

ノニガナ属ノニガナ、オオジシバリ、
イワニガナにおいて生じる
雑種について

新潟大学大学院
自然科学研究科博士後期課程
環境共生科学専攻
(自然システム科学大講座)

石澤 佳代

目次

要旨	3
序論	5
I 章 ノジシバリの起源－ノニガナとオオジシバリの交配実験による検討－	7
II 章 自然集団におけるノニガナ、オオジシバリ ならびに雑種の形態比較	13
III 章 ノニガナとイワニガナの雑種－ヒメノジシバリの形成－	17
IV 章 旧ニガナ属 (<i>Ixeris</i>) の分子 (DNA) マーカーを用いた系統解析	22
引用文献	28
表	30
図	52
付録	77
謝辞	90
Abstract	91

要旨

本研究は、ノジシバリ (*I. × sekimotoi* Kitam.) が、ノニガナ属 (キク科キクニガナ亜科キクニガナ連) の 2 種、ノニガナ (*Ixeris polycephala*) とオオジシバリ

(*I. japonica*) の種間雑種とする仮説 (北村 1936) を検証する目的でおこなわれた。

2 倍体のノニガナを種子親、6 倍体のオオジシバリを花粉親とする交配実験をおこなった結果、生じた F1 雑種は、両種の間間的な形質を示した。この個体の形態と北村 (1936) のノジシバリの記載が一致したことから、ノジシバリがノニガナとオオジシバリの種間雑種だという仮説を支持した。ノジシバリは、種子親がノニガナのときのみが生じ、4 倍体で、自家受粉により稔性のある種子を形成することが分かった。

また、ノニガナとオオジシバリが同所的にみられる自然集団に、交配実験で生じたノジシバリとよく似た個体を見つけたので DNA 量を測定したところ、4 倍体で稔性のある種子を形成していた。形態計測の結果と合わせて、自然集団でもノジシバリが形成されていることを確認した。また、2009 年から 2015 年の 6 年間の観察により、4 倍体のノジシバリは、個体数が増え、分布が広がりを見せていることを確認できたが、集団ごとに若干、葉の形態や頭花の径等に変異が見られた。なかには 3 倍体と推定される個体もみられた。花粉は稔性が高いことから、ノジシバリは花粉親として戻し交雑をおこなっている可能性も考えられる。

オオジシバリと近縁である 2 倍体のイワニガナ (*I. stolonifera*) とノニガナの間でも、雑種形成の可能性が示されているが (Kitamura 1956)、それに該当する種間雑種とみられる個体が、両種が混生する自然集団で見つかった。その個体は、ノニガナとイワニガナの間間的な形態をもち、ノジシバリとも異なっていた。DNA 量は 2 倍体で、稔性種子はほとんど得られなかった。また、ノニガナとイワニガナの交配実験をおこなったところ、種子親がノニガナのときに、その個体と同様な形態をもった雑種が得られた。さらに、自然集団と同じように稔性種子は確認できなかった。そこで、これらの個体をノニガナとイワニガナから生じる雑種として、ヒメノジシバリ *Ixeris × pseudosekimotoi* と命名することとした。なお、京都総合博物館と国立科学博物館、新潟県新津資料館に収められている標本にも、これと同じ形態をもつものがあり、各地で生じている可能性が考えられる。しかし、この雑種は、種子形成はほとんどおこなわず、イワニガナのような匍匐茎などによる栄養繁殖もおこなえないため、増殖する可能性は低い。一方、稔性のある花粉形成はおこなっていることから、戻し交雑等により、新たな種形成に関わる可能性は否定できない。

葉緑体 DNA はキク科植物では母性遺伝することが知られている。自然集団で見られたノジシバリとヒメノジシバリの種子親を特定するため、葉緑体 DNA の運搬 RNA 遺伝子の *trnT-trnF* 間非コード領域の塩基配列を決定した。両親種と比較した結果、いずれもノニガナが種子親であることが分かった。また、核 DNA マーカーであるリボソーム RNA 遺伝子間の非コード領域 ITS (Internal Transcribed Spacer) や ETS (External Transcribed

spacer) 領域の塩基配列と比較したところ、ノジシバリの花粉親はオオジシバリ、ヒメノジシバリの花粉親はイワニガナであることがほぼ確定した。

花粉親となったイワニガナとオオジシバリを分子マーカーで比較したところ *trnT-trnF* (葉緑体 DNA) には相違が見られず、ITS 領域 (核 DNA) では 1 塩基だけ相違見られた。さらに、ETS 領域 (核 DNA) をクローニングして塩基配列を比較したところ、わずか 3 塩基の相違があるのみで、ほぼ、同一であった。分子遺伝学的にも、形態学的にも、イワニガナとオオジシバリはノニガナとオオジシバリ、ノニガナとイワニガナよりも近縁であると考えられる。交配実験も試みたが、現在のところ両者の雑種形成は確認できていない。

以前のニガナ属は、現在、冠毛の色が白色で染色体基本数が $x=8$ のノニガナ属 *Ixeris* と、冠毛の色は汚白色あるいは黄白色で染色体基本数は $x=7$ のニガナ属 *Ixeridium* に分類されている (大橋他 2017)。そこで、この分類が分子系統学的に妥当であるかどうかを検討した。葉緑体 DNA の *trnT-trnF* 間の塩基配列を用いて系統樹を作成したところ、*Ixeris* と *Ixeridium* は、異なるクレードを形成した。ITS 領域を用いた系統解析も同様の結果を示した。従って、形態学的に分類されてきたとおり、分子系統学的にも *Ixeris* と *Ixeridium* のグループ分けは妥当であると言える。また、種間雑種 (ノジシバリとヒメノジシバリ) は、同じノニガナ属 (*Ixeris*) の種間だけで形成され、ノニガナ属 (*Ixeris*) とニガナ属 (*Ixeridium*) の間では生じていないことが改めて確認された。

序論

キク科 Asteraceae (Compositae) は世界に 2 万 4000 種ほどあり、ラン科、マメ科、イネ科とともに被子植物中でもっとも多様性のある科の一つと言われ、日本でも 400 種余りが野生し、帰化植物も 200 種程度あると言われている (大橋他 2017)。従来の分類では、花冠が舌状花のみからなり、植物体に乳管をもつものをタンポポ亜科とし、ほかはすべてキク亜科として取り扱ってきたが、最近の分類系では、日本に分布するキク科全体が 5 つの亜科に分類されている (大橋他 2017)。そのうちのキクニガナ亜科 Subfam. Chichorioideae、キクニガナ連 Tribe Chichorieae (かつては、これがタンポポ亜科) の中の 20 以上の属の一つであるノニガナ属 *Ixeris* について本論文に取り上げた。

ノニガナ属は自然雑種を形成することが知られているが、例えば、イワニガナ *Ixeris stolonifera* A. Gray とオニタビラコ *Youngia japonica* (L.) DC. からオニヒメジシバリ \times *Ixyoungia yendoi* Kitam.、オオジシバリ *Ixeris japonica* (Blum.f.) Nakai

(*Ixeris debilis* A. Gray) とオニタビラコからオニジシバリ \times *Ixyoungia sekimotoi* Kitam. などの属間雑種 (Kitamura 1956, Yahara 1995)、イワニガナとカワラニガナ *I. tamagawaensis* Kitam. からツルカワラニガナ *I. \times nikoensis* Nakai、オオジシバリとハマニガナ *I. repens* A. Gray からミヤコジシバリ *I. \times nakazonei* Kitam. などの種間雑種である (Kitamura 1956, Yahara 1995)。ミヤコジシバリについては、その形態や分布に加えて、リボソーム RNA 遺伝子の ETS を DNA マーカーに用いた倍数性に関する詳細な報告がある (Denda and Yokota 2003, 2004, 傳田 2006, 合田他 2014) が、その他の場合は外部形態に基づいて雑種として記録されているにすぎない。

本研究でとりあげるノジシバリ *I. \times sekimotoi* Kitam. は、当初から雑種として記載され、葉の基部が茎を抱き、分枝を多数出すなど、ノニガナ *Ixeris polycephala* Cass. とオオジシバリの中間的な形態的特徴をもつことから、両者の自然交雑によって形成した種間雑種とされている (Kitamura 1936, 1956)。これまでに栃木県宇都宮、東京都八王子で採集されているが、いずれの標本も、瘦果を形成している。なお、ノニガナは $2n=16$ の 2 倍体で (Babcock et al. 1937, Ishikawa 1916, 石川 1921)、オオジシバリは $2n=48$ の 6 倍体と報告されている (Ishikawa 1916, 石川 1921, Takemoto 1952)。筆者は、ノニガナとオオジシバリが同所的に生育する新潟市西蒲区巻で、ノジシバリと思われる個体を見つけた。さらに、ノニガナ、オオジシバリと同属のイワニガナも $2n=16$ の 2 倍体と報告されていて (Ishikawa 1916, 石川 1921, Takemoto 1952)、ノニガナと自然交配し、種間雑種を形成しているのではないかとと思われる個体や標本を見つけた。そこで、ノニガナとオオジシバリ、ノニガナとイワニガナをそれぞれ交配させ、生じた個体の DNA 量を計測し、両者の雑種と思われる個体の形態を計測するとともに、標本や記載との比較を行った。さらに、自然雑種と思われる個体の形態計測と DNA マーカーを用いた検討も行い、自然環境下で雑種形成が行われているか否かを検討した。

従来は、タンポポ亜科に 14 属の 1 つがニガナ属（北村 1956、佐竹他 2006）で、染色体基本数と冠毛の色と瘦果の中果皮にみられる解剖学的形質等に基づき、*Ixeris* と *Ixeridium* の 2 つの節があるとされてきた（Pak and Kawano 1992、矢原 1995）。しかし、現在は、前者の *Ixeris* を冠毛の色が白色で染色体の基本数が $n=8$ という特徴からノニガナ属、後者の *Ixeridium* は冠毛の色は汚白色あるいは黄白色の基本数は $n=7$ という特徴からニガナ属に分類されている（邑田他 2009、大橋他 2017）。そこで、本研究では、分子マーカーを使って系統樹をつくり、この分類が妥当であるかどうかの検討も行った。

以上に関わる内容を、本論文では、次の 4 つの点にまとめた。

I 章 ノジシバリの起源—ノニガナとオオジシバリの交配実験による検討—

II 章 自然集団におけるノニガナ、オオジシバリならびに雑種の形態比較

III 章 ノニガナとイワニガナの雑種—ヒメノジシバリの形成—

IV 章 旧ニガナ属（*Ixeris*）の分子（DNA）マーカーを用いた系統解析

なお、本論文で記した植物の学名は、大橋他（2017）の分類体系に基づいて使用した。

I 章 ノジシバリの起源—ノニガナとオオジシバリの交配実験による検討—

目的

ノニガナとオオジシバリとの間には雑種が形成され、ノジシバリと呼ばれている (Kitamura 1936、1956)。しかし、外部形態に基づいて雑種として記録されているにすぎず、詳細な研究はされていない。そこで、ノジシバリがノニガナとオオジシバリの雑種起源であるのか否かを確かめるために、人工交配を行い、生じた雑種個体の外部形態と繁殖生態をノジシバリの type 標本から得られる特徴及び記載 (Kitamura 1936、1956) と比較し、その起源を考察した。

材料と方法

各実験に用いたノニガナ、オオジシバリの採集地を表 I-1 に示した。そのうち、新潟市西蒲区巻では、オオジシバリがノニガナと一部混生し、自然雑種と思われる個体が存在していたので、混生しない場所を選び、形態的差異を確認しながら慎重に採集し実験に用いた。

1. 人工交配実験

ノニガナとオオジシバリの頭花を 5 月上旬から 6 月中旬にかけて室内で 1 回だけ 10 秒間こすりあわせて受粉させた。受粉後は果実ができるまで袋をかけ、約 3 週間後に果実を回収し、9 月下旬に市販の種蒔き用の土壤に播種した。

2. DNA 量の比較

ノニガナ (21 個体)、オオジシバリ (21 個体)、ノニガナとオオジシバリの交配によって生じた個体のうち、ノニガナ (♀) × オオジシバリ (♂) (85 個体)、オオジシバリ (♀) × ノニガナ (♂) (17 個体) について DNA 量を比較した。

葉の断片約 2cm² に Extraction Buffer (Partec 社) を加えた後、カミソリで細切し、生じた懸濁液をメッシュで濾過した。濾液に Staining Buffer (Partec 社) を加え、数分間放置して核 DNA を染色し、フローサイトメーター (Partec PA-I, Partec GmbH, Münster, Germany) で、DNA 量を計測した。対照としてミヤコグサ (2 倍体、新潟市西蒲区巻) を用いた。

3. 外部形態の比較

ノニガナ、オオジシバリ、上記の交配実験によって雑種と認められた個体を各 30 個体程度、外部形態の比較を行った。小花長、小花幅、頭花径、内総苞片長、外総苞片長、果実の瘦果長と冠毛長をデジタルノギスで計測し、茎葉の形態、生育型及び分枝の様子を比較した。

小花長と小花幅は 1 頭花から小花を 3 つ選び平均値を算出した。頭花径長は完全に開花した頭花を 1 つ選び、3 回計測して平均値を算出した。内総苞片長は開花直前のつぼみの長さを 1 個体から 1 つ選び計測した。外総苞片長については、乾燥標本にしたのち、頭花につく一番大きいものを計測した。瘦果長は、1 頭花から最も大きな瘦果を 3 つ選び平均

値を算出した。また、冠毛長については1個の瘦果につく冠毛を3本計測して平均値を算出した。生育型及び分枝の様子は、各個体で模式図を作り比較した。

なお、他の実験結果を含め統計学的検定にはSteel-Dwassの多重検定を用いた。

4. 生育期間と開花特性に関する比較

オオジシバリ、ノニガナについて、生活環や花期は、新潟市西蒲区巻に自生するものを、開花条件と開花日数は、同地点で採取し、新潟市内で栽培したものを用いて交配実験で得られたF₁雑種（2008年9月下旬に播種し栽培したもの）と比較した。

5. 花粉稔性及び花粉サイズ

花粉稔性率は、ノニガナとオオジシバリは30個体、雑種は15個体について調べた。未開花の頭花をスライドガラス上に置き、そこに70%エタノールを1~2滴落としたのち、ピンセットで軽く叩いて碎き、エタノールが完全に乾いてから、ラクトフェノール・コットンブルー（MycoPerm-Blue）で染色し、視野中の染色された花粉の割合を花粉稔性率とみなし算出した。

花粉のサイズについては、ノニガナとオオジシバリは30個体、雑種は22個体を用いて、1頭花あたり10個についてマイクロメーターを用いて計測し、形状を観察した。

6. 結実率

ノニガナ、オオジシバリ（ともに31個体）及びノニガナ（♀）とオオジシバリ（♂）の雑種（25個体）を送粉昆虫が存在しない室内に置き計測。ノニガナ、オオジシバリについては、5~7月における自然条件下での頭花あたりの結実率を調べた。瘦果を形成した頭花の割合を結実頭花率とした。また、1頭花中に形成された瘦果を計測し、そのうち大きさと果皮の色から判断して稔性瘦果と見なされた瘦果の割合を頭花あたりの結実率とした。

結果

1. 人工交配実験の結果

ノニガナは午前中にだけ開花し、オオジシバリは約3日間開花する。ノニガナ×オオジシバリの人工受粉を行った結果、ノニガナを種子親とした場合、結実した頭花の割合は81.6%と高い値を示し、オオジシバリを種子親としたとき（42.0%）の1.9倍であった。また、頭花あたりの結実率も、ノニガナが種子親のときに高く（88.0%）、オオジシバリが種子親のとき（62.0%）より有意に高かった（ $P<0.05$ ）（表I-2）。

2. 実生の相対DNA量と倍数性

ノニガナのDNA量はミヤコグサを1とすると平均1.42、オオジシバリは平均4.47であった（図I-1）。すなわち、オオジシバリのDNA量はノニガナの約3倍であり、ノニガナは2倍体、オオジシバリは6倍体であるという従来の報告と一致した。

ノニガナ（♀）×オオジシバリ（♂）の種子から生じた実生の形態を観察したところ、葉の付き方と茎の伸長の様子から2つの型が認められた。1つは、ノニガナに類似し、葉の基部は茎を抱き、茎が直立するもの（A型：25個体）で全体の17.9%を占めた（図I-

1)。もう一つは、ノニガナとは異なり、葉の基部は茎を抱かず匍匐するもの（B型：115個体）で、残りの82.1%の個体で見られた。そこで、相対DNA量を前者の7個体、後者の83個体について計測したところ、前者は1.26～1.49で平均1.44、後者は2.30～3.53で平均2.88であった。前者の値は、ノニガナの値に近く、ノニガナが自家受精したことによって生じた2倍体と考えられた。一方、後者の値は、ノニガナの1倍体に相当するDNA量0.71の約4倍であることから4倍体すなわち、両種の雑種と考えられた。

一方、オオジシバリ（♀）×ノニガナ（♂）から得られた実生の形態はオオジシバリと類似していたが、DNA量は大部分が4.10～4.82で平均は4.37であったのに対し（C型：16個体）、3.18のものがみられた（D型：1個体）。前者はオオジシバリのDNA量と等しく6倍体とみなすことができるのでオオジシバリの自家受精によって生じたと考えられた。また、後者は6倍体×2倍体の雑種形成により生じた4倍体と考えられた（付録I-2）。なお、この個体の外部形態は計測していない。

3. ノニガナ♀×オオジシバリ♂の雑種の外部形態と稔性

a. 頭花の形質

ノニガナ、オオジシバリ、ノニガナ（♀）×オオジシバリ（♂）から得られた雑種 F_1 （以下雑種 F_1 と呼ぶ）の小花長と幅について散布図を作成した（図I-2）。ノニガナは、小花長、幅ともに小さくオオジシバリとは不連続であった。一方、雑種 F_1 は、小花長と幅ともノニガナとオオジシバリの中間値を示した。雑種 F_1 とノニガナ、雑種 F_1 とオオジシバリの間では有意な差が認められた（ $P<0.05$ ）。

頭花径、内総苞片長、外総苞片長、瘦果長、冠毛長については、雑種 F_1 はノニガナとオオジシバリの中間値を示し（表I-3）、雑種 F_1 とノニガナ、雑種 F_1 とオオジシバリの間で有意差が認められた（ $P<0.05$ ）。

b. 葉の形質

ノニガナはすべての茎葉に葉柄がなく基部は抱茎でやじり形、オオジシバリの匍匐茎の葉には葉柄があり、花茎に付く葉は葉柄がなく基部は漸先形からやや抱茎の鉾形であった。一方、雑種 F_1 の匍匐茎の葉のほとんどは葉柄があるが、花序の基部に付く葉は葉柄がなく基部は心臓形からやじり形であった（図I-3）。従って、雑種 F_1 の葉形はノニガナとオオジシバリの中間型といえる。

c. 生育型及び分枝

ノニガナは、ロゼットの中心部から直立した茎を伸ばし、茎葉の脇から分枝する（図I

—

4A) オオジシバリは地表部を這うように匍匐茎が伸び、成長とともに地下にもぐり地下茎となるものもあった。匍匐茎には葉がつき、しばしば節から発根した。花茎は匍匐茎の葉腋から仮軸的に分枝して生じた（図I-4C）。一方、雑種 F_1 は、複雑に分枝し、立ち上がり横たわるように匍匐茎を伸ばした（図I-4B）。植木鉢で育てたため、茎の途中から発根は確認していない。

4. 生育期間と開花特性

ノニガナ、オオジシバリ（ともに新潟市産）及び雑種 F_1 の生育期間と開花特性を比較したものを表 I-4 に示した。雑種 F_1 とオオジシバリでは共通する点が多く、共に多年生で、花期は、5 月初旬～7 月下旬であった。雑種 F_1 とオオジシバリは曇りでも開花した。ノニガナは 1 年生で、花期は 5 月中旬～6 月中旬に限定され、晴天時のみ開花した。一方、開花期間に関しては、オオジシバリは 3 日間開閉を繰り返すのに対し、ノニガナは 1 日で、雑種 F_1 は 1～2 日であった。

5. 花粉稔性

ノニガナの花粉は粒形が均一で、ほとんどの花粉の内容物が染色され、高い稔性を示すとみなされた。オオジシバリの花粉はノニガナよりも大きく、形が不揃いで、ノニガナよりやや低い花粉稔性を示した。一方、雑種 F_1 の花粉サイズはノニガナとほぼ同じであるが形が不揃いで花粉稔性もやや低かった（表 I-5）。

6. 結実頭花率と頭花あたりの結実率

オオジシバリは、室内（送粉昆虫がない環境下）ではほとんどの頭花で種子をつけないのに対し（12.9%）、野外では、全ての頭花で種子形成が行われているのを確認した（100%）。一方、ノニガナは、室内でも野外でも全ての頭花で種子形成が行われていた（100%）。

また、頭花あたりの結実率（表 I-5）は、オオジシバリは野外に比べて室内では極端に低下し、ノニガナでは室内でも野外でもいずれも高かった。雑種 F_1 は室内においてもすべての頭花で種子形成を行ない、頭花あたりの結実率はノニガナと同程度の高い値を示した。

考察

(1) 雑種 F_1 がノジシバリである可能性

ノジシバリ *I. × sekimotoi* Kitam. のタイプ標本は、栃木県河内郡城山村駒生（現在の宇都宮市）で、1935 年 5 月 16 日に採集されたもので（H. Sekimoto: KY0, TNS に収蔵）、これをもとに北村（1936）が記載し、原（1952）によりノジシバリと命名された。

北村（1936）の記載及びタイプ標本と雑種 F_1 を比較すると、葉の形態と分枝においてタイプ標本と雑種 F_1 にはいくつかの類似点が見られる。葉に関しては、分枝した茎に付く葉には葉柄があるが、花序の基部に付く葉には葉柄がなく、基部が心臟形から矢じり形である点、また、分枝に関しては、葉腋より複数分枝し草丈を伸ばす点である。内総苞片長、瘦果長、冠毛長に関してはほぼ同一であった（表 I-6）。しかし、記載では「やや全縁、またはしばしばまばらに羽状深裂—羽状中裂」とあるのに対し、雑種 F_1 は、ほぼ全縁でまれに羽状中裂し、葉のサイズはタイプ標本より大きかった。これは、交雑親であるオオジシバリにおいて、葉の大きさや鋸歯の様子に変異が多く、雑種の形態にもバラつきが生じたためと考えられる。雑種 F_1 の頭花の直径はオオジシバリとノニガナの中間の値を示

し、タイプ標本に記されていた「頭状花の大（き）さノニガナとジシバリ（オオジシバリ）の中間大」と一致した。また、花粉サイズについては、タイプ標本から分けていただき計測した結果、タイプ標本は 19.9 μ m に対して、雑種 F₁ は 19.4 μ m で両者に有意な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。

従って、ノニガナ×オオジシバリの雑種 F₁ はタイプ標本と北村の記載からノジシバリと同定され、ノジシバリは kitamura(1936, 1956) が指摘したように、ノニガナとオオジシバリの種間雑種と考えることが妥当である。

(2) ノジシバリの種子親

ハマニガナとオオジシバリの種間雑種であることが明らかにされたミヤコジシバリの場合、種子親は、琉球列島ではハマニガナ（Denda and Yokota 2003）、愛知県渥美半島や大分県佐伯市ではオオジシバリである（合田他 2014）ことが判明しており、ハマニガナとオオジシバリの間では両種とも種子親になりうるようである。

本研究における交配実験の結果、ノニガナを種子親とした場合は 80 個体以上の雑種 F₁ が得られたのに対し、オオジシバリを種子親とした場合、得られた雑種 F₁ は 1 個体のみであった。オオジシバリがノニガナの花粉を受け入れにくい何らかの遺伝的生理的システムが存在するのかもしれない。ノジシバリの種子親がノニガナである可能性は高いと考えられるが、今後の課題として残されている。

(3) ノニガナとオオジシバリの交配システム

ノニガナは、野外においても送粉昆虫のいない室内においても高い結実率を示したので、同一頭花内で自家受精を行う仕組み（自動自家受粉）を持つと考えられる。ノニガナ（♀）×オオジシバリ（♂）の交配実験の結果、ノニガナの自家受精による子どもが多数生じたのは、ノニガナのこの交配システムを考慮するとよく理解できる。

一方、オオジシバリの結実率は、野外では高い値を示したが、室内では大きく低下した。筆者は、水を入れた容器にさしたオオジシバリの開花前の頭花を 40 個用意し、昆虫のいない室内に置いて追加的に交配実験を行った。開花後、半数は人工的に他家受粉させ、半数は筆を用いて自家受精させたところ、他家受粉させたものは 18% の頭花において結実が見られたが、自家受粉させたものは全く結実しなかった。オオジシバリは自家不和合性である可能性が高いと考えられる。

オオジシバリ（♀）×ノニガナ（♂）の交配実験の結果生じた 6 倍体は、オオジシバリの自家受精によるものと考えられる。今回の交配実験は頭花同士のこすりあわせ法によるもので、種子親としたオオジシバリの雌しべには、ノニガナの花粉とともに同じ頭花のオオジシバリの花粉も受粉する機会があった。自家受精による子どもが生じたというのは、自家不和合性が破られたことを意味する。

強い自家不和合性をもつことで知られているタンポポ属の場合でも、頭花のこすりあわせ法による異種間の人工交配実験の結果、自家不和合性が壊れて自家受精による後代が多数生じた事例が報告されている（Morita et al. 1990）。ノニガナの花粉はオオジシバリと

の間で交雑不和合を示すが、ノニガナの花粉外壁が含む何らかの物質の作用により、オオジシバリの自家不和合性が崩壊し、その自家受精が可能となったものとする。

Ⅱ章 自然集団におけるノニガナ、オオジシバリならびに雑種の形態比較

目的

新潟県新潟市西蒲区巻の 1 地点において、ノニガナとオオジシバリが生育する混生集団が存在する。2009 年～2015 年にかけて、オオジシバリと形態は良く似ているが頭花径がオオジシバリより小さく、さらに、葉の基部がノニガナの特徴であるやじり型の個体が見られ、ノニガナとオオジシバリの雑種（ノジシバリ）ではないかと考え観察を始めた。その結果、両者の中間的な形態をもつ個体（以下中間個体と呼ぶ）が複数生じていることが分かってきた。そこで、ノニガナ、オオジシバリならびにノジシバリと中間個体の外部形態と繁殖生態の比較を行った。

材料と方法

新潟市西蒲区巻にて生育していた中間個体のうち、NISHI-1、NISHI-2、NISHI-3、NISHI-4、NISHI-5 の 5 個体を対象に、DNA 量の計測、繁殖生態と外部形態の比較を行った（付録Ⅱ-1）。オオジシバリとノニガナ、人工交配で生じた雑種 F_1 （本章では、ノジシバリ）の計測値は、Ⅰ章の結果を引用した。また、中間個体（NISHI-1～5）はいずれもそれぞれ 1 個体で、計測は同一個体を複数回、別の個所を計測したものである。なお、方法の詳細はⅠ章の材料と方法を参照。

1. DNA 量の比較

ノニガナを 21 個体、オオジシバリを 22 個体、人工交配で形成したノジシバリを 83 個体、新潟県新潟市西蒲区巻でみられる NISHI-1～5 の DNA 量をⅠ章と同様にフローサイトメーターで計測し比較した。

2. 外部形態的の比較

NISHI-1～5 の外部形態を計測し比較した。計測方法は、Ⅰ章と同様に計測したが、外総苞片は、乾燥標本ではなく、乾燥前の頭花につく一番大きいものを選び計測した。ただし、NISHI-4、5 については、内総苞片長と外総苞片長の計測は行っていない。また、NISHI-3 は、茎葉の形態の観察についてはデータ不足で十分に検討できなかった。

3. 花粉の観察

ノニガナ（30 頭花）、オオジシバリ（30 頭花）、人工交配で形成したノジシバリ（22 個体の 1 頭花）、NISHI-1（1 頭花）、NISHI-2（1 頭花）、NISHI-4（1 頭花）、NISHI-5（1 頭花）の 3 個体の花粉を、コットンブルーラクトフェノール溶液により染色し観察に用いた。

結果

1. DNA 量の測定結果

DNA 量に関しては、ミヤコグサの DNA 量を 1 としたとき、ノニガナは 1.42、オオジシバリは 4.47、ニガナとオオジシバリの雑種であるノジシバリは 2.88 であるのに対し、NISHI-1、NISHI-2、NISHI-4、NISHI-5 は、2.4～2.84 で、ノジシバリの DNA 量とほぼ一致した（図Ⅱ

-1)。しかし、NISHI-3 は 1.9 と値が低かった。

2. 外部形態比較

ノニガナとオオジシバリとノジシバリと NISHI-1、NISHI-2、NISHI-3、NISHI-4、NISHI-5 に関して外部形態較を行った結果とノジシバリとの U-検定を行った結果を表 II-1 に示す。

a. 頭花の形質

小花長、小花幅、頭花径については、ノジシバリ（小花長 13.63 mm、小花幅 2.96 mm、頭花径 20.9 mm）に対し、NISHI-1、2、5 はいずれも少し大きかった。NISHI-4 は、ほぼ、同じく、NISHI-3 はノジシバリや他の 4 つよりいずれも小さかった（図 II-2a~c）。

総苞片は、NISHI-1~3、5 の比較で、ノジシバリの内総苞片（9.08 mm）に対して NISHI-5 は有意な差は認められず、また、ノジシバリの外総苞片（1.84 mm）に対して、NISHI-1、2、5 は有意な差が認められなかった。

瘦果は、ノジシバリの瘦果長（3.87 mm）に対し、NISHI-2 の値は大きく、NISHI-3 は小さかった。また、ノジシバリの冠毛長（5.33 mm）に対しても、NISHI-2 の値は大きかった（図 II-2d, e）。

小花幅、小花長、瘦果長、冠毛長で NISHI-4 はいずれもノジシバリと有意な差が認められなかった（ $P>0.05$ ）。一方、冠毛長以外の小花幅、小花長、内総苞片、外総苞片、瘦果長で NISHI-3 はノジシバリと有意な差が認められた（ $P<0.05$ ）。

b. 葉の形質

NISHI-1~5 の茎葉が漸先形で葉柄がある場合と葉柄がなく鋭形の場合があった。一方、花茎から出る葉は葉柄がなく、鋭形からやや抱茎の鈍形のものや心臓からやじり形であった。NISHI-1 と NISHI-5 の茎葉の様子を図 II-3 に示した。

c. 生育型および分枝

ノジシバリ同様、NISHI-1、NISHI-2、NISHI-4、NISHI-5 は、地上部を這う茎が形成するが、オオジシバリのように地下にもぐることではなく匍匐茎となり仮軸分枝を形成する（図 II-4）。NISHI-1、4、5 では、時々茎途中から細い根を出しているのを確認した。NISHI-3 に関しては、詳細な観察を行っていない。

3. 生育期間および開花期間

ノジシバリ同様、NISHI-1、NISHI-2、NISHI-4、NISHI-5 などは、ほぼ 1 年中地上部を展開する。5 月から 7 月位まで盛んに開花し、その後 11 月頃まで花をつけるものもあった。また、曇りでも開花し、開花期間は 1~2 日であった。なお、NISHI-3 に関しては詳細な観察を行っていない。

4. 花粉の観察

花粉サイズは NISHI-1 が 21.2 μ m、NISHI-2 が 22.2 μ m、NISHI-4 は、23.0 μ m、NISHI-5 が 23.3 μ m で、いずれもノニガナ（19.2 μ m）やノジシバリ（19.5 μ m）よりも大きく、有意な差が認められた（ $P<0.05$ 表 II-2）。一方、これら 3 つの花粉サイズは、オオジシバリ（24.5 μ m）よりも小さく、有意な差が認められた。花粉サイズは、ノジシバリ同様、NISHI-1、2 は

不そろいで、NISHI-4 および 5 の花粉も多少ばらつきが見られた。また、花粉稔性率は、ノジシバリが 82.5% に対して、NISHI-4、NISHI-5 については花粉稔性率が 87.8%、60.5% であった（表Ⅱ-2）。

5. 頭花あたりの結実率

NISHI-1 は、自然環境下での結実率と室内での結実率では、室内での結実率が非常に下がった。一方、NISHI-2 は、室内と野外では変わらなかった。NISHI-4 は、結実がほぼ、NISHI-2 と同じであったが、NISHI-3 と NISHI-5 は、結実する頭花数も少ない上に、頭花当たりの結実率も低かった（表Ⅱ-3）。

考察

(1) 新潟市西蒲区巻でのノジシバリ形成の可能性

NISHI-1~5 は、オオジシバリとノニガナの混生集団で見られた個体で、NISHI-1 は DNA 量および染色体数の計測の結果、4 倍体であり、NISHI-2、NISHI-4、NISHI-5 についても DNA 量の測定から 4 倍体であると考えられる。特に、人工交配してできたノジシバリと比較した結果、NISHI-4 について、結実率は若干低く、花粉サイズが少し大きい、頭花径、小花幅、小花長、瘦果長や冠毛長には有意な差が認められず ($P>0.05$)、また、分枝の様子や葉の特徴も類似していた。従って、新潟県新潟市巻町の自然環境下においても、ノジシバリが形成されていると考える。

ただ、NISHI-1 は、小花長や幅、内総苞片長で有意差が認められた ($P<0.05$)。NISHI-5 は、小花長や頭花径、花粉サイズで、ノジシバリと有意差が認められた ($P<0.05$)。さらに、NISHI-2 は、頭花径、小花幅、小花長、内総苞片長、瘦果長や冠毛長、花粉サイズはノジシバリより大きく有意差が認められた ($P<0.05$)。また、NISHI-5 については、非常に結実率が低かった。この場所では、広範囲にオオジシバリが生息していて、その中で頭花が比較的小さく、葉の形態に特徴的な変異を有する集団が存在する。フローサイトメーターで計測したところ、6 倍体であった（未発表）。また、オオジシバリの形態計測結果でも、小花長や頭花径などは、ニガナやイワニガナ（Ⅲ章を参照）と比較しても標準偏差が大きく、オオジシバリは集団における遺伝的変異が存在すると考えられる。そのため、4 倍体雑種間でも形態に変異が生じたのではないかと考えられる。

(2) 中間雑種の花期のずれ

新潟市西蒲区巻のふれあい公園では、オオジシバリのみが見られるところと、ノニガナと混生集団を形成しているところとがある。その場所では 6 月上旬になると、刈りとられ、ノニガナはその後、再び側芽を伸ばして開花し、そして 7 月頃には見られなくなる。一方、オオジシバリは草刈り後に、花数が減り、真夏には全く花は見られなくなる。ところが、中間雑種と思われる個体はノニガナ、オオジシバリの両種の花期が終了した時期にも、数は少ないが開花が見られる。また、天候によって、ノニガナ、オオジシバリは開花しないが、中間雑種は、開花しているものもあり、雑種形成の結果、開花のメカニズムに多少変異が生じた

ものと思われる。

(3) ノジシバリの3倍体

琉球列島と渥美半島、大分県佐伯市蒲江の砂浜海岸には、 $2n=16$ (2倍体)のハマニガナとオオジシバリ(6倍体)の自然交雑の結果 $2n=32$ (4倍体)のミヤコジシバリが見られるが、それらの場所からさらに、ミヤコジシバリから染色体の倍化や、両親種との戻し交雑等を通して、3倍体、5倍体、6倍体、7倍体、8倍体などが形成している(Denda and Yokota 2004、傳田 2006、合田他 2014)。ノジシバリでも、80%以上と花粉稔性率が高いことから、ミヤコジシバリ同様、オオジシバリあるいはノニガナとの戻し交雑や染色体の倍化が生じる可能性が考えられる。

NISHI-3の個体は、全体的に、サイズが小さく、オオジシバリよりもノニガナに近いサイズであった。また、種子は、生じるが結実率は4%と低く配偶子形成がうまくいっていない。DNA量の測定の結果、他の4つの個体よりもDNA量が少なく、およそオオジシバリの3分の1の量であることから、ノジシバリの3倍体の可能性がある。

今後もさらに、現地を調査し、形態ならびにDNA量を確認する必要がある。

Ⅲ章 ノニガナとイワニガナの雑種ーヒメノジシバリの形成ー

目的

ノニガナと花の特徴は類似するが、花径の大きさなどが異なる個体が長野県の1ヶ所と新潟県魚沼市の1か所で確認された。いずれも、確認された付近でオオジシバリはみられず、ノニガナとイワニガナが生育していた。ノジシバリのタイプ標本と一緒に保存されていた標本と似ていることから、それらの個体の習性ならびに外部形態の特徴について、ノニガナ、イワニガナ等と比較した。また、ノニガナとイワニガナを交配し、生じた個体とも比較した。

材料と方法

1. 生活環の観察

長野県下水内郡栄村青倉において、2005年6月16日、花壇の脇に2個体生育しているのを見つけ（石澤進氏）、そのうちの1つを根ごと採取し、鉢植えにした。その後、個体が大きくなったところで、茎葉を1~2枚をつけた茎を10cm程度に数本切り、さし木の要領で土に植え個体を増やした。なお、生育地の近くにノニガナとイワニガナが見られた。

さらにもう一つは、魚沼市（旧守門村）にて2014年6月14日に休耕田脇にて1個体生育しているのを見つけ、根ごと採取し鉢植えにした。こちらもさし木の要領で個体を増やした。なお、生育地には多くのノニガナが見られたほか、同地区にイワニガナの生育も確認した。

以下、長野県下水内郡栄村青倉の個体は（HIME-A）、新潟県魚沼市の個体は（HIME-B）とする（付録Ⅲ-1）。

2. 外部形態の比較

HIME-A、HIME-B、新潟県新発田市、西区、西蒲区、長岡市、南魚沼郡長森のイワニガナ（付録Ⅲ-2）の外部形態をI章と同様な方法で計測し、I章で計測したノニガナ、ノジシバリ（人工交配で生じた雑種F₁）と比較を行った。採集地に関しては、表Ⅲ-1に示した。なお、HIME-A、HIME-Bはいずれも1個体中の各部所の計測値である。

3. DNA量の計測

新潟県弥彦村、秋葉区、佐渡市から採集してきたイワニガナとHIME-Bについて、DNA量をフローサイトメーターで測定した。なお、HIME-AのDNA量は計測していない。

4. 花粉の観察

イワニガナとHIME-Bの花粉をコットンブルーラクトフェノール溶液により染色し観察を行った。イワニガナは新潟県刈羽郡小国町（1個体）、新潟県五泉市（1個体）、新潟県東蒲原郡上川村（1個体）、新潟県西頸城郡青海町（1個体）、新潟県北蒲原郡黒川村（4個体）、加茂市（1個体）、新発田市下田村（1個体）の計10個体を、HIME-Bは81粒の花粉を計測した。また、花粉稔性率について、イワニガナは10個体、HIME-Aは2個、HIME-Bは27個の未開花の頭花を用いて求めた。なお、HIME-Aの花粉サイズは計測していない。

5. 結実頭花率と頭花当たりの結実

HIME-B とイワニガナの 5 月の自然条件下での結実頭花率と頭花当たりの結実率を調べた。

6. イワニガナとノニガナの交配実験

2008 年 5 月中旬から 6 月上旬にかけ、小千谷市（6 個体）と長野県下水内郡栄村（1 個体）のノニガナと新潟市秋葉区（3 個体）と弥彦村（3 個体）のイワニガナの頭花を用いて交配実験をおこなった。また、2010 年 5 月下旬から 6 月上旬にかけ、新潟市西蒲区巻のノニガナ（23 個体）と長岡市（15 個体）と新潟市西区の新潟大学の構内に生息するイワニガナ（17 個体）の頭花を用いて交配実験をおこなった。いずれも、結実した果実を回収後、9 月に播種した。2009 年にも交配実験を行ったが、果実を回収できなかった。

結果

1. 生活環の比較

HIME-A は、2005 年～2007 年の間に栽培しその後は一気に衰弱し、枯れた。HIME-B は、2014 年から栽培し始め、2016 年 12 月の段階でまだ生育しているが、前年度よりは衰弱している様子である。開花は、HIME-A、B とも、4 月中旬から開花し、9 月頃まで開花した。花は、夜間に閉じるが、HIME-A は 4 日間、HIME-B は 2 日開閉を繰り返したのを観察した。HIME-A はほとんど種子の形成は見られず、HIME-B は少量ではあるが種子を形成した。HIME-A、HIME-B は、いずれも、冬期間は葉が少なくなり、春になると再び葉を多く形成した。

イワニガナは多年生で、5 月上旬～8 月頃まで開花し、開花期間は 2 日で、曇りでも開花する。冬期間は地上部がない。

2. 外部形態の比較

ノニガナ、イワニガナ、ノジシバリと HIME-A、HIME-B の外部形態の計測を行った結果とノジシバリと U-検定を行った結果を表Ⅲ-2 に示した。HIME-A と HIME-B とでは、HIME-B の冠毛長以外はノジシバリと有意な差が認められ、ノジシバリと異なるものであることがわかった。なお、種子に関する計測は HIME-B のみ行うことができた。

a. 頭花の形態

頭花径、小花長、幅、内総苞片長とも **HIME-A、HIME-B は**、ノニガナとイワニガナの間値を示した。HIME-B については、瘦果長、冠毛長についても、ノニガナとイワニガナの間値を示した。（図Ⅲ-1a～f）。

b. 葉の形態

イワニガナの茎葉は、円形または楕円形で、全縁に対し（図Ⅲ-2a）、HIME-A、HIME-B は披針形から倒披針形で細長く（図Ⅲ-2b）、ノニガナほどではないが、基部は茎を抱くものや葉柄をつけるものもみられた。

c. 分枝の比較

イワニガナは、オオジシバリと異なり匍匐茎を長く伸ばし、茎葉の出ているところから発根が見られる。一方、HIME-A、B の茎は、いずれも倒れて匍匐しているように伸びるが、

茎葉の出ているところからの発根はなく、仮軸分枝を繰り返す（図Ⅲ-3）。

3. DNA 量の計測

HIME-B については DNA 量の計測を行い、ノニガナ、イワニガナ、ノジシバリとの比較を行った。ミヤコグサの DNA 量を 1 としたとき、ノニガナは 1.42、イワニガナは 1.58、HIME-B は 1.36 で、いずれも 2 倍体であることが分かった（図Ⅲ-4）。染色体数は、HIME-A、B とも計測をしていない。

4. 花粉の観察

イワニガナ、ノニガナの花粉の長径はそれぞれ 19.2 μ m、22.8 μ m で、HIME-B は 19.8 μ m であった。花粉稔性率は、イワニガナが 92.1%、ノニガナが 99%と高い値を示したが、HIME-A は 58.6%、HIME-B は 51%であった（表Ⅲ-3）。花粉の形状は、イワニガナでは、ほぼ形がそろっていたが、HIME-B は少々不揃いであった。

5. 結実頭花率と頭花あたりの結実率

HIME-B の結実頭花率は 30%程度であるが、頭花あたりの結実率は 3.5%程度で、種子を形成した小花はごくわずかであった。一方、イワニガナの花あたりの結実率は 67.5%であった（表Ⅲ-3）。

6. イワニガナとノニガナの交配実験の結果

2008 年、2009 年、2010 年にイワニガナとノニガナの交配実験を行った。雑種らしいものができたのは 2008 年と 2010 年の交配実験の 2 回であった。2008 年の交配実験は、ノニガナとイワニガナをそれぞれ 7 頭花こすりつけ人工受粉させたところ、ノニガナを種子親とした 5 頭花の結実がみられた。そのうち 1 頭花の瘦果から発芽した 4 個体中 1 個体がノニガナの分枝とは異なり、仮軸分枝であった（付録Ⅲ-3）。DNA 量を計測したところ、2 倍体であることを確認した。一方、イワニガナを種子親とした 1 頭花は結実が見られたが、発芽は確認できなかった。2010 年の交配実験は、ノニガナとイワニガナをそれぞれ 23 頭花こすりつけ人工受粉させたところ、ノニガナを種子親としたときに 1 頭花のみ結実が確認された。その頭花の瘦果 10 個を植えたところ、5 個体が生育した。そのうち 4 個体はノニガナであったが、残りの 1 個体はノニガナの分枝の様子とは異なり、仮軸分枝（図Ⅲ-5）となった。葉の形態については、生育地で見られた雑種と同様にノニガナほどではないが、基部は茎を抱くものや葉柄をつけるものもみられた。また、開花期間が 2、3 日間だが、稔性種子は得られなかった。さらに、小花長も 2 mm 程度でノニガナより多少大きかった（写真より判断。付録Ⅲ-4）。

考察

（1）北村（1956）によるノニガナとイワニガナの雑種の可能性

京都総合博物館には、ノニガナとオオジシバリの雑種であるノジシバリの標本の中に茎葉の形態が異なるものが見られる（付録Ⅲ-5）。前者（標本 A：1935 年 5 月 16 日 河内郡城山村駒生 H. Sekimoto. ;KYO, TNS に収蔵）はタイプ標本で *I. × sekimotoi* の記載どおり羽

状深裂—羽状中裂の茎葉がみられるのに対し、後者（標本 B：1935 年 6 月 14 日武蔵國元八王子城山及其附近恩方村山地 佐藤達夫採集）は、まばらな欠刻があるものの、ほぼ全縁で裂片がない。*I. × sekimotoi* の記載に北村（1956）は、この 2 つの標本を引用していて、標本 A は、*I. × sekimotoi* を *I. debilis*（現在の *I. japonica*） \times *I. polycephala* と記載しているのに対し、この標本 B には *I. polycephala \times *I. stolonifera*? と記しており、標本 B がノニガナとイワニガナの雑種の可能性を示唆している。また、記載によると標本 B は標本 A より内総苞片長は 1mm 程度小さく 7~8 mm で、瘦果長が 0.5mm ほど大きく 4 mm と記されている（表Ⅲ-4）。標本 B と同場所、同日に採集された標本が、国立科学博物館にも保存され、葉の形は標本 B と同一であった。さらに、国立科学博物館には、「武蔵拝島」にて 1949 年 5 月 31 日に桧山氏が採集したもの（標本 C）、「上野沼田」にて 1958 年 7 月 7 日に武井武一氏が採集したもの（標本 D）が保存されている（付録Ⅲ-5）。標本 C は、標本 A と同じように、羽状深裂—羽状中裂であるのに対し、標本 D は、標本 B と同じように、茎葉はまばらな欠刻があるものの、ほぼ全縁で裂片がなかった。おそらく、これらの標本 B、D は、同一種であると考えられる。*

ノニガナを種子親としてイワニガナと掛け合わせた結果生じた個体は、ノニガナの分枝や茎葉と異なったものが形成された。その形態は、分枝に関してはノジシバリと同様であるが、小花長、小花幅、頭花径、外総苞片長は、ノジシバリより小さい。また、茎葉は小型で裂片がない。これらの点は標本 B と共通している。また、この交配によって生じた個体は不稔であったが、ノニガナとイワニガナの雑種であれば、おそらく、2 倍体同士の掛け合わせのため不稔になるであることが考えられる。標本 B もほとんど瘦果を形成していなかったことと共通する形態的特徴から、標本 B については、ノニガナ \times イワニガナの雑種と考えられ、ノニガナ \times オオジシバリの雑種であるノジシバリではないと判断できる。

（2）HIME-A、B がノニガナ \times イワニガナの雑種である可能性

HIME-A、B は、小花長、幅、頭花径、内総苞片、冠毛長で、ノニガナとイワニガナの間値を示し、瘦果長はイワニガナより 0.15 mm 大きかった。これらの個体はいずれも、イワニガナのような地上部に匍匐する茎をもつが、茎葉部での発根はみられなかった。また、小花長、幅、頭花径、瘦果長、冠毛長について Steel-Dwass 検定を行った結果、HIME-B とノニガナ、イワニガナとも有意な差が認められた（表Ⅲ-2）。ただ、HIME-A と HIME-B の小花長、小花、頭花径などいずれも U-検定では有意な差が認められた（ $P < 0.05$ ）。従って、HIME-A に関しては、DNA 量の確認はとれなかったが、種子が形成しにくいこと、形態比較の結果から、HIME-A、B ともノニガナとイワニガナの雑種であると考えられる。

新潟県新津資料館に保存されているイワニガナの標本の中に、HIME-B やノニガナ（♀） \times イワニガナ（♂）の交配によって生じた個体と同じ形態をとるものがみられた（付録Ⅲ-6）。それは、地上部を匍匐する茎をもつが、茎葉部での発根が見られず、葉は比較的細長く、茎を抱き、仮軸分枝を行う。また、小さい個体は、イワニガナの特徴である短い茎の葉腋から花径を伸ばし数個の頭花をつけるが、比較的大きな個体は、長く伸びた茎葉の葉腋から花

径を伸ばし数個の頭花をつけるといった標本Bと同様な形態をもっていた。また、種子の形成は、数点ある標本の中では見られなかった。総合的に考えて、この標本もノニガナとイワニガナの雑種であると思われる。

以上のことから、ノニガナとイワニガナの雑種は、注意深く観察していれば、各地で生じている可能性が考えられる。しかし、種子形成はほとんど行わず、匍匐茎などによる栄養繁殖もイワニガナのように行えないため、増殖する可能性は低い。だが、稔性があると思われる花粉形成は行っていることから、今後新たな種形成に関わる可能性は否定できない。

以下、このノニガナとイワニガナの雑種を

(仮称) ヒメノジシバリ、*Ixeris* \times *pseudosekimotoi* と表記する。

(3) イワニガナの交配システム

I 章でオオジシバリは自家不和合性の可能性が高いことを考察した。一方、イワニガナは、送粉昆虫のいない室内に置いても、自家受精を行い結実したことを確認したことから、自家不和合性を持つ可能性は低いと考えられる。ヒメノジシバリもノジシバリ同様に、ノニガナが種子親となり、イワニガナが種子親となった個体は確認していない。今回の交雑実験の回数が少ないことも考えられるが、イワニガナもオオジシバリ同様に、ノニガナの花粉を受け入れにくい何らかの遺伝的生理的システムが存在するのかもしれない。

IV章 旧ニガナ属 (*Ixeris*) の分子 (DNA) マーカーを用いた系統解析

目的

葉緑体 DNA の転移 RNA の遺伝子である *trnT* と *trnF* の間の非コード領域は、種レベルで変異のある領域として知られていて、この領域を用いた系統樹の作成も行われている。また、葉緑体 DNA は被子植物の多く、特にキク科植物では母性遺伝することが知られており、キク科タンポポ属に関しても葉緑体 DNA マーカーを用いた自然雑種の研究が行われている (Shibaike 2002)。II 章で述べたように、ノジシバリはノニガナとオオジシバリの、ヒメノジシバリはノニガナとイワニガナの種間雑種であると推定された。しかし、自然集団で生じた雑種の母親 (種子親) となった種がどちらなのかは特定できなかった。そこで、自然集団で生じたノジシバリ (II 章の NISHI-1)、ヒメノジシバリ (III 章の HIME-A) 及び、ノニガナ、オオジシバリ、イワニガナについて、DNA を抽出し、葉緑体 DNA マーカー (*trnL-trnF* 間の非コード領域の塩基配列) を用いて、両者の母系系統を確認した。さらに、核 DNA マーカーである ITS (Internal Transcribed Spacer : リボソーム RNA 遺伝子間の非コード領域) と、ミヤコジシバリの起源の証明に用いられていた核 DNA のマーカーである ETS (External Transcribed spacer) 領域についても、同様に塩基配列を明らかにし、個体間の関係を推察するとともに、両者の父系系統を確認し自然雑種形成が行われる過程を考察した。

さらに、前述したように旧ニガナ属 (*Ixeris*) は染色体基本数と冠毛の色と中果皮にみられる細胞学的な相違に基づき、独立した 2 属 *Ixeris* (ノニガナ属) と *Ixeridium* (ニガナ属) に分類されている (Pak and Kawano 1992、矢原 1995、大橋他 2017)。ノジシバリやヒメノジシバリのような種間雑種は、*Ixeris* (新) に属する種間でのみ生じ、*Ixeridium* の種との間では生じていない。このことは、*Ixeris* (新) と *Ixeridium* に属を分けることの妥当性を示していると思われる。そこで、旧ニガナ属の外群も含め塩基配列を読み、系統樹を作成することで、*Ixeris* (新) と *Ixeridium* の系統関係の検討を行った。

方法と材料

1. 葉緑体 DNA マーカー (*trnT-trnF* 間の非コード領域の塩基配列) を用いた比較

ノジシバリ (II 章の NISHI-1) とヒメノジシバリ (III 章の HIME-A)、ノニガナ属のノニガナ、イワニガナ、オオジシバリに加えて、表 IV-1 で示す計 25 種について *trnT-trnF* 間の非コード領域の塩基配列 (約 1350bp) を比較した。

DNA の抽出は、CTAB 法を用い、その後、PCR 反応法を用いて比較したい領域の塩基配列を増幅した (付録 IV-1)。なお、*trnT-F* 領域の塩基配列は、6 つのユニバーサルプライマー (表 IV-2) を用いて 3 つの区間 (*TrnT-a* と *TrnL5-b* 間 (AB 間)、*TrnL5-c* と *TrnL3-d* (CD 間)、*TrnL3-e* と *TrnF-f* (EF 間)) の解析を行った。

増幅した塩基配列を、ABI 社のオートシーケンサー (ABI PRISM 310) で泳動・解析を行った。解析には、解析ソフト Sequencher (Version 4.0.5 Gene Codes Corporation) で波形を確認し、CLUSTAL X1.81 でアライメントを行った。その後、得られたデータを系統

樹作成ソフト MEGA 6 (Tamura K et al. 2013)で NJ 法を用いて系統樹を作成し、ブートストラップ確率によってその信頼性を検討した。ただし、ノジシバリについては、ノニガナオオジシバリ、イワニガナに変異がみられた EF 間のみの解析したため、系統樹の中には含まれていない。

2. 核 DNA マーカーである ITS (Internal Transcribed Spacer : リボソーム RNA 遺伝子間の非コード領域) の塩基配列 (約 600bp) の比較

葉緑体マーカーと同様に、ノジシバリ (Ⅱ章の NISHI-1) とヒメノジシバリ (Ⅲ章の HIME-A)、ノニガナ属のノニガナ、イワニガナ、オオジシバリに加えて、表Ⅳ-1 に示す計 30 種に関して、表Ⅳ-2 に示すプライマーを用いて ITS 領域の解析を行った。加えて、日本 DNA データバンク (DDBJ) より一部の塩基配列を参照し系統樹を作成した。アクセッション番号に関しては表Ⅳ-1 に示した。

3. ETS 領域のクローニング、

葉緑体 DNA マーカー、核 DNA マーカーと同様に、表Ⅳ-1 に示す 7 種を ETS (External Transcribed spacer) 領域について、表Ⅳ-2 のプライマーで増幅させ、オートシーケンサーで塩基配列を読み取った。その結果、同一種内で同じ position で塩基の相違が見られたため、さらに、詳しく解析すると、イワニガナ、オオジシバリの数か所で複数の塩基のピークが見られたことから、ETS 領域の繰り返し配列内に変異があると考え、クローニング (付録Ⅳ-1) をして、相違のあった 8 か所についてそれぞれの塩基のパターンを求めた。

結果

1. 葉緑体 DNA マーカー (運搬 RNA の遺伝 *trnT*-F 間の非コード領域) の比較

trnT-F 間の非コード領域は、*trnT*-a から *trnL*5-b (ab 間)、*trnL*5-c と *trnL*3-d (c d 間)、*trnL*3-e と *trnF*-f (ef 間) の 3 つの区間に分かれているが、ab 間ではほとんどの種で両方のプライマーで数塩基が読み取れなかった。また、フクオウソウに関しては、CD 間では *trnL*5-c 側で、ef 間では *trnF*-f 側で、オオジシバリとカワラニガナでは、*trnL*3-d 側で、配列が読み取れなかった。表Ⅳ-3 には各領域で読み取れた塩基数を示す。

a. ノジシバリとヒメノジシバリの結果

ノニガナ属のノニガナ、ノジシバリ (Ⅱ章の NISHI-1)、ヒメノジシバリ (Ⅲ章の HIME-A)、イワニガナ、オオジシバリで確認できた塩基配列について比較すると、「ノニガナ・ノジシバリ・ヒメノジシバリ」と「イワニガナ・オオジシバリ」の 2 グループがそれぞれ同じ塩基配列で、*trnL*3-e と *trnF*-f (ef 間) で 1 塩基だけ相違が見られた (表Ⅳ-4)。

b. ノニガナ属 (*Ixeris*) 計 7 種とニガナ属 (*Ixeridium*) 計 2 種との塩基の比較

ノニガナ属のノニガナ、ハマニガナ、イワニガナ、オオジシバリ、カワラニガナ、タカサゴソウ、ヒメノジシバリの計 7 種、ニガナ属のニガナ、オオバナニガナの計 2 種について、インデルを比較した。ノニガナ属のうちタカサゴソウとカワラニガナの 2 種に共通性

がみられ、他の4種とは3か所で異なっていた。また、ニガナ属のニガナとオオバナニガナでもインデルは共通しており、ノニガナ属のノニガナ、ハマニガナ、イワニガナ、オオジシバリ、ヒメノジシバリと数か所で異なっていた（表IV-4）。なお、cd間では、ノニガナ属、ニガナ属の双方で変異がほとんどなかった。

c. 22種の塩基配列の比較ならびに系統樹

配列を読み取ったノニガナ属とニガナ属を除いた13種については、インデル部位が共通していたものは、CD間でフクオウソウとオオニガナ、オニノゲシとノゲシ、アゼトウナとワダンとヤクシソウ、EF間ではフクオウソウとオオニガナ、オニノゲシとノゲシであった。これら、葉緑体DNAの *trnT-a* と *trnF-f* 間のすべての塩基配列を用いて系統樹を作成した（図IV-1）。作成した系統樹では、ノニガナ属とニガナ属がそれぞれ単系統を形成した。

2. 核DNAマーカーであるITS（Internal Transcribed Spacer：リボソームRNA遺伝子間の非コード領域）の塩基配列

表IV-3に示す18種類の塩基配列を読み取を試みたが、いずれも、両方のプライマーの前後で、配列が確認できなかった。

a. ヒメノジシバリとノジシバリについて

表IV-5に示すように、120番、189番、577番の3か所でノニガナはイワニガナ、オオジシバリ、ノジシバリ、ヒメノジシバリの4種と配列が異なっていた。ヒメノジシバリは、同じ個所で少量であるがノニガナのもつ塩基を含んでいることを確認した。同様に、ノジシバリも配列が読めなかった577番以外ノニガナのもつ塩基を含んでいることを確認した。また、79番でオオジシバリとイワニガナでは相違があり、ヒメノジシバリとイワニガナは同じ塩基であった。

b. *Ixeris* と *Ixeridium* の比較

配列を読んだノニガナ属のノニガナ、イワニガナ、オオジシバリ、カワラニガナ、ヒメノジシバリに加えて、DDBJで参照したノニガナとカワラニガナとタカサゴソウの配列も含め計6種とニガナ属のニガナ、オオバナニガナの計2種を比較した（表IV-5）。ノニガナ属のうちタカサゴソウとカワラニガナの2種に共通性がみられ、他のノニガナとは数か所で相違が見られた。また、ノニガナ属とニガナ属では全体の10%で相違が見られた。

c. 22種の塩基配列の比較ならびに系統樹

大きな欠失はブタナ（11塩基）、フクオウソウ（6塩基）で見られ、そのほかはいずれも1~2塩基の欠失が存在した。

ITS領域で読み取れた塩基配列を用いて系統樹を作成した（図IV-2）。作成した系統樹では、*Ixeris* と *Ixeridium* は、それぞれクレードを作って分岐するごく近縁のグループであることが明らかになった。また、*Ixeris* と *Ixeridium* を形成するブートストラップ確率はそれぞれ99%、この両属のまとまりを形成するブートストラップ確率は99%と極めて高かった。

3. ETS (External Transcribed spacer) 領域の比較とクローニング

ノニガナ、ハマニガナ、イワニガナ、オオジシバリ、カワラニガナ、ノジシバリ（交配個体）、ヒメノジシバリ（自然雑種）について、いずれも 221 塩基の配列を確認した（表Ⅳ-3）。そのうち、種間で相違が見られた position を表Ⅳ-6-1 に示した。ノニガナと「オオジシバリ・イワニガナ」では、27 番目と 85 番目の 2 か所で塩基配列に違いが見られた。また、複数個体をシーケンスした結果、同種であっても、個体によって N（波形が重なるため判定不能）となる場合や異なる塩基がシーケンサーによって判定される場合があった。そこで、解析ソフト Sequencher (Version 4.0.5 Gene Codes Corporation) の波形データを見ると、常に複数の塩基の波形が重なって見られる position が 7 か所あった（表Ⅳ-6-2）。ノニガナは、波形の重なる position はほとんどなかったが、オオジシバリとイワニガナとノジシバリとヒメノジシバリでは複数の塩基が判定されたり、波形が重なって示されたりすることがあった。

4. ETS 領域のクローニング

ノニガナ、イワニガナ、オオジシバリ、ノジシバリ、ヒメノジシバリの 5 種について ETS 領域をクローニングし、イワニガナとオオジシバリで明瞭な相違がみられた 49 番目と 147 番目と 154 番目含まれていた塩基の割合と解析したコロニー数を表Ⅳ-7 に示した。解析したコロニーのうち、49 番目のオオジシバリやノジシバリには G の他に少量の A が見られるのに対して、ノニガナ、イワニガナ、ヒメノジシバリは G (グアニン) のみであった。154 番目はオオジシバリとノジシバリが、A のみであったのに対して、ノニガナ、イワニガナ、ヒメノジシバリは A と少量の C が見られた。154 番目は、オオジシバリが、C と少量の T が見られるのに対して、ノニガナ、イワニガナ、ヒメノジシバリは C のみであった。

この 49 番、147 番、154 番の 3 つの position にみられた塩基をコロニーごとに当てはめると、5 つの塩基パターンが生じ、その割合を表Ⅳ-8 に示した。すると、ノニガナとヒメノジシバリは 2 パターンなのに対して、オオジシバリやイワニガナ、ノジシバリでは 4 パターン見られるものがあつた。また、イワニガナとオオジシバリとでは、CGC パターンの有無で相違が見られた。

考察

(1)、自然集団におけるノジシバリ (NISHI-1)、ヒメノジシバリ (HIME-A) の母系系統、父系系統の推測

Ⅱ章では、自然集団において形態学的にみてノニガナとオオジシバリの雑種であるノジシバリ (NISHI-1) が形成されていた。また、同様にⅢ章では、自然集団においてイワニガナとノニガナの雑種であるヒメノジシバリ (HIME-A) が形成されていた。いずれも、交配実験の際にはノニガナが母親であつた。

今回、葉緑体 DNA マーカーを比較した結果、ノニガナはイワニガナとオオジシバリに対して、図Ⅳ-1 で示すように、EF 間の 207 番の 1 ヶ所で相違が見られた。ノジシバリであ

る (NISHI-1) もヒメノジシバリ (HIME-A) も、ノニガナと全く同じ塩基配列をもつことから、いずれもノニガナが母親であることが確認された。

一方、ITS 領域を比較した結果、ノニガナとイワニガナで相違が見られるところが1か所と、ノニガナと「イワニガナ・オオジシバリ」で相違が見られるところが3か所見られた。ノジシバリは (NISHI-1) は確認した箇所すべてがオオジシバリと全て同じ塩基配列で、ヒメノジシバリ (HIME-A) も全てがイワニガナと同じ塩基ではあった。ただ、ノニガナと相違が見られた4か所のヒメノジシバリの波形を見ると、ノニガナの塩基も含んでいた。また、ETS 領域を比較した結果、イワニガナにはなくオオジシバリにのみ含まれる塩基がノジシバリでは含まれ、ヒメノジシバリには含まれていなかった (表IV-6)。以上のことから、NISHI-1 はオオジシバリが、HIME-A はイワニガナが父親と結論づけてよいであろう。

(2) ノジシバリとヒメノジシバリのゲノム式の相違と繰り返し配列の反復数の相違

ゲノム構成をオオジシバリはD、ノニガナはP、イワニガナをSとすると、ゲノム式は6倍体のオオジシバリはDDDDDD、2倍体のノニガナはPPとなることから、4倍体のノジシバリでは、DDDPとなる。また、2倍体のイワニガナではSSとなることから、2倍体のヒメノジシバリはSPとなる。よって、ノジシバリは、父親のゲノムを多くもつことになるため、ITS や ETS などの核 DNA の場合、オオジシバリと同じ塩基と判定される。一方、ヒメノジシバリも、イワニガナと同じ塩基と判定され、ノニガナの塩基は解析結果の波形でわずかに確認できる程度であった。おそらく、ITS も ETS も繰り返し配列であるために、イワニガナの方がノニガナより反復数が多いため、イワニガナとノニガナの塩基が同比率として現れないのではないかと考える。

(3) ノニガナのホモ接合体頻度

ETS 領域の塩基を解析する際、ノニガナにはほとんど波形の重なりが見られなかった (表IV-6-2)。また、ETS 領域をクローニングした結果、ノニガナ、イワニガナ、オオジシバリにみられた特徴的な塩基の組合せから、5つの塩基パターンが生じ、2倍体のノニガナが2パターン現れたのに対して、同じ2倍体のイワニガナは4パターン現れた。(表IV-8)。これらの結果から、同じ2倍体種であるがノニガナの変異が少ないことは顕著である。これは、イワニガナは他家受精も行うが栄養繁殖を行うことに対し、ノニガナは専ら自家受粉を行った結果、ホモ接合体頻度が上昇した結果と考えられる。

(4) *Ixeris* と *Ixeridium* の系統関係

前述したとおり、最初の分類体系では、旧ニガナ属 (*Ixeris*) は、染色体基本数、中果皮の構造、冠毛の色の相違により、ノニガナ属 (*Ixeris* (新)) ニガナ属 (*Ixeridium*) に分けられている (大橋他 2017)。*Ixeridium* (ニガナ属) は、多年草で2倍体は有性生殖を行うが、倍数体は無融合生殖を行うことが知られている (西岡 1960、岡部 1932)。一方の *Ixeirs* (ノニガナ属) に分類された、ノニガナ、イワニガナ、ハマニガナ、カワラニガナ、オオジシバリ、タカサゴソウなどは、1年生のノニガナを除き、いずれも多年草で、

倍数体形成も有性生殖も行う。また、イワニガナ、ハマニガナ、オオジシバリは匍匐茎や地下茎などの栄養繁殖も行うことが知られている。

今回、葉緑体 DNA の *TrnT*-a と *TrnL5*-b 間の塩基配列を用いて系統樹を作成したところ、*Ixeris* と *Ixeridium* では、異なるクレードを形成した。また、同様に、ITS 領域でも、ノニガナ属のノニガナ、オオジシバリ、イワニガナ、ハマニガナは同じクレードを形成したが、*Ixeridium* のニガナは異なるクレードにまとまった。よって、形態において分類されてきたとおり、分子系統的にも *Ixeris* と *Ixeridium* と 2 つのクラスターに分類することができ、グループ分けは妥当であると言える。また、種間雑種（ノジシバリとヒメノジシバリ）は、分子系統の近い同じノニガナ属（*Ixeris*）の種間だけで形成され、ノニガナ属（*Ixeris*）とニガナ属（*Ixeridium*）の間では生じないことが改めて確認された。

（5）イワニガナとオオジシバリの比較

イワニガナとオオジシバリはノニガナとの交雑により、雑種が作られることが確認された。この両者について葉緑体 DNA の運搬 RNA の遺伝子 *TrnT*-*TrnF* の非コード領域では違いが見られず、核 DNA の ITS 領域（Internal Transcribed Spacer region）では 1 塩基のみ違いが見られ、ETS 領域（External Transcribed spacer）に関してもわずかな違いがあるのみであった。両者は、染色体数とシュートの伸ばし方、自家不和合性の有無、形態学上のサイズで明らかに違いが見られる。イワニガナは 2 倍体で、シュートは地を這い、自家受精を行うのに対して、オオジシバリは 6 倍体で、シュートは形成後すぐに地下部へ潜りこみ、自家不和合性がみられ、イワニガナに対して全体的に大きい点である。そこで、この両者を交配してみたが、現在のところ次代は生じていない（未発表）。野外でも、両者の雑種と思われるものは見つかっておらず、実験結果と同様であると考えられる。

引用文献

- Babcock, E. B., Stebbins, G. L. and Jenkins, J. A. 1937. Chromosomes and phylogeny in some genera of the Crepidinae. *Cytologia*. Fujii Jub. Vol. 1: 188-210.
- Denda, T. and Yokota, M. 2003. Hybrid origins of *Ixeris nakazonei* (Asteraceae, Lactuceae) in the Ryukyu Archipelago, Japan: evidence from molecular data. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 379-387.
- Denda, T. and Yokota, M. 2004. Cytogeography of *Ixeris nakazonei* (Asteraceae: Lactuceae) in the Ryukyu Archipelago, Japan and Taiwan. *J. Plant Res.* 117: 3-11.
- 傳田哲郎. 2006. 琉球列島におけるニガナ属の網状進化 分類 6 (2): 107-114
- 合田雅浩、入本敦史、奥田康浩、横田昌嗣、傳田哲郎. 2014. 大分県蒲江で発見されたミヤコジシバリ（キク科）の記録. 沖縄生物学会誌 52: 39-44.
- 原寛. 1952. 日本種子植物集覧 第二冊, pp. 216-219. 岩波書店、東京.
- Ishikawa, M. 1916. A list of the number of chromosomes. *Bot. Mag. (Tokyo)* 30: 404-448.
- 石川光春. 1921. ニガナ属の染色体に就て 植物学雑誌 35: 153-158.
- Kitamura, S. 1936. Compositae Novae Japonicae X 日本産新菊科植物. *Acta Phytotax. Geobot.* 5: 33-34.
- Kitamura, S. 1956. Compositae Japonicae, Pars Quinta. *Memoirs of the College of Science, Kyoto Univ. Series B.* 23: 132-133.
- 西岡 泰三. 1960. ニガナ属の分化について — 1 —. 植物学雑誌. 73: 431-437
- 邑田仁、米倉浩司. 2009. 97 高等植物分類表. 北隆館.
- 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩編. 2017. 日本の野生植物. 5: 198-281 平凡社.
- 岡部 作一. 1932. ニガナノ単性生殖（豫報）. *Bot. Mag. Tokyo* 46: 518-523
- PaK J. H., Kawano S. 1990a. Biosystematic studies on the genus *Ixeris* (Compositae-Lactuceae) I. Fruit wall anatomy and its taxonomic Implications. *Acta Phytotax. Geobot.* 41: 43-60
- PaK J. H., Kawano S. 1990b. Biosystematic studies on the genus *Ixeris* (Compositae-Lactuceae) II. Karyological analyses. *Cytologia* 55: 553-570
- PaK J. H., Kawano S. 1992. Biosystematic studies on the genus *Ixeris* and its allied genera (Compositae-Lactuceae) IV. Taxonomic treatments and nomenclature. *Mem. Fac. Sci., Kyoto Univ., Ser. Biol.* 15: 29-61
- Takemoto, T. 1952. Comparative Studies on *Ixeris stolonifera* (2x) and *Ixeris Japonica* (6x). *Bot. Mag. (Tokyo)* 65: 164-167.

- Morita, T., Menken, S. B. J., Sterk, A. A. 1990. Hybridization between European and Asian dandelions (*Taraxacum* section *Ruderalia* and section *Mongolica*) 1. Crossability and breakdown of self-incompatibility. *New Phytol.* 114 : 519–529.
- Shibaike, H. Akiyama, H. Uchiyama, S. Kasai, K. Morita, T. 2002. Hybridization between European and Asian dandelion (*Taraxacum* section *Ruderalia* and section *Mongolica*) 2. Natural hybrids in Japan detected by chloroplast DNA marker. *J. Plant Res.* 115 : 321–328.
- Yahara, T. 1995. *Ixeris*. *Flora of Japan* Vol. IIIb, pp. 15–19. Kodansha, Tokyo.

表 I-1 各実験に用いた材料の産地

○人工交配 ▲DNA量 □外部形態 △花粉、結実率 () は個体数

産地	ノニガナ	オオジシバリ
宮城県仙台市青葉台		□
新潟県村上市神林		▲(1)
新潟県新発田市		○(3) ▲(1) □
新潟県阿賀野市		○(4) ▲(4)
新潟県新潟市秋葉区		▲(4)
新潟県新潟市中央区鳥屋野		▲(2) □
新潟県新潟市西蒲区巻	○(4) ▲(19) □ △	○(21) ▲(6) △
新潟県三島郡出雲崎町尼瀬		▲(2) □
新潟県長岡市三俣野町	○(23) ▲(2) □	○(2)
新潟県長岡市妙見町		□
新潟県小千谷市		▲(1)
新潟県南魚沼市	□	
長野県下水内郡栄村	○(1)	

表 I -2 人工交配の結果 P : ノニガナ D : オオジシバリ

	P (♀)	×D(♂)	D (♀)	×P(♂)
結実頭花数 (処理数)	102	(125)	50	(119)
結実頭花の割合 (%)		81.6		42.0
頭花あたりの結実率 (%) +SD	88.0	±13.8	62.0	±33.8

表 I -3 ノニガナ、雑種F₁、オオジシバリの外部形態の比較

外部形態の比較		Steel-Dwass検定の結果			
比較形質	平均±SD [mm]	(計測数)			
	ノニガナ	雑種F ₁	オオジシバリ	水準 1	水準 2
小花長	7.02±0.89(30)	13.6±1.67(66)	20.2±2.44(37)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁
小花幅	1.46±0.16(30)	97±0.31 (66)	02±0.45 (37)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁
頭花径	9.93±0.52(35)	20.9±2.94(65)	32.4±4.42(35)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁
内総苞片長	6.69±0.91(37)	9.09±0.94(72)	13.7±0.69(30)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁
外総苞片長	1.01±0.08(30)	1.85±0.33(43)	3.73±0.91(32)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁
瘦果長	2.39±0.34(31)	3.87±0.59(33)	4.29±0.35(30)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁
冠毛長	3.62±0.66(31)	5.33±0.74(32)	7.14±0.57(30)	ノニガナ	雑種F ₁
				ノニガナ	オオジシバリ
				オオジシバリ	雑種F ₁

表 I-4 生育期間と開花特性

	ノニガナ	雑種F ₁	オオジシバリ
生活環	<ul style="list-style-type: none"> ・1年生 ・5月初旬に発芽し、6月下旬に枯死。 	<ul style="list-style-type: none"> ・多年生 ・冬期間は地上部なし、あってもまれ。 	<ul style="list-style-type: none"> ・多年生 ・冬期間は地上部なし、あってもまれ。
花期	<ul style="list-style-type: none"> ・5月中旬～6月中旬。 	<ul style="list-style-type: none"> ・5月下旬～7月下旬。 ・7月下旬以降は、細々と開花。 	<ul style="list-style-type: none"> ・5月初旬～7月下旬。 ・真夏は開花しないが、11月から真冬にかけて再び開花する場合もある。
開花条件と日数	<ul style="list-style-type: none"> ・晴天に開花。 ・曇りあるいは雨では開花しないこともある。 ・開花期間は1日。 	<ul style="list-style-type: none"> ・曇りでも開花。 	<ul style="list-style-type: none"> ・曇りでも開花。 ・開花期間は3日間程度。

表 I -5 花粉サイズ、花粉稔性率と頭花あたりの結実率

平均±SD(計測数)				Steel-Dwass検定の結果			
比較形質	ノニガナ	雑種F ₁	オオジシバリ	水準1	水準2	統計量	P値(*:P<0.05 **:P<0.01)
花粉サイズ [mm]	19.2±0.88(30)	19.5±1.5(20)	24.5±1.97(30)	ノニガナ	雑種F ₁	-1.48606	0.4459
				ノニガナ	オオジシバリ	-6.47367	0.0001 **
				オオジシバリ	雑種F ₁	5.83732	0.0001 **
花粉稔性率 [%]	99.0±3.41(33)	81.9±14.4(15)	97.2±14.5(33)	ノニガナ	雑種F ₁	5.33302	0.0001 **
				ノニガナ	オオジシバリ	-0.39131	0.9191
				オオジシバリ	雑種F ₁	5.31631	0.0001 **
室内での結実率 [%]	82.2±22.9(31)	82.5±30.8(25)	3.6±13.2(31)	ノニガナ	雑種F ₁	-0.94259	0.6133
				ノニガナ	オオジシバリ	6.95754	0.0001 **
				オオジシバリ	雑種F ₁	-6.66590	0.0001 **
5~7月までの自然環境下での結実率 [%]	94.1±10.2(31)	-----	78.3±20.6(31)	ノニガナ	雑種F ₁	-----	-----
				ノニガナ	オオジシバリ	3.90889	0.0003 **
				オオジシバリ	雑種F ₁	-----	-----

表 I -6 北村（記載）によるノジシバリ（ノニガナ×オオジシバリ）の外部形態

	小花の長さ	そう果	花序	花柄	内総苞
記載	10. 0mm（乾燥時）	約3. 5 mm	散房花序	6-13mm	8～9 mm（乾燥時）
雑種 F 1	13. 6mm（採集時）	約3. 8 mm	散房花序	———	9. 09 mm（採集時）

表Ⅱ-1 自然雑種の外部形態計測結果

表中の*はノジシバリとのU-検定の結果、有意が認められたもの (P<0.05)、棒線は未計測

外部形態の比較 平均±SD[mm](計測数)					
比較形質	NISHI-1	NISHI-2	NISHI-3	NISHI-4	NISHI-5
小花長	14.5±1.56(25)*	15.8±1.37(28)*	12.23±1.25(7)*	13.6±1.01(9)	13.8±0.99(37)
小花幅	3.26±0.29(25)*	3.3±0.21(28)*	2.33±0.17(7)*	2.91±0.16(9)	3.2±0.17(37)*
頭花径	22±2.05(30)	25.5±1.75(17)*	16.8±2.97(12)*	22.4±2.69(14)	23.6±1.47(30)*
内総苞片	9.92±0.65(31)*	10.2±0.59(30)*	7.36±0.84(33)*		9.31±0.51(22)
外総苞片	1.73±0.24(30)	1.92±0.28(35)	1.15±0.40(33)*		1.75±0.24(10)
瘦果長	3.94±0.39(113)	4.43±0.48(31)*	2.75±0.65(5)*	4.1±0.34(25)	3.78±0.47(12)
冠毛長	5.36±0.61(113)	6.61±0.32(31)*	5.14±0.44(5)	5.06±0.48(24)	5.52±0.52(10)

表Ⅱ-2 花粉サイズと花粉稔性率

表中の*はノジシバリとのU検定の結果、有意な差が認められたもの(P<0.05)、()中の数字は花粉の数

-----は未計測

	NISHI-1	NISHI-2	NISHI-4	NISHI-5
花粉サイズ[mm]	21.2±2.48(15)*	22.2±1.5(9)*	23.0±1.12(30)*	23.3±1.01(29)*
花粉稔性率[%]	-----	-----	87.8	62.8

表Ⅱ-3 頭花当たりの結実率

平均±SD〔mm〕(計測数)、-----は未計測

	NISHI-1	NISHI-2	NISHI-3	NISHI-4	NISHI-5
室内での結実率〔%〕	17.2±14.9(4)	43.7±18.5(13)	2.19±2.55(4)	-----	-----
自然環境下での結実率〔%〕	81.8±24.6(3)	53.1±9.68(9)	4.67±0.47(2)	-----	-----
栽培個体(野外)の結実率〔%〕	-----	-----	-----	42.9±20.7(4)	7.68±4.18(3)

表Ⅲ-1 各実験に用いた材料の産地

○人工交配 ▲DNA量 □外部形態 △花粉、結実率 ()は個体数

産地	ノニガナ		イワニガナ	
新潟県新発田市				□
新潟県秋葉区			○(3) ▲(3)	
新潟県西區五十嵐			○(17)	□
新潟県西蒲区巻	○(23)	▲(19) □ △	▲(1)	
新潟県弥彦村			○(4)	□
新潟県長岡市栖吉町				△
新潟県長岡市三俵野町		▲(2) □	○(15)	□
新潟県小千谷市	○(7)			
新潟県南魚沼市		□		□
新潟県佐渡			▲(1)	
長野県下水内郡栄村				□

表Ⅲ-2 ノニガナ、イワニガナ、ノジシバリ、ヒメノジシバリの外部形態の比較

外部形態の比較 平均±SD(mm)(計測数)						Steel-Dwass検定の結果		
比較形態	ノニガナ	イワニガナ	ノジシバリ	HIME-A	HIME-B	水準1	水準2	統計量 P値 (*P<0.05 **P<0.01)
小花長								
ノニガナ	7.02±0.89(30)	14.7±1.29(30)	13.6±1.67(66)	10.9±0.77(23)*	11.8±1.03(67)*	HIME-B	ノニガナ	7.84040 0.0001 **
イワニガナ						ノニガナ	イワニガナ	-6.64588 0.0001 **
ノジシバリ						HIME-B	イワニガナ	-7.10280 0.0001 **
小花幅								
ノニガナ	1.46±0.16(30)	3.12±0.33(31)	2.97±0.31(66)	2.24±0.14(23)*	2.37±0.16(67)*	HIME-B	ノニガナ	7.84218 0.0001 **
イワニガナ						ノニガナ	イワニガナ	-6.64652 0.0001 **
ノジシバリ						HIME-B	イワニガナ	-7.81865 0.0001 **
頭花径								
ノニガナ	9.93±0.52(35)	23.2±2.79(31)	20.9±2.94(65)	13.3±0.51(10)*	17.9±1.76(73)*	HIME-B	ノニガナ	8.38259 0.0001 **
イワニガナ						ノニガナ	イワニガナ	-6.96402 0.0001 **
ノジシバリ						HIME-B	イワニガナ	-7.28067 0.0001 **
内総苞片								
ノニガナ	6.69±0.91(37)	10.5±2.45(8)	9.09±0.94(72)	7.66±0.37(23)*	7.42±0.34(30)*	-	-	- -
イワニガナ						-	-	- -
ノジシバリ						HIME-B	ノニガナ	6.96281 0.0001 **
外総苞片								
ノニガナ	1.01±0.08(30)	2.59±0.43(34)	1.85±0.33(43)	-	1.31±0.31(37)*	ノニガナ	イワニガナ	-7.26022 0.0001 **
イワニガナ						HIME-B	イワニガナ	-7.77904 0.0001 **
ノジシバリ						HIME-B	ノニガナ	7.01997 0.0001 **
瘦果長								
ノニガナ	2.39±0.34(31)	3.14±0.41(16)	3.87±0.59(33)	-	5.28±0.50(40)	ノニガナ	イワニガナ	-7.05602 0.0001 **
イワニガナ						HIME-B	イワニガナ	-3.59933 0.0029 **
ノジシバリ								
冠毛長								
ノニガナ	3.62±0.66(31)	6.21±0.47(11)	5.33±0.74(32)	-		ノニガナ	イワニガナ	-7.05602 0.0001 **
イワニガナ						HIME-B	イワニガナ	-3.59933 0.0029 **
ノジシバリ								

表Ⅲ-3 花粉サイズと花粉稔性率

	平均±SD(計測数)		
	ノニガナ	イワニガナ	HIME-B
花粉サイズ[mm]	19.2±0.88(30)	22.8±1.35(10)	19.8±2.34(81)
花粉稔性率[%]	99.0±3.41(33)	92.1±18.6(10)	51.0±26.0(26)
結実頭花率(%)	100	100	30
頭花あたりの結実率(%)	94.1±10.2(31)	67.5±22.1(28)	3.45±6.33(28)

表Ⅲ-4 標本Bの計測結果(京都総合博物館にて)

比較形態	平均±SD[mm](計測数)
内組苞片	6.62±0.94(3)
外総苞片	1.02±0.13(3)
瘦果長	2.37(1)
冠毛長	4.55±0.3(3)

表IV-1 分子マーカーで使用したサンプルの一覧

○が今回解析したもの。△はDDBJより一部引用、* DDBJよりすべて引用。

学名	和名	採集地点	葉緑体DNA TrnT-TrnF アセッショ ン番号	ITS領域 アセッショ ン番号	ETS領域
<i>Crepidiastrum platyphyllum</i>	ワダン	不明	○	* AY876259	
<i>Crepidiastrum Keiskeanum</i>	アゼトウナ	愛媛県伊法町	○	* AB598564	
<i>Crepidiastrum denticulatum</i>	ヤクシソウ	不明	○	○	
<i>Hieracium umbellatum</i>	ヤナギタンポポ	不明	○	○	
<i>Hypochaeris radicata</i>	ブタナ	新潟県柏崎市米山	○	○	
<i>Ixeridium dentatum</i>	ニガナ	新潟県新潟市内野	○	○	
<i>ixeridium dentatum subsp.nipponicum</i>	イノニガナ			* AB766217	
<i>ixeridium dentata var.Stolonifera</i>	ハイニガナ	不明	○		
<i>Ixeridium dentatum var.albiflorum</i>	オオバナニガナ	新潟県西蒲区巻町仁箇堤	○	△ AB766220	
<i>Ixeridium-dentatum-f.-leucanthum</i>	シロバナニガナ			* AB766218	
<i>Ixeridium dentatum subsp.ozense</i>	オゼニガナ			* AB766221	
<i>Ixeridium dentatum subsp.kitayamense</i>	ドロニガナ			* AB766224	
<i>Ixeridium-beauverdianum</i>	ホソバナニガナ			* AB972273	
<i>Ixeridium laevigatum</i>	ヤナギニガナ			* AB972275	
<i>Ixeridium-alpicola</i>	タカネニガナ			* AB766225	
<i>Ixeris repens</i>	ハマニガナ	新潟県新潟市内野	○	* HQ436225	
<i>Ixeris japonica</i>	オオジシバリ	新潟県柏崎市米山	○	○	○
<i>Ixeris japonica</i>	オオジシバリ	新潟県西蒲区巻町			○
<i>Ixeris japonica</i>	オオジシバリ	新潟県阿賀市			○
<i>Ixeris stolonifera</i>	イワニガナ	新潟県 大崎山公園	○	○	○
<i>Ixeris polycephala</i>	ノニガナ	新潟県小千谷市	△ AB972299	○	○
<i>Ixeris tamagawaensis</i>	カワラニガナ	埼玉県	○	△ AB972301	○
<i>Ixeris chinensis</i>	タカサゴソウ	福岡県	○	* AY862578	
<i>Ixeris X pseudosekimotoi</i>	ヒメノジシバリ	長野県下水内郡栄村	○	○	○
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	ノジシバリ	交配個体			○
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	ノジシバリ	新潟県西蒲区巻町	○	○	
<i>Lactuca indica</i>	アキノノゲシ	不明	○	* LT721993	
<i>Lapsanastrum humile</i>	ヤブタビラコ	新潟県西蒲区国上山	○	×	
<i>Nabalus acerifolia</i>	フクオウソウ	長野県下水内郡栄村	○	○	
<i>Nabalus tanakae</i>	オオニガナ	長野県下水内郡栄村	○	○	
<i>Paraprenanthes sororia</i>	ムラサキニガナ	新潟県西蒲区仁箇堤	○	○	
<i>Picris hieracioides</i>	コウゾリナ	新潟県三条市	○	△ KT249838	
<i>Sonchus oleraceus</i>	ノゲシ	新潟県上越市郷津	○	○	
<i>Sonchus asper</i>	オニノゲシ	新潟県上越市郷津	○	△ AY458003	
<i>Youngia japonica</i>	アオオニタビラコ	新潟県西蒲区巻町角田浜	○	○	

表IV-2 使用したプライマー

プライマー番号		塩基配列
trnL-trnF		
primer a[trnT-a]	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	
primer b[trnL5-b]	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	
primer c[trnL5-c]	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	
primer d[trnL3-d]	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	
primer e[trnL3-e]	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	
primer f[trnF-f]	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	
ITS領域		
rDNA-3	GAG GAA GGA GAA GTC GTA ACA AGG	
rDNA-4	CTC CTC CGC TTA TTT ATA TGC	
ETS領域		
ETS-F2	ATT CGT AAC ACG TTG CTT GCG ACG	
18S-R1	GCA GGA TCA ACC AGG TAG CA	

表Ⅳ－3 葉緑体DNA (運搬RNAの遺伝TmT-F間の非コード領域)と
核DNA (ITS領域とETS領域)のシーケンス結果. 表中の－は未読

	運搬RNAの遺伝TmT-F間の非コード領域				ITS領域	ETS領域
	AB間	CD間	EF間			
<i>Crepidiastrum platyphyllum</i>	—	468bp	388bp	ワダン	—	—
<i>Crepidiastrum Keiskeanum</i>	509bp	468bp	388bp	アゼトウナ	—	—
<i>Paraixeris denticulata</i>	529bp	468bp	388bp	ヤクシソウ	581bp	—
<i>Hieracium umbellatum</i>	587bp	471bp	381bp	ヤナギタンポポ	603bp	—
<i>Hypochoeris radicata</i>	361bp	477bp	385bp	フタナ	640bp	—
<i>Ixeridium dentatum</i>	494bp	480bp	370bp	ニガナ	602bp	—
<i>Ixeridium dentatum var. Stolonifera</i>	494bp	—	—	ハイニガナ	—	—
<i>Ixeridium dentatum var. albiflora</i>	494bp	480bp	370bp	オオハナニガナ	503bp	—
<i>Ixeris repens</i>	574bp	480bp	369bp	ハマニガナ	—	221bp
<i>Ixeris japonica</i>	392bp	480bp	369bp	オオジシバリ	607bp	221bp
<i>Ixeris stolonifera</i>	492bp	480bp	369bp	イワニガナ	648bp	221bp
<i>Ixeris polycephala</i>	537bp	480bp	369bp	ノニガナ	653bp	221bp
<i>Ixeris tamagawaensis</i>	488bp	480bp	369bp	カワラニガナ	577bp	221bp
<i>Ixeris chinensis</i>	553bp	480bp	369bp	タカサゴソウ	—	—
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	—	—	369bp	ノジシバリ	—	—
<i>Ixeris X pseudosekimotoi</i>	498bp	480bp	369bp	ヒメノジシバリ	571bp	221bp
<i>Lactuca indica</i>	585bp	472bp	379bp	アキノノゲシ	655bp	221bp
<i>Lapsanastrum humile</i>	591bp	477bp	383bp	ヤブタビラコ	—	—
<i>Nabalus acerifolia</i>	556bp	379bp	311bp	フクオウソウ	289bp	—
<i>Nabalus tanakae</i>	543bp	440bp	376bp	オオニガナ	585bp	—
<i>Paraprenanthes sororia</i>	566bp	476bp	378bp	ムラサキニガナ	597bp	—
<i>Picris hieracioides</i>	538bp	476bp	400bp	コウゾリナ	560bp	—
<i>Sonchus oleraceus</i>	503bp	472bp	378bp	ノゲシ	605bp	—
<i>Sonchus asper</i>	476bp	472bp	379bp	オニノゲシ	537bp	—
<i>Youngia japonica</i>	442bp	476bp	383bp	オニタビラコ	567bp	—

表IV-4 葉緑体DNAtrnT-Fのアライメントの結果

	AB ^{III}																										
	95-113	116	117	118	119	124	128	129	130	131	132	133-138	243	249	250	276	277-291	292	300-306	346	364	458	462	465	525-530	574	575
position																											
consensus	-	G	A	G	C	C	T	T	C	G	C	-	T	T	A	T	-	-	-	G	G	C	A	G	-	A	T
<i>Ixeris polycephala</i>	-	-	-	-	-	-	.	.
<i>Ixeris repens</i>	-	-	-	T	-	-	.	.
<i>Ixeris stolonifera</i>	-	-	-	-	-	-	.	.
<i>Ixeris japonica</i>	*	-	-	-	-	-	*	*
<i>Ixeris tamagawaensis</i>	<i>Ins/Del 1-a</i>	-	G	.	.	A	<i>Ins/Del3</i>	T	<i>Ins/Del4</i>	-	*	*
<i>Ixeris chinensis</i>	<i>Ins/Del 1-a</i>	-	G	.	.	A	<i>Ins/Del3</i>	T	<i>Ins/Del4</i>	-	G	.
<i>Ixeris X pseudosekimotoi</i>	-	-	-	-	-	-	.	.
<i>Ixeridium dentatum</i>	<i>Ins/Del 1-b</i>	T	T	A	T	A	A	A	T	A	T	<i>Ins/Del2</i>	G	-	G	.	-	-	-	A	T	T	T	T	<i>Ins/Del5</i>	G	A
<i>Ixeridium dentatum var.albii</i>	<i>Ins/Del 1-b</i>	T	T	A	T	A	A	A	T	A	T	<i>Ins/Del2</i>	G	-	G	.	-	-	-	A	T	T	T	T	<i>Ins/Del5</i>	G	A

position	CD間										EF間									
	8	89	132	168	189	207	287	333			8	89	132	168	189	207	287	333		
consensus	A	-	A	T	G	C	A	C			A	-	A	T	G	C	A	C		
<i>Ixeris polycephala</i>	-		
<i>Ixeris repens</i>	-	A		
<i>Ixeris japonica</i>	-	A		
<i>Ixeris stolonifera</i>	-	A		
<i>Ixeris tanagawaensis</i>	A	.	.	.	C	.	A	G				
<i>Ixeris chinensis</i>	-	.	.	.	C	.	A	G				
<i>Ixeris X pseudosekinotoi</i>	-		
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	*		
<i>Ixeridium dentatum</i>	-	G	A	C	C	C	A	.			G	A	C	C	C	A	.	T		
<i>Ixeridium dentatum var.albit</i>	-	G	A	C	C	C	A	.			G	A	C	C	C	A	.	T		

Ins/Del1-a: 11bp long(ACTATTTTAAAT)
Ins/Del1-b: 18bp Long(TCTCAGCTATTCATATTA)
Ins/Del2: 6bp Long(GAATAT)
Ins/Del3: 14bp Long(ATACTTTTTTTTTT)
Ins/Del4: 7bp Long(AAAATTTT)
Ins/Del5: 6bp Long(TCAGGA)

*未読, *: consensusと同一, -: 欠失

表IV-5 ITS領域(1-607bp)の比較

120番、189番、577番のノニガナと他の種と塩基が異なる。同位置で、ヒメノジシバリはノニガナの塩基を含んでいたが、特に577番ではチミンを多く含んでいた。
() で示した塩基はDBJを参照したもので、この実験ではノニガナの塩基配列とは相違が見られなかった。

*: 未読, . : consensus と同一, -: 欠失

	41	42	55	56	57	58	73	74	75	77	79	80	87	88	99	102	104	105	120	121	122	131	135	136	137	141	143	148	151	186	187	189	191	205	207	208	
consensus	A	A	T	T	-	G	-	-	T	C	T	C	A	G	C	-	C	C	-	C	-	-	A	A	T	G	C	T	T	A	T	G	A	A	C	T	
<i>Ilexis polycephala</i>	-	.	-	-	-	-	.	.	.	-	-	-
<i>Ilexis japonica</i>	-	.	-	-	-	-	.	.	T	-	-	-	
<i>Ilexis stolonifera</i>	-	.	-	-	-	T	-	.	.	T	-	-	-	
<i>Ilexis tamagawaensis</i>	(A)	.	-	-	-	-	.	.	T	-	-	-	T	G	A	.	C	.	A	.	A	
<i>Ilexis chinensis</i>	-	A	-	-	-	T	-	.	T	-	-	-	T	G	A	.	.	.	A	.	A	
<i>Ilexis X sekimotoi</i>	-	.	-	-	-	-	.	.	T	-	-	-	
<i>Ilexis X pseudosekimotoi</i>	-	.	-	-	-	T	-	.	.	T	-	-	-	
<i>Ilexidium dentatum</i>	C	T	A	A	-	.	A	T	A	C	.	A	.	G	A	T	G	T	T	A	T	.	.	A	T	T	.	-	.	C	A	A	T	T	T	G	
<i>Ilexidium dentatum var.albiflora</i>	*	*	*	*	*	*	A	T	A	C	.	A	.	G	A	T	G	T	T	A	T	.	.	A	T	T	.	-	.	C	A	A	T	T	T	G	

	209	213	234	235	239	243	247	381	431	438	442	443	447	449	450	453	455	457	460	469	476	487	495	499	504	519	524	529	548	571	577	578	588	593	594	595	
consensus	G	G	C	A	T	T	C	G	C	A	A	C	C	C	T	C	G	G	G	A	A	T	G	C	G	A	T	T	G	T	T	-	C	G	T		
<i>Ilexis polycephala</i>	
<i>Ilexis japonica</i>	
<i>Ilexis stolonifera</i>	
<i>Ilexis tamagawaensis</i>	C	G	.	(A)	A	C	.	-	-	.	.	
<i>Ilexis chinensis</i>	.	-	T	A	T	T	C	.	C	A	.	T	C	G	.	.	A	C	.	-	T	.	.
<i>Ilexis X sekimotoi</i>	*	*	*	*	*	*	
<i>Ilexis X pseudosekimotoi</i>
<i>Ilexidium dentatum</i>	T	.	A	C	C	T	A	.	-	C	G	G	T	-	-	G	A	.	A	T	-	C	.	G	A	
<i>Ilexidium dentatum var.albiflora</i>	T	.	A	C	C	T	A	.	-	C	G	G	T	-	-	G	A	.	A	T	-	C	.	G	A	.	C	C	T	T	A	C	

表IV-6-1 ETS領域 (221bp)のアライメント結果の比較

*: consensusと同一		13	27	43	64	82	84	85	101	120	129	147	185
position													
consensus		G	T	G	C	G	A	A	C	A	C	A	A
<i>Ixeris polycephala</i>	
<i>Ixeris repens</i>		.	C	T	.	A	.	T	.	T	.	.	.
<i>Ixeris japonica</i>	G/N	C	C	.	.	.	G/A	T	C/T
<i>Ixeris stolonifera</i>	A/N	C	C	T
<i>Ixeris tamagawaensis</i>	A	C	C	.	T	.	T	T	.	.	T	.	G
<i>Ixeris X pseudosekimotoi</i>	A	C	C	T	.	.	.	N	.
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	G/A	C	C	T	C/N

表IV-6-2 ETS領域(221bp)の比較(波形データより)

<>は波形の大小関係を示す。例えば、G>Aは、GとAの2つの塩基の波形が現れ、AよりもGの方が大きい波形であったことを示す。また、G,G>Aは、波形がGのみのものと、GとAが重なって見られたことを示す。

position	13	27	84	85	101	147	154
<i>Ixeris polycephala</i>	G	T	A	A	C	A>G	C
<i>Ixeris japonica</i>	G,G>A,A>G	C	G,A>G>C	T	T,C,C>T,T>C	A	C>T
<i>Ixeris stolonifera</i>	A,A>G	C	A,A>G>C	T	C,C>T	A,A>G	C
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	A>G,G>A	C>T	A>G	T,T>A	C>T	A	C
<i>Ixeris X pseudosekimotoi</i>	A>G	C>T	A>C	T>A	C	A>G	C

表Ⅳ－7 ETS領域のクローニングの結果

表Ⅳ－7 各positionに存在する塩基の割合(%)

position	採集地	塩基	49	147	154
<i>Ixeris polycephala</i>	小千谷市 (26colony)	A	0.0	96.2	0.0
		G	100.0	3.8	0.0
		C	0.0	0.0	100.0
		T	0.0	0.0	0.0
<i>Ixeris stolonifera</i>	長岡市 (21colony)	A	0.0	95.0	0.0
		G	100.0	5.0	0.0
		C	0.0	0.0	100.0
		T	0.0	0.0	0.0
<i>Ixeris stolonifera</i>	長野県 (41colony)	A	0.0	82.9	0.0
		G	100.0	17.1	0.0
		C	0.0	0.0	100.0
		T	0.0	0.0	0.0
<i>Ixeris debilis</i>	新潟市 〔西蒲区〕 (21colony)	A	4.8	100.0	0.0
		G	95.2	0.0	0.0
		C	0.0	0.0	90.5
		T	0.0	0.0	9.5
<i>Ixeris debilis</i>	阿賀市 (19colony)	A	31.6	100.0	0.0
		G	68.4	0.0	0.0
		C	0.0	0.0	78.9
		T	0.0	0.0	21.1
<i>Ixeris japonoca</i>	新潟市 〔西区〕 (46colony)	A	23.9	100.0	0.0
		G	76.0	0.0	0.0
		C	0.0	0.0	76.1
		T	0.0	0.0	23.9
<i>Ixeris X pseudosekimotoi</i>	長野県 (44colony)	A	0.0	50.0	0.0
		G	100.0	50.0	0.0
		C	0.0	0.0	100.0
		T	0.0	0.0	0.0
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	人工交配 (58colony)	A	8.6	100.0	0.0
		G	91.4	0.0	0.0
		C	0.0	0.0	96.6
		T	0.0	0.0	3.4

表Ⅳ－8 ETS領域のクローニングの結果 49,147,154番目の塩基パターンの割合(%)を示した。						
	生育地	GAC	GGC	AAC	AAT	GAT
<i>Ixeris polycephala</i>	小千谷市	96.2	3.8			
<i>Ixeris japonica</i>	新潟市西蒲区	89.5				
	阿賀市	68.4		10.5	21.1	
	新潟市西区	73.3			24.4	2.22
<i>Ixeris stolonifera</i>	長岡市	95.0	5.0			
・	長野県	82.9	17.1		5.9	5.9
<i>Ixeris X sekimotoi</i>	人工交配	87.0		7.4	1.9	3.7
<i>Ixeris X pseudobosekimotoi</i>	長野県	48.9	51.1			

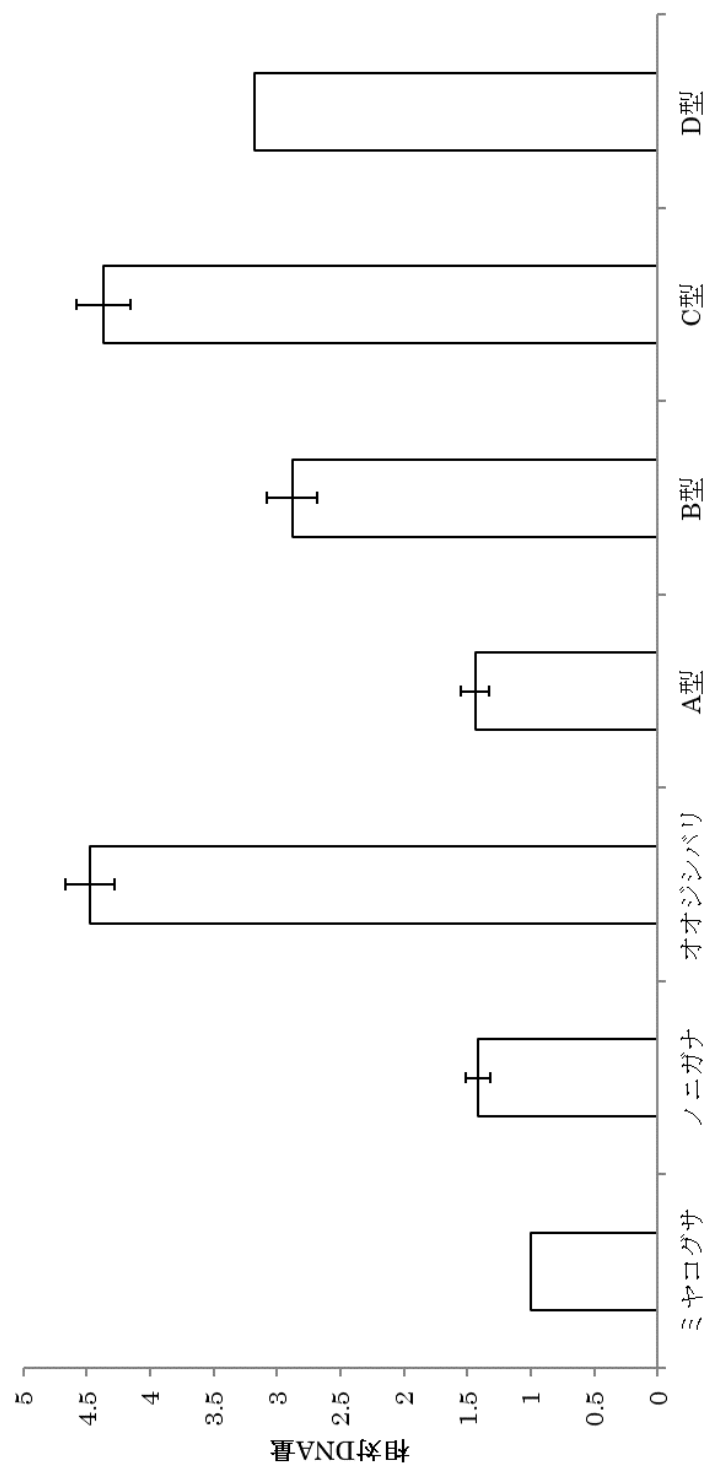


図 I -1 ミヤコグサを基準とした相対DNA量 (図中のひげは標準偏差)
A型とB型は $P(\text{♀}) \times D(\text{♂})$ 、C型とD型は $D(\text{♀}) \times P(\text{♂})$
(P: ノニガサ、D: オオジシバリ)

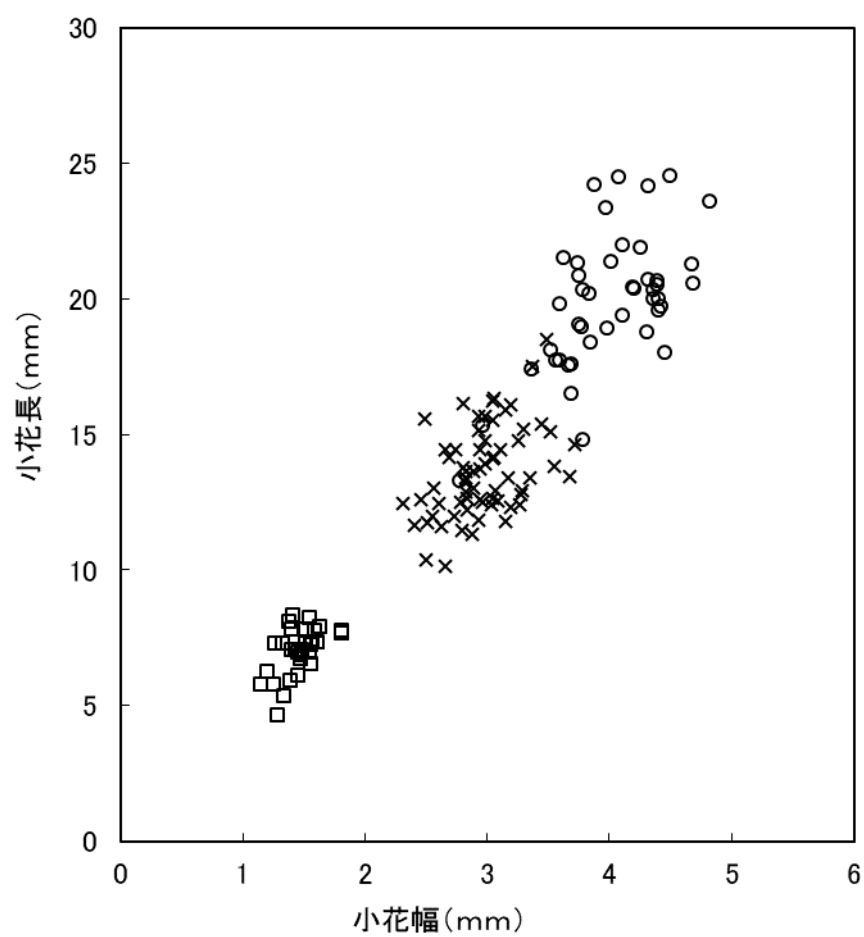


図 I -2 小花の形態比較
ノニガナ(□)、雑種F1(×)、オオジシバリ(○)



図 I-3 葉の形態

左：ノニガナ（左端から4番目までは上部から下部につく茎葉、右端は根生葉）

中央：雑種 F_1 （左端から2番目まで花茎につく葉、他は匍匐茎につく葉で鋸歯有り）

右：オオジシバリ（左端は花茎につく葉、他は匍匐茎の葉で右端は先端、鋸歯有）

図中のバーは5cm

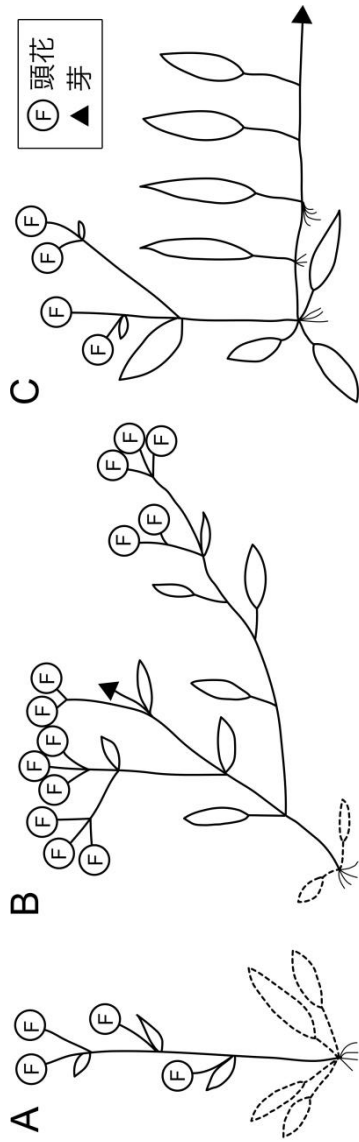
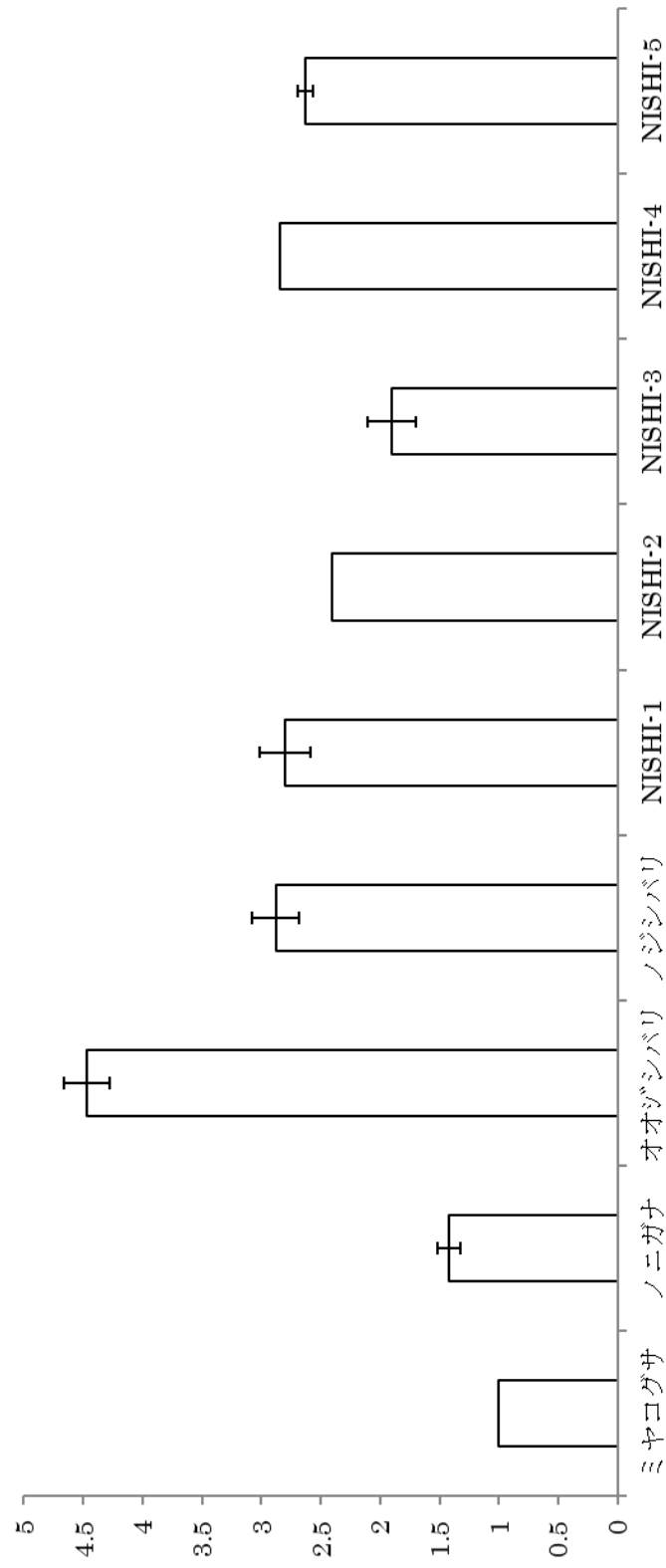


図 I-4 分枝の様子

A : ノニガナ B : 雑種 F_1 C : オオジハバ
(点線は花期には消失)



図Ⅱ-1 ミヤコグサを基準とした相対DNA量（図中のひげは標準偏差）

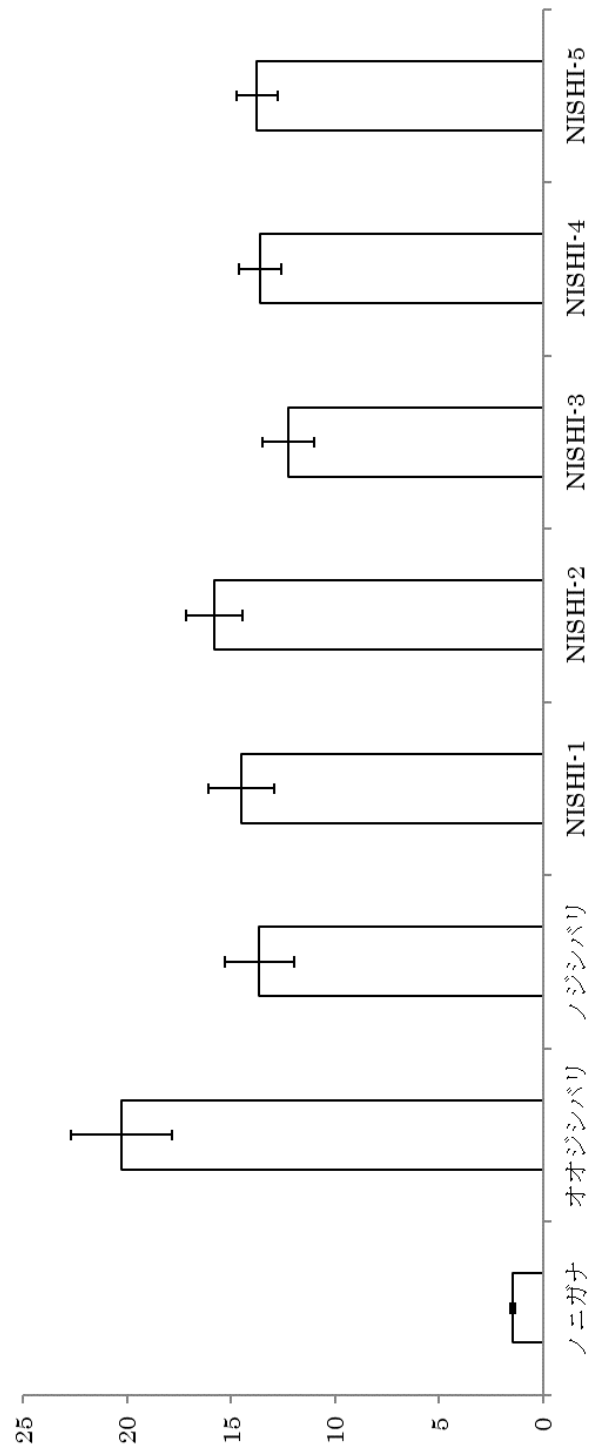
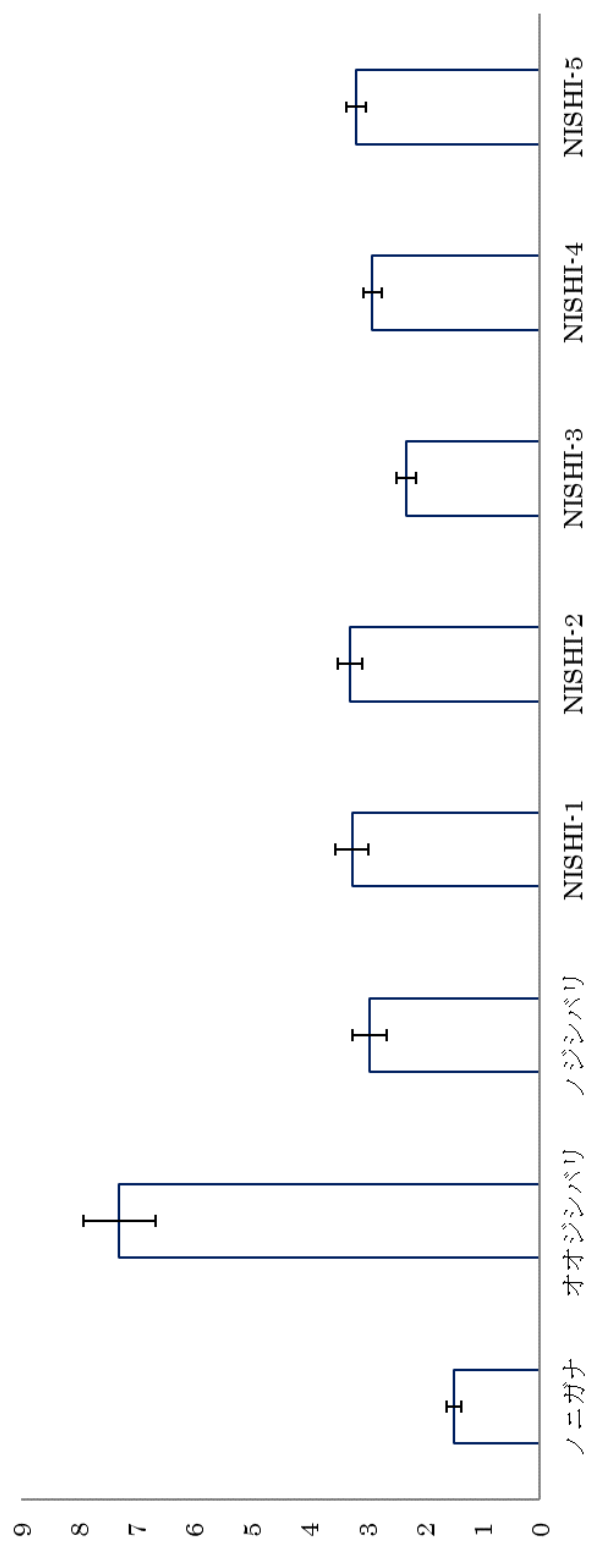


図 II -2a 小花長(mm)の比較 (図中のひげは標準偏差)



図Ⅱ-2b 小花幅(mm)の比較 (図中のひげは標準偏差)

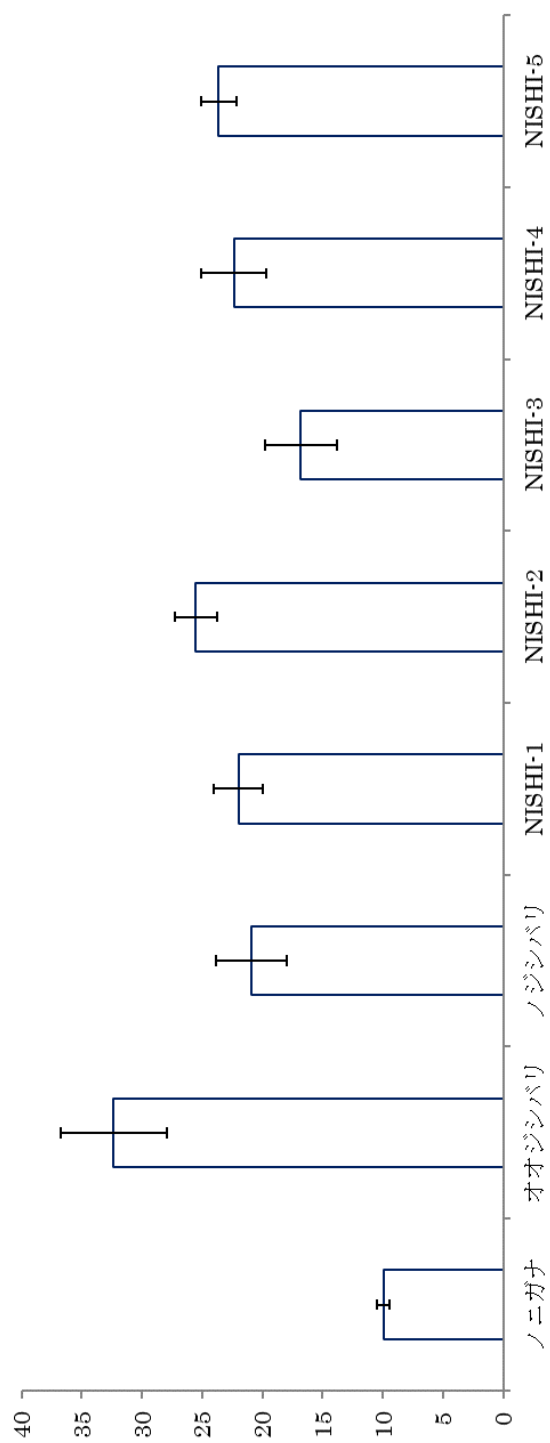


図 II -2c 頭花の径(mm) の比較 (図中のひげは標準偏差)

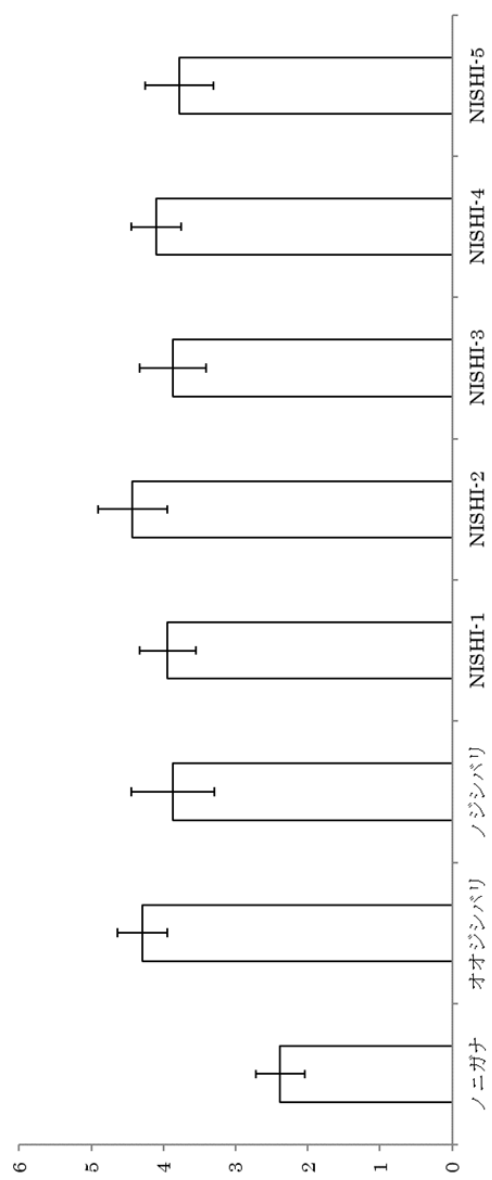
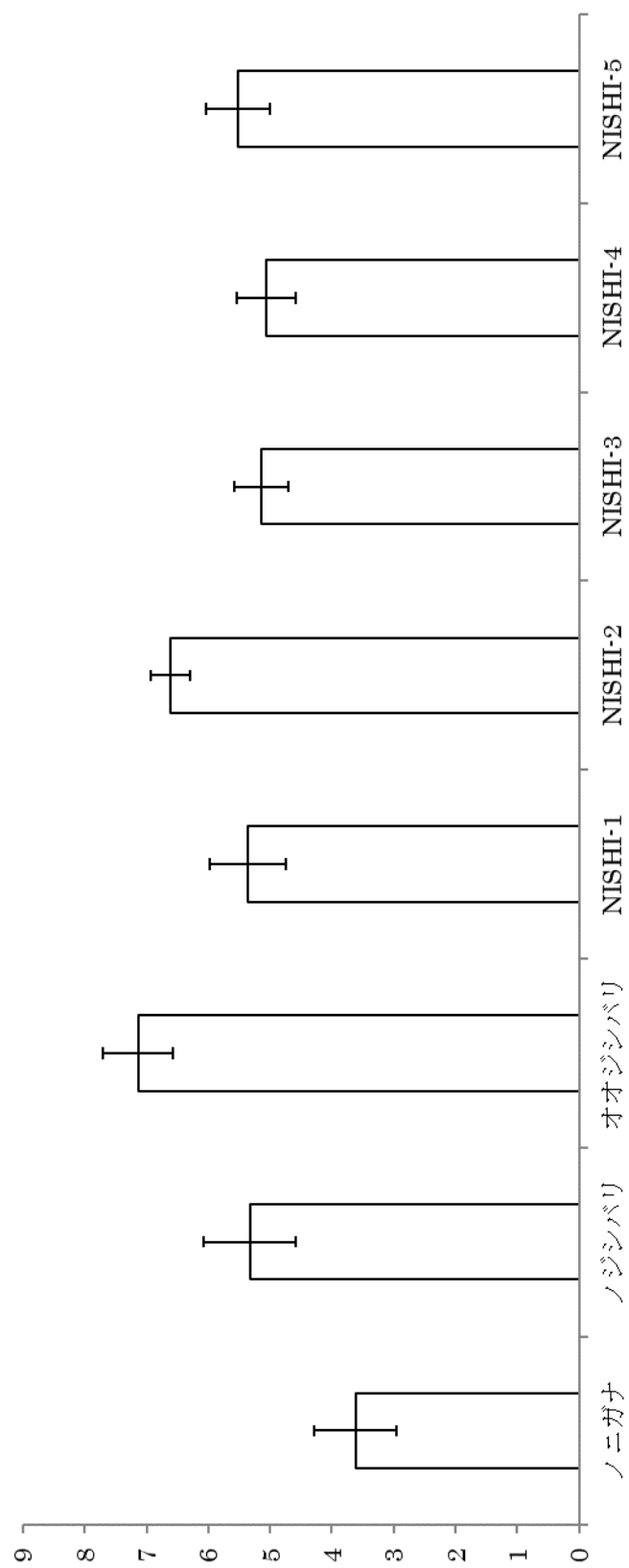


図 II-2 d 瘦果長 (mm) の比較 (図中のひげは標準偏差)



図Ⅱ-2e 冠毛長 (mm) の比較 (図中のひげは標準偏差)

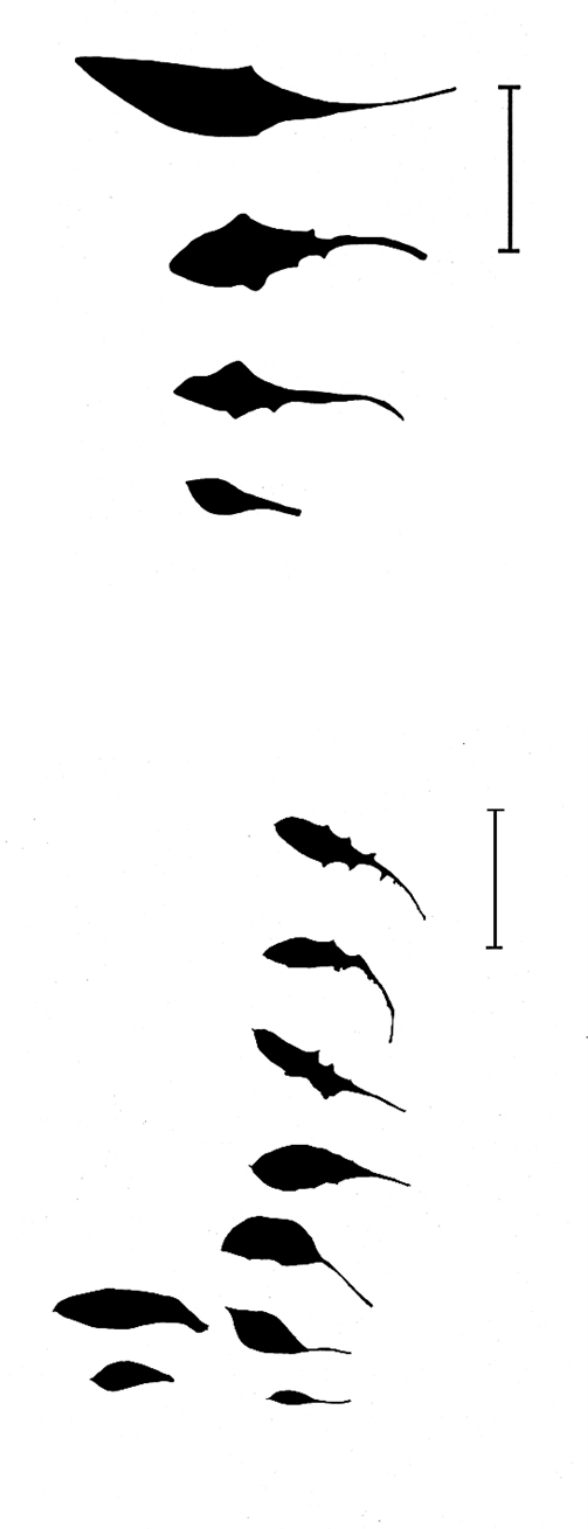
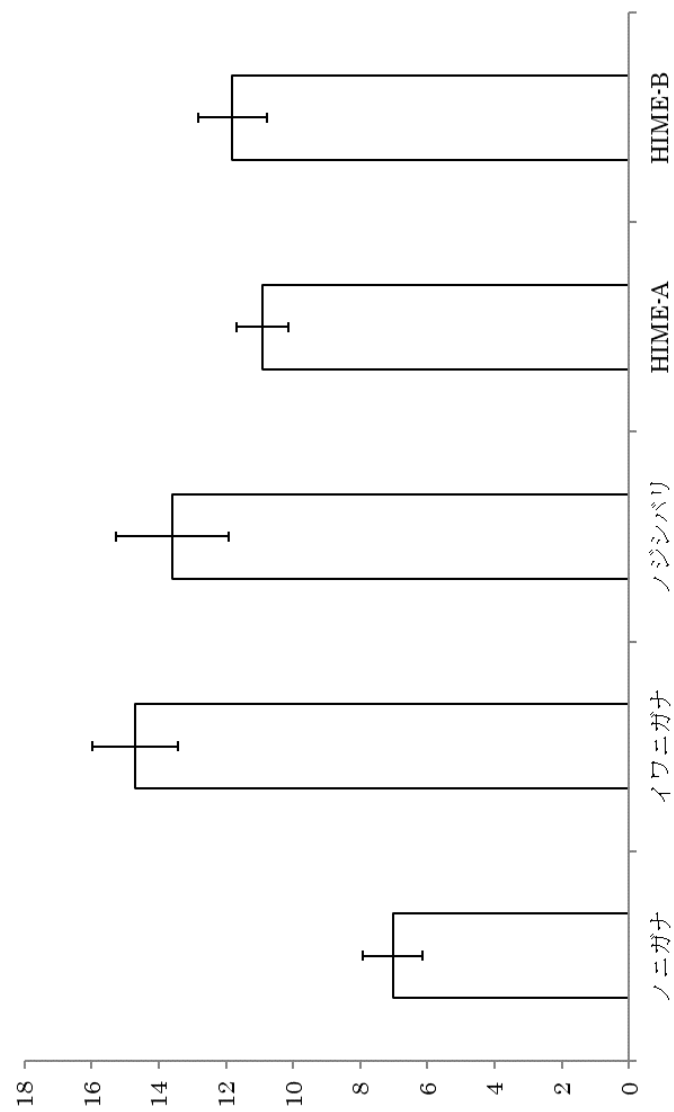


図 II-3 茎葉の様子
 (右 : NISHI-1 上の2つは花茎につく葉、他は匍匐茎の葉、左端が先端部、鋸歯有
 左 : NISHI-5 匍匐茎の葉、左端が先端部、鋸歯有)
 図中のバーは 5 cm

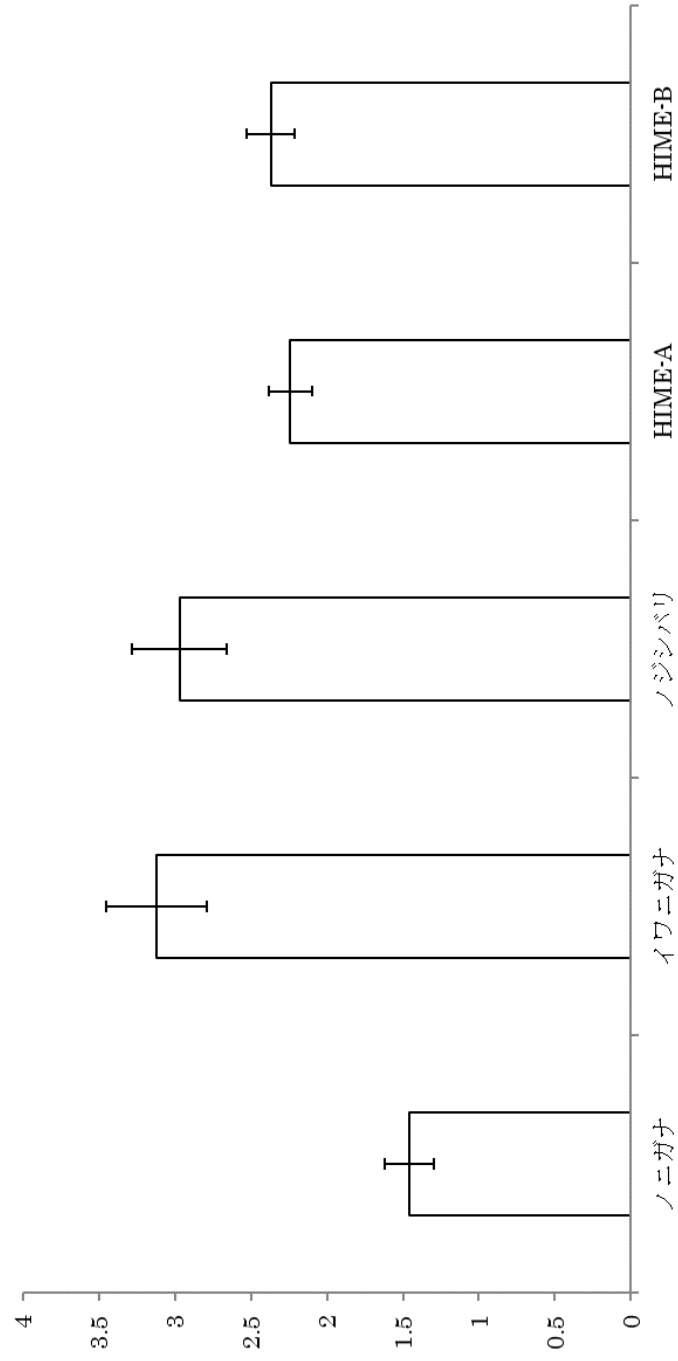


⑤ 頭花
 ▲ 芽

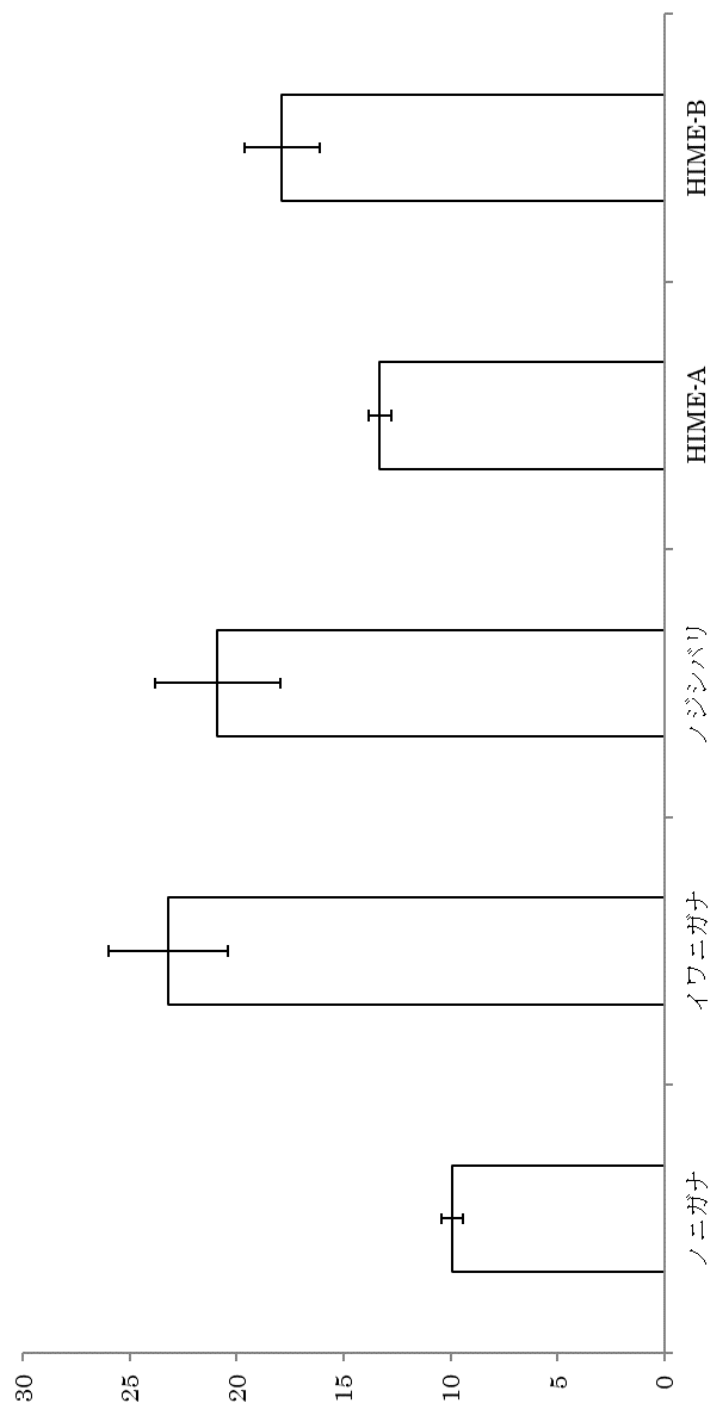
図 II-4 NSH1-5 の分枝の様子



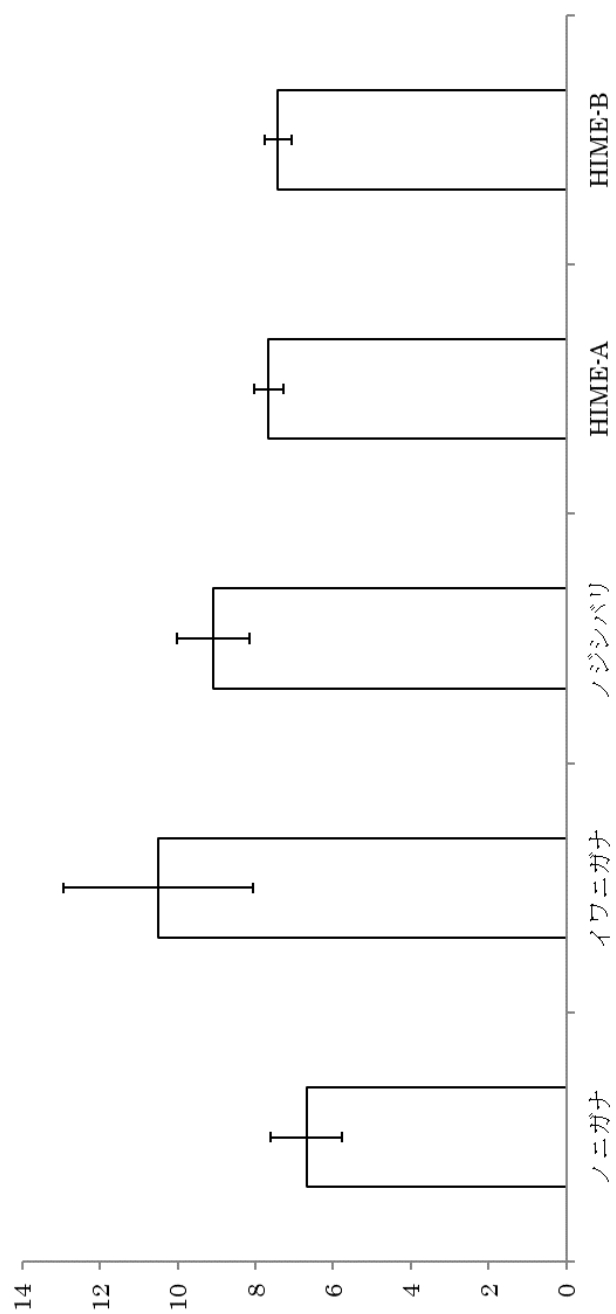
図Ⅲ-1a ノニガサ (mm) の比較(図中のひげは標準偏差)



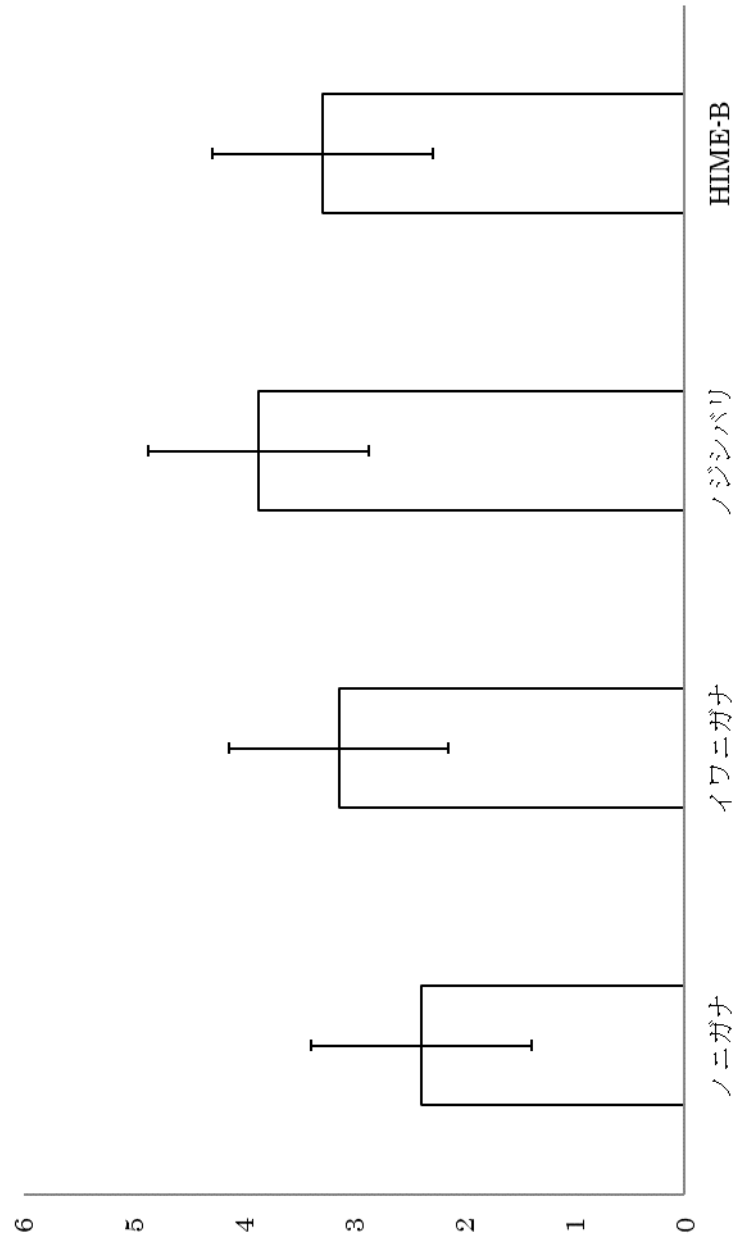
図Ⅲ-1b 小花幅 (mm) の比較 (図中のひげは標準偏差)



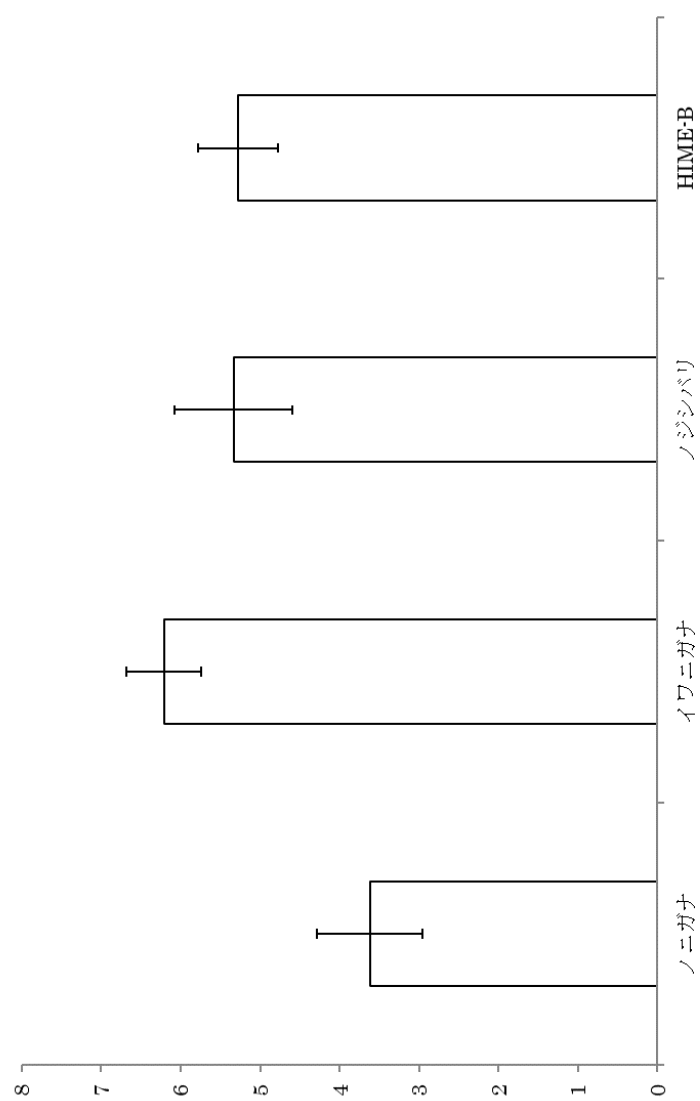
図Ⅲ-1c 頭花径(mm)の比較 (図中のひげは標準偏差)



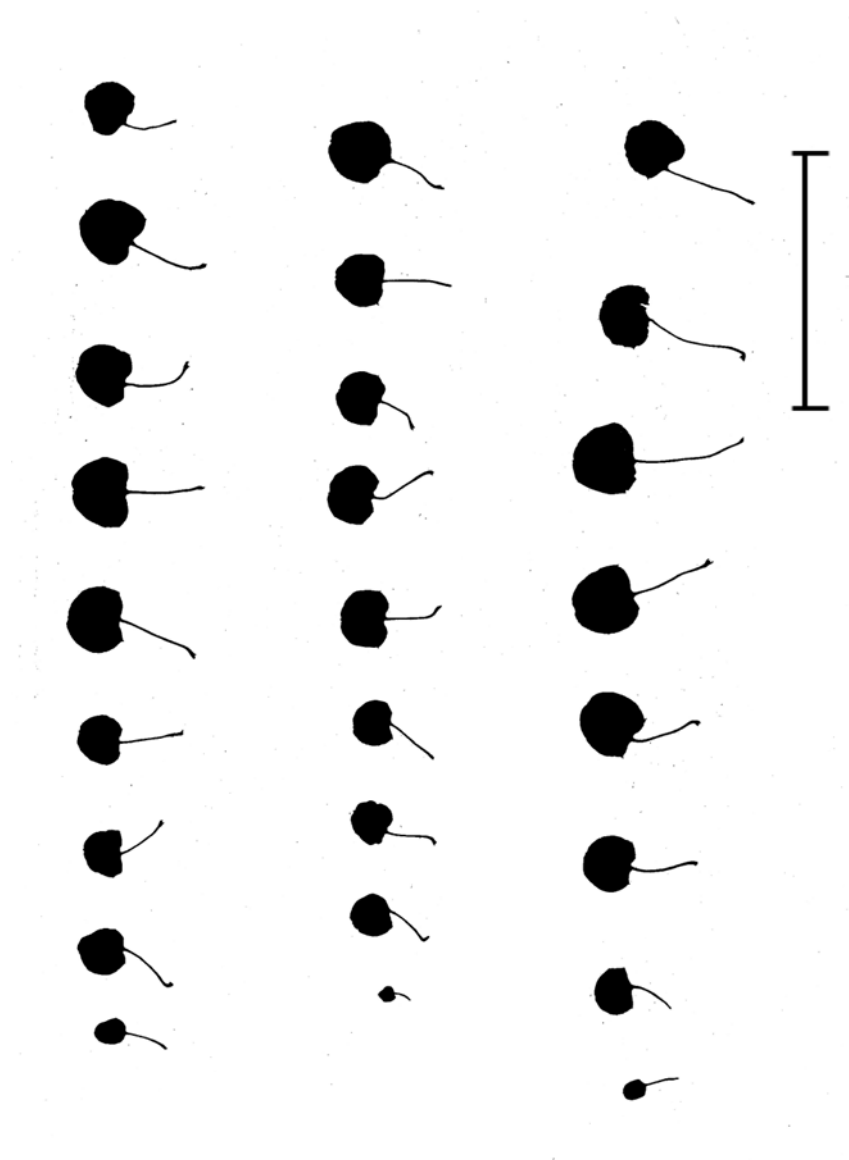
図Ⅲ-1d 内総苞片(mm)の比較 (図中のひげは標準偏差)



図Ⅲ-1e 瘦果長(mm)の比較 (図中のひげは標準偏差)



図Ⅲ-1f 冠毛長(mm)の比較 (図中のひげは標準偏差)



図Ⅲ-2a 茎葉の様子

イワニガナの3方向に伸びる匍匐茎に付く葉 左端は先端部、右端は根元

図中のバーは5cm

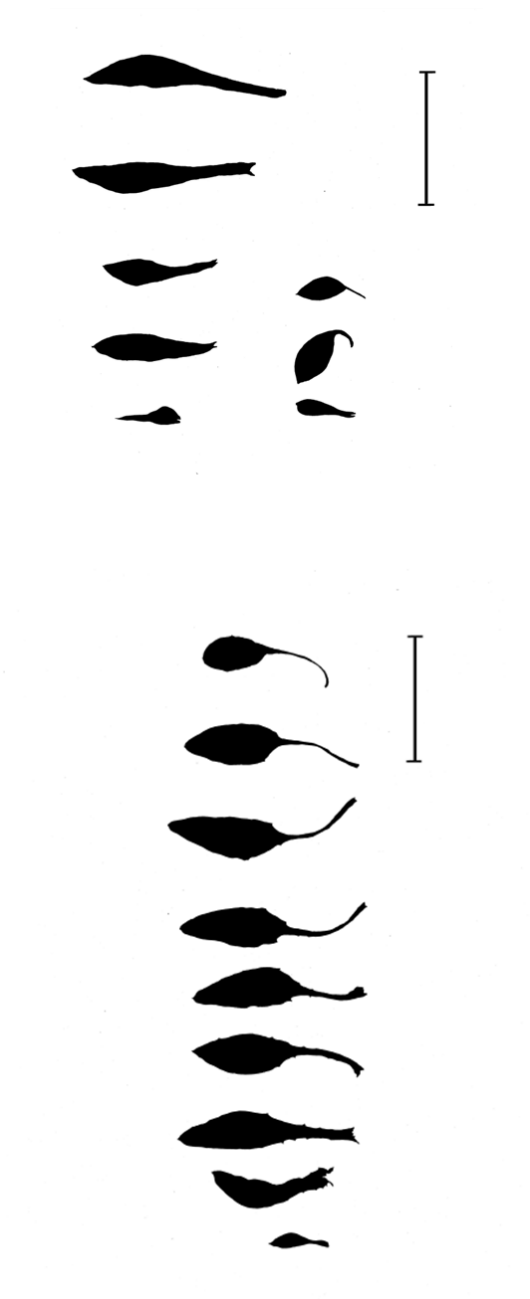
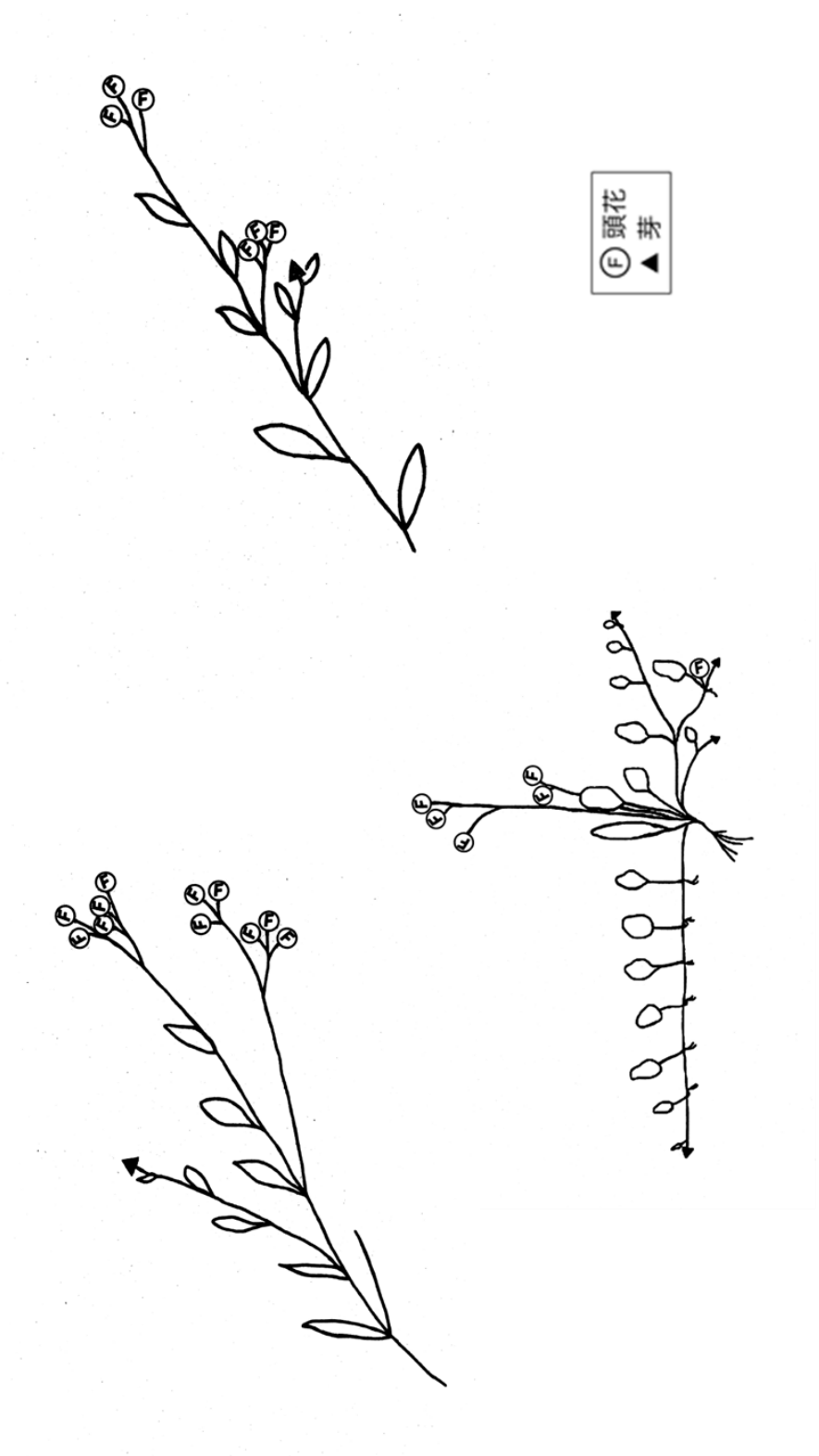


図 III-2b 茎葉の様子

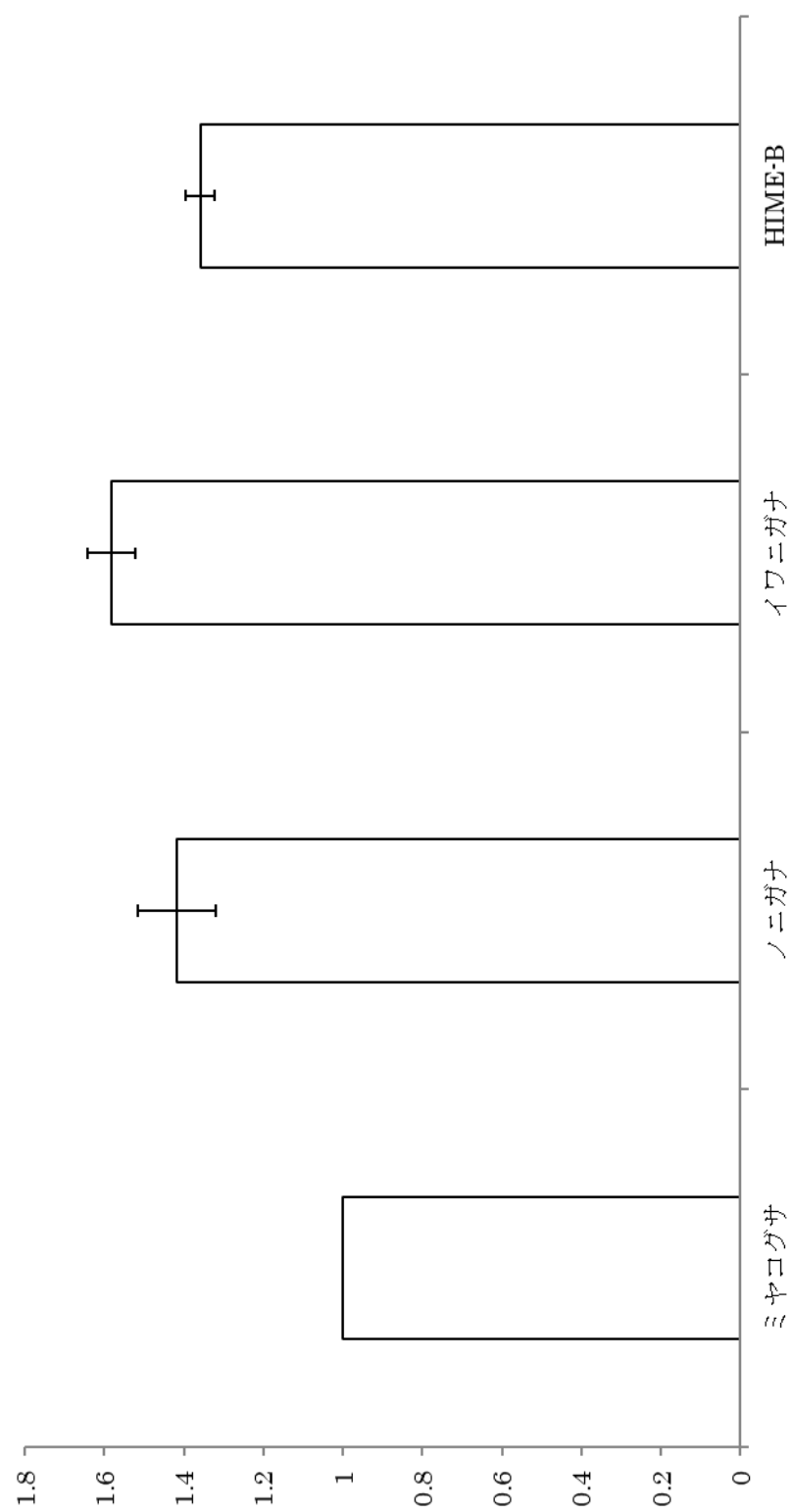
上：HIME-Aの茎葉（左端が先端部）

下：HIME-Bの茎葉（左端が先端部 上段、下段の2本の茎の葉）

図中のバーは5cm



図Ⅲ-3 分枝の様子（図中のFは頭花、▲は芽を示す）
上左:HIME-A



図Ⅲ-4 ミヤコグサを基準とした相対DNA量（図中のひげは標準偏差）

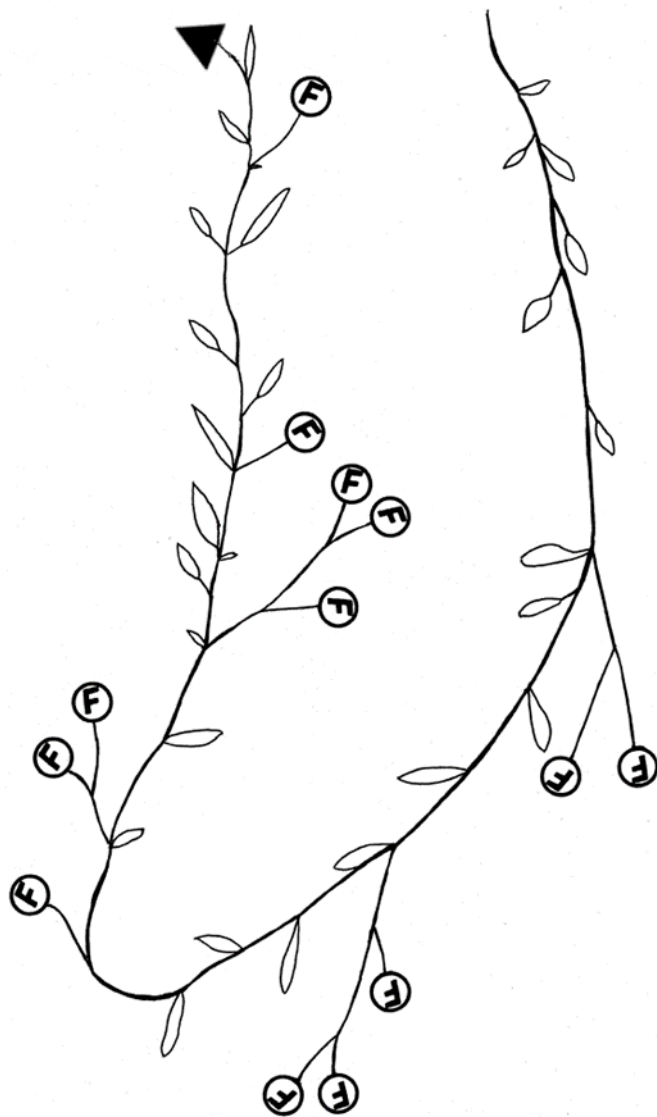
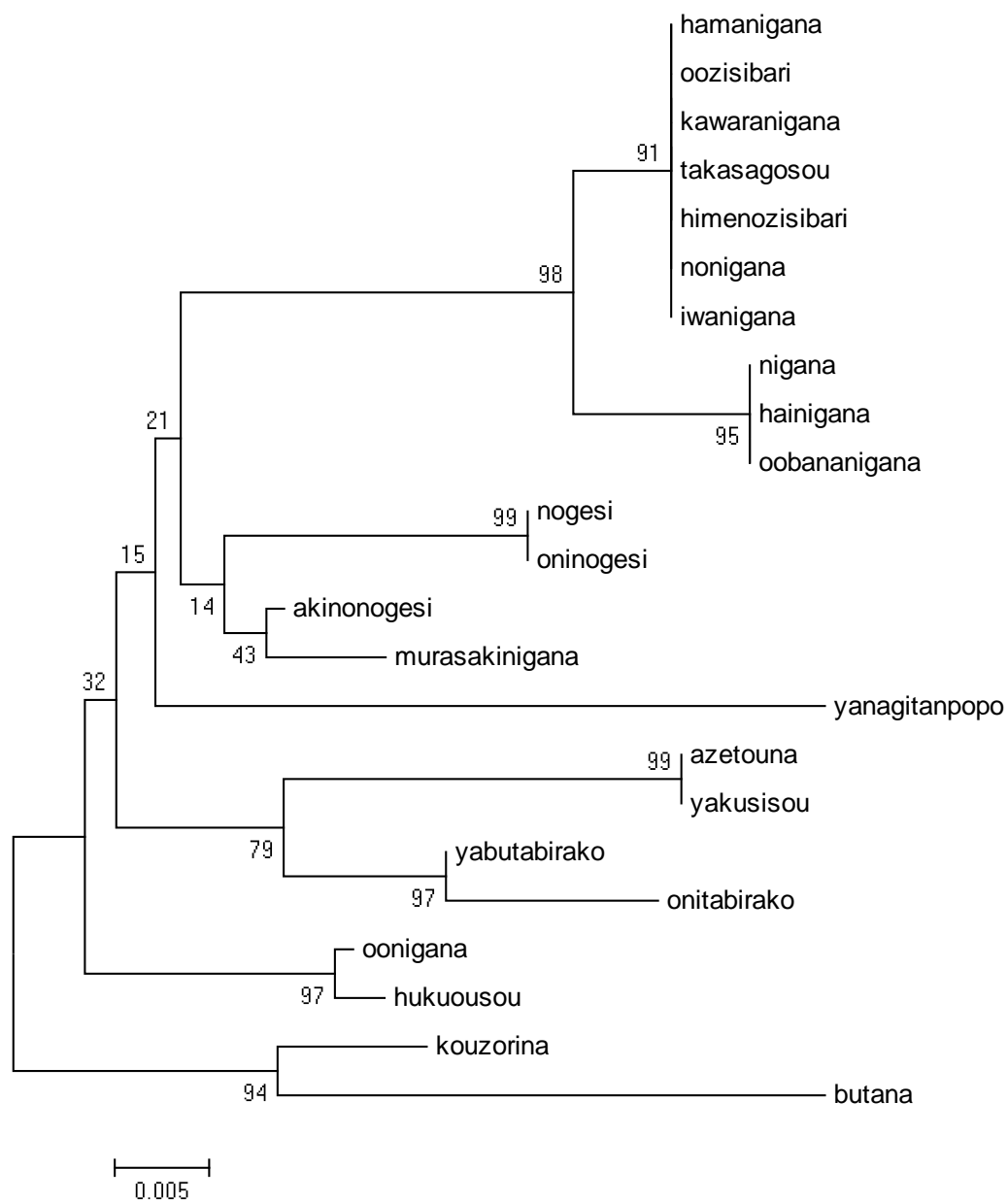
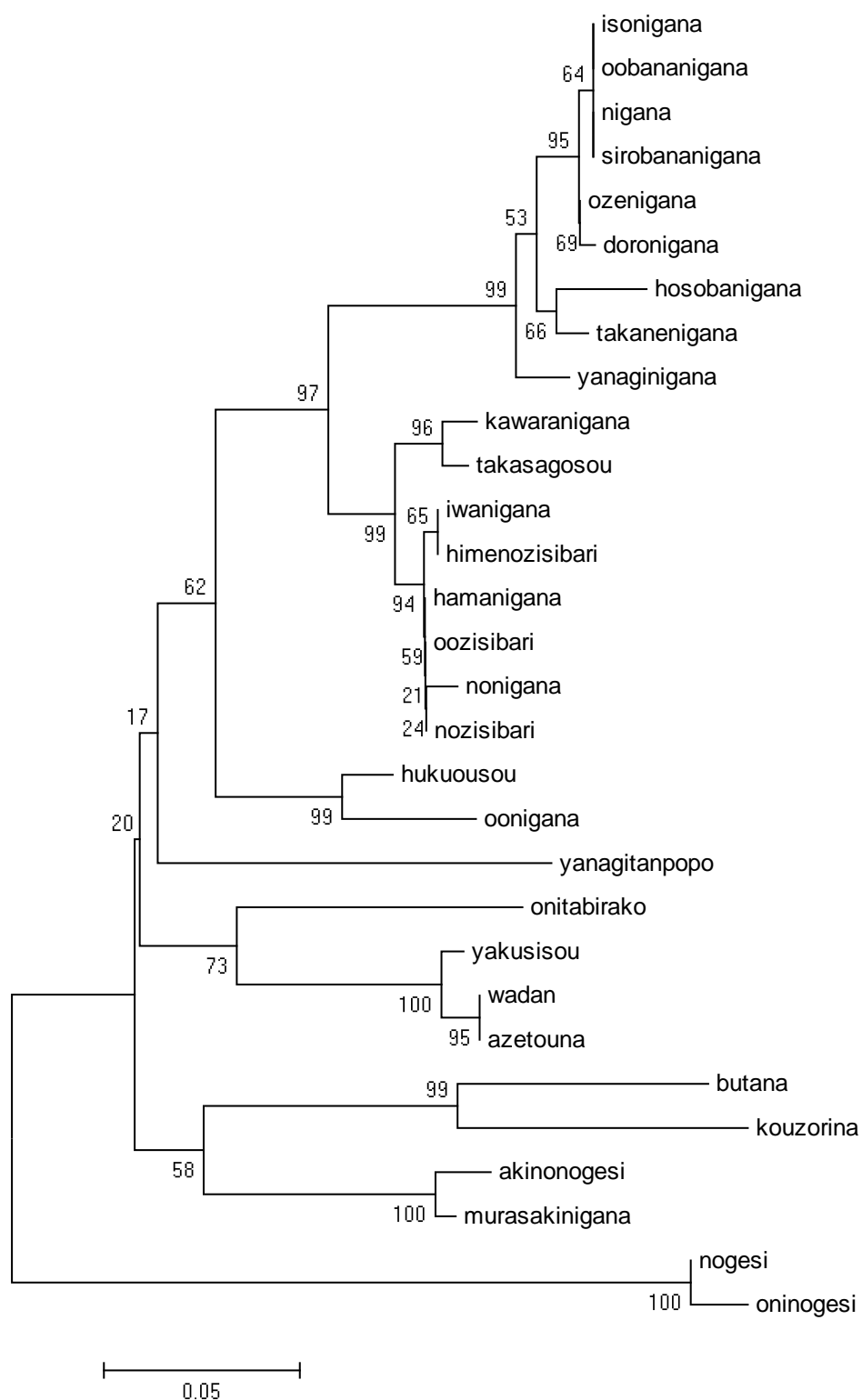


図 III-5 分枝の様子 (図中の F は頭花、▲ は芽を示す)
イワニガナ (♀) × ノニガナ (♂) で生じた F₁ 雑種



図IV-1 葉緑体 DNA の TrnT と TrnL 間の非コード領域 (860bp) に基づく系統樹 (NJ 法)

図中の名称は、表IV-1 を参照。外群には oninogesi (*S. asper*)、nogesi (*S. oleraceus*) などを用い、ブートストラップ確率を枝に示した。



図IV-2 ITS領域 (ITS1, 5.8s, ITS2) の289~655bpに基づく系統樹 (NJ法)

図中の名称は、表IV-1を参照。外群には oninogesi (*S. asper*)、nogesi (*S. oleraceus*) を用い、ブートストラップ確率を枝に示した。

付録Ⅰ－1 交雑実験の様子



交配実験 ノニガナにオオジシバリの花粉を掛け合わせ、袋かけをしたもの



交配実験 オオジシバりにノニガナの花粉を掛け合わせ、袋かけをしたもの

付録 I - 2 雑種 F₁ とオオジシバリ、ノニガナの標本



雑種 F₁ (ノニガナ (♀) × オオジシバリ (♂) によって生じた個体)



オオジシバリ



ノニガナ

付録Ⅱ－１



NISHI-1 西蒲区巻の4倍体

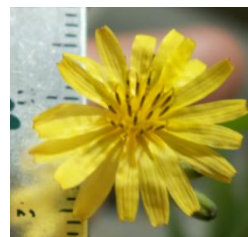
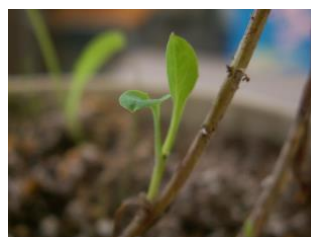


左：同じ場所で見られる変異個体 右：左からオオジシバリ、変異体、ノニガナ
2012年6月に撮影

付録Ⅲ－1 HIME－A と HIME－B の様子



HIME-A 長野県下水内郡栄村青倉にて発見

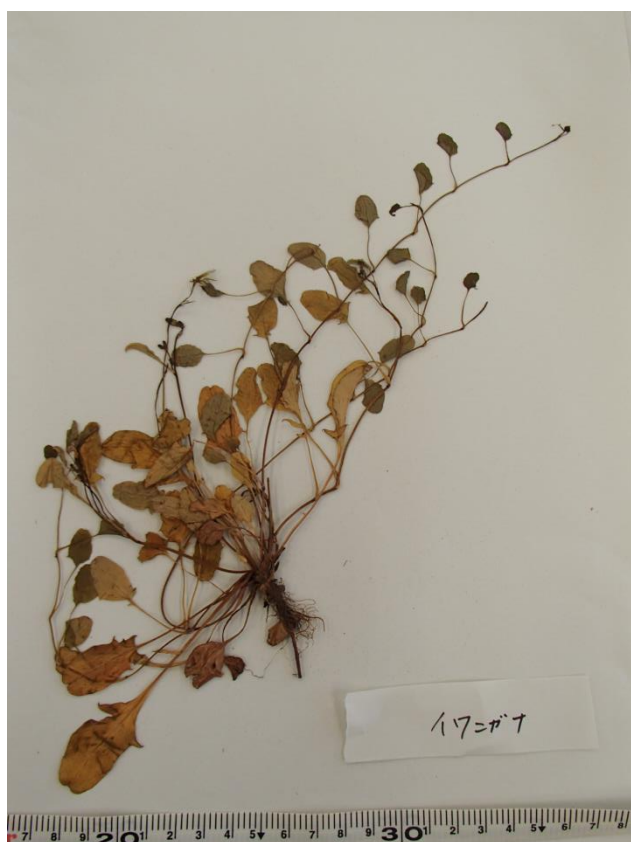


HIME-B 新潟県魚沼市にて発見

付録Ⅲ－2 イワニガナ



長野県下水内郡栄村にて



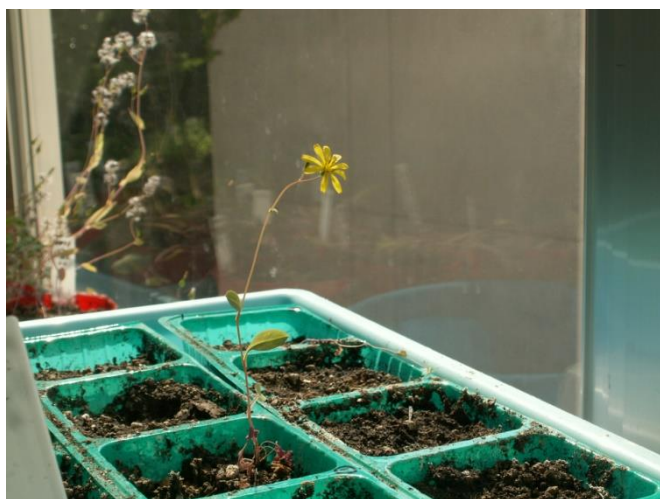
イワニガナ

付録Ⅲ－３ 2008年ノニガナ（♀）×イワニガナ（♂）の交配の結果

生じた個体の標本の写真



付録Ⅲ－４ 2010年ノニガナ（♀）×イワニガナ（♂）の交配の結果生じた個体



交配実験によって生じた個体の標本

付録Ⅲ－5 その1 京都総合博物館並びに国立科学博物館に収蔵されている標本



標本 A 「河内郡城山村駒生」にて 1935 年 5 月 21 日に採取されたもの

〔京都総合博物館蔵〕



標本 B 「武蔵國元八王子城山及其の附近恩方村山地」にて 1935 年 7 月 14 日に佐藤達夫氏が採集したもの。右上：瘦果の様子、右下；茎葉

〔京都総合博物館〕

付録Ⅲ－5 その2 京都総合博物館並びに国立科学博物館に収蔵されている標本



標本C 「武蔵拝島」にて1949年5月31日に桧山氏が採集したもの
〔国立科学博物館蔵〕



標本D 「上野沼田」にて1958年7月7日に武井武一氏が採集したもの
〔国立科学博物館蔵〕

付録Ⅲ－6 新潟県新津資料館の標本

1992. 5. 17 南蒲原郡下田村大谷 五十嵐ダムにて採集



付録Ⅳ－1

1. DNA の抽出 (CTAB 法)

2005 年～2010 年にかけて CTAB 法により DNA を抽出した。

乳鉢に入れた生葉 (3×3cm 程度) に液体窒素を入れ、一気に粉々にすり潰し、冷やしておいた葉さじを使って、エッペンチューブに移した (すぐに使用しない場合は、4℃あるいは-20℃で保存)。あらかじめウォーターバスを用いて 65℃に温めておいた CTAB buffer +2 メルカプトエタノール (100ml+0.2ml) を 750 μ l 加え、緩やかに混合した。その後、ウォーターバス (65℃) で 10 分間緩やかに振とうしながら湯せんした。クロロホルム-イソamilアルコール (24 : 1) を 700 μ l 加え、10 分間ローテーターで緩やかに混合し、遠心分離 (温室、15000rpm、10min) をした後、カットピペットで上澄みを新しいチューブに移した。このタンパク質除去の操作をもう一度繰り返した後、冷やしたイソプロパノール 450 μ l を加え、ローテーターで 5 分間緩やかに混合し、核酸を沈殿させた。さらに遠心分離 (4℃、15000rpm、10min) した後、上澄みを捨てて、冷やした 70%エタノールを約 1ml 加え、2～3 回ゆっくりと反転し、リンスした。その後、遠心分離 (4℃、15000rpm、10min) した上澄みを捨てて、20 分間ペレットを乾かした。ペレットを RNase (0.1mg/ml) 10 μ l と TE buffer 100 μ l に溶かし、65℃で 30 分以上湯せんをした。

フェノール-クロロホルム (1 : 1 v/v) を 100 μ l 加え、ローテーターで 1 分間緩やかに混合した。その後、遠心分離 (室温、15000rpm、10 分間) し、蓋がネジ式のチューブにカットピペットで上澄みを移し、3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 10 μ l と冷やしておいた 99%エタノール (-20℃) 250 μ l を加え、緩やかに混合した。-80℃ (ディープフリーザー) に 10 分間静置し、核酸を沈殿させた後、遠心分離 (4℃、15000rpm、10min) した上澄みを捨て、70%エタノール (-20℃) を約 1ml 加え、反転させてリンスをした。次に遠心分離 (4℃、15000rpm、10min) した後、再び上澄みを捨て、チューブを反転させてペレットを 20 分間乾燥させた。チューブに TE buffer を 50 μ l 入れペレットを溶かしたが、すぐに使用しない場合は、4℃または-20℃で保存した。

2. PCR (ポリメラーゼ連鎖反応法) で DNA の増幅

DNA 濃度を計測し、50 倍程度に薄め、10.0ng/ μ l にした。1ml エッペンチューブに、10X exTaq™ Buffer 2.5 μ l、dNTP Mixture (2.5mM) 2.0 μ l、Ex Taq™ 0.13、Forward プライマー、Reverse プライマー各 1.0 μ l、D.W. 17.37 μ l、鋳型 DNA 1.0 μ l の計 24 μ l を軽く指ではじいて混合し、軽く遠心に掛けて内容物を落とした。これらをサーマルサイクラー (94℃を 30 秒、55℃を 30 秒、72℃を 1 分の 35 サイクル) にかけて DNA を増幅させた。

3. PCR 生成物のチェック

PCR 生成物の確認をするためにアガロースゲルでミュービッド電気泳動装置を用いて電気泳動を行った。2%アガロースゲル (1XTAE buffer) を電子レンジでとかし、ゲル板に流し込みコームをセットし、固まったらコームを抜き、泳動 buffer (1XTAE buffer) を入れ

た泳動槽に入れた。パラフィルムの上に 10X Loading Buffer を 1 μl ずつ出しておき、その上に PCR 生成物を 5 μl 加え、ピペティングし、ゲルの溝に混合物を注入した。一番端の溝にはサイズマーカー (100 bp DNA Ladder (Dye Plus)) を 2 μl 注入した。100V で 20~25 分程度泳動した後、ゲルをエチジウムブロマイド液に浸し、20 分間し振とう機で振とうしながら染色した。染色後、トランスイルミネーターで 100%UV (波長 254nm) を照らし、増幅を確認した。

4. PCR ダイレクトシーケンス

PCR 生成物 5 μl 、D.W. 5 μl 、ExoSAP 0.1 μl を軽く混ぜ合わせ、37°C 30 分、80°C 15 分にインキュベートし PCR 生成物を精製した。さらに、Ready Reaction Premix 1.0 μl 、5X Sequencing Buffer 1.5 μl 、サンプル、0.5 μl 、プライマー 0.5 μl 、D.W. 6.5 μl を入れてよく混合させた後、BigDye Terminator v 1.1 を用いてサイクルシーケンス反応 (96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分を 25 サイクル) を行った。その後、125mM の EDTA を 2 μl 、3M の酢酸ナトリウムを 2 μl 、95%エタノールを 50 μl 加え、沈殿したサンプルを 15 分間放置した後、遠心分離 (室温、15000rpm、20min) かけた後、上澄みをすべて完全に取り、70%エタノールを 100 μl 加えて軽く攪拌した。その後、遠心分離 (室温、15000rpm、5min) にかけて、上澄みをすべて完全に吸い取り、風乾させた。これに、20 μl の Hi-DiFormamide をチューブに加え、十分混合した後、95°C で 2 分間加熱し、氷冷中で急冷した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシーケンスを行った。

クローニングの方法

- ① PCR ((denature 15s, anyling 15s, extention 20s) \times 35 回)の後、15°C で 30 分間で DNA を増幅させたもの 5 μl と Ligation Mighty Mix 5 μl 、T-vector 1 μl をおだやかに混合する。
- ② E. coli competent cells (50 μl) を -80°C のデューブフリーザーから取り出し、氷上でおだやかに解凍する。ウォーターバスを 42°C にする。振とう器を 37°C に設定し、クリーンベンチ内に冷凍庫から取り出した LB (-) (250 μl) を置き、室温にする。
E. coli competent cells に①の反応液を 5 μl 加え穏やかに混ぜる。氷上で 5~30 分間インキュベートし、大腸菌をベクターにくっつけさせる。正確に 30 秒間、細胞に 42°C で heat-shock を与え、すぐ氷上に移す。クリーンベンチ内で LB (-) 培地 (常温: マイクロチューブに分注したもの) 250 μl に加える。しっかり蓋をして 37°C 1 時間水平方向に振動させる。
- ③ Plate の準備をする。
LB (-) 100ml (5 枚分) をフラスコに分注し、1.5g のアガロースを加え、電子レンジで温める。40°C 近くまで冷やし、アンピシリンを 100 μl と X-Gal を 100 μl 加える。すばやく分注し、plate を作成する (冷蔵庫に保存)。Plate は常温にし、上下逆さまのふた

をずらしておき、風をあてる（紫外線はあてない）。固まったら冷蔵庫に保存

④Plating

シャーレに日付と加えられたものを書く。

アルコール消毒されているコンラージ棒を火にあててあぶり、エタノールを飛ばす。
100 μ lをピペットでなるべくばらまかないようにシャーレ中央にまく。風をあてる。その後、コンラージ棒で回転させながら(100回くらい)広げ表面だけ乾かす。その後、ふたをしてひっくり返す。

37℃のインキュベーターに16時間以上入れる。

⑤PCR

コロニーを爪楊枝の先で少しつつきそれを、PCR(95℃ 05 : 00⇒(95℃00:30、58℃ 00:30、72℃01:30) × 35、72℃ 05 : 00⇒20℃∞で増幅する。

謝辞

本研究は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の データベースを利用しました。

本論文を作成にあたり、長期にわたり酒泉満先生に見守っていただきました。あきらめかけたことがありましたが、先生のお言葉でまとめることができました。ありがとうございました。また、研究全般に関して、新潟大学名誉教授森田龍義先生に細部にわたり助言をいただき大変感謝しております。考察・発表等では新潟大学教育学部准教授志賀隆先生より、的確なアドバイスをいただきました。新潟大学農学部教授岡崎桂一先生、農業環境技術研究所の芝池博幸様には実験を行うにあたりお世話になりました。ありがとうございました。最後に、研究のきっかけとなったヒメノジシバリの提供者でもある父石澤進氏（元新潟大学理学部教授）に深謝します。

Abstract

The present study was carried out to verify Kitamura's hypothesis (1936) that *Ixeris* × *sekimotoi* is the interspecific hybrid of *Ixeris polycephala* and *Ixeris japonica* of the genus *Ixeris* (Compositae subfam. Cichorioideae tribe Cichorieae).

The F1 plants produced from the artificial cross between *I. polycephala* (2x) as the seed parent and *I. japonica* (6x) as the pollen parent were tetraploid and produced fertile seeds through self-pollination. They showed characteristics intermediate between both parental species, consistent with the description of *Ixeris* × *sekimotoi* by Kitamura (1936). These results support Kitamura's hypothesis and suggest that *Ixeris* × *sekimotoi* occurs only when the seed parent is *I. polycephala*.

An individual identified as *Ixeris* × *sekimotoi* was discovered from a natural population in Maki, Niigata Prefecture, where both *I. polycephala* and *I. japonica* grow sympatrically. The plant showed external morphology similar to that of the artificial F1 hybrid, with a tetraploid DNA content and seed fertility. During six years of observation (2009–2015), *Ixeris* × *sekimotoi* individuals increased in number and gained variations in leaf shape and head diameter

among them. An individual was estimated to be triploid. Higher pollen fertility of *Ixeris* \times *sekimotoi* suggested backcrossing potential as the pollen parent.

An interspecific hybrid between *I. polycephala* and another diploid species, *Ixeris stolonifera*, was also suggested by Kitamura (1956). Some putative hybrid individuals similar to it were discovered in natural populations where both species grew sympatrically. These were distinct from *Ixeris* \times *sekimotoi* and had morphological characteristics intermediate between *I. polycephala* and *I. stolonifera*, and had a diploid DNA content. Crossing between these two species demonstrated that putative hybrid individuals were produced only when the seed parent was *I. polycephala*. Accordingly, I named those hybrid individuals as "*Ixeris* \times *pseudosekimotoi*." Because *Ixeris* \times *pseudosekimotoi* neither produce fertile seeds nor carry out vegetative propagation by creepers like *I. stolonifera*, the possibility of multiplication seems low. However, the potential of backcrossing to either diploid parent cannot be excluded, because its pollen grains have some fertility.

In order to confirm the seed parents of *Ixeris* \times *sekimotoi* and *Ixeris* \times *pseudosekimotoi*, an intergenic region (*TrnT- TrnF*) of the chloroplast DNA (cpDNA) was sequenced, because cpDNA of the Compositae is maternally

inherited. A comparison of the base sequences with those of the parental species demonstrated that *I. polycephala* was the seed parent of both hybrid species. The base sequences of the internal transcribed spacer (ITS) and the external transcribed spacer of the nuclear ribosomal RNA gene (ETS) showed that the pollen parent of *Ixeris* \times *sekimotoi* and *Ixeris* \times *pseudosekimotoi* was *I. japonica* and *I. stolonifera*, respectively.

There were no differences in the *TrnT*-*TrnF* region between *I. stolonifera* and *I. japonica*, and only one base difference in the ITS region was detected. Moreover, the ETS region had only three base differences. Judging from these molecular data and their morphological characteristics, I believe that *I. stolonifera* and *I. japonica* are more closely related than *I. polycephala* and *I. japonica* or *I. polycephala* and *I. stolonifera* are. The reason why no hybridization occurs between *I. stolonifera* and *I. japonica* is still unclear.

The previous genus *Ixeris* is currently divided into the genera *Ixeris* and *Ixeridium*. Plants of the new *Ixeris* genus have a white pappus, and the basic number of chromosomes is $x = 8$. Plants of *Ixeridium*, on the other hand, have an off-white or yellowish white pappus, and the basic number of chromosomes is $x = 7$ (Oohasi *et al.* 2017). This classification was tested in the present study by

a molecular phylogenetic analysis. In the phylogenetic tree constructed from the base sequences between *TrnT* and *TrnF* of the cpDNA, *Ixeris* and *Ixeridium* each formed a different clade. Similar results were shown for the ITS region. Consequently, it is possible to conclude that the new taxonomic treatment of *Ixeris* and *Ixeridium* is correct molecular phylogenetically. Whereas interspecific hybrids were formed within the same genus *Ixeris*, they may not occur between *Ixeris* and *Ixeridium*.