

## 短 報

## 京都大学芦生研究林にてアキタスズムシソウを記録する

阪口翔太<sup>1\*</sup>・鶴田憲次<sup>2</sup>・光田重幸<sup>3</sup>・福本繁<sup>4</sup>・瀬戸口浩彰<sup>1</sup>・石原正恵<sup>5</sup>A new record of *Liparis longiracemosa* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato  
from Ashiu Research Forest, Kyoto UniversityShota SAKAGUCHI<sup>1\*</sup>, Kenji TSURUTA<sup>2</sup>, Shigeru FUKUMOTO<sup>3</sup>, Shigeyuki MITSUTA<sup>4</sup>, Hiroaki SETOGUCHI<sup>1</sup>  
and Masae ISHIHARA<sup>5</sup>

## 要旨

2020年7月初旬、京都大学芦生研究林の標高630m付近において、トチノキの樹幹上でラン科クモキリソウ属植物が開花しているのが発見された。形態観察と分子系統分析により種同定を行ったところ、芦生研究林新産のアキタスズムシソウであることが判明した。1930年代の古い標本記録も含め、京都府下では3地点の産地のみが知られる希少種であり、芦生研究林は府下第4番目の重要産地となった。

キーワード：希少植物、新産地、クモキリソウ属、ラン科

## Abstract

In early July 2020, flowering individuals of an unidentified *Liparis* sp. (Orchidaceae) were found on the trunks of Japanese horse chestnut trees at 630 m a.s.l. in Ashiu Forest Research Station, Kyoto University. Based on the results of morphological and molecular phylogenetic analyses, the species was identified as *L. longiracemosa* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato, which is a new record for Ashiu. *Liparis longiracemosa* is an endangered orchid with only three known localities in Kyoto Prefecture (including an old herbarium record from the 1930s), and our discovery revealed Ashiu Research Forest as a new important locality for this species in Kyoto.

**Key words:** *Liparis*, New locality, Orchidaceae, Rare plant

## 1. 緒言

京都府南丹市に位置する京都大学芦生研究林には、アシウスギ *Cryptomeria japonica* (L. f.) D. Don f. *radicans* (Nakai) Sugim. et Muroi とブナ *Fagus crenata* Blume を主とする冷温帯性針広混交林が保全されている。過去に大規模な伐採を経験していない天然林は原生的な環境に依存するラン科植物にとって重要であり、これまでに30種のラン科植物が芦生から記録されている (YASUDA & NAGAMASU, 1995)。しかしながら、ラン科植物は自生

量が少なく林内に散在しているため、多くの研究者が植物調査を行ってきた芦生研究林であっても未発見の種が残されている可能性がある。実際、2019年に近畿地方北部には分布が知られていなかった希産種・フガクスズムシソウ (*Liparis fujisanensis* F. Maek. ex F. Konta et S. Matsumoto) が芦生研究林内で確認される (阪口ら, 2020) など、ラン科植物のさらなる発見が期待されていた。

2020年7月5日、著者である鶴田と福本が研究林内を踏査していた折、標高630m付近のトチノキ *Aesculus*

<sup>1</sup> 京都大学大学院人間・環境学研究科

<sup>2</sup> 京都市立芸術大学

<sup>3</sup> 京都府京田辺市

<sup>4</sup> 京都市山科区

<sup>5</sup> 京都大学フィールド科学研究教育センター芦生研究林

<sup>1</sup> Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

<sup>2</sup> Kyoto City University of Arts

<sup>3</sup> Kyotanabe, Kyoto

<sup>4</sup> Yamashina, Kyoto City

<sup>5</sup> Ashiu Forest Research Station, Field Science Education and Research Center, Kyoto University

\* 責任著者：阪口翔太

〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町 京都大学大学院人間・環境学研究科 相関環境学専攻

Tel : +81-75-753-6796, Fax : +81-75-753-6694

e-mail : sakaguchi.shota.6a@kyoto-u.ac.jp

*turbinata* Blume の樹幹で開花するラン科クモキリソウ属植物を発見した。芦生からは同属種としてクモキリソウ *Liparis kumokiri* F. Maek., クモイジガバチ *Liparis truncata* F. Maek. ex T. Hashim., フガクスズムシソウが記録されていたが、今回発見された植物の形態がいずれの種とも一致しなかったため、1株を採取して京都大学に持ち込んだ。その後、京都大学で形態を詳細に観察しDNA配列に基づいて種同定を行ったところ、芦生では未記録だったアキタズムシソウ *Liparis longiracemosa* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato であることが判明したので本稿にて報告する。

## 2. 材料と方法

### 外部形態の観察

日本産クモキリソウ属植物に関する検索表を掲載している「改訂新版 日本の野生植物1」(大橋ら, 2015) および関連する種の分類体系 (TSUTSUMI et al., 2007; TSUTSUMI et al., 2008; TSUTSUMI et al., 2019) を参照し、芦生研究林で採取された個体の形態を比較検討した。形態観察の後、サンプル個体はさく葉標本にして京都大学博物館の植物標本庫 (KYO) に収蔵した。

### DNA 塩基配列解析

外部形態の観察に加えて、DNA 塩基配列による種同定を試みた。サンプル個体の葉の一部 (約 1 cm<sup>2</sup>) を採取しシリカゲルで乾燥させたあと、CTAB法 (MURRAY & THOMPSON, 1980) でDNAを抽出した。PCR増幅には、日本産クモキリソウ属に適用されたプライマー (TSUTSUMI et al., 2007) を採用し、同文献で記載されている方法に従って核ITS領域、葉緑体ゲノム中の *trnS-trnG* 遺伝子間領域、*trnL* 遺伝子 + *trnL-trnF* 遺伝子間領域の合計3領域についてPCR増幅を行った。PCR産物はアガロースゲル泳動でシングルバンドを確認したあと、ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) によって未反応のプライマーを消化した。その後、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) を使ってPCR産物の両側からシーケンス反応を行った。シーケンス反応産物をエタノール精製した後に、ABI 3130xl シーケンサー (Applied Biosystems) を用いてキャピラリー泳動を行った。

泳動後に得られた波形データを BioEdit (HALL, 1999) に取り込み、両側の配列をアセンブルした。本研究で新規に得た配列は、先行研究 (LEE et al., 2010; TSUTSUMI et al., 2007; TSUTSUMI et al., 2019) で報告されているクモキ

リソウ属植物の配列 [*L. fujisanensis* (L1, L18, J8), *L. koreojaponica* Tsutsumi, T. Yukawa, N.S. Lee, C.S. Lee et M. Kato (L3, L4, L41), *L. kumokiri* (L9, L15, L16), *L. lilifolia* (L.) A. Rich. ex Lindl. (L25), *L. longiracemosa* (L8), *L. makinoana* Schltr. (L2), *L. pterosepala* N.S. Lee, C.S. Lee et K.S. Lee (K20, K21), *L. purpureovittata* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato (L24), *L. suzumushi* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato (L6)], および阪口ら (2020) の芦生産 *L. fujisanensis* (Ashiu1) の配列と合わせて3領域を結合したうえで、ClustalW (THOMPSON et al., 1994) で整列させた。得られたアライメントから欠損とギャップ領域を除いた配列データを解析対象として最尤系統樹の推定を行った。この推定においてはMEGA X (KUMAR et al., 2018) を利用し、1,000回のブートストラップで各枝の支持率を得た。

## 3. 結果と考察

### 形態的特徴

芦生研究林で確認されたクモキリソウ属植物は2枚の落葉性の葉をもち、卵形の偽球茎を有していた (図1a)。花茎は約10 cmの長さがあり、そこに茶褐色を帯びた淡緑色の花を3個着けていた (その下に2花が脱落したと思われる痕跡が確認された)。唇弁は幅6-8 mm × 長さ8-10 mmの大きさと緩やかに反り返り、その裏側には披針形の側萼片が2枚配置していた (図1b左)。花を正面から見ると、唇弁の下方からわずかに側萼片がのぞく。花弁は線形で、花の中心部から斜め下の方向に反り返っていた (図1b右)。蕊柱は淡緑色で、先端部には嘴状になった薬帽を確認できた (図1b右)。

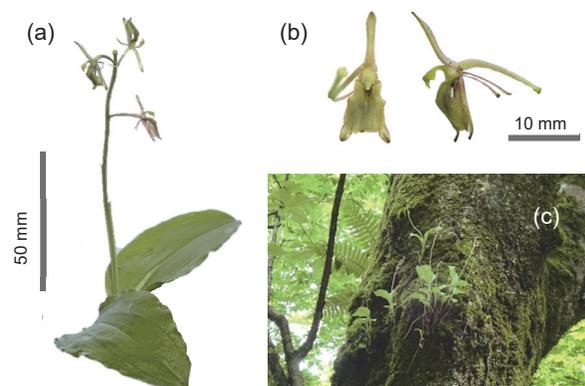


図1. (a) 芦生研究林で採取されたアキタズムシソウの全体写真, (b) 花の拡大写真 (左: 正面, 右: 側面), (c) 自生状況。

こうした形態的特徴からして、この植物は日本産クモキリソウ属のスズムシソウ群に属すると考えられた。スズムシソウ群は形態的類似性から分類に混乱が生じてきたグループであったが、2008年に発表された研究論文により日本列島温帯のスズムシソウ群は3種に分類されることが示された (Tsutsumi et al., 2008)。その3種とは、スズムシソウ *L. suzumushi* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato, セイタカスズムシソウ *L. makinoana* Schltr., アキタスズムシソウ *L. longiracemosa* Tsutsumi, T. Yukawa et M. Kato である (Tsutsumi & Yukawa, 2019)。このうち、スズムシソウは開花期が5月から6月と早く、また唇弁が長さ15 mm前後と大型であることから、芦生研究林で見つかった植物とは性質が異なる。後の2種は開花期がともに6-7月で花形態も類似しているが、アキタスズムシソウの方が唇弁の幅が狭く、花茎に花が疎らにつ

く特徴をもつ (Tsutsumi et al., 2019)。芦生研究林で得られたサンプル個体の唇弁の形状は縦長であり、脱落した花痕を考慮すれば着花間隔はやや疎らで、形態的にはアキタスズムシソウに最も類似していた (図1b)。

#### 系統的位置付け

DNA分析の結果、芦生産クモキリソウ属植物のITS領域 (LC616679)・*trnL*+*trnL*-F領域 (LC616680)・*trnS*-G領域 (LC616681)の塩基配列を取得できた (括弧内に塩基配列のDDBJアクセッション番号を示す)。材料と方法に挙げた他種の配列と合わせて整理させたところ、合計2,362 bpのアライメントとなった。このデータに基づいて推定した最尤系統樹を図2に示す。形態的特徴から示唆されたように、本サンプルは、スズムシソウ (L6)・セイタカスズムシソウ (L2)・アキタスズムシソウ (L8)

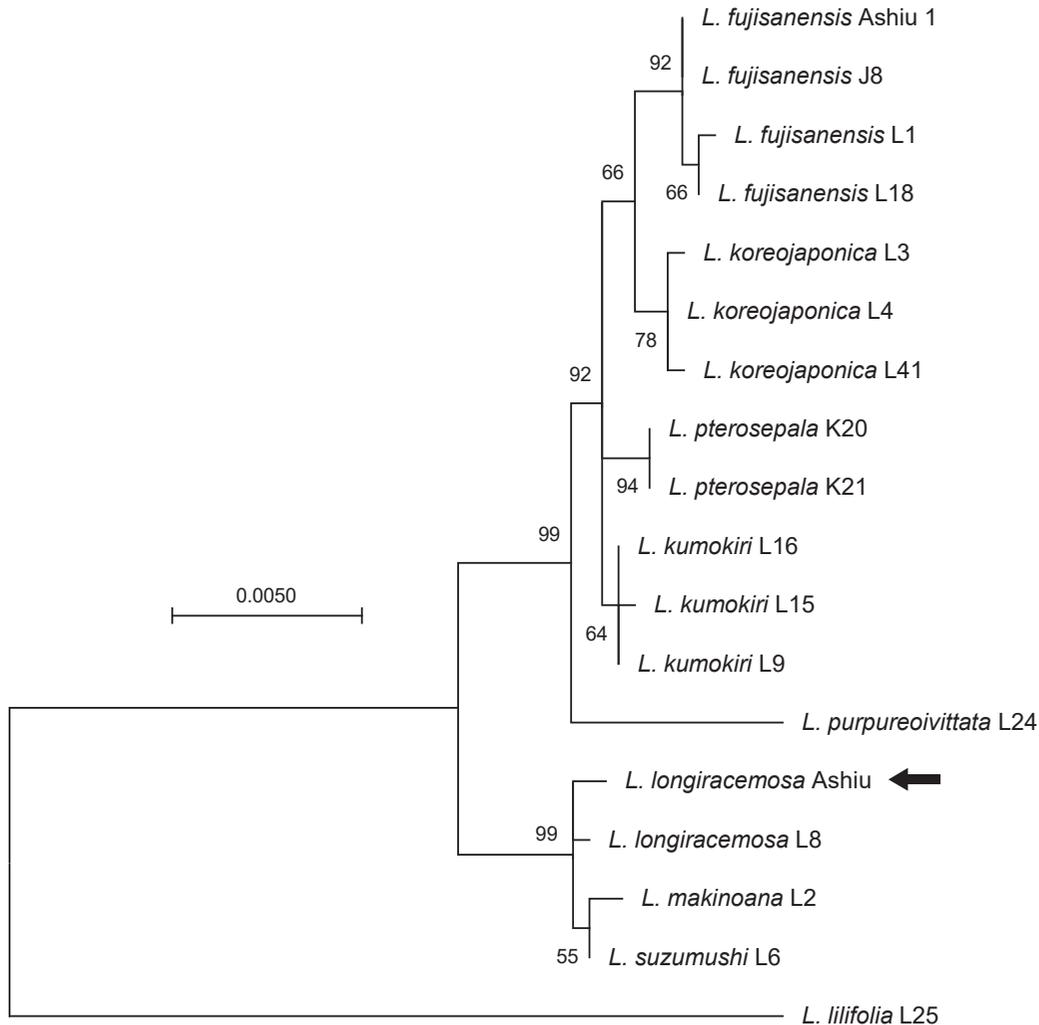


図2. クモキリソウ属植物の最尤系統樹。核ITS領域と葉緑体2領域を結合し、ギャップや欠損座位を除去したデータセット (アライメント長2,362 bp) で系統樹推定を行っていた。系統樹上の枝脇に記した数字はブートストラップ値を示している。本研究で得た京都府芦生産のアキタスズムシソウを矢印で示している。スケールは、塩基座位あたりの置換数を示している。

から成るスズムシソウ群クレードに属していた（ブートストラップ支持率 99%）。このクレード内では葉緑体の塩基配列（*trnL*+*trnL-F* 領域・*trnS-G* 領域）には変異がなかったが、ITS 領域において 4 配列間に 5 座位の変異が存在した。これにより、支持率 55% でスズムシソウとセイタカスズムシソウが系統的まとまりを形成し、芦生産のサンプル個体はアキタスズムシソウに比較的近い系統的位置にあることが分かった。ただし、（スズムシソウ+セイタカスズムシソウ）グループと（アキタスズムシソウ+芦生産サンプル個体）グループの間の変異はわずかであることから、分子に基づく正確な種同定にはさらなる分析努力が必要である。

以上の形態情報と系統分析の結果に基づき、芦生研究林で見つかったクモキリソウ属植物をアキタスズムシソウとして同定する（証拠標本：JAPAN. Kinki, Kyoto, Nantan City, Miyama, Ashiu, 5 July 2020, K. Tsuruta & S. Fukumoto, KYO 00025874）。アキタスズムシソウは北海道から九州まで広く分布するが、京都府では 1933 年に京都市京北細野町、1980 年に綾部市、1997 年に宮津市で標本が採取されたのみである（TSUTSUMI et al., 2019）。また京都近郊の主要な標本庫（HYO, OSA）においても京都府産のスズムシソウ群の標本は収蔵されていない（2021 年 3 月現在）。そのため、今回の報告によって、芦生研究林が府下第 4 番目のアキタスズムシソウの産地となったと考えられる。府内では本種の分布は限定的であり、最近の確認記録が途絶えている産地もあると思われるので、本種の保全上で芦生研究林は重要地域に位置付けられる。

なお、本種は基本的に地生の植物であるにも関わらず、芦生研究林では 2 本のトチノキの老木上にものみ生育が確認された。芦生研究林では 2000 年前後にニホンジカの過採食によって林床植生が荒廃し、多くの希少植物が消失した（KATO & OKUYAMA, 2004; 藤木・高柳, 2008; 藤井, 2010）。同様に、もともとは地上にも個体群を維持していたアキタスズムシソウにもシカの採食が及び、シカの口が届かない樹上にものみ個体群が残存した可能性もある。

### 謝辞

本研究は、ニッセイ財団環境問題研究助成と自然保護助成基金のご支援を頂き遂行しました。アキタスズムシソウの標本収蔵状況の確認に際し、高野温子博士（兵庫県立人と自然の博物館）と横川昌史氏（大阪市立自然史博物館）にご協力を頂きました。また 3 名の匿名査読者と編集者からは、本稿の改訂過程で有益なご助言を頂きました。京都大学フィールド科学教育研究センター芦生

研究林には調査入林を許可して頂きました。記して御礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) 藤井伸二 (2010) 芦生研究林枕谷におけるシカ摂食にともなう林床開花植物相の変化. 保全生態学研究 15: 3-15.
- 2) 藤木大介・高柳敦 (2008) 京都大学芦生研究林においてニホンジカ (*Cervus nippon*) が森林生態系に及ぼしている影響の研究 — その成果と課題について. 森林研究 77: 95-108.
- 3) Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.
- 4) Kato, M. & Okuyama, Y. (2004) Changes in the biodiversity of a deciduous forest ecosystem caused by an increase in the Sika deer population at Ashiu, Japan. Contr. Biol. Lab. Kyoto Univ. 29: 437-448.
- 5) Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. and Evol. 35: 1547-1549.
- 6) Lee, C.S., Tsutsumi, C., Yukawa, T. & Lee, N.S. (2010) Two new species of the genus *Liparis* (Orchidaceae) from Korea based on morphological and molecular data. J. Plant Biol. 53: 190-200.
- 7) Murray, M. G. & Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids. Res. 8: 4321-4322.
- 8) 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩 (2015) 改訂新版 日本の野生植物 1. 平凡社, 東京.
- 9) 阪口翔太・福本繁・長澤耕樹・増田和俊・高橋大樹・瀬戸口浩彰・古田卓・岸本泰典・平塚健一・船津慧・石原正恵 (2020) 京都府芦生にてフガクスズムシソウ (ラン科) を記録する. 植物地理・分類研究 68: 81-87.
- 10) Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids. Res. 22: 4673-4680.
- 11) Tsutsumi, C., Yukawa, T., Lee, N.S., Lee, C.S. & Kato, M. (2007) Phylogeny and comparative seed morphology of epiphytic and terrestrial species of *Liparis* (Orchidaceae) in Japan. J. Plant Res. 120:405-412.
- 12) Tsutsumi, C., Yukawa, T. & Kato, M. (2008) *Liparis purpureovittata* (Orchidaceae): a new species from Japan. Acta Phytotaxon. Geobot. 59: 73-77.
- 13) Tsutsumi, C., Yukawa, T. & Kato, M. (2019) Taxonomic Reappraisal of *Liparis japonica* and *L. makinoana* (Orchidaceae). Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B, 45: 107-118.
- 14) Yasuda, S. & Nagamasu, H. (1995) Flora of Ashiu. Contr. Biol. Lab. Kyoto Univ. 28: 367-486.