

雑草のALS阻害剤抵抗性生物型の種子発芽特性

富永 達*

アメリカ・ワシントン州の苗木畑において、ノボロギク (*Senecio vulgaris* L.) のトリアジン系除草剤抵抗性生物型が1968年に認知された¹²⁾。これは、世界で最初の雑草における除草剤抵抗性生物型の報告であった。日本では埼玉県の桑畑でパラコートに抵抗性を示すハルジオン (*Erigeron philadelphicus* L.) が1980年に初めて認められた¹⁷⁾。その後、2006年11月末までに183種で311抵抗性生物型が報告されており⁸⁾、その中には、複数の異なった抵抗性機構を獲得し、作用機作の異なる複数の除草剤に対して同時に抵抗性を示す複合抵抗性をもつ生物型も存在している。

日本の水田における雑草のSU剤抵抗性生物型の防除に関する課題は、対策剤の普及によって既に解決済みであるかのような観がある。しかし、除草剤を使用し続ける限り、それに対する新たな抵抗性生物型が顕在化することが予想される。また、福岡県の麦畑において、スズメノテッポウ (*Alopecurus aequalis* Sobol.) のSU剤抵抗性生物型が新たに報告され¹⁶⁾、畑作においてもそれらへの対策を講ずることが必要となっている。

雑草の除草剤抵抗性生物型の生活史特性を理解し、それに対応した耕種(生態)的な防除方法を総合的防除体系に組み込むことによって、新たな除草剤抵抗性生物型の優占を抑制することが可能であると考えられる。トリアジン系除草剤やパラコートに対する抵抗性生物型は、これらの除草剤が散布されない環境において、競争力や適応度が感受性生物型より劣り、優占することはないと考えられてきた。しかし、SU剤を含むALS阻害剤に対する抵抗性生物型では、Pro¹⁷³Hisの変異をもつアメリカ・アイダホ州由来のトゲチシャ (*Lactuca serriola* L.)¹⁾ やTrp⁵⁷⁴Leuの変異をもつカナダ・南オンタリオ州由来の*Amaranthus powellii* S. Wats.¹⁴⁾を除いて、ALS阻害剤が散布さ

れない環境下でも乾物生産量あるいは適応度に関して感受性生物型との間に差異がないことが報告されている。

雑草の種子発芽に関する特性は、生育初期の作物との競争や埋土種子集団の動態を解析するうえで重要な意義をもち、また、耕種の防除に有効に利用できる可能性がある。*Brassica campestris* L.¹⁰⁾ や*Amaranthus powelli*¹⁸⁾では、アトラジンに抵抗性を示す生物型が感受性生物型より遅く発芽することが報告されているが、発芽遅延の機構についての詳細は不明である。ここでは、ALS阻害剤抵抗性生物型の種子発芽特性に関するいくつかの報告を紹介するとともに、これらの報告から導き出された結果の解釈について供試集団(個体)数やその由来(起源)に関して考察する。

1. ALS阻害剤抵抗性生物型の発芽特性

1) トゲチシャ (*Lactuca serriola* L.)

アメリカ・アイダホ州の畑のALS阻害剤抵抗性個体から、また、一度もALS阻害剤が散布されていない畑から感受性生物型の種子が採集され(個体数に関する記述はない)、ガラスハウス内で育成されたそれぞれの実生について抵抗性の有無が再確認された。

(1) 埋土種子の寿命：ナイロンメッシュの袋に入れられた両生物型各75種子が、それぞれ地表、7.5cmおよび15cmの深さに埋土され、3年間にわたって6ヵ月ごとに掘り上げられた。掘り上げられた種子は、20℃・12時間明条件下に置かれ、5日から7日間24時間ごとに発芽の有無が調査された。実験は州内の2ヵ所で行なわれ、それぞれ4反復された。実験室内(21℃)に貯蔵された両生物型の種子についても同様の発芽実験が行なわれた。

両生物型の埋土種子の寿命に差異は認められなかった²⁾。

(2) 発芽実験：8月17日から9月13日の間の4回にわたって、両生物型の各2個体から種子がそれぞれ採集され、20℃・12時間明条件下に置床され、最初の24時間は12時間ごとに、その後の9日間は24時間ごとに発芽の有無が調査された。実験は50種子4反

* 京都大学農学研究科
606-8502 京都市左京区北白川追分町
tominaga@kais.kyoto-u.ac.jp
(2006年12月16日受付, 2007年2月15日受理)

復で行なわれた。

9月4日に採集された抵抗性生物型の種子は、感受性生物型の種子より早く発芽したが、最終発芽率に差異はなかった²⁾。

2) ホウキギ (*Kochia scoparia* L.)

(1) アメリカ・モンタナ州のいくつかの畑では、ホウキギのALS阻害剤抵抗性生物型が、早春に感受性生物型より早く出芽し、生育することが認められている。これらを実験的に検証するために、ホウキギのALS阻害剤抵抗性生物型の発芽特性が感受性生物型と比較された。

モンタナ州内の3カ所の抵抗性個体および2カ所の感受性個体から種子が採集され(個体数に関する記述はない)、ガラスハウス内のそれぞれ別々の区画で栽培された。成熟種子が採取され、4℃で貯蔵された(貯蔵期間に関する記述はない)。

発芽試験時の温度処理は、4.6～16.8℃の間の6段階に設定され、12時間おきに発芽の有無が調査された(明暗条件は特に設定せず)。実験は、それぞれ10種子の3反復を3回繰り返して行なわれた。

4.6℃区における48時間後の発芽率は、抵抗性生物型では80%以上を示したのに対し、感受性生物型では約40%にとどまった。他方、7.2℃以上の区においては、両生物型の発芽率に差異が認められなかった⁵⁾。

(2) アメリカ・カンザス州とノースダコタ州で採集されたALS阻害剤抵抗性および感受性それぞれ1生物型がガラスハウス内で3世代栽培され、4世代目の種子が実験に用いられた。これらの種子は、実験開始まで約7ヵ月間室温で貯蔵された。

発芽試験温度は、8℃、18℃および28℃(いずれも全日長)に設定された。8℃区では最初の11日間は4時間ごとに、その後17日目までは1日ごとに発芽の有無が調査された。18℃区および28℃区では最初の176時間は4時間ごとに、その後は約24時間ごとに17日間発芽が調査された。なお、実験はそれぞれ40種子、4反復で行なわれた。種子の発芽経過から発芽速度および最終発芽率などが評価された。

カンザス州集団では、抵抗性生物型の8℃区における最終発芽率が感受性生物型より11%高かった。18℃区および28℃区ではそれぞれ4%および5%高かった。また、発芽速度が速かった。ノースダコタ州集団では、8℃区においてのみ発芽パターンに差異が認められ、61時間後の抵抗性生物型の発芽率が50%で

あるのに対し、その時点における感受性生物型の発芽率は25%であると推定された¹⁵⁾。

3) ボウムギ (*Lolium rigidum* Gaud.)

(1) 発芽試験：オーストラリア・西オーストラリア州由来のALS阻害剤抵抗性ボウムギの500以上の収集系統から、地理的に離れた9抵抗性系統および10感受性系統が選ばれた(感受性系統の母集団に関する記述はない)。

20℃で貯蔵されていた種子が供試され(記述内容からこれらの種子は前年12月に生産されたと推定される)、2月、3月、5月および6月に発芽試験が行なわれた。発芽条件は、20/15℃(明/暗)で、14日間観察された。なお、実験は、50種子の3反復で行なわれた。

最終発芽率に関して、系統間差異が認められたが、抵抗性生物型と感受性生物型の間に差異は認められなかった。

(2) 出芽試験：上記と同じ抵抗性ボウムギの収集系統から、地理的に離れた6抵抗性系統および6感受性系統が選ばれた(感受性系統の母集団に関する記述はない)。

種子が生産されてから約10ヵ月後に(貯蔵条件に関する記述はない)、それぞれ50種子が2cmの深さに埋土され、13/7℃(明/暗)の温度制御室で出芽が観察された。3反復で行なわれた。

抵抗性生物型と感受性生物型の出芽パターンに差異は認められなかった⁷⁾。

4) イヌカキネガラシ (*Sisymbrium orientale* Torn.)

オーストラリア南部の土壌タイプが類似し、輪作体系が同じ畑のALS阻害剤抵抗性個体および感受性個体から種子が採集された。なお、両採集地は10km離れている。

(1) 発芽試験；取播き種子(100種子×5反復)の発芽試験が、20/16℃(明/暗12時間ごと)の条件下で行なわれ、5日ごとに発芽数が数えられた。また、2000種子を2cmの深さに埋土し、それぞれ100～150種子を最初の1年間は1ヵ月ごとに、その後は6ヵ月ごとに4年にわたり掘り取り、前述と同条件下で発芽試験を行なった(5反復)。

イヌカキネガラシの取播き種子は、抵抗性生物型においても感受性生物型においても1%しか発芽せず、休眠状態にあった。1ヵ月後には、50～60%に発芽率が上昇し、2ヵ月後には80～84%に達した。抵抗性生物型と感受性生物型の発芽率に差異は認められ

なかった。

(2) 出芽試験；抵抗性生物型が優占する畑で、1992年に10個の5×3m区画を設置し、1区画の半分は4cmの深さに耕し、残り半分は耕起しない区を設けた。10個の20×50cmコドラートをそれぞれ設置し、5月から11月までの間、月に1度ずつ出芽数を調査した。調査後、出芽個体をすべてグリホサート処理により枯殺したので、1993年から1996年までの調査時に出芽した個体はすべて1992年以前に生産された種子に由来する。

浅耕によって埋土種子集団は、不耕起区と比較して急激に減少し、4年目には10個体/m²以下の出芽数になることが明らかになった³⁾。

5) イヌホタルイ (*Scirpus juncooides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama)

北海道と宮城県産のALS阻害剤抵抗性生物型8集団および北海道と秋田県産の感受性生物型6集団の発芽特性を比較した。おのおの隔離栽培された個体由来の種子を9月あるいは11月から5℃畑水分土壌条件で貯蔵し、翌年1月、2月および3月の実験に用いた。50粒、3反復で供試した。発芽条件は、15℃湛水土壌、30℃湛水土壌および15℃密栓水中である。いずれも明暗12時間条件とした。また、現地水田において、イヌホタルイの出芽状況を調査した。

抵抗性生物型の発芽は、感受性生物型と比較して速やかであった。また、水稻移植後早期に発生する個体の多くは抵抗性生物型であった⁹⁾。

6) ウマノチャヒキ (*Bromus tectorum* L.)

アメリカ・オレゴン州のナガハグサ (*Poa pratensis* L.) 種子採取畑で、ウマノチャヒキのALS阻害剤抵抗性生物型および感受性生物型の種子が採集され (採集された種子数に関する記述はない)、ガラスハウス内で抵抗性の有無が再確認された。両生物型各10個体がガラスハウス内で栽培され、種子が採取された。採取された種子は生物型ごとに室温で貯蔵された (貯蔵期間に関する記述はない)。

発芽試験時の温度・光条件は、5℃、15℃および25℃恒温・全日長に設定され、6時間おきに発芽の有無が調査された。実験は、それぞれ50種子の4反復を繰り返して行なわれた。

5℃区において、抵抗性生物型は感受性生物型より27時間早く発芽したが、15℃区および25℃区においては、両生物型間に差異が認められなかった¹¹⁾。

2. ALS阻害剤抵抗性生物型の種子中のバリン、イソロイシンおよびロイシン含量

1) ホウキギ (*Kochia scoparia* L.)

アメリカ・モンタナ州内の3カ所のALS阻害剤抵抗性ホウキギおよび2カ所の感受性ホウキギから種子が採集され、ガラスハウス内のそれぞれ別々の区画で栽培された。成熟種子が採取され、4℃で貯蔵された。

種子中のバリン、ロイシンおよびイソロイシン含量がHPLCによって、おのおの種子抽出物について2反復で解析され、抽出操作自体も繰り返された。

抵抗性系統の種子中のバリン、ロイシンおよびイソロイシンの濃度は、感受性系統の約2倍であった⁵⁾。

2) トゲチシャ (*Lactuca serriola* L.)

アメリカ・アイダホ州でALS阻害剤抵抗性生物型および感受性生物型の種子が採集され、ガラスハウス内で栽培された (個体数に関する記述はない)。

それぞれ50 mgの種子についてバリン、ロイシンおよびイソロイシン含量がHPLCによって解析された。

抵抗性生物型の種子におけるバリン、ロイシンおよびイソロイシンの濃度は、感受性生物型と比較して、それぞれ、70%、43%および9%高かった⁶⁾。

以上の報告から、いくつかの雑草のALS阻害剤抵抗性生物型の種子は、感受性生物型の種子よりも低温で早く発芽することが認められる。一般に、10℃以下の低温においては、貯蔵たんぱく質の異化が遅く、利用できる遊離アミノ酸量が少ない。抵抗性生物型の種子がより低温で発芽可能なのは、抵抗性生物型のALSにおいてフィードバック阻害が弱まり、その種子に細胞分裂と生長に関与する遊離アミノ酸 (バリン、ロイシンおよびイソロイシン) がより多く蓄えられているためであると推定されている^{6, 13, 15)}。

これらの抵抗性生物型がより低温で早く発芽することは、春先の耕起や除草剤散布あるいは霜によって抵抗性生物型の埋土種子量を減少させることにつながる可能性がある。また、抵抗性集団は、1個体あるいはごく少数の個体に起源した可能性が高いため、発芽特性における個体間変異が少なく、より均一であることが推定される。このことも防除効果を高めるであろう。

抵抗性生物型の競争力や適応度、本稿でとりあげた種子発芽特性に関する実験結果の解釈に関しては、

供試された抵抗性生物型と、対照として用いられた感受性生物型の由来（起源）や遺伝的背景について十分吟味する必要がある。

1) 由来（起源）；除草剤は、栽培体系が同じであると毎年同じ時期に散布される。例えば、播種前に耕起されるような栽培体系では、すでに発芽している個体は耕起時に除去される。耕起後に除草剤が散布されると、除草剤による選択圧は、耕起後に発芽した個体にかかり、結果として、耕起前に発芽した個体には、この選択圧は働かない。また、除草剤が早春に散布される立地では、その時期にすでに発芽している個体に選択圧が働き、発芽が遅く、その時期に発芽していない個体には、選択圧はかからない。その結果、発芽が早い集団において抵抗性が進化することになる。他方、対照として供試する感受性集団については、その集団が、研究対象とする抵抗性集団が抵抗性を獲得する前の集団を代表しているかどうか吟味する必要がある⁴⁾。

雑草の抵抗性生物型の競争力や適応度、種子発芽特性を解析するとき、対照とする感受性生物型には、抵抗性生物型と地理的に同じで（あるいは極めて近く）、同じような生育地で、過去に同じような栽培体系であった立地に由来することが求められる。

2) 遺伝的背景；理想としては、準同質遺伝子系統を用いるべきである^{7, 15)}。しかし、野生集団を扱う場合、これは現実的でない。

抵抗性を付与した塩基置換部位が異なると、交叉抵抗性の発現程度にも差が生ずる。また、抵抗性だけでなく他の機能においても差異が生じる可能性がある。抵抗性の機構が明らかになった生物型を用いると実験結果についての理解が深まるであろう。

3) 供試集団数；Thompson *et al.*¹⁵⁾ のホウキギ、Boutsalis & Powles³⁾ のイヌカキネガラシの研究では、抵抗性および感受性それぞれ1集団ずつが供試されている。野生集団に遺伝的変異が存在することは自明である。結果がまったく偶然によるものであることを排除するにはどれぐらいの集団数を用いるべきであろうか。Gill *et al.*⁷⁾ は、出芽率の差を5%の有意水準で検出するとすれば、抵抗性および感受性それぞれ少なくとも4集団が必要であると述べている。また、Cousens *et al.*⁴⁾ は、供試集団数は、評価する形質の変動係数や適応度の差異によるが、対象とする形質の変動係数が10%で、10%の適応度の差を5%の有意水準で検出するとすれば、それぞれ18集団が

必要であると算出している。

雑草の除草剤抵抗性生物型の耕種的防除への応用のために、今後より多くの除草剤抵抗性生物型の生活史特性が明らかにされ、それらのデータの蓄積が望まれる。

引用文献

- 1) Alcocer-Ruthling, M., D.C. Thill and B. Shafii 1992a. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* **6**, 303-309.
- 2) Alcocer-Ruthling, M., D.C. Thill and B. Shafii 1992b. Seed biology of sulfonylurea-resistant and -susceptible biotypes of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology* **6**, 858-864.
- 3) Boutsalis, P. and S.B. Powles 1998. Seedbank characteristics of herbicide-resistant and susceptible *Sisymbrium orientale*. *Weed Research* **39**, 389-395.
- 4) Cousens R.D., G.S. Gill and E. Jane Speijers 1997. Comment: Number of sample populations required to determine the effects of herbicide resistance on plant growth and fitness. *Weed Research* **37**, 1-4.
- 5) Dyer, W.E., P.W. Chee and P.K. Fay 1993. Rapid germination of sulfonylurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions is associated with elevated seed levels of branched chain amino acids. *Weed Science* **41**, 18-22.
- 6) Eberlein, C.V., M.J. Guttieri, C. A. Mallory-Smith, D. C. Thill and R. J. Baerg 1997 Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriole*). *Weed Science* **45**, 212-217.
- 7) Gill, G.S., R.D. Cousens and M. R. Allan 1996. Germination, growth, and development of herbicide resistant and susceptible populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* **44**, 252-256.
- 8) Heap, I. 2006. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Web page: www.weedscience.com, accessed on November 30, 2006.
- 9) 古原洋・内野彰・渡邊寛明 2001. スルホニルウレア系除草剤抵抗性イヌホタルイ (*Scirpus juncooides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama) の低温条件下での発芽. *雑草研究* **46**, 175-184.
- 10) Mapplebeck, L.R., V. Souza Machado and B. Grodzinski 1982. Seed germination and seedling growth characteristics of atarazine-susceptible and resistant biotypes of *Brassica campestris*. *Canadian Journal of Plant Science* **62**, 733-739.
- 11) Park, K.W., C.A. Mallory-Smith, D.A. Ball and G.W. Mueller-Warrant 2004. Ecological fitness of

- acetolactate synthase inhibitor-resistant and -susceptible downy brome (*Bromus tectorum*) biotypes. *Weed Science* **52**, 768-773.
- 12) Ryan, G.F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science* **18**, 614-616.
- 13) Tanaka, Y. 2003 Properties of acetolactate synthase from sulfonyleurea-resistant *Scirpus juncoides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama. *Pestic. Biochem. Physiol.* **77**, 147-153.
- 14) Tardif, Francois J., Irena Rajcan and Mihai Costea 2006. A mutation in the herbicide target site aceto-hydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytologist* **169**, 251-264.
- 15) Thompson, C.R., D.C. Thill and B. Shafii 1994. Germination characteristics of sulfonyleurea-resistant and -susceptible *Kochia* (*Kochia scoparia*). *Weed Science* **42**, 50-56.
- 16) 内川修・宮崎真行・田中浩平・大段秀記 2005. 福岡県における除草剤低感受性スズメノテッポウの発生と各種除草剤の効果. *雑草研究* **50**(別), 68-69.
- 17) Watanabe, H., T. Honma, K. Ito and M. Miyahara 1982. Paraquat resistance in *Erigeron philadelphicus* L. *Weed Research, Japan* **27**, 49-54.
- 18) Weever, Suzan E. and A. Gordon Thomas 1986. Germination responses to temperature of atrazine-resistant and -susceptible biotypes of two pigweed (*Amaranthus*) species. *Weed Science* **34**, 865-870.