

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05645

研究課題名(和文) 絶滅危惧ラン科植物の自生地播種試験を用いた保全手法の開発

研究課題名(英文) Development of conservation methods using seed-sowing of endangered orchid species

研究代表者

山下 由美 (Yumi, Yamashita)

福島大学・共生システム理工学類・客員准教授

研究者番号：30792543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本産ラン科植物の約60%の種は絶滅危惧種に指定されており、保全技術の確立が急務である。しかしながらラン科の種子は微細なため、散布された種子や幼若個体の地中での観察が困難で、保全に不可欠な種子繁殖特性や幼若期の共生菌多様性がほとんどの種において明らかになっていない。これらの「ブラックボックス」を解明するためには、さまざまな立地において初期成長を継続観察する手法の確立が必要である。ラン科の代表的な生育立地である1. 林床、2. 湿地、3. 樹上で種子を袋に詰めて自生地播種試験を行った結果、ラン科植物の代表的立地での初期成長を観察する方法を確立し、共生菌の多様性解析を行う事が出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ラン科のみならず微細種子・胞子を散布体とする植物(ツツジ科、リンドウ科、シダ植物等)の生物多様性、生態学、保全に以下のように貢献する。1. 微細種子・胞子をもつ植物でこれまで「ブラックボックス」だった発芽、初期成長に適した光、温度、水、栄養などの特性が解明でき、植物体(特に地下部)の形態、成長過程が可視化できる。2. 自生地での種ごとの種子寿命、埋土種子特性の解明が一挙に進む。また、自生地播種によって親個体からの距離と発芽率の相関が検証でき、実生のセーフサイトが明らかになる。3. 自生地播種試験法を応用することにより、費用対効果の高い野生復帰が実現する。

研究成果の概要(英文)：About 60% of Japanese orchid species are listed as endangered, and there is an urgent need to establish conservation techniques. However, because orchid seeds are minute, it is difficult to observe dispersed seeds and juvenile individuals in the ground, and seed reproductive characteristics and juvenile symbiotic fungal diversity, which are essential for conservation, have not been clarified for most species. To elucidate these “black boxes,” it is necessary to establish methods for continuous observation of early growth in a variety of locations. As a result of conducting authigenic seeding tests using bags of seeds in the following representative orchid locations: 1. forest floor, 2. wetlands, and 3. tree tops, we were able to establish a method for observing the initial growth of orchid plants in representative locations and analyze the diversity of symbiotic fungi.

研究分野：植物生態学

キーワード：ラン科 共生菌 自生地播種試験 保全 発芽生態

### 1. 研究開始当初の背景

日本には 85 属 320 種のラン科植物が自生するが、その 60%の種は絶滅危惧種に指定されている。遺伝的多様性を保ちつつ個体数を増加させて自生地の保全を図るには、種子繁殖が必須である。しかし、ラン科植物の多くは胚と種皮のみからなる微細種子を風散布するため、地中の種子や幼若個体を把握することが困難で、ほとんどの種の発芽生態が分かっていない。栄養を持たない微細種子の発芽には、発芽と初期成長を誘導する特定の菌類が共生し、栄養を供給することが不可欠だが、この共生菌もほとんどの種で明らかではない。こうした課題を有するラン科の発芽生態を明らかにするため、種子を封入したスライドマウントを埋設・回収する自生地播種試験法が試みられている(図1)。しかしこの技術の実践は、林床に自生する種に限られるため、ラン科の多様な生育立地において技術が確立していない。また、この手法を使った生息域内保全・野生復帰のプロトコールも整備されていない。

ラン科植物の生育立地は林床、草地、湿地、樹上に大別されるが、多様な生育立地で播種する場合、種子を固定する資材や方法、土壤水分や栄養をコントロールする方法などの技術改良が必要である。さらに生息域内保全や野生復帰に向けて、播種資材が残存せず、幼若個体ができるまで生育を継続できる手法の改良が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究ではラン科の代表的な生育立地(林床、草地、湿地、樹上)に自生する複数の絶滅危惧種をモデルとして以下の項目を実施し、費用対効果の高い保全手法を確立する。1:生育立地に応じた自生地播種試験法の改良を行い、標準化する。2:確立した手法を複数の絶滅危惧種で実践し、多様な生育立地での発芽生態特性を明らかにし、生息域内保全・野生復帰の成功率を格段に向上させる。

### 3. 研究の方法

本研究では環境省レッドリストで絶滅危惧種に指定されている種などの中から、ラン科の3つの代表的な生育立地で生育し、アクセスの可能な以下の種をモデルとして選抜し、下記の a、b、c の3つの異なった環境条件で播種試験を実施した。林床: カイサカネラン(環境省 IA)、シロテンマ(IA)、クマガイソウ(II)、モイワラン(IA)、ヒメノヤガラ(IB)。湿地: ミズトンボ(II)、トキソウ、サワラン、カキラン、サギソウ。樹上: セッコク、カヤラン、クモラン、フウラン。

a. 樹上での播種試験: 研究代表者らはすでに着生種クモランで播種試験を実施したが、樹皮上での種子の散逸と乾燥が課題であることが判明している。散逸に対しては、両面テープ、ポリラップ、不織布などを用いた種子固着の改良を試みる。乾燥に対しては、ラップ、ミズゴケなどで被覆する改良を行った。

b. 湿地での播種試験: 水位の上昇や水流等の影響で種子袋が移動・流出する可能性が考えられる。水中へ固定ペグを設置して固定し、種子袋の回収率を向上させた。

c. 林床での播種試験: 林床では、種子発芽に適切な土壤深度が種ごとに異なること、また、深度により共生菌の種類が異なる傾向を既に見出している。この事象を検証するため、土壤生態系を攪乱せず異なった深度に簡便に播種する手法を開発した。

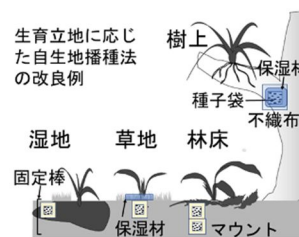


図1 生育立地に応じた播種試験法

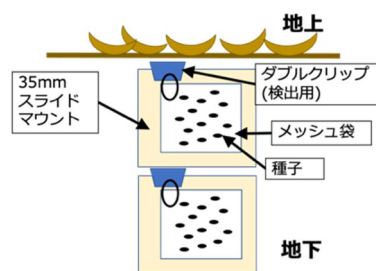


図2 発芽深度を考慮した播種試験法



図3 種子袋中の発芽種子(プロトコーム)

### 4. 研究成果

#### (1) 林床での播種試験結果 クマガイソウ

クマガイソウ *Cypripedium japonicum* Thunb. は環境省レッドリストでは絶滅危惧 類に指定され、沖縄を除く全ての都道府県に分布するが、そのほとんどで絶滅危惧種に指定されている。増殖は地下茎によるクローン繁殖が知られているが種子繁殖の実態は不明であった。研究代表者等は SSR マーカーによる解析から種子繁殖可能性のある 6

表1. 時間経過によるクマガイソウ発芽数と発達ステージ

経過年数	発芽バケツ数	回収バケツ数	発達ステージ別プロトコーム数				
			0	4	8	12	16
1	0	276					
2	3	480					
3	4	231					
4	5	162					
5	2	43					
6	0	2					
合計		1194					

■ Stage 1 ■ Stage 2 ■ Stage 3

力所の自生地を見出し、ここで図2に示すような深度を変えた種子パケット埋設法を用いて播種試験を行った。

その結果、2年以上経過した種子パケットで発芽種子(プロトコム、図3)を見いだすことが出来た。これはクマガイソウの自然状態で初の発芽である。各約200個の種子を詰めて埋設した1194個のパケット中、14枚で発芽が見られ、得られたプロトコムは38個であったことから、発芽率は0.014%となり、これは極めて低い値である(表1)。しかし、得られたプロトコムから発芽時に共生する菌を単離培養する事に成功し、分子同定の結果、Tulasnell 科 *Tulasnell* 属の3つのOUTであることが明らかにした(図4)。これは既報の成熟個体由来の菌と同じクレードに属したことから、クマガイソウは発芽から成熟時まで同一の菌と共生することが明らかとなった。

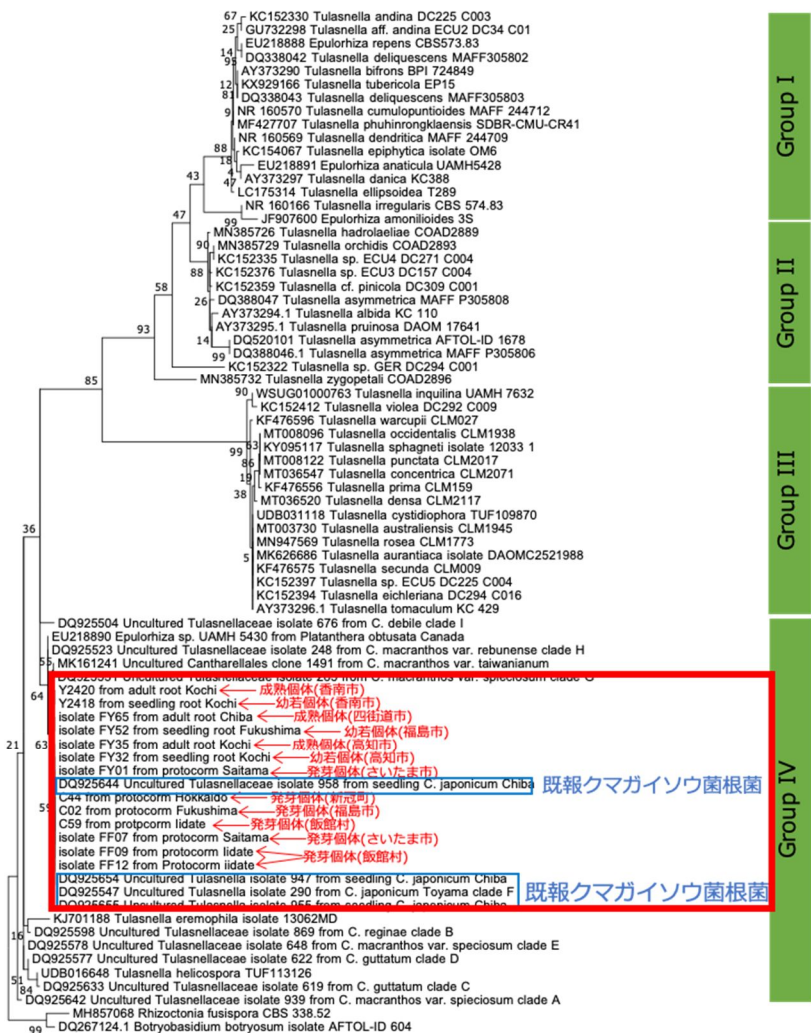


図4.ツラスネラ属5.8S領域の最尤法系統樹

(2) 樹上での播種試験  
結果 セッコク、カヤラン、クモラン、フウランを用いた検討ー

樹上の播種試験では林床と異なり、種子の散逸を防いで樹皮に固着する方法の検討だけでなく、適度な保湿法を考案する必要があり、更には鳥などによる破損を防止する手段を講じる事が播種試験成功の必須の条件となる。

セッコク、カヤラン、クモラン、フウランの種子を用いて図5に示すような接着資材と保湿・保護材を設置して2022年に自生地および試験区での発芽試験を行った。



図5. 様々な接着資材と保湿保護資材を用いた樹上播種試験  
1. 和紙絆創膏, 2.メッシュ袋, 3.布絆創膏, 4.キネシオテープ, 5.傷絆創膏

表2に示すようにセッコクでは3ヶ所の試験区全てで設置3ヶ月以降発芽が見られた。400個の種子を封入したパケットの内、回収した19個に合計191個のプロトコムが得られたので発芽率は2.5%と今回試験した着生ラン中で最も高い値を示した。

表2. セッコク播種試験結果

播種地	播種日	回収日	経過月数	回収パケット数	発芽パケット数	プロトコム数
磐城農業高校	3/28/22	7/8/22	3	9	2	16
静岡市梅林	2/28/22	7/28/22	5	5	4	23
福島大学	5/13/22	8/8/22	3	5	5	152
				合計	11	191

カヤランでは表3に示すように自生地2ヶ所、試験区2ヶ所の合計4ヶ所の内、自生地、試験区それぞれ1ヶ所で発芽が見られ、発芽率は33パケットに46個のプロトコームが見られたことから0.35%となり、セッコクの値よりは低かった。クモランとフウランは今回発芽を見ることは出来なかった。

接着に用いた資材の中ではメッシュ袋、キネシオテープと和紙絆創膏による接着が最もセッコクのプロトコームの成長を促進した(図6)。このパケットを更に6ヶ月以上放置し、プロトコームの成長をモニタリングしたが、保湿ラップの下にコケ類が繁茂し、プロトコームの成長は観察できなかった。

更に、2023年に同様の接着資材と保湿・保護資材を用いて播種試験を行ったが、発芽率は全ての種で低く、安定的な結果を示すには至らなかった。これは播種した年の気候が関与すると思われる、樹上のランの発芽研究には温度・湿度・照度などのモニタリングが更に必要である。また、ラップによる保湿条件や期間も今後検討する必要がある。なお、コケ類の発生が少なかった紙テープを13ヶ月放置したところ、試験区で図7に示す様に多数の実生が生じた。したがって確率は低いが生地、試験区を問わず実生成長は起こるものと考えられ、今後の環境条件の検討が更に望まれた。

表3. カヤラン播種試験結果 \*は自生地それ以外は試験区

播種地	播種日	回収日	経過月数	回収パケット数	発芽パケット数	プロトコーム数
*佐賀県 檜原湿原	3/15/22	7/6/22	4	13	3	14
磐城農業高校	3/28/22	7/8/22	3	10	1	32
*静岡市 梅林	2/28/22	7/28/22	5	5	0	0
福島大学	5/13/22	8/8/22	3	5	0	0
			合計	33	4	46

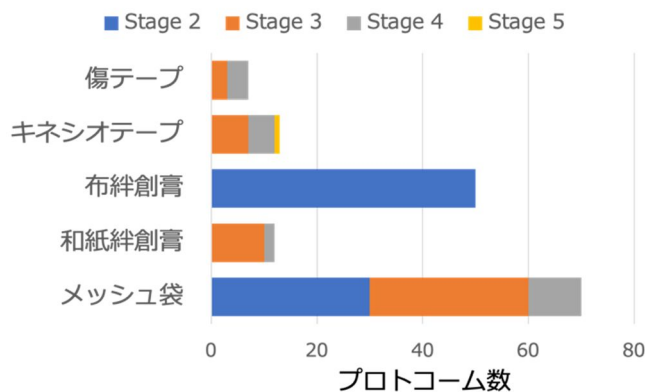


図6. プロトコームの成長に及ぼすパケット素材の影響ーセッコクを用いた比較ー

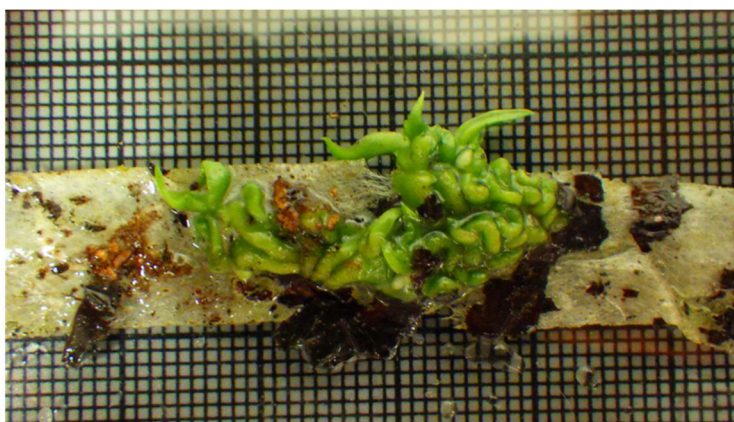


図7. 播種13ヶ月後の紙絆創膏上のカヤランの実生

### (3) 湿地での播種試験結果 ミズトンボ、サギソウ、サワラン、トキソウ、カキランを用いた検討

湿地に生育するランの種のみズゴケ類や土などの移動しやすい立地での自然条件の発芽は知られていない。そこで、水位の上昇や水流に対応するためにペグを用いて播種パケットを固定した。種子パケットはいずれの自生地でも回収することが出来たが、3年に渡る播種試験でもどの種も発芽を見ることが出来なかった。湿地の中でも共生菌が種子に移行しやすい条件を更に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamashita, Y., N. Satoh, T. Kurosawa and S. Kaneko.	4. 巻 65(1)
2. 論文標題 Genetic Diversity and Structure of the Endangered Lady's Slipper Orchid <i>Cypripedium japonicum</i> Thunb. (Orchidaceae) in Japan.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Population Ecology.	6. 最初と最後の頁 54-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1438-390X.12134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山下由美・山下俊之.	4. 巻 35
2. 論文標題 4種の菌従属栄養植物(アオキラン、ヒメノヤガラ、シロテンマ、ホクリクムヨウラン)の新産地報告.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 フロラ福島	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋俊哉・山下由美・山ノ内崇志・黒沢高秀.	4. 巻 34(2)
2. 論文標題 福島県昭和村矢の原湿原北湿原の植物相と植生.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 福島大学地域創造	6. 最初と最後の頁 135-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Ogura-Tsujita, Kenshi Tetsuka, Shuichiro Tagane, Miho Kubota, Shuichiro Anan, Yumi Yamashita, Koichi Tone and Tomohisa Yukawa.	4. 巻 13(4)
2. 論文標題 Differing Life-History Strategies of Two Mycoheterotrophic Orchid Species Associated with Leaf Litter- and Wood-Decaying Fungi.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diversity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/d13040161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 辻田有紀・山下由美・村田美空・首藤光太郎・天野正晴・遊川知久.	4. 巻 24(3)
2. 論文標題 ランミモグリバエの新たな寄主植物と北限と南限を含む国内の分布状況.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫(ニューシリーズ)	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20848/kontyu.24.3_55	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chie Tsutsumi, Ayako Maeda, Atsushi Abe, Yumi Yamashita, Tomohisa Yukawa and Satoshi Kakishima.	4. 巻 47(3)
2. 論文標題 Genetic Diversification of Oberonia (Orchidaceae) in Japan, with Implications for the Species Taxonomy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B	6. 最初と最後の頁 131-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50826/bnmnsbot.47.3_131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita, Y., Ogura Tsujita, Y., Nagata, N., Kurosawa, T., & Yukawa, T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Molecular identification of seed feeding flies dissected from herbarium specimens clarifies the 100 year history of parasitism by Japanagromyza tokunagai in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 240-256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1440-1703.12283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山下由美・藤井健太・池山裕一郎・藤森祥平・辻田有紀・黒沢高秀・遊川知久
2. 発表標題 野外播種試験で明らかになったクマガイソウ(ラン科)の種子発芽特性
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kento Rammitsu, Masaru Goto, Yumi Yamashita, Tomohisa Yukawa, Yuki Ogura-Tsujita.
2. 発表標題 Three epiphytic orchids harbor distinct mycorrhizal communities. even in co-existing individuals: The link to in vitro symbiotic compatibility.
3. 学会等名 The 11th International Conference on Mycorrhiza (ICOM11) and the 5th International Molecular Mycorrhiza Meeting (iMMM5). (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下由美・藤井健太・池山裕一・藤森祥平・辻田有紀・黒沢高秀・遊川知久.
2. 発表標題 野外播種試験で明らかになったクマガイソウ(ラン科)の発芽・繁殖特性.
3. 学会等名 日本菌学会第66回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤 千絵・細矢 剛・山下 由美・遊川 知久.
2. 発表標題 日本のジガバチソウ(ラン科) から単離された菌根菌.
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下由美
2. 発表標題 さく葉標本に残された寄生バエの非破壊サンプリング法開発と分子同定 - ランミモグリバエによる食害の歴史を押し葉標本から探る -
3. 学会等名 九州大学比較社会文化研究院 生物多様性講座総合演習(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下由美
2. 発表標題 シードバケットを使った野外播種試験
3. 学会等名 種子・胞子・組織培養を使った保全フォーラム - 小笠原の絶滅危惧種に注目して (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木晴大・山下由美・山ノ内崇志・黒沢高秀・遊川知久
2. 発表標題 ヒメノヤガラ(ラン科ヒメノヤガラ属)集団間の花形質と繁殖特性の検討.
3. 学会等名 日本植物分類学会第22回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下由美
2. 発表標題 モイワラン、葉っぱ無し生活の秘密
3. 学会等名 企画展・学芸員は見た！札幌の絶滅危惧植物展・ミュージアムトーク (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下由美・藤井健太・池山裕一郎・藤森祥平・辻田有紀・黒沢高秀・遊川知久
2. 発表標題 野外播種試験で明らかになったクマガイソウ(ラン科)の発芽・繁殖特性
3. 学会等名 日本植物分類学会第21回大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Yumi YAMASHITA, Natsuki SATOH, Takahide KUROSAWA, Shingo KANEKO, and Tomohisa YUKAWA
2. 発表標題 Clonal Structure of the largest wild and ex situ conserved populations of <i>Cypripedium japonicum</i> Thunb. (Orchidaceae) in Japan.
3. 学会等名 23rd World Orchid Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下由美・高木大輔・池田健一・末次健司・黒沢高秀・遊川知久.
2. 発表標題 緑色菌従属栄養植物カイサカネランの色素体構造.
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Yamashita, Yuki Ogura-Tsujita, Nobuaki Nagata, Takahide Kurosawa, Tomohisa Yukawa.
2. 発表標題 Molecular identification of seed-feeding flies dissected from herbarium specimens clarifies the 100-year history of parasitism by <i>Japanagromyza tokunagai</i> in Japan.
3. 学会等名 The 9th East Asian Plant Diversity and Conservation Virtual Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山下俊之・山下由美・遠藤雄一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 歴史春秋社	5. 総ページ数 121
3. 書名 福島スミレ図鑑	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	遊川 知久  (Yukawa Tomoshisa)  (50280524)	独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・グループ長    (82617)	
研究分担者	辻田 有紀  (Ogura-Tsujita Yuki)  (80522523)	佐賀大学・農学部・准教授    (17201)	
研究分担者	山下 俊之  (Yamashita Toshiyuki)  (90192400)	奥羽大学・薬学部・教授    (31602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関