

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660042

研究課題名(和文) 農耕地における「里帰り」外来雑草と在来雑草の雑種形成に関する雑草学的研究

研究課題名(英文) Weed biological study on the hybridization between native and alien weeds in arable land

研究代表者

富永 達 (TOMINAGA, Tohru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10135551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：外来雑草のうち、ある地域に分布していた雑草が他の地域に侵入し、長い年月を経て再び原産地に侵入した場合、同種の在来系統と外部形態が同じであるため識別困難である。本研究では、エノコログサ属とメヒシバ属雑草について、在来系統と「里帰り」系統を識別可能なSSRマーカーを開発することを試みた。エノコログサ属雑草に関しては有効なマーカーを開発できなかったが、メヒシバ属雑草についてはiPBSマーカーによって国内産メヒシバと海外産メヒシバを識別できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：There are some weed species which migrated to other areas from native distribution area and again immigrated to original areas after long migration. It is very difficult to distinguish such weeds morphologically from original native one, because the two strains are the same species. In this experiment, we try to develop the SSR markers which distinguish such two weed strains of major upland weeds, *Setaria* and *Digitaria*. We could not develop useful SSR markers to distinguish the two strains of *Setaria* weeds, but some iPBS markers will be useful for distinguishing the two strains of *Digitaria* weeds.

研究分野：雑草生態学

キーワード：外来雑草 分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

人間の移動や物資輸送のグローバル化と量的拡大に伴い、多くの外来雑草が日本に侵入している。これらの外来雑草による被害は、自然生態系にとどまらず、作物生産の場においても大きな脅威となっている。外来雑草の侵入と定着には、種子の分散能力とその後の生育特性が大きく関わっているが、近縁種や種内の他系統との雑種形成による適応度の上昇に起因する新たな雑草問題が生じている可能性も否定できない。実際、一部のダイズ作農家や飼料作物農家からは、同じ種でありながら草型や競争力が従来とは異なる新しいタイプの雑草の存在が報告され、現行の防除法では十分に制御できないことが問題となっている。

畑雑草には、その分布が地域的に限定されている草種もあれば、汎世界的に分布している草種も存在する。汎世界的に分布している雑草の中には、アジア原産でヨーロッパやアメリカに広がった草種がある。これらは、もともとの遺伝的背景は同じであっても、地理的に離れると集団間で遺伝的交流は生じず、長い年月が経てばそれぞれの地域ごとの自然条件や農業の特性に応じて遺伝的に分化していることが考えられる。例えば、アメリカの代表的な畑雑草として、アメリカ農務省はヒコ類 (*Amaranthus* spp.) やメヒシバ (*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koel)、シロザ (*Chenopodium album* L.)、エノコログサ類 (*Setaria* spp.)、ブタクサ類 (*Ambrosia* spp.)、イヌビエ (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) などをあげているが、これらの草種は日本の畑強害雑草と共通で、メヒシバ、エノコログサ類およびイヌビエはアジア原産である (竹松・一前, 1997)。しかし、これらの草種は日本の同一種と比較して大型化しているのが特徴である (渡辺, 2001)。

自然条件下では、日本に生育する草種と例えばアメリカに生育する草種が雑種を形成することはあり得ない。他方、日本は、大量の食料や飼料をアメリカから輸入しており、輸入穀物や飼料には日本に生育する雑草と共通の草種の種子が生きた状態で多数混入し、未熟堆肥などを經由してこれらが畑地に侵入している (清水, 2001)。これらの一部には、除草剤抵抗性雑草も含まれている。このように、ある地域に分布していた雑草が別の地域に侵入し、長い年月を経て、再び原産地に侵入する、いわば「里帰り」の状況が日本では現在生じており、畑作強害雑草のメヒシバ、エノコログサ類およびイヌビエはその典型といえる。

これらの「里帰り」雑草は、在来雑草と比較し、前述のように大型化する傾向にあるが、同種であるため、外部形態だけで識別することは困難である。合理的な防除体系を確立するためには、「里帰り」雑草の侵入・定着の実態を明らかにすることが必要であるが、外部形態での識別が困難なことから、適切な分

子マーカーの開発が求められている。

2. 研究の目的

長期間地理的に隔離されていた草種が再び同所的に生育し、雑種を形成すると、雑種強勢によって競争力に勝り、適応度が高い新たなタイプの雑草が生み出される可能性がある。従来、外来雑草の分布拡大の実態把握に関しては、当該外来種そのものの分布拡大の様相を現地における調査や標本、文献調査などによって経時的に明らかにした例はあるが、在来種と外来種の間で雑種が形成され、それと分布拡大との関連が推定されている例は、日本では、人里植物のタンポポ属 (*Taraxacum* spp.) の在来種と外来のセイヨウタンポポの雑種形成とその分布について報告されているに過ぎず (芝池・森田, 2002)、畑雑草についての報告はない。

本研究では、今まで報告はないが、潜在的に生じている「里帰り」雑草と在来雑草の雑種形成の実態を、強害雑草のメヒシバ、エノコログサ (*S. viridis* (L.) P. Beauv.) およびアキノエノコログサ (*S. faberi* R. Herrm.) を材料として「里帰り」系統と在来系統を識別することが可能な分子マーカーを開発することを目的とする。有効な分子マーカーが開発されれば、同種でありながら草型や競争力が従来とは異なる新しいタイプの雑草に対して有効な防除計画を策定する一助となると考えられる。また、メヒシバの同属近縁種である *D. sanguinalis* (L.) Scop. も供試した。さらに、侵入・定着の有無について検討する際の基礎となるメヒシバと *D. sanguinalis* の外部形態の差異も検討した。

3. 研究の方法

(1) 材料

本研究にはメヒシバ、エノコログサおよびアキノエノコログサについて以下の日本国内と海外産の系統をそれぞれ用いた。なお、国内産系統は、輸入港とその周辺に生育する系統と山間部の畑地に生育する系統を採取した。

メヒシバ

日本：宮城県名取市、愛知県豊橋市、長野県伊那市、京都府京都市、綾部市、京丹後市、舞鶴市、兵庫県神戸市、福岡県筑後市
海外：アメリカ、スペイン、セルビア

エノコログサおよびアキノエノコログサ

日本：宮城県名取市、愛知県豊橋市、長野県伊那市、京都府京都市、兵庫県神戸市、福岡県筑後市
海外：アメリカ、スペイン、トルコ

D. sanguinalis

海外：アメリカ、スペイン、トルコ、ドイツ

(2) SSR マーカーの開発

SSR (Simple Sequence Repeat) は、解析

能の高さやその領域がゲノム中に多数存在すること、共優性バンドが得られること、繰り返し数のずれによって生じる多型が多いことなどから遺伝学的解析によく利用される (Zhou et al. 2003)。

メヒシバ、*D. sanguinalis*、エノコログサおよびアキノエノコログサとも、研究圃場で生育させた上記系統のそれぞれの個体の葉身から CTAB 法により DNA を抽出し、制限酵素処理を行い、アダプターを付加した。この DNA 断片のうち、ターゲットとなる SSR 領域の配列を片側のプライマー、アダプター配列をもう片方のプライマーとして PCR 増幅した。これをプラスミドに導入し、ゲノムライブラリーを構築した。このライブラリーからコロニーを取り出し、Insert PCR を行い、塩基配列を決定し、SSR 領域を増幅させるプライマーを設計した (Lian and Hogetsu 2002 など)。なお、エノコログサおよびアキノエノコログサに関しては、同属のアワ (*S. italica* P. Beauv.) で開発された SSR マーカーも利用した。

(3) iPBS を用いた多型の検出

メヒシバおよび *D. sanguinalis* に関しては、iPBS (Inter Primer Binding Sites) を用いた多型の検出も SSR 解析とともに行った。多くの SSR が変異の多い非コード領域に存在し、対象種ごとに特異的な SSR マーカーを開発しなければならず、作成にかなりの時間と労力がかかる (練・宝月 2004) のに対し、iPBS マーカーは、レトロトランスポゾン内のプライマー結合部位からつくられた優性マーカーで、DNA 配列の予備知識を必要としない、操作が簡易で、多型バンド数が多く、再現性が優れているなどの利点がある (Mehmood et al. 2013)。用いた 25iPBS マーカーのうち、再現性の高かった 9iPBS プライマーを用いて PCR を行い、3.5% アクリルアミドゲルを用いて 120V で 1 時間電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、多型の検出を行った。

(4) 外部形態の特性

上述のメヒシバ、*D. sanguinalis*、エノコログサおよびアキノエノコログサの各系統を催芽させ、畑土壌を詰めた直径 9cm×高さ 8cm のビニールポットに移植し、肥料 (N:P₂O₅:K₂O=8:0:8 kg/10a) を施用した。出穂後草丈、穂数、穂長、小穂の毛の長さ、分株数を測定した。

4. 研究成果

(1) SSR マーカーの開発

メヒシバおよび *D. sanguinalis*

目的とするサイズのバンドを増幅できたプライマーを用い、メヒシバおよび *D. sanguinalis* の DNA サンプルについて蛍光プライマーを用いた PCR を行い、フラグメント解析を行ったが、シグナルを明確に確認

することができず、多型解析に使用できなかった。日本国内産と海外産のメヒシバ、メヒシバと *D. sanguinalis* には大きな遺伝的分化が生じている可能性が考えられる。

エノコログサおよびアキノエノコログサアワで開発された SSR マーカーを利用したが、多型を検出できず、新たなマーカーの開発が必要であった。

(2) iPBS マーカーを用いた多型の検出

日本国内産と海外産系統を識別する有効な SSR マーカーの開発に成功しなかったため、メヒシバについて iPBS マーカーを試みた。用いた 25iPBS マーカーのうち、再現性の高かった 9 マーカーを解析に使用した。用いたバンドの総数は 76 であった。

メヒシバ各集団のヘテロ接合度は、神戸港集団が最も高かった。神戸港は国内有数の穀物輸入港であるため、移入系統が存在する可能性が高いことが示唆された。

集団間の遺伝子分化係数 (F_{st}) は 0.761 で、遺伝的分化の程度が高いことが確認された。近隣結合法によって作成した系統樹では、国内産と海外産のメヒシバは、別のクラスターに属し、両者が遺伝的に分化していることが推定された。国内産のメヒシバの産地と遺伝的類縁関係の間には高い相関は認められず、国内で地理的に分化している可能性が低いことが示唆された。

iPBS マーカーのうち、特定のマーカーでは、国内と海外産のメヒシバ集団の間で明確にバンドパターンが異なるものが認められ、このマーカーが国内と海外産のメヒシバ集団を識別するのに有効であることが示唆された。今後さらに iPBS マーカー数を増やし、解析する必要があると思われる。

(3) 外部形態の特性

調査形質のうち、メヒシバ、エノコログサおよびアキノエノコログサともに、穂長および草丈に関して集団間で有意差が認められた。アメリカ産のメヒシバ、エノコログサおよびアキノエノコログサは、他の集団と比較して穂長および草丈が大であった。他の形質に関しては集団間に有意な差が認められないか、一定の傾向は認められなかった。

以上のことから、植物体のサイズを除いて、国内産と海外産のメヒシバ、エノコログサおよびアキノエノコログサを明確に特徴づけられる外部形態形質は見いだせず、表現型からは国内産と海外産集団を識別することは困難であった。

メヒシバおよび *D. sanguinalis* の外部形態の差異に関しては、草丈、穂長、穂数および分株数において一定の傾向は認められなかった。メヒシバと比較して *D. sanguinalis* は、小穂および葉鞘の毛が長く、密度は高かった。しかし、メヒシバの小穂および葉鞘の毛の長さや密度に関しては、系統間変異が大きく、

また、供試した *D. sanguinalis* の産地が限られていたことから、さらに多くの産地からの系統を用い、検討することが必要と考えられる。

葉舌に関しては、メヒシバと比較して *D. sanguinalis* の葉舌は短く、両種を識別する有力な形質であると考えられた。

本研究では、メヒシバ、エノコログサおよびアキノエノコログサについて、国内産と海外産集団を識別することができる有効な SSR マーカーを開発することはできなかった。これらの種については、両者に大きな遺伝的分化が生じている可能性が考えられた。メヒシバについては iPBS マーカーを使用することによって両者を識別できる可能性が示唆された。今後、より多数の iPBS マーカーを開発し、「里帰り」系統を在来系統と識別し、「里帰り」系統の侵入・定着の実態を明らかにしたい。

<引用文献>

Lian C. and T. Hogetsu, 2002. Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique. *Molecular Ecology Notes* 2, 211-213.

Mehmood, A., M. J. Jaskani, S. Ahmad, and R. Ahmad, 2013. Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers. *Pakistan Journal of Agriculture* 50, 591-597.

練春蘭・宝月岱造, 2004. 効率的マイクロサテライト(SSR)マーカー作成のためのプロトコル. *日林誌* 86, 191-198.

芝池博幸・森田竜義, 2002. 広がる雑種タンポポ. *遺伝* 56, 16-18.

清水矩宏, 2001. 最近の外来雑草の侵入経路. 清水矩宏・森田弘彦・廣田伸七編. *日本帰化植物写真図鑑*. 24. 全国農村教育協会.

竹松哲夫・一前宣正, 1997. 世界の雑草. 1057. 全国農村教育協会.

渡辺修, 2001. 帰ってきたウルトラ雑草. 清水矩宏・森田弘彦・廣田伸七編. *日本帰化植物写真図鑑*. 131. 全国農村教育協会.

Zhou H-F., Z-W. Xie, S. Ge, 2003. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza*

rufipogon Griff.) in China. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 332-339.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

川又絵美・下野嘉子・富永達、国際貿易港と市街地間の植生の比較、日本雑草学会第 54 回大会、2015 年 4 月 18 日、秋田県立大学(秋田県秋田市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.weed.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 達 (TOMINAGA, Tohru)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：10135551

(2)研究分担者

福永 健二 (FUKUNAGA, Kenji)
県立広島大学・生命環境学部・教授
研究者番号：50435533

(3)連携研究者

大迫 敬義 (OHSAKO, Takanori)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師
研究者番号：80363969