

## 身近なランであるネジバナの多型維持機構の 説明による生物多様性維持へのアプローチ

佐々木 謙昌

岐阜県・滋賀県

### はじめに

生物多様性は、遺伝的多様性も包括した概念でありその保全の必要性は広く認知されている。遺伝的多様性維持は、遺伝資源の保全につながることも根拠の一つとされている。しかし、その遺伝子の多様性がいかに維持されているかはまだ十分に研究されていない。例えば中立説的な遺伝的多様性の遺伝と増加の説明では、遺伝資源としての価値がある可能性が高い適応度に影響を及ぼすような遺伝子の多様性について完全に網羅することはできない。

したがって、そのような中立的でない遺伝子も積極的に維持されるようなメカニズムを明らかにする必要がある。中立的でない遺伝子は、淘汰圧によって最も適応度の高い遺伝子に均一化されてしまうと考えられるからだ。このメカニズムに関する知見を深めることで、生物集団に遺伝資源が保存されている根拠をより強固にできると考えられる。

このような積極的維持メカニズムは、多型に働いている可能性が高い。特に、多型の中でも比較的小さな集団であっても集団ごとと同じような頻度で見られるようなものにあると考えられる。なぜなら、有限の集団では遺伝的浮動によって遺伝子が取り除かれてしまうので、それにもかかわらず集団内の多型の頻度を維持しているような集団には、遺伝子頻度を維持しうるようなメカニズムが存在すると考えられるからだ。

そのような多型が存在する生物の一つに、ネジバナ (*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames var. *amoena* (M.Bieb.) H.Hara) があげられる。本種は地生のラン科の植物である。その花序構造はらせん状になっており、巻き方向に右巻きと左巻きの多型(巻き型多型)がある(図1)。ネジバナの個体群における多型の頻度は、およそ1:1であることが知られている(早川ら 2017)。このような1:1の頻度はどの集団でも見られることから、ネジバナは積極的な維持メカニズムを解明するための研究材料として相応しい種と考えられる。

本研究では、このメカニズムを解明するために、1) ネジバナに訪れる訪花者の同定、2) ネジバナの巻き型多型の分布の解析、3) 人工花序を用いたらせん型花序を訪れるクロマルハナバチの訪花行動の観察を行った。

### 対象種の基本情報

ネジバナは、地生のラン科植物で、日当たりの良い草地や芝生などに生える(林ら 1989)。開花の最盛期は6月の下旬から7月の下旬までとされる(林ら 1989)。花粉は花粉塊と呼ばれる塊となっていて、塊のまま送粉者に付着して運ばれる。花は花茎を中心にらせん状につき、その巻方向が右向きのもので左向きのものであり、その二型(巻き型多型)は、同所的におよそ1:1の頻度で分布している。(早川ら 2014)。花は花序の下から上に向かって順次開花する。個々の花の寿命は3、4日であり、両性期のある弱い雄性先熟で、自家和合性であるが、自動受粉はしない(Iwata et al. 2011)。

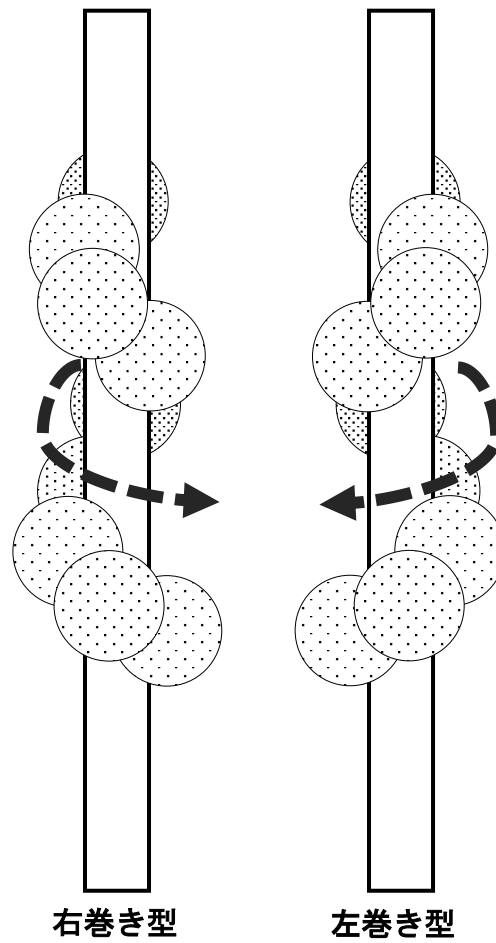


図1 ネジバナの巻き型多型.

左の写真は岐阜大学で撮影したネジバナの写真である。左のネジバナが右巻き型、右のネジバナは左巻き型である。それぞれの多型は個体群内に同所的にみられる。左の図はネジバナの巻き方向の見方の模式図である。長方形の軸はネジバナの花径、円はネジバナの小花を表す。このように直立した花茎にらせん形に小花をつける花序構造をとっており、らせんの巻き方向に右巻きと左巻きがある。

## 調査地

岐阜大学教育棟前のネジバナが群生している草地（35°27'53.6"N 136°44'16.1"E付近）と滋賀県立大学南駐車場北部の草地（35°15'26.0"N 136°12'58.2"E付近）を調査地とした。それぞれの調査地内に14×20m, 15×25m の調査区画を設定した。岐阜大学では、ネジバナの訪花昆虫の調査と巻き型多型の分布調査を行った。滋賀県立大学では巻き型多型の分布調査を行った。

## ネジバナの訪花昆虫の調査

### 調査内容

調査は、2020年6月28日、29日、7月1日、2日に、岐阜大学の調査区画で行った。6月28日、7月1日、2日は10時から15時、6月29日は8時から14時まで調査を行った。6月29日は、例外的に15時30分まで行った。調査地内もしくは調査地周辺でネジバナに昆虫が訪れるまで待ち、昆虫が訪れたら近づいて目視で種同定を行った。また可能な場合は、送粉者としての働きを比較するために訪花昆虫への花粉塊の付着の有無と、その訪花行動を観察した。

計画段階では、ネジバナに訪れるキムネクマバチ (*Xylocopa appendiculata*) の訪花行動の詳細な観察を行う予定であった。しかし2019年では比較的多数みられたキムネクマバチの訪花は、本調査を行った2020年では一例も見られなかったためその調査を行うことができなかった。

### 結果

調査時間中の天気は、6月28日が雨のち曇り、6月29日は晴れ、7月1日は雨時々曇り、7月2日は晴れ時々曇りであった。表1に気象庁データベースより岐阜市の気象情報を書き載せた。ネジバナへの訪花を観察された昆虫種は、モンシロチョウ (*Pieris rapae*)、ヒメアカタテハ (*Vanessa cardui*)、ヒメハラナガツチバチ (*Campsomeris annulata*)、クチナガハリバエ (*Prosema siberita*)、ハチ目の一種 (未同定) であった (図2)。観察された訪花回数が最も多かったのは、クチナガハリバエであった (表2)。花粉塊の附着は、ハラナガツチバチとクチナガハリバエで観察された。ハラナガツチバチでは訪花を観察した3例中の全3例で、クチナガハリバエでは訪花を観察した15例のうち1例で、花粉塊 (図3) の附着が観察された (表2)。

ネジバナ花序に飛来したハラナガツチバチは、花序の下部にとまり、上部へ移動しながら訪花していた。花序の上端までたどりついた後に飛び立つこともあれば、再び花序の下部へ移動しながら同じ小花を重ねて訪花することもあった。

### 考察

ネジバナの多型間相互作用を詳細に明らかにするためには、主要な送粉者を突き止める必要がある。本調査では、花粉塊の附着率から、岐阜大学構内におけるネジバナの主要な送粉者は、ハラナガツチバチであると考えられた。例数は少ないものの (3例中3例)、花粉塊の附着は訪花時に必ず確認することができた。これからハラナガツチバチは、ネジバナの花粉を効率よく運ぶことができると考えられる。

また訪花時の行動からも、ハラナガツチバチはネジバナに適した送粉者であると考えら

れた。ハラナガツチバチは、花序中の小花に飛来したのち、その小花から上位の小花に移動し訪れることが他の訪花昆虫よりも多かった。ネジバナは弱い雄性先熟で、花序は下部より咲き上がるので花序の下部は雌性期にあり上部は雄性期の傾向がある。このような花序が効率よく他個体の花粉を受け取り、自身の花粉を他個体に渡すには、花序の下部から上部に訪花する送粉者が適している（菊沢 1995）。

一方、訪花者の中でクチナガハリバエは訪花頻度が高かったものの、送粉効率は低いと考えられた。ネジバナへの訪花頻度はハラナガツチバチの5倍であったが、花粉塊の付着頻度は1/15であった。ネジバナにとってクチナガハリバエは送粉者としてよりも、盗蜜者としての性質が強いものと考えられた。ハラナガツチバチ以外にもハチ目昆虫が訪花していたが、観察のために近づいたところ、ネジバナから飛び去ったため種を同定することができず、花粉塊の付着の有無も確かめることができなかった。この訪花昆虫は、今回の調査で最も送粉に貢献していると考えられるハラナガツチバチと同じハチ目であることから、送粉者としての働きが強いかもしれない。

表 1. 調査日の気象条件

気象条件	6月28日	6月29日	7月1日	7月2日
天気	雨のち曇り	晴	雨時々曇り	晴時々曇
最高気温 (°C)	31.6	31.7	30.4	29.9
平均気温 (°C)	25	26.2	26	25.2
降水量 (mm)	28	0	3	0.5
日照時間 (時間)	6.7	10.3	2.1	9.8
平均風速 (m/s)	3.2	3.3	3.5	3.5
平均湿度 (%)	70	55	81	63

表 2. ネジバナの訪花昆虫と花粉塊の付着例数

種名	各調査日における観察された個体数					調査期間中の花粉塊付着例数
	6/28	6/29	7/1	7/2	合計	
モンシロチョウ	4	0	0	0	4	0
ヒメアカタテハ	0	0	1	0	1	0
ヒメハラナガツチバチ	3	0	0	0	3	3
ハチ目	1	0	2	1	4	—
クチナガハリバエ	0	0	8	7	15	1
合計	8	0	11	8		



図2 岐阜大学の調査地で観察されたネジバナの訪花昆虫.

(a) クチナガハリバエ *Prosenia siberite* (b) ヒメハラナガツチバチ *Campsomeris annulate* (c) モンシロチョウ *Pieris rapae* (d) ヒメアカタテハ *Vanessa cardui* これらの写真は、岐阜大学で撮影されたものである。同定のできなかったハチ目と考えられる昆虫は、写真を撮ることができなかった。

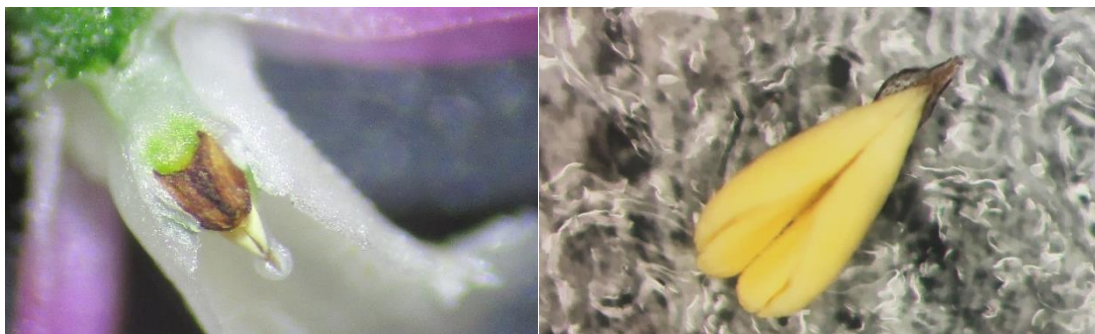


図3 ネジバナの花粉塊.

左の図はネジバナの小花の側花弁を取り除いて花粉塊を露出させたものである。右の図はネジバナから取り除いた花粉塊を上から見た図である。

## 巻き型多型分布解析

### ネジバナの分布・形態データ収集

2020年6月末から1ヶ月間、岐阜大学と滋賀県立大学の調査地で行った（図4）。調査地内で、見つけることができた全てのネジバナの位置情報とその巻き方向のデータを収集した。位置情報は、設定した原点を基準にし、2次元の座標データとして記録した。巻き方向のデータは、写真を撮って記録した。

### 巻き型多型分布解析

本解析は、ネジバナ個体群の巻き型多型頻度を 1:1 に調節するような作用があるか確かめるために行った。またその作用が確認できたときそれはどの程度の空間スケールで働いているか調べた。解析は、ネジバナの巻き型多型分布調査で得られた岐阜大学と滋賀県立大学のデータをもとに行った。

巻き型の分布様式を定量化するために、ネジバナの周囲の巻き型頻度の標準偏差を指標として用いた。任意のネジバナ株の近い順に  $n-1$  本の株を選び、初めに選んだ株を合わせて  $n$  本の小集団について右巻き型の局所的な比率を求めた。この計算を全てのネジバナ株に対して行い、右巻き型の局所的な比率の標準偏差を求めた。この標準偏差を巻き型分布様式の指標として用いた。ネジバナの局所的な巻き型比率が群落内のどこでも近い値をとれば、この指標の値は小さくなると期待される。結果として後述する通り、いずれの調査地でも調査地全体での巻き型比率は 1:1 であったので、調査地内のどこでも局所的な比率が 1:1 に近いほど指標値は小さくなると期待される。

仮に、局所的な比率を 1:1 に近づける作用、あるいは 1:1 から遠ざける作用が存在した場合、その作用がどの程度のサイズのネジバナ小集団の比率に対して作用しているかは、作用のメカニズムによって異なる可能性がある。そのため、その範囲、つまり空間スケールを推定することは、メカニズムを推測する上での手がかりになると考えられる。本研究では小集団の単位（小集団サイズ）を複数考え、 $n=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50$  の 13 通りについて指標を計算した。

この実測された分布様式の指標（標準偏差）の評価のために、ランダムに巻き型多型が決定されると仮定した場合に期待される指標（標準偏差）の確率密度分布と比較した。この確率密度分布は、次のように求めた。まず、実測データのネジバナの位置を固定したままで巻き型のデータをランダムに入れ替えて、ネジバナの巻き型が偶発的に決定されると場合に期待される仮想的な分布を作成した。この仮想的な分布を対象として、実測データに対して行った時と同様に、局所的な巻き型比率の標準偏差を求めた。この操作（仮想的な分布の作成と標準偏差の計算）を 1000 回繰り返して、巻き型多型がランダムに決定される場合に期待される巻き型比率の標準偏差の確率密度分布を求めた。そして、実測された巻き型比率の分布の指標（標準偏差）の評価のために、この確率密度分布の下位何%に位置するか ( $p$ ) を求めた。 $p \leq 0.05$  の時、巻き型多型の比率は、偶発的に出現している時よりも 1:1 に近いと評価した。以上の評価は、実測データの標準偏差を求めた時と同様に、それぞれの  $n$  の値について行った。

## 結果

岐阜大学と滋賀県立大学では、ネジバナは図5のように分布していた。各調査地全体における右巻き型の割合は、それぞれ0.501、0.516であった。岐阜大では、小集団サイズ  $n = 2,3$  のときにランダムな分布よりも均一に分布していた（それぞれ  $p = 0.008$ 、 $p = 0.041$ ）。滋賀県大では、有意ではないものの、小集団サイズ  $n = 5$  のとき最も均一に分布する傾向が見られた ( $p = 0.108$ ) (図6)。図7に、有意に均一な分布をしているとみられた岐阜大学のデータについて、ランダムと仮定した時の理論値と、調査で得られたデータを比較したものを示した。

## 考察

巻き型多型がランダムな分布よりも1:1に近づく傾向が見られたのは、岐阜大学では小集団サイズ  $n = 2,3$  のときで、滋賀県立大学では小集団サイズが  $n = 5$  のときであった。また、岐阜大学では、それらの小集団サイズでランダム分布からのずれが顕著であったものの、滋賀県立大学ではずれの度合いが小さかった。

この結果は、ネジバナの巻き型多型の分布が、なんらかの作用によって1:1に維持されており、その空間的なスケールが小さい可能性を示すものである。そのような作用が、ネジバナの巻き型多型を維持している至近的な作用であると考えられる。また、その作用がはたらく空間スケールが小さいことは、草本植物では一般的に送粉距離が小さいことと対応しているかもしれない。

スケールが小さい時に巻き型比率が1:1に近づくことは、言い換えると近くの株とは異なる巻き型になる傾向があることを示している。このことは、自株とは異なる型の株の近くにいることが適応的であることを示しているのかもしれない。たとえば、巻き型が右巻きのみでネジバナ群落内に、左巻きの株が侵入した場合、ほとんどの右巻き株は近くには同型の株があるが、左巻きの株の周りには異型の、つまり右巻きの株があることになる。右巻き型の近くでは適応度が高ければ、やがて左巻き型の個体が増えていくだろう。多数派と少数派が反対の場合でも同様に考えることができる。このような作用があれば、結果的にネジバナで観察される1:1の巻型が実現されると期待される。少数派有利な選択圧による多型維持には、例えばラン科の *Dactylorhiza sambucina* (Gigord et al. 2001) で明らかにされている。今後の研究で、ネジバナにも少数派にとって有利に働く選択圧が作用していることを確かめるには、頻度が小さいほうの巻き型ほど繁殖成功度が高いこと、つまり負の頻度依存性が存在することを示す必要がある。

本研究では2つの調査地を用いたが、その間で巻き型多型の分布傾向に違いがあった。ランダムな分布を仮定した場合の確率密度分布から実測値のずれの大きさは、岐阜大学で滋賀県立大学よりも大きかった。その原因は不明であるが、送粉昆虫相の違いによるものなのかもしれない。この送粉者と巻き型多型維持の関係について明確に示すことができれば、送粉者による植物の形質の多様性保全の研究の糸口になるかもしれない。また、均一化の傾向がみられた岐阜大学個体群に関しても、図7のように理論値との差が明確とはいづらい。この研究でみられたこの違いが巻き型の分布を均一化する作用の根拠とするにはさらなる研究が必要である。



図4 調査地の風景（上：岐阜大学、下：滋賀県立大学）



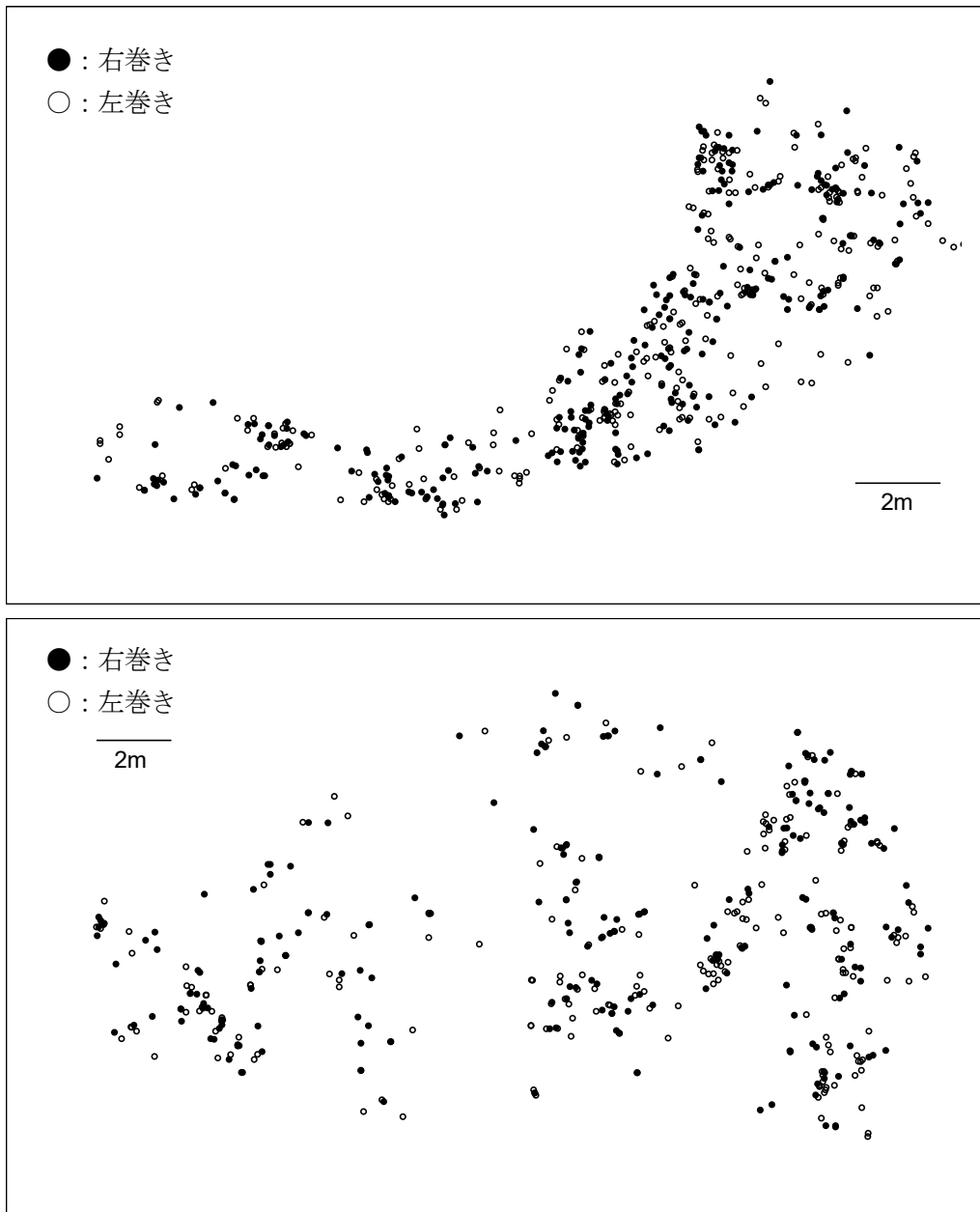


図5 岐阜大学（上）と滋賀県立大学（下）におけるネジバナの巻き型多型の分布

黒い丸は右巻き型、白抜きの丸は左巻き型の位置を示す。岐阜大学では、268 個体の左巻き型と 269 個体の右巻き型が見つかった。滋賀県立大学では、221 個体の左巻き型と 236 個体の右巻き型が見つかった。

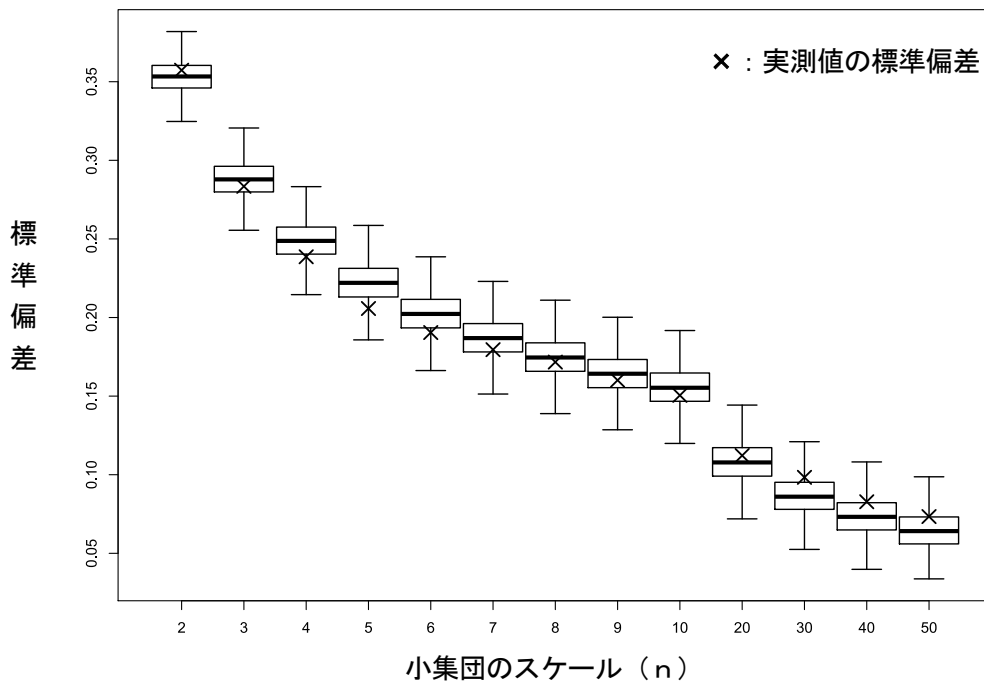
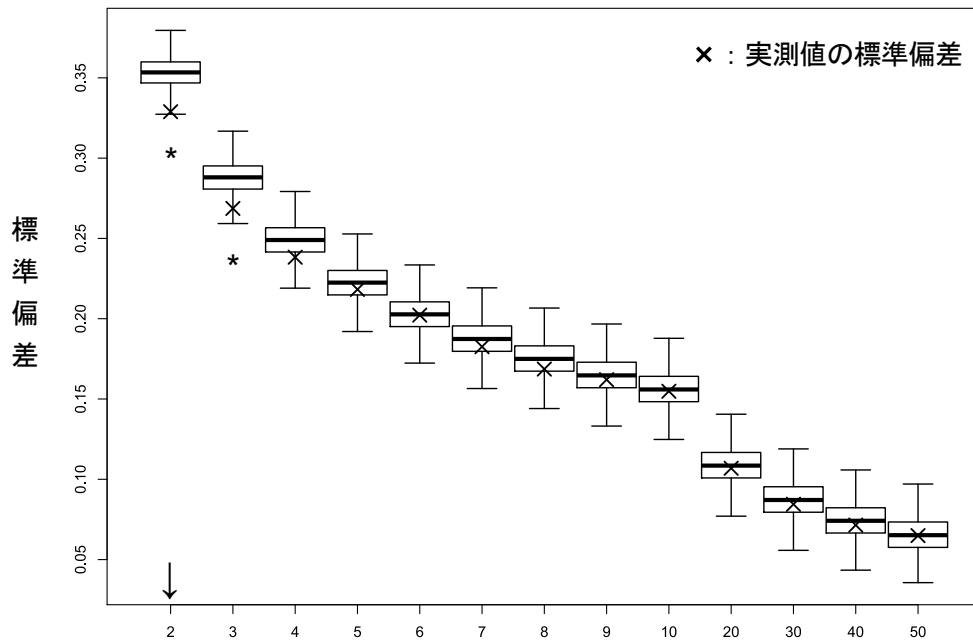


図6 ランダムな巻き型の分布を仮定した場合に期待される局所的な巻き型比率の標準偏差の確率密度分布、および実測データとの比較（上：岐阜大、下：滋賀県大）  
 各箱ひげ図は、それぞれの小集団スケール（n）に対応するランダムな巻き型の分布を仮定した確率密度分布を表す。×は、それぞれの小集団スケール（n）に対応する実測の標準偏差の値を示した。実測値の順位が、下位5%以下のスケールには\*の印をつけた。

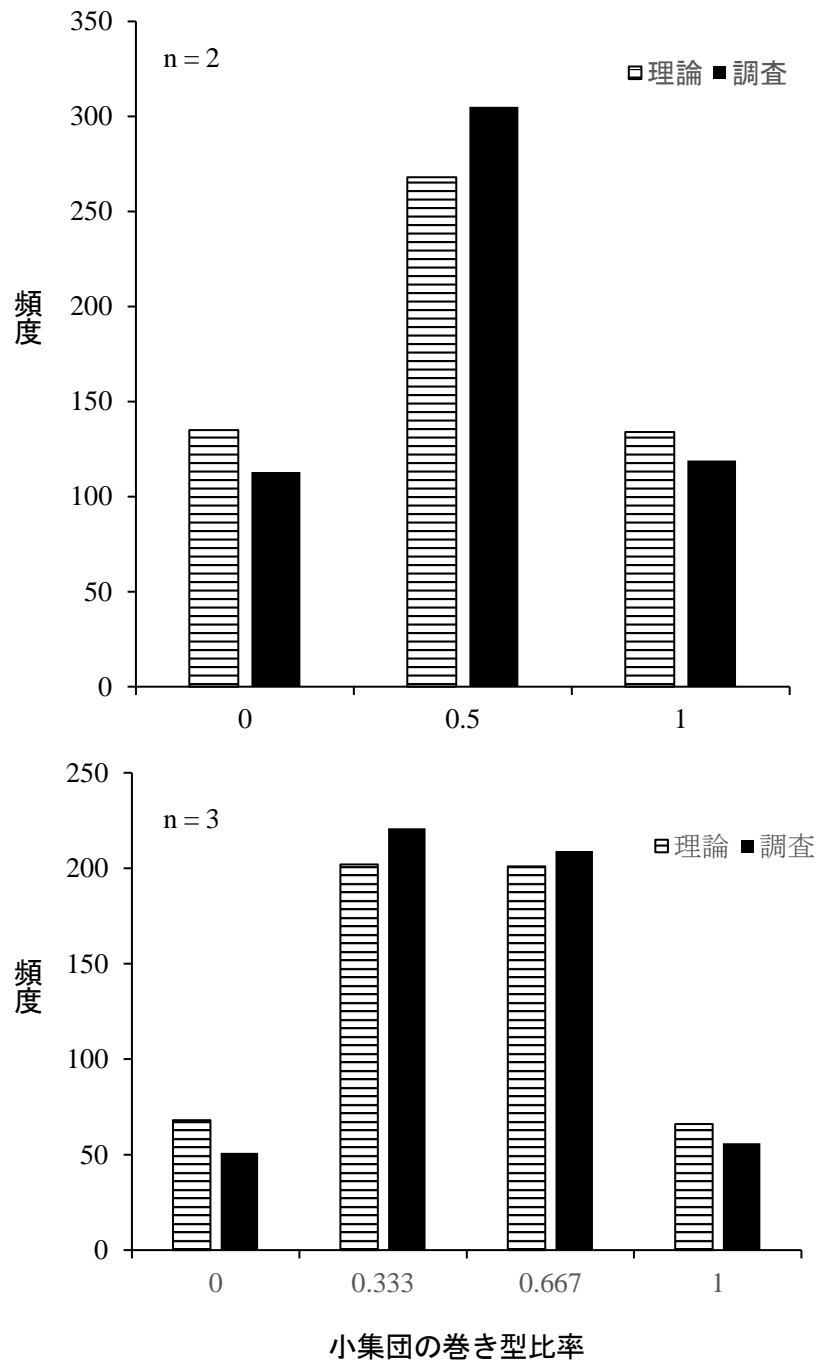


図 7 岐阜大学の n=2(上)、n=3(下)の時のランダムな分布をすると仮定した場合の理論値と実測データの比較

横軸は各空間スケールにおける小集団の巻き型比率を示す。頻度は小集団の頻度を示す。横ストライプのバーは理論値を、黒塗りのバーは実測データを示す。実測データの方が、ランダム分布を仮定した場合よりも中央に集まる傾向があった。

## 人工花序を用いたらせん型花序に訪れるクロマルハナバチの訪花行動の観察

### 対象種の基本情報

クロマルハナバチ (*Bombus (Bombus) ignites* Smith, 1869) は、本州から九州に分布するミツバチ科の昆虫である (図 8)。本種は、シロツメクサ、サクラ類、オドリコソウなどの幅広い分類群の植物を利用できるジェネラリストであり、野外でワーカーが見られるのは 5-10 月とされる (多田内ら 2014)。本種は送粉昆虫として農家に利用されており、比較的容易に入手することができる。本研究では、農業用として販売されているクロマルハナバチを購入して (アグリ・トップ®クロマルキューブ、アグリセクト (株)) 行動観察実験に供した。また、マルハナバチ属は人工花序を用いた研究でよく利用されてきた。本種もマルハナバチ属であり本実験内容に適した種であると考えられる。

### 実験方法

花序のらせん方向が訪花者の行動に影響を与えるかを調べるのが本実験の最終目的である。しかし、まずはクロマルハナバチに採餌の対象として認められるらせん型人工花序を作成する必要がある。そのため色々な人工花序を作成し、実験に適した人工花序を模索することを本年度の目的とした。人工花序は、ネジバナの小花を模したモデルを 3D プリンターで出力して着色した後、それらをらせん状に重ねあげることで作成された。

2020 年 10 月、滋賀県立大学圃場のビニールハウス内にクロマルハナバチを放ち、作成した人工花序に蜜を入れたものを提示した。ハチが逃げないようにネットや養生テープでビニールハウスの隙間をシールして行った。人工花序にクロマルハナバチが訪れるか観察した (図 9)。

### 結果と考察

人工花序を構成する小花モデルの数を変える、小花モデルに足場をつけるなどしたが、作成したどの人工花序 (図 10) にも、クロマルハナバチが訪れることはなかった。しかし、ホバリングをしながら花序を見て回るような探索行動が観察された。また、人工花序にとまろうとしていたにもかかわらず、足が滑って止まれなかった個体が 1 例観察された。購入したクロマルハナバチの巣内には蜜壺が入っているため、ワーカーが採蜜する必要がなくなっている可能性を考え、巣内に組み込まれているものと同様の蜜壺を、人工花序の近くに設置したところ、巣から出たクロマルハナバチはその蜜壺には訪れていた。

本年度作成された人工花序は、クロマルハナバチにあまり適さないものであった。その原因は、クロマルハナバチが足を滑らせてしまう行動から、小花モデルの形状や材質が本種にはとまりにくいものであったことにあると考えられた。小花モデルの形状の凹凸をより増やす、材質を変更することで、この問題は解決できるかもしれない。

実験にふさわしい人工花序を作成することには失敗してしましたが、いくつかの知見を得ることはできた。クロマルハナバチの注意を人工花序で引くことには成功した。このことから、白色の樹脂に赤い色を塗った人工花序でもクロマルハナバチの興味を惹くことが可能であることがわかった。また、農業用のクロマルハナバチの巣を用いても、少なくとも巣内の資源と同等の価値であれば、人工的な蜜源でも採餌を行うことも確認できた。ハチがとまれるように人工花序を改良できれば、仕様に耐える花序を作成できるかもしれない。



**図8 クロマルハナバチのワーカー**

巣箱の蓋を開けたら、つぎつぎと出てきてビニールハウス内を活発に飛び回った。大変おとなしく、攻撃されることはなかった。あまりにもかわいらしいので指で突いてみたが刺されなかった。



**図9 人工花序と巣箱の配置**

人工花序と巣箱は図のように配置した。図左端の土を入れた黒いトレイの上に人工花序を刺して提示した。図右端の白い箱のようなものが巣箱である。巣箱は開閉でき、実験開始時に開放した。撮影時、巣箱を開放する前なのでハウス内にハチは飛んでいない。

この図のような配置以外にも、人工花序を置く高さをより高い位置に置いたり、人工花序の数を増やしたり減らしたりといった試行錯誤も行った。

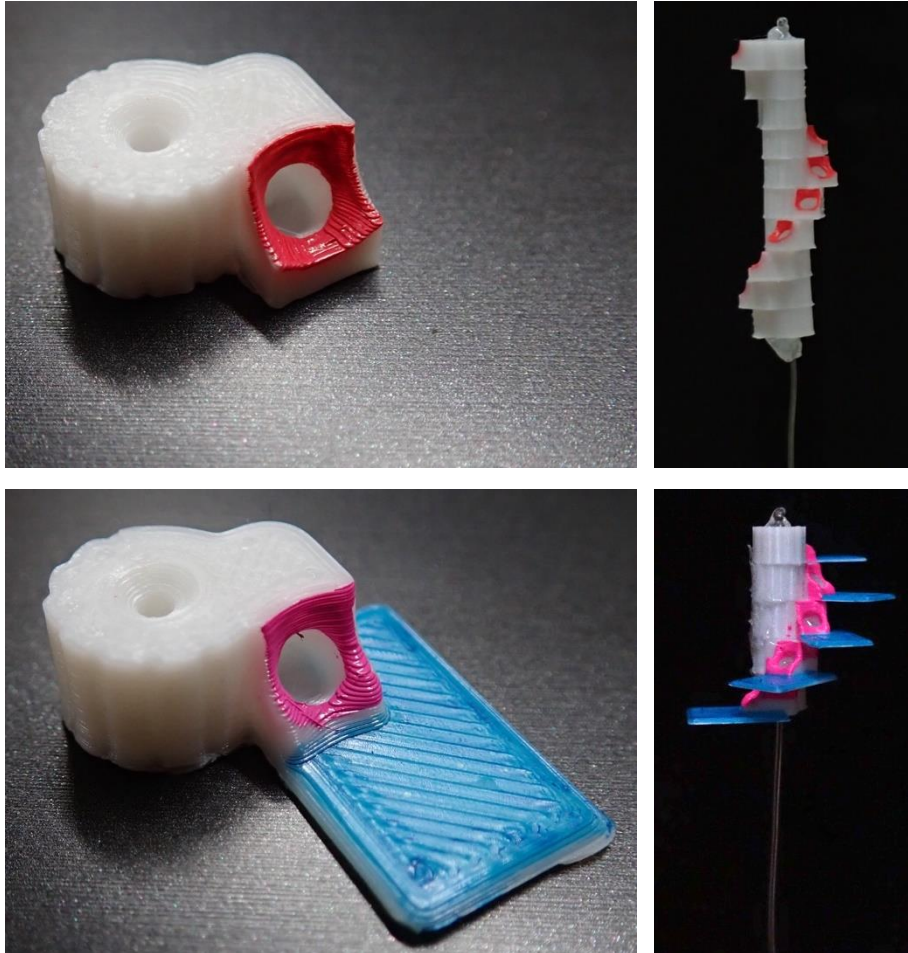


図 10 小花モデル（左）とそれで作成された人工花序（右）

左図のような小花の模型を 3D プリンターで作成した。小花モデルは硬質の樹脂でできている。上図の人工花序は初めに作成したもので、足場がついていない。クロマルハナバチがとまろうとしているのに足を滑らせているのを観察したので下図の足場付きのモデルを作成した。しかし、足場付きのモデルでもクロマルハナバチは滑ってしまってもとまることができなかった。

## まとめ

訪花者に関する調査から、ネジバナには多様な種が訪花することがわかった。岐阜大学においては、花粉回の付着の程度からヒメハラナガツチバチが主要な送粉者であることが推定された。また、巻き型多型分布の解析から、その分布を均一化するような作用を示唆することができた。

本年度の研究で明らかになったの巻き型分布を均一にする傾向で、ネジバナ花序構造の多型を維持するメカニズムが働いていることを初めて示唆することができた。積極的な移転的多型維持メカニズム解明に一步近づくことができた。今後、多型分布均一化作用深めていくとともに、ネジバナに訪れる昆虫の行動も合わせて本研究を進める予定である。

## 外部での研究報告

本研究の成果を2021年3月に開催された日本生態学会第68回全国大会で発表した。本学会で、ネジバナの巻型多型の分布解析についてポスター発表を行った。新型コロナウイルスの影響によりオンライン上で開催された。オンライン上であったものの、多くの方々に興味を持っていただき、コメント欄やZoom上で活発な議論を行うことができた。

- ・ 日本生態学会第68回全国大会 ポスター発表 (P1-158)

## 今後の予定

2021年度8月現在、2021年度分のネジバナの調査は終了し、データの整理・解析中である。2021年度は調査地を滋賀県立大学にしほり、前年度と引き続きネジバナの位置データと花序データを収集した。また、本年度は訪花者の行動の撮影に成功した。

以後、これらの収集されたデータに関して解析を進める予定である。ネジバナの位置データと花序データに関しては2020年度と同様な解析に加え、巻き型以外の花序の形態も考慮された解析を試みる。また訪花者の行動に関する解析について、訪花者が経験した巻き型とその行動の関係性について解析をする。具体的には、訪花者の巻き型の経験数によって、訪花者の連続訪花数、花序滞在時間、小花を飛ばして訪花する行動の頻度などが変化するかを確かめる。

## 参考文献

- ・ 林 弥栄 (監) .1989. 「山溪ハンディ図鑑1 野に咲く花」. 明光社. 396 p.
- ・ 早川 宗志, 末次 健司, (2017), ネジバナの形態変異と分類, 植調, 51(4):115-117
- ・ Iwata, T., Nagasaki, O., Ishii, H.S. and Ushimaru, A. (2012). Inflorescence architecture affects pollinator behaviour and mating success in *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae). *New Phytologist*. 193: 196-203.
- ・ 菊沢 喜八郎(著) ,(1995)「植物の繁殖生態学」. 蒼樹書房. 34-35p.
- ・ Luc D. B. Gigord, Mark R. Macnair, and Ann Smithson (2001). Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soò. *PNAS* 98 (11): 6253-6255.
- ・ 多田内 修, 村尾竜起 (編) .2014. 「日本産ハナバチ図鑑」. 文一総合出版. 431p.
- ・ 気象庁データベース, <https://www.jma.go.jp/jma/menu/menureport.html>