

別紙 3-2 ギンドロ (*Populus alba*) の水平根の調査

調査木；ギンドロ成木（樹高 15m、胸高直径 15cm、森林総合研究所（茨城県つくば市）樹木園の植栽木）

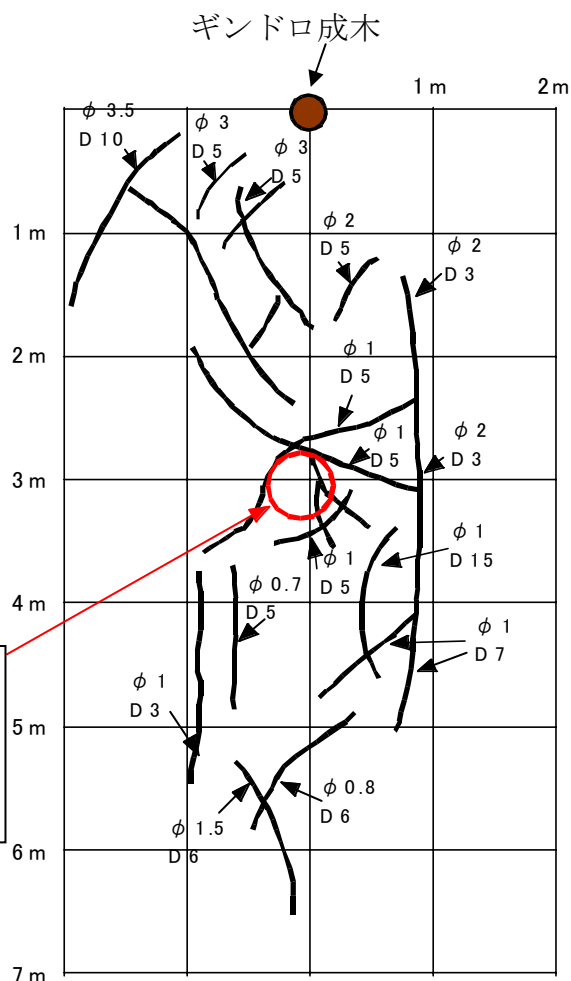
太さ 1～3cm 程の水平根は、地表より 3～15cm の深さを走っていた。また、調査地の一部については、80cm の深さまで掘り下げたが、ギンドロの根は見られなかった。



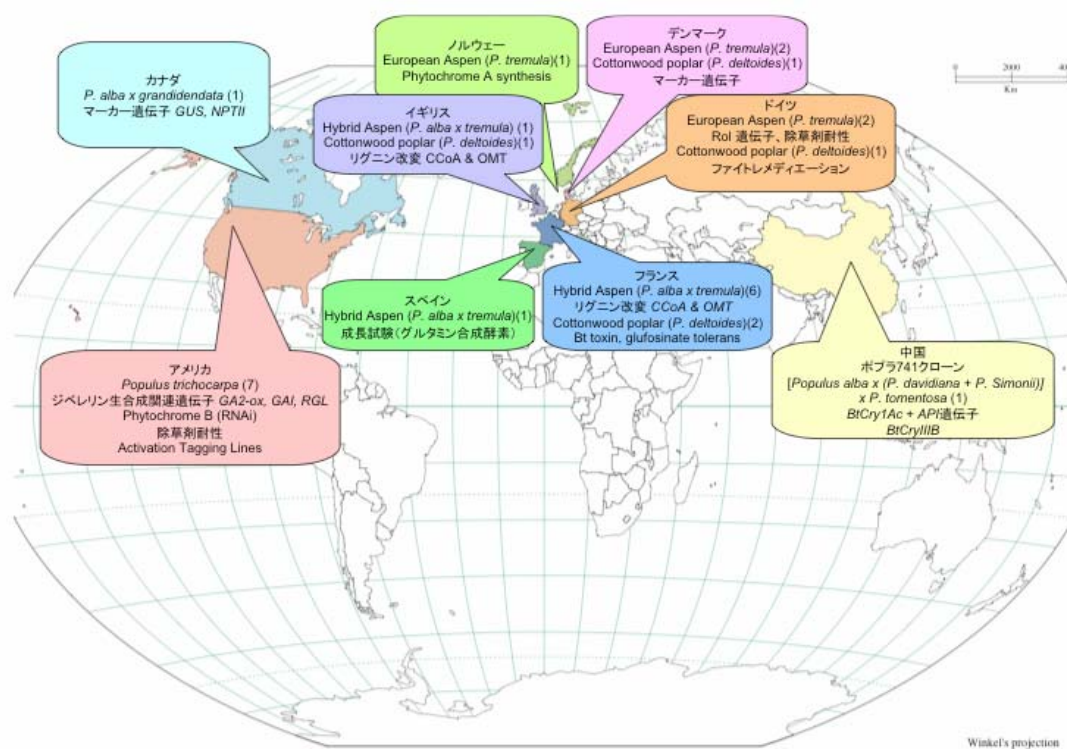
右図の実線は、ギンドロの根を示す（直径と地表面からの深さを cm 単位で併記する）。

赤い円の部分は深さ 80cm まで掘ったが、地表付近の水平根以外の根は見られなかった。

φ；直径、D；地表面からの根の深さ（cm）



別紙 4 ハコヤナギ属遺伝子組換え体の海外での第1種使用例 (件数)



別紙 5 El2-P35S-Ω-PopCel Signal Peptide-AaXEG2 カセットの全塩基配列

aagcttgaacatggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagatacagtcctcagaagaccaaagggtattgagacttttcaaca
aagggtaatatcgggaaacctctcggattccattgccagctatctgtcacttcataaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatg
ccatcattgcgataaaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtgggtccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaa
aagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgataacatgggtggagcacgacactctcgtctactccaagaatatcaaagata El2
cagtcctcagaagaccaaagggtattgagacttttcaacaaagggtaatatcgggaaacctctcggattccattgccagctatctgtcacttcac
aaaaggacagtagaaaaggaaggtggcacctacaaatgccatcattgcgataaaaggaaaggctatcgttcaagatgcctctgccgacagtgggt
ccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgat P35S
atctccact
gacgtaagggtatgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggt Ω
tacgtatttttacaaca
attaccaacaacaacaacaacaacaacattacattttacattctacaactacatctagaggatcctttggagggggaaatggctaatacca ← PopCel1
ctacattttcactaatgttgcaagtttttctcgttaactttttgtgtctgagctatttttagctttgccttcacttctctagagcgccgcagcagcttctcg Signal
gg
tcagtgggataccgccaccgcgggtgacttcacctgtacaacgatctttggggcgagagcgccggcaccgggtcccaagtgcactggagtcgactect Peptide
acagcggcgataccatcgcttggcacaccagctggctcgtcggtcgaggtagcagcagcgtcaagagctatgctaacgccgctctgacctcacccc sequence
caccagctgaactgcattctccagcattcctaccacctggaagtgtgctatactccggctctagcatcgttggcgacgtcgcttacgacacattcctggc
cgaaacgccagcggtcttccaagtacgagatcatggtctggtcgcggcctggggcggtgctggccccatctcgtcgaccggatcgaccatcgcca AaXEG2
ccccgacgattgccggcgtaactggaagctgtactccggcccaacggggacaccacgtctacagcttcgtcgctgactcgaccaccgagagcttc
tccggtgacctgaacgacttctcacctacctggtcgacaacgagggcggtgtccgatgagctgtacctgaccaccctcgagggcggtaccgagccctt
cactggtcgcgacccaagttgacctctccgagtacagcatctccattgagtaaatcaaacgttgagtgtcacggatggccgaccgtgttgctgtg
accgcggctgacggggagaatcactagtgaattcgcggcgctgcaggtcgaccatatgggagagctc

aagctt; *HindIII*

gatatc; *EcoRV*

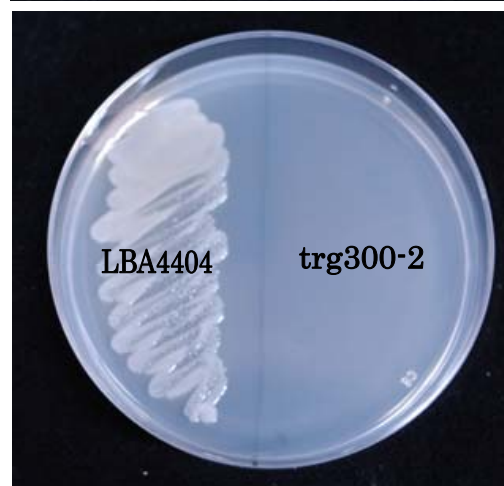
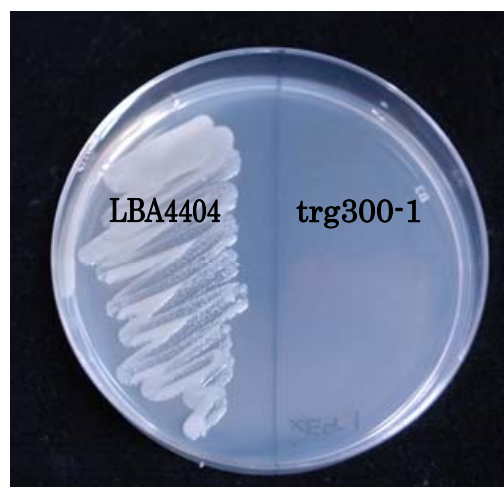
tacgta; *SnaBI*

tctaga; *XbaI*

gagctc; *SacI*

別紙 6 組換えギンドロのアグロバクテリウム残存の有無

組換えギンドロ trg300-1 及び trg300-2 の茎葉（約 200mg）を採取し、滅菌蒸留水 1ml を加えて無菌条件下、乳鉢を用いてすりつぶし、ナイロンメッシュで濾過した濾過液を 50 mg/L カナマイシンを含む培地上に塗布し、28℃、48 時間培養したところ、細菌の増殖は全く見られなかった。



別紙 7 組換えギンドロにおける供与遺伝子の存在状態およびさし木による栄養繁殖個体間の安定性

サザンハイブリダイゼーション (図 1) ; 幼葉 約 20-25mg から抽出したゲノム DNA 5 μ g を制限酵素 *Hind*III で完全切断し、0.8% アガロースで電気泳動した。*AaXEG2* cDNA 全長を PCR-DIG ラベルしたプローブを調製し、化学発光により検出した。その結果、さし木を 2 回繰り返した個体においても移入された *AaXEG2* 遺伝子がゲノム上に安定して存在していることが確認された。

ウェスタンブロッティング (図 2) ; 幼葉 100-200 μ g から抽出した総タンパク質 3 μ g に 2 $\times$ SDS サンプルバッファーを等量加えて 95°C、5 min 反応させることによって直鎖状に変成させ、SDS-PAGE で分離し、エレクトロブロッティングにより PVDF 膜に転写した後、*AaXEG2* 抗体と共にインキュベートし、ECL Western Blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社) により発光検出した。その結果、*AaXEG2* と予想される 28kDa の特異的なバンドが検出され、さし木を 2 回繰り返した個体においても安定して *AaXEG2* タンパク質が産生していることが確認された。

PCR 分析 (図 3) ; キシログルカナーゼ遺伝子に特異的なプライマー (CGGTGACTTCACCCTGTACAACG、GGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTCC) を用い、PCR によって導入遺伝子から推測されるサイズのバンドを特異的に検出した。

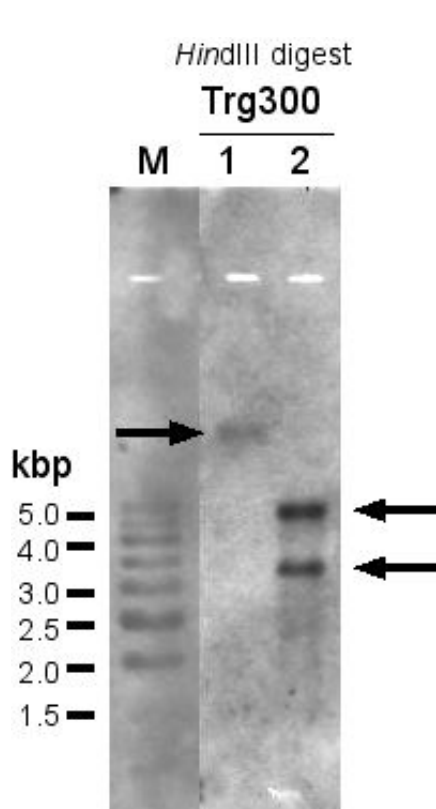


図 1 サザンハイブリダイゼーション

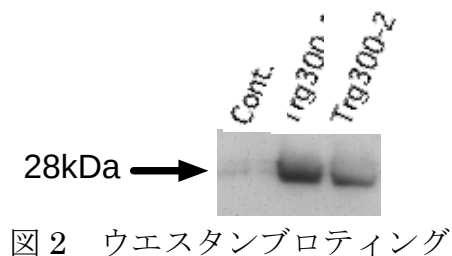


図 2 ウェスタンブロッティング

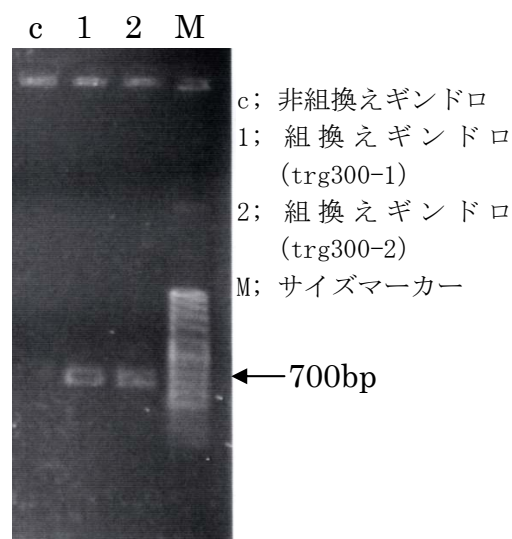


図 3 PCR 分析