

短 報

大阪府で見つかったクマガイソウの生育状況と遺伝的多様性

大阪市立自然史博物館

川西市在住

福島大学大学院共生システム理工学研究科

福島大学理工学群共生システム理工学類

横 川 昌 史

菅 久

山 下 由 美

兼 子 伸 吾

Growth situation and genetic diversity of *Cypripedium japonicum* Thunb. found in Osaka Prefecture. Masashi Yokogawa* (*Osaka Museum of Natural History*), Hisashi Suga (*Resident in Kawanishi-shi, Hyogo Prefecture*), Yumi Yamashita (*Fukushima University School of Symbiotic Systems Science and Technology*) and Shingo Kaneko (*Fukushima University, Faculty of Symbiotic Systems Science and Technology*)

We discovered a cluster of *Cypripedium japonicum* Thunb. that had not been recorded after 1987 in Osaka Prefecture. The habitat is in a sloping *Cryptomeria japonica* plantation, and 130 shoots, 32 flowering and 98 non-flowering, were grown there. The genotypes of flowering plants were determined using microsatellite markers and it revealed that at least three genets existed in this habitat. Because of the small number of genets in spite of the number of flowering shoots, it was considered that this population has been maintained mainly by vegetative propagation with rhizomes. Since 1987, no specimens of *C. japonicum* from Osaka Prefecture have been collected, and there is no information about the growth of this species in recent floristic literature. Therefore, the discovery of this species is considered important for biodiversity conservation and floristics in Osaka Prefecture.

Keywords: Conservation, Local floristics, Microsatellite markers, Orchid, Specimen information

要旨: 大阪府内で 1987 年以来記録がなかったクマガイソウを発見した。生育地は傾斜のあるスギ植林地で、開花 32 シュート、非開花 98 シュートの計 130 シュートが生育していた。マイクロサテライトマーカーを用いて開花シュートの遺伝子型を決定したところ、この生育地には少なくとも 3 つのジェネットが存在することが明らかになった。開花シュート数に対してジェネット数が少ないことから、この生育地では主に地下茎による栄養繁殖で個体群が維持されていると考えられた。1987 年以降、大阪府産のクマガイソウの標本は採集されておらず、植物目録などの文献にも情報が出てこない。そのため、今回の生育地の発見は大阪府の生物多様性保全と植物相研究にとって重要なものになるだろう。

キーワード: 保全、地域植物誌、マイクロサテライトマーカー、ラン、標本情報

はじめに

クマガイソウ *Cypripedium japonicum* Thunb. は、北海道西南部から九州、朝鮮半島、中国東部に分

布するラン科の多年草である（遊川，2015）。日本国内において広く分布するものの、園芸採取や森林伐採、自然遷移などの影響により個体数が減少しており、環境省のレッドデータブック 2014

では絶滅危惧Ⅱ類に指定されている（環境省、2015）。このような状況を受けて、各地でクマガイソウの保全が進められているが、個体群によって生育状況や保全活動の状況は大きく異なっている（山下ほか、2017）。

クマガイソウは大阪府レッドリスト2014では絶滅危惧Ⅰ類に指定されている（大阪生物多様性保全ネットワーク、2014）。大阪府のレッドリストでのクマガイソウのランクは、環境省のランクよりも高く、大阪府では特に地域絶滅のリスクが高いと考えられる。2017年4月、著者の一人、菅が大阪府某所でクマガイソウの生育を確認した（図1）。新たに見つかったクマガイソウの生育地の保全を進める上で、ジェネットを識別することは重要だと考えられる。しかしながら、クマガイソウは地下茎で増えるため（岩瀬・小幡、1980）、外部形態の観察から遺伝的な同一クローンであるジェネットを識別するのは難しい。本報告では、1. 新たに見つかったクマガイソウの生育地の生育状況の評価、2. マイクロサテライトマーカーを用いた開花ジェネット数の評価、3. 大阪府のクマガイソウの過去の生育記録の整理を行い、今後の保全についての方針を検討する。

方法

野外調査

2017年5月20日、新たに見つかったクマガイソウの生育地において、生育シュート数の調査を行った。生育地は傾斜のあるスギ植林の林床で、大まかに分けて二カ所に分布していた。大まかな二カ所の位置は、ハンディGPS（GPSMAP 64SJ, GARMIN 社）を用いて緯度経度を記録し、それぞれの場所内でのシュートの位置関係については折れ尺などを用いて記録した。複数のシュートの葉が連続して分布している場合をパッチと定義し、パッチ内のシュートを数えた。1シュートだけ生えている場合は孤立シュートとして記録した。また、シュートを数える際に、花茎がついているシュートを開花シュート、花茎がついていないシュートを非開花シュートとして記録した。

マイクロサテライトマーカーを用いたジェネット数および遺伝的多様性の推定

2017年6月29日、生育地において、開花茎22本から葉片を採取し、実験室に持ち帰ったのち、分析まで冷凍保存した。DNeasy Plant Mini

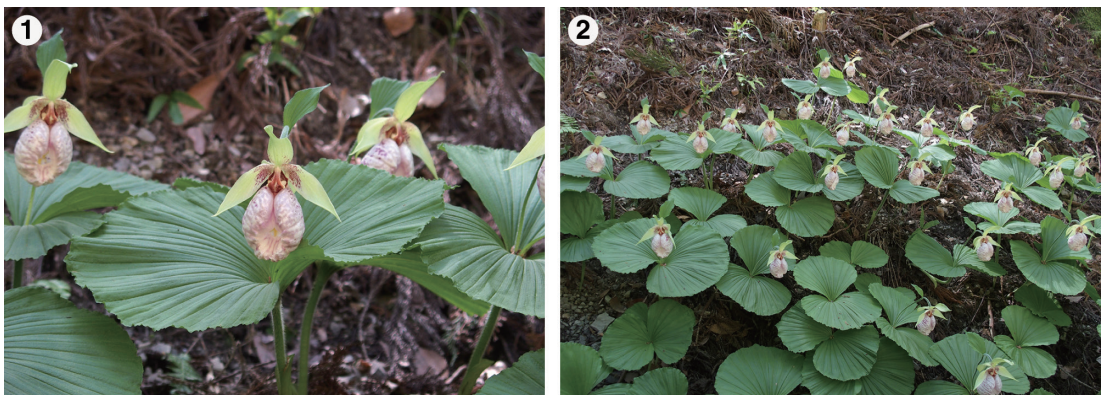


図1. ①大阪府で新たに見つかったクマガイソウ. ②クマガイソウが群生する様子. いずれの写真も図2のパッチAで2018年4月23日に撮影.

Kit (QIAGEN) を用いて、採取した葉から DNA を抽出し、TE バッファーで調整した。Yamashita et al. (2016) と同様の実験方法でクマガイソウのマイクロサテライト 14 遺伝子座 (Cypj 47, Cypj 60, Cypj061, Cypj62, Cypj 91, Cypj 94, Cypj 114, Cypj140, Cypj179, Cypj 180, Cypj 197, Cypj 202, Cypj226, Cypj233 ; Yamashita et al., 2016) の遺伝子型を決定した。

得られた遺伝子型データに基づき、遺伝子座ごとの対立遺伝子数 (A)、ヘテロ接合度の観察値 (H_o)、ヘテロ接合度の期待値 (H_e)、PI (Probability of Identify), PI_{Sibs} (Probability of Identity for Sibs.) を算出した。 PI_{Sibs} は血縁個体間での PI である。PI および PI_{Sibs} については Waits et al. (2001) や Peakall et al. (2005) に詳しい。これらのパラメータについてはすべて GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) を用いて計算した。すべての遺伝子座で同一の遺伝子型だったサンプルは同一ジェネットであると判断した。

文献および標本調査

大阪府下におけるクマガイソウの過去の生育記録を明らかにするため、大阪府の植物誌および植物目録 (田代・堀, 1938 ; 堀, 1962 ; 桑島, 1990) のクマガイソウに関する記述をチェックした。また、大阪市立自然史博物館の植物標本庫 (OSA) およびきしわだ自然資料館の植物標本庫のクマガイソウの標本を調査し、標本ラベルから採集地および採集年代の情報を記録した。加えて、2007 年から 2008 年にかけて日本の主要な植物標本庫 8 ヲ所 でクマガイソウの標本調査をした研究 (高橋, 2009) に、1961 年に大阪府で採集された標本記録が 1 例掲載されていたので、採集年代の分析にはこのデータも加えた。

結果

新たに見つかったクマガイソウの生育状況と遺伝的多様性

野外調査の結果、5 つのパッチと 2 つの孤立非開花シュートが見つかり (図 2)、全体で開花 32 シュート、非開花 98 シュートの計 130 シュートのクマガイソウが生育していた。パッチ A には開花シュート 20 本、非開花シュート 48 本、パッチ B には開花シュート 6 本、非開花シュート 30 本、パッチ C には開花シュート 6 本、非開花シュート 12 本、パッチ D, E, F にはそれぞれ非開花シュート 2 本が生育していた。

マイクロサテライトマーカーによる分析の結果

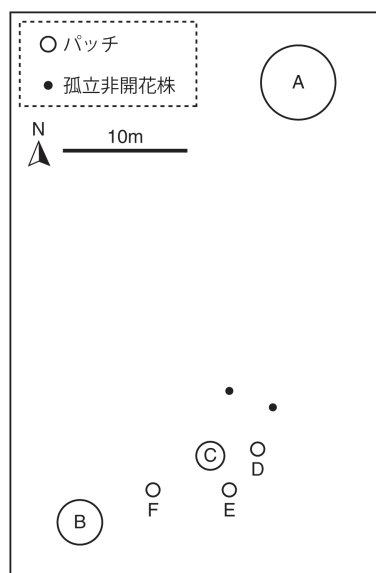


図 2. 調査地内のクマガイソウの分布図。図中の白丸の大きさはパッチ内のシュート数に比例する。2017 年 5 月 20 日の調査時点で、パッチ A には開花シュート 20 本、非開花シュート 48 本、パッチ B には開花シュート 6 本、非開花シュート 30 本、パッチ C には開花シュート 6 本、非開花シュート 12 本、パッチ D, E, F にはそれぞれ非開花シュート 2 本が生育していた。

表 1. 調査したクマガイソウの 14 遺伝子座における遺伝的変異. 分析したシュート数は 22 で, ジェネット数は 3 だった.

遺伝子座	A	H_o	H_E	PI	PI _{Sibs}
<i>Cypj047</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj060</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj061</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj062</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj091</i>	3	0.67	0.61	0.23	0.5
<i>Cypj094</i>	4	0.67	0.72	0.12	0.42
<i>Cypj114</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj140</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj179</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj180</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj197</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj202</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj226</i>	1	0	0	1	1
<i>Cypj233</i>	1	0	0	1	1

Note: A = 対立遺伝子数; H_o = ヘテロ接合度の観察値; H_E = ヘテロ接合度の期待値; PI = Probability of Identity; PI_{Sibs} = Probability of Identity for Sibs.

果, 14 遺伝子座のうち, *Cypj091* と *Cypj094* で多型が見られたが, その他の 12 遺伝子座は単型であった (表 1). 各遺伝子座の PI の総積は 0.028, PI_{Sibs} の総積は 0.210 であった. パッチ A から 11 シュート, パッチ B から 6 シュート, パッチ C から 5 シュート, 合計 22 の開花シュートを分析したが, 見つかったジェネットは 3 つであった. これら 3 つのジェネットは, それぞれパッチ A, B, C に対応していた. すなわち, 分析した範囲では, それぞれのパッチは互いに異なる単一のジェネットで構成されていた.

大阪府のクマガイソウの過去の生育記録

OSA およびきしわだ自然資料館の植物標本庫において, 15 点の大阪府産のクマガイソウの標本を見出すことができた. これらに文献記録を加えたところ, 現在の大阪府の市町村区分において 7 つの市町村でクマガイソウの生育記録があることが明らかになった.

高橋 (2009) の図 3 を参考にして, クマガイソ

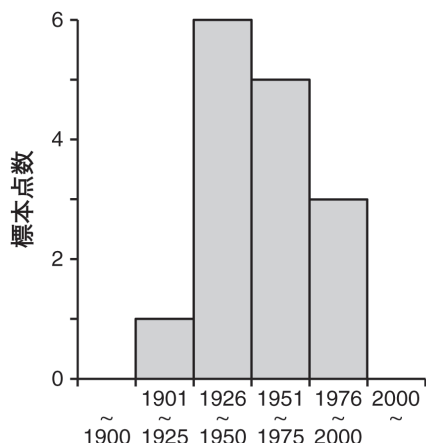


図 3. 大阪府産のクマガイソウの標本ラベルに基づく採集年代ごとの標本点数. 重複標本をのぞいた 14 点の標本ラベルのデータと, 高橋 (2009) の 1 点のデータを用いた.

ウの採集年代ごとの標本点数をグラフ化したところ, 1926 年から 1950 年に標本点数のピークがあった (図 3). 今回見出した大阪府産のクマガイソウの標本の中で, 最も古い標本は 1906 年に採られたもので, 最も新しい標本は 1987 年に採られたものであった.

考察

新たに見つかったクマガイソウ生育地の生育状況と遺伝的多様性

本調査地では, 130 シュートのクマガイソウが見つかり, うち 32 シュートが開花していた. 日本のクマガイソウの生育状況を整理した研究では, 100 個体以上の開花個体が見つかる個体群がある一方で, その多くは数個体から数十個体の開花個体しか残存していないのではないかと考察されている (山下ほか, 2017). 今回新たに見つかったクマガイソウの生育地も, これらの多くの小規模な個体群の一例と言えるだろう. また, クマガ

イソウは主にスギ植林地に生えることが多く（山下ほか, 2017）、今回見つかった生育地もこれらの例と同様、スギ植林地であった。スギ植林地ではスギの成長による林内照度の低下によってクマガイソウが衰退する可能性が示唆されている（岩瀬・小幡, 1978）。そのため、スギ植林地での報告例が多いことを根拠に、本調査地がクマガイソウにとって良好な生育環境かどうかを判断することはできない。

本調査地のクマガイソウの開花率は0.246であった。鳥取県のクマガイソウの自生地での開花率のモニタリングの結果は、シュート数の多いスギ人工林の個体群で0.632（4年間の平均値）、スギ林縁の個体群で0.181（4年間の平均値）、スギ人工林の個体群で0.268（3年間の平均値）であった（永松, 2011）。また、千葉県のクマガイソウの自生地では、竹林で0.295、常緑樹が混生する落葉樹林で0、落葉樹林で0.138、竹林で0という報告（岩瀬・小幡, 1979）やスギ人工林で0.348（岩瀬・小幡, 1978）という報告がある。これらの先行研究と比較すると、本調査地のクマガイソウの開花率は取り立てて低いというわけではなかった。

マイクロサテライトマーカーによる分析によって、本調査地の開花シュートは少なくとも3つのジェネットを含むことが明らかになった。これらのジェネットは生育地のシュート数の多いパッチにそれぞれ対応しており、パッチ内では地下茎によってシュートを増やしている可能性が高いと考えられる。PIは、ある集団において、同じ遺伝子型を持つ個体が任意交配によって生じる確率を意味し、分析したすべての遺伝子座のPIの総積は、分析したすべての遺伝子座で全く同じ遺伝子型を持つ別個体が任意交配により生じる確率を意味する。本研究のPIの総積は0.028、PI_{Sibs}の総積は0.210であり、マイクロサテライトマーカー

による個体識別を行った多くの先行研究（例えば、Brinkman et al., 2010 ; Costa et al., 2012）に比べてPIやPI_{Sibs}の値は大きい。また、クマガイソウは自家花粉を受粉させても高い結実率を示し（Suetsugu & Fukushima, 2013）、地下茎で殖える（岩瀬・小幡, 1980）ことから容易に同一ジェネット同士で交配することが予想される。その場合には親子あるいは兄弟を識別する必要が生じるので、より正確なジェネット識別にはより低いPI_{Sibs}が求められるだろう。そのため、今回の分析では識別できなかったジェネットがある可能性には注意が必要である。千葉県と北海道のクマガイソウのジェネットを識別した研究によると、千葉県の個体群では24サンプルから24のジェネットが、北海道では31のサンプルから19のジェネットが検出されている（Yamashita et al., 2016）。今回の大阪の生育地は、ジェネットの識別漏れがあるかもしれないことを考慮しても、ジェネットの数はいくつ少ないと考えられる。

遺伝的多様性について見てみると、千葉県と北海道のクマガイソウの個体群で多型のあったマイクロサテライトマーカー（Yamashita et al., 2016）のほとんどが本調査地では単型であった。ジェネットが少ないことも含めて、今回見つかったクマガイソウの生育地の遺伝的多様性は低いと考えられる。

大阪府のクマガイソウの過去の生育記録との比較

標本や文献に基づく過去のクマガイソウの記録を参照すると、本研究で新たに見出したクマガイソウの生育地と同じ市町村からの記録はあった（堀, 1962）が、市町村レベルより詳細な場所の情報は得られなかった。そのため、過去の記録と今回見つかったクマガイソウの生育地が同じ場所かどうかの判断はできない。

大阪府のクマガイソウの標本の採集年代（図

3) を見てみると 1926 年から 1950 年に標本点数のピークがあり、最近に近づくにつれて標本点数が減少していた。ピークの年代は異なるものの、全国規模のクマガイソウの標本採集状況からも同様の傾向が確認されている（高橋，2009）。このような傾向について高橋（2009）では、普通種のノビネチドリの標本採集点数は 1976 年以降において増えており、クマガイソウなどの絶滅危惧種と異なるパターンを示したことから、クマガイソウなどの絶滅危惧種の近年の標本数の減少は、1) 野外の個体数が減少した、2) 保護政策が整備され採集行為が減った、のどちらかが要因だろうと考察している。大阪府では最近のクマガイソウの生育地の情報はなく、2000 年以降に出版された大阪府内の地域植物目録（北河内自然愛好会，2004；近畿植物同好会，2005，2013）にもクマガイソウの記述はない。そのため、大阪府のほとんどの場所ではすでにクマガイソウは地域絶滅してしまった可能性が高い。そのため、今回のクマガイソウの発見は、植物相研究上も保全上もとても重要だと考えられる。

大阪府のクマガイソウの保全上の留意点

今回新たに見つかったクマガイソウの個体群のシュート数は決して多くなく、ジェネット数はかなり少ないと推測された。クマガイソウの個体群維持には、開葉期に明るい環境が必要で、低木層が少なく、草本層も適度に押さえられていることが必要とされる（岩瀬・小幡，1980）。クマガイソウの数を維持するには、シュート数のモニタリングをしながら、植林の間伐や低木の伐採などの管理が必要かもしれない。また、クマガイソウの主な減少要因として、園芸採取が挙げられる（環境省，2015）。特に現存する 3 つのジェネットを絶やさないう、生育環境の改善と盗掘の防止策が望まれるだろう。絶滅危惧植物の野生個体につ

いて個体識別可能なレベルで遺伝子型を決めておくことは盗掘などの抑止につながるため（志賀ほか，2013），今回得られた遺伝子型データは今後の保全管理にも役立つと考えられる。

本研究の調査地では、生育地からの消失などのリスクを分散させるため、地元の有志の手によって、近隣のスギ植林地林床へクマガイソウの移植が行われた。この移植の際には遺伝子型データは考慮されておらず、図 1 のパッチ A 以外の個体が移植の対象となった。生育地の遺伝的多様性を網羅的にリスク分散させるのであれば、今後はパッチ A からの移植も検討していく必要があるだろう。

絶滅危惧種などの産地情報の取り扱いに関する提言

クマガイソウのような盗掘による地域絶滅の可能性が高い植物については、生育地の秘匿が優先され、生育状況が公開されずに効果的な保全策を打ち出せない可能性が指摘されている（山下ほか，2017）。保全を進める上で生育状況の情報は必須であるが、広く公開すると盗掘等のリスクにさらされるというジレンマは多くの植物で起こっていると考えられる。本報告では、クマガイソウの盗掘等を未然に防ぐために詳細な産地情報を掲載しなかった。一方、大阪市立自然史博物館に寄贈したクマガイソウの標本のラベルには詳細な生育地の情報とともに、標本採集時の個体群サイズの情報や移植などの保全活動の情報を記すようにした。博物館などの公的な標本庫の標本は将来に渡って長く維持管理されるものであるが、標本庫の標本を閲覧するためには管理者の許可が必要であり、誰でもアクセスできるわけではない。また、サイエンス・ミュージアムネット（S-net : <http://science-net.kahaku.go.jp/> 2018.12 参照）などの標本のデータベースでは絶滅危惧種の産地情報について、詳細が公開されないようになっている（細

矢ほか, 2018)。広く公開される報文では, 生育状況や生態, 保全活動の詳細を報告し, 非公開にすべき情報については証拠標本とともに標本ラベルに記して残すという方法は有用ではないかと考える。論文中で標本番号とともに標本を引用することで, 報文と標本の情報の紐付けも可能であろう。一方で, 標本のラベル情報は完全な非公開ではないため, その取扱いには十分な注意が必要である。対象となる植物の種類や生育地の状況によっては標本ラベルにも詳細を書かずに情報管理を行う必要があるだろう。標本の寄贈者と標本庫の管理者には状況に応じた判断が求められる。

もちろん, 標本採集によって生育地に悪影響があっては本末転倒であるので, 採集には細心の注意が必要である。実際, 本研究では, 地元で保全活動を進める有志の立ち会いの元, クマガイソウの地上部のみを採集し, 生育地へのダメージを最小限に留める配慮を行ったことを付記しておく。

謝辞

生育地の地元自治会関係者の方々には調査の許可をとっていただくとともに, 野外調査に協力いただいた。また, きしわだ自然資料館の岡本素治館長には収蔵標本の写真を提供いただいた。これらの方々に厚くお礼申し上げる。

証拠標本

生育地保全の観点から, 採集年と標本庫の登録番号のみ記す。登録番号が付いていない標本については, 採集者名と採集者の標本番号を記した。

- ・本研究で新しく見出した大阪府産のクマガイソウ *Cypripedium japonicum* Thunb. 2018 (OSA300058)
- ・OSA に所蔵されている大阪府産のクマガイソウ

Cypripedium japonicum Thunb.

1906 (OSA204043) ; 1931 (OSA300072) ; 1935 (OSA300070) ; 1937 (OSA300069) ; 1937 (OSA300071) ; 1940 (OSA300074) ; 1947 (OSA300075) ; 1951 (OSA300073) ; 1956 (OSA186214) ; 1972 (OSA126121) ; 1981 (OSA204645) ; 1982 (OSA75316) ; 1987 (OSA60082) .

- ・きしわだ自然資料館の植物標本庫に所蔵されている大阪府産のクマガイソウ *Cypripedium japonicum* Thunb.

1934 (Nakajima 1999) ; 1957 (Nakajima 4484)

引用文献

- Brinkman T. J., D. K. Person, M. K. Schwartz, K. L. Pilgrim, K. E. Colson & K. J. Hundertmark. 2010. Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conservation Genetics Resources*, 2(1) : 115-118.
- Costa V., J. Pérez-González, P. Santos, P. Fernández-Llario, J. Carranza, A. Zsolnai, I. Anton, J. Buzgó, G. Varga, N. Monteiro & A. Beja-Pereira. 2012. Microsatellite markers for identification and parentage analysis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *BMC Research Notes*, 5 : 479.
- 堀 勝. 1962. 大阪府植物誌. 421pp. 大阪府植物誌刊行会, 大阪.
- 細矢 剛・神保宇嗣・中江雅典・海老原淳・水沼登志恵. 2018. 自然史標本データベース「サイエンス・ミュージアムネット」の現状と課題. デジタルアーカイブ学会誌, 2 (2) : 60 - 63.
- 岩瀬 徹・小幡和男. 1978. クマガイソウの生態の基礎調査 (その1). 「千葉県指定天然記念物成東町クマガイソウ調査報告書 I」(沼田 真

- ほか著), pp. 2 - 18. 千葉県教育委員会, 千葉.
- ・——. 1979. クマガイソウの生態の基礎調査 (その2). 「千葉県指定天然記念物成東町クマガイソウ調査報告書Ⅱ」(沼田 真著), pp. 2 - 26. 千葉県教育委員会, 千葉.
- ・——. 1980. クマガイソウの生態の基礎調査 (その3). 「千葉県指定天然記念物成東町クマガイソウ調査報告書Ⅲ」(沼田 真・岩瀬 徹・小幡和男著), pp. 2 - 37. 千葉県教育委員会, 千葉.
- 環境省. 2015. レッドデータブック 2014 - 日本の絶滅のおそれのある野生生物 - 8 植物 I (維管束植物). 646pp. ぎょうせい, 東京.
- 近畿植物同好会. 2005. 高槻市北部植物目録 西川一郎植物標本目録. 150pp. 近畿植物同好会, 大阪.
- . 2013. 清水千尋氏寄贈植物標本目録. 79pp. 近畿植物同好会, 大阪.
- 桑島正二. 1990. 大阪府植物目録. 197pp. 近畿植物同好会, 大阪.
- 北河内自然愛好会. 2004. 北河内植物目録. 101pp. 北河内自然愛好会, 大阪.
- 永松 大. 2011. 絶滅危惧種クマガイソウの鳥取県における自生状況. 山陰自然史研究, 6 : 9 - 15.
- 大阪生物多様性保全ネットワーク (編). 2014. 大阪府レッドリスト 2014. 47pp. 大阪府, 大阪.
- Peakall, R., D. Ebert, R. Cunningham & D. Lindenmayer. 2005. Mark-recapture by genetic tagging reveals restricted movements by bush rats (*Rattus fuscipes*) in a fragmented landscape. *Journal of Zoology*, 268(2) : 207-216.
- Peakall, R. & P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28 : 2537-2539.
- 志賀 隆・横川昌史・兼子伸吾・井鷲裕司. 2013. 全個体遺伝子型解析データに基づく絶滅危惧水生植物シモツケコウホネ *Nuphar submersa* とナガレコウホネ *N. × fluminalis* の市場流通株の種同定と産地特定. *保全生態学研究*, 18(1) : 33 - 44.
- 高橋英樹. 2009. 日本産アツモリソウ属 *Cypripedium* (ラン科) の地理分布パターン. 分類, 9 (2) : 143 - 157.
- 田代善太郎・堀 勝. 1938. 大阪府植物誌. 289pp. 大阪府池田師範学校, 大阪.
- Suetsugu, K. & S. Fukushima. 2014. Pollination biology of the endangered orchid *Cypripedium japonicum* in a fragmented forest of Japan. *Plant Species Biology*, 29(3) : 294-299.
- 山下由美・佐藤晃平・佐藤なつき・兼子伸吾. 2017. 日本における絶滅危惧植物クマガイソウ *Cypripedium japonicum* Thunb. (ラン科) の生育状況と葉緑体 DNA の遺伝的多様性. 分類, 17 (2) : 159 - 166.
- Yamashita, Y., A. Izuno, Y. Isagi, T. Kurosawa & S. Kaneko. 2016. Isolation and characterization of novel microsatellite loci for the endangered orchid *Cypripedium japonicum* (Orchidaceae). *Applications in Plant Sciences*, 4(2) : 1500097.
- 遊川知久. 2015. アツモリソウ属 *Cypripedium* L.. 「改訂新版 日本の野生植物 1」(大橋広好・門田裕一・邑田 仁・米倉浩司・木原 浩編). pp. 193 - 194, 平凡社, 東京.
- Waits, L. P., G. Luikart & P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10(1) : 249-256.