

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェ
ニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草
剤耐性ワタ GHB811**

**平成 30 年 9 月 18 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	3
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
5	(1) 遺伝的素材に関する事項	4
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項	4
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
	2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
10	3 宿主に関する事項	4
	(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	4
	(2) 遺伝的先祖に関する事項	5
	(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
	(4) 寄生性及び定着性に関する事項	5
15	(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	5
	(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	5
	(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項	5
	(8) 飼料に利用された歴史に関する事項	6
	(9) 飼料の安全な利用に関する事項	6
20	(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
	(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
	4 ベクターに関する事項	6
	(1) 名称及び由来に関する事項	6
	(2) 性質に関する事項	6
25	(3) 薬剤耐性に関する事項	6
	(4) 伝達性に関する事項	7
	(5) 宿主依存性に関する事項	7
	(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項	7
	(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	7
30	5 挿入遺伝子に関する事項	7

	(1) 供与体に関する事項	7
	(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項	7
	(3) 構造に関する事項	8
	(4) 性質に関する事項	8
35	(5) 純度に関する事項	10
	(6) コピー数に関する事項	10
	(7) 安定性に関する事項	11
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	11
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	11
40	(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項	11
	6 組換え体に関する事項	11
	(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項	12
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	12
45	(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項	12
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	13
	(5) 宿主との差異に関する事項	14
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	14
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	14
50	(8) 不活化法に関する事項	15
	(9) 外国における認可等に関する事項	15
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	15
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	15
55	7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項	15
	IV 審議結果	15
	V 参考文献及び参考資料	15

「除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ 阻害型除草剤耐性ワタ GHB811」に係る安全性確認

60

I はじめに

除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ

阻害型除草剤耐性ワタ GHB811（以下「GHB811 ワタ」という。）について、平成 30
年 2 月 21 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、
「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年
11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

65

II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811

性 質 : 除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性

申請者 : BASF ジャパン株式会社

開発者 : BASF Agricultural Solutions Seed US LLC

70

GHB811ワタには、除草剤グリホサート及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤（以下、「HPPD阻害型除草剤」という。）に対する耐性を付与するため、トウモロコシ(*Zea mays*)由来の*2mepsps*遺伝子及び*Pseudomonas fluorescens* A32株に由来する*hppdPfW336-1Pa* 遺伝子が導入されている。

75

GHB811ワタにおいては、*2mepsps*遺伝子から発現する5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（以下、「2mEPSPSたん白質」という。）は、除草剤グリホサートによる影響を受けないことから、グリホサート存在下でも芳香族アミノ酸の合成を可能にすることにより、植物にグリホサート耐性を付与する。

80

また*hppdPfW336-1Pa*遺伝子から発現する4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（以下、「HPPD W336たん白質」という。）は、HPPD阻害型除草剤の影響を受けないことから、HPPD阻害型除草剤存在下でもホモゲンチジン酸の合成を可能にすることにより、植物にHPPD阻害型除草剤への耐性を付与する。

85

GHB811ワタと非組換えワタを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上の性質を除き、差異は認められなかった。このため、GHB811ワタに付与された性質について安全性を評価したところ、飼料として安全上の問題となる点は認められなかった。したがって、GHB811ワタは、飼料として摂取する家畜の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、ワタは主に綿実油かすの形態で主に乳牛用飼料の原料として使用されている。

90

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

GHB811 ワタを作出するのに用いた宿主は、アオイ科 (Malvaneae) ワタ属 (*Gossypium*) ワタ (*G. hirsutum* L.) の非組換え商業品種 Coker312 である。

GHB811 ワタにはトウモロコシ (*Z. mays*) に由来する *2mepsps* 遺伝子及び *P. fluorescens* A32 株に由来する *hppdPfW336-1Pa* 遺伝子が導入されている。*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfW336-1Pa* 遺伝子は、それぞれ 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質をコードする。

GHB811 ワタは、2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質を発現することにより、除草剤グリホサート及び HPPD 阻害型除草剤への耐性を持つ。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

ワタは、一般的に繊維料作物として栽培され、綿糸が取り除かれた綿実から綿実油を抽出した綿実油かすの形態で、主に乳牛用飼料の原料として利用されている(農林水産省, 2013)。また、綿実そのものが乳牛用飼料の原料として利用されることもある(OECD, 2004)。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

GHB811 ワタ及び非組換えワタの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

GHB811 ワタは、2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質を発現することにより、除草剤グリホサート及び HPPD 阻害型除草剤への耐性を持つ。この点を除けば、GHB811 ワタは非組換えワタと差異はなく、①収穫時期(成熟程度)、②家畜等の摂取(可食)部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法についても非組換えワタとの相違はない。

(1) ~ (4) により、GHB811 ワタの飼料としての安全性評価においては、非組換えワタとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

GHB811 ワタは、導入された *2mepsps* 遺伝子によって 2mEPSPS たん白質を発現し、除草剤グリホサート耐性を示す。また、導入された *hppdPfW336-1Pa* 遺伝子によって HPPD W336 たん白質を発現し、HPPD 阻害型除草剤耐性を示す。これにより GHB811 ワタは、作用機序の異なる除草剤を使用できるため、ワタ生産者へ幅広い雑草防除の選択肢を提供する。

3 宿主に関する事項

(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

GHB811 ワタの宿主は、アオイ科 (Malvaneae) ワタ属 (*Gossypium*) ワタ

(*G. hirsutum* L.) の非組換え商業品種 Coker312 である。

135

(2) 遺伝的先祖に関する事項

140

ワタの栽培は、メソアメリカから始まり、メキシコのテワカン谷において、紀元前 3,500～2,300 年頃のワタの栽培化の形跡が確認されている。今日、栽培されているワタの起源は、グアテマラ国境付近のメキシコと考えられており、18 世紀に米国南東部に広まり、その後、世界の熱帯・亜熱帯の諸国に広がったとされている (OECD, 2008)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

145

ワタには、有害生理活性物質として、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸が含まれている。

150

ゴシポールには遊離型と結合型があり、遊離型ゴシポールがより強い生理活性を有する。ゴシポールは、非反芻動物、鳥類等に対して毒性を示し、哺乳類に対して、食欲減退、体重減少等を引き起こすことが知られている。一方、反芻動物は、反芻胃中で遊離型を結合型に変換することができるため、ゴシポールの影響を受けにくい。また、綿実油かすの加工段階において、ほとんどのゴシポールはたん白質と結合するため、綿実油かすではゴシポールの毒性は低下する (OECD, 2008)。

155

シクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）は、飽和脂肪酸の代謝を阻害することが知られている (OECD, 2008)。シクロプロペン脂肪酸は、飽和脂肪酸の不飽和化を阻害することにより、鶏卵の卵白の変色やふ化率低下を引き起こすため、綿実油かす及び綿実油の家きん飼料への使用が制限されている (OECD, 2004)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

160

ワタは種子植物であり、ワタが家畜等に寄生又は定着することはない。

(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

165

ワタには、糸状菌による立枯病や半身萎ちょう病等の病害が発生するが、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない (OECD, 2008)。

(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

ワタは栽培作物であり、雑草化するとの報告はない (OGTR, 2008)。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

170

ワタは、多年生植物で低木にもなるが、商業的には一年生植物として栽培される。ワタは、基本的には自殖性であるが、虫媒等で他家受粉が生じることが知られている (OECD, 2008)。ワタとの交雑が可能な近縁野生種は、我が国には自生していない。

175 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

ワタは、一般的に繊維料作物として栽培され、綿糸が取り除かれた綿実から綿実油を抽出した綿実油かすの形態で、主に乳牛用飼料の原料として利用されてきた。我が国においても、主に乳牛用の配合飼料や混合飼料の原料として利用されている(農林水産省, 2018)。

180

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

ワタの種子には、有害生理活性物質として、ゴシポール等が含まれているが、主に、ゴシポールの影響を受けにくい反芻動物である乳牛用の飼料原料として利用されている。

185

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

ワタの種子は 2~3 か月の休眠性を持つが、栽培種においては、育種により休眠性が失われている、又は最小限に抑えられている。ワタの生存及び増殖能力は、温度、湿度、土壌等の各条件により制限される(OECD, 2008)。

190

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタの近縁種であるピマワタ(*G. barbadense*)は、ワタと同様にゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸を含むことが知られている。

195 4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

GHB811 ワタの作出に用いられた導入用プラスミド pTSIH09 は、*Agrobacterium tumefaciens* に由来するプラスミド pGSC1700 を基に作成されている。

200

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド pTSIH09 の塩基数は 13,099bp である。また、導入用プラスミド pTSIH09 の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており(参考資料 2,3)、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

205

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド pTSIH09 にはアミノグリコシド系抗生物質に耐性を付与する *aadA* 遺伝子(Fling *et al.*, 1985)が含まれており、導入用プラスミド pTSIH09 の作成時に選択マーカーに用いられた。*aadA* 遺伝子は導入用プラスミド pTSIH09 における T-DNA 領域の外側に位置するため、GHB811 ワタ中には含まれていない。

210

なお、GHB811 ワタ中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている。

215 (4) 伝達性に関する事項
導入用プラスミド pTSIH09 は、プラスミドの伝達を可能とする配列を含まない。

(5) 宿主依存性に関する事項
220 導入用プラスミド pTSIH09 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、植物や家畜等で増殖を可能とする配列は含まれていない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項
225 プラスミド pGSC1700 を基に構築した導入用プラスミド pTSIH09 に、*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子カセットを含む T-DNA 領域を組み込むことで、発現ベクターを作成している。

(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項
230 GHB811 ワタは、*2mepsps* 遺伝子発現カセット及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により非組換えワタ品種 Coker312 に導入することで作出された。挿入位置は導入用プラスミド pTSIH09 の T-DNA 領域を含む右側境界配列から左側境界配列までである。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項
235 ① 名称、由来及び分類に関する事項

2mepsps 遺伝子は、トウモロコシに由来する (Lebrun *et al.*, 2003)。また *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子は、土壤中に存在するグラム陰性桿菌である *P. fluorescens* A32 株に由来する (Boudec *et al.*, 2001)。

240 ② 安全性に関する事項
2mepsps 遺伝子の供与体であるトウモロコシは、世界の主要穀物の 1 つであり、動物やヒトは食経験を有している。また *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* は、土壌や水中に一般的に存在するグラム陰性桿菌であり、人や家畜等への病原性やアレルギー性は報告されていない。

245 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

250 挿入 DNA の宿主への導入は、導入用プラスミド pTSIH09 を用い、アグロバクテリウム法により行った。宿主である非組換えワタ品種 Coker312 の胚軸を、導入用プラスミド pTSIH09 を有するアグロバクテリウムと共存培養することで形質転換を行なった後、抗生物質 (チカルシリン) 及びグリホサートを添加した培地に移すことにより、アグロバクテリウムの除菌及び形質転換体の選抜を行った。

その後、選抜した個体を再分化させ、再分化個体 (T0) を得た。この T0 世代の内、HPPD 阻害型除草剤の 1 つであるテンボトリオンに耐性を有する個体を選抜

255 し、これらの自殖後代である T1 世代にさらにグリホサートを散布し、耐性を示す
個体を選抜した。このように選抜された個体から、最終的に GHB811 ワタを育成
した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

260 *2mepsps* 遺伝子発現カセットは、Ph4a748 プロモーターによりその発現が
制御されている。Ph4a748 プロモーターはシロイヌナズナ (*Arabidopsis*
thaliana) 由来のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域を含む配列で、植物細胞
内で転写を誘導する (Chabouté *et al.*, 1987)。

265 *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子発現カセットは、Pcsvmv プロモーターによりその
発現を制御されている。Pcsvmv プロモーターはキャッサバヴェインモザイク
ウイルス(Cassava Vein Mosaic Virus)由来のプロモーター領域を含む配列で、
で、植物細胞内で、転写を誘導する (Verdaguer *et al.*, 1996)。

② ターミネーターに関する事項

270 *2mepsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、シロイヌナズナ (*A.*
thaliana) 由来の H4 遺伝子の 3'末端非翻訳領域(Chabouté *et al.*, 1987)で、転
写を終結させポリアデニル化を誘導する。

275 *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、シロイヌナズナ
(*A. thaliana*) 由来の H4 遺伝子の 3'末端非翻訳領域(Chabouté *et al.*, 1987)で、
転写を終結させポリアデニル化を誘導する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

280 挿入 DNA の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基
配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

285 挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。*2mepsps* 遺伝
子及び *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>hppdPFW336-1Pa</i> 遺伝子発現カセット	
ThistonAt ターミネーター	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来のヒストン H4 遺伝子の 3'非翻 訳領域(Chabouté <i>et al.</i> , 1987)を含む配列で、ポリアデニル化に より mRNA の転写を終結させる。
<i>hppdPFW336-1Pa</i>	<i>P. fluorescens</i> A32 株の HPPD をコードする遺伝子に由来し、

遺伝子	アミノ酸配列の 336 番目が改変されている。これにより HPPD 阻害型除草剤への耐性が付与される(Boudec <i>et al.</i> , 2001)。なお、ワタにおける発現に適するようにコドンを最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。
<i>TPotpY-1Pa</i>	ヒマワリ(<i>Helianthus annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Zea mays</i>)の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体ペプチドのコード領域を基に合成されている(Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。HPPD W336 たん白質を色素体へ輸送する。なお、ワタにおける発現に適するようにコドンを最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。
Pcsmv プロモーター	Cassava Vein Mosaic Virus のプロモーター配列の領域を含み、植物において目的遺伝子を恒常的に発現させる(Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。
<i>2mepsps</i> 遺伝子発現ユニット	
Ph4a748 プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域を含み、植物において目的遺伝子を恒常的に発現させる(Chabouté <i>et al.</i> , 1987)。
Intron1 h3At	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H3Ⅲ第Ⅱ遺伝子の第一イントロンを含む配列(Chaubet <i>et al.</i> , 1992)で、Ph4a748 プロモーターとの組合せで植物における転写活性を高める。
<i>TPotpC</i>	ヒマワリ(<i>H. annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Z. mays</i>)の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体ペプチドのコード領域を基に合成されている(Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。2mEPSPS たん白質を色素体へ輸送する。
ThistonAt ターミネーター	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域(Chabouté <i>et al.</i> , 1987)を含む配列で、ポリアダニル化により mRNA の転写を終結させる。
外骨格領域	
<i>aadA</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> 由来の、アミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子を含む配列 (Fling <i>et al.</i> , 1985) 。
ORIpVS1	<i>A. tumefaciens</i> における複製のために導入された <i>Pseudomonas</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点を含む配列 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994) 。
ORI ColE1	<i>E. coli</i> における複製のために導入した <i>E. coli</i> のプラスミド pBR322 由来複製起点を含む配列(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)。

○ *2mepsps* 遺伝子の機能

GHB811 ワタに導入された *2mepsps* 遺伝子から発現される 2mEPSPS たん白質は植物に除草剤グリホサートに対する抵抗性を付与する。EPSPS たん

295 白質は、植物において芳香族アミノ酸（チロシン、フェニルアラニン及びトリプトファン）の生合成に関するシキミ酸経路で作用する酵素の一つで、ホスホエノールピルビン酸（PEP）とシキミ酸 3-リン酸（S3P）から 5-エノールピルビンシキミ酸 3-リン酸（EPSP）を生成する反応を触媒する。除草剤グリホサートは、植物の内在性 EPSPS たん白質の活性を阻害し、芳香族アミノ酸の合成を止めることで植物を枯死させる（Steinrücken and Amrhein, 1980; Lebrun *et al.*, 2003）。一方、*2mepsps* 遺伝子がコードする 2mEPSPS たん白質は除草剤グリホサートの存在下でも EPSPS 活性を示す（Lebrun *et al.*, 2003）ため、除草剤グリホサートによって活性を阻害される内在性 EPSPS たん白質に変わって芳香族アミノ酸の合成を可能にすることで、植物に除草剤グリホサートへの耐性を付与する。

○ *hppdPfW336-1Pa* 遺伝子の機能

305 *hppd* 遺伝子から産生される HPPD たん白質は、チロシン代謝系路の酵素の一つであり、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸（4-HPP）と酸素からホモゲンチジン酸（HGA）を生じる反応を触媒する。HPPD 阻害型除草剤はその代謝産物であるジケトニトリル体（DKN）が HPPD たん白質の活性部位に結合することにより、この反応を阻害するため、HPPD 阻害型除草剤を散布された植物は光合成や抗酸化システムに重要なプラストキノン及びトコフェロールの前駆体である HGA の生産ができなくなり（DellaPenna *et al.*, 2006）、HPPD 阻害型除草剤を散布された植物は枯死する。

310 一方、*hppdPfW336-1Pa* 遺伝子から産生される HPPD W336 たん白質は、HPPD たん白質のアミノ酸配列において 1 つのアミノ酸に変異が導入されることで、4-HPP とは結合可能な一方、DKN との結合親和性が低下し、DKN による活性阻害を受けず正常代謝が行えるため、植物は HPPD 阻害型除草剤耐性を示す。

（５）純度に関する事項

320 導入用プラスミド pTSIH09 に含まれる遺伝子は、その性質が明らかになっており、塩基配列解析により、挿入領域に目的以外の遺伝子は含まれていないことを確認している（参考資料 3）。

（６）コピー数に関する事項

325 GHB811 ワタに導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数及び外側骨格配列の有無を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、GHB811 ワタ中の導入用プラスミド pTSIH09 の T-DNA 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されていること、また導入用プラスミド pTSIH09 の外側骨格配列が存在しないことが確認された（参考資料 6,7）。

330 また、挿入 DNA とその近傍配列の全塩基配列を決定するため、挿入 DNA 及び近傍領域の塩基配列解析を行った。合わせて導入遺伝子の塩基配列が導入用プラスミド pTSIH09 中の対応する塩基配列と同一であるか確認した。その結果、

GHB811 ワタ中の挿入塩基配列は、T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列と同一であることが確認された(参考資料 8)。

さらに、GHB811 ワタにおいて、挿入 DNA が既知内在性の遺伝子を破壊していないかについて確認するため、DNA の挿入部位を対照の非組換えワタ中の塩基配列と比較した結果、GHB811 ワタの導入遺伝子の挿入部位においてワタゲノム内在性配列に 13bp の欠損が認められた(参考資料 9)。しかし、近傍配列の BLASTn 解析の結果、T-DNA 領域の導入による既知の内在性の遺伝子の破壊はないと考えられた。

(7) 安定性に関する事項

GHB811 ワタに導入された *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の GHB811 ワタから得られた DNA を用いたサザンブロット解析を実施したところ、*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された(参考資料 23)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

GHB811 ワタにおける *2mepsps* たん白質及び HPPD W336 たん白質の発現量を ELISA 分析により測定した。試験には米国の 3 か所のほ場から異なる生育時期に採取した GHB811 ワタの葉、根、花蕾、さく、有毛種子、植物体を供試した。測定の結果、供試したすべての組織サンプルから *2mepsps* たん白質及び HPPD W336 たん白質の発現が確認された(参考資料 11)。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド pTSIH09 にはアミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域の外側に含まれているが、GHB811 ワタ中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット解析によって確認されている(参考資料 6)。

(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

GHB811 ワタの導入遺伝子とその両末端近傍配列の境界領域について、オープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。3 アミノ酸以上からなる ORF の存在を、6 つの読み枠についてストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンで検索した結果、126 個の ORF が確認された。それらについて、既知の毒性たん白質等との相同性の有無を確認するために、FASTA 検索アルゴリズムを利用してデータベース(NCBI non-redundant database, version2016.0906)との相同性検索を行った結果、有意な相同性は認められなかった(参考資料 10)。

6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

375 GHB811 ワタは、*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfW336-1Pa* 遺伝子が導入されており、2mEPSPS たん白質が発現することにより除草剤グリホサートに、また HPPD W336 たん白質が発現することにより HPPD 阻害型除草剤への耐性を持つ。これらの点を除けば、GHB811 ワタは非組換えワタとその形態及び生育特性において差異は認められず、飼料としての利用方法も変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

380 GHB811 ワタで発現する 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質が既知の毒素たん白質等と相同性を有するか確認するため、データベース(NCBI non-redundant protein database, version2016_1006 及び Bayer toxin database,version 17.1)に登録されているたん白質のアミノ酸配列を対象に、BLOSUM50 を用いて相同性検索を行った。その結果、2mEPSPS たん白質及び
385 HPPD W336 たん白質と既知の毒素たん白質等との間に相同性は認められなかった(参考資料 4,5)。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

390 GHB811 ワタで発現している 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、以下のア～ウについて検討を行なった。なお、実際の処理は *E. coli* で発現させた 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質を供試しており、これら *E. coli* 由来のたん白質と GHB811 ワタ中で発現するたん白質は、分子量、ペプチド分析、免疫反応性、N-末端配列の決定、酵素活性及び糖たん白質染色分析により同等性が確認されて
395 いる(参考資料 12,13,14)。

①2mEPSPS たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

400 2mEPSPS たん白質の人工胃液中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中での試験開始 30 秒以内に消化されることが確認された(参考資料 15)。

イ 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素(パンクレアチン)処理

405 2mEPSPS たん白質の人工腸液中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中での試験開始 30 秒以内に消化されることが確認された(参考資料 16)。

ウ 加熱処理

410 2mEPSPS たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により検討した結果、75℃以上の条件下では 30 分以上の加熱処理により免疫応答性を失うことが確認された(参考資料 17)。

②HPPD W336 たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

415 HPPD W336 たん白質の人工胃液中での消化性について、SDS-PAGE 及び
ウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中での試験開始 30 秒
以内に消化されることが確認された（参考資料 19）。

イ 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

420 HPPD W336 たん白質の人工腸液中での消化性について、SDS-PAGE 及び
ウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中での試験開始 30 秒
以内に消化されることが確認された（参考資料 20）。

ウ 加熱処理

425 HPPD W336 たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により検討
した結果、75℃以上の条件下では 30 分以上の加熱処理により免疫応答性を失
うことが確認された（参考資料 21）。

（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

430

①2mEPSPS たん白質

EPSPS たん白質は、植物において芳香族アミノ酸の生合成に関与するシキミ
酸経路で作用する酵素の一つで、ホスホエノールピルビン酸(PEP)とシキミ酸 3-
リン酸(S3P)から 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸(EPSP)を生成する反応を
触媒する)。EPSPS たん白質は、PEP 及び S3P と特異的に反応することが知られ
ている(OECD, 1999a)。また、EPSPS たん白質による反応は、芳香族アミノ酸生
合成における律速段階ではないと考えられており（Weiss and Edwards, 1980;
Herrmann and Somerville, 1983; Herrmann, 1995a, b; Heldt, 2000; Buchanan, 2005）、
EPSPS たん白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸
の濃度が高まることはないことが報告されている(Padgett *et al.*, 1996; Ridley *et al.*,
2002)。実際に 2mEPSPS たん白質を発現する GHB811 ワタについて、2014, 2015
年に米国の計 8 ヲ所の圃場で栽培試験を行い、種子における構成成分を分析し
た結果、芳香族アミノ酸について対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差
は認められなかった。

445 以上のことから、GHB811 ワタにおける 2mEPSPS たん白質の発現が宿主の代
謝経路へ影響を及ぼすことはないと考えられる。

②HPPD W336 たん白質

450 HPPD W336 たん白質は、チロシン代謝経路における 4-ヒドロキシフェニル
ピルビン酸（4-HPP）からホモゲンチジン酸（HGA）への反応を触媒する酵素
である。チロシン代謝は厳密に制御されており、チロシン量の上昇は、HPPD
阻害型除草剤の毒性の理由の一つと考えられている(Prisbylla *et al.*,
1993;Pallett *et al.*, 1998)が、チロシン含量について、GHB811 ワタと非組換え

ワタとの間に統計学的有意差は見られず、チロシンが前駆体となっている他の経路への影響はないと考えられる。

また、HPPD たん白質を単独で過剰発現させても総トコフェロール量はほとんど変化させないことが報告されている(Tsegaye *et al.*,2002;Falk *et al.*,2003;Raclaru *et al.*,2006;Farré *et al.*,2012)。GHB811 ワタにおいても、HPPD W336 たん白質の発現により HPPD たん白質の総量が増加するが、HGA 含量の増加は認められておらず(参考資料 28)、その下流のトコフェロール含量も文献値の範囲内であった。

また、HPPD たん白質の基質として、4-HPP の他にフェニルピルビン酸(PP)、3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP) 、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC) 及び 2-オキソ-5-チアヘキサン酸 (KMTB) の 4 種の化合物が植物体内に存在する基質として報告されている(Lindstedt *et al.*, 1977、参考資料 25)。これら 4 物質と HPPD W336 たん白質との反応活性を比較した結果、4-HPP と比較して HPPD W336 たん白質との反応活性が極めて低いことから、植物体内の 4-HPP 存在下においてこれら 4 物質が HPPD W336 たん白質の基質として利用されることはないと考えられた。

したがって、*hppdPfW336-1Pa* 遺伝子の導入に伴い HPPD W336 たん白質の発現により HPPD 活性が増加しても、チロシン異化経路に影響を及ぼさず、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

GHB811 ワタ及び対照の非組換えワタとの構成成分の同等性を評価するため、米国の 8 か所のほ場において栽培した GHB811 ワタ及び対照の非組換えワタのリンターを除いた種子について、①一般成分、②無機塩類、③ビタミン、④有害生理活性物質、⑤アミノ酸、⑥脂肪酸の分析を行った(参考資料 14)。また、この 8 か所のほ場において参考として 7 品種の非組換えの商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。

GHB811 ワタへの除草剤散布については、グリホサート(約 1.06~1.22 kg a. i. /ha)を、また HPPD 阻害型除草剤の 1 つである除草剤イソキサフルトール(約 100.3~115.2 g a. i. /ha)を散布した。

その結果、GHB811 ワタの各種構成成分は、対照の非組換えワタあるいは従来のワタと同程度であることが確認された。また、ワタに含まれる有害生理活性物質であるゴシポール(総ゴシポール及び遊離型ゴシポール)及びシクロプロペン脂肪酸(マルバリニン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸)についても、従来のワタと同等であることが確認された。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国で行われたほ場試験の結果、GHB811 ワタの外界における生存及び増殖能力は、非組換えワタと相違ないことが確認されている。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

495 これまでに米国で行われたほ場試験の結果、GHB811 ワタの生存・増殖能力は
非組換えワタと相違ないことが確認されている。

(8) 不活化法に関する事項

500 GHB811 ワタは、物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の散
布）等の非組換えワタを枯死させる従来の方法で不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

505 2017 年 4 月に米国食品医薬局（FDA）に対して食品及び飼料としての安全性確
認を申請している。

また 2017 年 8 月にカナダ保健省（Health Canada）に対して食品としての、カ
ナダ食品検査庁（CFIA）に対して環境・飼料としての安全性確認を申請している。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

510 GHB811 ワタの栽培方法は、除草剤グリホサート及び HPPD 阻害型除草剤に対
する耐性を付与されており、雑草防除のためにこれらの除草剤を使用できること
を除いて、非組換えワタと同様である。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

515 GHB811 ワタの種子の製法及び管理方法については、非組換えワタとの相違は
ない。

7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場
合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項
該当しない。

520

IV 審議結果

525 除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型
除草剤耐性ワタ GHB811 について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安
全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜への安全上
の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1. Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H L., Boyer, H. W.
1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose
cloning system. Gene 2, p.95-113.
2. Boudec, P., Rodgers, M., Dumas, F., Sailland, A., Bourdon, H. 2001. Mutated
hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain
such a gene and which are tolerant to herbicides. U.S. Patent US 6,245,968 B1.
3. Buchanan B. B. 2005. 植物の生化学. 分子生物学 学会出版センター, p.342-358.

4. Chaboute, M.-E., Chaubet, N., Philipps, G., Ehling, M., Gigot, C., 1987. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 8, p.179-191.
5. Chaubet, N., Clement, B., Gigot, C. 1992. Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. *Journal of Molecular Biology* 225, p.569-574.
6. DellaPenna, D., Pogson, B. J. 2006. Vitamin synthesis in plant: tocopheroles and carotenoids. *Annual Reviews of Plant Biology* 57: 711-738.
7. Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., Krupinska, K. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540, p. 35-40
8. Farré, G., Sudhakar, D., Naqvi, S., Sandmann, G., Christou, P., Capell, T., Zhu, C. 2012. Transgenic rice grains expressing a heterologous p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase shift tocopherol synthesis from the γ to the α isoform without increasing absolute tocopherol levels. *Transgenic research* 21, p. 1093-1097
9. Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13:7095-7106.
10. Gruys, K. J., Walker, M. C., Sikorski, J. A. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, p.5534-5544.
11. Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25, p. 989-994.
12. Heldt, H.-W. 2000. 植物生化学 シュプリンガー・フェアラーク東京, p.242-244
13. Herrmann, K. M. 1983. "The common aromatic biosynthetic pathway". *Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation*. Herrmann K. M., Somerville R. L. eds. Addison-Wesley, Publishing Company., p.301-322.
14. Herrmann, K.M. 1995a. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7:907-919.
15. Herrmann, K. M. 1995b. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.* 107, p.7-12.
16. ILSI. 2014. Crop Composition Database, Version 5.0. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed July 27, 2016].
17. Lebrun, M., Leroux B., Sailland A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. U.S. Patent 5,510,471.
18. Lebrun, M., Sailland, A., Freyssinet, G., Degryse, E. 2003. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. U.S. Patent US 6,566,587 B1.
19. Lindstedt, S., Odelhög, B., Rundgren, M. 1977. Purification and some properties of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. P.J. 874. *Biochemistry* 16, p.3369-3377.

20. OECD. 1999a. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 10: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. ENV/JM/MONO(99)9.
21. OECD. 2004. Consensus document on compositional considerations for new varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and Anti-nutrients. 32p. (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.11).
22. OECD. 2008. Consensus document on the Biology of Cotton (*Gossypium* spp.). 64p. (Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45).
23. OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). 87p.
24. Padgett SR, Taylor NB, Nida DL, Bailey MR, MacDonald J, Holden LR, Fuchs RL. 1996. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. The Journal of Nutrition 126: 702-716.
25. Pallett, K. E., Little, J. P., Sheekey, M., Veerasekaran, P. 1998. The mode of action of isoxaflutole. Pesticide Biochemistry and Physiology 62, p. 113-124
26. Prisbylla, M. P., Onisko, B. C., Shribbs, J. M., Adams, D. O., Liu, Y., Ellis, M. K., Hawkes, T. R., Mutter, L. C. 1993. The novel mechanism of action of the herbicidal triketones. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds 731
27. Raclaru, M., Gruber, J., Kumar, R., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, M. K., Friedt, W., Frentzen, M., Weier, D. 2006. Increase of the tocopherol content in transgenic Brassica napus seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. Molecular Breeding 18, p. 93-107
28. Ridley WP, Sidhu RS, Pyla PD, Nemeth MA, Breeze ML, Astwood JD. 2002. Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant corn event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 7235-7243.
29. Steinrücken HC, Amrhein N. 1980. The Herbicide Glyphosate is a Potent Inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate Acid-3-Phosphate Synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications 94: 1207-1212.
30. Tsegaye, Y., Shintani, D. K., DellaPenna, D. 2002. Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relation to tocopherol biosynthesis. Plant Physiology and Biochemistry 40, p. 913-920.
31. Verdaguer, B., De Kochko, A., Beachy, R., N., Fauquet, C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. Plant Molecular Biology 31, p. 1129-1139.
32. Weiss, U., Edwards, J. M. 1980. "Regulation of the shikimate pathway." The biosynthesis of aromatic compounds. A Wiley-Interscience Publication, Inc, New York., p.287-301.
33. 農林水産省. 2018. “流通飼料価格等実態調査＜速報版＞ 配合・混合飼料の原料・流通状況 2-(1)原料使用量”. 飼料月報（概要）、平成 29 年度 12 月.

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. M. Freyssinet. 2007. Cotton crop biology and general information. [M-215504-03-2]
2. R. Dreesen. 2015. Description of vector pTSIH09. [M-388224-02-1]
3. R. Dreesen. 2015. Sequence determination of plasmid pTSIH09. [M-521125-02-1]
4. A. Capt. 2017. 2mEPSPS protein, amino acid sequence homology search with known allergens and toxins. [M-445681-05-1]
5. A. Capt. 2017. HPPD W336 protein, amino acid sequence homology search with known allergens and toxins. [M-445678-05-1]
6. P. Back, 2016. Detailed insert characterization and confirmation of the absence of vector backbone sequence in cotton GHB811. [M-572036-02-1]
7. P. Back, 2017. Detailed insert characterization in the BC2F3 generation of GHB811cotton. [M-581791-01-1]
8. A. van Hoecke. 2017. DNA sequence determination of the transgenic and insertion loci of GHB811 cotton. [M-533573-02-1]
9. A. van Hoecke. 2017. Bioinformatics analysis of the GHB811 cotton insertion locus. [M-581222-01-1]
10. E. Posada. 2016. GHB811 cotton Identification of Open Reading Frames and homology search of sequences ≥ 30 amino acids to known allergens and toxins. [M-575144-01-1]
11. S. Sathischandra and A.-J. Wu. 2017. GHB811 cotton-Summary of protein expression analyses of field samples grown in the USA during 2015. [M-583070-01-1]
12. R. Dreesen. 2016. Characterization of 2mEPSPS protein purified from GHB811 cotton and comparability with the recombinant 2mEPSPS protein batch 1417_2mEPSPS. [M-568145-01-1]
13. R. Dreesen. 2016. Characterization of HPPD W336 protein purified from GHB811 cotton and comparability with the recombinant HPPD W336 protein batch 1411_ HPPD W336. [M-576569-02-1]
14. Amended Report for MSL0029033: Compositional Analyses of Cottonseed from MON 88702 Grown in the United States During the 2015 Season (MSL0029119)
15. D. Rouquie. 2011. 2mEPSPS protein; In vitro digestibility study in human simulated gastric fluid. [M-406126-01-1]
16. D. Rouquie. 2011. 2mEPSPS protein; In vitro digestibility study in simulated intestinal fluid. [M-275371-02-1]
17. H. Serrano. 2014. The effect temperature on microbially-produced 2mEPSPS as 100 assessed by ELISA. [M-500886-01-1]
18. M. L. Healy and E. Schönbrunn. 2006. Biochemical characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (wtEPSPS) and its mutated glyphosate-resistant form (2mEPSPS). [M-267370-01-1]
19. J.B. Rascle. 2009. HPPD W336 protein; In vitro digestibility study in human gastric fluid. [M-356196-01-1]
20. J.B. Rascle. 2009. HPPD W336 protein; In vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid. [M-356198-01-1]
21. T. Moore. 2013. The effect of temperature on microbially produced HPPDW336 assessed

- by ELISA. [M-447994-01-1]
22. V. Habex, 2011. The modified 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene product (HPPD W336) description and characterization. [M-359562-02-1]
 23. R. Dreesen. 2016. Structural stability analysis of cotton GHB811. [M-548778-01-1]
 24. R. Dreesen. 2015. Substrate specificity of the wild type HPPD and HPPD W336 proteins from *Pseudomonas fluorescens*. [M-424989-04-2]
 25. R. Dreesen. 2015. Literature survey on potential alternative substrates for HPPD. [M-412397-03-1]
 26. B. Laber. 2015. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens*. Enzymatic characterization of the wild-type and G336W mutant enzymes. [M-423000-03-1]
 27. J. Gottula et al., 2016. GHB811 cotton – Composition assessment of GHB811 cotton grown in the USA during 2014 and 2015. [M-566678-01-1]
 28. J. Gottula et al., 2016. GHB811 cotton – Supplemental composition assessment of GHB811 cotton grown in the USA during 2014 and 2015. [M-566679-02-1]
 29. N. Vanhoutte. 2016. Real-time PCR method for event-specific quantification of *Gossypium hirsutum*. [M-575777-01-1]
 30. W. J. Kowite. 2006. Residue analysis of GlyTol cotton processed fractions, USA, 2006. [M-280727-01-1]
 31. D. R. Fischer, E. Jerkins. 2017. Balance Pro(Isoxaflutole)-Magnitude of the residue in cotton[M-599609-01-1]