

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-519854

(P2018-519854A)

(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)  
**A 0 1 H 1/02 (2006.01)** A 0 1 H 1/02 Z 2 B 0 3 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2018-519265 (P2018-519265)	(71) 出願人	517449752
(86) (22) 出願日	平成28年6月24日 (2016. 6. 24)		アクセラレーテッド エージー テクノロ
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月20日 (2018. 2. 20)		ジーズ, エルエルシー
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/039339		アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 0 2 1
(87) 国際公開番号	W02016/210315		, アンキニー, スイート 6, サウスイ
(87) 国際公開日	平成28年12月29日 (2016. 12. 29)		スト クリークビュー ドライブ 2 3 0
(31) 優先権主張番号	62/269, 514		2
(32) 優先日	平成27年12月18日 (2015. 12. 18)	(74) 代理人	110000659
(33) 優先権主張国	米国 (US)		特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(31) 優先権主張番号	62/269, 531	(72) 発明者	クローネ, トッド
(32) 優先日	平成27年12月18日 (2015. 12. 18)		アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 1 3 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		, ジョンストン, ブルック リッジ コー
(31) 優先権主張番号	62/269, 496		ト 6 6 0 7
(32) 優先日	平成27年12月18日 (2015. 12. 18)	F ターム (参考)	2B030 AA02 AB03 AD20 CA01 CA07
(33) 優先権主張国	米国 (US)		HA07

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 種子製造

## (57) 【要約】

本発明は、任意の作物植物において雑種種子を産生し、その上、異系交雑および自家受粉による汚染も低下させる、新規方法を記載するものである。従来の種子生産方法とは対照的に、本発明の方法は、雌性親植物におけるいずれの形態の雄性不稔の使用にも、同じ種の無関係のおよび望ましくない植物からの隔離距離の使用にも、標的となる雌に近接した雄性親植物の使用にも依存しない。この方法は、保存花粉バンクにおいて入手できるような雄性親の花粉の、またはそれらが入手できるようになったときの雄性植物からのリアルタイム回収を使用して入手できるような雄性親の花粉の、随意の供給を含む。雌からのおよび位置的に近接している無関係の植物からの発芽可能な花粉が放出されていない期間に、所望の花粉が稔性の雌に供給される。供給される雄性花粉は、前記雌に優先的に受粉させ、比較的純度の高い雑種種子を、現行の雑種生産実施を使用して雄性不稔の実施も規定の隔離距離も用いなかった場合よりはるかに高いレベルで生産するような、量および幸運なタイミングでのものである。そのような幸運なタイミングは、雌性親の花粉が発芽可能なになる1日もしくは2日前の、および/または雌性親の花粉もしくは他の近接した植物の花粉が毎日飛散しはじめる前の連続した数回の朝の、雌への花粉の意図的散布を含みうる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

汚染を減少させることにより結果として得られる種子の遺伝的純度を改善する種子の製造方法であって、

- a . 雌性要素と雄性要素の両方を備えている指定雌性親植物を栽培する工程と、
  - b . 前記指定雌性親植物の前記雄性要素が発芽可能な花粉を放出していないとき、且つ、他の生物学的適合性花粉源も発芽可能な花粉を放出していないときに、前記指定雌性親植物に指定雄性植物花粉を 1 回以上で意図的に受粉させる工程と、
  - c . 前記指定雌性植物を栽培して成熟させる工程と、
  - d . 前記指定雌性植物により生産された種子を収穫する工程と、
- を含むことを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

- i . 前記雌性植物の雄性不稔、
  - i i . あらゆる生物学的適合性花粉源からの前記指定雌性植物の物理的および / または時間的隔離、および
  - i i i . 前記指定雌性植物に近接して栽培される雄性花粉供与植物
- の条件のうちの 1 つ以上の必要性の低減または排除をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

- 前記指定雄性植物花粉が、
- a . 新鮮な花粉、および
  - b . 保存された花粉
- のうちの 1 つ以上を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

前記指定雌性親植物が、コーン植物、ダイズ植物、コムギ植物、イネ植物、ヒマワリ植物、セイヨウアブラナ植物、モロコシ植物、ワタ植物、オオムギ植物、トウジンビエ植物またはアルファルファ植物のうちのいずれか 1 つ以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

指定雄性植物花粉の意図的散布が、機械的手段、空気圧手段、陽圧、陰圧、手動手段、またはこれらの組合せのうちのいずれか 1 つ以上によって行われることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

指定雄性植物花粉の意図的散布が、自動化または半自動化手段によって行われることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記自動化または半自動化手段が、車両またはドローンであることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記指定雄性植物花粉が、圃場、栽培箱、温室、ガラス温室、シェードハウス、フープハウス、垂直栽培施設または水耕栽培施設のうちの 1 つ以上から収穫された新鮮な花粉であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

40

**【請求項 9】**

前記指定雄性植物花粉が、以前に収集され、冷却、冷蔵、凍結保存、凍結、凍結乾燥または液体窒素中での貯蔵により保存された保存花粉であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

- 前記指定雄性植物花粉が、
- i . 概日リズムが変更された源、
  - i i . 前記指定雌性親植物の前記雄性要素が遅延されるが、正常な 1 日周期で開花する

50

源、および

i i i . 前記指定雌性親植物の前記雄性要素が遅滞なく飛散させられる、正常な 1 日周期で開花する源

のうちの 1 つ以上から収集されたことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記指定雄性植物花粉が、同じ指定雌性親植物に 1 回より多く散布されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記指定雌性親植物が前記花粉を最初に受入可能になる時点で前記指定雄性植物花粉が散布されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記指定雌性親植物の前記雄性要素成熟が処置で遅延されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記指定雄性植物花粉が単一の遺伝源から得られることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記指定雄性植物の花粉が、複数の遺伝源から得られて散布前に混合されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

[ 関連出願の相互参照 ]

本願は、2015 年 6 月 25 日に出願した、SEED PRODUCTION と題する、米国特許仮出願第 62 / 184 , 596 号、および 2015 年 12 月 18 日に提出した、SEED PRODUCTION と題する、米国特許仮出願第 62 / 269 , 496 号、および 2015 年 12 月 18 日に提出した、GRAIN PRODUCTION と題する、米国特許仮出願第 62 / 269 , 531 号、および 2015 年 12 月 18 日に提出した、GRAIN PRODUCTION と題する、米国特許仮出願第 62 / 269 , 514 号の優先権を主張するものである。米国特許仮出願第 62 / 184 , 596 号、同第 62 / 269 , 496 号、同第 62 / 269 , 531 号および同第 62 / 269 , 514 号の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0002】

本発明は、新規の、需要に応じた種子および / または雑種種子生産 ( 製造 ) 技術 ( 本明細書では以降「雑種種子 ( ハイブリッド種子、Hybrid seed ) 」と言う ) に、一般に関する。より具体的には、本発明は、能動的花粉飛散、雄性不稔および / または物理的隔離に依存しない、雑種種子生産技術に関する。

【背景技術】

【0003】

本発明は、これらに限定されるものではないがトウモロコシ ( コーンとも呼ばれる ) 、ダイズ、コムギ、イネ、ヒマワリ、セイヨウアブラナ、モロコシ、ワタ、オオムギ、トウジンビエ、アルファルファおよび他の植物を含む、雑種作物種子生産実施および植物育種実施の分野に応用される。植物の生殖器官の位置および受精のタイミングに基づいて、多くの種は、自家受粉に頼って稔性種子を生産する。植物を雄性不稔にするための何らかの形態の機械的、物理的または遺伝的介入を実行しないと、多くの植物は、それらの親植物の遺伝的特徴を単純に再現する。雑種植物は、ある遺伝的背景の雄性花粉源から、それを異なる遺伝的背景を有する植物の雌性生殖器官と交雑させることで生じる、受精の結果である。作物植物間の雑種性は、一般に、商業生産では収量の点で有利であり、したがって、可能な場合は商品作物の生産の自然または自家受粉法より好ましい。図 1 に示されているように、作物収量は、1940 年代の雑種の広範な導入に伴って著しく増加し始め、そ

40

50

して今日まで長い期間にわたって着実に増加し続けてきた。現在、トウモロコシ、イネ、モロコシ、ヒマワリおよびセイヨウアブラナが、雑種種子を利用する主な作物である。ダイズおよびコムギなどの他の作物に関する雑種種子生産の規模は、生殖器官構造の生態および有効な雄性不稔法の利用困難によりもたらされる障害を克服するために多くの資源が要求されるため、非常に制限される。通常は自家受粉する植物品種からの雑種種子の大規模生産法は、不足しているまたは不十分であるが、実用化されれば大きな価値をもたらすことになる。雑種種子の播種および栽培が、自家受粉種子または変種種子の播種および栽培と比較してはるかに大きい種子収量の可能性をもたらすことは、広く知られている。

#### 【0004】

雑種種子の新品種が同定されるや否や、農業従事者は、彼らの圃場においてその種子を大抵は利用しようとする。相応じて、種子生産が要求される。現在、ほとんどの種子は、20世紀初頭によく使用された二重交雑雑種ではなく単交雑雑種である。しかし、どちらを使用してもよい。単交雑雑種への転換は、そのような種子の収量増加に起因した。農業従事者が各季節に必要な種子のすべてを生産するために非常に大量の土地が要求される。所望の雑種を有効に生産するためには受粉が適切な親により行われなければならない、これには花粉源に対する厳重な管理が要求される。これには、指定された雌性植物の花粉のそれ自体の受粉、すなわち自家受粉を防止することが要求されることが多い。典型的に、これは、雄性不稔を誘導することにより果される。例えば、コーンの場合、雌性親は、通常、雄穂除去される。しかし、雄穂除去には難点がある。第一に、費用がかかる。第二に、植物が傷つけられ、その結果、収量が低下する。雄穂除去の難点に対処するために、他の形態の雄性不稔が提案されてきた。例としては、細胞質雄性不稔、遺伝子雄性不稔、および化学的に誘導される雄性不稔が挙げられる。すべてに欠点がある。

#### 【0005】

したがって、雑種生産が当たり前である作物についての現行の雑種種子生産プロセスは、種により異なるが、典型的に以下の要素を含む：(1)互いにごく接近して配列された生産ブロックに雌性および雄性親植物を定植すること；(2)同じ種の他の無関係のまたは望ましくない植物への曝露を低減させるために前記生産ブロックを隔離した位置に配置すること；および(3)何らかの形態の雄性不稔を雌に付与して雌性親植物を雄性不稔にし、かくて、雑種種子を最終的に汚染することになる自家受粉の可能性を回避すること。これら3要素を利用して雑種トウモロコシ種子を生産する基本的方法は、1920年代後期に雑種トウモロコシが初めて商業化されて以来、変わっていない(非特許文献1)。雑種種子生産において、用語「汚染」は、雌性親植物と雄性親植物間の望ましい所期の遺伝子交雑を有さない種子を指す。汚染は、雌性植物による自家受粉の結果として生じることもあり、または意図したものでない雄性親からの花粉による雌性植物の受粉の結果として生じることもある。これは、空気中の花粉移動の結果であることもあり、または生産圃場に侵入する、もしくは偶発的に花粉を運んでしまうほど雌性植物の近くに存在する、昆虫、野生生物、人、車両もしくは他の潜在的な花粉運搬体を介して導入されることもある。

#### 【0006】

生産ブロックの隔離をうまく実行し、望ましくない受粉事象をうまく回避し、雄性不稔をうまく付与することは難題である。同じ種の他の植物から十分に遠方に隔離されている土地を入手することは達成困難であり、達成不可能であることもある。したがって、圃場が望ましくない花粉に曝露されることは珍しいことではなく、その結果、圃場において生産される種子のある特定のパーセントは汚染される。雄性不稔法は、遺伝的不稔、雌源としての使用が意図される植物の生殖領域の雄性部分の物理的もしくは機械的除去、または雄性配偶子を殺滅する化学的除雄剤を含む。物理的および機械的方法には非常に費用がかかる一方、化学的除雄剤は、値段が高く、および/またはあまり効果的でない。細胞質雄性不稔の形態での遺伝的雄性不稔は、セイヨウアブラナおよびヒマワリのような一部の作物で広く使用されているが、すべての生殖質が適合性であるとは限らないため有用性が制限される他の植物、例えばトウモロコシおよびイネでは限定的である(非特許文献2；非特許文献3)。核遺伝子雄性不稔法は、種子産業において大部分が開発中であり、ごく少

数の雑種生産地で使用されているが、ほんの少数の形態しか商業化されていない。遺伝的雄性不稔法は、物理的／機械的および化学的手段より好ましいが、依然としてかなりの資源を用いる必要があり、最短の時間枠で市場に出すための形質スタック作出および製品獲得の複雑さを増大させ、ときには（GMOを必要とするものに関する）全世界の複雑な規制制度に合格しなければならない。本質的に、植物における雄性不稔付与方法のすべてが、適切に遂行するために、多大な出費および／または資源の負担、ならびに製品または製品タイムラインの限定という共通点を共有する。

#### 【0007】

いくつかの経済的に重要な作物（ダイズおよびコムギを含むがこれらに限定されない）は、現在、雑種として栽培することができない。なぜなら、雄性不稔を付与する十分な方法がなく、および／またはこれらの種は、高度に自家受粉性であり、花粉はそのような短い距離を移動するので、雄性不稔を用いたとしても他家受粉成功率が低い可能性が高くなり、その結果、他家受粉雑種種子の収量は低くなって、雑種生産を経済的に不可能にさせるからである。ダイズに加えて、コムギは、今までに雑種種子生産の利用が限定的にしか成功していない、もう1つの貴重な作物である。一般的に言えば、種子産業は、雑種作物システムが可能にする有意な収量増加および育種効率に突き動かされて、ほとんどの主要作物種に関して雑種作物生産を可能にするまたは改善する方法を積極的に追求している。

#### 【0008】

雑種生産を既にご利用している作物（例えば、コーン、ヒマワリ）について、本発明は、雌に近接した雄の定植、隔離、および雄性不稔といった、前に述べた費用のかかる、資源依存的な3要素すべての必要性を完全にもしくはある程度なくすか、またはそのような要素への依存を低減させる。雑種コーン植物を作出するために広く使用されている1つの方法は、雄性および雌性親であって、好ましい雑種種子を作成するための適切な遺伝子構造を有する各親を、互いにごく接近して定植する方法である。下でさらに詳細に論じるように、各植物は、種子を生産するための雄性配偶子と雌性配偶子両方を提供することができる。したがって、一方の親系統は、雄源としての使用に適した特性を有するものとして指定されることになるのに対して、他方の植物は、雌として指定されることになる。雄性植物は、良好な花粉飛散能力を概して必要とし、その一方で雌性植物は、雌性生殖組織の十分な露出、ならびに良好な種子収量および他の望ましい遺伝的特徴を有さなければならない。広く実施されている方法では、雄から飛散される花粉は、雌性植物の稔性が最も高い時期と重ならなければならない。雌が圃場のおおよそ70%を占めるのに対して、雄性植物は圃場のおおよそ30%を通常は占めるが、この数値は、雄が不良な花粉飛散体である場合、より高いパーセンテージに増加する。雄は、指定雌性植物のための花粉を生産するためにのみ存在する。したがって、雄に指定される土地には、種子または食物生産測定量と比較して生産性がない。雄性植物は、価値のある資源も消費し、それらの一部には、利用可能な無機物および水分が含まれる。さらに、雌として指定された植物をそれらの雄性に関して不稔化して、自家受粉または圃場内の他の指定された雌による受粉を防止しなければならない。

#### 【0009】

当業者には理解されるように、本明細書において開示する本発明の実施は、作物の性質に依存して異なる恩恵をもたらすことになる。例えば、一部の作物は、開花前でさえ花の中に放出される花粉のため高い自家受粉率を有する。必然的に、そのような作物の自家受粉種子率は非常に高い。本発明の実施は、自家受粉のパーセンテージを低下させることができるが、開花前に起こる自家受粉のため、指定雄性花粉での他家受粉の成功率は、閉じている花の中で自家受粉が起こっていない作物における率より低くなる。一部の作物は、作物の性質およびその花粉の特徴のため、異系交雑を防止するために長い隔離距離を必要としない。そのような場合、本発明の実施は、いずれの隔離要件にも影響を及ぼすことができないだろうが、それにもかかわらず指定雄性花粉での他家受粉の成功率を増加させることになり、自家受粉を減少させることにもなる。したがって、栽培される作物に依存して、本発明は、雌に近接した雄の定植、隔離、および雄性不稔といった、前に述べた費用

10

20

30

40

50

のかかる、資源依存的な要素のいずれか 1 つ、いずれか 2 つまたは 3 つすべての必要性を完全にもしくはある程度なくすか、またはそのような要素への依存を低減させうる。

#### 【 0 0 1 0 】

加えて、標的他家受粉に対して望ましくない他家受粉の原因となる可能性がある同じ種の無関係の植物からの十分な隔離を見出すことは、多くの場合、困難でありうる。この隔離の助長にも費用がかかりうる。例えば、雑種コーン種子生産では、十分な隔離を達成するためにコーンをダイズなどの他の作物で包囲することがよくある。図 2 に示されているように、典型的なトウモロコシ雑種種子生産圃場 1 0 0 は、隔離を達成するためにすべての側面がおおよそ 2 0 1 メートル ( 6 6 0 フィート ) のダイズ作物 1 0 2 により通常は包囲される。ダイズ作物は、薄い陰影付きの外側正方形により図 2 に描かれている。内側の雑種種子生産圃場 1 0 4 は、図 2 に黒い正方形によって描かれているように、すべての側面に 4 ~ 8 列の雄性親植物 1 0 6 の境界を有する。この雑種種子生産圃場の最も内側の部分には、雌性親植物と交互に雄性親植物の列が定植される。図 2 には、これが、4 列の雌の間に 2 列の雄という一般的なパターンで示されている。このパターンは、限定を意図したものではない - 雄列が雌列の間に共通の間隔で散在しているような、多くのパターンが使用される。雄性および雌性親植物の特徴、ならびに所定の場所に存在しうる他の要因に依存して、様々な定植パターンが、栽培者により使用される。図 2 は、結果として、おおよそ 3 5 % 雄性親植物および 6 5 % 雌性親植物である圃場となる。長さがおおよそ 6 1 0 メートル ( 2 0 0 0 フィート ) で幅が 8 0 0 列の圃場に基づき、図 2 のレイアウトは、結果として、隔離手段として作用する  $6 5 0 0 0 0 \text{ m}^2$  ( 65 ヘクタール ( 1 6 1 エーカー ) ) のダイズ生産により包囲されたおおよそ  $3 7 0 0 0 0 \text{ m}^2$  ( 37 ヘクタール ( 9 2 エーカー ) ) の種子生産となる。これは、比較的小さい種子生産面積のために相当な量の土地面積を必要とする。雑種種子生産圃場の他の例は、雄性親植物と雌性親植物の様々な組合せを使用することができ、使用されることになるパターンの決定は、親植物の特徴に依存することが多い。

#### 【 0 0 1 1 】

商業規模の生産でのそのような手順の実行は、費用もかかり、多くの場合、要求遺伝的純度を得るには不十分でもある。遺伝的純度は、種子純度の測定値である。雑種種子に関して、遺伝的純度は、雄性親植物と雌性親植物間の所期の遺伝子交雑を有する種子の測定値であり、通常はパーセンテージとして表される。自家受粉の結果として得られる種子 ( 同系交雑種 ( s e l f s ) ) または意図したものでない花粉での受粉の結果として得られる種子 ( 異系交雑種 ( o u t - c r o s s e s ) ) は、汚染物と見なされ、雑種種子ではない。雑種コーン種子は、保証雑種種子 ( c e r t i f i e d h y b r i d s e e d ) として販売されるには通常は 9 5 % の遺伝的純度 ( すなわち、9 5 % 雑種種子 ) を有さなければならない。米国における種子検定は 4 世代スキームであり、このスキームは、個々の州各々の責務であり、各々の州内に、個々の州の種子法に基づいて種子を品質保証するための指定された機関がある。前記 4 世代は、育種家種子、原原種種子、原種種子および保証種子である。保証種子は、原原種種子または原種種子から生産され、4 世代種子検定プログラムの最終製品である。各州にはその独自の種子法があるが、9 5 % 遺伝的純度要求が一般的である。推奨隔離距離が使用された場合でも、ごく近接している他の圃場から風、昆虫および他の自然要因により運ばれてくる花粉のため、望ましくない花粉が圃場を汚染することはよくある。

#### 【 0 0 1 2 】

トウモロコシの雌性親植物に雄性不稔を導入する方法の中でも、雄穂除去は、世界中の種子生産の大部分に使用されており、雌性植物から雄穂を除去するために手作業および / または高額機器が必要であるため非常に費用がかかる。1 9 3 0 年代におけるコーン雑種の大幅な採用 ( 非特許文献 4 ) 以来、種子生産は、隔離した雄と雌の種子生産ブロックの定植および雌列の雄穂除去を含む非常に類似した様式で、主として行われてきた。本明細書に記載の本発明には、種子生産法の売上原価 ( C O G S : c o s t o f g o o d s s o l d ) を低下させることができる点で経済的価値がある。第一に、本発明は、雄穂

10

20

30

40

50

除去費用を節約することになる。本発明は、現在用いられている強度の平均50%で雄穂除去を可能ならしめることができよう。 $\$350/A$ の現在の雄穂除去費用（非特許文献5）および米国だけでおよそ $4 \times 10^9 \text{ m}^2$ （100万エーカー）の雑種子生産（非特許文献6）を仮定すると、本発明は、種子産業にとって雄穂除去費用削減に関して年間 $\$175,000,000$  [ $\$350/\text{約}4000 \text{ m}^2$ （1エーカー） $\times 50\%$ 採用 $\times 4 \times 10^9 \text{ m}^2$ （100万エーカー）]の価値があることになる。加えて、隔離距離を減少させること、および種子生産圃場に定植される雄の量を減少させることにより、さらなる価値が得られることになる。遺伝的雄性不稔法は、雄穂除去より費用がかからないが、それでもやはり、的確な遺伝子/細胞質を有する雌性系統を開発するために、それらがGM Oと見なされる場合、遺伝子を利用するための政府の規制当局の認可を受けるために、および開発プロセスタイムラインに起因してわずかに遅延される製品を導入するために、かなりの費用を種子産業にもたらす。これらの理由のため、遺伝的雄性不稔法は、米国において生産される全トウモロコシ雑種単位のうちの少数にしか使用されていない。同様に、化学的雄性不稔導入は、少数の作物にしか使用されておらず、相当な費用がかかる、相対的に不十分、および広範囲に適用できないと考えられている。

10

20

30

40

50

#### 【0013】

したがって、当産業では、上記難点の影響を低減させる、または上記難点を完全になくす発明が必要とされている。そのような発明は、雌性親植物にごく接近して雄性親植物を定植する必要性を低減させるもしくは完全になくすことになり、または必要とされる雄性親植物の数を低減させることになる。加えて、前記発明は、受粉手順のより制御された方法により、種子生産圃場に同じ種の他の無関係の植物から隔離して定植する必要性を軽減するまたは有意に低減させることになる。同様に、前記発明は、より短い隔離距離の使用を可能にすることになる。さらに、前記発明は、自家受粉を回避するために指定雌性親に何らかの形態の雄性不稔を用いる必要性を低減させ、またはなくし、その結果、労働集約的雄穂除去プロセスまたは他の雄性不稔法の使用を大きく低減させるまたは完全になくすことになる。

#### 【0014】

加えて、雑種として栽培することができない作物、または形態構造変化もしくは現行の育種の実施のために掛け合わせるのが難しい作物について、本発明は、雑種子の生産を可能にすること、および雑種生産を種子産業にとって経済的に実行可能な選択肢にする費用での商業レベルの量の生産を可能にすることができる。コムギをかけ合わせる努力は、80年を超えて行われてきたが、コムギの雑種強勢からの20%を超える子実収量の可能性にもかかわらず、種子の経済的生産にはほとんど成功していない（非特許文献7）。本明細書に記載の本発明などの、雑種子を経済的に生産するシステムには、とてつもない価値があるであろう。変種のコムギと比較して雑種コムギについての10%というささやかな収量増加を仮定し、かつコムギ作付面積の3分の1が雑種に転換すると仮定すると、バリューチェーン全体について全世界で年間43億ドルの価値があることになる。これは、7億2千900万kg（729MMメトリックトン）の2014年度世界コムギ生産[国際連合食料農業機構（FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations）]および1,000kg（1メトリックトン）当り $\$180.32$ のコムギ商品価格（非特許文献8）に基づく（計算： $\$180.32/1000 \text{ kg}$ （1MT） $\times 729,000,000$ （729MM MT） $\times 10\%$ 収量増加 $\times 33\%$ 雑種採用）。この総額は、控えめなものである。およそ33%の雑種コムギ採用だけで種子販売による潜在的な世界的価額獲得は年間およそ30億ドルであるというのが種子業界による主張であるからである（非特許文献9）。世界規模での数字は、さらにそれよりはるかに大きい。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1】この図は、1866～2011年の米国におけるコーン作物の約 $4000 \text{ m}^2$ （1エーカー）当りのブッシェル（1ブッシェル＝約35リットル（米国））での平均収量

の増加を示す図である。情報源：ミズーリ大学・エクステンション（University of Missouri Extension）ウェブサイト。

【0016】

【図2】この図は、典型的なトウモロコシ雑種種子生産圃場を上から見た図を表す図である。外側の薄い陰影付き正方形は、隔離境界であり、典型的にダイズが定植される。内側の黒い正方形は、雄性親植物を表し、内側の圃場は、雄性親植物と雌性親植物の交互列パターンである。

【発明の概要】

【0017】

汚染を減少させることにより結果として得られる種子の遺伝的純度を改善する種子生産方法であって、雌性要素と雄性要素の両方を備えている指定雌性親植物を栽培する工程；前記指定雌性親植物の前記雄性要素が、発芽可能な花粉を放出していないとき、かつ他の生物学的適合性花粉源も、発芽可能な花粉を放出していないときに、前記指定雌性親植物に指定雄性植物花粉を1回以上、意図的に受粉させる工程；前記指定雌性植物を栽培して成熟させる工程；および前記指定雌性植物により生産された種子を収穫する工程を含む方法を提供する。さらに、前記方法は、次の条件のうちの1つ以上の必要性の低減または排除を含む：前記雌性植物の雄性不稔；あらゆる生物学的適合性花粉源からの前記指定雌性植物の物理的および/または時間的隔離；ならびに前記指定雌性植物に近接して栽培される雄性花粉供与植物（male pollinator plants）。

10

【0018】

本発明のさらなる実施形態は、新鮮な指定雄性植物花粉または保存された指定雄性植物花粉のどちらかの使用を含む。花粉は、圃場、栽培箱、温室、ガラス温室、シェードハウス、フープハウス、垂直栽培施設または水耕栽培施設のうちの1つ以上から収穫されたものであってもよい。保存花粉は、これらに限定されるものではないが冷蔵、凍結保存、凍結乾燥または液体窒素中での貯蔵を含む様々な形態の冷却または凍結をこれらに限定されるものではないが含む、花粉に発芽能力を保持させられる任意の手段により、保存されたものであってもよい。さらに、花粉は、新鮮なものであると、保存されたものであると、概日リズムが変更された源（ソース）から収集したものであってもよく、前記指定雌性親植物の前記雄性要素が遅延されるが正常な1日周期で開花する源から収集したものであってもよく、または前記指定雌性親植物の前記雄性要素が遅滞なく飛散させられる正常な1日周期で開花する源から収集したものであってもよい。花粉は、新鮮なものであろうと、保存されたものであろうと、1つ以上の遺伝源から収集されたものであってもよく、散布前に他の遺伝源からの花粉と混合されたものであってもよい。

20

30

【0019】

一部の実施形態では、雄性植物花粉は、同じ指定雌性植物に1回より多く散布される。本発明の実施形態は、指定雌性植物親が前記花粉を最初に受入可能になる時点での指定雄性植物花粉の散布を含む。別の実施形態は、雌性親植物の雄性要素の成熟を遅延させるための処置の使用を含む。

【0020】

前記方法は、これらに限定されるものではないがコーン、ダイズ、コムギ、イネ、ヒマワリ、セイヨウアブラナ、モロコシ、ワタ、オオムギ、トウジンビエおよびアルファルファを含む、広範な植物に応用することができる。

40

【0021】

任意の植物種の種子を生産する方法であって、指定雌性植物への指定雄性花粉の意図的散布を含み、指定雌性植物親が、雌性要素には花粉を受け取る準備が整っているが雄性要素は花粉を放出していない状態である、方法を提供する。さらに、指定雌性親は、雄性不稔を含む必要がなく、望ましくない生物学的適合性花粉源から隔離される必要もない。

【0022】

指定雄性花粉の散布を自動化手段、機械的手段、手動手段、空気圧手段、陽圧、陰圧、半自動化手段またはこれらの組合せにより行ってもよい。さらに、指定雄性花粉源は、雄

50



性原料物質から以前に保存された花粉からであってもよく、または雄性原料物質から収穫したての花粉からであってもよい。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下は、改善された雑種種子生産を可能にする技術および方法の実施形態の詳細な説明である。このような技術および方法は、任意の植物から雑種種子の作出に使用しうる。論述および理解を容易にするために、以下の詳細な説明は、しばしば、(コーンとも言われる)トウモロコシに関する使用を参照して本発明に言及する。これらの技術および方法を任意の種子繁殖植物に関して使用しうることは、ならびにコーンおよび他の具体的に名を挙げる植物が、単に例証を目的として論じるものに過ぎず、限定を意図したものではないことが理解されるべきである。同様に、この技術は、一般に親生産および/または種子生産における汚染を減少させることならびに遺伝的純度を上昇させるために使用しうる。5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、または任意の他の量を含むがこれらに限定されない任意の量で、汚染を低下させうる。好ましい実施形態では、汚染を少なくとも30%、例えば、30%以上、40%以上または50%以上低下させうる。

10

【0024】

種子は、雑種種子を含めて、多数の目的のために生産される。第一に、種子は、様々な研究目的で、遺伝的特徴の新たな組合せの価値を評価するために生産される。種子会社は、よりよい植物の遺伝的特徴の開発を求めて研究に何十億ドルもつぎこむ。雑種種子を生産するもう1つの理由は、農業従事者などの生産者へのそのような種子の商業販売である。加えて、種子は、雑種種子生産圃場において親を栽培するために使用される親種子を作出するために生産される。本発明は、任意の目的で生産される、任意の雑種または非雑種種子の生産に使用することができる。種子の最終用途にかかわらず、雑種種子の生産は、適切な雌を受精させる適切な雄性花粉に依存する。雑種種子生産の改善された方法は、収集、貯蔵、および雄性親植物からの花粉の雌性親植物への供給を含む。花粉を収集するいくつかの方法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第4,922,651号明細書には、植物の受粉を果すまたは改善するための装置が開示されている。

20

【0025】

加えて、米国特許第4,922,651号明細書などの、いくつかの花粉供給方法が、当技術分野において公知である。加えて、花粉を貯蔵する様々な方法が公知である。例えば、極低温貯蔵のための花粉の調製のための方法および機器を包含する米国特許第5,596,838号明細書には、花粉を何ヶ月もの期間にわたって貯蔵することができ、それでもなお花粉に依然として発芽能力があることが教示されている。いくつかの花粉供給方法は公知であるが、これらの方法は、大規模圃場研究または商業用雑種種子生産における利用を支援するために、現行技術では常に必要とされる隔離および/または雄性不稔の必要性をなくすようなやり方で花粉を意図的に供給することを使用者に教示しておらず、提案しておらず、動機も与えていない。本発明は、植物が自家受粉を受ける可能性がある、および/または他の望ましくない花粉に曝露される可能性がある活動期間外に受粉が行われる結果となり、したがって、雄性不稔の使用も隔離の使用も必要としないが、一方または両方を、本発明の範囲から逸脱することなく利用してもよい。さらに、コムギなどの一部の植物では、雄性花粉は、雑種を有効に生産できるほど遠くに移動しない(Loureiro, I.)ら著、「ユーフィティカ(Euphytica)」、2007年、156巻、p.25-37; Dong, S.)ら著、「プロスワン(PLos ONE)」、2016年、11(3)、e0151373.doi:10.1371/journal.pone.0151373)。本発明は、花粉を雌性親植物に有効に供給する意図的受粉に頼ることにより、当産業におけるこの問題を改善する。

30

40

【0026】

50

上で論じたように、本発明は、発芽して、最終的には農業従事者に販売される雑種子を有することになる種子植物になる、雌性親種子を播種する一般的な実施に応用することができ、または研究プログラムに使用するための種子の生産に応用することができる。しかし、現行の実施の場合のような雌性植物にごく近接した雄性親種子の播種ではなく、本発明は、特定の時間における雄性花粉の雌性植物への意図的散布の使用による、改善された代替策を提供する。花粉散布に関しての用語「意図的」の使用は、風、昆虫活動または他の自然に起こる状態による自然受粉を含まないやり方での花粉の特異的散布を意味する。意図的に散布された花粉は、計画的な人間の活動、決定または介入の結果として植物に散布された花粉であって、手で散布されることもあり、または他の手段により散布されることもある花粉である。意図的花粉散布の一例は、圃場における特定の必要性または条件に対処するための花粉の使用である、花粉の「処方的」散布である。下で詳細に論じるように特定の時間が好ましいが、本発明の一態様は、圃場における日中の時間を問わない受粉の利点である。本発明のすべての態様では、花粉を1つの遺伝源から得てもよく、または複数の遺伝源から得てもよい。

#### 【0027】

雑種子を作るために必要な雄性花粉[ときには「花粉<sup>M</sup>」]の獲得は、花粉バンク経由である場合もある。花粉バンクは、1つ以上の花粉源から収集され、花粉がその発芽能力を保持するように貯蔵された、貯蔵花粉源である。そのような花粉バンクの花粉源として使用された植物は、これらに限定されるものではないが圃場、栽培箱、温室、ガラス温室、シェードハウス、フープハウス、垂直栽培施設または水耕栽培施設を含む、任意の条件で栽培および収穫されたものでありうる。花粉バンクからの花粉は、様々な方法で調達されたものでありうる。例えば、一実施形態では、圃場での雌性植物の自然栽培の前に、概日リズムが2～8時間である制御環境で栽培された雄から新鮮な花粉を収穫することができる。この方法は、下でさらに詳述することにする。別の実施形態では、バンクに貯蔵されている花粉は、受粉のためにバンクから最終的にそれを取り出す数日、数週間、数ヶ月または数年前に収集された保存花粉でありうる。保存花粉は、これらに限定されるものではないが冷蔵、凍結保存、凍結乾燥または液体窒素中での貯蔵を含む様々な形態の冷却または凍結をこれらに限定されるものではないが含む、花粉に発芽能力を保持させられる任意の手段により、保存されたものでありうる。

#### 【0028】

1つ以上の実施形態では、花粉を葯スタジオ(anther studio)から収穫することがある。葯スタジオは、植物の任意の種または品種の雄性植物生殖組織に最適な栽培条件を可能にする。圃場などの標準的な野外条件で栽培されている植物または温室もしくは栽培箱などの制御条件で栽培されたものから組織(例えば、コーンの雄穂)を切断する。組織を好ましくは植物が花粉を飛散させ始める前に切断して葯スタジオ内に配置する。その後、組織を、さらなる成長を可能にする栄養培地で培養してもよい。専用の照明、温度および/または湿度のうちの少なくとも1つを葯スタジオ内で循環させてもよく、それにより組織の持続成長が可能になる。成長速度を上昇させるようにまたは緩徐化するように成長を調節し、かくて花粉の入手可能期間を調節しうる。これにより、昼夜を問わず達成することができる受粉のための需要に応じた花粉を有することができることが可能になる。これは、種子および子実生産に関係するいくつかの有益な価値のあるプロセスの受粉実施可能化に有用である。それにより、保存のための濃縮花粉源も得られる。葯スタジオから収穫され、保存されたいずれの花粉も、収穫されたての花粉と同様に、しかし新鮮な花粉は保存されずに死滅したずっと後に、利用することができた。(アール・アイ・グレイソン(R. I. Greyson)著、「マイズ・インフローレスセンス・カルチャー(Maize inflorescence culture)」、エム・フレーリング(M. Freeling)、ブイ・ワルボット(V. Walbot)編、サ・マイズ・ハンドブック(The Maize Handbook)、1994年、p. 712-714; ジェイ・ビー・スコッパー(J. B. Schoper)、アール・ジェイ・ランバー(R. J. Lamber)、ビー・エル・バシラス(B. L. Vasilas)およびエ

10

20

30

40

50

ム・イー・ウェストゲート (M. E. Westgate) 著、「プラント・ファクターズ・コントローリング・シード・セット・イン・マイズ。ザ・インフルエンス・オブ・シルク・ポーレン、アンド・イアリアーフ・ウォーター・ステータス・アンド・タッセル・ヒート・トリートメント・アット・ポリネーション (Plant factors controlling seed set in maize. The influence of silk pollen, and ear leaf water status and tassel heat treatment at pollination)」、Plant Physiol.、シュプリンガー出版 (Springer-Verlag)、ニューヨーク (New York)、1987年、83巻、p. 121 - 125)

10

#### 【0029】

機械的手段、陽圧、陰圧、空気圧手段によることもあり、または別の方法であることもある、花粉<sup>M</sup>の供給は、雌が花粉を受入可能になるとすぐに行われ、これは、どの日であれ指定雌性親の花粉 [ときには花粉<sup>F</sup>] が発芽可能になる常に前であり、かくて、受入可能なすべての雌に関して他家受粉をうまく行うことができる時間帯を可能にする。言い換えると、植物の雌性要素が、雄からの花粉を受け取るために開いた後、同じ植物の雄性要素に花粉を生産する準備が実際に整う。コーンの場合、雌は、絹糸が出る前および皮から出てから何日間も花粉受入可能である。さらに、コーンの場合、花粉が絹糸出現前に飛散されることもあり (雄性成熟)、または絹糸出現が花粉飛散の後であることもある (雌性成熟) という、2つの可能性が存在する。いずれの場合も、絹糸は、一旦受入可能になると、花粉が所与の日飛散される前に花粉受入可能であることになる。本発明は、両方の状況に応用することができる。さらに、一部の例では、絹糸は、約7日間、一日中、花粉受入可能である。したがって、これらに限定されるものではないが1日1回、1日2回を含む、任意の回数、花粉を意図的に散布してもよく、または連続散布で花粉を意図的に散布してもよい。雄性不稔を使用しないと、花粉<sup>F</sup>は、通常は、午前半ばの時間に飛散し始めて昼近くまたは昼過ぎまで継続し、その後、すべての花粉<sup>F</sup>は、発芽可能な雌を発見して発芽し、自家受粉成功を可能にする結果となるか、または発芽可能な雌上に着地しなければ60分以内に死滅する (ルナ・ブイ (Luna V.) ら著、「クロップ Sci. (Crop Sci.)」、2001年、41巻、5号、p. 1551 - 1557)。したがって、雌性トウモロコシ植物には、雄性花粉を供給することができ、かつ花粉<sup>F</sup>が飛散していない、毎日の時間帯がある。この時間帯は、数日にわたって繰り返されることになる。本発明は、花粉<sup>F</sup>が飛散していないまたは発芽可能でない時間帯に、発芽可能な雌のほぼすべてに他家受粉するので、自家受粉種子を回避するために雄性不稔を必要としない。

20

30

#### 【0030】

したがって、本発明の一態様は、雌性親への花粉供給のタイミングである。すべての作物には、雌が成熟し、比較的継続的に成長する受粉時間帯 (雌が花粉受入可能であり、うまく受粉事象を行うことができる時間) の日周期があるが、雄は、午前半ばに始まって昼近くもしくは昼過ぎに終わる、花粉が発芽可能になり飛散するかまたは葯の開裂により放出される (dehiscence from the anthers)、異なる周期を有する。場合によっては、雌が稔性になる前に花粉<sup>F</sup>が発芽可能になることもあるが、その日に発芽可能な花粉<sup>F</sup>が飛散し始める前に発芽可能な雌が稔性になる最初の朝は必ずある。したがって、前日に飛散した可能性がある花粉<sup>F</sup>は、とくに死滅しており、雌が翌朝発芽可能になる前には発芽不能になっている。それ故、早朝から午前半ばの時間は、花粉<sup>F</sup>が飛散し始める直前にすべての発芽可能な雌に幸運にも他家受粉するための花粉<sup>M</sup>の散布には理想的であるが、花粉<sup>F</sup>が飛散し始める数日前に花粉を散布すること選択してもよく、または純度の高い雑種子の作出成功確率を増すために日中の複数の時間にもしくは継続的に花粉を散布することを選択してもよい。一例では、花粉は、6:00 a.m. に供給されることがある。しかし、花粉の供給を日中の時間を問わず行ってもよく、これは旧来の方法より大きな利点を持つ。したがって、花粉<sup>F</sup>が飛散し始めたとき、すべての発芽

40

50

可能な雌は、選択された花粉源によって既に受粉されており、花粉<sup>F</sup>は、いずれの発芽可能な雌も見つけれずに短時間の後、死滅するため、以前の雑種システムでは何らかの形態の雄性不稔を余儀なくされた雌の自家受粉が回避される。異なる種の花粉は異なる生存期間を有し、さらにそのような生存期間は環境条件による影響を受けうる（ダフィニ・エイ（Daffini, A.）およびディー・ファーマージ（D. Firmage）著、「プラント・システムクス・アンド・エボリューション（Plant Systemics and Evolution）」、2000年、222巻、1号、p. 113 - 132）。より高い湿度およびより低い温度は、花粉の寿命を延ばしうる。例えば、イネ（rice）[イネ（Oryza sativa）]の場合、花粉寿命は4分ほども短いこと（コガ（Koga）ら著、「キトロギア（Cytrogia）」、1971年、36巻、p. 104 - 110）または花粉の50%は20分までに死滅すること（ハトゥン・エス（Khatum, S.）およびティー・ジェイ・フラワーズ（T. J. Flowers）著、「J. Exp. Bot.」、1995年、46巻、p. 151 - 154）が判明している。対照的に、野外栽培の大根（radish）[大根（Raphanus sativas）]花粉は、5日の生存期間を有することが証明された（シディキ・ビー・エイ（Siddiqui, B. A.）著、1983年、Acta Bot. Ind.、11巻、p. 150 - 154）。

#### 【0031】

したがって、本発明は、一旦雌の花粉受容力が確立されると、花粉が所定の日に飛散される前に、雌が花粉受入可能になる前に花粉が先に全体に飛散された場合でも、植物の雌性要素は一般に花粉受入可能であるということを利用する。すべてではないにせよほとんどの植物において、これは、日周リズムで起こり、例えば、コーンに関しては、雌性要素は、花粉受入可能であり、雄性要素は、少なくとも毎日露が乾き終わって（これは、一部の例では、10:00 a.m.であることもあり、または曇りもしくは雨の日には1:00 p.m.ほども遅いこともある）初めて準備が整うという、日周リズムで起こる。さらに、何らかの天候不良または雨の日には、雄性要素は、大幅に遅延されることがあり、または実際に全く花粉を飛散させないこともある。ダイズなどの多くの作物では、雌性要素は、雄性要素の前日には準備が整いうる。多くの場合、雌は、全体的におよび日々、雄より先に準備が整っている。したがって、午前中の最初の受粉は、結果的に所望の花粉による受粉になることが多い。さらに時刻に関係なく雌が最初に受入可能になるまさにその時点で受粉する能力を有することは、現行の実施に対する非常に大きな利点である。

#### 【0032】

適切な時間に植物の受精時間帯の妥当な期間にわたって花粉を供給することにより、雌性植物においていずれの形態の雄性不稔も使用することなく十分な純度を達成することができる。任意の作物に関して何らかの形態の雄性不稔を使用することなく商業雑種種子生産を可能にしたのは、これが初めてである。したがって、これは、本発明の新規態様である。さらに、ダイズなどのいくつかの作物は、経済的に実行可能である形態の雄性不稔を有さないのので、本発明は、雄性不稔が可能でなかった種（例えばダイズ）または困難であった種（例えばコムギ）に関しての雑種種子生産を可能にする。同様に、本発明は、望ましくない生物学的に適合性の源（花粉<sup>U</sup>）からの物理的な隔離も時間的な隔離も使用しない有効な雑種種子生産を初めて可能にする。したがって、花粉<sup>U</sup>が飛散し始めたとき、すべての発芽可能な標的雌は、選択された花粉源によって既に受粉されており、花粉<sup>U</sup>は、種および環境条件に依存して短時間（1～4時間）の後には死滅し（ルナ・ブイ（Luna V.）ら著、Crop Sci.、2001年、41巻、5号、p. 1551 - 1557；スタンレー・アール・ジー（Stanley, R. G.）およびリンズケンズ・エイチ・エフ（Linskens, H. F.）著、「ポーレン：バイオロジー、バイオケミストリー、マネージメント（Pollen: Biology, Biochemistry, Management）」、1974年、シュプリンガー出版（Springer-Verlag）、ハイデルベルグ（Heidelberg）；シヴァンナ・アール・ケイ（Shivanna, R. K.）著、「ポーレン・バイオロジー・アンド・バイオテクノロ

ジー ( Pollen Biology and Biotechnology )」、2003年、サイエンスパブリッシャーズ社 ( Science Publishers, Inc. ) )、いずれの発芽可能な標的雌も見出されないため、以前の雑種種子システムでは何らかの形態の隔離が余儀なくされた雌の交差汚染受粉が回避される。

#### 【0033】

受入可能な絹糸の時宜にかなった受粉を果すために需要に応じて発芽可能な花粉を供給する能力は、圃場規模で雑種種子および子実生産に共通の多数の制限に対処する。具体的には、本発明の処方的使用は、低レベルの花粉生産を克服し、雄花と雌花間の繁殖同調不良をなくし、雑種種子生産における高い物理的隔離費用を減少させる。

#### 【0034】

本発明の実施形態は、旧来の隔離技術に対処する上での様々な選択肢を含む。上で論じたように、旧来の隔離技術は、物理的隔離を含みうる。物理的隔離に対処する前記様々な選択肢は、花粉<sup>U</sup>からの隔離の完全排除はもちろん、花粉<sup>U</sup>汚染を低下させるために必要な隔離距離の短縮も含みうる。雄性親系統および雌性親系統を含む雑種種子生産圃場を他のコーンから隔離するために米国コーン雑種種子産業において隔離に使用されている標準距離は、201メートル ( 660フィート ) 以上である ( アイオワ・シード・サーティフィケーション・リクワイアメンツ・ハンドブック ( Iowa Seed Certification Requirements Handbook )」、アイオワ作物改良協会 ( Iowa Crop Improvement Association ) 編、2009年 )。この距離は州ごとに異なりうるが、この距離は、風により助長される花粉漂流はもちろん昆虫により助長される受粉も防止するために通常は有意である。本明細書において開示する本発明の技術を、任意選択で、雑種種子親の隔離距離の短縮または排除と併用することにより、一連の漸進的な遺伝的純度改善を行うことができる。例えば、本発明の受粉方法と隔離距離の短縮の併用は、結果として得られる雑種種子の遺伝的純度レベルの改善をもたらすことになる。隔離距離を201メートルから180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5もしくは1メートルの隔離距離に短縮することができ、または隔離距離を完全になくすことができ、したがって、雑種親植物は、所期の交雑親でない他のコーンのすぐ隣に定植される。隔離距離を短縮すると純度レベルが低くなる可能性がより高くなるが、本明細書において開示する受粉技術の効力のため、達成される純度レベルは、なお、雑種種子の生産および販売の要求基準の範囲内でありうる。外来性花粉源からの物理的隔離についての旧来の要求は、雑種種子生産に多額の出費を加える。現地の花粉飛散前に高い受精レベルを確保するのに十分な投与量の花粉の受入可能な絹糸への本発明による直接散布により、種子圃場隔離を実施する必要性が克服される。

#### 【0035】

物理的隔離に加えて、時間的隔離は、花粉<sup>U</sup>汚染しないように雌を隔離するために使用されうる技術である。時間的隔離は、雌絹糸および花粉<sup>U</sup>を異なる時間に利用できるように雌と望ましくない雄を定植した場合に起こる。1つの非限定的な例では、雌および雄は、ひと月離して定植されることがある。そのような技術は、熱帯性および亜熱帯性気候で最もよく使用される。本発明の実施形態は、時間的隔離に対処する上での様々な選択肢も含む。時間的隔離に対処する前記様々な選択肢は、花粉<sup>U</sup>からの隔離の完全排除はもちろん、花粉<sup>U</sup>汚染を低下させるために必要な隔離時間の短縮または隔離量の低減も含みうる。本明細書において開示する受粉技術の効力のため、達成される純度レベルは、なお、雑種種子の生産および販売の要求基準の範囲内でありうる。

#### 【0036】

雄花の開花と雌花の開花の近い同期性、および露出した絹糸1本当たりの最小花粉密度は、高い種子生産および遺伝的純度レベルのための基本要件である。以前に収集され、保存された花粉、または新鮮な花粉を、受入可能な絹糸に7~10日間にわたって散布し、それによって花粉発芽能力低下条件下、花粉飛散に対するシルキング遅延条件下、または雄性自殖体と雌性自殖体間の「ニック」不良条件下で確実に結実させることができる。耕種

10

20

30

40

50

産業において、「ニック」は、雑種種子生産に関して使用される用語であり、花粉粒が受粉に成功して、結果的に受精することになるような理想的な時期に発生する雄花型と雌花型両方の同期性（すなわち、雌における絹糸出現ピークと合わせた雄による花粉飛散ピーク）を指す。種子生産について、完璧な「ニック」は、雌性集団の50%が絹糸を働かせ始めるのと同じ日に雄性集団の50%が花粉を飛散させ始めた場合に起こる。

#### 【0037】

本発明の受粉技術を、圃場における雄穂除去量の低減と並行して利用した場合にも、同様の一連の純度改善が適用される。雄穂除去の標準的な実施には、雌の雄穂の1%より多く花粉を飛散させないことが要求される（アイオワ・シード・サーティフィケーション・リクワイアメンツ・ハンドブック（Iowa Seed Certification Requirements Handbook）、アイオワ作物改良協会（Iowa Crop Improvement Association）編、2009年）。これを果すために、雄穂除去クルーは、連続4～5日、様々なレベルの強度（雄穂除去機がいずれかの所与の道を通して移動する速度）で圃場を通過する必要がある。本明細書において開示する本発明の技術を利用することにより、雄穂除去道および/または強度を低減させることができ、それにより、雌の雄穂の1%より多くの飛散が可能になる上に許容可能な遺伝的純度がなお得られる。飛散が可能になるパーセントを1%、2%、3%、4%、5%から10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%に増加させることができる。100%の場合、雄穂除去の必要ないであろう。

10

20

#### 【0038】

遺伝的純度の必要レベルを得るための雌の圃場への受粉成功のために定植する必要がある雄性植物の数の低減と並行して本発明の受粉技術を利用した場合にも、同様の一連の純度改善が適用される。典型的なトウモロコシ雑種種子生産圃場では、雄性親植物の存在は、圃場内の植物の20%～40%の範囲である（バスラ・エイ・エス（Basra, A. S.）著、「ヘテロシス・アンド・ハイブリッド・シード・プロダクション・イン・アルロノミック・クロップス（Heterosis and Hybrid Seed Production in Agronomic Crops）」、1999年、p. 48）。必要とされる雄性親植物のパーセンテージは、多数の要因に依存することになり、そのような要因には、雄性親植物からの花粉が実証することになる、予想される花粉の活力および発芽能力はもちろん、特定の土地面積および気候に係る要因も含まれる。本発明の実施により、圃場に必要雄性植物のパーセンテージの有意な低減が可能になり、またはそのような雄性植物を完全になくすることが可能になる。例えば、生産環境で40%の雄性親植物を必要とするのではなく、圃場内の雄性親35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%またはさらには0%などの、より低いパーセンテージを使用することができる。本発明による処方的花粉散布には、種子圃場から雄性花粉供与体（male pollinator）を完全になくす可能性がある。

30

#### 【0039】

さらに、同様の一連の純度改善は、1つ以上の植物が、その植物が開花して他の花粉源を受け取ることが可能になる前に自家受粉しうる作物にも応用することができる。そのような作物の1つの非限定的な例はコムギである。本発明は、そのような作物にも有利でありうる。例えば、限定的雄性不稔および/または隔離を適用することができる。さらに、雌は、早期に開花するように育種されることもありえ、または開花させるための機械的もしくは物理的かく乱を受けることもありうる。場合によっては、花粉が強制的に花に押し込まれることもある。そのような出来事からの多少の自家受粉が避けられない場合でも、自家受粉前に開花する植物において適切な掛け合わせ受粉（hybrid pollination）を行うことができる。そのような場合、遺伝的純度は改善される。

40

#### 【0040】

花粉粒は小さく、非常に壊れやすいものでありうる。雌にうまく受粉するそれらの能力は、様々な環境ストレスによって損なわれることがあり、花粉を生産する植物により受け

50

継がれた固有の性質でもありうる。花粉の性能（すなわち、発芽速度、花粉管伸長活力）は、花粉活力とすることができ、これに対して発芽可能な種子をうまく作る花粉の能力は、花粉発芽能力とすることができ（シヴァンナ・アールケイ（Shivanna, R K）ら著、「Theor. Appl. Genet.」、1991年、81巻、1号、p. 38 - 42）。花粉活力および発芽能力は、植物種、栽培品種および品種の間で有意に異なりうる。場合によっては、通常は不良な活力および／または発芽能力を有する花粉を使用して本発明を実施することが望ましいこともある。そのような状況で、本発明の実施は、収量を増加させ、純度を改善すると予想されるが、これらの特徴の各々に関する改善パーセンテージは、活力または発芽能力がより高い花粉の使用と比較して低いこともある。したがって、本発明の実施により達成されうる純度と収量両方についての一連の改善は、花粉活力および発芽能力をはじめとする広範な要因に依存しうる。純度改善が小さい事象では、本開示の中で後程説明するような純度レベルを改善するための追加の工程を用いてもよい。

10

#### 【0041】

当業者には理解されるであろうが、本発明の実施の際に使用されることになる雄性花粉の選択は、本発明を実施することにより理解される潜在的恩恵の有意な要因である。花粉活力および発芽能力は、花粉により付与されうる様々な形質および特徴と共に、考慮すべき事柄である。活力および発芽能力がより低い花粉の使用が、結果として得られる種子にそれが付与することになる形質のため、やはり良好な選択肢である場合もありうる。花粉がより低い活力または発芽能力を有することが分かっているような場合、結果として生じる、より穏やかな汚染減少が、より低い潜在的収量増加と共に、予想されるはずである。そのような判断を、栽培者は、作物の特定の特徴と、所望の種子と、作物に影響を与える環境ならびに他の生物学的および／または非生物学的圧力に関しての予想受粉時における優勢な条件とに基づいて行うことができる。したがって、受粉時に花粉を選択できることは、本発明を実施することにより理解される潜在的恩恵のさらなる有意な要因である。下の表1は、本発明の使用についての選択された潜在的恩恵の概要を示すものである。

20

【表 1】

表 1：花粉選択の恩恵の例

生産問題	本発明の利用	予想される恩恵
圃場規模での雑種種子生産に適さない、雄性自殖による花粉生産不良	需要に応じて受入可能な絹糸に散布され、その結果、受粉を増加させる、新鮮なまたは保存された花粉の使用	雑種開発に優良雄性自殖体を利用する、より大きな可能性
親種子圃場における低い種子生産レベル	需要に応じて受入可能な絹糸に散布され、その結果、受粉を増加させる、新鮮なまたは保存された花粉の使用	優良雄性および雌性自殖体による、より大量の種子生産
低い種子収量および許容可能レベルより高い遺伝子汚染につながる、雑種種子生産における雄性自殖体と雌性自殖体との繁殖同調不良	需要に応じて受入可能な絹糸に散布され、その結果、受粉を増加させる、新鮮なまたは保存された花粉の使用	約 4 0 0 0 m <sup>2</sup> (1 エーカー) 当りの種子収量増加、雌性自殖体の自家受粉減少、外来の源からの異系交雑減少
外来性花粉源からの物理的隔離の要求に起因する雑種種子生産の高額な費用	需要に応じて受入可能な絹糸に散布され、その結果、受粉を増加させる、新鮮なまたは保存された花粉の使用	現地の花粉飛散前に 1 0 0 % までの受精を確実にするのに十分な投与量の花粉の受入可能な絹糸への直接散布
受粉が、同一遺伝子構造の植物による、例えば、自家受粉または同種間受粉 (sibling pollination) による、単作圃場の自殖作用	需要に応じて受入可能な絹糸に散布され、その結果、受粉を増加させる、新鮮なまたは保存された花粉の使用	約 4 0 0 0 m <sup>2</sup> (1 エーカー) 当りの種子収量増加、雌性自殖体の自家受粉減少、外来の源からの異系交雑減少

10

20

30

## 【0042】

以下の非限定的な実施例は、本発明を実施することができる可能性のあるシナリオを提供し、その恩恵の概要を示すものである。従来を使用すると雑種種子生産圃場に 35 % 以上の雄の存在を必要とする、しかしそれでも結果的に許容可能ぎりぎりの汚染 (約 5 %) となる、飛散不良雄からなる雑種の場合に、本発明を実施することができる。本発明は、雄の存在を半分の 17 % 存在に減少させることを可能にすることができ、その上、汚染を許容可能レベル (2 ~ 3 %) に減少させ、売上原価を低下させることも可能にすることができた。あるいは、雄が平均より上の花粉飛散体であり、および前の親が増加している状態で花粉が捕獲され、保存された場合、本発明は、雄をなくすことならびに雄穂除去強度 (および費用) を 50 % 減少させ、その結果、売上原価を低下させることを可能にすることができ、その上、従来の実施と同等のレベル (2 ~ 3 %) での、しかし、本発明の実施を伴わない同パラメータ (50 % 雄穂除去、および雄の存在なし) より劇的に低い汚染レベルでの汚染の維持を可能にすることができた。

40

## 【0043】

花粉<sup>M</sup>を任意の数のやり方で供給することができ、そのようなやり方としては、花粉散布機構を備えている圃場で運転される機械類による、手動供給、半自動化散布用の小型手動機械装置での手動供給；または花粉散布が、これらに限定されるものではないが機械的手段、陽圧、陰圧もしくは空気圧手段をはじめとする自動手段による場合、自走式装置および/もしくは人間が誘導する装置、例えば、花粉散布デバイスが搭載されたドローンによる完全自動化散布によるものが挙げられるが、これらに限定されない。ドローンの使用

50



は、特に新規であり、この方法に実際に役立つであろう。前記方法において使用されることになる小型ドローンは、調整する必要がなく、またGPS座標を使用して花粉散布を直接雌性植物上に集中させるように誘導することができる。これらの方法のいずれかを使用して、本発明者らは、種子の品質保証および商業販売に（自家受粉および異系交雑汚染種子を合わせて）汚染5%以下を一般に要求する、本明細書において前に説明したような米国における現行の州種子法を満たすために十分な純度を有する1000m<sup>2</sup> [1ヘクタール（2.47エーカー）]のコーン雌性親植物の他家受粉成功には、幸運にも連続3～4日間供給される約140グラム（5オンス）の花粉<sup>M</sup>で十分であると推定した。この推定は、1mg当りのトウモロコシ花粉粒の数を規定している文献、および受粉成功のために絹糸1本당りおよそ3～5粒以下の花粉を推定すること（絹糸1本당り3～4粒の花粉は、受粉の確実な成功に必要な量として受粉技術分野の当業者により一般に容認されている（エム・イー・ウェストゲート（M. E. Westgate）、ジェイ・リザソ（J. Lizaso）、ダブリュー・バッチェラー（W. , Batchelor）著、「クウォンティタティブ・リレーションシップ・ビトウィーン・ポーレン・シェッド・デンシティー・アンド・グレイン・イールド・イン・マイズ（Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize）」、クロープサイエンス（Crop Science）、2003年、43巻、p. 934 - 942；エム・ウリベラレア（M. Uribe Larrea）、ジェイ・カルコバ（J. Carcova）、エム・イー・オテギ（M. E. Otegui）、エム・ウェストゲート（M. Westgate）著、「ポーレン・プロダクション、ポリネーションダイナミクス、アンド・カーネル・セット・イン・マイズ（pollination dynamics, and kernel set in maize）」、クロープサイエンス（Crop Science）、2002年、42巻、p. 1910 - 1918））に基づく。例えば、ポーター（Porter）著、「Environ.ヘルス・パースペクティブズ（Environ. Health Perspectives）」、1981年、37巻、p. 53 - 59；ミラー（Miller）著、「マイズ・フォー・バイオロジカル・リサーチ（Maize for Biological Research）」、ダブリュー・エフ・シェリダン（W. F. Sheridan）（編）、1982年、p. 279 - 293）を参照されたい。花粉供給のタイミング、必要な花粉量、および花粉供給日数を、様々な雌性親が生産する花粉量の変動および天候パターン（すなわち、降雨頻度または降水量、風速および風向など）などの状況に応じて、必要に応じて調整することができる。例えば、雄および雌の花粉生産能力に依存して、任意の所定の親セットに応じて前記方法を調整およびカスタマイズすることができる。さらに、これらの送達方法の効率は、掛け合わせ受粉に必要な花粉量を低減させると予想される。これらのより効率的な方法は、雑種種子生産用に現在生産されている花粉の量の平均で1/1000以下を使用しうると、本発明者らは推定する。本発明者らの研究は、トウモロコシの雄穂から圃場に通常通りに飛散される場合、絹糸1本당り約3000個の花粉尘粒がコーンの完全結実に必要であることを示す。人工授粉研究および屋外圃場研究により、絹糸1本당り約3～4個の花粉尘粒が確実に結実することが証明された。（エム・イー・ウェストゲート（M. E. Westgate）、ジェイ・リザソ（J. Lizaso）、ダブリュー・バッチェラー（W. , Batchelor）著、「クウォンティタティブ・リレーションシップ・ビトウィーン・ポーレン・シェッド・デンシティー・アンド・グレイン・イールド・イン・マイズ（Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize）」、クロープサイエンス（Crop Science）、2003年、43巻、p. 934 - 942；エム・ウリベラレア（M. Uribe Larrea）、ジェイ・カルコバ（J. Carcova）、エム・イー・オテギ（M. E. Otegui）、エム・ウェストゲート（M. Westgate）著、「ポーレン・プロダクション、ポリネーションダイナミクス、アンド・カーネル・セット・イン・マイズ（pollination dynamics, and kern

el set in maize)」、クロープサイエンス(Crop Science)、2002年、42巻、p.1910-1918)。これは、結果的に、雑種種子生産に現在必要な花粉量の約1000分の1の比になる。

#### 【0044】

したがって、本発明の実施は、雄性親植物が雌性親植物に接近して存在する必要性といずれかの形態の雄性不稔が雌性親植物間に存在する必要性を同時になくす。さらに、当業者は、上に列挙した例を必要に応じて容易に変えることができる。例えば、一部の状況では、夜に受粉することが有利であることもある。他の場合、一日中受粉することが有利であることもある。雌性親の自然花粉飛散より先に起こるようなタイミングであるいずれの花粉放出も有効であると予想される。

10

#### 【0045】

本発明は、任意の作物植物において雑種種子生産を改善するようにまたは雑種種子生産を可能にするように機能することができる。本発明は、これらに限定されるものではないが理想的もしくは標的栽培環境、季節はずれの環境、または制御された環境(例えば、シェードハウス/ガラス温室/温室/フープハウス、栽培箱、垂直栽培施設、水耕栽培施設、エアロポニック施設など)を含む、任意の環境において機能することができる。望ましくない源からの花粉<sup>F</sup>または他の花粉が活発に飛散していない間に現在発芽可能なすべての雌を他家受粉するのであれば、花粉<sup>F</sup>または他の望ましくない花粉の発芽能力に関係なく、雌が発芽可能になるや否や花粉<sup>M</sup>を散布することができる。本発明を使用して、すべての従来要素が存在するときでさえ現行種子生産実施を改善することもでき、かくて、たとえ雄性不稔および/または隔離および/または雄植物を用いたとしても困難な生産状況で雑種種子純度レベルを改善することもできる。本発明は、親繁殖圃場(parent increase fields)-特定の遺伝子型の自殖種子を播種し、自家受粉させる圃場-に応用することができよう。この自家受粉の結果として生じる結実により、雑種を作るための親源として後日使用されることになる自殖種子がはるかに大量に得られる。不稔性雌性親についての親繁殖圃場において本発明を使用することにより、存在することになる維持系統(細胞質雄性不稔系統に類似しているが、発芽可能な花粉を有し、正常な種子を生産する)を隔離する必要性が回避される。同様に、本発明を通常の親生産圃場に応用して、結果として得られる種子の純度を改善することができる。本発明を研究の場に応用して、交差汚染を回避するための、または(少量の実験的雑種種子を作成するための)隔離された交雑ブロックでの雄穂除去を回避するための、毎日の苗状袋がけの必要性をなくすこともできる。

20

30

#### 【0046】

非常に高い純度レベルが要求される場合、または純度が所望されるような高さにならないと予想される場合、さらなる工程を用いて、任意の作物の従来雑種系を含む、任意の雑種生産ブロックから収穫された種子混合物中にある自家および相互汚染種子から任意の所望のレベルに雑種種子ロットを精製することができる。同様に、本明細書に記載の本発明を様々な技能レベルで実行することができるので、さらなる工程を使用して、任意の所望のレベルに雑種種子ロットを精製することができる。例えば、花粉<sup>M</sup>に伝達され、結果として得られる種子において異なる区別可能な表現型として発現される、雄性親系統における遺伝子マーカの利用により、選別による種子のさらなる精製が可能になる。そのような方法の例は、国際公開第2014/147005号パンフレットにおいて開示されている。さらに、ホワイトコーンとイエローコーンを自動化種子選別機で簡単に選別することができるこの種の技術は、ホワイト種コーン産業で概して使用される。遺伝子マーカは、種子の色、種子の色の強さもしくはパターン、種子の形状、種子のサイズ、種子の密度、または他の種子の特徴に基づいて区別することができる表現型を付与しうる。種子会社は、他社とは異なるものとして独自の特異的マーカ、例えば、異なる生来の種子形質、または肉眼では潜在的に読み取れない遺伝子修飾カラーマーカを利用することができる。その場合、マーカ表現型に基づいて種子を視覚的にまたは機械的に選別しうる。例えば、ラボイ(Raboy)ら著、「プラントPhysiol.(Plant Physiol.)

40

50

」、2000年、124巻、p. 355 - 368；エバンス・エム・エム・エス (Evans, M. M. S.) およびカーミクル・ジェイ・エル (Kermicle, J. L.) 著、「ジェネティクス (Genetics)」、2001年、159巻、p. 303 - 315；ジェンキンス・エム・ティー (Jenkins, M. T.) 著、「J. ヘレディティ (Heredit y)」、1925年、16巻、p. 307 - 310；およびチェイス・エス (Chase, S.) 著、「ジェネティクス (Genetics)」、1949年、34巻、p. 328 - 332を参照されたい。労働力が非常に安価である発展途上国における一部の作物については、これを手作業で行うことができるが、他の状況では、例えば株式会社サタケの種子ソータ (Satake Seed Sorter) などの自動化もしくは半自動化種子選別機、または種子の走査および選別が可能な光走査システムを有するほうが経済的である。

10

#### 【0047】

トウモロコシの場合、例えば、生来の形質の紫色の幼芽 (PP: purple plumule) (チェイス (Chase) 著、「ジェネティクス (Genetics)」、1949年、34巻、p. 328 - 332) を、すべて雄自殖体になるように品種改良され、花粉<sup>M</sup> 経由で遺伝される、雄表現型マーカとして、自動化種子選別機を選別方法として用いて、使用しうる。本発明を、上で説明したように、しかし、結果として生じる雑種純度レベルを測定するために使用することができるマーカを含む雄を用いて、進めてもよい。収穫後、種子の副次標本の迅速アッセイにより、PP種子が、純度を上昇させるための種子選別を回避するのに十分な高さの純度であるかどうかを判定することができる。規定のレベルでなかった場合、種子を例えば自動化種子選別機に通して、雑種種子を表すPP種子を、自家および他家受粉汚染種子を表す無色胚種子から分離することになる。これは、種子生産植物における通常の調質プロセスに沿って行うことができる。さらに、雑種でない無色胚種子を子実として販売することまたは廃棄することができる。

20

#### 【0048】

トウモロコシにおいて使用することができるマーカの例としては、白色 / 黄色胚乳、黄色 / オレンジ色胚乳、不透明 / 正常胚乳、正常 / 紫色幼芽、無色 / 紫色アリユーロン、デンプン胚乳変異体、またはこれらのマーカと他のトウモロコシマーカの任意の組合せが挙げられるが、それらに限定されない。ダイズの場合、使用することができるマーカとしては、緑色および黄色子葉が挙げられるが、これらに限定されない。非作物特異的トランスジェニックマーカとしては、カラーマーカ遺伝子 (例えば、DsRed2)、あるいは任意の正常種子表現型を変化させる任意の導入遺伝子、例えば、種子部におけるアントシアニンもしくは他の色素を増加させる導入遺伝子、または子葉の色を変化させる導入遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。そのようなマーカのさらなる例は、国際公開第2014/147005号パンフレットにおいて見つけることができる。

30

#### 【0049】

マーカを使用する選別工程の追加使用は、雑種純度の結果が、雄性不稔を用いないおよび / または標準に満たない隔離を用いる従来の方法によって得られることになる結果よりかなり良好であるが、商業販売に十分な高さの純度に達しない場合、最も適切かつ経済的である。例えば、本発明者らのデータに基づいて、雄性不稔または隔離の通常使用のないトウモロコシ生産の雑種種子ロットにおける (主として雌自家受粉からの) 汚染は70%より高くなり、これに対して、本発明の技術を使用して同じく雄性不稔も隔離もせず栽培した種子ロットの汚染レベルは、半分以上の汚染が削減されて35%以下の汚染になると推定される。35%汚染は、コーンのような一部の作物に要求されることになるものほど低くはないが、ダイズのような現行非雑種作物については、雑種として作物を生産し始めるのにこれで十分でありうる。例えば、ダイズに関わる1つの先行方法では、交雑種の育種の開発のための手作業の交雑で約70%の純度が達成された。コーンの場合、より高い収量レベルで外来性花粉による汚染減少に関する圃場ベースの証拠もある (アスティニ・ジェイ・ピー (Astini, J. P.) 著、「アグロノミー」 (Agronomy J.)」、2009年、101巻、p. 373 - 380)。典型的に、任意の選別工

40

50

程中に取捨選択される非雑種種子は、子実として販売される。本明細書において開示する本発明を使用することにより、非雑種種子を2つのカテゴリーに分類することが可能であろう・・・子実（異系交雑物および他の非自家汚染物）についての1つのカテゴリーと、選別工程の付加価値副産物を提供する、自家受粉品種として販売されうる第二の部分（自化物）。

#### 【0050】

当業者には理解されるように、本発明の実施の結果として得られる付加恩恵は、種子収量増加である。稔性雌性親植物への花粉の計画的かつ意図的散布は、自然に起こる受粉と比較して受粉事象を増加させる結果となる。本発明を実施する際の使用に選択される花粉<sup>M</sup>に依存して、受粉率をかなり増加させることができる。そして結果として、収量も、別の方法で達成されることになるものより有意に高くなる。平均すると、本発明者らは、本発明の実施の結果として少なくとも15%の収量増加を予想する。雌性親植物の状態、使用される花粉の選択、環境条件および他の要因に依存して、本発明の方法の実施を伴わない予想収量と比較して、状況次第では100%を超える収量増加を含めて、10%を有意に超える収量増加が予想される。

10

#### 【0051】

以下の実施例は、本発明をより詳細に例証するものであり、本明細書に記載する方法をコーンでどのように実行することができるかの説明に役立つ。この基本的方法を、作物特異的遺伝子異修飾を有する任意の作物に適宜応用することができる。実施例1～4は、2015年の夏期に中央のアイオワにおける圃場で行った。

20

#### 【0052】

##### [実施例1]

#### 【0053】

成熟時のしぼんだ穀粒表現型の原因となる遺伝子（shrunkenまたはsugary遺伝子座）の劣性ホモ接合体（ジェニングス・ピー・エイチ（Jennings, P. H.）およびシー・エル・マコムズ（C. L. McCombs）著、「フィトケミストリー（Phytochemistry（Phytochemistry）」、1969年、8巻、8号、p. 1357 - 1363）および白色の胚乳をもたらすyellow遺伝子座の劣性ホモ接合体（バックナー・ビー（Buckner, B.）ら著、「ザ・プラント・セル（The Plant Cell）」、1990年、2巻、p. 867 - 876）である、スイートコーン雑種を使用して、本明細書に記載の本発明を実施した。このスイートコーン雑種を雌として使用し、通常商品子実コーン植物（黄色胚乳穀粒）から隔離せずに2列の36.5メートル（120フィート）列で栽培し、雄性不稔にできなかった（すなわち、雄穂除去しなかった）。白色のしぼんでいない胚乳という特徴を有する雄が、雌性スイートコーン列から平均して6メートル（20フィート）の、栽培した10列の4.5メートル（15フィート）列中に存在した。おおよそ8:30 amの自然花粉飛散の最も早い部に白色胚乳雄の雄穂からの花粉（花粉<sup>M</sup>）を強制することにより、本発明を実施した。雄穂に袋がけし、袋の中に花粉を収集することにより、花粉を収集した。その後直ちに、花粉の袋を穏やかに叩いて絹糸上に花粉粒を放出することを含む当技術分野において周知の技術を使用して手作業で花粉<sup>M</sup>をスイートコーン雌絹糸に向かわせた。この方法を使用するとき、しぼんだ穀粒は、自家受粉汚染穀粒を表し、黄色穀粒は、異系交雑汚染物を表し、白色穀粒は、所期のF1交雑種を表す。この方法を使用して合計30,821個の穀粒を産生した。いくつかのスイートコーン雌には花粉<sup>M</sup>を向かわせず、自然受粉させた。これらの自然受粉された雌穂から合計28,896個の穀粒を産生し、それらを対照として使用した。

30

40

#### 【0054】

表2は、自家汚染と交差汚染両方からの全汚染物の18%の減少があったことを示す。これは、予想したものより低い汚染減少であったが、それでもやはり純度レベルの実質的改善を表す。この実施例を熟考し、分析し、綿密に調査して、このシステムによるよりいっそう低い汚染の達成を制限するいくつかの要因があることが明らかになった。この実施

50

例で使用したスイートコーンは、汚染物の同定が容易なマーカを提供するため、便宜上、使用したが、雑種の平均的雌性親より5～10倍以上多い花粉を有する非常に大きい雄穂を有した。この大量の花粉の影響は、対照としての役割を果たした自然受粉雌穂における高い自家受粉パーセンテージ（この実施例では93%であり、下の実施例2では96%であった）から容易に分かる。正常子実コーン雌について、この数は、同様の栽培実施を用いて50～80%範囲であると予想された。下の実施例4では、白色子実雌を使用して、自家受粉率は、78%に過ぎなかった。この実施例の成果に影響を与えるもう1つの要因は、雌が花粉を飛散させ始める前に本発明者らが受粉による本発明の完全な実行を試みなかったことである。本発明者らは、自然花粉飛散のまさに開始時に指向性受粉（directed pollination）を行うことにより本発明を適用することを単に試みて、汚染物を打ち負かそうとした。このアプローチは、部分的な実行のみを使用して本発明の可能性を単に示すことを意図したものであった。最後に、汚染物の減少を制限するもう1つの要因は、ホワイトコーンからの花粉が自殖体からのものであり、雑種花粉（すなわち、スイートコーン花粉）と比較して競争力が低いことが証明されていることであった。これらの要因に照らして、18%汚染物減少は、純度レベルの妥当な改善である。

【表2】

表2. 本明細書に記載の本発明でホワイト雄を使用したときのホワイトスイートコーン雌性親の自家受粉による汚染および異系交雑汚染の減少

	自然受粉されたもの		需要に応じた発明	
	対照*	全体に対する%	ホワイトスイートコーンに対してホワイト	全体に対する%
受粉のタイプ	穀粒の#			
所期F1交雑種（白色）	539	2%	7242	23%
自家受粉汚染物（しぼんだ）	26798	93%	22730	74%
異系交雑汚染物（黄色）	1532	5%	849	3%
合計	28869		30821	
需要に応じた汚染減少	18%			

【0055】

[実施例2]

別の実施例では、成熟時のしぼんだ穀粒表現型の原因となる遺伝子（shrunkenまたはsugary遺伝子座）の劣性ホモ接合体および白色の胚乳をもたらすyellow遺伝子座の劣性ホモ接合体であるスイートコーン雑種を使用して、本明細書に記載の本発明を実施した。このスイートコーン雑種を雌として使用し、通常商品子実コーン植物（黄色胚乳）から隔離せずに2列の69メートル（225フィート）列で栽培し、雄性不稔にしなかった（すなわち、雄穂除去しなかった）。周囲の通常商品子実コーン植物を雄として使用し、これらは、正常な（しぼんでいない）胚乳という特徴を有し、雌に隣接するすべての列に存在した。さらに、午前中の約8：15amに雌列の雄穂に水を噴霧し、これらの雌列からの花粉飛散を約8：45amまで遅延させた。雌の雄穂に水を噴霧した後直ちに、雄穂に袋がけすることにより黄色胚乳雄の雄穂からの花粉<sup>M</sup>を強制することによって本発明を実施して、袋の中に花粉を収集した。その後直ちに、花粉の袋を穏やかに叩いて絹糸上に花粉粒を放出することを含む当技術分野において周知の技術を使用して手作業で花粉<sup>M</sup>をスイートコーン雌絹糸に向かわせた。この工程を、これらの雌がいずれの花

粉も飛散する前に行った。この方法を使用するとき、しぼんだ穀粒は、自家受粉汚染穀粒を表し、黄色穀粒は、所期の F 1 交雑種を表す。異系交雑汚染の測定はない。この方法を使用して合計 3 4 4 7 3 個の穀粒を産生した。いくつかのスイートコーン雌には花粉<sup>M</sup>を向かわせず、自然受粉させた。これらの自然受粉された雌穂から合計 4 9 1 4 個の穀粒を産生し、それらを対照として使用した。

#### 【0056】

表 3 は、自家汚染と交差汚染両方からの全汚染物の 3 1 % の減少があったことを示す。この汚染減少は、特にこの実施例が表す困難なプロトタイプを考えると、雄穂、および指定雌植物から飛散される花粉が膨大である（通常の雌性雑種親より 5 ~ 1 0 倍以上多い）点でかなりのものである。これらの結果は、本明細書に記載の本発明の実行を表すが、よりいっそう高い活力を適用して結果をさらに向上させることができる。保存花粉源を使用した場合、絹糸を下垂させ、雌の卵細胞を受精させるためのより多くの時間を所定の花粉に与えるために、受粉を午前中のより早い時間に行うことができただろう。

#### 【表 3】

表 3. 本明細書に記載の本発明でイエロー雄を使用したときのホワイトスイートコーン雌性親の自家受粉による汚染の減少

受粉のタイプ	自然受粉されたもの		需要に応じた発明	
	対照*	全体に対する %	ホワイトスイートコーンに対してイエロー	全体に対する %
	穀粒の #			
所期 F 1 交雑種 (黄色)	1 9 2	4 %	1 2 8 3 7	3 7 %
自家受粉汚染物 (しぼんだ)	4 7 2 2	9 6 %	2 1 6 3 6	6 3 %
異系交雑汚染物 (診断せず)	0	0 %	0	0 %
合計	4 9 1 4		3 4 4 7 3	
需要に応じた汚染減少	3 1 %			

#### 【0057】

#### [ 実施例 3 ]

この実施例では、ホモ接合性ワキシー雌性親と、wax y 遺伝子座に機能的または野生型対立遺伝子を含む雄性親の混合物（ネルソン・オー・イー（Nelson, O. E.）著、「ジェネティクス（Genetics）」、1968年、60巻、p. 507 - 524）とを使用して、本発明をシミュレートした。wax y 対立遺伝子は劣性であり、自家受粉汚染物を表すホモ接合状態である場合、肉眼で容易に識別できる特有の不透明表現型を穀粒にもたらす。雌を隔離せずに 3 列の 4 . 6 メートル（15 フィート）列で栽培し、雄性不稔にできなかった（すなわち、雄穂除去しなかった）。雄は、雌列のすべての側面に近接および隣接して存在した。自然花粉飛散期間の最早部のおおよそ 8 : 30 am に雄性植物の雄穂に袋がけして雄からの花粉<sup>M</sup>を強制することにより本発明を実施し、それによって袋の中にその花粉を収集した。その後直ちに、花粉の袋を穏やかに叩いて絹糸上に花粉粒を放出することを含む当技術分野において周知の技術を使用して手作業で花粉<sup>M</sup>をワキシー雌絹糸に向かわせた。この実施例では合計 3 2 1 7 個の穀粒を 1 4 本の雌穂から得た。表 4 は、この実施例の結果を示すものである。対照をこの実験に直接含めなかったが、文献からの先験的予想は、本発明を使用しない雌の自己受粉による最低 5 0 % の汚染があるというものである（例えば、パテルニアニ・イー（Paterniani E.）およびストート・エイ・シー（Stort, A. C.）著、「ユーフィティカ（Euph

y t i c a )」、1974年、23巻、p. 129 - 134 ; マー・ビー・エル (Ma , B . L . ) ら著、Crop Sci .、2004年、44巻、p. 1273 - 1282 を参照されたい)。下の実施例4からの対照を使用して、本発明を使用しないと約78%の汚染レベルが予想されることになる。この実施例では、自家受粉汚染を2%に低下させた。これは、自家受粉による汚染レベルの97%低下を表す。この実施例では、基準95%純度レベルを満たす雑種子を作ったことになる。

【表4】

表4. 本明細書に記載の本発明で野生型雄を使用したときのワキシー雌性親の自家受粉による汚染の減少

受粉のタイプ	自然受粉されたもの		需要に応じた発明	
	対照*	全体に対する%	ワキシーに対して野生型	全体に対する%
	穀粒の#			
所期F1交雑種 (硝子状)	1337	22%	3217	98%
自家受粉汚染物 (ワキシー)	4724	78%	66	2%
異系交雑汚染物 (診断せず)	ND	ND	ND	ND
合計	6061		3283	
需要に応じた汚 染減少	97%			

\*ワキシー対照にはイエロー／ホワイト対照を使用した。同じ列の自家受粉制御ワキシー植物は100%ワキシーであった。

【0058】

[ 実施例4 ]

ホモ接合性白色胚乳雌性 (すなわち、y e l l o w 遺伝子座での劣性ホモ接合体 (y / y ) ) 親と、黄色の胚乳である雄性親の混合物とを使用して、本明細書に記載の本発明をさらにシミュレートした。雌を2015年の夏期にアイオワの圃場において隔離せずに1列の4.6メートル (15フィート) 列で栽培し、これらの植物を雄性不稔にしなかった (すなわち、雄穂除去しなかった)。雄は、雌列のすべての側面に近接および隣接して存在した。自然花粉飛散期間の最早部のおおよそ8:30 a m に雄の雄穂に袋がけして雄からの花粉<sup>M</sup>を強制することにより本発明を実施した。その後直ちに、花粉の袋を穏やかに叩いて絹糸上に花粉粒を放出することを含む当技術分野において周知の技術を使用して手作業で花粉<sup>M</sup>をワキシー雌絹糸に向かわせた。この実施例では合計888個の穀粒を5本の雌穂から得た。この列内にいくつかの植物があり、他の隣接列には、自然受粉させて対照として使用した、合計6061個の穀粒からなる白色胚乳雌があった。表5は、この実施例において汚染が79%低下したことを示すものである。この実施例は、内乳カラーマーカーを利用して、純度を基準95%レベルに上げるように白色胚乳穀粒 (すなわち、自家受粉物) を取捨選択することにより純度を改善することができる事例となる。

【表 5】

表 5. 本明細書に記載の本発明でイエロー雄を使用したときの白色胚乳雌性親の自家受粉による汚染の減少

受粉のタイプ	自然受粉されたもの		需要に応じた発明	
	対照*	全体に対する %	ホワイト対してイエロー	全体に対する %
	穀粒の #			
所期 F 1 交雑種 (黄色)	1 3 3 7	2 2 %	7 4 4	8 4 %
自家受粉汚染物 (白色)	4 7 2 4	7 8 %	1 4 4	1 6 %
異系交雑汚染物 (診断せず)	N D	N D	N D	N D
全穀粒	6 0 6 1		8 8 8	
需要に応じた汚染減少	7 9 %			

10

【0059】

[ 実施例 5 ]

20

隔離距離を 50 % 以上低減させること、雌性親の雄穂除去を、雌の 10 % が飛散性雄穂を ( 標準的な 1 % の飛散性雄穂ではなく ) 有することを可能ならしめるような、低減されたレベルで実施すること、および雄性植物のパーセントを 50 % 以上低下させることを除いて、まさに現在実施されているような様式でコーン種子雑種生産ブロックに定植する。雄性親花粉を収集し、保存し、貯蔵施設から得、6 a m に雌性親絹糸に散布する。

【0060】

予測される結果は、本発明を実行しない同じ生産実施と比較して汚染が 50 % 以上低下されることである。この実施例のパラメータは、平均量から若干多い量の花粉を飛散する雄と、平均量の花粉を飛散する雌とを利用する雑種種子生産ブロックに適切に適用しうる。

30

【0061】

[ 実施例 6 ]

標準隔離距離および ( 飛散性雄穂を有する雌 1 % 以下を可能にするための ) 標準的な雄穂除去実施を含み、かつ雄が飛散させる花粉量に基づく標準パーセンテージで雄を含む、現在実施されているのとまさに同じ様式で、コーン種子雑種生産ブロックに定植する。例えば、雄が「不良な」雄であると判定され、雄穂 1 本当たり 2 百万個未満の花粒を飛散すると仮定する。この場合、一部の種子会社の基準により、この雄は基準以下と見なされることになり、その雄が作る可能性がある雑種の収量がどれほど高いかに関係なくその雄は廃棄されることになる。他の種子会社は、この雄に伴うリスクを冒し、雑種種子生産ブロックに雌に対して高い比率でそれを定植する可能性がある。

40

【0062】

この実施例では、雄を 2 : 4 の比率で ( 2 雄列を 4 雌列ごとに ) 定植し、全生産ブロックの周囲に雄 10 列の境界がある。前記雄性親花粉は、収集され、保存された、貯蔵施設から得られる雄性親花粉を使用し、それを 6 a m に雌性親絹糸に正確に散布することにより、本発明を実施する。

【0063】

予測される結果は、雑種種子の品質保証および販売の基準を満たすレベルに汚染が低下されることである。通常の生産条件下で、この実施例に記載の生産圃場は、用いている不要な雄のため、平均すると 5 % 汚染になりうる。この平均を中心とする範囲は、任意の所定の圃場についての環境条件 ( 例えば、風および隣接圃場の近接 ) に依存して、1 ~ 8 %

50



汚染でありうる。これは、このシナリオでの生産圃場の半数が、廃棄を必要とする可能性がある基準以下（＜95%純度）の雑種種子を生産することになることを含意する。本発明を実行した圃場について、汚染の50%減少の使用は、平均汚染が、今や、可能性のある範囲0%～5%で2.5%となることを含意する。この場合、正規分布を用いて、この実施例における生産圃場の90～100%が、95%の基準を満たす種子を生産すると予想されることになる。

【0064】

[実施例7]

コーン親種子生産圃場は、所定の雑種の一方の親のみを含有する（201メートル（660フィート）以上）隔離された圃場である。親を自然受粉させて、または本質的に自家受粉させて、雑種種子生産の際にその親を使用するのに十分な親種子が存在するようにその種子を増加させる。雑種種子生産ブロックにおいて親を最終的に使用するのに十分な親種子を生産するために、数世代の親種子増加が必要である。

10

【0065】

この親種子生産実施例では、汚染させる可能性のある他のコーンからの隔離がないことになる。収集され、保存された、貯蔵施設から得られる親の花粉を使用し、それを6amに親の絹糸に散布することにより、本発明を実施する。予測される結果は、本発明を実行しない同じ生産実施と比較して汚染が50%以上低下されることである。この実施例でのパラメータは、隔離距離が達成不可能であり、それにもかかわらず重要な産物の雑種種子を作るために親を増加させる必要があるときに適用しうる。このシナリオは、季節はズレに栽培する場所（例えば、ハワイ）において種子会社が次の生育期のために親を増加させようと試みているときに遭遇することがある。

20

【0066】

実施例のまとめ。実施例1～4は、指定された雄および雌の雄性に依存する成功レベルの変動に対して本発明がどのように機能することができかを例証するものである。これら4つの実施例すべてにおいて、本発明のシミュレーションを使用してまたは本発明自体を使用して汚染の減少が観察されたが、本発明の有用性および可能性を例証するために需要に応じて入手可能であった保存花粉を利用することが理想的であったことになる。これは、花粉が自然花粉雲とのあらゆる競争を回避できる、より理想的な時点での絹糸への花粉の散布を可能にしめたことになり、標的絹糸を下垂させるそのような非常に有利なスタートを有することになり、その結果、汚染させる他の花粉が雌を受精させる確率を大きく低下させ、かくて、汚染パーセントをこれらの実施例よりいっそう低いレベルに減少させることになる。

30

【0067】

本発明の様々な代表的実施形態を上である程度の詳細さで説明したが、当業者は、本明細書および特許請求の範囲に記載の本発明の主題の趣旨または範囲を逸脱することなく、これらの開示した実施形態に非常に多くの変形を加えることができる。場合によっては、本明細書に直接または間接的に述べる方法論に関して、様々な工程および作業を1つの可能な作業順序で説明するが、本発明の趣旨および範囲から必ずしも逸脱せずに、工程および作業を並べ替えること、交換すること、または削除することができることは、当業者には理解される。上の説明に含まれ、添付の図面に示されているすべてのことは、単に説明に役立つものと解釈され、限定するものと解釈されないことを意図したものである。添付の特許請求の範囲で定義する本発明の趣旨から逸脱することなく、詳細または構造に変更を加えることができる。

40

【0068】

上で概要を示した実施形態に関連して本発明を説明したが、公知であろうと、または現在予見されるもしくは予見されうるものであろうと、様々な代替形態、修飾形態、変形形態、改良形態および/または実質的均等物が、少なくとも通常の技能を有する当業者には明らかになりうる。ある特定の順序での方法の工程の列挙は、その方法の工程の順序に関するいかなる限定にもならない。したがって、上で述べた本発明の実施形態は、説明に役

50

立つことを意図したものであり、限定を意図したものではない。本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく形態および詳細に変更を加えてもよいことは、当業者には理解されるであろう。したがって、本発明は、すべての公知のまたは先に開発された代替形態、修飾形態、変形形態、改良形態および／または実質的均等物を包含することを意図したものである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0069】

【非特許文献1】ラッセル・ダブリュー・エイ(Russell, W. A.)著、「プロシーディングス・オブ・ジ・アニュアル・コーン・アンド・ソルガム・インダストリアル・リサーチ・カンファレンス(Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Industrial Research Conference)」、1974年、29巻、p. 81 - 101

10

【非特許文献2】ベケット・ジェイ・ビー(Beckett, J. B.)著、「クロップ Sci (Crop Sci.)」、1971年、11巻、p. 724 - 727

【非特許文献3】デュヴィック・ディー・エヌ(Duvick, D. N.)著、「アドバンス・イン・ジェネティクス(Advances in Genetics)」、1965年、13巻、p. 1 - 56

【非特許文献4】クロウ・ジェイ・エフ(Crow, J. F.)著、「ジェネティクス(Genetics)」、1998年、148巻、p. 923 - 928

20

【非特許文献5】「ドラフト・エンバイラメント・アセスメント(Draft Environmental Assessment)」、[online]、2010年、パイオニア・ハイ・ブリード・インターナショナル社(Pioneer Hi-Bred international, Inc.)、シード・プロダクション・テクノロジー(Seed Production Technology)(SPT)プロセス(Process) DP-32138-1 Corn、[2016年6月19日検索]、検索先：インターネット<URL: [https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08\\_33801p\\_fea.pdf](https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08_33801p_fea.pdf)>

【非特許文献6】ウェバー(Weber)ら著、「ジャーナル・オブ・アグロノミー・アンド・クロップ・サイエンス(Journal of Agronomy and Crop Science)」、2009年、193巻、p. 79 - 92

30

【非特許文献7】ピケット・エイ・エイ(Pickett, A. A.)著、「Adv. プラント・ブリード(Adv. Plant Breed)、Suppl. J. プラント・ブリード(Suppl. J. Plant Breed)」、1993年、15巻、p. 1 - 259

【非特許文献8】「2016年6月13日コムギ価格(June 13, 2016 wheat price)」、[2016年6月13日オンライン検索]、検索先：インターネット<URL: <https://www.ams.usda.gov/market-news1/livestock-grain-market-news-piibli cations>>

40

【非特許文献9】「シンジェンタ・インベスター・デイ・2015プレゼンテーション(Syngenta Investor Day 2015 Presentation)」[online]、20頁、[2016年6月19日検索]、検索先：インターネット<URL: <http://www4.syngenta.com/~media/Files/S/Syngenta/events-and-presentations/plenary-presentation-rndday2015-trish-malarkey.pdf>>

【図 1】

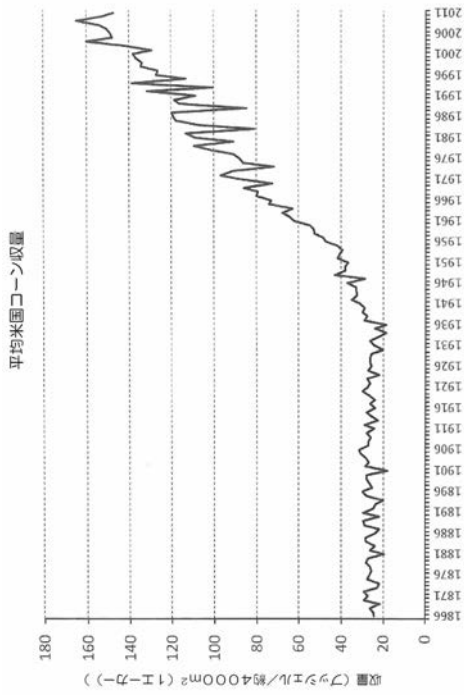
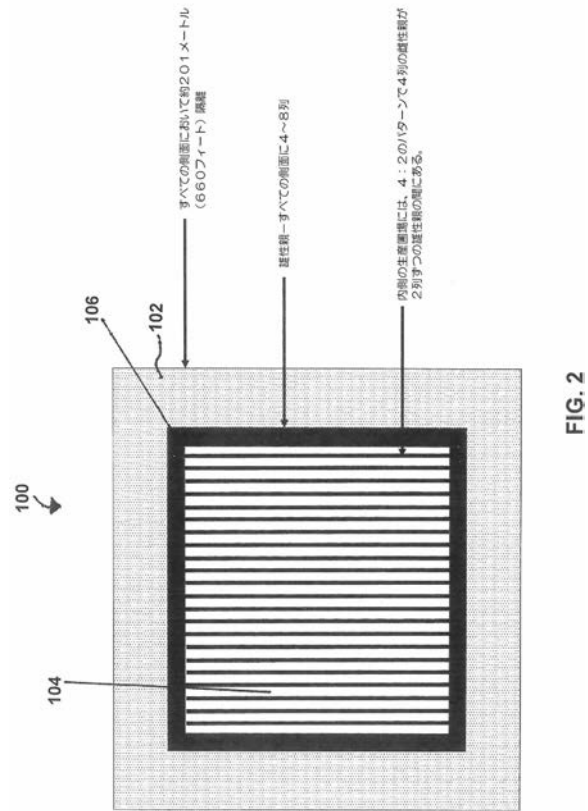


FIG. 1

【図 2】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/039339

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01H1/02  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SU 1 061 770 A1 (DENISOV VALENTIN F) 23 December 1983 (1983-12-23) abstract	1-12
X	----- WO 2013/070846 A1 (PIONEER HI BRED INT [US]) 16 May 2013 (2013-05-16) paragraph [0009]	1-11,14, 15
X	----- US 4 087 937 A (MEADOR LAWRENCE DEAN) 9 May 1978 (1978-05-09) column 1, lines 12-15 column 2, lines 17-20	1-11,14, 15
X	----- CA 966 734 A (MOEWS SEED COMPANY; NAT STARCH CHEM CORP) 29 April 1975 (1975-04-29) page 3, lines 6-18	1-11,14, 15
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2016

Date of mailing of the international search report

21/09/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, Jürg

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No

PCT/US2016/039339

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARCOVA JORGELINA ET AL: "Synchronous pollination within and between ears improves kernel set in maize", CROP SCIENCE, vol. 40, no. 4, July 2000 (2000-07), pages 1056-1061, XP009191220, ISSN: 0011-183X the whole document -----	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/039339

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
SU 1061770	A1	23-12-1983	NONE	
-----				
WO 2013070846	A1	16-05-2013	AR 088840 A1	10-07-2014
			CL 2014001234 A1	22-09-2014
			CN 103929949 A	16-07-2014
			EP 2775822 A1	17-09-2014
			US 2013118066 A1	16-05-2013
			WO 2013070846 A1	16-05-2013
			ZA 201403460 B	29-07-2015
-----				
US 4087937	A	09-05-1978	NONE	
-----				
CA 966734	A	29-04-1975	CA 966734 A	29-04-1975
			FR 2139970 A1	12-01-1973
			US 3728817 A	24-04-1973
-----				

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/184,596

(32)優先日 平成27年6月25日(2015.6.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US