しなかった種子は掘り出して、腐敗していなかった種子は、種子の休眠を打破した後 (前述)、再び播種した。そして、発芽を 1 ヶ月間、調査した。*cp4 epsps* 遺伝子を含む GM 雑種の検出は、発芽した実生の初生葉を用いて、免疫クロマトグラフィーにより行った。

(JP110755 × A3525RR) BC₂F₂、A3525RR、及びこの BC₂F₂ 雑種と同じ祖母植物に由来する JP110755 の無傷の種子を、赤玉 (中)、バーミキュライト及びクレハ培養土 (クレハ、東京) を 2:1:1 の比率で含む混合培土を入れた鉢 (直径 11 cm、高さ 7 cm、3 粒/鉢) に播種した。これらの低温耐性を前述のように調査した。

植物の性質の調査

発芽率は播種後 1 ヶ月後に測定した。スペースの制約のために温室ですべての実生を維持できなかったときには、成熟するまで栽培する供試植物を無作為に選んだ。草丈は、播種後 1~2 ヶ月後に測定した。ツルマメと雑種の最長の蔓を草丈のためにまっすぐにした後で測定した。蔓を含む茎の性質を、紫色の程度、太さ、及び毛の長さについて調べるため、各植物に 1~5 の尺度で、目視でスコアをつけた。葉の大きさを評価するため、各成熟植物から目視で選んだ最大の三出葉の頂小葉の葉身長を測定した。根元直径は、電子デジタルノギスを用いて、直角に角度を変えて二度測定し、各個体の平均値を出した。最終地上部乾重量は、莢の収穫後に枯死した植物から地上部を取って、80°C で 2 日間、乾燥させることにより測定した。

各植物の開花期は、最初の花が開いたときから最後の花がしぼんだときまでの期間として記録した。

一個体当たり種子総重量は、室温で種子が乾燥してから測定した。一粒当たり種子重は、各個体の種子総重量を各個体の種子総数で割ることにより求めた。

結果

ツルマメとダイズの雑種の作成

GM ダイズ品種が東アジアの畑で栽培されるときには、GM ダイズからツルマメへの花粉流動によりツルマメの自然生息地で雑種が生じるかもしれない。一方、ツルマメから GM ダイズへの花粉流動により農耕地で雑種種子が生じるかもしれないが、それは最後に収穫されて消費されるだろう。それで我々はダイズの花粉をツルマメに人工授粉することにより、F₁ 雑種を作成した (図 1)。二つの GM 品種 (A3244RR と A3525RR) 及びそれらの非 GM 親品種 (それぞれ A3244 と A3525) は花粉ドナーとして用い、二つのツルマメ、那須-5 と JP110755 は花粉レシピエントとして用いた (表 1)。F₂ 雑種は F₁ 雑種の自家受粉により得られ、F₃ 雑種は *cp4 epsps* 遺伝子を持っている選択した F₂ 雑種の自家受粉により作成された (図 1)。F₁ 雑種は、ゲノムにツルマメとダイズ由来の遺伝子を各 50% 含んでいると予想される。子孫の F₂ 及び F₃ 雑種もツルマメとダイズ由来の遺伝子を約 50% ずつ含んでいると予想される (図 1)。これらの雑種は自然生息地に育っているツルマメとさらに交雑し、ツルマメ由来の遺伝子をより高い割合で含む雑種を生じるかもしれない。そのような雑種の性質を調べるため、我々はツルマメに F₁ 雑種の花粉を人工的に授粉することにより BC1F₁ 雑種を、ツルマメに BC1F₁ 雑種の花粉を人工的に授粉することにより BC2F₁ 雑種を作成した (図 1)。BC1F₂ 及び BC2F₂ 雑種も、それぞれ BC1F₁ 及び BC2F₁ 雑種の自家受粉により作成した (図 1)。ゲノム中のツルマメ由来の遺伝子の期待される割合は、BC1F₁ 及び BC1F₂ 雑種では 75%、BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種では 87.5% であった (図 1)。2009 年に純系のツルマメ系統が利用可能になったので、F₁ 雑種の性質をさらに調べるため、純系ツルマメ系統と GM または非 GM ダイズとの F₁ 雑種を作成した。表 1 は、本研究で調べた雑種を示している。

ツルマメと GM ダイズの雑種における *cp4 epsps* 遺伝子の遺伝

ツルマメと GM ダイズとの雑種における *cp4 epsps* 遺伝子の安定性と表現型を評価するため、分離世代の実生を 3 種類の試験で分析した。最初に、葉中の CP4 EPSPS タンパク質を免疫クロマトグラフィーで検出し、CP4 EPSPS-陽性と陰性の表現型の分離比を統計学的にテストした (表 2)。その結果は、3:1 の分離比を示す優性のメンデル式遺伝に一致した (表 2)。次に、すべての CP4 EPSPS-陰性植物をいくつかの陽性植物と共に *cp4 epsps* 遺伝子の PCR にかき、不安定性により発現していない遺伝子を探索した。しかし、不安定な対立遺伝子の存在を示す証拠はなかった (補足表 1)。最後に、実生でグリホサート耐性試験を行った (補足表 1)。テストしたすべての CP4 EPSPS-陽性植物はグリホサート耐性であったが、これはテストしたすべての植物で CP4 EPSPS タンパク質の酵素活性は損なわれておらず、また、グリホサート耐性の表現型は雑種において優性であることを示している。

雑種種子の低温耐性

本研究における供試植物の発芽率は 25°C で播種後、1 ヶ月後に測定した (補足表 2)。雑種と親のツルマメ及びダイズの発芽率は、ほとんどの場合、類似していたが、那須-5 では種子の休眠を打破するように処理しなかったときに発芽率が低かった (補足表 2)。

播種した種子の越冬能力を調べるために、F₂ 及び BC2F₂ 雑種を祖先のツルマメ及びダイズと共に播種し、4°C で暗所に 3 ヶ月間置き、それから 25°C で 1 ヶ月間栽培し、発芽率と休眠種子を含む生存率を調べた (図 2)。ダイズの発芽率は 0 (図 2A) または 0 に近かった (図 2B)。GM または非 GM ダイズ由来の両方の F₂ 雑種と BC2F₂ 雑種は、それらに対応する祖先のツルマメに匹敵する発芽率であった (図 2A, B)。ダイズと F₂ 雑種のすべての未発芽種子は腐敗していたが、BC2F₂ 雑種とツルマメのほとんどすべての未発芽種子は腐敗していなかった。F₂ 及び BC2F₂ 雑種と JP110755 の実生の一部は発芽後に枯死した。低温処理後 1 ヶ月での生存率を図 2C と 2D に示す。正常な形態の未発芽種子について、種子の休眠を打破するための部分的な種皮除去の後、発芽する能力を評価し、発芽した種子を休眠していた種子として数えた。F₂ 雑種の生存率は、祖先のツルマメとダイズの間であった (図 2C)。一方、BC2F₂ 雑種は JP110755 と有意に変わらない生存率を示した (図 2D)。

GM ダイズに由来する F₂ 雑種の発芽及び生存率は、非 GM ダイズに由来する F₂ 雑種と有意に違わなかった (図 2A, C)。雑種の生存率への *cp4 epsps* 遺伝子の影響をさらに評価するため、分離世代の雑種において低温処理後に生残していた CP4 EPSPS-陽性 (+) と陰性 (-) の植物の数を調べた (表 3)。生残植物は期待されるメンデル比を示したので (表 3)、雑種の生存率への *cp4 epsps* 遺伝子の影響は検出されなかった。

雑種植物の形態

雑種植物の形態を調査した。ダイズと異なり、ツルマメには蔓があった。F₁、BC1F₁、BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種のすべての植物に屈触性の蔓があった。ただし、若い F₁ の実生に蔓はなかった。F₂ 及び F₃ 雑種の一部の植物にも蔓があり、それらの一部は植物が成長する間に徐々に現れた。ツルマメの草丈は、ツルマメの最長の蔓に基づき、播種後 1~2 ヶ月後にダイズより高かったが、必ずしも有意差があるわけではなかった (補足表 3)。雑種の草丈は、ツルマメとダイズの間か、ツルマメまたはダイズに類似していた (補足表 3)。*cp4 epsps* 遺伝子を持つ持たないで対応する雑種 [すなわち、(那須-5 × A3244) F₁ 対(那須-5 × A3244RR) F₁、(純系那須-5 × A3244) F₁ 対(純系那須-5 × A3244RR) F₁、(純系 JP110755 × A3244) F₁ 対(純系 JP110755 × A3244RR) F₁、(那須-5 × A3244) F₂ 対(那須-5 × A3244RR) F₂、(那須-5 × A3244RR) F₂ (CP4-) 対(那須-5 × A3244RR) F₂ (CP4+)、(那須-5 × A3244RR) F₃ (CP4-) 対(那須-5 × A3244RR) F₃ (CP4+)、及び(JP110755 × A3525RR) BC2F₂ (CP4-) 対(JP110755 × A3525RR) BC2F₂ (CP4+)] の中で、(純系 JP110755 × A3244RR) F₁ だけが(純系 JP110755 × A3244) F₁ より有意に背が高かった (補足表 3)。分離世代の雑種の間で、Fisher の正確確率検定により、CP4 EPSPS タンパク質と蔓の存在との間の独立性が明らかになった (補足表 4)。蔓を含む茎のいくつかの性質 (紫色の程度、太さ、及び毛の長さ) を、F₂ 雑種とその祖先のツルマメとダイズの間で、半定量的に評価した。F₂ 雑種は、ツルマメとダイズの間接的な茎を持っており、*cp4 epsps* 遺伝子は茎の形態に影響を与えなかった (補足表 5)。花と未熟な莢はツルマメ、ダイズ及

びそれらの雑種の間で類似していた。ツルマメとダイズは子葉、初生葉及び三出葉の本葉を持っていた。すべての雑種はこれと同じ種類の葉を持っていた。ダイズの葉の大きさはツルマメより大きかった。雑種の葉の大きさは、ツルマメとダイズの間か、ツルマメまたはダイズに類似していた（補足表 6）。*cp4 epsps* 遺伝子を持つ持たないの 6 対の雑種の中で、1 対が葉の大きさで有意差を示した。すなわち、(那須-5 × A3244) F₂ は(那須-5 × A3244RR) F₂ より葉が大きかった（補足表 6）。

最終根元直径は植物が枯れた後で測定した（補足表 7）。ダイズの最終根元直径はツルマメより大きかった。雑種の最終根元直径は、ツルマメとダイズの間か、ツルマメまたはダイズに類似しており、*cp4 epsps* 遺伝子の影響はなかった（補足表 7）。F₁ 雑種と親のツルマメとダイズを用いて、各個体の総茎長を植物が枯れた後で測定した。ツルマメの総茎長はダイズより長く、F₁ 雑種の総茎長はツルマメとダイズの間であった。総茎長に対する *cp4 epsps* 遺伝子の有意な影響はなかった（補足表 8）。最終地上部の乾重量を測定した。ツルマメはダイズより大きな乾重量を持っており、雑種はツルマメとダイズの間か、ツルマメに類似していた。*cp4 epsps* 遺伝子の影響はなかった（補足表 9）。ツルマメとダイズの成熟した莢の色は、それぞれ濃褐色と淡褐色であった。(JP110755 × A3525RR) BC1F₁ 及び BC2F₁ 雑種は成熟した濃褐色の莢をつけた。(JP110755 × A3525RR) BC2F₂ 雑種の各個体は、濃褐色と淡褐色のいずれかの莢をつけた（補足表 10）。Fisher の正確確率検定により、CP4 EPSPS タンパク質と成熟した莢の色との間の独立性が示された（補足表 10）。BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種の成熟した莢の脱離した部分は、強いねじれを示したが、それはツルマメに類似していた（不掲載データ）。

BC1F₁ 雑種の形態は、ツルマメに類似していた。ただし、(JP110755 × A3525RR) BC1F₁ の 5 個体中、2 個体は、ツルマメの未熟葉に類似した、皺の寄った小さな薄い緑色の葉を持っており、少数の種子しかつかなかった（不掲載データ）。理論上、ツルマメ由来の遺伝子を 87.5% 含む BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種の形態も、ツルマメに類似していた。すなわち、JP110755 との有意差はなかったが、A3525RR との間では、いくつかの有意差があった（補足表 3, 6, 7, 9）。それに対して、理論上、ツルマメとダイズ由来の遺伝子を各 50% 含む F₁、F₂ 及び F₃ 雑種は、ツルマメ及び／またはダイズとの間で、いくつかの有意差を示した（補足表 3, 5, 6, 7, 9）。ダイズ品種 A3244、A3244RR、A3525 及び A3525RR は、本研究で調べた形態学的特徴に関して、互いに有意に違わず、ツルマメ系統の那須-5 及び JP110755 も同様に互いに有意に違わなかった（補足表 3, 5, 6, 7, 8, 9）。

開花期の比較

供試植物の開花期を調べた（補足図 1）。ダイズ品種の開花期が最も早かった。JP110755 と純系 JP110755 の開花期が最も遅かった。那須-5 と純系那須-5 の開花期は中間的であった。5 月 22 日～6 月 5 日に播種したとき、ダイズの開花期は部分的に那須-5 及び純系那須-5 の開花期と重なったが、JP110755 及び純系 JP110755 の開花期とは全く重ならなかった。F₁、F₂ 及び F₃ 雑種の開花期は、親または祖先のツルマメ及びダイズの間であった。長日条件

は開花期を長くした。BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種は、親のツルマメ、JP110755 に類似した開花期を持っていた。開花期に対する *cp4 epsps* 遺伝子の有意な影響はなかった（補足図 1）。

雑種の繁殖力

ツルマメとダイズは自殖性植物なので、供試植物は閉鎖系温室で花粉媒介者なしで自家受粉した種子を生産した。図 3 は、ツルマメとダイズとそれらの雑種の異なる組合せの七つの実験グループにおいて、一個体当たり生産された種子数を示している。繁殖力は、異なる実験グループの同じ系統の植物間で様々であったが、それは多分、生育条件の違いのせいである。ツルマメの植物はダイズの植物より多くの種子を生産し、各実験グループ内のツルマメ系統間またはダイズ品種間では有意差はなかった。F₁、F₂ 及び F₃ 雑種の自家受粉種子数は、ツルマメとダイズの間か、ツルマメまたはダイズに類似していた。BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種の自家受粉種子数は、ツルマメで観測されたものに類似していた。*cp4 epsps* 遺伝子を持つ持たないで対応する雑種間で、種子数に有意差はなかった（図 3）。一個体当たり莢数を実験グループ 2、6 及び 7 において計測した。その結果は図 3 で報告したものに類似していた（補足表 11）。一莢当たり種子数は、実験グループ 2、6 及び 7 におけるすべての系統で、2.1~2.5 の範囲であった（補足表 12）。一個体当たり種子総重量を、純系ツルマメ由来の F₁ 雑種と(JP110755 × A3525RR) BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種について調べた（補足表 13）。生産された種子数にもかかわらず、一個体当たり種子総重量は、一粒当たり種子重の違いのせい、必ずしもツルマメにおいてダイズより大きいわけではなかった（補足表 14）。ダイズはツルマメや雑種より大きく重い種子をつけた。F₁ 雑種はツルマメとダイズの間接的な重さの種子をつけ、BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種はツルマメに類似した重さの種子をつけた（補足表 14）。一個体当たり種子数（図 3）と一粒当たり種子重の結果として、F₁ 雑種はツルマメやダイズより大きな一個体当たり種子総重量を生み出し、BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種はツルマメに類似した一個体当たり種子総重量を生み出した（補足表 13）。一個体当たり種子総重量や一粒当たり種子重に対する *cp4 epsps* 遺伝子の影響は検出されなかった（補足表 13, 14）。

雑種種子の形態

種子の形態を観察して、写真撮影した。種皮は種子親に由来する組織である。A3244、A3244RR、A3525 及び A3525RR は、大きな丸い黄土色の種子をつけ、那須-5 と JP110755 は、小さな楕円形で濃褐色の種子をつけた（補足図 2）。F₁ 種子はツルマメに類似していたが、多少歪んでおり（補足図 2）、より重かった（補足表 14）。F₂ 種子は、ツルマメとダイズの中間の大きさ、形、及び色を示した（補足図 2）。各親植物から収穫した F₃ 及び F₄ 種子のプールは、*cp4 epsps* 遺伝子の存在とは無関係に、色の多様性を示した（補足図 3, 4）。各 BC1F₁ 植物から収穫した BC1F₂ 種子プールは、ツルマメまたは F₂ 雑種に類似した色を持っていた（補足図 5A）。BC2F₁、BC2F₂ 及び BC2F₃ 種子は、ツルマメの種子に類似していた（補足図 5B-D、補足表 14）。

考察

本研究で我々は、ツルマメと GM または非 GM ダイズとの様々な雑種を作成したが(図 1、表 1)、その目的はそれらの性質を調べることと、*cp4 epsps* 遺伝子の遺伝様式及び影響を調べることである。F₁、F₂ 及び F₃ 雑種のゲノムは、ツルマメ由来の遺伝子を 50% 含むと期待されるのに対し、ツルマメに戻し交配した雑種のゲノムは、ツルマメ由来の遺伝子を 75% (BC1F₁、BC1F₂) または 87.5% (BC2F₁、BC2F₂) 含むと期待される。もし、GM ダイズからツルマメへの導入遺伝子の遺伝子浸透が生じるなら、このような戻し交配雑種が現れるはずである。しかしながら、自然戻し交雑率は低いと思われる。なぜなら、ツルマメ集団の他殖率は自殖率よりかなり低いからである (Fujita ら 1997; Kiang ら 1992; Kuroda ら 2008)。Kuroda ら (2010) は、ツルマメとダイズの間型の日本の自然生息地における結末に基づき、ダイズの遺伝子のツルマメへの遺伝子浸透はまれにしか起こらないように思われると報告した。その一方で、彼らはダイズの遺伝子のツルマメへの遺伝子浸透が過去に起こったことを示唆する証拠を見出した (Kuroda ら 2010)。

GM ダイズ系統 40-3-2 の子孫において、*cp4 epsps* 遺伝子は安定に遺伝し、CP4 EPSPS タンパク質は安定に発現すると報告されている (http://www.bch.biodic.go.jp/download/en_lmo/Soybean40_3_2enRi.pdf)。しかしながら、ツルマメとダイズの雑種における *cp4 epsps* 遺伝子の安定性と CP4 EPSPS タンパク質の発現は、これまで知られていなかった。ツルマメとダイズは、同じ数の染色体 (2n = 40) を持っており、交雑可能で、稔性のある子孫を作る (OECD 2000)。それゆえに、ツルマメとダイズの雑種は、安定なゲノムを持っていると思われる。しかし、ある導入遺伝子には遺伝子サイレンシングが起こるかもしれない (Kooter ら 1999)。本研究で、F₂、F₃ 及び BC2F₂ 雑種における *cp4 epsps* 遺伝子の分離比を調査することにより、この遺伝子の安定性を調べた。この遺伝子は、雑種においてメンデル式に遺伝した (表 2)。さらに、*cp4 epsps* 遺伝子に特異的な PCR と実生のグリホサート耐性試験による研究により (補足表 1)、遺伝子発現やタンパク質機能の阻害の証拠がなかったことから、この遺伝子が雑種で安定に発現することが示唆された。

ツルマメは秋に種子を散布し、その種子は春に発芽する。対照的に、ダイズはほとんど越冬しない。それゆえに、蒔かれた種子の越冬能力は、自然生息地で生き残るために重要であると思われる。本研究で、越冬能力を評価するため、F₂ 及び BC2F₂ 種子の発芽及び生存率を、土の中で 4°C での 3 ヶ月間の低温処理後に調べた (図 2)。F₂ 及び BC2F₂ 種子は、低温処理後にツルマメと同様に発芽し、実生のほとんどが生き残った。BC2F₂ 種子の大部分は、祖先の JP110755 の種子と同様に、休眠種子として生き残った。さらに、BC2F₂ 種子はツルマメに似た種皮を持っていた (補足図 5C)。種皮は、休眠の主要な決定因子であると考えられており (Moise ら 2005)、種皮の色を制御しているいくつかの遺伝子座がツルマメの硬実性に関係していることが示されている (Sakamoto ら 2004)。Zou ら (2010) は、種皮中の主要なフェノール性物質がツルマメの種皮強制硬実性に機能的に関与していることを示唆した。ツルマメの自然生息地における冬季の環境条件は我々の実験条件より厳しいと思われるが、我々はツルマメとダイズの雑種が越冬能力を持っている可能性を排除できない。Kitamoto ら (2012) は、JP110755 (Hiroshima) とダイズ品種フクユタカとの F₂ 雑種が 0% ~90-100% の範囲の生存率を持つ越冬した種子を生産したことを、12 月 26 日から 3 月 16

日まで土に埋めた F₃ 種子を用いた野外実験に基づいて、報告した。我々の研究において、GM ダイズ由来の F₂ 雑種の発芽及び生存率は非 GM ダイズ由来の F₂ 雑種と有意に違わなかった (図 2A, C)。さらに、分離世代の雑種の生存率に及ぼす *cp4 epsps* 遺伝子の影響は検出されなかった (表 3)。また、*cp4 epsps* 遺伝子と雑種種子の形態とは無関係であった (補足図 3, 4)。これらの結果は、*cp4 epsps* が機能的に低温耐性や休眠性に関係していないという事実に一致する (OECD 1999)。

我々は、特に、草丈、茎の性質 (紫色の程度、太さ、及び毛の長さ)、葉の大きさ、最終根元直径、総茎長、及び最終地上部乾重量に焦点を合わせて、雑種植物の形態を調査した (補足表 3, 5, 6, 7, 8, 9)。植物の形態は、植物の適応度に影響を及ぼすはずである。一般的に言えば、F₁、F₂ 及び F₃ 雑種は、ツルマメとダイズの中間的な形態を示し、戻し交配雑種はツルマメに類似した形態を示した。*cp4 epsps* 遺伝子の存在は、ほとんどの場合、形態に有意な影響を与えなかったが、例外は (純系 JP110755 × A3244RR) F₁ における草丈 (補足表 3) と (那須-5 × A3244RR) F₂ における葉の大きさ (補足表 6) であった。しかしながら、これらの形態学的な差異の理由はわからない。*cp4 epsps* 遺伝子は形態とは無関係である (OECD 1999)。草丈と葉の大きさにおける統計学的な有意差にかかわらず、*cp4 epsps* 遺伝子は種子生産に有意な影響を与えなかった (図 3、補足表 11, 13)。さらに、CP4 EPSPS タンパク質は蔓の存在 (補足表 4) 及び成熟した莢の色 (補足表 10) とは無関係であった。

(JP110755 × A3525RR) BC1F₁ 雑種の 5 個体中、2 個体は、ツルマメの未熟葉に類似した、皺の寄った小さな薄い緑色の葉を持っており、少数の種子しかつかなかった。異常な BC1F₁ 植物のひとつに由来する花粉を用いて、2 粒の BC2F₁ 種子が得られたが、それらは発芽しなかった (不掲載データ)。この異常の原因は種間雑種の遺伝的不安定性かもしれない。しかしながら、*cp4 epsps* 遺伝子がこの異常の原因であるとは思われない。なぜなら、(JP110755 × A3525RR) BC1F₁ 雑種の 5 個体中、3 個体は、*cp4 epsps* 遺伝子を持っていたが正常であったからである。さらに、*cp4 epsps* 遺伝子は、形態とは無関係な、ありふれた植物代謝産物を合成する酵素をコードしている (OECD 1999)。もし、そのような異常な植物が自然生息地に現れたとしても、少数の種子しか生産しなければ、その子孫は消滅するだろう。

開花期の重なりは、野外における交雑にとって重要な要因である。F₁、F₂ 及び F₃ 雑種の開花期は親または祖先のツルマメ及びダイズの間なので (補足図 1)、これらの雑種はさらにツルマメ及び/またはダイズと交雑するかもしれない。一方、BC2F₁ 及び BC2F₂ 雑種の開花期は、親のツルマメ系統で観察されたものに類似しており、しがって、それらは戻し交雑可能である。ダイズの開花期は播種日により変更可能であることと、GM ダイズ種子の意図しない散布が輸送中に季節を問わず起こりうることに注意すべきである。*cp4 epsps* 遺伝子は、開花期に有意な影響を与えなかった (補足図 1)。

個体群の適応度は、自然生息地において同じ生活環ステージで計測した子の数と親の数の比で定義される。それゆえに、繁殖力は適応度に影響を与える基本的な要因である。全体として、F₁、F₂ 及び F₃ 雑種はツルマメとダイズの中間の繁殖力を示し、戻し交配雑種はツルマメに類似した繁殖力を示した (図 3)。一個体当たり種子数の違いは、一莢当たり種子数

の違いではなく、一個体当たり莢数の違いによると思われる（補足表 11, 12）。重要なことだが、*cp4 epsps* 遺伝子は一個体当たり種子数に有意な影響を与えなかった（図 3）。

本研究の結果に基づき、我々は、ツルマメとダイズ由来の遺伝子をそれぞれ半分ずつ含む雑種は、ツルマメとダイズの中間の適応度を持つのに対し、ツルマメへ 2 回、戻し交配した雑種はツルマメに類似した適応度を持つということを提唱する。さらに、*cp4 epsps* 遺伝子は、雑種において安定に遺伝するが、グリホサート処理なしでは適応度に影響を与えないということを提唱する。Kitamoto ら（2012）は、中立の導入遺伝子がダイズからツルマメへ移る頻度を、生産種子数と越冬性についての適応度関連の量的形質遺伝子座（QTL）との連鎖を考慮して予測するモデルを発表した。*cp4 epsps* 遺伝子の影響はグリホサート処理なしでは中立であるという我々の結果に基づき、彼らのモデルは *cp4 epsps* 遺伝子に適用可能である。しかしながら、*cp4 epsps* 遺伝子は低温処理後の生存率（表 3）や分離世代での生産種子数（図 3）に影響を与えなかった。これは、GM ダイズ 40-3-2 系統のゲノムにおける *cp4 epsps* 遺伝子の位置は不明であるが、生産種子数と越冬性についての適応度関連 QTL とこの導入遺伝子は連鎖していないことを示唆している。

謝辞

ご助言を頂いた農業環境技術研究所の松尾和人博士と筑波大学の澤良博士に感謝いたします。また、純系のツルマメ種子を提供していただいた農業生物資源研究所の加賀秋人博士に感謝いたします。また、GM 及び非 GM ダイズの種子を提供していただいたモンサント・カンパニーとツルマメ系統の種子を提供していただいた農業生物資源ジーンバンクに感謝いたします。本研究は、環境省、及び農林水産省委託プロジェクト「遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究」により資金提供されました。

引用文献

Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnol* 20: 567–574

Fujita R, Ohara M, Okazaki K, Shimamoto Y (1997) The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*). *J Hered* 88: 124–128

James C (2011) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011*. ISAAA Brief No. 43. ISAAA, Ithaca

Kiang YT, Chiang YC, Kaizuma N (1992) Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate Prefecture, Japan. *J Hered* 83: 325–329

Kitamoto N, Kaga A, Kuroda Y, Ohsawa R (2012) A model to predict the frequency of integration of fitness-related QTLs from cultivated to wild soybean. *Transgenic Res* 21: 131–138

- Kooter JM, Matzke MA, Meyer P (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci* 4: 340–347
- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA (2008) Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Sci* 48: 1071–1079
- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D (2010) The origin and fate of morphological intermediates between wild and cultivated soybeans in their natural habitats in Japan. *Mol Ecol* 19: 2346–2360
- Mizuguti A, Ohigashi K, Yoshimura Y, Kaga A, Kuroda Y, Matsuo K (2010) Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environ Biosafety Res* 9: 13–23
- Mizuguti A, Yoshimura Y, Matsuo K (2009) Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biol Manag* 9: 93–96
- Moïse JA, Han S, Gudynaitė-Savitch L, Johnson DA, Miki BLA (2005) Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 41: 620–644
- Nakayama Y, Yamaguchi H (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soya*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biol Manag* 2: 25–30
- OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. <http://www.oecd.org/dataoecd/17/11/46815618.pdf>
- OECD (2000) Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2000\)9&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2000)9&doclanguage=en)
- Sakamoto S, Abe J, Kanazawa A, Shimamoto Y (2004) Marker-assisted analysis for soybean hard seededness with isozyme and simple sequence repeat loci. *Breed Sci* 54: 133–139
- Warwick SI, Beckie HJ, Hall LM (2009) Gene flow, invasiveness, and ecological impact of genetically modified crops. *Ann NY Acad Sci* 1168: 72–99

Zhou S, Sekizaki H, Yang Z, Sawa S, Pan J (2010) Phenolics in the seed coat of wild soybean (*Glycine soja*) and their significance for seed hardness and seed germination. *J Agric Food Chem* 58: 10972–10978

表 1. 本研究で調べた雑種

雑種	供試植物数
(那須-5 × A3244) F ₁	6
(那須-5 × A3244RR) F ₁	6
(那須-5 × A3525) F ₁	6
(那須-5 × A3525RR) F ₁	2
(JP110755 × A3244) F ₁	6
(JP110755 × A3244RR) F ₁	2
(JP110755 × A3525) F ₁	6
(JP110755 × A3525RR) F ₁	1
(那須-5 × A3244) F ₂	15, 18
(那須-5 × A3244RR) F ₂	30, 30**
(那須-5 × A3525) F ₂	36*
(那須-5 × A3525RR) F ₂	60*, 57**
(那須-5 × A3244RR) F ₃	32, 60**, 100**
(JP110755 × A3244RR) BC1F ₁	5
(JP110755 × A3525RR) BC1F ₁	5
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	5
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂	20, 120*, 66**
(純系那須-5 × A3244) F ₁	10~ 52
(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	10~ 22
(純系 JP110755 × A3244) F ₁	10~ 133
(純系 JP110755 × A3244RR) F ₁	10~ 78

雑種名は次のことを表している：(交配の種子親 × 交配の花粉親) 雑種の世代。戻し交配 (BC) は種子親を用いて行われた。

*種子の低温耐性を調べた植物。

***cp4 epsps* 遺伝子の遺伝を調べた植物。

表 2. CP4 EPSPS-陽性 (+) と陰性 (-) の表現型の分離と、メンデル式分離についてのカイ 2 乗検定の上側累積確率 (*P*)

雑種	CP4 (+)	CP4 (-)	<i>P</i>
(那須-5 × A3244RR) F ₂	21	9	0.53
(那須-5 × A3525RR) F ₂	43	14	0.94
(那須-5 × A3244RR) F ₃	39	21	0.074
(那須-5 × A3244RR) F ₃	79	21	0.36
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂	45	21	0.20

F₃ 植物はへミ接合の F₂ 親から得られた。

表 3. 低温処理後に生き残った CP4 EPSPS-陽性 (+) と -陰性 (-) の植物数と、メンデル式分離についてのカイ 2 乗検定の上側累積確率 (*P*)

雑種	生き残った形	CP4 (+)	CP4 (-)	<i>P</i>
(那須-5 × A3525RR) F ₂	実生	22	7	0.91
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂	実生	16	7	0.55
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂	休眠種子	39	10	0.46

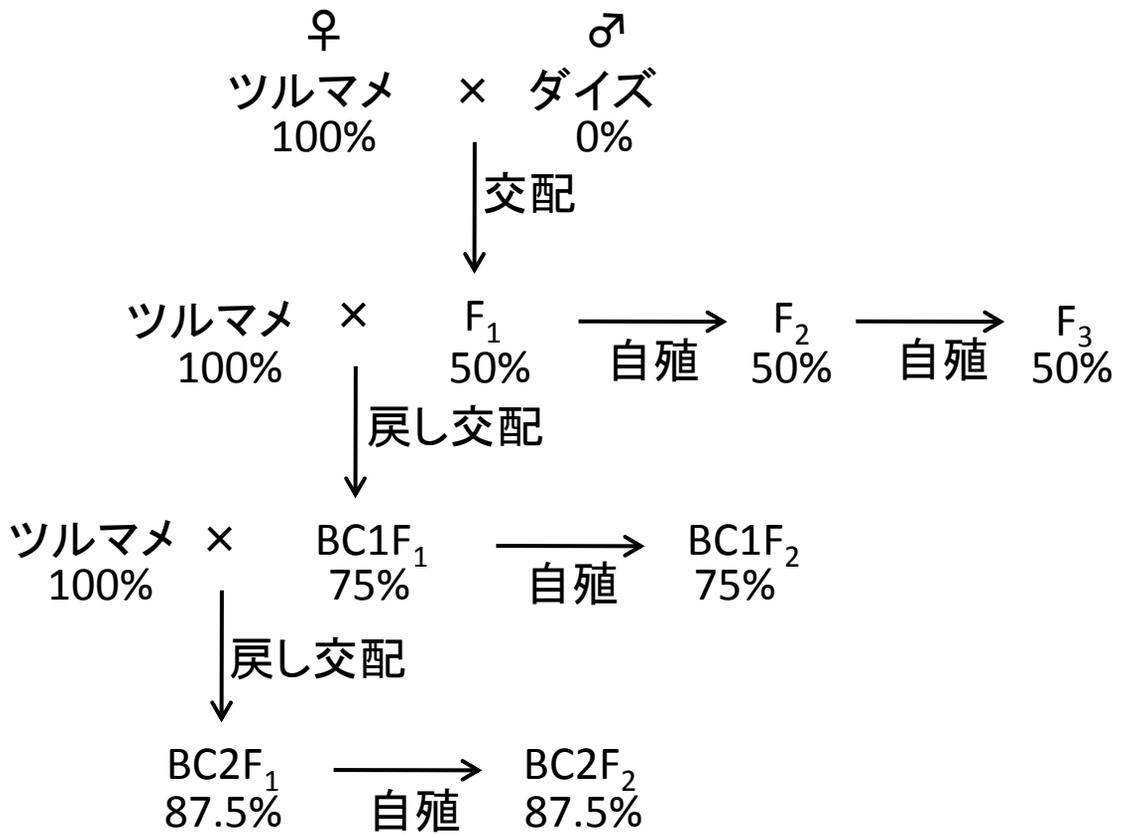


図1. ツルマメとダイズの雑種の作成。ゲノム中のツルマメ由来の遺伝子の期待される百分率が示されている。

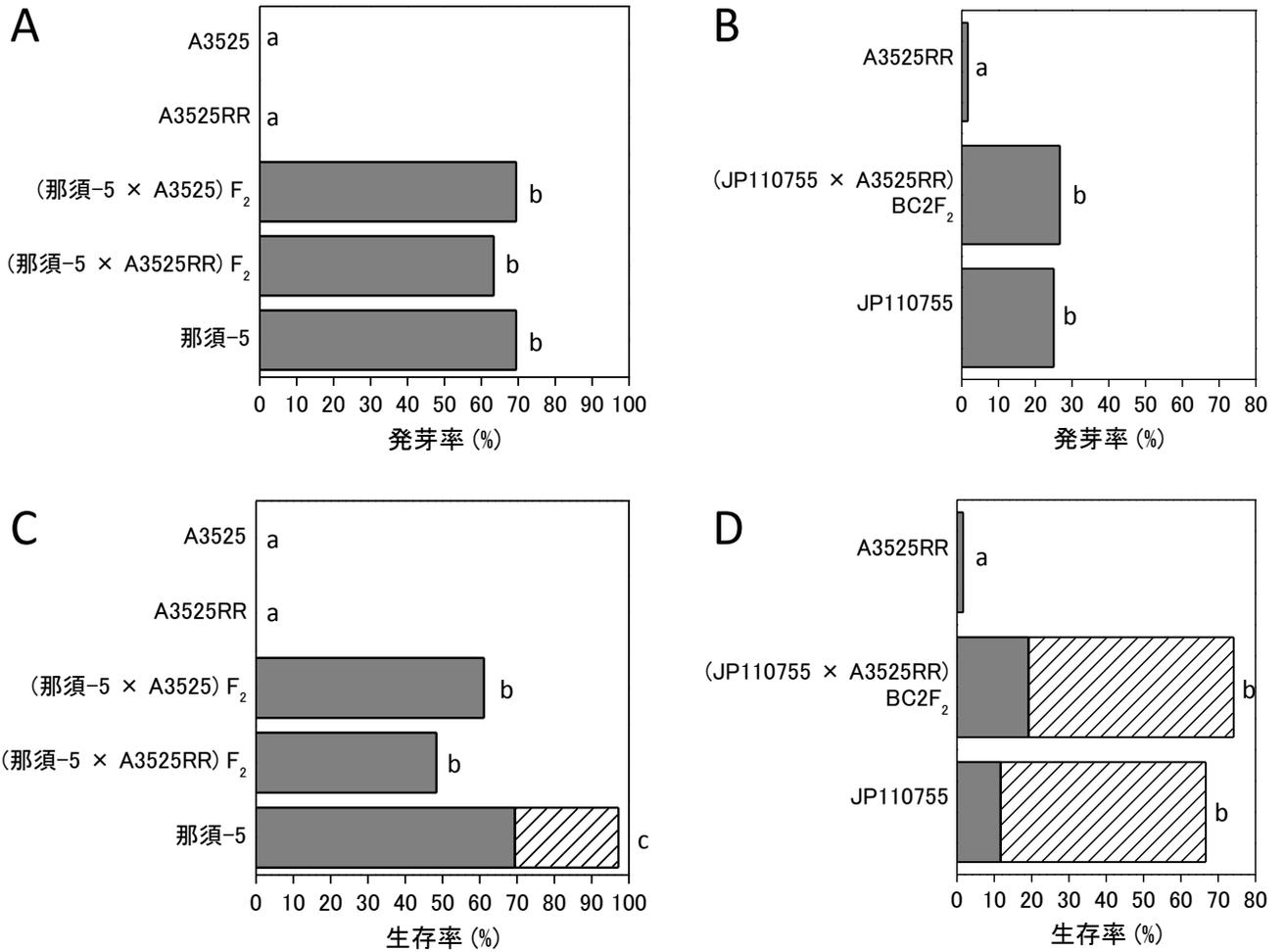


図2. 低温処理後1ヶ月での発芽率と生存率。F₂ (A, C) 及びBC2F₂ (B, D) 雑種は、それらが由来するツルマメ及びダイズとともに播種され、4°Cで暗所に3ヶ月間置かれ、発芽率 (A, B) と休眠種子 (斜線の棒) を含む生存率 (C, D) を調べるために25°Cで1ヶ月間栽培された。棒の右の同じ文字は、Ryanの多重比率比較のための有意差検定を用いて判定した有意差がないことを示している ($p < 0.05$)。

実験

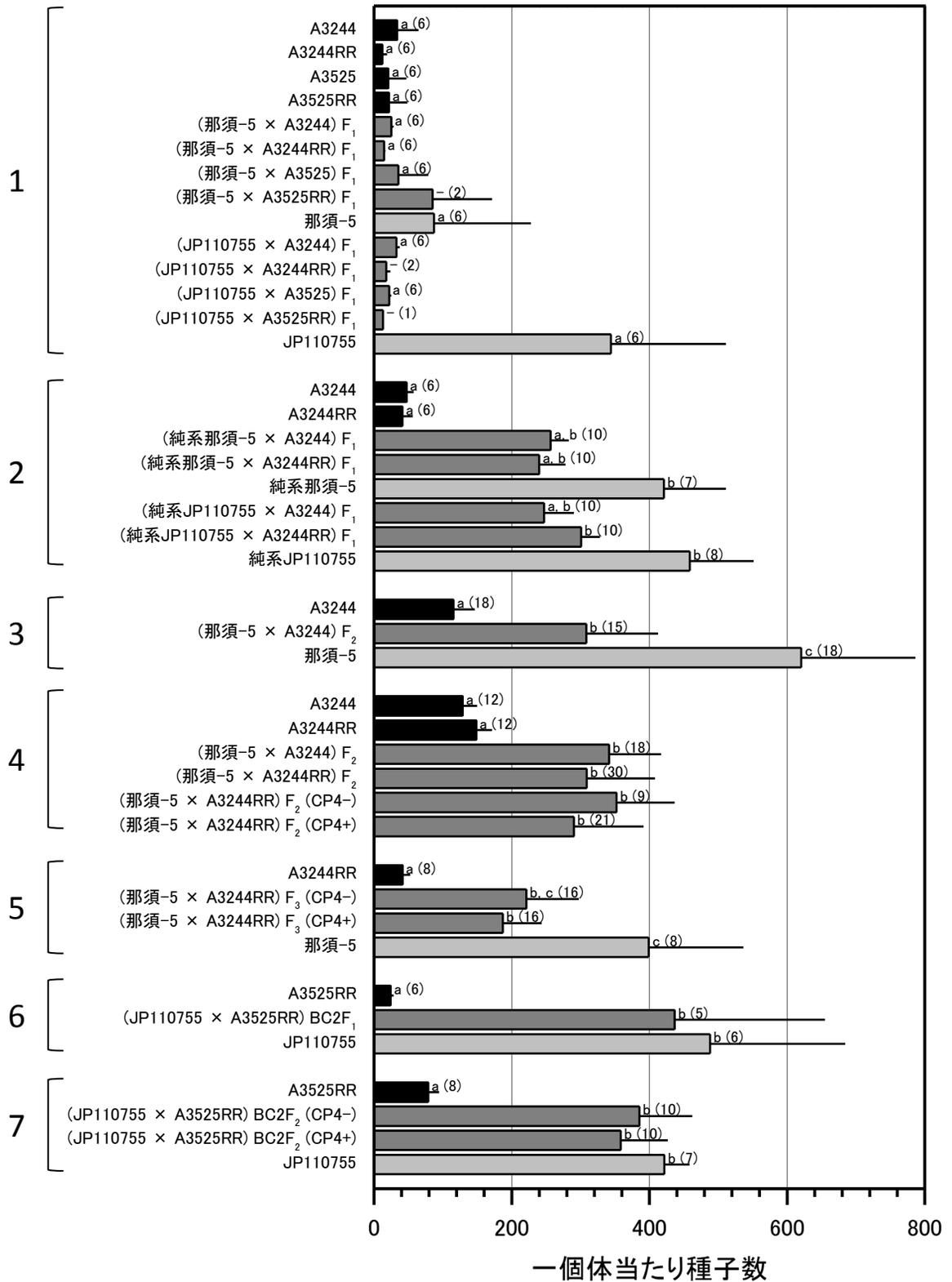


図3. 一個体当たり生産された種子数。実験グループが左に示されている。黒（ダイズ）、灰色（雑種）及び明るい灰色（ツルマメ）の棒は、左に表示された植物一個体当たりの平均自殖種子数を表している。エラーバーは標準偏差を表している。棒の右の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した、グループ内の有意差がないことを表している（ $p < 0.05$; 標本数nはその文字の後の括弧内に示されている）。標本数が少ないために統計解析から除外したデータは、棒の右の「-」で示されている。

補足表1. 3通りの方法を用いた*cp4 epsps* 遺伝子とその発現の検出

雑種	個体番号	CP4 EPSPS	<i>cp4 epsps</i>	グリホサート耐性
(那須-5 × A3525RR) F ₂	1	+	+	+
	4-7, 9	+	nd	+
	10, 11	+	+	+
	12-16, 18-21, 23, 25, 27 -30, 32-34, 36, 39, 41, 43-46, 49-54, 56, 58-60	+	nd	+
	2, 3, 8, 17, 22, 24, 26, 31, 35, 37, 42, 48, 55, 57	-	-	-
(那須-5 × A3244RR) F ₃	1-3	+	+	+
	5, 9, 11, 12, 14-23, 26, 28, 29, 31, 32, 34-37, 40, 41, 43, 44, 46, 48-50, 53 -55, 57, 59	+	nd	+
	4, 6-8, 10, 13, 24, 25, 27, 30, 33, 38, 39, 42, 45, 47, 51, 52, 56, 58, 60	-	-	-

nd, 未測定

F₃植物はヘミ接合のF₂親から得られた。

補足表2. 25°Cで播種後1ヶ月での供試植物の発芽率

植物	発芽 / 播種 種子数	発芽率 (%)	種子の休眠を 打破する処理	播種日
A3244	40/41	98	無	5/25/2007
A3244	12/12	100	無	6/4/2010
A3244RR	18/18	100	無	5/25/2007
A3244RR	15/15	100	無	5/23/2008
A3244RR	12/12	100	無	6/4/2010
A3525	23/36	64	無	11/30/2007
A3525	35/36	97	無	12/19/2008
A3525RR	35/36	97	無	11/30/2007
A3525RR	10/10	100	有	6/5/2009
A3525RR	16/16	100	有	5/28/2010
(純系那須-5 × A3244) F ₁	52/(52 + 2*)	≥ 96	有	6/4/2010
(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	23/23	100	有	6/4/2010
(純系JP110755 × A3244) F ₁	133/133	100	有	6/4/2010
(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	78/(78 + 2*)	≥ 98	有	6/4/2010
(那須-5 × A3244) F ₂	33/60	55	無	5/25/2007
(那須-5 × A3244RR) F ₂	30/36	83	無	5/25/2007
(那須-5 × A3525) F ₂	35/36	97	無	8/10/2007
(那須-5 × A3525RR) F ₂	57/60	95	無	1/12/2007
(那須-5 × A3244RR) F ₃	60/60	100	有#	1/25/2008
(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	21/21	100	無	5/23/2008
(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	79/79	100	無	5/23/2008
(JP110755 × A3244RR) BC1F ₁	6/6	100	有	7/18/2008 – 8/29/2008
(JP110755 × A3525RR) BC1F ₁	5/6	83	有	7/18/2008 – 8/29/2008
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	7/11	64	有	6/5/2009
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	19/20	95	有	5/28/2010
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	20/20	100	有	5/28/2010
那須-5	30/30	100	有	5/25/2007
那須-5	17/36	47	無	9/28/2007
那須-5	14/15	93	有	5/23/2008
純系那須-5	11/11	100	有	6/4/2010
JP110755	16/17	94	有	6/5/2009
JP110755	12/16	75	有	5/28/2010
JP110755	19/30	63	有	2/3/2012
JP110755	21/30	70	無	2/3/2012
純系JP110755	12/12	100	有	6/4/2010

*, 未発芽未同定種子

#, ツルマメに似た7粒の種子について

補足表3. 草丈

実験	植物	播種後日数	草丈 ± SD (cm)	植物数	統計的 有意差
1	A3244	52	36.4 ± 2.6	6	a
	A3244RR	52	33.3 ± 0.9	6	a
	A3525	52	37.7 ± 4.5	6	a
	A3525RR	52	37.2 ± 3.2	6	a
	(那須-5 × A3244) F ₁	52	74.9 ± 8.7	6	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₁	52	65.2 ± 25.9	6	a
	(那須-5 × A3525) F ₁	52	71.1 ± 9.5	6	a
	(那須-5 × A3525RR) F ₁	52	61.3 ± 1.1	2	-
	那須-5	52	64.7 ± 8.7	6	a
	(JP110755 × A3244) F ₁	52	43.7 ± 3.0	6	a
	(JP110755 × A3244RR) F ₁	52	25.0 ± 10.1	2	-
	(JP110755 × A3525) F ₁	52	36.3 ± 6.3	6	a
	(JP110755 × A3525RR) F ₁	52	25.5	1	-
	JP110755	52	67.4 ± 9.0	6	a
2	A3244	42	19.9 ± 1.3	11	a, b, d
	A3244RR	42	17.6 ± 1.1	9	a, b, d
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	42	28.5 ± 16.6	52	b, c
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	42	28.0 ± 18.9	22	a, b, c
	純系那須-5	42	77.0 ± 10.1	11	d
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	42	14.5 ± 5.5	133	a
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	42	20.0 ± 9.9	78	b
	純系JP110755	42	55.2 ± 7.8	11	c, d
3	A3244	49	20.3 ± 2.7	18	a
	(那須-5 × A3244) F ₂	49	25.2 ± 11.6	15	a
	那須-5	49	49.3 ± 16.7	18	b
4	A3244	49	19.0 ± 4.1	12	a
	A3244RR	49	19.4 ± 3.2	12	a
	(那須-5 × A3244) F ₂	49	46.8 ± 31.1	18	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	49	26.3 ± 19.2	30	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	49	28.3 ± 20.3	9	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	49	25.4 ± 19.1	21	a
5	A3244RR	62	25.9 ± 2.6	8	a, b
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	62	35.4 ± 20.7	16	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	62	24.1 ± 11.2	16	a
	那須-5	62	60.6 ± 17.4	8	b

6	A3525RR	61	35.5 ± 3.7	6	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	61	41.7 ± 22.3	5	a, b
	JP110755	61	62.4 ± 9.6	6	b
7	A3525RR	28	19.2 ± 1.8	8	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	28	50.7 ± 16.5	10	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	28	52.4 ± 14.9	10	b
	JP110755	28	44.8 ± 9.5	5	a, b

草丈(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。標本数が少ないために統計解析から除外したデータは「-」で示されている。

補足表4. Fisherの正確確率検定によるCP4 EPSPSタンパク質と蔓の存在との間の独立性の検定

雑種	播種後日数	蔓のある植物数	蔓のない植物数	両側 <i>P</i> 値
(那須-5 × A3244) F ₂	68	31	2	0.66
(那須-5 × A3244RR) F ₂	68	27	3	
(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	68	8	1	1.00
(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	68	19	2	
(那須-5 × A3525RR) F ₂ (CP4-)	45	17	26	0.11
(那須-5 × A3525RR) F ₂ (CP4+)	45	2	12	
(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	60	7	32	1.00
(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	60	4	17	
(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	42	5	16	0.32
(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	42	11	68	

F₃植物はヘミ接合のF₂親から得られた。

補足表5. 蔓を含む茎の性質

特徴	植物	播種後 日数	スコア ± SD	植物数	統計的 有意差
紫色の程度					
	A3244	67	2.0 ± 0	30	a
	A3244RR	67	2.0 ± 0	12	a
	(那須-5 × A3244) F ₂	67	3.2 ± 0.9	33	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	67	3.3 ± 0.9	30	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	67	3.2 ± 1.0	9	a, b
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	67	3.3 ± 0.8	21	b
	那須-5	67	4.0 ± 0	18	b
太さ					
	A3244	68	4.0 ± 0	30	a
	A3244RR	68	4.0 ± 0	12	a
	(那須-5 × A3244) F ₂	68	3.0 ± 0.3	33	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	68	3.0 ± 0.3	30	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	68	3.0 ± 0	9	b, c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	68	3.0 ± 0.3	21	b
	那須-5	68	2.0 ± 0	18	c
毛の長さ					
	A3244	68	4.0 ± 0	30	a
	A3244RR	68	4.0 ± 0	12	a, b
	(那須-5 × A3244) F ₂	68	3.2 ± 0.6	33	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	68	3.1 ± 0.5	30	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	68	3.0 ± 0	9	b, c, d
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	68	3.1 ± 0.6	21	c
	那須-5	68	2.0 ± 0	18	d

茎の特徴は各植物に目視で1～5点のスコアをつけることにより評価した。平均スコアと標準偏差が示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している ($p < 0.05$)。

補足表6. 葉の大きさ

実験	植物	播種後 日数	大きさ ± SD (cm)	植物数	統計的 有意差
2	A3244	96	11.0 ± 1.1	6	b, c
	A3244RR	96	10.2 ± 2.5	6	a, b, c
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	103	11.7 ± 0.7	10	c
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	103	11.1 ± 0.7	10	b, c
	純系那須-5	117, 118	8.7 ± 0.7	7	a, b, c
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	115	8.8 ± 0.6	10	a, b
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	115	8.9 ± 0.6	10	a, b, c
	純系JP110755	132	6.1 ± 0.3	8	a
3	A3244	125	12.7 ± 0.9	18	b
	(那須-5 × A3244) F ₂	139	12.0 ± 1.3	15	b
	那須-5	181	8.7 ± 0.9	18	a
4	A3244	125	13.3 ± 1.0	12	a, c
	A3244RR	125	13.4 ± 0.7	12	c
	(那須-5 × A3244) F ₂	140, 161	13.2 ± 1.4	18	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	140, 161	11.1 ± 2.1	30	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	140, 161	11.0 ± 1.7	9	a, b, c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	140, 161	11.1 ± 2.3	21	a, b
5	A3244RR	108	9.5 ± 1.1	8	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	150	9.1 ± 1.3	16	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	150	9.1 ± 1.5	16	b
	那須-5	159	6.9 ± 0.7	8	a
6	A3525RR	104	6.9 ± 0.6	6	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	129	5.3 ± 0.9	5	a
	JP110755	129	5.3 ± 0.8	6	a
7	A3525RR	101	8.1 ± 0.8	8	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	146	6.3 ± 0.8	10	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	146	6.7 ± 0.8	10	a, b
	JP110755	146	6.2 ± 0.3	5	a

各成熟植物から目視で選んだ最大の三出葉の頂小葉の葉身長で表される葉の大きさ(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。

補足表7. 最終根元直径

実験	植物	直径 ± SD (mm)	植物数	統計的 有意差
1	A3244	3.8 ± 0.6	6	a
	A3244RR	3.3 ± 0.3	6	a
	A3525	3.3 ± 0.5	6	a
	A3525RR	3.6 ± 0.7	6	a
	(那須-5 × A3244) F ₁	2.4 ± 0.1	6	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₁	2.5 ± 0.4	6	a
	(那須-5 × A3525) F ₁	2.2 ± 0.3	6	a
	(那須-5 × A3525RR) F ₁	2.9 ± 0.5	2	-
	那須-5	2.0 ± 0.4	6	a
	(JP110755 × A3244) F ₁	2.9 ± 0.2	6	a
	(JP110755 × A3244RR) F ₁	2.4 ± 0.1	2	-
	(JP110755 × A3525) F ₁	2.4 ± 0.2	6	a
	(JP110755 × A3525RR) F ₁	2.6	1	-
	JP110755	2.4 ± 0.5	6	a
2	A3244	4.4 ± 0.5	6	b, c
	A3244RR	4.6 ± 1.0	6	b, c
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	3.4 ± 0.5	10	a, b
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	3.3 ± 0.4	10	a, b
	純系那須-5	2.3 ± 0.3	7	a
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	4.8 ± 0.5	10	c
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	4.5 ± 0.5	10	b, c
	純系JP110755	4.0 ± 0.8	8	a, b, c
3	A3244	7.8 ± 1.2	18	c
	(那須-5 × A3244) F ₂	4.5 ± 1.0	15	b
	那須-5	2.8 ± 0.4	18	a
4	A3244	8.9 ± 1.6	12	b
	A3244RR	10.5 ± 0.9	12	b
	(那須-5 × A3244) F ₂	4.6 ± 0.8	18	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	5.0 ± 1.0	30	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	4.8 ± 0.7	9	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	5.1 ± 1.1	21	a
5	A3244RR	5.7 ± 0.7	8	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	4.7 ± 0.8	16	b, c
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	4.2 ± 0.7	16	b
	那須-5	2.2 ± 0.1	8	a

6	A3525RR	4.8 ± 0.1	2	-
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	3.8 ± 0.5	5	a
	JP110755	4.1 ± 0.4	6	a
7	A3525RR	6.9 ± 0.8	8	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	4.7 ± 0.5	10	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	5.3 ± 0.4	10	a, b
	JP110755	4.4 ± 0.4	5	a

根元直径(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。標本数が少ないために統計解析から除外したデータは「-」で示されている。

補足表8. 蔓を含む総茎長

植物	総茎長 ± SD (cm)	植物数	統計的 有意差
A3244	63.9 ± 27.6	6	a
A3244RR	40.7 ± 2.9	6	a
A3525	57.3 ± 39.2	6	a
A3525RR	60.6 ± 38.9	6	a
(那須-5 × A3244) F ₁	289.3 ± 41.6	6	a, b
(那須-5 × A3244RR) F ₁	207.2 ± 77.9	6	a, b
(那須-5 × A3525) F ₁	326.7 ± 174.8	6	a, b
(那須-5 × A3525RR) F ₁	705.0 ± 744.6	2	-
那須-5	1076.8 ± 1698.6	6	a, b
(JP110755 × A3244) F ₁	258.3 ± 43.8	6	a, b
(JP110755 × A3244RR) F ₁	121.8 ± 21.6	2	-
(JP110755 × A3525) F ₁	210.8 ± 7.4	6	a, b
(JP110755 × A3525RR) F ₁	150.0	1	-
JP110755	4160.3 ± 2403.0	6	b

植物が枯死した後で各植物の総茎長(平均 ± 標準偏差)が計測された。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。標本数が少ないために統計解析から除外したデータは「-」で示されている。

補足表9. 最終地上部乾重量

実験	植物	乾重量 ± SD (g)	植物数	統計的 有意差
2	A3244	2.0 ± 0.5	6	a, b
	A3244RR	1.7 ± 0.6	6	a
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	5.2 ± 1.5	10	a, b, d
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	4.8 ± 1.3	10	a, b, c
	純系那須-5	9.3 ± 2.7	7	c, d
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	6.3 ± 1.6	10	a, b, d
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	7.3 ± 1.0	10	b, d
	純系JP110755	12.3 ± 1.3	8	d
3	A3244	4.1 ± 1.6	18	a
	(那須-5 × A3244) F ₂	12.3 ± 5.1	15	b
	那須-5	21.6 ± 9.3	18	b
4	A3244	5.7 ± 2.0	12	a
	A3244RR	9.2 ± 2.2	12	a, b
	(那須-5 × A3244) F ₂	26.6 ± 11.3	18	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂	23.6 ± 9.9	30	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4-)	27.4 ± 7.8	9	c
	(那須-5 × A3244RR) F ₂ (CP4+)	22.0 ± 10.4	21	b, c
5	A3244RR	5.8 ± 2.4	8	a
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4-)	12.4 ± 6.0	16	b
	(那須-5 × A3244RR) F ₃ (CP4+)	8.6 ± 5.9	16	a, b
	那須-5	8.1 ± 2.5	8	a, b
6	A3525RR	3.5 ± 1.5	2	-
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	8.7 ± 3.9	5	a
	JP110755	9.8 ± 3.7	6	a
7	A3525RR	4.9 ± 1.6	8	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	18.5 ± 2.8	10	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	20.5 ± 2.2	10	b
	JP110755	19.5 ± 2.1	5	b

地上部乾重量(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。標本数が少ないために統計解析から除外したデータは「-」で示されている。

補足表10. Fisherの正確確率検定を用いたCP4 EPSPSタンパク質と成熟した莢の色との間の独立性の検定

雑種	濃褐色の莢を付けた 植物数	淡褐色の莢を付けた 植物数	両側 <i>P</i> 値
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4 ⁻)	8	2	1.00
(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4 ⁺)	7	3	

補足表11. 一個体当たり莢数

実験	植物	一個体当たり莢数 ± SD	植物数	統計的 有意差
2	A3244	20.5 ± 4.6	6	a
	A3244RR	18.8 ± 5.9	6	a
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	103.4 ± 12.2	10	a, b
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	98.7 ± 19.3	10	a, b
	純系那須-5	182.7 ± 42.2	7	b
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	103.9 ± 19.4	10	a, b
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	131.0 ± 8.7	10	b
	純系JP110755	205.9 ± 24.8	8	b
6	A3525RR	11.3 ± 1.2	6	a
	(JP110755 × A3525RR) BC ₂ F ₁	195.8 ± 99.4	5	b
	JP110755	217.7 ± 81.5	6	b
7	A3525RR	35.4 ± 5.8	8	a
	(JP110755 × A3525RR) BC ₂ F ₂ (CP4-)	166.9 ± 31.1	10	b
	(JP110755 × A3525RR) BC ₂ F ₂ (CP4+)	161.6 ± 31.0	10	b
	JP110755	192.0 ± 18.6	5	b

一個体当たり莢数(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。

補足表12. 一莢当たり種子数

実験	植物	一莢当たり種子数 ± SD	植物数	統計的 有意差
2	A3244	2.3 ± 0.1	6	a, b
	A3244RR	2.1 ± 0.2	6	a
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	2.5 ± 0.1	10	b
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	2.4 ± 0.1	10	a, b
	純系那須-5	2.3 ± 0.1	7	a, b
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	2.4 ± 0.2	10	a, b
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	2.3 ± 0.1	10	a, b
	純系JP110755	2.2 ± 0.2	8	a, b
6	A3525RR	2.1 ± 0.2	6	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	2.3 ± 0.1	5	a
	JP110755	2.2 ± 0.1	6	a
7	A3525RR	2.2 ± 0.2	8	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	2.3 ± 0.1	10	a
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	2.2 ± 0.1	10	a
	JP110755	2.2 ± 0.1	5	a

一莢当たり種子数(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。

補足表13. 一個体当たり種子総重量

実験	植物	一個体当たり種子 総重量 \pm SD (g)	植物数	統計的 有意差
2	A3244	9.7 \pm 2.4	6	a, b
	A3244RR	7.6 \pm 2.8	6	a
	(純系那須-5 \times A3244) F ₁	16.8 \pm 1.5	10	b, c
	(純系那須-5 \times A3244RR) F ₁	14.5 \pm 2.2	10	a, c
	純系那須-5	10.3 \pm 2.1	7	a, b
	(純系JP110755 \times A3244) F ₁	15.0 \pm 3.0	10	a, c
	(純系JP110755 \times A3244RR) F ₁	18.2 \pm 1.4	10	c, d
	純系JP110755	11.1 \pm 2.3	8	a, b
6	A3525RR	3.6 \pm 1.4	6	a
	(JP110755 \times A3525RR) BC2F ₁	12.4 \pm 7.6	5	a
	JP110755	11.5 \pm 4.7	6	a
7	A3525RR	15.0 \pm 3.2	8	b
	(JP110755 \times A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	9.5 \pm 2.6	10	a, b
	(JP110755 \times A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	8.0 \pm 1.8	10	a
	JP110755	8.2 \pm 1.1	5	a

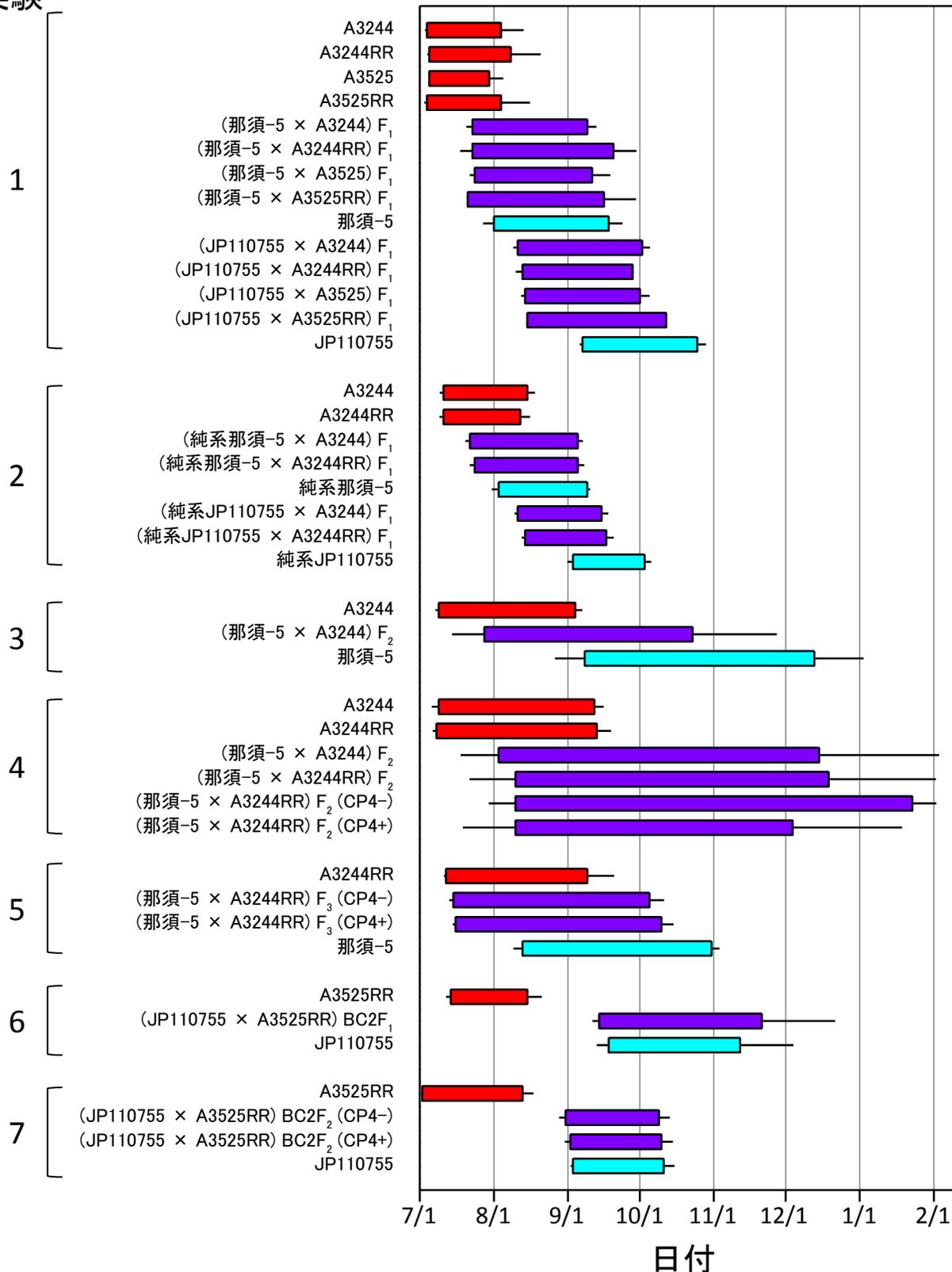
一個体当たり種子総重量(平均 \pm 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。

補足表14. 一粒当たり種子重

実験	親植物	一粒当たり種子重 ± SD (mg)	植物数	統計的 有意差
2	A3244	205.8 ± 14.3	6	b
	A3244RR	188.2 ± 10.7	6	b
	(純系那須-5 × A3244) F ₁	65.8 ± 6.3	10	b
	(純系那須-5 × A3244RR) F ₁	60.8 ± 3.9	10	a, b
	純系那須-5	24.5 ± 0.8	7	a
	(純系JP110755 × A3244) F ₁	60.7 ± 3.0	10	a, b
	(純系JP110755 × A3244RR) F ₁	60.8 ± 3.3	10	a, b
	純系JP110755	24.4 ± 2.9	8	a
6	A3525RR	147.3 ± 32.9	6	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₁	26.4 ± 6.2	5	a, b
	JP110755	23.4 ± 1.4	6	a
7	A3525RR	191.2 ± 6.9	8	b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4-)	24.3 ± 2.7	10	a, b
	(JP110755 × A3525RR) BC2F ₂ (CP4+)	22.1 ± 1.5	10	a
	JP110755	19.4 ± 0.8	5	a

一粒当たり種子重(平均 ± 標準偏差)の比較のため、左端の列に実験グループが示されている。右端の列の同じ文字は、Schefféの比較法を用いたKruskal-Wallis検定によって判定した有意差がないことを表している($p < 0.05$)。

実験



補足図1. 供試植物の開花期。実験グループが左に示されている。播種日は、2006年5月22日（実験1）、2010年6月4日（実験2）、2007年5月25日（実験3, 4）、2008年5月23日（実験5）、2009年6月5日（実験6）、及び2010年5月28日（実験7）であった。15 h日長のための補光は、実験1（7月7日に終了）、実験4、及び実験5（9月25日に終了）のために行われた。赤（ダイズ品種）、紫（雑種）、及び青（ツルマメ系統）の棒は、左に表示された植物における平均開花開始日から平均開花終了日までの開花期を表している。エラーバーは標準偏差を表している。

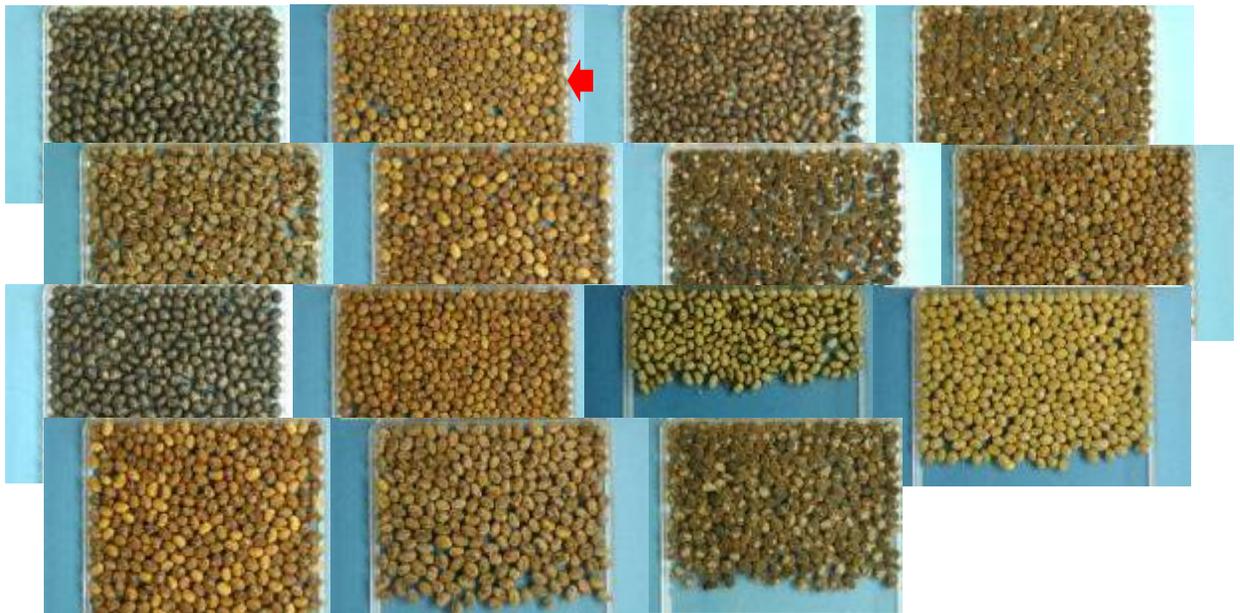


補足図2. GMダイズ、ツルマメ、F₁及びF₂雑種の種子の例。世代名は親植物ではなく種子自身を表している。種子は1 mmの方眼紙の上に置かれた。

(那須-5 x A3244RR) F₂ *cp4 epsps* (-/-) 由来



(那須-5 x A3244RR) F₂ *cp4 epsps* (+/-) 由来



(那須-5 x A3244RR) F₂ *cp4 epsps* (+/+) 由来



補足図3. F₃雑種種子。F₂植物の*cp4 epsps*遺伝子型の下に、各F₂植物から収穫した種子のプールが示されている。種子を入れたシャーレは内寸96 mm幅であった。赤い矢印は、F₃雑種を調べるために用いた種子のプールを示している。

(那須-5 x A3244RR) F₃ CP4 EPSPS (-) 由来

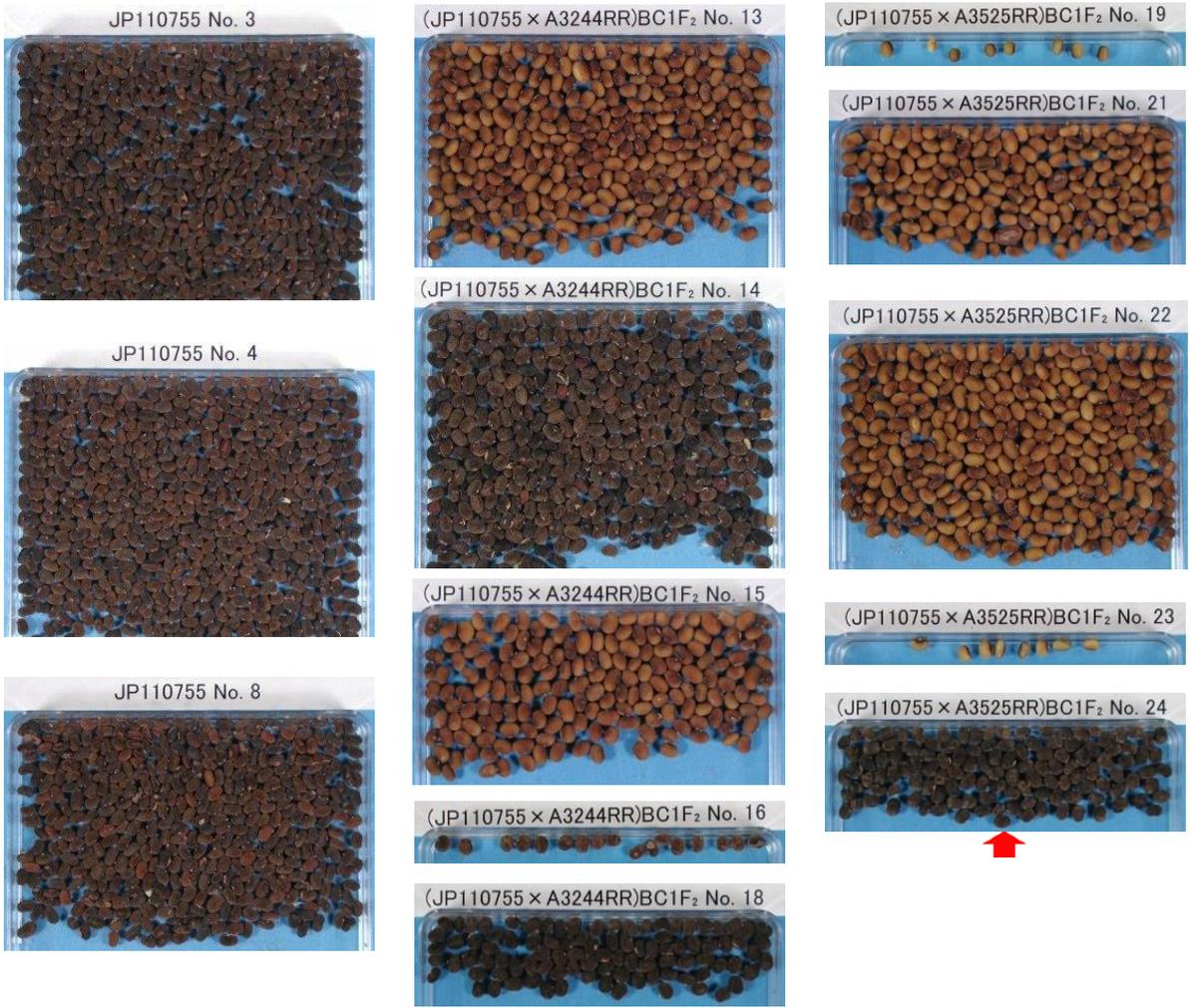


(那須-5 x A3244RR) F₃ CP4 EPSPS (+) 由来

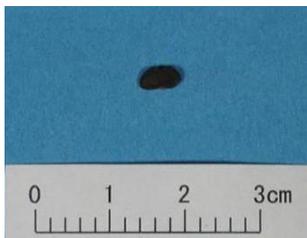


補足図4. F₄雑種種子。F₃植物のCP4 EPSPS表現型の下に、各F₃植物から収穫した種子のプールが示されている。種子を入れたシャーレは内寸96 mm幅であった。

A



B



C



D



補足図5. BC1F₂、BC2F₁、BC2F₂、及びBC2F₃雑種種子。(A) JP110755及びBC1F₂種子。種子の色はBC1F₂で分離する。各親植物から収穫した種子のプールが示され、ID番号で区別されている。赤い矢印は、本研究においてBC2F₁、BC2F₂及びBC2F₃雑種の祖先であった、あるBC1F₁植物から収穫した種子のプールを示している。(B) (JP110755 × A3525RR) BC2F₁種子。(C) (JP110755 × A3525RR) BC2F₂種子のプール。(D) (JP110755 × A3525RR) BC2F₃種子のプール。種子を入れたシャーレは内寸96 mm幅であった。