

## 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24年6月6日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870002

研究課題名（和文） ドクムギ属の除草剤抵抗性遺伝子の拡散リスク評価

研究課題名（英文） Diffusion risk of herbicide resistance gene of ryegrass

## 研究代表者

下野 綾子（SHIMONO AYAKO）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30401194

## 研究成果の概要（和文）：

農耕地雑草にとって除草剤は極めて強い選択圧であり、多くの雑草で除草剤抵抗性が進化した。なかでもライグラス (*Lolium* spp.) の発生報告数は多く、深刻な除草剤抵抗性雑草のひとつとされている。国内でも2010年に初めてドクムギ属の除草剤抵抗性個体の発生が報告された。本研究はライグラスの除草剤抵抗性遺伝子の拡散リスク評価に寄与できる実証的データを得ることを目的とし、1) 抵抗性遺伝子の後代への遺伝、2) 集団間の遺伝子流動の程度、3) 除草剤抵抗性個体の由来を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Persistent herbicide application to weed species across vast areas promotes the rapid evolution of herbicide resistance among them. Ryegrass (*Lolium* spp) is one of the most reported herbicide-resistant weeds. Because ryegrass species is major weed of wheat field of wheat-exporting countries, their seeds are introduced into Japan as contaminants in imported wheat commodity. Herbicide resistant plants were detected in surrounding area of major ports.

To assess diffusion risk of herbicide resistant gene in area without herbicide use, I analyzed (1) frequency of resistant progenies, (2) gene flow and spatial genetic structure of the species, and (3) origin of the herbicide resistant gene.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：遺伝子流動、浸透交雑、除草剤耐性、外来雑草、適応度

## 1. 研究開始当初の背景

除草剤の普及に伴い、除草剤抵抗性雑草の発生が多数報告されるようになった。なかでも世界中の農耕地で問題雑草となっているドクムギ属（ライグラス *Lolium* spp.）は、除草剤抵抗性の発生報告数が多く、最も深刻な除草剤抵抗性雑草の1つとされている。海外から日本に輸入された小麦にはドクムギ属種子が大量に混入しており、種子の半数以上が除草剤抵抗性を持っていることが明らかとなった（下野・小沼 2009）。さらに野外で穀物輸送中のこぼれ種由来だと考えられる抵抗性個体の発生が報告された（下野・小沼 2010）。ドクムギ属は風媒の他殖性であり、近縁種間でも容易に交雑が起こる。なかでも、イタリアンライグラスやペレニアルライグラスは牧草や緑化植物として広く利用されているため雑草化し、日本各地いたる所で見られる。これらの事実から、ドクムギ属植物に見られる抵抗性遺伝子は交雑により環境中に拡散しやすいものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、抵抗性遺伝子およびマイクロサテライト領域をマーカーとして、除草剤抵抗性個体の由来を明らかにするとともに、種子・花粉散布などのプロセスを通じた時間的・空間的な遺伝子の動きを明らかにし、除草剤抵抗性個体の存続性および除草剤抵抗性遺伝子の拡散可能性を評価する。

## 3. 研究の方法

(1) 分析に供試したサンプルの採取は、既往研究でドクムギ属の除草剤抵抗性個体が検出された鹿島港周辺で行なった。鹿島港周辺の各13集団よりそれぞれ約50個体を採集し、アセト乳酸合成酵素（ALS）阻害剤およびアセチル CoA カルボキシラーゼ（ACCace）阻害剤に抵抗性を付与する遺伝変異（塩基置換）の有無を決定した。

(2) 後代の抵抗性個体出現頻度を推定するために、ALS阻害剤抵抗性個体の頻度が高い集団において種子を採集し、発芽させた種子に対する除草剤（クロロスルフロン）暴露試験を行った。5  $\mu$ M のクロロスルフロンを添加した寒天培地に播種し、発芽後1週間後の杯軸および根の長さを測定し、伸長が阻害されない個体を抵抗性個体と見なした。

(3) 空間的な遺伝構造を推定するために、Hirata *et al.* が開発したマイクロサテライトマーカー4座（02-05D、02-11G、03-04F、08-12G）の遺伝子型を決定した。個体間距離に応じた遺伝子頻度の相関の強さの指数と

して近交係数  $F_{ij}$  を算出した。さらに、遺伝子頻度に基づき任意交配が仮定できるようなグループ（クラスター）を、ソフトウェア Structure によりマルコフ連鎖モンテカルロを用いてベイズ推定を行った。

(4) 国内栽培品種および外国由来雑草のライグラスを用いて抵抗性遺伝子の由来推定を行った。供試材料は日本における育成3品種（タチワセ、ニオウダチ、イナズマ）、西オーストラリア産小麦混入ライグラス（ASW）、カナダ産春小麦混入ライグラス（1CW）、アメリカ産春小麦混入ライグラス（DNS）、アメリカ産冬小麦混入ライグラス（WW）である。これらの材料について、除草剤抵抗性を付与する遺伝子領域、マイクロサテライト領域、葉緑体 trnT-trnL 領域約800bpの遺伝子型あるいは塩基配列の比較を行った。

## 4. 研究成果

(1) ALS阻害剤抵抗性個体は13集団中6集団で、ACCace阻害剤抵抗性個体は4集団で検出された。これまでどちらの除草剤抵抗性個体も検出されていなかった1集団で、ALS阻害剤、ACCace阻害剤双方に対する抵抗性個体が検出され、新たな個体の逸出あるいは移住による分布拡大が示唆された。なお、抵抗性個体が検出された集団でのALS阻害剤およびACCace阻害剤抵抗性個体の頻度はそれぞれ2-14%、2-8%で、全分析個体を通じた抵抗性個体頻度はそれぞれ2% および1.4%であり、前年までの結果とほぼ同じであった。

(2) 後代におけるALS阻害剤抵抗性個体の頻度は親集団とほぼ変わらず、ALS阻害剤抵抗性遺伝子は淘汰されず後代に受け継がれていることが明らかとなった。

(3) マイクロサテライト領域の遺伝子頻度に基づく空間的遺伝構造を解析した結果、近交係数はごく近傍の個体間のみで正の相関が見られ（図1）、遺伝子流動が頻繁に起こる距離は数メートル程度と推定された。また、クラスタリング解析の結果、クラスター数が2の時尤度が高く、大きく2グループに分けられた。除草剤抵抗性が見つかった集団と3キロ以内にある集団は同じクラスターに、3キロ以上離れた集団は別クラスターに振り分けられた（図2）。このような局所的な遺伝構造が形成されていることから、周辺集団との遺伝子流動は限られていることが示唆された。

(4) マイクロサテライト領域の遺伝子頻度に基づくクラスタリングを行ったところ、国内で確認された抵抗性個体は ASW、1CW、DNS

と遺伝的に同じクラスター、日本育成品種は別クラスターに配分された(図3)。WWは個体によって異なるクラスターに配分された。除草剤抵抗性遺伝子のシーケンス解析においても同様の傾向が見られ、抵抗性個体は輸入穀物の混入種子由来であることが示された。なお、葉緑体 trnT-trnL 領域においては、4 つの変異(ハプロタイプ)が検出されたが、集団間で明確な差異は検出できなかった。

2年間の結果をまとめると、除草剤抵抗性個体は外国の輸入穀物への混入種子由来であり、穀物輸入港で定着していることが示された。一方で除草剤抵抗性遺伝子の拡散は顕著ではなく、局所的に分布し、それに相応した局所的な遺伝構造が形成されていた。今後はこの局所的な遺伝構造が形成されている理由(生態学的な特性の違い等)を明らかにする予定である。

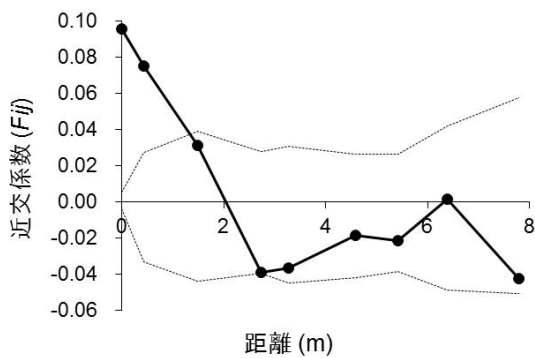


図1. 個体間距離に応じた近交係数  $F_{ij}$  (遺伝子頻度の相関の強さの指数) の変化

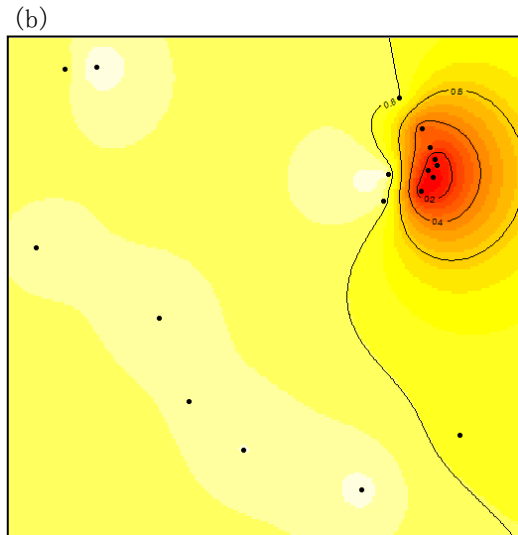
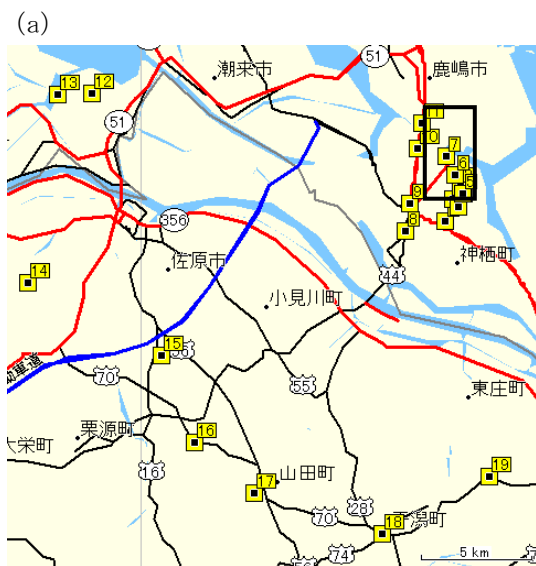


図2. 鹿島港でのサンプリング集団の位置(a)と Structure によるクラスター分析の結果(b)。鹿島周辺の集団は2つのクラスター(赤と黄色)に分かれ、赤いクラスターは抵抗性個体が分布する集団を含む。この赤いクラスターは鹿島港のごく限られた地域で検出された。

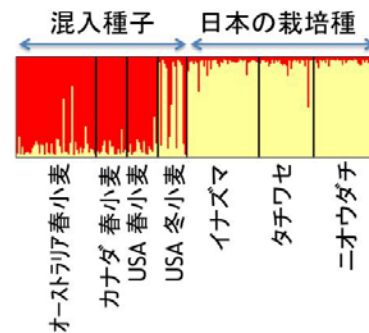


図3. 外国由来雑草のライグラス(西オーストラリア産小麦混入ライグラス、カナダ産春小麦混入ライグラス、アメリカ産春小麦混入ライグラス、アメリカ産冬小麦混入ライグラス)および本における育成3品種(タチワセ、ニオウダチ、イナズマ)の Structure によるクラスター分析の結果。外国由来雑草のライグラスは鹿島港で抵抗性個体が分布する集団と同じ赤いクラスターに、日本の育成品種は抵抗性個体の検出されなかった鹿島港周辺集団と同じ黄色いクラスターに分類された。

## 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)

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Shimono, A., Shimono, Y., Konuma, A. & Ohsawa, R. Dispersal and persistence of herbicide resistance ryegrass at a Japanese port. Plant and Animal Genome, San Diego, CA, Jan-16, 2012
- ② Shimono, Y., Shimono, A., Konuma, A. & Tominaga, T. Distribution of herbicide-resistant *Lolium* populations in ports and their genetic variation. The 5th EAFES International Congress, Ryukoku Univ. Kyoto, March-19, 2012
- ③ 下野綾子・下野嘉子・小沼明人・大澤良  
除草剤抵抗性ライグラスの由来を探る.  
第 27 回個体群生態学会大会 岡山大学  
2011 年 10 月 15 日
- ④ 下野綾子・下野嘉子・大澤良 港に生育  
する除草剤抵抗性ライグラスの存続性.  
第 58 回日本生態学会 札幌コンベンシ  
ョンセンター 2011 年 3 月 9 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下野 綾子 (SHIMONO AYAKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30401194