

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580326

研究課題名（和文）ライグラス類野生化集団の高精度分布調査とエンドファイトによる生態影響の解析

研究課題名（英文）Surveys of fine-scale distributions of naturalized populations of ryegrasses, and analysis of ecological impacts of endophyte infection

研究代表者

澤田 均（SAWADA HITOSHI）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10183831

研究成果の概要（和文）：外来牧草はしばしば野生化するため、河原や農地への悪影響が懸念されている。そこでライグラス類をモデル植物に選び高精度分布調査法を開発し、河原等における野生化集団の分布状況およびエンドファイト感染状況を調査した。エンドファイト感染によって種子捕食を免れやすく、侵入性の高まることが示唆された。農地周辺において除草剤グリホサートに対する抵抗性個体の出現を確認した。これは国内初の事例である。

研究成果の概要（英文）：Non-native pasture plants are concerned about their impacts in both the riversides and farmlands, because they have often naturalized to invade there. We selected ryegrasses as model plants, and developed the method of examining fine-scale distributions of naturalized populations. By using this method, we recorded the distributions of Italian ryegrass in relation to endophyte infection in the riversides. Endophyte-infected individuals were unlikely to be consumed by seed-eating insects, suggesting that endophyte may confer the resistance to those, thereby enhancing the invasiveness of the grass. We also found glyphosate-resistant Italian ryegrass around the rice paddy fields. This is the first report of a glyphosate-resistant weed in Japan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：生態学、牧草、外来生物、雑草

1. 研究開始当初の背景

(1)我が国では外来牧草が草地・飼料畑や緑化

サイトに広く栽培・利用されているが、しば

しば野生化し、有害雑草と化している。しかし、これらの侵入及び被害の実態や野生化集団の生物的・生態的特性はまだ十分に解明されていない。有害雑草化を抑えて適切に栽培・利用するためには、これらの基礎的情報の入手が急務である。

(2)侵入及び被害の実態の解明には、野生化集団の分布状況を高精度で把握し、微小スケールで他生物との相互作用を解析することが必要である。しかし、基幹牧草について、このような研究はまだ行われていない。侵入及び被害の実態の精査を支援するために、高精度分布調査法の開発が必要である。

(3)一方、ライグラス類及びトールフェスクでは、エンドファイト（これら草種と共生する内生菌）に着目することが必要である。エンドファイトが感染することにより、その侵入性が高まる恐れがあるためである。この根拠は、米国においてエンドファイトが感染したトールフェスクが極めて高い侵入性を示したことである。また、最新の研究では、感染ホストの遺伝子型や環境要因がエンドファイト感染による侵入性の変化に大きく影響することが示唆されている。それゆえ、日本国内の野生化集団を対象とし、かつ侵入地の環境条件を十分に考慮した研究が必要である。

(4)さらにエンドファイト感染による種子食昆虫への影響を評価することも重要である。エンドファイトが感染した種子はアルカロイドを含むため、種子食昆虫の選好性や成長に影響する可能性が高い。種子食昆虫は雑草防除に有用な益虫である。しかし、これまでエンドファイトによる種子食昆虫への影響を調べた研究はほとんどない。

(5)本課題の実施により、ライグラス類の侵入状況及び生態的インパクトの解析が可能となり、侵入及び被害の実態の精査が実施可能となるだろう。さらに生態的リスク評価法及びリスク管理法の改良により、外来牧草の有効利用と適正なリスク管理が実現できるものと期待される。

2. 研究の目的

(1)本研究ではライグラス類（特にイタリアンライグラス）をモデル植物として、その野生化集団の高精度分布調査法を開発することを目的とした。特に局所スケールで分布状況を精密に把握する調査法を開発する。局所スケールの分布状況の知見は、微小スケールで起こる他生物との相互作用の実態を解明する上で不可欠である。しかし、外来牧草ではこのような研究が皆無である。

(2)河川敷に侵入して拡散しつつある野生化集団の分布状況と、農地周辺に生育する野生化集団の分布状況を調査する。農地周辺を調査する理由は、一部のイタリアンライグラス野生化集団がすでに農業雑草化しているためである。

(3)エンドファイト感染ライグラス類の分布状況を把握する。さらにエンドファイトの垂直伝播効率を調査する。

(4)エンドファイト感染ライグラス類による種子食昆虫への影響を調査する。エンドファイト感染種子と非感染種子を用いて、室内実験と野外実験を行うとともに、種子カード法により、現地にて種子捕食の調査を行う。

3. 研究の方法

(1)静岡県安倍川を調査地に定め、高性能 GPS

を用いて、ライグラス類野生化集団の高精度分布調査法の開発・改良を進めた。同調査法を用いて、河川敷3ヵ所にて、野生化集団の分布位置と集団サイズを記録した。

(2)静岡県袋井市および菊川市の農地周辺にてイタリアンライグラス野生化集団の分布状況を調べた。除草剤グリホサートを長期的に連用している場所の情報を重ね合わせ、除草剤の効果が低減している場所を特定した。これらの場所から種子を採取し、シードバイオアッセイとグリホサート散布試験を行い、グリホサート抵抗性の程度を評価した。

(3)安倍川河川敷のイタリアンライグラス集団について、エンドファイト感染個体率と垂直伝播効率を調べた。2011年は丸石河原、高水敷、堤防の合計22集団から、2012年は合計10集団から、個体ごとに種子を採取してエンドファイト感染の有無を調べた。

(4)イタリアンライグラスは1年草で、初夏に結実し、秋まで発芽しない。夏期は種子の状態で過ごす。そのため、河川敷（特に丸石河原）の地表面に位置する種子は、夏期の高温に曝されやすい。他のイネ科草種では、しばしば高温によってエンドファイト除去の起こることが報告されている。そこで、安倍川から採取された感染個体を用い、感染種子に様々な高温処理を加えて、次世代種子の感染の有無を調べた。さらに高温・冠水を模した処理を加えて、次世代種子の感染の有無を調べた。

(5)エンドファイト感染種子と非感染種子を用いて、種子食昆虫による摂食実験を行った。一方、安倍川河川敷にイタリアンライグラス種子を塗布した種子カードを設置し、無脊椎

動物のみが捕食できる条件と、脊椎動物と無脊椎動物の両方が捕食できる条件にて、種子消失率を調べた。

(6)種子食昆虫の種子摂食実験を行った。エンマコオロギの幼虫と成虫を用いて、室内実験を行った。幼虫は小型（体長16 mm未満）、中型（体長16-19 mm）、大型（体長19 mm以上）の3種類、雌成虫と雄成虫を用いた。シャーレ内にイタリアンライグラスの感染種子と非感染種子を置いた。コオロギは24時間絶食後、シャーレに1頭ずつ入れ、48時間、自由に摂食させ、残置種子数から摂食数を推定した。反復はそれぞれ20である。

雌成虫を用いて野外実験を行った。2011年9月。大型容器（92×62×21 cm）の中央に種子トレイ（34×27×7 cm）を置き、土壌を敷きつめた。種子トレイを二分し、感染種子と非感染種子をそれぞれ250粒、地表に置いた。エンマコオロギ雌成虫1頭を容器に放飼し、14日間、自由に摂食させた。実験終了後、種子トレイを回収し、ビニールハウスに移し、播き出し法による生存種子数の調査を行った。週1回の出芽観察を3か月間行った。この期間の累積出芽数を生存種子数の推定値とした。反復は5である。

感染種子の摂食によるコオロギの体重への影響を調べるために、非選好性実験を行った。孵化後35日目のエンマコオロギ幼虫（平均体長13.2 mm）を用いた。シャーレに1頭ずつ入れ、感染種子のみ与える区と、非感染種子のみ与える区を設けた。反復は20である。8日間、自由に摂食させ、種子捕食量と体重を測定した。

4. 研究成果

(1)安倍川の河川敷にてGPSを用いて高精度分布調査を重ね、問題点の抽出と改良に努め、迅速な調査法を開発した。同調査法により、

丸石河原に侵入したイタリアンライグラス野生化集団の分布位置と集団サイズを記録した。各集団の平均草高および個体間距離のような属性も合わせて記録した。今回の精密な分布マッピングによって、イタリアンライグラスの侵入・拡散プロセスを理解するためのベースライン・データを得ることができた。

(2)袋井市の水田畦畔に野生化したイタリアンライグラス 12 集団で、グリホサート抵抗性を獲得していることが明らかとなった。これは、国内初のグリホサート抵抗性雑草の報告である。野生化集団の適正な管理法を立案する上で重要な知見である。

(3)エンドファイト感染個体率は全体に高いものの、集団間変異のあること、感染個体率と冠水の起こりやすさの間に関係のあることが示唆された。丸石河原のように冠水を受けやすい場所の集団で、感染個体率が低い傾向にあった。一方、エンドファイトの垂直伝播効率を調べたところ、不完全な垂直伝播効率を示す個体の多いことが確認された。2012年の調査から、これまでに報告されている数値を下回る垂直伝播効率を示す個体が確認された。冠水を受けやすい場所では、垂直伝播効率の個体間変異が大きい傾向にあった。

(4)感染種子を様々な高温に曝しても、感染個体率は低下しなかった。一方、60°C20 分間の高温・冠水区で、感染個体率が 30%に低下し、垂直伝播効率も 80%に低下した。2011年夏期、安倍川の丸石河原にて地表面温度を測定したところ、日中しばしば 60°Cを超えることが確認された。夏期の高温と冠水が、丸石河原のエンドファイト感染個体率の低下の一因となることが示唆された。

(5)2011 年に安倍川河川敷に種子カードを設置し、種子消失率を調べたところ、極めて高いことが観察された。2012 年の調査では、無脊椎動物のみがアクセスできる場合の種子消失率は、丸石河原では 4%、高水敷では 11%であった。脊椎動物と無脊椎動物の両方がアクセスできる場合は、それぞれ 29%、57%であった。一方、エンドファイト感染種子と非感染種子の種子消失率は、2011 年の調査では設置場所によって、非感染種子が感染種子を上回った。しかし、2012 年の調査では同程度であった。

(6)室内で選好性実験を行ったところ、エンマコオロギの幼虫、雌成虫ともに、感染種子より、非感染種子を多く摂食する傾向にあった。小型幼虫の 48 時間あたり種子捕食数は、感染種子が平均 5.2 粒、非感染種子が 9.0 粒 ($p<0.01$)、中型幼虫ではそれぞれ 12.3 粒、25.4 粒 ($p<0.01$)、大型幼虫ではそれぞれ 19.4 粒、33.1 粒であった ($p<0.01$)。雌成虫ではそれぞれ 16.7 粒、24.9 粒であった ($p<0.01$)。一方、雄成虫ではそれぞれ 14.1 粒、16.7 粒と、明瞭な差がなかった。

一方、野外で雌成虫を用いて選好性実験を行ったところ、同様の傾向が確認された。感染種子の生存個体数は平均 52.6 個、非感染種子の生存個体数は 107.2 個であった。捕食個体数はそれぞれ 197.6 個、142.8 個 ($p<0.05$)と推定された。エンドファイトが感染すると、ロリン・アルカロイドが産生される。これを種子食昆虫が忌避することで、種子消失率が高まらず、イタリアンライグラスの侵入性が強化されることが示唆された。

(7)非選好性実験を行ったところ、感染種子のみの区では、非感染種子のみの区より、増体量が有意に低下した。実験終了時の幼虫の体

重はそれぞれ 0.1419 g, 0.1609 g で、実験開始時からの増加率はそれぞれ 15.2%, 33.0% であった。8 日あたりの種子捕食量は、それぞれ 29 粒, 41 粒であった。イタリアンライグラス野生化集団は、コオロギによる種子捕食を受けると、エンドファイト感染個体率が増加しやすいことが示唆された。一方、感染イタリアンライグラスが蔓延すると、エンマコオロギの餌の量と質が低下することで、その成長が低下する可能性がある。

(8)以上の成果は、外来牧草の有害雑草化を抑えて適切に栽培するための科学的基盤を強化するものである。我が国では外来牧草を自給粗飼料生産の基幹草種と位置づけ、広く栽培・利用しており、外来牧草の適正なリスク管理の観点から重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yuki Niinomi、Mutsuhiro Ikeda、Masayuki Yamashita、Yoshiki Ishida、Motoaki Asai、Yoshiko Shimono、Tohru Tominaga、Hitoshi Sawada、Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) on rice paddy levees in Japan、Weed Biology and Management、査読有、13、31-38、2013、DOI:10.1111/wbm.12007
- ② Masayuki Yamashita、Hitoshi Sawada、他 8 名、Endophyte-infected Italian ryegrass in Japan: proliferation by repelling seed-eating insects, and potential practical use for insect pest control、Proceedings of the 4th Japan-China-Korea Grassland Conference、査読有、262-263、2011

[学会発表] (計 7 件)

- ① 内田 智、山下雅幸、澤田 均、エンドファイトが感染したイタリアンライグラス休眠種子は、エンマコオロギの選好性が低いのか?、日本草地学会、2012 年 8 月 29 日、酪農学園大学 (江別市)
- ② 内田 智、山下雅幸、澤田 均、エンマコオロギによる種子捕食は外来雑草ネズミムギの発芽エスケープを促すか?、日本雑草学会、2012 年 4 月 5 日、農林水産技術会議事務局・筑波事務所 (つくば市)
- ③ 内田 智、山下雅幸、澤田 均、エンマコオロギは雑草集団の種子特性を変化させうる、日本生態学会中部地区会、2011 年 12 月 3 日、静岡大学 (静岡市)
- ④ 水元駿輔、山下雅幸、澤田 均、エンドファイト感染ネズミムギはアカスジカスミカメ孵化幼虫の生存率を低下させる、日本生態学会中部地区会、2011 年 12 月 3 日、静岡大学 (静岡市)
- ⑤ 戸村和貴、山下雅幸、澤田 均、静岡県安倍川に侵入したネズミムギのエンドファイト感染: 種子捕食への影響、日本生態学会中部地区会、2010 年 12 月 11 日、静岡大学 (静岡市)
- ⑥ Kazuki Tomura、Masayuki Yamashita、Hitoshi Sawada、Endophyte infection frequency and vertical transmission efficiency in Italian ryegrass along a river in Japan、Joint Meeting of the Mycological Society and the International Symposium on Fungal Endophyte of Grasses、2010 年 6 月 28 日、Hilton Lexington/ Downtown Convention Center (Lexington, USA)
- ⑦ 戸村和貴、山下雅幸、澤田 均、静岡県安倍川におけるイタリアンライグラスのエンドファイト感染個体率および垂直伝播効率、日本草地学会、2010 年 3 月 26 日、三重大学 (津市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 均 (SAWADA HITOSHI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 1 0 1 8 3 8 3 1

(2) 研究分担者

山下 雅幸 (YAMASHITA MASAYUKI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 3 0 2 5 2 1 6 7

(3) 連携研究者

なし