

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440215

研究課題名(和文) 種内および近縁種間における花の匂い特性の多様性形成とそれに伴う種分化に関する研究

研究課題名(英文) Study of floral scent characteristics involved in the speciation

研究代表者

鈴木 浩司(東浩司) (SUZUKI, Hiroshi)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50362439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近縁種間およびそれらの雑種個体における花の匂いの化学的特性の違いと生殖的隔離との関係を調べるために、アケビ属、サツマイモ属、ヒメタイサンボク、セキショウなどを対象に匂い特性を調べた。アケビとミツバアケビの交雑個体であるゴヨウアケビにおいては両親とは異なる匂い物質を放つ個体があり、野外で誘引試験した場合は両親種ではあまり見られない甲虫類の訪花が見られた。ハリアサガオとヨルガオの匂い特性は異なっており、両種の雑種個体の作成を試みたが、現時点まで成功していない。ヒメタイサンボクは川を挟んで異なる種内分類群がみられ、葉の化学成分を指標に種内多型を評価した。

研究成果の概要(英文)：To study relationship between reproductive isolation and chemical characteristics of floral scent among closely related species including hybrids, I conducted floral scent analyses and field experiments using imitated flowers which contain scent chemicals of *Akebia x pentaphylla*. The imitated flower experiments tend to attract some small beetles which are not found in the parents species, *A. quinata* and *A. trifoliata*. In addition, I analyzed flora scents of *Ipomoea alba*, *I. muricata*. And I tried to produce their hybrid seeds between *I. alba* and *I. muricata*, but I could not. The scent profiles of *I. alba* and *I. muricata* were different each other and *I. alba* emitted larger amounts of volatile than *I. muricata*. I analyzed leaf volatiles (essential oils) of *Magnolia virginiana* to detect chemical marker to distinguish northern and southern populations.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：花の匂い 多様性 種分化 雑種

## 1. 研究開始当初の背景

花と昆虫との相互適応的関係の成立は被子植物の多様化の大きな原動力であり、その成立・維持過程を明らかにすることは、植物の系統進化・種分化を考える上で重要な研究アプローチである。これまでの被子植物(特に花の)多様化・種分化についての多くの研究は花の「かたち」や「色・模様」の形態的特徴や変異幅などを調べることに重点を置いてきた。しかしながら、花の形や色と同等に重要な要素である花の「匂い」に関しては、あまり研究が行われていない。例えば、ラン科の研究などで報告されているように、花の匂い特性の異なる近縁種の雑種個体が両親種とは異なる匂い特性(および花形態)を示し、送粉者シフトを起こしている例は、雑種形成による新たな種分化の例と考えられている。

筆者のこれまでの研究においても、匂い特性の異なる近縁種(変種)間(アケビ属、モクレン属)の交雑個体において、多くは両親種の中間的な匂い特性を示すが、まれに両親種に見られない匂い物質が新規に放出されることが分かった。これは、新規形質を獲得した雑種個体(集団)による種分化過程を検証する上で、重要な発見だが、より詳細なデータを集める必要がある。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの研究に引き続き、アケビ属2種(アケビ、ミツバアケビ)の雑種であるゴヨウアケビについて、両親種とは異なる花の匂いの化学的特性を持っていないかどうか、持っているならば、それが両親種とは異なる繁殖様式(訪花昆虫相の違い)を導いているかどうかを明らかにするために、ゴヨウアケビのさらなる探索と花の匂いの化学的特性を調べ、両親種との違い、特に両親種からは放出されていない匂い物質を放出していないかどうかを調査する。さらに、アケビ、ミツバアケビでは見られず、ゴヨウアケビの花においてのみ見られる匂い物質に関して、単純な模擬花を用いて、野外における昆虫の誘引試験を行う。

(2) アケビ属は雌雄同株で一つ一つの花は小さく花序となって咲き、同一花序に雄花と雌花が含まれる。この場合、花ひとつあたりの花の匂いの化学的特性の評価が難しい。そこで、花が比較的大きいサツマイモ属のハリアサガオとユウガオを研究対象とし、花の匂いの化学的特性の評価および雑種個体の作成を試みる。雑種種子ができれば、栽培し、その花の匂いの化学的特性や花粉稔性などの繁殖様式を調べる。

(3) これまでの研究で、北米東部に自生するヒメタイサンボク(モクレン属)は川を挟

んで遺伝的に異なる集団に分かれることがわかっており、また、花の開花特性や匂い特性も集団間で異なることが明らかになっている。花の匂いの化学的特性に関して、両集団間でどのように異なっているのか、それに伴い、訪花昆虫相が異なっているのかどうかを可能な範囲で明らかにする。ただ、本種は自生地ではかなり高木(~20m)で、花の採取・観察が難しい、そこで、DNA解析および葉の化学的特性(精油成分)を調べることで、集団間の違いを見出すことを試みる。

(4) ショウブ属セキショウはすでに匂いの化学的特性について調べているが、セキショウは開花期が異なる種内分類群がいくつか知られている。ここでは標準系統と小型系統の両方を同所的に栽培し、訪花昆虫の違いを調べる。また、栽培品および野外におけるセキショウ種内の花の匂いの多型性(や訪花昆虫)についても調査する。

## 3. 研究の方法

(1) 日本にはアケビ属3種が分布する。アケビ *Akebia quinata* の花は強い匂いを放ち、市街地や里山に生育する。ミツバアケビ *A. trifoliata* はほとんど匂いを放出せず、アケビより山地側に生育する。ゴヨウアケビ *A. x pentaphylla* はアケビとミツバアケビの雑種であり、アケビ、ミツバアケビほどではないが、里山から山地にかけてしばしば見られる。これら3種の花の匂いをヘッドスペース法により吸着剤 TENAX に捕集し、エーテルで溶出後、GC-MS 分析を行った。匂いの捕集に際し、これらの花は比較的小さいので、同一個体から複数花序(原則10花序)を集めて匂い捕集を行った。その際、一つの花序に雄花と雌花があるため、オス花とメス花は別々に匂い捕集を行った。ゴヨウアケビについては花序の形態がアケビ(球状)とミツバアケビ(細長い)の中間的なもので、かつ葉の小葉に鋸歯があり(または波打つ)、3-5枚のものとした。ゴヨウアケビの雑種性を明らかにするために、コットンブルー染色による花粉稔性および葉緑体 DNA 配列および核 ITS 領域の配列を決定し、アケビ、ミツバアケビと比較した。また、白い画用紙で作った円盤(直径5cm)を模造花として、そこにアケビ、ゴヨウアケビで共通して見られた匂い物質、およびゴヨウアケビでのみ見られた匂い物質の標品(市販品)を染み込ませ、昆虫の誘引性を試験した。

(2) ハリアサガオとユウガオは市販されている種子を購入し、ポット栽培した。花の匂いの捕集についてはアケビの場合と同じだが、つぼみの段階から開花まで5段階に分けて匂いの捕集を行った。また、交雑種子の作成では、つぼみの段階でカミソリで花弁を切り、ピンセットで除雄を行った。その後、ナ

イロンメッシュの袋をかぶせ花卉に開き具合に応じて他種の花から雄ずいを取り出し花粉を柱頭につけた。

(3) ヒメタイサンボクは北米東部に分布し、南部集団と北部集団では花の匂いが異なり、花が開き始める時間がずれていることが知られている。また、南部集団と北部集団の境界線はすでにわかっており、その近傍で両者の混生集団および雑種個体の探索を行った。また、比較的観察しやすい個体については訪花昆虫の観察を行った。しかし、ヒメタイサンボクは高木なので、花を採取・観察することが難しい。そこで、葉の精油成分を調べるために葉を採取し、乾燥後、エーテル抽出を行った。抽出液を濃縮後、薄層クロマトグラフィで展開し、硫酸とGoddin試薬で焼付、精油成分のパターンを調べた。DNA解析も合わせて行った。

(4) ショウブ属セキショウについても、市販品および野外において、可能な限り多くの個体の花の匂いの捕集を行った。セキショウの花序は非常に細長いので、ガラス管を用いたヘッドスペース法により補修した。また、セキショウは普通に見られる系統のほかに、やや小型のものや、開花期が少し遅れる系統が知られている。それらは異なる分類群(変種レベル)とされている。そこで、普通系統と小型系統の鉢植えを同所的に並べて、訪花昆虫の観察を行った。

#### 4. 研究成果

(1) アケビ属のアケビとミツバアケビ、およびその雑種とされるゴヨウアケビの花の匂いの捕集、訪花昆虫の観察、およびDNA解析を行った。その結果、極微量ではあるが、両親種(アケビ、ゴヨウアケビ)の匂い物質としては検出されていない物質が、ゴヨウアケビから新たに検出された。すでに一部のゴヨウアケビでのみ見られた匂い物質については模造花をもちいた昆虫の誘引試験を行った。アケビ属はつる性で樹木に絡みついて比較的高い位置まで伸びていくので、それを模して日当たりの良い林縁において地上1m付近と地上3m付近で訪花昆虫の違いを検討した。地上3m付近のほうが個体数としては1m付近より比較的多くの昆虫が訪花していた。また、試験の際の匂い物質の量については実際の花から検出された量と同程度に調整した場合はほとんど昆虫が誘引されず、量を増やすと昆虫が誘引された。また、模造花を用いた試験において、アケビやゴヨウアケビで共通して見られた匂い物質(炭化水素型モノテルペン)の場合はハチの仲間が比較的多く訪花しているが、ゴヨウアケビでのみ見られた匂い物質(酸素を含むタイプのモノテルペン)については小さな甲虫類が多く見られた。しかし、試験を行う場所により訪花昆

虫の組成が大きく異なり、より詳細な試験が必要である。また、雑種であるゴヨウアケビは花粉稔性が低く(3割程度)、種子生産についても調査したが、結実種子は得られなかった。さらに、DNA解析から形態的にミツバアケビとしか考えられない個体がアケビのハプロタイプを持つなど、浸透性交雑が疑われる例が見られた。今後はさらに野外試験等によりゴヨウアケビの独自性を検証する必要がある。また、模造花を用いた野外試験においては試験する匂い物質は単品でしか行わなかったが、より実際の状態に近づけるために、共通して見られる匂い物質をベースに試験したい匂い物質を加えて試験する方法を検討する。



図1. ゴヨウアケビの模造花に集まった昆虫

(2) ハリアサガオとヨルガオの栽培を行い、開花個体の花の匂いの化学的特性を調べた。また、つぼみの状態から開花まで段階を追って調べたが、量的な違いしか見られなかった。つぼみの状態ではまったく匂いを放出していないが、開花し始めた直後から匂いを放出し始めた。ヨルガオのほうが花も大きいせいもあり、匂いの放出量はハリアサガオより多かった。種間では匂いの化学的特性は大きく異なっており、一方はベンゼノイド系、もう一方はテルペン系であった。そのため、交雑個体がどのような匂いの化学的特性を持つかが興味を持たれた。そこで、両者の交雑個体の作成を試みたが、同時期に播種したところ、開花期が1ヶ月程度ずれてしまったり(ヨルガオのほうが開花まで時間がかかる)、除雄がうまくいかず、交雑種子を得られたと思ったものが、次年に発芽させて調べてみたら自殖種子だったりと結果的に交雑個体を作り出すことができなかった。そもそも交雑個体ができるかどうかはわからないが、栽培自体は簡単なので、今後も行っていきたい。

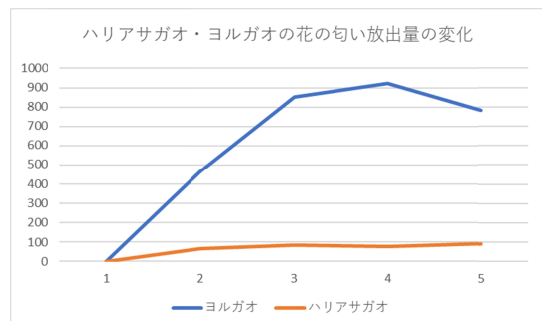


図2. ハリアサガオとヨルガオの花の匂いの

## 放出量の変化

表 1. ゴヨウアケビの花の匂い物質

MONOTERPENES	IRREGULAR TERPENES
a-P inene	4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene
Sabinene	SESQUITERPENES
b-P inene	ST-1
Myrcene	ST-23
1,8-Cineole	ST-3
Limonene	ST-6
(Z)-Ocimene	ST-8
(E)-Ocimene	Caryophyllene
M T-1	ST-24
Linalooloxide	ST-25
Terpinolene	b-Farnesene
M T-4	ST-13
Linalool	a-Farnesene
Perillene	ST-20
M T-5	BENZENES
Limonene oxide	Benzylmethyl ether
M T-6	Phenylacetaldehyde
Limonene oxide	2-Phenylethanol
Allo-Ocimene	Methylsalicylate
M T-7	Benzylbenzoate
a-Terpineol	N-COMPOUNDS
M T-8	Phenylacetoneitrile
M T-9	2-Aminobenzaldehyde
Nerol	MISCELLANEOUS
Carvone	(Z)-Jasmone
(Z)-Citral	UNIDENTIFIED
Geraniol	unidentified
(E)-Citral	unidentified

(3) 北米に自生するヒメタイサンボクの南部集団と北部集団(変種レベルで区別されている)において花の匂いの化学的特性が異なっていることはわかっているが、両者が交雑しているのかどうかはよくわかっていない。しかし、本種は高木なので、花の採取・観察が難しい。そこで、先行研究において、南部集団と北部集団で違いが見られたと報告がある葉の精油成分を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で調べてみた。南部集団と北部集団の比較では全体として、両者は異なるスポットパターンを示すが、個体差が激しく、それが交雑由来なのかどうか判断が難しい。TLCからそれぞれの集団に特徴的な成分を抽出して物質の同定を試みたが、材料となる葉の量が少なく、同定には至らなかった。

(4) ショウブ属についても新たな集団においてこれまで同様に匂いの捕集やDNA解析、訪花昆虫の観察を行った。匂いに関しては特に種内の多型性は見られず、どの個体も特定の匂い物質を放出していた。ただし、微量成分については、さらなる解析が必要である。訪花昆虫についてはセキショウではほとんど訪花昆虫が観察されなかったが、強いて言えば、アリが花序を通過していく例が多く、

実際、観察した個体の自然状態での結実率は低かったが、アリが通った部分だけが種子をつけているようにも見た。また、系統の異なるセキショウ集団間の人工交配を試みたが、現時点では成功していない。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Azuma, Hiroshi. Molecular Phylogeny of Magnoliaceae. Annual meeting of the Magnolia Society International. プロツワフ(ポーランド)2015年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

鈴木 浩司 (SUZUKI, Hiroshi)

富山県立大学工学部・准教授

研究者番号: 50362439

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

#### (4) 研究協力者

( )