

長野県飯島町周辺に生育するクヌギとアベマキの葉裏の 星状毛密度と浸透性交雑

齊藤陽子・井出雄二

Introgressive hybridization and density of stellate hairs on the abaxial surface of leaves of *Quercus acutissima* and *Quercus variabilis*, around Iijima Town, Nagano Prefecture

Yoko SAITO, Yuji IDE

1. はじめに

種間交雑とは、異なる種に属する個体間の交配であり、植物種ではしばしば見られる現象である (MALLEY, 2005)。種間交雑に関する研究は、種の起源や進化、種間の系統関係などの解明と関連する (ANDERSON, 1949; ARNOLD, 1992; TWYFORD and ENNOS, 2012)。また、浸透性交雑とは、継続的な種間交雑と戻し交雑の繰り返しの伴い、一方の種の遺伝子が他方の種へ徐々に浸透していくことである (ANDERSON and HUBRICHT, 1938)。浸透性交雑を行う種間では、上記のように交雑個体が繰り返し戻し交雑を行うことにより、核 DNA からみると親種に限りなく近い個体が生産され、形態的にも親種と区別がつかなくなる。そのため、すでに片方の種が占めていた分布域に、他方の種が花粉を飛散させ浸透性交雑を行うことにより、種子散布を伴わなくとも容易に分布を拡大できる (PETIT et al., 2003)。このように、浸透性交雑は、植物種の分布拡大にも重要な役割を果たしている。

樹木種でも、トウヒ属 (HAMILTON et al., 2013; TSUDA et al., 2016) やカンバ属 (PALME et al., 2004) など、多くの種間交雑が報告されている。コナラ属も多くの種間交雑が報告され (TAMAKI and OKUDA, 2014)、ヨーロッパ大陸では *Quercus robur* × *Quercus petraea* (RUSHTON, 1978; AAS, 1993; PETIT et al., 2003)、北米の 5 樹種間 (*Quercus alba*, *Quercus macrocarpa*, *Quercus michauxii*, *Quercus stellata* and *Quercus virginiana*) (WHITTEMORE and SCHAAL, 1991)、中米の *Quercus affinis* × *Quercus laurina* (RAMOS-ORTIZ et al., 2016)、朝鮮半島でのアカガシ・ウラジロガシ・アラカシの 3 樹種間 (LEE et al., 2014) など、数多くの研究が行われている。日本国内でもミズナラ・コナラ・カシワの 3 樹種間 (李ら, 1996; 宮崎, 1988; MATSUMOTO et al., 2009) やシラカシ・ウラジロガシ (北村・村田, 1979) などで相互の中間的な形質を持つ個体などが報告されている。

コナラ属の交雑の研究は、従来は親種と雑種個体との形態変異 (RUSHTON, 1978; 奥田ら, 1995; 奥田ら, 1996; KREMER, 2002) やフェノロジー調査などによる自然交雑の可能性の検討 (李ら, 1996)、人工交配による雑種個体の稔性の検証 (生方ら, 1999) などが行われてきた。

近年では DNA マーカーの進展やデータ解析手法の高度化に伴い、葉緑体 DNA が浸透性交雑する種間で共有されていること (OKAURA et al., 2007; KANNO et al., 2004) が明らかになった。また *Quercus crassifolia* と *Quercus crassipes* の交雑帯において、形態と同時に核マーカーを用いて交雑個体が推定 (TOVAR-SANCHEZ and OYAMA, 2004) された。さらに、核 SSR (Simple Sequence Repeats) マーカーとベイズクラスタリングを使った解析で、葉の形質によって 2 種に識別されるアカガシとツクバネガシの間に遺伝子流動があること (TAMAKI and OKADA, 2014) も示された。

アベマキとクヌギはコナラ属クヌギ節の種であり、この 2 種間で交雑を行うとされている (中井, 1943)。両種の間接的な形質を備えた個体の存在が古くから知られており、ミヅアベ (倉田, 1949) やアベクヌギ (橋詰・金川, 1988) などと呼ばれる。中間的な形質を示す個体は、中国地方など (橋詰・金川, 1988) で見られるが、天竜川流域で現在でも両種が交雑していると考えられる交雑帯が存在することが、HIROKI and KAMIYA (2005) によって指摘されている。両種の葉形態の変異については、一般にクヌギよりアベマキの方が整生で幅が広く、クヌギの葉には腰細のものがあ、また成葉の裏面ではクヌギは葉毛がほとんどないのに対し、アベマキは星状毛が密生するとされている (橋詰・金川, 1988)。しかし、葉の大きさや形状のみから両種を区別することは難しく (橋詰・金川, 1988)、両種のクヌギ、アベマキの分類は葉裏面の葉毛が決めて (岡田ら, 1996) とされている。

クヌギとアベマキの分布は広く、クヌギはネパールまで、アベマキはチベット東南部とされており (北村・村田, 1979)、日本に分布するクヌギ節はこの 2 種のみである。両種とも里山に生育する代表的な樹種であり、クヌギ節の植物遺体が縄文時代の遺跡から発掘される (伊東, 1990) など、古くから人間により利用されてきた。現在でもクヌギは産業的にも重要な種であり、シイタケ原木として優れているが、アベマキは不適當であるとされる (橋詰・金川, 1988)。

これまでクヌギとアベマキの交雑について遺伝マーカーを用いた研究は行われておらず、また人工交配による雑種形成に関わる検証も行われていない。そのため両種が実際に浸透性交雑を行っているか、また、中間的な形質の個体が本当に交雑個体なのかは明らかとなっていない。そこで、本研究では、現在、交雑帯とされている場所に生育している個体を対象に、実際に交雑が生じているのか、また、従来の形態から判別する交雑個体の識別が妥当であるのかを明らかにすることを目的とした。具体的には、各個体について、クヌギとアベマキの識別点となっている葉裏の星状毛密度を測定すると同時に、葉緑体 SSR マーカーと核 SSR マーカーを用いて遺伝的特性を明らかにし、浸透性交雑の証拠として、i) 葉緑体の共有がなされているか、ii) 核 DNA の混合 (以下、遺伝的混合) は起こっているか、iii) 個体ごとの形態から予想される交雑の程度と遺伝的混合の程度とは関連があるか、について検討を行った。

2. 材料と方法

材料

長野県駒ヶ根市から飯島町に至る南北約 6km、東西約 3km の範囲 (図 1) に生育する、クヌギ節樹木のうちランダムに選んだ 108 個体を材料とした。1 個体あたり星状毛を観察するための葉を 3 枚、遺伝分析用の葉を 1 枚採取した。遺伝分析用の葉は、冷蔵で実験室まで運搬し、その後、分析まで -30°C で保存した。飯島町は HIROKI and KAMIYA (2005) の研究で推定された交



図1 調査地および対照集団の位置
Fig. 1 Location of the study area and reference populations

雑個体率は60%を超え、周辺地域と比較して突出して高かった場所である。また、遺伝解析の対照データを得るため、東京都八王子市および静岡県浜松市のクヌギ集団それぞれ47個体および13個体、愛知県瀬戸市に生育するアベマキ集団42個体（図1）を用いた。

葉裏の星状毛数のカウント

クヌギとアベマキの交雑個体は、両者の中間的な形態をとるとされているが、葉の形態や樹皮の厚さは林分間、個体間の変異が大きく（橋詰・金川, 1988）、識別は困難である。一方、クヌギは葉の裏面に星状毛を持たず、アベマキは多数の星状毛を持つ。そこで、交雑個体を識別する指標としてHIROKI and KAMIYA (2005) に倣って、葉の裏面の右側の基部から9番目と10番目の葉脈間の星状毛数をカウントした。カウントは1個体あたり3枚の葉について行い、実体顕微鏡（オリンパス SZX16）を用いて写真撮影し、写真をコンピュータのモニターに拡大して映し、0.5mm 四方の星状毛の数を数え、3枚の平均値をその個体の値とした。また、参考値とするためアベマキ集団（瀬戸市）の5個体について、各1枚の葉の星状毛密度を上記の方法で数えた。

DNA 解析

対象個体から採取した葉から改変 CTAB 法を用いて DNA を抽出した。遺伝マーカーとして、核 SSR マーカー6座、bcqm42 (MISHIMA et al., 2006), ssrQpZAG15, ssrQpZAG36, ssrQpZAG110 (STEINKELLNER et al., 1997), CsCAT15 (MARINONI et al., 2003), QM69-2M1 (ISAGI and SUHANDONO, 1997), および葉緑体 SSR マーカー6座、 μ dt1, μ dt3, μ dt4, μ cd4, μ cd5, μ kk4 (DEGUILLLOUX et al., 2003) を用いた。PCR 反応には Multiplex PCR kit (Qiagen co.) を用い、各プライマーの濃度が $0.2\mu\text{M}$ となるよう反応液を構成した。PCR 条件は、初期活性化 95°C 15 分の後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 54°C （核マーカー）または 48°C （葉緑体マーカー）で 90 秒、伸長反応 72°C 90 秒を 1 サイクルとし、合計 30 サイクル行い、その後、最終伸長反応を 60°C で 30 分間行った。PCR 産物の電気泳動および遺伝子型の決定には、ABI 社の Genetic Analyzer 3100 および多型解析ソフト GeneMapper を用いた。完全な遺伝データを得ら

れた個体は 90 個体であり、以下のデータ解析に供試した。

データ解析

葉緑体 SSR6 座のフラグメントサイズに基づいて、ハプロタイプを分類し、各個体の葉緑体ハプロタイプを決定した。また、核 SSR のデータを基に、各対立遺伝子の頻度と遺伝的多様性の指数 (A_R , H_E , F_{IS}) を F_{STAT} (GOUDET, 1995) で求めた。PRITCHARD ら (2000) のアルゴリズムに基づいて開発された STRUCTURE2.3.4 (2009) を用いてベイジアンクラスタリングを行い (以下、STRUCTURE 解析)、各個体のクラスターへの帰属を判断した。クラスター数 K は 1 から 8, 200,000 回の burn-in period の後、Markov chain Monte Carlo シミュレーション 200,000 回とした。STRUCTURE HARVESTER (EARL et al., 2012) を用いて ΔK (EVANNO et al., 2005) を計算し、最適なクラスター数を推定した。

形態から判断される交雑の程度と遺伝子型から見た交雑との程度に関連があるかを明らかにするため、各個体の星状毛密度と STRUCTURE 解析の結果から得られたクラスターへの帰属割合との相関について、Spearman の順位相関係数を用いて検定を行った。

3. 結果

葉裏の星状毛密度

葉裏の星状毛の状態を図 2 に示し、星状毛密度によるヒストグラムを図 3 に示す。1mm² あたり 0~928 本で平均 236.7 (± 294.9) 本であり、0~100 本未満の個体が多かった。無毛 (0 本/mm²) の個体数は、30 個体で全体の 27.8% であり、1 本/mm² 以上 100 本/mm² 未満の個体は 34 個体で 31.5% であった。これらは、葉の裏面が緑色に見えた。肉眼で葉裏が明らかに白く見えるものは、星状毛密度がおおむね 400 本/mm² 以上で、顕微鏡下でも葉の全体が星状毛に覆われるように見えた。星状毛密度が 400 本/mm² 以上の個体は、36 個体 (33.3%) であった。アベマキ集団の 5 個体の平均は 1036.0 本/mm² (920 本/mm²~1120 本/mm²) であった。

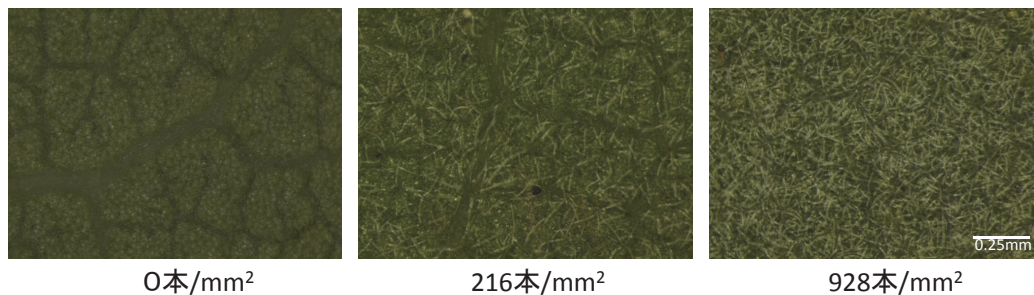


図 2 交雑帯集団における葉裏の星状毛の様子

Fig. 2 Stellate hairs on the abaxial surface of a leaf in the hybrid zone population

葉緑体 DNA のハプロタイプ

それぞれの葉緑体 SSR マーカーのフラグメントサイズは、 $\mu dt1:90bp$, $\mu dt3:129bp$, $\mu dt4:139bp$, $\mu cd4:101bp$, $\mu cd5:81bp$, $\mu kk4:115bp$ の 1 通りであり、検出されたハプロタイプは 1 つであった。すなわち、調査地全ての個体が同一のハプロタイプを持っていた。このハプ

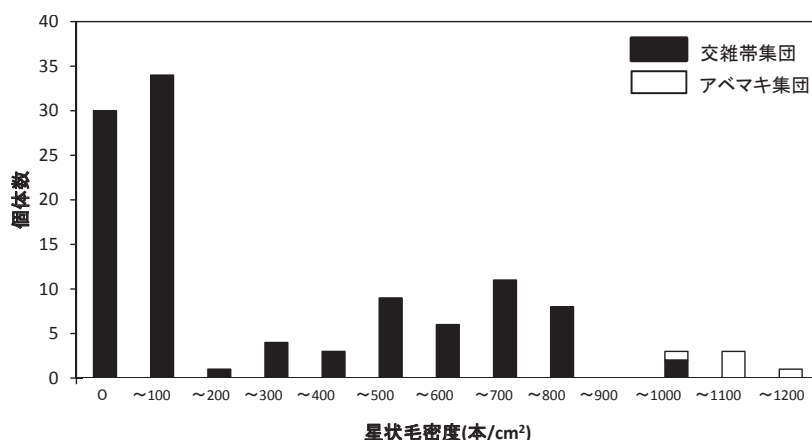


図3 交雑帯集団およびアベマキ集団における葉裏の星状毛密度の分布アベマキ集団は5個体のみ
 Fig. 3 Density distribution of stellate hairs on the abaxial surface of a leaf in the hybrid zone and *Quercus variabilis* populations. Only 5 individuals were used for analysis in the *Quercus variabilis* population.

ロタイプは、対照とした2つのクスギ集団とアベマキ1集団の全個体のハプロタイプと同じであった。

核DNAからみた遺伝的多様性

核SSRマーカーを使用して求めた集団ごと、遺伝子座ごとの遺伝的多様性の指標を表1に示した。集団の遺伝的多様性は、交雑帯集団、瀬戸市集団（アベマキ）の順で、 A_R と H_E ともに高く、すべての集団で F_{IS} は有意に0からずれていなかった。対立遺伝子ごとに見ると、 A_R は3つの遺伝子座（bcqm42, CsCAT15, ssrQpZAG15）で交雑帯集団の値が最も高く、残りの3つの遺伝子座で瀬戸市集団（アベマキ）が最も高かった。 H_E は交雑帯集団が4つの遺伝子座（bcqm42, CsCAT15, QM69-2M1）で最も高く、残りの遺伝子座は、それぞれ1座ずつ瀬戸市集団（アベマキ）とクスギの八王子集団で最も高かった。 F_{IS} は、交雑帯集団のQM69-2M1で有意に0からずれていたが、その他の対立遺伝子はすべてハーディワインベルグ平衡にあり、すべての集団は任意交配集団であった。

表1 交雑帯およびクスギ、アベマキ集団における核SSR6遺伝子座の遺伝的多様性
 Table 1 Genetic diversity estimated using six nuclear SSR loci in the hybrid, *Quercus actissima*, and *Quercus variabilis* populations.

遺伝子座	$A_{R(26)}$				H_E				F_{IS}			
	交雑帯	クスギ		アベマキ	交雑帯	クスギ		アベマキ	交雑帯	クスギ		アベマキ
		八王子	天竜川	瀬戸市		八王子	天竜川	瀬戸市		八王子	天竜川	瀬戸市
bcqm42	12.0	8.2	9	9.1	0.887	0.809	0.853	0.873	0.099	0.106	-0.173	0.155
CsCAT15	8.2	8.2	7	7.2	0.830	0.829	0.801	0.763	0.009	-0.026	0.040	0.158
QM69-2M1	5.4	3.0	3	5.9	0.753	0.651	0.676	0.742	0.173*	0.183	-0.137	-0.059
ssrQpZAG15	9.3	8.9	9	6.8	0.822	0.839	0.798	0.729	0.027	-0.040	-0.157	0.021
ssrQpZAG36	4.0	1.0	1	4.1	0.682	0	0	0.648	0.071	NA	NA	-0.103
ssrQpZAG110	9.5	9.3	8	10.1	0.833	0.842	0.788	0.847	-0.027	0.014	-0.073	0.073
平均	8.1	6.4	6.2	7.2	0.801	0.662	0.653	0.767	0.057	0.041	-0.100	0.048

A_R : アレリックリッチネス, H_E : ヘテロ接合度の期待値, F_{IS} : 固定指数, *: 0から有意にずれている($p < 0.05$)

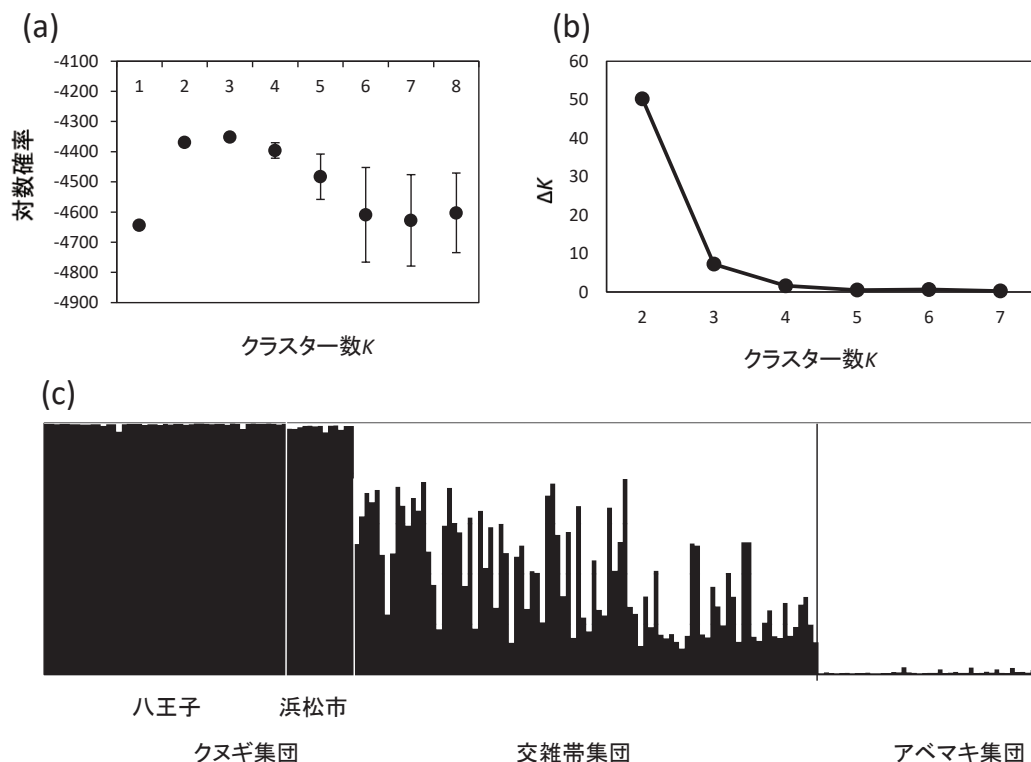


図4 STRUCTURE 解析によるベイズクラスタリング (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) クヌギ集団 (八王子, 浜松市), 交雑帯集団およびアベマキ集団 (瀬戸市) における各個体ごとの2つのクラスターの混合割合 Fig. 4 Bayesian clustering using STRUCTURE. (a) Changes in the log probability of the data and (b) ΔK statistic. (c) Admixture proportions of two genetic clusters in the *Quercus acutissima*, hybrid, and *Quercus variabilis* populations.

表2 集団ごとのクヌギクラスター割合

Table 2 The proportion of *Quercus acutissima* cluster in each population.

集団	平均	±	標準偏差
交雑帯	0.391	±	0.208
クヌギ	八王子	0.995	± 0.005
	浜松市	0.984	± 0.008
アベマキ	瀬戸市	0.010	± 0.006

遺伝的混合

STRUCTURE 解析の結果, データの対数確率は K が 2 から 3 で頭打ちになった (図4)。また, ΔK はクラスター数が 2 の時, 最大となった。クラスター数が 2 の時, クヌギとアベマキの個体は, それぞれ別のクラスターに属した (以下, クヌギクラスターおよびアベマキクラスター)。解析した交雑帯集団の全ての個体が, 対照に用いたクヌギとアベマキの双方のクラスターの混合

となった (図 4)。各集団のクヌギクラスター割合を表 2 に示す。クヌギ集団は、それぞれ 0.995 (八王子) および 0.984 (浜松市) であり、すべての個体のクヌギクラスター割合が 100% に近かった。アベマキ集団 (瀬戸市) はクヌギクラスター割合が 0.010 で 1% にも満たなかった。交雑帯集団におけるクヌギクラスターの割合は $0.391 (\pm 0.208)$ と中間の値をとったがばらつきが大きく、個体ごとに見ると 0.104~0.778 で、遺伝的混合の程度には幅があった。

星状毛密度とクヌギまたはアベマキクラスターへの帰属割合

各個体の星状毛密度とクヌギクラスターの関係については、星状毛密度が高いほど、クヌギクラスター割合が低く (図 5)、Spearman の順位相関係数を求めたところ、有意に負の相関があった ($r = -0.5940, p < 0.01$)。一方、無毛の個体でもクヌギクラスターの占める割合には幅があった ($n = 21$, 平均 0.579 ± 0.163)。

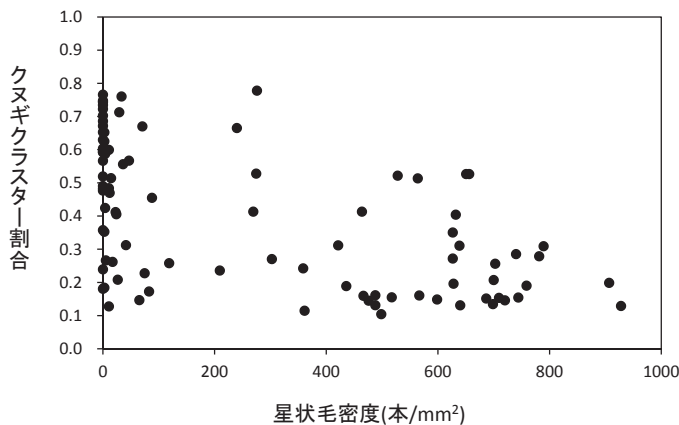


図 5 交雑帯個体の裏の星状毛密度と STRUCTURE 解析によるベイズクラスタリングのクヌギクラスター割合の関係。Spearman の順位相関係数 $r = -0.5940$ で有意であった ($p < 0.01$)。

Fig. 5 The correlation between the density of stellate hairs on the abaxial surface of a leaf and the proportion of *Quercus acutissima* genetic cluster in hybrid zone individuals. The Spearman's rank correlation coefficient was significant ($r = -0.5940, p < 0.01$).

4. 考察

葉裏の星状毛密度からみた交雑帯の存在

本研究の調査地は、HIROKI and KAMIYA (2005) において、葉裏の星状毛密度から交雑個体と判定された個体の割合が約 60% で最も高かった長野県飯島町の周辺とした。一般にアベマキとクヌギは葉の裏面の星状毛の有無で識別され、交雑個体はその中間とされるが、星状毛密度の閾値の定義はなく、HIROKI and KAMIYA (2005) では肉眼で見て葉の裏が白いものをアベマキ、葉の裏の色が緑色または緑色に近いもののうち顕微鏡下で星状毛を持つものを交雑個体としている。一方、岡田ら (1996) は走査式電子顕微鏡を用いてわずかに星状毛がみられても一列細胞毛の方がはるかに多い場合にはクヌギとし、全般に星状毛が見られるが毛量が少ない場合を交雑個体、星状毛がかなり多く葉全体がおおわれる場合をアベマキとしている。どちらの基準も完全

には数値化されていないため、全く同じ基準で議論することは困難である。本研究では、400本/mm²以上の個体は肉眼で葉裏が完全に白く見え、かつ顕微鏡下でも葉の全体が星状毛に覆われるように見えるため、400本/mm²未満の密度で星状毛がある個体が既存研究の定義の交雑個体とほぼ同等と考えた。この基準では本研究での交雑個体割合は38.9%となり、形態から見た交雑個体が高頻度で存在し、飯島町周辺が交雑帯であることを支持する。一方、この交雑個体の割合は、HIROKI and KAMIYA (2005) の約60%よりも低い値であるが、これは基準が完全には一致しないことや、本研究では全108個体をサンプルとしたが、HIROKI and KAMIYA (2005) は13個体であり、サンプル数が大きく違うことが交雑個体割合の違いに反映された可能性がある。さらに、本研究で参考値としたアベマキ(瀬戸市)の星状毛密度は1000本/mm²程度となり、5個体のうち4個体は交雑帯で最も密度が高い個体よりも高い値となった(図3)。このことは、本研究では星状毛密度が400本/mm²以上の個体を葉の裏面が白く見えるためアベマキとしたが、これらも交雑個体である可能性を示唆している。

交雑帯における浸透性交雑

葉緑体DNAは、交雑帯集団および対照としたクヌギとアベマキの集団全てが同じハプロタイプに固定されていた。これは使用した葉緑体SSRマーカー6座が、クヌギとアベマキで単型である可能性が考えられる。しかし、齊藤ら(未発表)は、同じマーカーセットを用いて日本及び朝鮮半島、中国大陸のクヌギを解析し、23ハプロタイプを検出している。したがって、ハプロタイプが1つに固定されていたのは解析した集団の遺伝的特性であると考えられる。このことから、このハプロタイプは、2種が分化する前の祖先集団から保持されているか、両種で浸透性交雑が起こっているため共有されたと考えられる。近縁種間で交雑を行うコナラ属樹木は、このように種間でハプロタイプを共有することが数多く報告され(例えばCAVENDER-BARES et al., 2015; PETIT et al., 2002)、日本国内においてはKANNO et al. (2004) と OKAURA et al. (2007) が、コナラ、ミズナラ、カシワ、ナラガシワが葉緑体ハプロタイプを共有していることを示した。祖先的なハプロタイプはより広域に分布することが多いが、本研究ではハプロタイプが一つしか検出されず、また、対照集団も関東、東海地方と比較的狭い範囲であったため、この結果のみからは祖先多型か交雑による共有かは判別できなかった。

核DNAからみた遺伝的多様性は、 A_R 、 H_E ともに、交雑帯集団で最も高くなった。メキシコにおける*Q. castanea* 集団の遺伝的多様性が、同所的に生育する近縁種の種数が多いほど高くなることが報告されており(VALENCIA-CUEVAS et al., 2014)、種間の交雑により直接的に遺伝的多様性が影響を受けていると考察されている。本研究の交雑帯でも、これと同様の現象が生じて、遺伝的多様性が高くなっていると考えられる。また、交雑帯集団が任意交配集団であったことは、本調査地でクヌギとアベマキがただ同所的に生育しているのではなく、浸透性交雑を行っている可能性を示す。

さらにSTRUCTURE解析の結果でも、交雑帯の個体はクヌギクラスターとアベマキクラスターの混合となったことから、飯島町周辺で両種の浸透性交雑が生じていることが支持された。核DNAのベイズクラスタリングは種内の遺伝構造の検出に用いられることが多いが(例えばTSUDA et al., 2009)、本研究と同様に異なる種間での遺伝的混合が検出される例も多い。例えば、メキシコにおける*Q. affinis* と *Q. laurina* (RAMOS-ORTIZ et al., 2016) や中国大陸の*Q. mongolica* と *Q. liaotungensis* (ZENG et al., 2011) の交雑帯におけるベイジアンクラスタリングによる核

DNA の遺伝的混合が示されている。

また、2つのクラスターの混合の程度に幅があったことから、交雑帯においては、両種の交雑のみならず戻し交雑や交雑個体同士の交配が生じていることと推察される。

星状毛密度から予想される交雑の程度と遺伝的混合との関連

星状毛密度とクヌギクラスターへの帰属割合に有意な負の相関があったことから、形態から判断される交雑の程度と、遺伝子型から見た交雑の程度には関連があることが明らかとなった。このことは、クヌギとアベマキの遺伝的混合の程度が星状毛密度という形質に反映することを示している。形態から交雑と判別された個体を遺伝マーカーでも交雑個体と識別する試みはこれまでもなされてきており、*Q. crassifolia* と *Q. crassipes* の交雑個体は、RAPD マーカーを用いた Hardig hybrid index (HARDIG et al., 2000) によって検出された (TOVAR-SANCHEZ and OYAMA, 2004)。また、*Q. crispula* と *Q. dentata* の交雑個体は、AFLP マーカーのデータを主座標分析し図示した結果、親種個体の中間に位置した (ISHIDA et al., 2003)。本研究では、交雑帯の個体が親種の遺伝的混合であることを示しただけではなく、その遺伝的混合の程度が星状毛密度と関連があることを示すことができた。これは、星状毛密度が環境的な影響をほとんど受けず、遺伝的に支配されている可能性を示唆する。また、これまでのクヌギとアベマキの雑種の識別点として、星状毛の密度が提唱されてきた (岡田ら, 1996) ことは遺伝的な観点から見ても妥当であったといえる。

しかし一方で、クヌギ集団においてはクヌギクラスター割合が 100% に近いのに対し、交雑帯集団では無毛の個体でもクヌギクラスターが平均 0.579、最大で 0.766 でしかなかったことから、本交雑帯に生育する個体は無毛、すなわち形態からクヌギと判断される個体であったとしても必ずしも遺伝的には純粋なクヌギとは言えない可能性がある。同様に交雑帯集団では、形態から星状毛密度が高く既存研究ではアベマキと識別される個体のうち、クヌギクラスター割合が最小でも 0.129 あったことから、純粋なアベマキと言えない可能性が残される。このことは、葉裏が白くても交雑帯の個体は、参考としたアベマキ集団の個体の星状毛密度より低いものがほとんどであることから支持される。交雑帯における種の識別と形態および遺伝的混合の程度との関連については、さらなる検討が必要である。

以上、既報によりクヌギとアベマキの交雑帯であるとされていた長野県飯島町周辺は、本研究でも、形態的に交雑個体であると考えられる個体が高頻度で生育していた。また、遺伝解析により、そこに生育している全個体が、実際に両種の遺伝的混合の個体であり、両種が浸透性交雑を生じていることを示した。また、遺伝的混合の程度と、葉裏の星状毛密度という形質との間に関連があり、遺伝的にクヌギに近い個体ほど星状毛密度が小さく、逆にアベマキに近い個体ほど星状毛密度が高い傾向があることが明らかになった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京大学大学院の吉田薫教授には星状毛をカウントするために実体顕微鏡をお貸しいただきました。また、福田知秀氏と瀬戸康弘氏には対照集団のサンプルをご提供いただきました。この場をお借りして御礼申し上げます。

要旨

クヌギとアベマキはどちらもコナラ属クヌギ節に属し、両種の間間的な形質の個体が野外で観察されるため、交雑すると言われている。しかし、間間的な形質の個体が実際に交雑個体なのかを遺伝的に明らかにした研究はない。本研究では、両種の交雑帯とされている長野県飯島町周辺に生育しているクヌギ節樹木について、クヌギとアベマキの識別点である葉裏の星状毛密度を測定し、以下の遺伝的特性を明らかにすることとした。i) 両種が葉緑体ハプロタイプを共有しているか、ii) 交雑個体で核 DNA の混合（遺伝的混合）は起こっているか、iii) 形態から予想される交雑の程度と遺伝的混合の程度とは関連があるか。遺伝解析には調査地の 90 個体のクヌギ節樹木を、対照集団としてクヌギ 2 集団（八王子市と浜松市、合計 60 個体）、アベマキ 1 集団（瀬戸市 42 個体）を用いた。その結果、実験に供試した全ての個体と同じ葉緑体ハプロタイプであり、浸透性交雑を行っていることに矛盾しなかった。また、核 SSR 解析を用いた STRUCTURE 解析により、交雑帯に生育している全個体が、実際に両種の遺伝的クラスターの混合であり、浸透性交雑が生じていることが示された。また、各個体は葉裏の星状毛密度が高いほどクヌギクラスターの割合が小さい傾向があり、形態から予想される交雑の程度と遺伝的混合の程度に有意な相関があった。

キーワード：交雑帯、ベイジアンクラスタリング、葉緑体ハプロタイプ、核 SSR、形態

引用文献

- AAS G. (1993) Taxonomical impact of morphological variation in *Quercus robur* and *Q. petraea*: a contribution to the hybrid controversy. *Annals of Forest Science*. 50 (suppl 1):107s-113s
- ANDERSON E. (1949) *Introgressive Hybridization*. pp109. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- ARNOLD M.L. (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 23: 237-261.
- CAVENDER-BARES, J., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., EATON, D., HIPPI, A., BEULKE, A. and MANOS, P. (2015) Phylogeny and biogeography of the American live oaks (*Quercus* subsection *Virentes*): a genomic and population genetics approach. *Molecular Ecology*. 24: 3668-3687.
- DEGUILLIOUS, M., DUMOLIN-LAPEGUE, S., GIELLY, L., GRIVET, D. and PETIT, J. (2003) A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes*. 3: 24-27.
- EARL, D. A. and BRIDGETT, M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4: 359-361.
- EVANNO G., REGNAUT S. and GOUDET J. (2005) Detecting the number of cluster of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.
- GOUDET, J. (1995). FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F statistics. *Journal of Heredity*. 86: 485-486.
- HARDIG T., BRUNSFELD S., FRITZ R., MORGAN M. and ORIANS C. (2000) Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Molecular Ecology*. 9: 9-24.
- 橋詰隼人・金川悟 (1988) クヌギ・アベマキ混交林における葉及び樹皮形態の変異. 第 99 回日本林学会大会発表論文集. 241-242.
- HAMILTON, J., LEXER, C. and AITKEN S. (2013) Genomic and phenotypic architecture of a spruce hybrid zone (*Picea sitchensis* × *P. glauca*). *Molecular Ecology*. 22: 827-841.
- HIROKI S. and KAMIYA T. (2005) Discrimination of hybrids between *Quercus variabilis* and *Q. acutissima* by

- using stellate hairs, and analysis of the hybridization zone in the Chubu District of central Japan. The Journal of Phytogeography and Taxonomy. 53: 145-152.
- ISAGI, Y. and SUHANDONO, S. (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. Molecular Ecology. 6: 897-899.
- ISHIDA T., HATTORI K., SATO H. and KIMURA M. (2003) Differentiation and hybridization between *Quercus crispula* and *Q. dentata* (Fagaceae): Insights from morphological traits, amplified fragment length polymorphism markers, and leaf miner composition. American Journal of Botany. 90: 769-776.
- 伊東隆夫 (1990) 日本の遺跡から出土した木材の樹種とその用途 II. 木材研究・資料 26: 91-189.
- KANNO M., YOKOYAMA J., SUYAMA Y., OHYAMA M., ITOH T. and SUZUKI M. (2004) Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. Journal of Plant Research. 117: 311-317.
- KREMER, A., DUPOUEY, J., DEANS, J., COTTRELL, J., CSAIKL, U., FINKELDEY, R., ESPINEL, S., JENSEN, J., KLEINSCHMIT, J., DAM, B., DUCOUSSO, A., FORREST, I., LOPEZ DE HEREDIA, U., LOWE, A., TUTKOVA, M., MUNRO, R., STEINHOFF, S. and BADEAU, V. (2002) Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. Annals of Forest Sciences. 59: 777-787.
- KRUTOVSKII, K. and BERGMANN, F. (1995) Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. Heredity. 74: 464-480.
- 北村四郎・村田源 (1979) 原色日本植物図鑑・木本編 II. pp545., 保育社, 大阪.
- 倉田益二郎 (1949) アベマキ. (特用樹種. 朝倉書店, 東京). 112-120.
- LEE, J., JIN, D., CHOI, B. and CHOI, D. (2014) Genetic differentiation and introgression among Korean evergreen *Quercus* (Fagaceae) are revealed by microsatellite markers. Annales Botanici Fennici 51: 39-48.
- 李廷鎬・橋詰隼人・山本福壽 (1996) カシワ, コナラ, ミズナラおよびそれらの中間型個体の開花期, 花粉の形態・稔性について. 日本林学会誌. 78: 452-456.
- MALLET J. (2005) Hybridization as an invasion of the genome. Trends in Ecology and Evolution. 20: 229-37.
- MARINONI, D., AKKAK, A., BOUNOUS, G., EDWARDS, K.J. and BOTTA, R. (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). Molecular Breeding. 11: 127-136.
- MATSUMOTO, A., KAWAHARA, T., KANAZASHI, A., YOSHIMARU, H., TAKAHASHI, M. AND TSUMURA, Y. (2009) Differentiation of three closely related Japanese oak species and detection of interspecific hybrids using AFLP markers. Botany. 87: 145-153.
- MISHIMA, K., WATANABE, A., ISODA, K., UBUKATA M. AND TAKATA, K. (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Quercus mongolica* var. *crispula*. Molecular Ecology Notes. 6: 695-697.
- 宮崎安貞 (1988) 北海道におけるなら類の遺伝子浸透と自然雑種. 北海道の林木育種. 31: 5-8.
- 岡田滋・中川幸尚・橋詰隼人 (1995) 中国地方 (岡山県三平山) のなら類の雑種性について (I) - 走査性電子顕微鏡 (SEM) による葉毛型の分類 - . 日林関西支論 3:133-136.
- 岡田滋・山本史恵・橋詰隼人・山本福壽 (1996) クヌギ, アベマキの葉の形態の変異について. 日林関西支論 5: 73-76.
- 岡田滋・山本武・山本福壽・橋詰隼人 (1995) 山陰海岸 (長尾鼻, 陸上岬) に自生するなら類の変異 (II) - ミズナラ, コナラ, カシワの雑種性について - . 日林関西支論 4: 89-92.
- OKAURA, T., QUANG, N.D., UBUKATA, M., and HARADA, K. (2007) Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica* var. *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. Genes & Genetic Systems. 82: 465-477.
- PALME, A.E., SU, Q., PALSSON, S. and LASCOUX M. (2004) Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. Molecular Ecology 13:167-178
- PETIT, R., CSAIKL, U., BORDÁCS, S., BURG, K., COART, E., COTTRELL, J., VAN DAM, B., DEANS, J., DUMOLIN-

- LAPÈGUE, S., FINESCHI, S., FINKELDEY, R., GILLIES, A., GLAZ, I., GOICOECHEA P., JENSEN, J., KÖNIG, A., LOWE, A., MADSEN, S., MÁTYÁS, G., MUNRO, R., OLALDE M., PEMONGE, M., POPESCU, F., SLADE, D., TABBENER, H., TAURCHINI, D., DE VRIES, S., ZIEGENHAGEN, B. and KREMER, A. (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks. *Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. Forest Ecology and Management.* 156: 5–26.
- PETIT R., BODÉNÈS C., DUCOUSSO A., ROUSSEL G. and KREMER A. (2003) Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist.* 161: 151–164.
- PRITCHARD J., STEPHENS M. and DONNELLY P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945–959.
- RAMOS-ORTIZ, S., OYAMA, K., RODRIGUEZ-CORREA, H. and GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. (2016) Geographic structure of genetic and phenotypic variation in the hybrid zone between *Quercus affinis* and *Q. laurina* in Mexico. *Plant Species Biology.* 31: 219–232.
- RUSHTON, B. (1978) *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: a multivariate approach to the hybrid problem: 1. Data acquisition, analysis and interpretation. *Watsonia.* 12: 81–101.
- STEINKELLNER, H., LEXER, C., TURETSCHKE, E., AND GLÖSSL, J. (1997) Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology.* 6: 1189–1194.
- TOVAR-SANCHEZ, E. and OYAMA, K. (2004) Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus Crassifolia* and *Quercus Crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany.* 91: 1352–1363
- TAMAKI I. AND OKADA M. (2014) Genetic admixing of two evergreen oaks, *Quercus acuta* and *Q. sessilifolia* (subgenus *Cyclobalanopsis*), is the result of interspecific introgressive hybridization. *Tree Genetics and Genomes.* 10: 989–999.
- TSUDA, Y., CHEN, J., STOCKS, M., KÄLLMAN, T., SØNSTEBØ, J., PARDUCCI, L., SEMERIKOV, V., SPERISEN, C., POLITOV, D., RONKAINEN, T., VÄLIRANTA, M., VENDRAMIN, G., TOLLEFSRUD, M. and LASCoux, M. (2016) The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? *Molecular Ecology.* 25: 2773–2789.
- TSUDA, Y., KIMURA, M., KATO, S., KATSUKI, T., MUKAI, Y., and TSUMURA, Y. (2009) Genetic structure of *Cerasus jamasakura*, a Japanese flowering cherry, revealed by nuclear SSRs: Implications for conservation. *Journal of Plant Research.* 122: 367–375.
- TWYFORD A.D. and ENNOS R.A. (2012) Next-generation hybridization and introgression. *Heredity.* 108: 179–189.
- 生方正俊・板鼻直栄・河野耕蔵 (1999) ミズナラとカシワの交雑和合性および種間雑種における繁殖能力と開花時期. *日本林学会誌* 81: 286–290.
- VALENCIA-CUEVAS, L., PINERO, D., MUSSALI-GALANTE, P., VALENCIA-AVALOS, S. and TOVAR-SANCHEZ, E. (2014) Effect of a red oak species gradient on genetic structure and diversity of *Quercus castanea* (Fagaceae) in Mexico. *Tree Genetics & Genomes* 10:641–652
- WHITTEMORE, A. and SCHAAL, B. (1991) Interspecific gene flow in sympatric oaks (hybridization/introgression/chloroplast DNA/*Quercus*). *Evolution.* 88: 2540–2544.
- ZENG, Y., LIAO, W., PETIT, R. and ZHANG, D. (2011) Geographic variation in the structure of oak hybrid zones provides insights into the dynamics of speciation. *Molecular Ecology.* 20: 4995–5011.

(2016年11月10日受付)

(2017年1月18日受理)

Summary

Quercus acutissima and *Quercus variabilis*, both of which are Section *Cerris*, are assumed to hybridize with each other because individuals with intermediate morphology are sometimes observed in the field. However, whether or not these individuals are indeed hybrids of the two species is uncertain, because there has been no molecular study on hybridization between them.

In this study, we sampled leaves of Section *Cerris* species around Iijima Town, Nagano Prefecture, where individuals with intermediate morphology have been observed with a high frequency (the so-called hybrid zone), and we attempted to clarify their genetic characteristics by using both chloroplast simple sequence repeat (SSR) and nuclear SSR analyses. We aimed to address the following questions; i) Do these two species share the same chloroplast haplotypes? ii) Is the nuclear DNA of hybridized individuals an admixture of the two species? iii) Is the degree of admixture of each individual is related with the morphological traits, specifically stellate hair density? We sampled leaves of 90 individuals in the hybrid zone as well as two *Q. acutissima* populations (Hachioji City and Hamamatsu City, total 60 samples) and one *Q. variabilis* population (Seto City, 42 samples) as reference populations. The results showed that all individuals in the hybrid zone and reference populations had the same haplotype, supporting the hypothesis of introgressive hybridization between these two species. All individuals in the hybrid zone were admixtures of genetic clusters of the two species, as revealed by structural analysis of the nuclear SSR data, also suggesting introgressive hybridization. The individuals with a higher density of stellate hairs on the abaxial surface of leaf showed lower a proportion of the *Q. acutissima* genetic cluster. This result suggests that the degree of admixture of each individual was related with morphological traits.

Keywords: hybrid zone, Bayesian clustering, chloroplast haplotype, nuclear SSR, morphology