

長野県松本市におけるヒルガオとコヒルガオの雑種（アイノコヒルガオ）の分布と非対称的な交雑

篠原義典^{★1}・市野隆雄^{2,3}

要約：ヒルガオとコヒルガオは、ともにヒルガオ科の多年生草本である。両種は、葉の形などの形態によって区別されるが、野外では中間的な形態を示す個体が多く観察されている。両種は、人工的に交配可能であり、送粉者も共通していることから、このような個体は両種の種間雑種（アイノコヒルガオ）と推定されている。本研究では、ヒルガオとコヒルガオの野外での交雑の実態を理解するため、長野県松本市の59地点においてサンプリングを行い、個体ごとに形態から雑種を判別した。その結果、59地点中29地点で、形態的に雑種と判別される個体が生育していることが明らかになった。次に、雑種と判別された個体について、核DNAの遺伝子型（ITS領域）と葉緑体DNAの遺伝子型（*rpl16*領域）を調べた。その結果、核DNAにおいて、雑種個体はヒルガオとコヒルガオの遺伝子型をヘテロで示した。一方葉緑体DNAにおいては、ほとんどの雑種個体がコヒルガオの遺伝子型を示した。このことから、ヒルガオとコヒルガオの間では、コヒルガオが胚珠親となる非対称な交雑が起こっている傾向が強いこと、雑種個体はほとんどF1で構成されていることがそれぞれ示唆された。

キーワード：種間雑種、一方向的な交雑、雑種判別、核DNA、葉緑体DNA

緒言

野外における被子植物の雑種形成は、他の分類群に比べ、より広く見られる現象である（Ellstrand *et al.* 1996）。そのため、分布域が接触し、同所的に両親種が存在する地域では、種間雑種が生み出される交雑帯が生じやすい。この交雑帯の構造と安定性は、両親種の遺伝的・生態的特性、交雑帯への分散能力、そして交雑帯で生じた雑種の適応度などに依存している（Barton and Hewitt 1981; Harrison 1993）。一般に、交雑帯は種間雑種が両親種に比べ適応度が低いこと、強化や遺伝子流動が起こることにより、消失しやすく、一時的なものになりやすい（Harrison 1986）。しかしながら、直接的な証拠はないが（Harrison 1986）、長期間にわたって安定的に維持さ

れてきた交雑帯も存在することが示唆されている（Graham *et al.* 1995）。

ヒルガオ属（*Calystegia*）における種間雑種は、人工的、並びに自然条件下で容易に形成されることが知られており、属内の多様化に大きく貢献してきたと考えられている（Brown *et al.* 2009）。ヒルガオ属に属するヒルガオ（*C. japonica* Choisy）とコヒルガオ（*C. hederacea* Wall）の間には、種間雑種であるアイノコヒルガオ（*C. japonica* × *C. hederacea*）が存在するといわれている（岩槻 2008）。本研究では、このアイノコヒルガオが上記2種の種間雑種であることを形態および分子遺伝学的に確認し、さらに種間雑種の方向性、および浸透交雑の有無を調べることによって、2種の雑種形成の実態を明らかにすることを目的とした。

両親種のヒルガオ、およびコヒルガオはともに本州から九州に分布する在来種であり、ともに道端や草地、野原の日当たりのよい場所に生育している（村田 1981, 岩槻 2008）。両種はともに自家不和合性を持ち、野外では周囲のクローン個体から自家花粉を主に受け取っている。そのため、ほとんど種子を結実できず、各々の集団は根茎による栄養繁殖によって維持されていると考えられている（Ushimaru and Kikuzawa 1999）。しかしながら、ともにピンク色の漏斗状の花をつけ、送粉者としてコハナバチ科（Halictidae）やハキリバチ科（Megachilidae）を利用することで（Ushimaru and Kikuzawa 1999）、他個体からの花粉を受け取り、種子繁殖も行っている。

両種の核相は、 $2n=22$ と等しく（清水 1997）、人工的に交雑させることが可能である（Ushimaru and Kikuzawa 1999）。野外においては両親種の間中間的な形質を示す個体がしばしば観察されており（Ito *et al.* 2005）、両親種の花期は重なっていること、送粉者も共通していることから、これらの中中間的な形質を示す個体は種間雑種であるアイノコヒルガオであると考えられている（岩槻 2008）。しかしながら、雑種が両親種の間中間的な形質を示すとは限らないこと（Rieseberg *et al.* 1993）やF2や戻し交雑の可能性を考慮すると、形態による判別だけからでは、雑種の存在状況を把握するのは困難である。実際に、人工的に作られたF1個体は、種子の稔性を持っていた（Ushimaru and Kikuzawa 1999）ことから、野外においてF2や戻し交雑が生じている可能性が高い。そのため、ヒルガオとコヒルガオの野外での交雑の実態を把握するためには、分子遺伝学的手法による両親種と雑種個体の判別が不可欠である。核DNAは両親種からともに遺伝するが、葉緑体DNA

1 信州大学総合理工学研究科理学専攻
〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

★ maxgiten@yahoo.co.jp

2 信州大学理学部理学科生物学コース

3 信州大学山岳科学研究所

(2017年3月22日受付, 2017年12月11日受理)

は母親からのみ遺伝する。そのため、雑種はそれぞれ異なる両親種由来の核 DNA と葉緑体 DNA を保持している可能性がある。この不一致を検出することによって、野外において浸透交雑の有無や、遺伝子流動の方向性を明らかにすることができる (Hardig *et al.* 2000; Minder *et al.* 2007; Wallace *et al.* 2011)。そこで本研究では、核 DNA と葉緑体 DNA の解析を行うことで雑種の判別を行った。

材料および方法

サンプリング

長野県松本市において、2016年6月1日から9月27日までの間に計59地点より、それぞれ1~14シュートをサンプリングした(第1表, 第1図)。ヒルガオ、およびコヒルガオは栄養繁殖を行うため、隣接するシュートはクローンである可能性が高い。そのため、サンプリングは、最低2m離れたシュートから行った。1シュートにつき花1個と葉3枚をそれぞれの集団から採取し、形態判別を行った。

形態判別

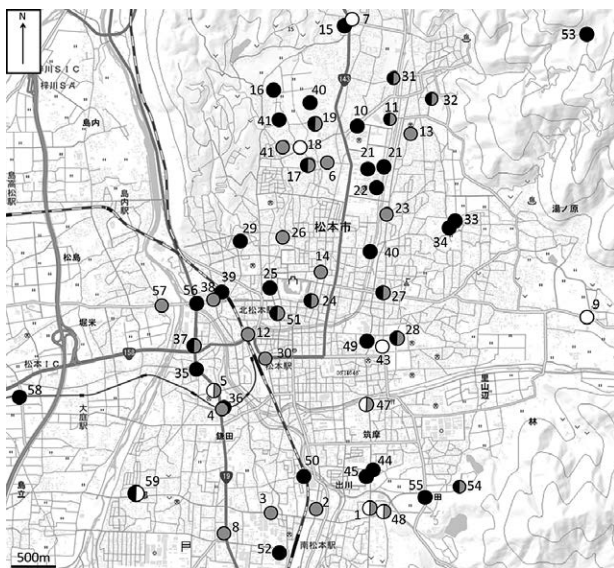
ヒルガオとコヒルガオは、形態的に花冠直径、葉の形態、苞葉の形態、花柄の翼の有無という4形質より、区別される(清水 1997; Ushimaru and Kikuzawa 1999; 林ら 2009)。本研究では、ヒルガオ、コヒルガオの形態的差異をそれぞれの形質について第2表のように定義した(清水 1997; Ushimaru and Kikuzawa 1999; 林ら 2009)。種間雑種の形態は、それぞれ両

親種の中間的な形質とし、第2表のように著者らが定義した。そして、上記の4形質それぞれについて0(ヒルガオの形態)、0.5(雑種の形態)、1(コヒルガオの形態)の点数をつけ、形態によってヒルガオ、コヒルガオ、および雑種の判別を行った。花冠直径は、各シュート(個体)よりランダムに採取した花1個について、デジタルノギス(エー・アンド・デイ製)により測定した。葉の形態は各シュート(個体)より3枚採取した葉について、スキャナ(CanoScan Lide 210)で取り込んで判別し、その平均値をシュート(個体)の点数として用いた。苞葉の形態、花柄の翼の有無については、目視によりそれぞれ判別し、苞葉は各シュート(個体)2枚の観察、花柄の翼の有無は各シュート(個体)1本の花柄の観察によった。

すべての測定形質の点数はシュート(個体)ごとに合計し、形態指数(morphological index)として扱った(第2表)。この値は、ヒルガオの形態において最低値(0)を、コヒルガオの形態において最高値(4)を示す。この値が0以上1以下のときヒルガオ、1を超え3未満のとき種間雑種、3以上のときコヒルガオとしてそれぞれの個体の形態判別を行った。本研究では、この形態判別を個体の第一義の同定結果とする。

遺伝解析

ヒルガオ、コヒルガオは根茎で栄養繁殖するため(Ushimaru and Kikuzawa 1999)、集団は少数個体のクローンから成り立っている可能性が高い。そのため、遺伝解析はそれぞれの集団において、形態判別によってヒルガオ、雑種、コヒルガオとそれぞれ判別されたシュート(個体)から1シュートずつを代表させて行った。DNAの抽出は、形態判別の際に採取した花を -30°C で冷凍保存したものをを用い、CTAB法(Stewart and Via 1993)により行った。得られたDNAを鋳型として核DNAのITS領域(390 bp)と、葉緑体DNAの*rpl16*領域(650 bp)を増幅した。プライマーは、ITS領域ではITS5(5' GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G 3')とITS4(5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT CC 3')(White *et al.* 1990)を、*rpl16*領域ではCaly2F(5' TGT GGA TAA ACG GAA GGA GGA G 3')とCaly2R(5' CAG AAC CGG ACG TGA GAG TT 3')(著者らが作成)をそれぞれ用いた。PCRの反応温度は、(98 $^{\circ}\text{C}$, 1分) \times 1サイクル、(98 $^{\circ}\text{C}$, 10秒; 「アニーリング温度」, 30秒; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1分) \times 30サイクルである。「アニーリング温度」は、ITSプライマーでは55 $^{\circ}\text{C}$ 、*rpl16*プライマーでは60 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。PCR産物は、Exo-Star(GEヘルスケア・ジャパン製)を用い精製した。そして、BigDye Terminator Ver. 1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)とModel 3130 automated sequencer(Applied Biosystems)を用いてdirect sequencing法により、精製したPCR産物からそれぞれの塩基配列を決定した。そして、形態判別の結果と合わせヒルガオ型、コヒルガオ型、雑種型の



第1図 調査サイトの位置

形態判別によってヒルガオと判別された個体が生育する集団●, 種間雑種と判別された個体が生育する集団■, コヒルガオと判別された個体が生育する集団○, をそれぞれ表す。単円で表される単独生育地は43地点、半円で色分けされている混生生育地は16地点、それぞれ見つかった。なお、サイト番号は第1表と対応する。

第1表 各調査サイトにおけるヒルガオ属植物の形態（個体数）・核 DNA・葉緑体 DNA による種判別の結果。J はヒルガオ，H はコヒルガオ，J × H は種間雑種を表す。核 DNA，葉緑体 DNA による種判別は各調査サイトから形態判別でヒルガオ，雑種，コヒルガオとそれぞれ判別された個体からそれぞれ1個体ずつランダムに選抜して行った。

サイト No.	北緯	東経	サンプル採取年月日	形態判別	核 DNA	葉緑体 DNA
1	36°12'53"	137°58'47"	2016/6/1	H (1), J × H (3)	J × H	H
2	36°12'53"	137°58'21"	2016/6/1	J × H (6)	J × H	H
3	36°12'51"	137°57'59"	2016/6/1	J × H (2)	J × H	J
4	36°13'32"	137°57'35"	2016/6/1	J × H (3)	J × H	H
5	36°13'39"	137°57'32"	2016/6/1	H (2), J × H (3)	H, J × H	H
6	36°15'07"	137°58'26"	2016/6/2	J × H (7)	J × H	H
7	36°16'02"	137°58'37"	2016/6/3	H (1)	H	H
8	36°12'43"	137°57'37"	2016/6/3	J × H (2)	J × H	H
9	36°14'06"	138°00'31"	2016/6/7	H (3)	H	H
10	36°15'22"	137°58'41"	2016/6/14	J (7)	J	J
11	36°15'24"	137°58'57"	2016/6/14	J (3), J × H (3)	J, J × H	J
12	36°14'01"	137°57'48"	2016/6/14	J × H (5)	J × H	H
13	36°15'18"	137°59'06"	2016/6/14	J × H (4)	J	J
14	36°14'25"	137°58'23"	2016/6/14	J × H (1)	J × H	J
15	36°16'02"	137°58'36"	2016/6/17	J (7)	J	J
16	36°15'36"	137°58'00"	2016/6/17	J (3)	J	J
17	36°15'07"	137°58'18"	2016/6/17	J (5), J × H (2)	J	J
18	36°15'13"	137°58'14"	2016/6/17	H (3)	H	H
19	36°15'23"	137°58'21"	2016/6/17	J (2), J × H (2)	J × H	H
20	36°15'06"	137°58'53"	2016/6/21	J (1)	J	J
21	36°15'05"	137°58'46"	2016/6/21	J (4)	J	J
22	36°14'58"	137°58'50"	2016/6/21	J (8)	J	J
23	36°14'48"	137°58'55"	2016/6/21	J × H (2)	J × H	H
24	36°14'14"	137°58'19"	2016/6/21	J (2), J × H (4)	J, J × H	J, H
25	36°14'19"	137°57'59"	2016/6/21	J (3)	J	J
26	36°14'38"	137°58'05"	2016/6/21	J × H (4)	J × H	H
27	36°14'17"	137°58'54"	2016/6/27	J (5), J × H (1)	J	J
28	36°14'00"	137°59'00"	2016/6/27	J (3), J × H (11)	J, J × H	H
29	36°14'37"	137°57'45"	2016/6/30	J (2)	J	J
30	36°13'51"	137°57'57"	2016/6/30	J × H (2)	J × H	H
31	36°15'41"	137°58'58"	2016/7/1	J (1), J × H (1)	J × H	H
32	36°15'33"	137°59'17"	2016/7/1	J (3), J × H (1)	J × H	H
33	36°14'45"	137°59'27"	2016/7/1	J (1)	J	J
34	36°14'43"	137°59'25"	2016/7/1	J (4)	J	J
35	36°13'47"	137°57'24"	2016/7/5	J (5)	J	J
36	36°13'32"	137°57'35"	2016/7/5	J (2)	J	J
37	36°13'57"	137°57'23"	2016/7/5	J (2), J × H (2)	J, J × H	J, H
38	36°14'14"	137°57'32"	2016/7/5	J × H (1)	J × H	J
39	36°14'17"	137°57'36"	2016/7/5	J (2)	J	J
40	36°15'31"	137°58'18"	2016/7/8	J (2)	J	J
41	36°15'24"	137°58'03"	2016/7/8	J (8)	J	J
42	36°15'14"	137°58'05"	2016/7/8	J × H (1)	J × H	H
43	36°13'56"	137°58'53"	2016/7/27	H (1)	J × H	H
44	36°13'08"	137°58'47"	2016/7/27	J (1)	J	J
45	36°13'05"	137°58'46"	2016/7/27	J (2)	J	J
46	36°14'33"	137°58'48"	2016/7/27	J (5)	J	J
47	36°13'34"	137°58'45"	2016/7/27	H (1), J × H (1)	J × H	J
48	36°12'52"	137°58'54"	2016/8/26	H (1), J × H (3)	J × H	H
49	36°13'58"	137°58'46"	2016/8/26	J (2)	J	J
50	36°13'05"	137°58'16"	2016/9/12	J (2)	J	J
51	36°14'09"	137°58'03"	2016/9/12	J (1), J × H (3)	J	J
52	36°12'38"	137°58'07"	2016/9/12	J (4)	J	J
53	36°15'58"	138°00'31"	2016/9/12	J (3)	J	J
54	36°13'01"	137°59'30"	2016/9/15	J (2), J × H (3)	J, J × H	J
55	36°12'57"	137°59'13"	2016/9/15	J (1)	J	J
56	36°14'14"	137°57'24"	2016/9/27	J (3)	J	J
57	36°14'12"	137°57'07"	2016/9/27	J × H (1)	J × H	H
58	36°13'37"	137°55'59"	2016/9/27	J (1)	J	J
59	36°12'58"	137°56'54"	2016/9/27	J (2), H (2)	J, H	J, H

第2表 ヒルガオ, コヒルガオ, 種間雑種の形態的差異。両親種の形態について, 花冠直径は, Ushimaru and Kikuzawa (1999) と林ら (2009) を参考にし判別基準を設けた。両親種のその他の形態は, 清水 (1997) を参考にし, 判別基準を設けた。雑種の形態は, 両親種の間隔的な形質をそれぞれ雑種の判別基準とした。そして, それぞれの形態について 0 (ヒルガオの形態), 0.5 (雑種の形態), 1 (コヒルガオの形態) の点数をつけ, 4 形態の合計点数を形態指数とした。0~1 をヒルガオ, 1~3 を種間雑種, 3~をコヒルガオとして判別した。

着目形質	ヒルガオ	種間雑種	コヒルガオ
花冠直径	5.0-6.0 cm	4.0-5.0 cm	3.0-4.0 cm
葉形態	側裂片の頂点をつなぐ直線が葉身を通らない	側裂片の頂点をつなぐ直線が一部葉身を通る	側裂片の頂点をつなぐ直線がすべて葉身を通る
苞葉の形態	先端が完全に鈍頭	先端が不完全に鈍頭 (鋭頭) (丸みを帯びるが先端はとがる)	先端が完全に鋭頭
花柄の翼	翼は全く見られない	稜は見られるが, 翼は低く縮れていない。	縮れた翼がみられる

遺伝子型をそれぞれ決定し, 各シュート (個体) の遺伝子型を判定した。

本研究で解析した核 DNA は, *Calystegia silvatica* の ITS 領域 (EU812831) の 60 番目から 449 番目に対応し, 葉緑体 DNA は *Argyria nervosa* (KF242477) の 83900 番目から 84549 番目に対応している。

統計解析

雑種形成の方向性を明らかにするために, 核 DNA により雑種と判別された個体について, 保有する葉緑体 DNA の遺伝子型に偏りがあるかどうかを, 二項検定により検証した。統計ソフトは R version 3.1.1 (R Core Team 2014) を用いた。

結 果

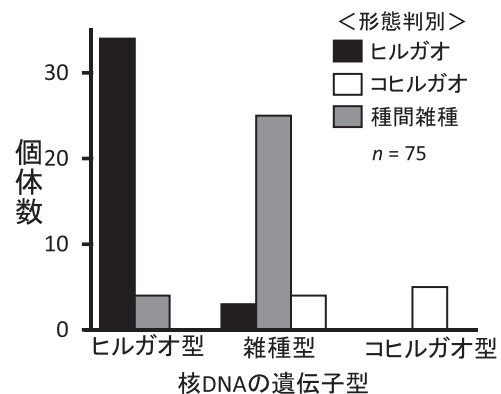
形態判別

形態判別の結果, ヒルガオと判別された個体が 37 集団, コヒルガオと判別された個体が 9 集団, 種間雑種と判別された個体が 29 集団に生育していた (第 1 図)。59 集団のうち, 43 集団で両親種, もしくは雑種が単独で生育しており, 残り 16 集団で両親種同士, もしくは雑種との混生が見られた (第 1 表)。混生地において, ヒルガオと種間雑種が混生していた集団が最も多かった (11 集団)。コヒルガオと種間雑種が混生していた集団は 4 集団であった。一方で, 両親種同士が混在していた集団は最も少なく, 1 集団でしか発見できなかった。

遺伝解析

形態的にヒルガオ, コヒルガオ, および雑種と判別された個体の中から, 集団内に生育していたものについて, それぞれ 1 個体ずつ選出し, 遺伝子解析を行った。その結果, 計 75 個体 (形態判別による分類: ヒルガオ: 37 個体, コヒルガオ: 9 個体, 種間雑種: 29 個体) が解析対象となった。

核 DNA の ITS 領域を解析した結果, 形態によりヒルガオ, およびコヒルガオと判別された個体の多くは, 502 番目の



第2図 核 DNA による種判別 (横軸) と形態判別 (凡例) の関係。例えば左端の棒チャートは, 核 DNA でヒルガオ型と判別されたもののうち, 形態判別でもヒルガオと判別されたものが, 34 個体, 種間雑種と判別された個体が 4 個体であったことを示している。

1 塩基に変異が生じていた (第 2 図, 第 3 表)。さらに種間雑種と判別されたほとんどの個体は, ヒルガオとコヒルガオの配列をヘテロで共有していた (第 2 図, 第 3 表)。したがって, 少なくとも F1 雑種については ITS 領域によって, 判別することができた。ここで, 第 3 表のようにそれぞれの配列をヒルガオ型, 雑種型, コヒルガオ型と本研究では定義した。

しかし, 形態による判別と核 DNA の遺伝子型が一致しない個体も観察された (第 2 図, 第 3 表)。形態でヒルガオと判別された個体では, 3 個体 (サイト 19, 31, 32) が, 形態でコヒルガオと判別された個体では, 4 個体 (サイト 1, 43, 47, 48) が雑種型の核 DNA 配列を示した。一方, 形態で雑種と判別された個体のうち, 5 個体 (サイト 13, 17, 27, 38, 51) がヒルガオ型の核 DNA 配列を示した。

葉緑体 DNA の *rpl16* 領域を解析した結果, 解析した 650 bp 中 2 塩基に変異が生じており (第 4 表), 核 DNA の遺伝子型がヒルガオ型の個体とコヒルガオ型の個体との間では, 葉

第3表 核DNA(ITS領域:390 bp)におけるヒルガオ属2種間の塩基置換。変異サイトNo.は*Calystegia silvatica*(EU812831)の配列を参照した。ヒルガオとコヒルガオの間では502番目のサイトで塩基置換が生じており、種間雑種においては、それぞれの塩基をヘテロで共有していた。遺伝子型を決定する502番目の塩基置換は、ヒルガオ：黒、雑種：灰色、コヒルガオ：白の塗りつぶしでそれぞれ表している。

変異サイト No.	315	502	518	Accession No.
ヒルガオ型	A	G	T	LC225749
	A	G	Y	LC225750
	R	G	T	LC225751
雑種型	A	R	T	LC227678
	R	R	Y	LC227679
コヒルガオ型	A	A	T	LC225748

R: G or A, Y: T or C

第4表 葉緑体DNA (rpl16 領域: 650 bp) におけるヒルガオ属2種間の塩基置換。変異サイトNo.は*Argyria nervosa*(KF242477)の配列を参照した。ヒルガオとコヒルガオの間では83957と84532番目のサイトで塩基置換が生じていた。遺伝子型を決定するそれぞれの塩基置換は、ヒルガオ：黒、コヒルガオ：白の塗りつぶしでそれぞれ表している。

変異サイト No.	83957	84532	Accession No.
ヒルガオ HaplotypeI	A	T	LC227680
コヒルガオ HaplotypeI	C	C	LC227681

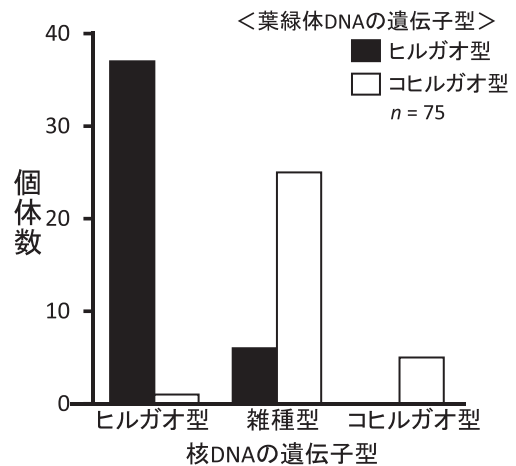
緑体DNAにおいてもほぼすべての個体で異なる遺伝子型を示した(第3図)。一方で、核、葉緑体の遺伝子型が一致しない個体は、ヒルガオにおいて1個体(サイト28)、コヒルガオにおいては観察されなかった。また、核DNAの遺伝子型が雑種型の個体では、葉緑体DNAの遺伝子型としてヒルガオ型とコヒルガオ型の両方が観察されたが、コヒルガオ型を示す個体の方が多かった(第3図, 両側検定: $P=0.0005$)。よって、雑種個体は、コヒルガオが胚珠親になるケースが多いことが分かった。

考 察

ヒルガオとコヒルガオの非対称的な交雑

長野県松本市において、形態的にヒルガオとコヒルガオの中間的な形質を示す個体が多く(29/59 集団)生育していた(第1表)。さらに、中間的な形態を示したほとんどの個体は、ヒルガオ型とコヒルガオ型の核DNAをヘテロで持っていた(第1表, 第1図)。これらのことから、ヒルガオとコヒルガオの種間雑種(アイノコヒルガオ)は、野外において多数生育していることが明らかになった。これらの雑種個体は、高い割合でコヒルガオ型の葉緑体DNAを持っていた(第1表, 第3図)。したがって、野外で生じた種間雑種は、コヒルガオがヒルガオの花粉を受け取ることによって生じていることが明らかになった。

野外において、上記のような種間雑種が生じた背景には、
1) 同所的に存在する2種間で非対称的な交雑が起きている、



第3図 核DNAによる種判別(横軸)と葉緑体DNAによる種判別(凡例)の関係

例えば左端の棒チャートは、核DNAでヒルガオ型であった38個体のうち、葉緑体DNAでは37個体がヒルガオ型、1個体が雑種型であったことを示している。

2) 他集団から他種花粉が混入することにより、元々占有していた種が雑種へ置き換わるという2つの可能性が考えられる。このうち2)の仮説では、2種間でサイト間の花粉の移動が必要である。しかし、Ushimaru and Kikuzawa (1999)では、ハマヒルガオ(ヒルガオ属の自家不和合性を持つ種)の結実率が隣接するサイト間でも大きく異なっていたことから、ヒ

ルガオ属では、サイト間の送粉者の移動は少なく、結実率はパッチ内のクローンの構成に左右されると考察している。したがって、本研究で観察された種間雑種は、2) 他集団から他種花粉が混入して生じたというよりも、1) 同所的に存在する2種類の非対称的な交雑によって生じた可能性が高いと考えられる。ここでは、ヒルガオとコヒルガオ間の非対称的な交雑がどのような要因によって生じているかを考察する。

雑種形成の方向性は、集団・地域内のそれぞれの両親種の頻度によって大きく左右される (Nason *et al.* 1992; Carney *et al.* 2000; Burgess *et al.* 2005)。例えば、Nason *et al.* (1992) はアヤメ属 *Iris* の交雑集団において、*Iris hexagona* から *I. fulva* への遺伝子流動が、*I. hexagona* の頻度増加につれて増えていくことを示している。本研究を行った長野県松本市でも、高頻度で分布した (37/59 集団) ヒルガオから低頻度で分布した (9/59 集団) コヒルガオへの遺伝子流動が起こっていた (第1表)。そのため、両親種であるヒルガオとコヒルガオの相対的な頻度に依存して雑種形成の方向性が決まっている可能性が高い。しかし、本研究では、ヒルガオが優占する1地域 (長野県松本市) でしか雑種形成の方向性が分かっていない。そのため、今後コヒルガオが優占する地域においても、同様に雑種形成の方向性について調べる必要があるだろう。

また、雑種形成の方向性は、それぞれの両親種の花形質の違いが関与している事例も知られている (Gore *et al.* 1990; Field *et al.* 2010)。例えば、*Eucalyptus* 属は、両親種の花サイズによって、雑種形成の方向性が左右され、花サイズの大きい種から小さい種への遺伝子流動が観察されている (Gore *et al.* 1990; Field *et al.* 2010)。これは、両親種のうち花サイズの小さい種の花管が、花サイズの大きい種の胚珠へ届かないため、花サイズの小さい種から大きい種への交雑が制限されているからであると考えられている (Gore *et al.* 1990)。ヒルガオとコヒルガオの間でも、花サイズが前者の方が大きいなど多くの花形質が異なっている (Ushimaru and Kikuzawa 1999)。さらに、人工授粉実験より、ヒルガオが花粉親、コヒルガオが胚珠親の組み合わせで交雑する方が、結果率が高くなることが分かっている (Ushimaru and Kikuzawa 1999)。これらのことから、ヒルガオとコヒルガオ間においても、花形質の違いが生み出す非対称な隔離機構が、非対称的な交雑を生み出す一つの要因になっているかもしれない。したがって、今後、ヒルガオとコヒルガオの非対称的な交雑の要因を探索するために、花形質の違いによって非対称的な隔離がもたらされているかどうかを検証することも重要だろう。

野外でのヒルガオとコヒルガオの共存維持機構

送粉者を共有する近縁種同士が共存することはまれであり、その多くは分布などを違えて生育している (高倉ら 2010)。その原因は、同所的に送粉者を共有することによって、送粉者を巡る競争 (菊沢 1995) や他種花粉による繁殖

干渉 (高倉ら 2010) が引き起こされ、一方の種が他方の種を駆逐してしまうからであると考えられている。ヒルガオとコヒルガオは、送粉者を共有し、ともに本州~九州に分布しているが (村田 1981; Ushimaru and Kikuzawa 1999)、2種は頻繁に雑種形成を行い、少なくとも長野県松本市においてはコヒルガオがヒルガオの花粉を受け取ることによって主に雑種が形成されていた。両親種において核と葉緑体 DNA の遺伝子型がほとんどの個体で一致していた (第3図) ことから、ヒルガオとコヒルガオの間には浸透交雑が起こっておらず、ほとんどの雑種が F1 雑種で構成されている可能性が高い。したがって、長野県松本市に生育するコヒルガオは、ヒルガオの花粉を受け取ることによって、徐々に子孫を残せない種間雑種へと置き換わってしまい、最終的には2種の交雑帯が消失してしまうと予想される。しかし、本研究ではコヒルガオも低頻度ではあるが維持されていた。

一般に、同所的に分布する雑種の両親種では、ハビタット選好性などの生態的特性が異なることで、種間交雑が制限されていることが知られている。(Richard *et al.* 1999; Cavender-Bares and Pahlisch 2009)。例えば、北部トルコで交雑帯を形成する4種のツジ属 *Rhododendron* は、それぞれの種が異なるハビタット選好性を持ち、分布標高を違えている (Milne *et al.* 1999)。また、フロリダからアメリカ南部に同所的に分布する *Quercus virginiana* と *Q. geminata* においては、ハビタットの選好性が異なるだけでなく、2種間で花期にずれが生じている (Cavender-Bares and Pahlisch 2009)。ヒルガオとコヒルガオにおいても、根茎の季節的動態、特に根茎の越冬様式という生態的特性が大きく異なっていることが示されている (Ito *et al.* 2005)。この根茎の性質の違いは、それぞれの耐寒性と大きく関わりとされている (Warwick *et al.* 1986)。そのため、ヒルガオとコヒルガオは、潜在的には異なるハビタット選好性を持っていると予想される。よって、ヒルガオがコヒルガオを駆逐する相互作用が働いていたとしても、異なるハビタットを占有することにより、交雑が制限されることで両親種が維持されているのかもしれない。

今後の展望

本研究では、形態、および核と葉緑体 DNA に基づき、ヒルガオ、コヒルガオ間の雑種の判別を行った。その結果、野外において雑種個体は頻繁に観察された。そして、その多くがコヒルガオを胚珠親としていることから、ヒルガオとコヒルガオ間では非対称的な交雑が起こっていることが示唆された。

しかし、本研究で行った雑種の判別方法には限界がある。形態による種判別においては、それぞれ4つの同定形質に基準を設けたが、科学的データに基づく基準ではない。さらに、1個体当たりのサンプリング数が少なく、個体内の変異について評価が不十分でもある。そのため、形態による判別が

正確に行えていない可能性があり、本研究において、一部の個体で形態と核 DNA による判別が一致しない問題が生じた(第2図)。また、DNA による判別においては、本研究では核、葉緑体ともに1領域しか扱っていない。そのため、今回得られたデータから雑種間での交雑や両親種との戻し交雑を完全に否定することできない。実際に、形態は両親種に近いが雑種型の核 DNA を持つ、戻し交配の結果生じたと考えられる個体も観察されている(第2図)。さらに、Ushimaru and Kikuzawa (1999) では、F1 個体は種子の稔性を持っていることが示しており、雑種崩壊のメカニズムも明らかになっていない。

そこで、今後よりヒルガオ、コヒルガオ間の雑種形成の実態を理解するには、より厳格な基準を設けた形態判別(量的形質を含む科学的データに基づく形態判別)と複数領域およびより鋭敏なマーカー(AFLPやマイクロサテライト)を用いた遺伝子解析が必要となってくるだろう。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、信州大学理学部理学科生物学コースの田路翼氏にはサンプルを提供して頂いた。ここに記して感謝の意を表す。本研究は科学研究費補助金(15H02641)より助成を受けたものである。

引用文献

- Barton, N.H. and G.M. Hewitt 1981. Hybrid zones and speciation. In "Evolution and Speciation" ed. by W.A. Atchley and D.S. Woodruff, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 109–145.
- Brown, J.M., R.K. Brummitt, M. Spencer and M.A. Carine 2009. Disentangling the bindweeds: hybridization and taxonomic diversity in British *Calystegia* (Convolvulaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 160, 388–401.
- Burgess, K.S., M. Morgan, L. Deverno and B.C. Husband 2005. Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance. *Mol. Ecol.* 14, 3471–3483.
- Carney, S.E., K.E. Gardner and L.H. Rieseberg 2000. Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution* 54, 462–474.
- Cavender-Bares, J. and A. Pahlisch 2009. Molecular, morphological, and ecological niche differentiation of sympatric sister oak species, *Quercus virginiana* and *Q. geminata* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 96, 1690–1702.
- Ellstrand, N.C., R. Whitkus and L.H. Rieseberg 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5090–5093.
- Field, D.L., D.J. Ayre, R.J. Whelan and A.G. Young 2010. Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*. *Heredity* 106, 841–853.
- Gore, P.L., B.M. Potts, P.W. Volker and J. Megalos 1990. Unilateral cross-incompatibility in *Eucalyptus*: the case of hybridization between *E. globulus* and *E. nitens*. *Aust. J. Bot.* 38, 383–394.
- Graham, J.H., D.C. Freeman and E.D. McArthur 1995. Narrow hybrid zone between two subspecies of big sagebrush (*Artemisia tridentata*: Asteraceae). II. Selection gradients and hybrid fitness. *Am. J. Bot.* 82, 709–716.
- Hardig, T.M., S.J. Brunsfeld, R.S. Fritz, M. Morgan and C.M. Orians 2000. Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Mol. Ecol.* 9, 9–24.
- Harrison, R.G. 1986. Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity* 56, 337–349.
- Harrison, R.G. 1993. Hybrid zone pattern and process. In "Hybrid zones and the evolutionary process" ed. by R.G. Harrison, Oxford University Press, Oxford, pp. 3–12.
- 林弥栄・畔上能力・菱山忠三郎・西田尚道 2009. 「山溪ハンディ図鑑1 野に咲く花」. 山と溪谷社, 東京, pp. 182.
- Ito, M., K. Takagi and M. Yoshino 2005. Rhizome dynamics in *Calystegia japonica* Choisy and *Calystegia hederacea* Wall. in relation to overwintering. *Weed Biol. Manag.* 5, 137–142.
- 岩槻秀明 2008. 「街でよく見かける雑草や野草がよーくわかる本」. 秀和システム, 東京, pp. 288–291.
- 菊沢喜八郎 1995. 「植物の繁殖生態学」. 蒼樹書房, 東京, pp. 53–58.
- Milne, R.I., R.J. Abbott, K. Wolff and D.F. Chamberlain 1999. Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence. *Am. J. Bot.* 86, 1776–1785.
- Minder, A.M., C. Rothenbuehler and A. Widmer 2007. Genetic structure of hybrid zones between *Silene latifolia* and *Silene dioica* (Caryophyllaceae): evidence for introgressive hybridization. *Mol. Ecol.* 16, 2504–2516.
- 村田源 1981. ヒルガオ科. 佐竹義輔・大井次三郎・北村四郎・亘理俊次・富成忠夫編著「日本の野生植物 草本 III 合弁花類」. 平凡社, 東京, pp. 57–62.
- Nason, J.D., N.C. Ellstrand and M.L. Arnold 1992. Patterns of hybridization and introgression in populations of oaks, manzanitas, and irises. *Am. J. Bot.* 79, 101–111.
- R Core Team 2014. R (version 3.1.1.): The R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/> (2017年8月1日アクセス確認)
- Rieseberg, L.H., N.C. Ellstrand and M. Arnold 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 12, 213–241.
- 高倉耕一・西田佐知子・西田隆義 2010. 植物における繁殖干渉とその生態・生物地理に与える影響. *日本植物分類会誌* 10, 151–162.
- 清水建美 1997. 「長野県植物誌」. 信濃毎日新聞社, 長野, pp. 907–909.
- Stewart Jr, C.N. and L.E. Via 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14, 748–750.
- Ushimaru, A. and K. Kikuzawa 1999. Variation of breeding system, floral rewards, and reproductive success in clonal *Calystegia* species (Convolvulaceae). *Am. J. Bot.* 86, 436–446.
- Wallace, L.E., T.M. Culley, S.G. Weller, A.K. Sakai, A. Kuenzi, T. Roy, W.L. Wagner and M. Nepokroeff 2011. Asymmetrical gene flow in a hybrid zone of Hawaiian *Schiedea* (Caryophyllaceae) species with contrasting mating systems. *PLoS One* 6, e24845.
- Warwick, S.I., D. Phillips and C. Andrews 1986. Rhizome depth: the critical factor in winter survival of *Sorghum halepense* (L.) Pers. (Johnson grass). *Weed Res.* 26, 381–388.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lees and J. Taylor 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR protocols: a guide to methods and applications" ed. by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, Academic Press, New York, pp. 315–322.

**Asymmetric hybridization between
Calystegia japonica Choisy and
C. hederacea Wall in Matsumoto,
Nagano, central Japan**

Yoshinori Shinohara^{★1} and Takao Itino^{2,3}

Summary

Calystegia japonica (Convolvulaceae) and *C. hederacea* are perennial herbs. They are distinguished by morphological traits, such as leaf shape, but individuals which have intermediated morphological traits are often observed in the wild. These individuals

1 Graduate School of Science and Technology, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan

★ maxgiten@yahoo.co.jp

2 Department of Biology, Faculty of Science, Shinshu University

3 Institute of Mountain Science, Shinshu University

are supposed to be interspecific hybrids (*C. japonica* × *C. hederacea*), because they can be crossed by artificial pollination, and have common pollinators in the wild. Here, to understand hybridization between *C. japonica* and *C. hederacea* in the wild, we conducted sampling at 59 sites in Matsumoto, Nagano, Japan, and distinguished hybrids by morphological traits. As a result, hybrids distinguished by morphology are observed at 29 sites of 59 sites. Moreover, we investigated sequences of nuclear DNA (ITS region) and chloroplast DNA (*rpl16* region), and found that *C. japonica* and *C. hederacea* have different sequences, the nuclear DNA type coincides with chloroplast DNA types, and most of hybrids determined by nuclear DNA contained chloroplast DNA of *C. hederacea*. These results suggest that asymmetric hybridization, in which *C. hederacea* tend to be mother, occur between *C. japonica* and *C. hederacea* and most of the hybrids are composed of F1 hybrids.

Keywords: inter-specific hybridization, directed hybridization, distinction of hybrids, nuclear DNA, chloroplast DNA