分子生物学的手法によるイチビの種内変異および日本への侵入経路の解明

黒川俊二*

キーワード：イチビ，分子生物学，侵入経路，外来雑草，飼料畑

Keywords: *Abutilon theophrasti*, molecular biology, invasion pathway, exotic weeds, forage crop fields

イチビ (*Abutilon theophrasti* Medic.) は元来，繊維作物として世界各地で栽培されてきた有用植物である⁸⁾。日本においてもイチビの導入の歴史は古く，すでに平安時代にまとめられた「本草和名」にその名が記されており，それ以前に中国から導入されたと考えられる。しかし，1980年代半ば以降急激にその分布を拡大し，現在では日本の飼料畑における最も厄介な帰化雑草となっている。

現在日本の飼料畑では，イチビ以外にも，ヨウシュチョウセンアサガオ，オオクサキビ，ハリビユ，アレチウリ，ワルナスビなどの多種多様な帰化雑草が問題となっており⁶⁾，その対策が急務となっている。

こうした多くの帰化雑草が全国の飼料畑で集中的に問題を引き起こしていたことから，この問題は日本の畜産事情に原因があると推定された。そのため，これら帰化雑草の侵入源として，1980年代以降急増してきた輸入飼料が疑われた。鹿島港における輸入穀物の雑草種子混入調査では，アメリカ合衆国とオーストラリアからの輸入穀物の中に混入していた種子の中にイチビが含まれていたことが明らかとなっている^{1, 7)}。

イチビをはじめとする多くの帰化雑草による被害を効果的に防止するためには，個々の種に対する防除法の確立が重要であるだけでなく，それらの侵入源，侵入経路，定着条件および拡散機構を解明し，できるだけ侵入初期の段階で防除策を講じることが必要

不可欠である。イチビのようにすでに全国に蔓延したものの侵入・定着・拡散過程を解明することは，過去の事象であるため非常に困難であるが，近年発展した分子生物学的手法は非常に有効な手段となりうる。本研究は，分子生物学的手法を駆使し，日本全国の飼料畑で大きな被害をもたらしているイチビについて，その侵入源および侵入過程を解明することを目的として行った。

1. 世界のイチビの種内変異の様相の把握

世界中で収集されたイチビのUSDA (United States Department of Agriculture) 遺伝資源と鹿島港に入港した輸入穀物サンプル中で検出されたイチビを用いて，形態形質および生育特性について相対的な比較を行うとともに，ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) によるDNA解析を行った。それらの結果を元に，輸入穀物サンプル中で種子が検出されたイチビの，種内変異の中での位置づけを明らかにした。

1) 形態および繁殖特性に見られる種内変異⁴⁾

イチビには分枝があまり起こらず，草高が高くなる低分枝型の生育型を示す系統と，分枝性が強く，あまり草高が高くない高分枝型の生育型を示す系統があることが見出された。生育型が低分枝型である系統は，長い繊維を容易に得られる点で繊維作物として最適であったと推察され，一方，高分枝型は花芽数の増加をもたらす結果，雑草の繁殖戦略にとって有利な種子生産性を高くすることに貢献していると考えられた。低分枝型の生育型を示す系統は，より長い茎を生産するべく長い栄養生長期間を持ち，開花期が短かった。またこれらの系統が生産する種子は休眠性も低く，栽培の際の出芽揃いに貢献したと推察される。

供試材料間で形態上の明確な差異として，さく果の色に黄白色と黒色の二種類が観察された。低分枝型で作物的な生育特性を示す系統は，ほとんど黄白色のさく果をつけることが明らかとなった。遺伝解析の結果，黒色は黄白色より優性形質であり，さく果の色を支配する主働遺伝子 (主働遺伝子群) は，1遺

* 畜産草地研究所 飼料作生産性向上研究チーム

〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松768

shunji@affrc.go.jp

Shunji Kurokawa : Molecular biological studies on the invasion of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) in Japan. National Institute of Livestock and Grassland Science. 768 Senbonmatsu, Nishinasuno, Nasu, Tochigi, 329-2793, JAPAN
(2006年5月12日受理)

第1表 交雑後代におけるさく果の色の分離

世代 (系統番号)	さく果の色		χ^2 値 ¹⁾
	黒色	黄白色	
	(no. of plants) ²⁾		
種子親 (PI4992210)	...	1	...
花粉親 (94-I-S)	1	...	...
F ₁ (黄白色×黒色)	8	0	...
F ₂ (黄白色×黒色)	85	16	4.52 (0.02<P<0.05)

1) F₂世代における理論分離比を3:1としたときの χ^2 値を示す。

2) 交雑実験に用いた親の個体数およびその交雑後代の個体数を示す。なお、交配は黄白色(♀)×黒色(♂)の一方のみで、正逆交雑は行っていない。

伝子支配であることは判明しなかったものの核ゲノム上に座乗していることが確認された(第1表)。このように、作物的な生育特性を示す系統のほとんどで見られる黄白色のさく果の色は劣性遺伝子によって支配されていることから、この形質は、作物系統を維持する上で、野生のイチビからの遺伝子流動を防止するための遺伝マーカーとして有用であったことが推察される。

遺伝資源の中に見られた日本の在来系統と輸入穀物に混入していた種子の系統の形態および生育特性の比較を行った結果、ほぼすべての形質において有意差が見られた。特に、開花期間、着果数、種子休眠率といった繁殖力に関わる形質については、輸入穀物混入系統は在来系統に比べて非常に高いことが明

らかとなった(第2表)。さらに、在来系統と輸入穀物混入系統は、それぞれ黄白色と黒色のさく果をつける点でも明確に区別された。これらの結果は、年間2300万トンに及ぶ輸入穀物を介して非常に雑草性の強い系統が日本に大量に入り、日本中の畜産農家に導入されていることを示すものである。

2) DNA多型に基づく系統解析³⁾

ISSR解析結果に基づくクラスター分析の結果、大きく2つのクラスター(Cluster 1, 2)に分かれ、さく果の色の変異とはほぼ一致していた(第1図)。これらのことから、イチビはさく果の色によって、2つの系統群に識別できると考えられた。

輸入穀物混入系統と在来系統は、形態や生育特性が大きく異なるだけでなく、遺伝距離も大きく離れて

第2表 日本在来系統と輸入穀物混入系統の間で見られた形態および生育特性の違い

形態および生育特性		平均値		Mann-Whitney rank test
		在来系統	輸入穀物混入系統	
播種3ヵ月後			(n=9)	(n=3)
草高	(cm)	156.2	111.7	**
枝数		14.7	21.3	**
全枝長	(cm)	454.2	781.7	*
葉数		52.7	155.7	**
播種4ヵ月後				
草高	(cm)	241.2	179.0	**
枝数		22.7	30.3	**
開花特性				
開花開始に至る日数	(days)	102.3	67.3	**
開花開始日の草高	(cm)	204.9	40.3	**
開花期間	(days)	20.2	60.7	**
着果数		158.4	777.0	**
種子休眠率	(%)	7.0	40.5	**

*, **: それぞれ5%, 1%水準で有意。

第1図 ISSR解析に基づくイチビ系統樹
枝上の数値は、ブートストラップ確率を示す（50％以上のみ表示）。

いることが明らかとなった。

2. 葉緑体DNA多型を用いたイチビ遺伝子型の分類

輸入穀物混入系統が飼料畑で問題を引き起こしているイチビの由来であることを確かめるためには、種子の移動を検証する必要がある。そこで、母系遺伝する葉緑体DNA多型を検出し、ハプロタイプを識別

するPCRベースのマーカーを作成した。また、先に述べたさく果の色の変異と組み合わせで遺伝子型分類を行い、遺伝子型間での生育特性の比較を行った。

1) マーカーの確立およびさく果の色と組み合わせた遺伝子型の分類³⁾

葉緑体DNAシーケンスの比較を行った結果、3箇所PCR増幅領域において、3つの1塩基置換、1つの6塩基の挿入／欠失および1つの30塩基の逆位

第3表 系統間で見られた葉緑体DNA塩基配列の変異

サンプル番号	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnH-trnK</i>				<i>trnT-psbC</i>
	挿入/欠失 ¹⁾	1塩基置換		逆 位		1塩基置換
PI499240	-----	C	T	CTAATACTCTTGATAGAACAAAGAAATTGGT		T
PI499255	-----	C	T	CTAATACTCTTGATAGAACAAAGAAATTGGT		T
94-62-L	TTGAAT	T	A	ACCAATTTCTTGTTCTATCAAGAGTATTAG		A

1) 「-」は欠失していることを示す。

を検出した。これらの変異の組み合わせから、2つのハプロタイプ(ハプロタイプAとBとする)となることが判明した(第3表)。

葉緑体DNAハプロタイプとさく果の色の変異を組み合わせることによって、供試したイチビのすべての系統を3つの遺伝子型(Type I, IIおよびIII)に分類することができた(第4表)。各系統群における遺伝子型識別の結果を第5表に示す。すべての日本の栽培品種およびUSDA 遺伝資源の一部はType Iだった。Type I以外のUSDA 遺伝資源にはType IIとType IIIの両方が見出された。すべての輸入穀物混入系統群とアメリカコーンベルトで採集した系統群はType IIIであった。日本で蔓延している系統群のほとんどはType IIIであったが、長野県と栃木県で採集された系統のいくつかはType IIに分類された。

本研究において提案した遺伝子型の分類は、葉緑体DNA マーカーを利用している点において、母系を推定できる利点がある。そのため、種子による移動を推定できる可能性があり、イチビの侵入・拡散過程の推定のための強力なツールとなりうる。日本サンプルの中で、輸入穀物混入系統とは異なる葉緑体を持つType IIの系統がいくつか見られたことは、それらが輸入穀物混入系統とは別の系統に由来することを示唆している。別の利点として、葉緑体DNA 多型に組み合わせたさく果の色の変異について、栽培品種がつける黄白色が黒色に対して劣性であることが挙げられる。現在日本に分布している雑草のイチビの中に黄白色のさく果をつける系統が見つからないのは、劣性形質が野生状態で維持されることが稀であることを証明している。また、黄白色のさく果をつける遺伝子型(Type I)の分布は、そのままイチビの繊維作物としての世界での分布を示していると考えられ、繊維作物の伝播経路などの研究にも貢献するかもしれない。USDA 遺伝資源の遺伝子型識別の結果からみると、原産地のアジアだけでなく、ヨーロッパ、アフリカおよびアメリカにも栽培品種と同じType Iが広く分布していたことがわかる。

しかし、ここで示した遺伝子型識別の欠点として、Type IIとは逆方向の雑種、つまり、Type IIIにType Iの花粉がかかった場合の雑種の検出が不可能な点が挙げられる。また、Type IIとType IIIについては、遺伝子型間の戻し交雑の程度を推定することも難しく、こうした遺伝子型間の遺伝的交流がどのようにイチビの侵入過程に影響してきたかを解明するために

第4表 葉緑体DNAハプロタイプとさく果の色によるイチビの遺伝子型分類

葉緑体DNA ハプロタイプ	さく果の色	遺伝子型
A	黄白色	I
A	黒色	II
B	黒色	III

は、それぞれの遺伝子型の中での変異についても明らかにする必要があり、さらなる遺伝マーカーの作出が不可欠であると考えられる。

2) 各遺伝子型の形態および生育特性上の相違

形態および生育特性に関わる全14形質に基づく主成分分析の結果、第一主成分(PC1)は繁殖能力と関わる形質(分枝数、開花期間およびさく果数)について正の固有ベクトル、開花にいたる日数について負の固有ベクトルを示していた。また、この主成分は種子休眠性について正の固有ベクトルを示していたことなどから、雑草性あるいは作物特性を示す有用な指標となりえる。作物的な特性を示すもの、すなわち、PC1の値がより小さいものは、アジア、アフリカおよびアメリカの各地域の系統に見られ、イチビの原産国とされる中国と日本で採集されたものも含まれていた。

イチビの3つの遺伝子型の分類に基づいて、各遺伝子型に識別された個体を主成分プロットに示した結果(第2図)、Type Iは作物としての特性を示す位置にプロットされ、Type Iが栽培系統であることを裏付ける結果となった。また、Type IIIは雑草性を示す位置にプロットされ、Type IIはType IとType IIIの中間の位置にプロットされる傾向が見られた。

3. さく葉標本の葉緑体DNA多型と国内雑草系統の由来の推定

遺伝子型識別による系統群間の比較の結果から、近年雑草として問題となっているイチビが輸入飼料を介して侵入した可能性が強く示唆された。もしそれが事実であれば、穀物輸入量が増加する1950年代以前には、その系統の分布はまれであったに違いない。そこで、時間的な変化を明らかにするために、さく葉標本を材料としたDNA解析法を確立し、イチビのハプロタイプ識別をさく葉標本に適用した。それらの結果と現在の遺伝子型の分布状況を総合して国内に分布する雑草系統の由来の推定を試みた。

第5表 イチビの各系統群における遺伝子型

グループ	国	地域・ソース	生育地 ¹⁾	系 統	葉緑体DNA ハプロタイプ	さく果色	遺伝子型				
輸入穀物	アメリカ合衆国	鹿島港	—	94-1-S 94-22-H 94-62-L 94-67-P	B B B B	黒 黒 黒 黒	Ⅲ Ⅲ Ⅲ Ⅲ				
	オーストラリア	鹿島港	—	94-20-V	B	黒	Ⅲ				
コーンベルト	アメリカ合衆国	イリノイ州	トウモロコシ畑	k00239 k00240	B B	黒 黒	Ⅲ Ⅲ				
				インディアナ州	トウモロコシ畑	k00235 k00237 k00238	B B B	黒 黒 黒	Ⅲ Ⅲ Ⅲ		
		空き地	k00234			B	黒	Ⅲ			
			ダイズ畑			k00236	B	黒	Ⅲ		
		ミズーリ州	トウモロコシ畑	k00241 k00242	B B	黒 黒	Ⅲ Ⅲ				
				ネブラスカ州	トウモロコシ畑	k00243 k00245	B B	黒 黒	Ⅲ Ⅲ		
		ソルガム畑	k00244			B	黒	Ⅲ			
		日本国内	日 本	群馬県	トウモロコシ畑	k00013	B	黒	Ⅲ		
				広島県	トウモロコシ畑	k00011	B	黒	Ⅲ		
				宮城県	トウモロコシ畑	k00003	B	黒	Ⅲ		
長野県	トウモロコシ畑			k00004 k00005 k00006 k00007 k00008	A B B B A	黒 黒 黒 黒 黒	Ⅱ Ⅲ Ⅲ Ⅲ Ⅱ				
				奈良県	トウモロコシ畑	k00002	B	黒	Ⅲ		
						荒地地	k00012	B	黒	Ⅲ	
				新潟県	採草地 草地	k00015	B	黒	Ⅲ		
						k00020	B	黒	Ⅲ		
岡山県	トウモロコシ畑			k00009 k00010	B B	黒 黒	Ⅲ Ⅲ				
				栃木県	トウモロコシ畑	k00022 k00049 k00079 k00109 k00139 k00148 k00178 k00205	B B B B A B B A	黒 黒 黒 黒 黒 黒 黒 黒	Ⅲ Ⅲ Ⅲ Ⅲ Ⅱ Ⅲ Ⅲ Ⅱ		
東京都	空き地					k00016	B	黒	Ⅲ		
山形県	トウモロコシ畑					k00001	B	黒	Ⅲ		
日本栽培品種	日 本					農業生物資源 研究所 ジーンバンク	—	JP25777 JP25778 JP25779 JP25780 JP25781 JP25782 JP25783 JP25784 JP25785 JP25786 JP25787	A A A A A A A A A A A	黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色 黄白色	I I I I I I I I I I I

1) 「—」は生育地が不明。

第2図 形態および生育特性に基づく主成分分析プロット

○：Type I，◐：Type II，●：Type III。

○および◐はそれぞれさく果が黄白色，黒色の遺伝子型識別を行っていない個体を示す。

1) さく葉標本の葉緑体DNA多型解析²⁾

4つの標本庫，TNS (国立科学博物館)，TI (東京大学)，MAK (東京都立大学)，およびKYO (京都大学) に保存されているものの中でイチビと同定されたものについて，DNA抽出および解析を試みた結果，供試したすべてのさく葉標本について葉緑体DNAハプロタイプを識別することができた。

ハプロタイプAと識別された最初の標本は，1883年に山形県で採集されたものであった。ハプロタイプAの標本は，1890年代，1900年代および1970年代を除くすべての年代で見出された。一方，ハプロタイプBと識別された最初の標本は，1893年に東京で採集されたものであった。ハプロタイプBについてもほとんどの年代で見出された。それぞれのハプロタイプの国内分布を比較したところ，ハプロタイプAの分布は，北海道から鹿児島県にまで，また，ハプロタイプBについても，青森県から熊本県までの広い範囲に分布しており，これら2つのハプロタイプの分布に大きな違いは認められなかった。

2) 国内雑草系統の由来の推定

すべての日本の栽培品種がType Iに分類され，輸

入穀物混入系統とその主な生産地であると考えられるコーンベルトで採集された系統がすべてType III (第5表) であったことは，かつて日本で栽培されていたものとは異なる葉緑体DNAハプロタイプを持つ系統が輸入穀物経由で日本に入ってきていることを示している。また，日本で現在問題を引き起こしているイチビの大部分が輸入穀物混入系統と同じType IIIであったことは，これらが輸入穀物に混入して新たに侵入してきた系統に由来することを強く示唆している。また，さく葉標本のDNA解析の結果においても，Type IIIに分類されたさく葉標本の多くは第二次世界大戦後に採集されていた (全Type III標本の72.2%)。つまり，これらの結果は，1980年代以降，イチビによって日本中の飼料畑を中心に深刻な問題が引き起こされてきた原因は，近年の穀物輸入量増大に伴う新たな侵入の増大であるという仮説を支持するものである。

しかし，日本サンプルの一部に種子親が作物に由来するType IIが見つかることは，かつて繊維作物として栽培されていた栽培系統に由来すると推察されるものが現存していることを示している。さら

に、さく葉標本のハプロタイプ識別の結果、110年前の標本に現在国内に分布する大部分の遺伝子型と同じType IIIが見つかっていることは、穀物輸入量が増大する以前から同じタイプが存在していたことを示している。近年の飼料畑の雑草防除方法が、野草利用での無除草から集約的なトウモロコシ栽培での土壌処理除草剤処理へと変化した、土壌処理剤に対する感受性が低いイチビにとって有利な環境条件が整ったことにより、過去に存在していた雑草型のイチビが大発生するにいたった可能性もまだ残されている。しかし、今回得られた結果だけでは、過去のハプロタイプBを持つ系統と、輸入穀物に混入している系統が同様の性質を示すものであるかどうかはわからないため、検証することは困難である。ここで開発したさく葉標本のDNA解析法は、短い断片であれば約120年間におよびイチビのさく葉標本をすべて解析することが可能であったことから、雑草性に関わる形質に連鎖したPCRマーカーを作成し、さく葉標本に適用することによって、日本におけるイチビの遺伝子型が、時代とともにどのように変化してきたのかを明らかにできるかもしれない。近年のイチビの蔓延の原因に関わる仮説を正確に検証するためには、より多くの分子マーカーを現在および過去の系統解析に適用する必要があると考えられる。

すでに大きな問題を引き起こしているイチビの歴史的な増加過程や分布拡大様式を解明することは、強害帰化雑草と呼ばれるものがどのような侵入過程を経て問題を引き起こすにいたるのかを知ることにつながり、これまでの雑草学研究では困難とされてきた、帰化雑草の侵入初期の過程の解析が可能になると期待される。今後、こうした研究は雑草学の新たな研究分野の一つとして展開されていくものと考えられるとともに、帰化雑草の防除の観点からも、最も効果的とされる水際での種子遮断という積極的な防除対策技術の開発につながるものと期待される。

謝 辞

本研究は草地試験場（現畜産草地研究所）および農林水産省流動研究員制度により派遣された農業環境技術研究所において行われたものであり、遂行に当たっては、芝池博幸博士（農業環境技術研究所）、草地試験場栽培生理研究室吉村義則前室長（現畜産草地研究所）、同研究室元室長清水矩宏博士（現神津牧場理事）をはじめ数多くの方々の御指導、御協力を賜り

ました。また、伊藤操子京都大学名誉教授には、研究の取りまとめに当たり多大な御助言、御指導を賜りました。さらに、USDA/ARS、農業生物資源研究所ジーンバンク、国立科学博物館、東京都立大学（現首都大学東京）牧野標本館、東京大学総合研究博物館および京都大学理学部には、貴重な研究材料を提供して頂きました。

ここに、関係各位に深く感謝し御礼申し上げます。

発表論文および引用文献

- 1) 榎本敬・清水矩宏・黒川俊二 1996. 外国からの濃厚飼料原体に混入していた雑草種子の同定 II. 注目すべき種の特徴などについて. 雑草研究 41(別),214-215.
- 2) 黒川俊二・芝池博幸・秋山永・渡辺修・吉村義則・尾上桐子 2001. 押し葉標本のDNA解析によるイチビの分布拡大様式の解明. 雑草研究 46(別),164-165.
- 3) Kurokawa, S., H. Shibaike, H. Akiyama and Y. Yoshimura 2004. Molecular and morphological differentiation between the crop and weedy types in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.) using a chloroplast DNA marker: seed source of the present invasive velvetleaf in Japan. Heredity 93,603-609.
- 4) Kurokawa, S., N. Shimizu, S. Uozumi and Y. Yoshimura 2003. Intra-specific variation in morphological characteristics and growth habit of newly and accidentally introduced velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.) into Japan. Weed Biology and Management 3,28-36.
- 5) Kurokawa, S., N. Shimizu, S. Uozumi and Y. Yoshimura 2003. ISSR variation in a worldwide collection of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and the genetic background of weedy strains mingled in grains imported into Japan. Weed Biology and Management 3,179-183.
- 6) Nishida, T. and N. Shimizu 1999. Alien plant invasion into forage crop fields and artificial pastures in Japan. In "Biological Invasions of Ecosystem by Pests and Beneficial Organisms" ed. by E. Yano, K. Matsuo, M. Shiyomi, D. A. Andow, National Institute of Agro-Environmental Science, Tsukuba, pp.128-142.
- 7) 清水矩宏・榎本敬・黒川俊二 1996. 外国からの濃厚飼料原体に混入していた雑草種子の同定 I. 種類とバックグラウンド. 雑草研究 41(別),212-213.
- 8) Spencer, N.R. 1984. Velvetleaf, *Abutilon theophrasti* (Malvaceae), history and economic impact in the