

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510240

研究課題名（和文） 絶滅の危機に瀕するサクライソウの保全のための基礎研究

研究課題名（英文） A basic research for conservation of endangered plant, *Petrosavia sakuraii*

研究代表者

高橋 弘 (TAKAHASHI HIROSHI)

岐阜大学・教育学部・教授

研究者番号：40021331

研究成果の概要（和文）：サクライソウはグロムス属のAM菌への従属栄養植物であることが明らかとなった。中部地方の集団では景観がヒノキ林で、相対照度が1.7から5.3%、pHが3.3から4.8でやや湿った土壌に生育するが、広葉樹が多いとサクライソウが少なかった。また、生活史の特性として雌雄生殖器官と胚の発生、地下動態、及びポリネーターを解明するとともに、種子発芽は生育場所に1年以上埋土したものにみられること、胚珠/花粉の比率が極めて低いこと（27.1–34.2）、かなり強い近交弱勢が見られること、高山と木曽の集団におけるフェノロジーなどを解明した。

研究成果の概要（英文）：*Petrosavia sakuraii* was a myco-heterotrophic plant associating with AM fungi of the genus *Gromus*. The plants grew in the fairly acid and moist soil on dark floor of *Camaecyparis obtusa* forests in landscape in central Japan, though they were few where many broad-leaved trees invaded. We also elucidated that development of the reproductive organs and embryo, movement of the subterranean stems, pollinators, seed germination characteristics, pollen-ovule ratios, inbreeding depression and phenology of *P. sakuraii*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：在来種保全

1. 研究開始当初の背景

サクライソウ (*Petrosavia sakuraii*) は、東アジアに分布するサクライソウ属3種のうちの1種で、日本国内では樹林の林床下に稀に見られる無葉緑体植物である。岐阜県では7–8月ごろに花をつけるが、ふつう10 cm前後の白色の花茎のみからなり葉

がない。共生菌を介して他の植物から栄養を摂取する菌従属栄養性の植物と考えられており、そのためサクライソウの生存は生育地の生態系の変化を容易に受けやすい。分類学的には、単子葉植物の1種で、日本の固有種オゼソウ (*Japonolirion osense*) とともに、サクライソウ目サクライソウ科

を作っている (Tamura et al. 2004; Soltis et al. 2005)。進化学的には、サクライソウ科は原始的な単子葉植物オモダカ目とヤマノイモ目の中間に位置し、単子葉植物の進化を知る上で学術上重要な植物である。

サクライソウは岐阜県中津川市恵那山麓で初めて発見され、1903年牧野富太郎が新種として発表している (ただし、学名の変更は何度かなされている)。その後、石川県、福井県、長野県、愛知県、京都府、奄美大島で報告されてきた。しかし、レッドデータブック (環境庁 2000) によれば、京都府では絶滅、石川県と福井県は現状不明となっており、岐阜県、長野県、及び奄美大島で現存が確認されているのみである (愛知県の情報は無い)。岐阜県内では、中津川市で恵那山麓を含む2カ所、可児市で2カ所、多治見市1カ所で報告され、ごく最近高山市でも自生地が発見された (中島 2003)。その意味では岐阜県はサクライソウの生育に適した環境をもっている (いた) と言える。

しかし、現在進めている岐阜県の植物相調査や、環境省及び岐阜県と一緒に進めているレッドデータブックの見直し作業の中で、岐阜県のサクライソウが絶滅の危機に瀕していることが明らかになってきた (高橋 2006)。すなわち、中津川市の2カ所と可児市の1カ所では1966年までに既に絶滅した可能性が高く、可児市の残り1カ所 (浅間山) と多治見市でも個体数が激減し、2000年以降全く出現しない年もあることが判明した。従って、このまま放置すれば、サクライソウは岐阜県からも日本国内からも絶滅する可能性が高い。それゆえ、貴重な生きた学術資料であるサクライソウを絶滅から守るため、緊急に保全対策をとる必要がある。

2. 研究の目的

サクライソウの激減は、商用を目的とした乱獲が主要因とは考えにくく、むしろ生育環境の変化が要因と考えられる。しかし、その生育環境や生活に関する研究はこれまでほとんどなされたことがなく、現状のままでは有効な保全対策が立てられない。そこで、サクライソウを保全するための有効手段を見出すための基礎研究として、共生菌を同定し、生育環境、生活史、フェノロジー、及び集団の遺伝的多様性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

対象とした集団は高山、可児、多治見、木曾、及び奄美の集団である。

(1) 共生菌の同定

根に共生する菌類について、形態とDNA塩基配列の比較により、同定した。

(2) 生育地の環境の特性と適応

① 相対照度

曇天の日中、サクライソウの生育地点と開けた場所で同時に照度を測定して、サクライソウ生育地の相対照度を算出した。

② 土壌 pH

サクライソウの生育場所の土壌を採取し、数日間乾燥後、蒸留水に入れ、pHメーターにより測定した。

③ 土壌水分

サクライソウの生育地点で、土壌水分測定器により測定した。

④ 植生

サクライソウ自生地のうち、絶滅に瀕している低密度調査地 (多治見と可児) と、良好に生育している高密度調査地 (高山と木曾) で、森林群落の調査をおこなった。10×10 mの調査区を設置し、その内部に生育する高さ1.2 m以上の樹木について、種、直径 (1.2 mの位置) を調べた。測定した直径から1.2 mの位置での断面積 (胸高断面積) を算出し、種ごとに積算した。

⑤ 植物体に含まれるフラボノイド

サクライソウの茎に含まれるフラボノイドを高速液体クロマトグラフィーにより分離同定し、オゼソウに含まれるフラボノイドと比較した。

(3) 生活史

① 雌雄生殖器官と胚の発生

サクライソウの花の発生初期から胚の完成まで、パラフィン切片法により連続切片を作成して観察した。

② 種子発芽実験

室内実験では高山で2009年11月7日に採取した種子を用いた。室温、乾燥状態で約1ヶ月保存した後、冷湿処理を行った。ステンレスシャーレに湿らせた脱脂綿を敷き、その上に濾紙で作った小箱 (それぞれに50粒ずつの種子) を載せ、蓋をして光を遮断し、5°Cに設定した冷蔵庫内に保存した。100日後に冷湿処理を終了し、次の条件下に移した。温度については、15°C10時間暗条件 (1時間かけて25°Cに上昇) 25°C12時間明条件 (1時間かけて15°Cに下降) とし、光条件については明/暗12時間交代 (ガラスシャーレ使用) と常に暗条件 (ステンレスシャーレ使用) の2区で行った。明暗交代区では種子を30粒入れた10個のシャーレ (合計300粒)、暗区で

は5個のシャーレ(合計150粒)を用いた。暗区のステンレスシャーレは水分蒸発を防ぐため、ビニルテープで密閉した。50日後に発芽種子を検査した。

野外での埋土による実験は高山と木曾で行った。高山では2009年11月7日に採取した種子を室温、乾燥状態で保存し、12月14日に埋土した。野外播種試験法(辻田・遊川2008)に準じて、種子を5cmと10cmの深さに埋める装置を10セット用意した。この装置を10セット、サクライソウが多く生育する場所で、少なくとも1個体から50cm以内の地点に埋めた。木曾では2009年10月30日に採取した種子を室温、乾燥状態で保存し、12月25日に埋土した。こちらは種子を入れたメッシュ袋を5個用意し、サクライソウが多く生育する場所で、少なくとも1個体から50cm以内の地点の地下約5cmの所に埋めた。

③ 地下動態

木曾集団で花茎を出した個体と、前年花茎を出して当年出さなかった個体を掘り出し、地下茎の成長形態を調べた。

④ ポリネーター

高山と木曾の集団で、訪花昆虫の観察と採取を行った。

⑤ 花粉粒/胚珠の比率(P/O比)

高山と木曾の集団で調べた。胚珠と葯を別々のマイクロチューブに入れて約1mlの70%エタノールを加えて保存した。胚珠は実体顕微鏡で直接数えた。花粉粒は次の方法で数えた。葯が入ったマイクロチューブに1%界面活性剤、およびアニリンブルー水溶液とグリセリンの1:1の混合液を約1ml加え、超音波洗浄器で30分間超音波処理をした。葯片を取り除いた後、放置または加熱してエタノールを蒸発させた。エタノールの匂いがなくなった後、マイクロチューブごと重量を測定して記録した。

予め重さを測定したスライドグラスに、よく攪拌した液をピペットで1滴載せて、全体の重量を測定し、載せた液滴の重量を算出した。この液滴に含まれる花粉粒を光学顕微鏡を用いて数えた。この操作は3回反復した。

マイクロチューブを洗浄、乾燥させ、その重さを測定して、全花粉粒が含まれていた液体の重さを算出し、検鏡した液滴の重量の割合から、全花粉粒数を推定した。

⑥ 近交弱勢

高山集団で人工的な自家交配と他家交配をし、できた種子から推定した。開花前の花茎全体を微細な目のメッシュ袋で覆った。人工他家交配をする花では開花直後、袋を除いて葯が未裂開の時に除雄をし、他家の裂開し

た葯の花粉を柱頭に付着させた後、再び袋を掛けた。自家交配をする花では、同様に開花直後袋を外して除雄をし、同じ花茎にある花の裂開した新鮮な葯からの花粉を柱頭に付着させた後、再び袋を掛けた。これらの花の果実を裂開直前に採取し、結実率を調べた。

(4) フェノロジー

高山、可児、多治見では自記温度計によって気温を測定した。また、これらの集団と木曾集団で、ほぼ1ヶ月置きに地下10cmと20cmの、また可能な場所では30cmを加えて、地中温度を測定した。

1m×1mの方形区を高山で10個、木曾で8個設定し、出現個体の花茎伸長、開花時期と開花数、果実の裂開と種子散布について記録した。

4. 研究成果

(1) 共生菌の同定

調査した高山集団、木曾集団及び奄美集団の全てのサクライソウは、グロムス属の特定のアーバスキュラー菌根菌(AM菌)に対して極めて高い特異性をもつことが明らかとなった。このことは、サクライソウの盛衰にこの特定のAM菌の盛衰が関与していることを示唆する(Yamato et al. 2011)。

(2) 生育地の環境の特性と適応

① 相対照度

サクライソウが生育している地点は、測定した中部地方の全ての集団で、相対照度が約1.7%から約5.3%の間にあり、非常に暗い場所であった。

② 土壌pH

土壌のpHは、測定した中部地方の集団は、どれも3.3から4.8の間にあり、強い酸性を示した。

③ 土壌水分

測定した中部地方の集団は6.7%から28.2%の間にあった。測定条件は、雨天を除いた以外は一定ではなかったが、やや湿り気の多い土壌と言える。

④ 植生

高山、多治見、可児、木曾の4集団における樹木組成とそれらの胸高断面積を表1に示す。

いずれの調査地もヒノキ林の景観だった。しかし、ヒノキの優占度は、多少の例外はあるものの、低密度調査地では低く、高密度調査地では高い傾向にあった。サクライソウ低密度調査地ではヒノキ以外に、アベマキ、コナラ、ソヨゴ、サカキなどの侵入が著しかった。ヒノキ林が荒廃して広葉樹が増加してく

ると、サクライソウが減少していくことが示唆される。なお、何れの集団も林床の草本層は極めて貧弱であった。

サクライソウ生育地の植生調査に関しては可児集団における水野ら(1974)によるものがあるが、複数の集団間の比較を行ったものはこれが初めてである。これらの結果は、少なくとも中部地方のサクライソウはヒノキとの結びつきが強いことを示したことに重要な意味がある。

表1. サクライソウの生育地における樹木組成(樹高 新調査合計: cm)

種	サクライソウの生育地				サクライソウの高山集団				
	多治見1	多治見2	可児1	可児2	木曾1	木曾2	高山1	高山2	
ヒノキ	1834.3	5921.0	1732.6	977.1	4774.4	4496.8	9184.1	2914.2	31844.51
ヒノキの割合	(32.0%)	(65.7%)	(39.5%)	(25.4%)	(79.1%)	(59.7%)	(78.1%)	(99.6%)	
アカマツ		531.2		561.5		1865.0			2967.63
アベマキ		1239.4	909.8	991.2					2744.38
コナラ	1452.9		132.5	177.2	557.6	278.9			2599.13
リンドウ	1845.7	446.4	96.3		5.9	18.6	0.9		2333.79
サカキ	41.5	41.3	1245.0	961.0					2291.81
ヒバコマツ							1796.5	2.8	1799.29
ツバ					609.1	784.6			1393.69
シラカシ	299.0	178.5	232.7						710.18
クリ							572.2		572.24
ヤブツバキ		190.9	37.5	123.3					351.72
モリノキ									244.0
ヒサカキ	127.4	174.8	13.0						315.22
アヒビ	121.3				60.5	88.5			270.28
クマノヅメ		216.8					195.1		216.78
コナツバ									136.15
ヤマザクラ				59.3					59.31
アラカシ		48.2							48.23
モミ					29.6	0.3			30.43
シラカシ?	9.9	9.6							19.82
ナツキ							13.7		13.75
ミツバツツジ							8.9		8.95
ヤマムラサキ				1.3					1.29
合計	5732.06	9019.05	4432.36	3832.00	6037.19	7521.06	11754.74	2926.83	51274.23

⑥植物体に含まれるフラボノイド

これまで報告が全くなかったサクライソウに含まれる化学成分のうち、フラボノイドについて分離・同定して、サクライソウ属とともに2属だけでサクライソウ目をつくるオゼソウと比較した。用いた木曾と奄美の集団は、同一の組成を示した。含有されているフラボノイドは6種類で、定性された4種類のうち、3種類はC-グリコシルフラボンのVitexin、Isovitexin、およびVicenin-2、残りの1種類はフラボノールO-配糖体のIsorhamnetin3-O-glucosideであった。これらの中でオゼソウに共通して含まれるのはVicenin-2のみであった。しかし、オゼソウにあるC-グリコシルフラボノールは検出されなかったものの、C-グリコシルフラボンとフラボノールO-配糖体が存在するという点では一致した。植物におけるフラボノイドの機能は、紫外線防御、ファイトアレキシン、抗酸化・抗ストレスなどが報告されている。オゼソウは緑色植物であるのに対して、サクライソウは無葉緑体植物であり、含有するフラボノイドが質的に異なるのは、それぞれの植物における各種フラボノイドの機能が異なっているためと推察される(Iwashina et al. 2011)。この成果は、1つの系統群の中で光合成能力を維持している植物とそれを失った植物へと分化する過程での生理的適応分化の研究に大きな貢献をするものと考え

られる。

(3) 生活史

①雌雄生殖器官と胚の発生

近年の分子系統解析は、東～東南アジア固有のサクライソウ属は、日本固有植物オゼソウ属とともに単子葉植物内に独立目サクライソウ目をつくることを示している。本研究では雌雄生殖器官と胚の発生学の研究を行い、腺状の雄蕊タペト組織、小孢子母細胞における同時的細胞分裂、倒生で厚層珠心型の胚珠、T字型の大孢子四分子、内乳形成はab initio 造壁型、種皮は成熟時に3細胞層で、外種皮、内種皮、内種皮内層からなることなど、オゼソウ属と共通した特徴を持ち、2属が形態的にも他の単子葉植物と異なることを証明した(Tobe and Takahashi 2010)。この成果はサクライソウが植物系統進化学に大きく貢献するとともに、この貴重な植物を絶滅させてはならない重要な根拠を改めて示した。

②種子発芽実験

室内での実験では全く発芽がみられなかった。

野外での埋土実験では、高山と木曾の両集団とも約1年後では発芽せず、1年半を経過してから発芽が見られた(表2、3)。

表2. サクライソウの高山集団における埋土種子とその発芽率。種子は2009年12月14日に埋土した。

調査日	セット No.	埋土深さ 5 cm		埋土深さ10 cm	
		種子数	発芽率 (%)	種子数	発芽率 (%)
2010/10/2	1	103	0	111	0
	2	114	0	103	0
	計	217	0	214	0
2011/8/9	3	120	3.3	112	0.9
2011/10/28	4	114	2.6	105	83.8
	5	102	13.7	97	0
	計	216	7.9	202	38.1

表3. サクライソウの木曾集団における埋土種子とその発芽率。種子は2009年12月25日、地下5 cmに埋土した。

調査日	種子数	発芽率 (%)
2010/11/4	113	0
2011/7/22	102	23.5
2011/10/29	108	22.2

発芽した植物の形態は小さな球形をしていて、約3ヶ月の間では大きな変化は見られなかった。

これらの実験結果、およびこれ以前に行った、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月の冷湿処理後、連続光下と連続暗下で 10℃、15℃および 20℃の恒温条件下での予備実験でも全く発芽がみられなかったことを合わせると、サクライソウの種子発芽に共生菌の作用が関わっていることが示唆される。

このような発芽実験はこれまで行われた例はなく、また、発芽に菌の作用を要することが示唆されたことは、これが菌従属栄養植物の種子発芽に共通した条件である可能性をも示唆する。

③地下動態

サクライソウの茎は地下部ではあまり長く伸びず、仮軸分枝をする。地下部にできた腋芽は、地上に長く伸びる場合は基本的に花茎となるが、花をつけない個体では短く地中に留まっていた。多くの個体は腋芽を1個つくるが、中には数個、多い場合は10個以上つくるものがあつた。サクライソウは多年草であるものの、同一個体において地上茎が毎年出現するわけではない。茎が地上に出現する場合は、花をつける花茎としてである。これはサクライソウが光合成をしないことと関係があると思われる。このようなサクライソウの地下動態は、今回初めて明らかにされた。

④ポリネーター

高山集団と木曾集団の両方ともアメイロオオアリが非常に多く訪花し、吸蜜した。体に大量の花粉が付着するようには見えないが、1つの花茎の花を渡り歩くので、特に自家受粉に役立っている可能性がある。

高山集団ではコシブトハナバチ科のキオビツヤハナバチとハナバチ科ハグロハナバチ、木曾集団ではセイボウモドキ科のハナバチが吸蜜のために訪花した。これらは体に多くの花粉を付着させ、離れた個体に移動するので、他家受粉に重要なポリネーターと思われる。Takahashi et al. (1993)は可児の集団でコハナバチ科とヒメハナバチ科の小型のハナバチ5種と小型のハナアブ類3種が訪花したことを報告しており、今回のデータはサクライソウが多様な小型のハナバチとハナアブが主要なポリネーターとなっていることを支持する。

⑤花粉粒/胚珠の比率 (P/O 比)

高山集団の P/O 比は 27.1 (N = 14、標準偏差 2.0)、木曾集団では 34.2 (N = 25、標準偏差 2.0) であつた。これらの値は絶対的自家受粉をする植物にみられる値 (Cruden

1977) である。サクライソウのように雌雄異熟 (雌性先熟) でありながら低い P/O 比を示す植物は知られていない。サクライソウには昆虫も訪花するが、アリ類以外の昆虫の訪花頻度は低く、開花後半には自動自家受粉をする能力をもつこと (Takahashi et al. 1993) が、このような P/O 比をもたらしているのかもしれないが、これは今後の研究課題である。

⑥近交弱勢

人工交配を行った花の結実率は、自家交配では 36.4%、他家交配では 61.0% となり、前者は後者より結実率が大きく低下した。これらの値から計算される種子生産段階の近交弱勢は、おおよそ 0.4 となった。近交弱勢は種子形成後にも現れると考えられるので、世代を通しての近交弱勢はさらに大きくなる可能性がある (Takahashi and Maki 2011)。

この大きな近交弱勢は、小さな P/O 比と矛盾するようにみえる。その要因に関しては多方面からさらなる検討を要する。

(4) フェノロジー

サクライソウの花茎は木曾集団では6月中旬、高山集団では6月下旬から出現した。図2に2010年における高山集団の花茎の出現から種子散布に至るまでの変化を、気温と地中温度の変化とともに示した。

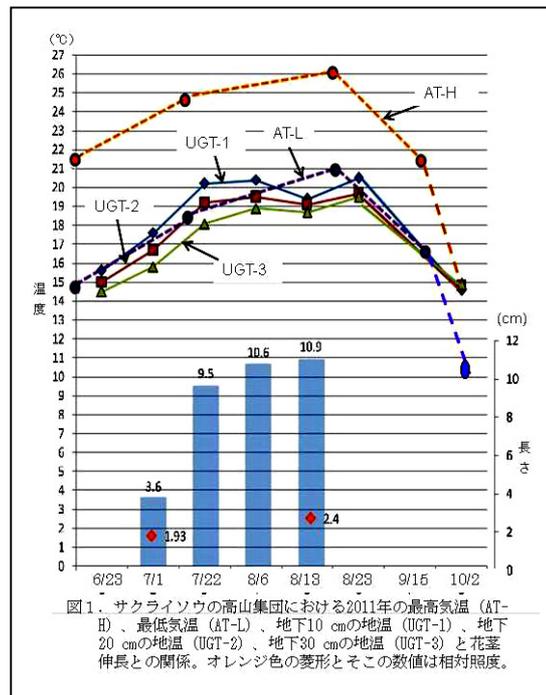


図1. サクライソウの高山集団における2011年の最高気温 (AT-H)、最低気温 (AT-L)、地下10 cmの地温 (UGT-1)、地下20 cmの地温 (UGT-2)、地下30 cmの地温 (UGT-3) と花茎伸長との関係。オレンジ色の菱形とそこの数値は相対照度。

地下部がある辺りの地下 10 cm の地温は、地下部が活発に活動して花茎が伸長し始める頃は最低気温とほぼ同じの 15℃前後であり、最高気温と最低気温の平均値は 19℃前後であつた。この地温と最低気温は9月中旬ま

ではほぼ同じ状態が続いた。花茎の伸長は気温や地温の上昇とともに8月中旬まで進行した。開花は8月上旬から中旬であり、この時期の最高気温と最低気温の平均は22~23℃であった。この花茎伸長や開花の時期と気温や地温との関係は、可児と木曾の集団でもほぼ同様であり、可児では約4週間、木曾では約2週間早く進行した。しかし奄美の集団は、調査に訪れた2011年7月上旬は、既に開花からかなり経過した個体が多かったが、開花したばかりの個体も混じっていた。現地在住の方から得た情報では例年6月上旬に開花するとのことであり、少なくともこの年は1ヶ月に渡って開花が続いたことが示唆された。

高山における蒴果の裂開、種子散布は10月末から11月中旬であった。

サクラソウにおける詳細なフェノロジーが明らかにされたもの、本研究が初めてである。

なお、集団の遺伝的多様性の解析については、担当者(牧)が東日本大震災の影響を受けたため、未完である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

① Yamato, M., Yagame, T., Shimomura, N., Iwase K., Takahashi, H., Ogura-Tsujita, Y. and Yukawa, T. 2011. Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakuraii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza* 21: 631-639. 査読有り.
DOI: 10.1007/s00572-011-0373-3

② Takahashi, H. and Maki, M. 2011. Seed abortion due to inbreeding depression in the threatened saprophytic *Petrosavia sakuraii* (Petrosaviaceae). *J. Phytogeogr. Taxon.* 59: 47-50. 査読有り.

③ Iwashina, T., Tobe, H., Takahashi, H. and Yukawa, T. 2011. Flavonoids from achlorophyllous plant, *Petrosavia sakuraii* (Petrosaviaceae). *Biochem. System. Ecol.* 39: 883-884. 査読有り.
DOI: 10.1016/j.bse.2011.06.021

④ Tobe, H. and Takahashi, H. 2009. Embryology of *Petrosavia* (Petrosaviaceae): evidence for the distinctness of the family from other monocots. *J. Plant Res.* 122: 597-610. 査読有り.
DOI: 10.1007/s10265-009-0259-z

[学会発表] (計 2件)

① 高橋弘. 2011. サクラソウの系統分類と保全. 岐阜県植物研究会, 2012年1月9日, 岐阜大学.

② 岩科司 (発表者)・遊川知久・高橋弘・戸部博. 2010. サクラソウに含まれるフラボノイド: オゼソウとの植物化学的比較. 日本植物分類学会, 2010年3月28日, 愛知教育大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘 (TAKAHASHI HIROSHI)

岐阜大学・教育学部・教授

研究者番号: 40021331

(2) 研究分担者

戸部 博 (TOBE HIROSHI)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号: 60089604

遊川知久 (YUKAWA TOMOHISA)

国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号: 50280524

牧 雅之 (MAKI MASAYUKI)

東北大学・理学研究科・准教授

研究者番号: 60293985

津田 智 (TSUDA SATOSHI)

岐阜大学・流域圏科学研究センター・准教授

研究者番号: 50212056

(3) 連携研究者

岩科 司 (IWASHINA TSUKASA)

国立科学博物館・植物研究部・部長

研究者番号: 30151731

大和政秀 (YAMATO MASAhide)

鳥取大学・農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター・助教

研究者番号: 00571788