

様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 6月20日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18402005
 研究課題名（和文） アツモリソウ属のHVカメラによる生態調査と遺伝子解析に基づく進化系統性の解明
 研究課題名（英文） Ecological study of Cypripedium by HV camera and gene analysis for the clarification and identification of different species.
 研究代表者
 谷口 弘一（TANIGUCHI HIROKAZU）
 國學院大學栃木短期大学・初等教育学科・講師
 研究者番号：60002771

研究成果の概要：3年間で調査した地域と種は下記である。カナダはバンフ周辺でYellow, L' S, (苳弁の形や色で3種) Sparrowegg L' S, MountainL' S,。アメリカではサギナウ周辺でCandidum, Yellow, Showy, を。カルフォルニア州でCalifornicumである。本研究期間中の3年間は天候不順で、開花期が定まらず数年前の調査時とは異なり、開花期に十分な調査が行えなかった。平成19年度は平年より10日以上遅れ、平成20年度は平年より20日も遅れた種があった。これらの種はHVカメラで記録した。DNA解析のため収集したサンプルは上記の他国内種のコアツモリ、アツモリソウ、ホテイヤツモリソウ、テップアツモリソウ、キタミアツモリソウである。無菌培養はShowy Alkinoの種を用いて開花時期短縮の実験を継続中である。米国、カナダの開花日の激変からスエーデン、北カナダの調査を行うことが出来なかった。アラスカ、北カナダ、スエーデンは新たな計画を立てて行う。北米のアツモリソウは開発のため10年前とは著しく減少している。生育地が広大であるため株数の減少とは言っても日本とは比較できない。但し、Californicumは盗掘され株数の減少が著しい。Showyもカナダに比べれば生育地は狭くなっている。カナダのバンフでは、MountainL' Sは数株であったが、他の種は分布域も広く大群落は10年前とあまり変化は見られない。カナダの種について大群落の記録をまとめる必要性は高い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	10,400,000	3,120,000	13,520,000

研究分野：社会科学B

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：1) アツモリソウ 2) 生態調査 3) 進化系統性 4) DNA解析 5) 無菌培養
 6) 北半球のアツモリソウ

1. 研究開始当初の背景

アツモリソウ属は日本ではレブンアツモリソウを除いては、分布域に数本~数十本しか生育していないが、世界では各地に大群落が見られる。しかしながら開発によって各地で生育数の減少が見られる。本研究はアツモリソウ属の生態調査を行い、大群落の映像をHVカメラで捉え、アツモリソウ属の生態をDBとして将来に向け保存すること。更に進化系統性を見るためDNA解析を行う事を目的とした。10数年にわたる調査で静止画の記録は所持するが、HVカメラによる記録は存在せずその必要性を考慮したものである。

2. 研究の目的

HVカメラによってアツモリソウ属の生態把握を行うこと。DNA解析による種間の系統性を調べる。無菌培養技術によって開花日数の短縮を目指すこと。

DNA解析に関しては、北海道およびロシア北米、カナダの複数箇所で採集した試料を使用する。レブンアツモリソウに関しては礼文島において採集した複数個体を、カラフトアツモリソウに関しては、礼文島およびウラジオストックにおいて採集した試料を解析対象としている。また、コアツモリについても同様のDNA解析の対象とした。これらの解析により、アツモリソウ、レブンアツモリソウ、カラフトアツモリソウ、コアツモリの分布および北米、カナダのYellow l. s. Candidum, Mountain l. s. の雑種の多様性、分子系統に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

HVカメラによる生態調査は開花期に合わせて行う。映像は群落、方形区内(1~2m²)の株数と、全景。株の全景、中景、花のクローズアップ測定データとしては生育地の緯度、経度、気温、土壌条件、生育地方向、斜度、下草の種類、株の背丈、葉数、葉の大きさ、花(唇弁、背萼片、側花弁等)の計測を行う。これらのデータを生育地で3~5株と対象とする。DNA解析のため葉のサンプルを収集しシリカゲルで低温保存する。DNA塩基配列の分子マーカーは葉緑体遺伝子とrDNAのIST領域を用いる。HVカメラで収録した映像はブルーレイディスクに編集する。平成21年3月編集装置を購入したが現在試行中である。

平成18年度は内示後直ちに計画を立てたが18年度は開花期が異常に早いためアメリカ、

カナダ、生態調査の地域は図1(カナダ)、図2(アメリカ)でスウェーデンも計画時には開花後となるため調査を断念した。このため18年度は実験用株の購入を行い、11月に10数株にサイテスを付けて輸送してもらった。調査地域は図1、図2であるが19年度と20年度に調査したものである。19年は開花日が予定より遅れ調査日には10日近く遅れていた。20年度も情報を得て19年度より一週間遅れて出発したがカナダは更に開花が10日位遅れた。調査方法は群生地生態として、群落、株数の個体と花の全景、花のクローズアップをHV画像としてスライドで記録し、各個体の測定を行った。更に方形区(1m²~4m²)株数、植生、土壌、日照条件、気温等を記録した。個体測定は背丈、葉の数、葉の中長さ、花の各部分の測定を行った。測定表は表1であり、これはCalifornicumの測定例である。

調査地域：19年、20年共カナダはバンフ、エドモント、カルガリー周辺とオービッドサミットを調査した。本来ならYellow, Sparroweggの大群落が生育している場所である。アメリカはサギナウ、デトロイト、アンナーバー、レッドメドフォード周辺で調査を行った。

(Candidum, Yellow, Showy, Mountain, Californicum)、()内は今回の調査対象種である。

図1 カナダ

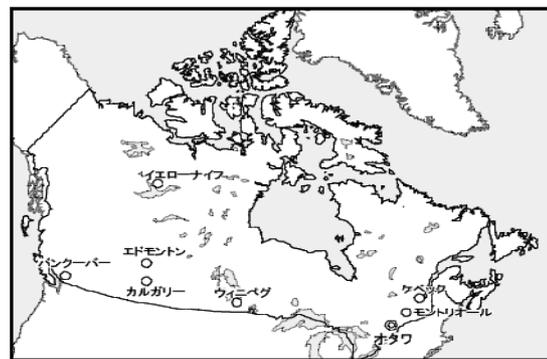


図2 米国



4. 研究の成果

(1) 生態調査

北米・カナダ・日本・西欧・北欧・極東に分布するアツモリソウの生態記録は国内外では全く行われていない。ましてHVカメラによるものも我々のみである。現在まで北米、カナダ日本については予定通り行ったが、天候不順等による開花日の変化に調査日がマッチせず北欧、北カナダ、西欧はHVカメラによる記録は行うことができなかつた。今後2～3年かけて行う予定である。本年2月、我々はHVビデオ編集装置を購入しブルーレイビデオに一部の映像の編集を行ったが、この鮮明度の高さに我々は驚嘆した。DNA解析は現在中村が行っているが、全体が完了し結果を出すのもう少し時間が必要である。遺伝子資源としてアツモリソウの重要性、世界の研究者や関係者にHVカメラによるDBに対する期待は大きく新年度からも継続して行う所存である。

(2) 調査地域と調査対象種及び生育状況

平成19年カナダは開花日が10日以上遅れた、そのため20年は20年の調査日より一週間遅らせたが、開花日は更に一週間以上遅れた。バンフ、エドモントン、カルガリー地域では群落を形成している地域では開花は見られず数本の株の調査を行った。オービットサミットでは19年、20年ともYellow Sparrowegg共芽出しが見られた位開花が遅れていた。19年バンフではMountain L'Sの測定と記録を取る事が出来た。メドフォードではCalifornicumの調査を行った。

表1はCalifornicumの調査データの一部である。尚、調査地点の緯度、経度、高度と地名は省略する。

表1

CYP 調査用紙集計用

平成19年 6月6日 国名・No1アメリカ・カルフォルニア
種名 C.californicum No2アメリカ・オレゴン州

21年6月6日改定

NO	調査年月日	調査地域	緯度	経度	天気	気温	高度
1	2007/6/6				晴れ、小雨	20C	
2	2007/6/6				晴れ	20C	

日照時間	方位	方形区長さ	分布株数	開花株数	分布植物	土壌条件
10H	南斜面		50~60本			清流の淵
8H	林の淵	5㎡	30本	16本		

NO	背丈 cm	葉数	上部葉数	葉長さ	1葉目 (葉幅)	3葉目 (葉長さ)	花の幅	唇弁幅	唇弁長さ
95	20	9番目	16番目	9.5cm	2.3cm		3.8cm	1.1cm	1.4cm
				15.0cm	6.5cm				
120	24	4番目	16番目	4.5cm	1.2cm		2.6cm	1.1cm	1.6cm
				11.2cm	3.9cm				

唇弁高さ	背がく片 (長さ)	背がく片 (幅)	側花弁 (長さ)	側花弁 (幅)	側がく片 (長さ)	側がく片 (幅)	カール	花の数
0.9cm	1.8cm	1.0cm	1.65cm	1.1cm	1.4cm	3.0cm	平ら	12花
1.4cm	1.6cm	1.0cm	1.6cm	0.9cm	1.7cm	0.6cm	平ら	7花中最大のもの

生育状況について我々が北米の調査を行ったのは、平成5年、平成9年～11年、平成18、19、20年である。平成8年では主にカナダ北部、平成9年～11年はカナダ、米国である。今回の調査で北米のアツモリソウの分布量は以前に比べ明らかに減少している。これは開発による生育地の減少と気温上昇による影響と考える。しかしながら米国は面積が広く、日本の現況と比較することは出来ない。今後何らかの保護手段を講じる必要があると考える。

これらに対してカナダは大群落が10年前と変わらずに見られる。今回は花期に合致しなかったが、多くの地点で芽出し株を確認した。現況をハイビジョン映像として収集する必要性を強く確認した。

(3) Californicumの減少について

Californicumは平成15年水上広志が調査し、データを得ているが19年のメドフォードの調査では3箇所を調査したが、1ヶ所は平成15年には一面に生育していたが19年の調査では開花株40本前後であり、かなりの数が盗掘されていた。この種は背丈1.2mにもなり1株20花もつく種である。インターネットで販売もされた様であるが、生育環境が清流の淵という特性があり、日本で購入、栽培しているものは全て枯死している。早急な保護策が必要である。同様の条件下にあるものがKentuckienseであるが、これは花が大きく川淵に生育しているが、これも減少が見られる種である。

(4) DNA解析

これまでに明らかにした5種の遺伝型 (Type A, Type B, Type C, Type D, Type E) (Genes Genet. Syst. (2001) 76, p. 181-188) および *C. parviflorum* (PA-03) の塩基配列と、今回解析した試料の塩基配列についてアライメントを作成した (表2)。

これらのデータより、*trnL* 遺伝子と *trnF* 遺伝子の遺伝子間領域は、*trnL* 遺伝子のイントロン配列より、多型が多く検出できることが分かる。両遺伝子領域の塩基配列に基づき、本研究で解析した試料について遺伝型を分類した結果を表1に示した。

北海道の複数箇所て採集したアツモリソウは、Type DまたはType Eに分類された。北海道で採集したホテイアツモリソウは、Type Eに分類された。ロシアの複数箇所て採集したアツモリソウと、礼文島で採集したレブンアツモリソウは、Type Dに分類された。礼文島のカラフトアツモリソウはType Cに、ウラジオストックで採集したカラフトアツモリソウはType Dに分類

された。アツモリソウとカラフトアツモリソウの交雑種と考えられる試料は、Type Dに分類された。また、北海道で採集されたコアツモリの *trnL* 遺伝子と *trnF* 遺伝子の遺伝子間領域は、Genbankデータベースに登録されているどの塩基配列とも大きく異なり、新規のものであった。

以上の結果から、アツモリソウ、レブンアツモリソウ、カラフトアツモリソウのDNA解析により、新たな多型を検出することはできなかったが、各遺伝型を示す個体の地理的分布に関する知見を得ることができたと言える。

表2 DNA解析サンプル

No.	登録No. 登録の記述	日付	場所	種名	遺伝型
17	3 Cyp cal(同株)	H18.8.5	礼文	C. calceolus	Type C
9	3 modoki, 2	H11.6.29	礼文	C. macranthos x C. calceolus	Type D
10	3 Cyp R.	H17.8.10	礼文	C. macranthos var. rebunense	Type D
11	3 Cyp R.	H18.8.5	礼文	C. macranthos var. rebunense	Type D
20	5 Cyp. M. アツモリ	H13.8.20	厚岸	C. macranthos var. speciosum	Type D
23	5 アツモリソウ	H19.8	士別	C. macranthos var. speciosum	Type D
29	7 macranthum, 白, シロバナアツモリ, 1	H11.6.18	ウラジオストク	C. macranthos	Type D
30	7 macranthum, うす緑	H11.6.18	ウラジオストク	C. macranthos	Type D
37	8 calceolus, 1	H11.6.19	ウラジオストク	C. calceolus	Type D
1	1 Cyp m, 1	H2.8.7	大千軒	C. macranthos	Type E
3	1 Cyp m, 3	H17.8.28	大千軒	C. macranthos	Type E
21	5 Cyp. M. アツモリ	H17.8.28	上磯	C. macranthos var. speciosum	Type E
22	5 ホチアイアツモリソウ	H19.8	上磯ガロウ	C. macranthos var. hotai-atsumorianum	Type E
6	2 コアツモリ	H15.5.28	上ノ国	C. debile	新規

今後の方向

本研究のHVカメラによる記録は天候不順と開花日の変化によって、予定通り行うことが出来なかった。北米、アラスカ、カナダ東北部は新しい計画によって行う予定である。世界のアツモリソウ属の生態をHV動画で記録する試みは我々のみが行っているものであり、世界的に関係者の期待は大きいのである。特に日本のレブンアツモリソウ、北米の大型種、西欧の *Calceolus*、極東の *Macranthos* の群生や生態を動画データベースにする価値は高いと考える。

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4件)

- ① In vitro proliferation and genetic diversity of *Cypripedium* (Plant Biotechnology 25巻 P341-P346(2008)) H. taniguchi M. katsumi 他 査読有
- ② 北半球に生育するアツモリソウの進化系統性に関する調査研究
谷口弘一、中村達夫、勝見允行 日本科学教育学会研究会発表科教研技法 Vol23-No1 P 53~P62 2008年 査読無

③ 北海道における稀少種保護の現状 1

谷口弘一、勝見允行 國學院大學栃木短期大学紀要 第40号抜刷 P41~P73 2006年3月10日発行 査読無

④ 北米・西欧・極東ロシア及び日本のアツモリソウ属の生態調査報告 1

谷口弘一、勝見允行、中村達夫、佐野浩、水上広志 國學院大學栃木短期大学紀要 第40号抜刷 P21~P40 2006年3月10日発行 査読無

[図書] (計1件)

① 北海道の野の花

谷口弘一、三上日出夫 北海道新聞社 P1~P631 2007年5月 (2刷)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 弘一 (TANIGUCHI HIROKAZU)
國學院大學栃木短期大学・初等教育学科・講師
研究者番号：60002771

(2) 研究分担者

中村 達夫 (NAKAMURA TATSUO)
横浜国立大学・大学院環境情報研究員・講師
研究者番号：50334636

(3) 連携研究者

水上 広志 (MIZUKAMI HIROSHI)
ウエイン大学・名誉教授
勝見 允行 (KATSUMI MASAYUKI)
国際基督教大学・名誉教授