

## 平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		HOGETSU TAIZO					
① 研究代表者氏名		宝月 岱造		② 所属研究機関・部局・職		東京大学大学院・農学生命科学研究科・教授	
③ 研究課題名	和文	森林樹木種および外生菌根菌種の網羅的分子遺伝解析と分子生態データベースの構築					
	英文	Exhaustive molecular genetic analysis and molecular ecology database construction of tree and ectomycorrhizal fungal species.					
④ 研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		33,600	12,800	12,800	12,800	8,500	80,500
⑤ 研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
宝月 岱造	東京大学・農学生命科学研究科・教授	森林分子生態学		総括および温帯林・亜熱帯林樹木遺伝解析			
練 春蘭	東京大学・アジア生物資源環境研究センター・助教授	分子生態学		温帯林・亜熱帯林樹木遺伝解析			
後藤 晋	東京大学・農学生命科学研究科・講師	森林遺伝育種学		北方林樹木遺伝解析			
奈良 一秀	東京大学・アジア生物資源環境研究センター・助手	菌根生態学		菌根菌遺伝解析			
⑥ 当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>森林を構成する樹木や菌類の繁殖を比較的狭いスケールで考えると、それぞれの種は、固有な花粉散布機構、種子散布機構、胞子散布機構等の繁殖機構に基づいて、個体群を維持していると見ることができる。また広いスケールで考えると、それぞれの繁殖機構に基づいて、固有な遺伝地理的構造を形作っていることが予想される。本研究では、狭いスケールで見た樹木と外生菌根菌の繁殖の特徴と、広いスケールで見た樹木の遺伝地理的構造を、出来るだけ多数の種に関して網羅的に解析し、一種の分子生態データベースを構築する。具体的には、分布域や風媒虫媒の別をもとに網羅的に樹木種を選び、また、菌根菌種は、系統的位置や生息環境の別をもとに網羅的に選び、解析対象とする。これらについて、マイクロサテライト(SSR)多型解析を行い、花粉散布機構、種子散布機構、胞子散布機構を明らかにする。菌根菌に関しては、地下群集構造（種構成）の解析も合わせて行う。また、樹木種については、葉緑体DNAの多型解析により、より広いスケールでの遺伝分化状況も明らかにする。それにより、多数の樹種や菌種の繁殖機構と遺伝地理的構造とを明らかにし、データベースを構築する。</p> <p>本研究の遂行により、最終的には、気候温暖化による植生分布変化、森林の多様性維持、持続的森林管理を考える上で不可欠な、分子生態データベース構築への道が拓かれる。このデータベースは、将来の研究者にとっても、極めて意義深いものとなるはずである。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. 技術的進展

マーカーによる多型解析と平行して、マイクロサテライト(SSR)マーカー作製法の改良を検討した。その結果、従来の方法に比べ、極めて少ない時間と労力と費用でマーカーを作製できる方法を確立した(Lian et al., J. Plant Research in press)。この方法は、既に私たちが確立した dual-suppression-PCR 法を、複合マイクロサテライトを対象を限定することにより簡易化したもので、労力、時間、経費が従来のおよそ半分で済む。この方法により、本研究の主題の一つである、多数の樹木種および菌根菌種でのマーカー作製を、より迅速に行うことが可能になった。

2. 核マイクロサテライトマーカーの作製

以下の樹木および菌類について、SSR マーカーを作製した。

- ・ 樹木：①ヤエヤマヒルギ、②オヒルギ (Islam et al., Mol Ecol Notes, 2004、2006)、③メヒルギ (Islam et al., Mol Ecol Notes, in press)、④ツノヤブコウジ(Geng et al., submitted)、⑤ *Acanthus ilicifolius*、⑥ヒルギモドキ、⑦ヒルギダマシ (Geng et al., in preparation)、⑧カクレミノ (Lian et al., J Plant Res, Online-First)、⑨トドマツ、⑩エゾマツ (Lian et al., in preparation)、⑪イチョウ (Yan et al., Mol Ecol Notes, Online-First)、⑫ヤチダモ(Goto et al. in prep)、⑬ハルニレ (Goto et al. in preparation)。
- ・ 外生菌根菌：①ウラムラサキ (Wadud et al., Mol Ecol Notes, 2006)、②キツネタケ (Wadud et al., Mol Ecol Notes, Online-First)。

3. 葉緑体 SSR マーカーの作製

①ヤエヤマヒルギ、②オヒルギ、③メヒルギの三種の葉緑体 SSR マーカーを作製した。

4. 菌根菌の ITS 領域の配列解読

菌種同定に必要な外生菌根菌の ITS 領域配列を 195 種（一部重複を含む）解読し、DDBJ 登録した。また、富士山先駆草本種と共生するアーバスキュラー菌根菌の 28S リボソーム DNA 領域配列も約 80 タイプ解読した。

5. マイクロサテライト多型解析による繁殖機構の解明

上記のマーカーを用い、いくつかの樹木および菌根菌個体群で、個体群内レベル、個体群間レベルでの多型解析を行い、繁殖特性を解析した。主なものを以下にあげる。

(1)北方林樹木の繁殖特性

東京大学北海道演習林岩魚沢保存林のヤチダモ、トドマツ、カツラ、オニグルミなどの北方林樹木種の繁殖特性、花粉と種子の散布実態を調査した。その結果、核と葉緑体 SSR マーカーの多型解析により、稚樹が隣接する少数の母樹に由来すること、種子散布範囲が限定されていること等、トドマツの倒木更新特性が明らかになった。一方、カツラでは、花粉も種子も広範囲に散布されることが分かった (Sato et al. 2006. Heredity)。さらに、数理モデルを用いた雌雄異株性高木ヤチダモの花粉散布パターン研究も行った。(Goto et al. Molecular Ecology, in press)。

(2)マングローブ林樹木の繁殖特性

日本西表島のマングローブ林：西表島の流域毎のヤエヤマヒルギ、オヒルギおよびメヒルギ個体群について、核 SSR および葉緑体 SSR 多型解析を行った。その結果、程度の差はあれ、どの種でも個体群間に大きな遺伝的分化が検出された。このことから、各流域の個体群間では花粉散布および種子散布による遺伝子流動が少ないことが明らかになった。現在、マングローブ樹種の繁殖様式を明らかにするために、中国南沿岸域のマングローブ林も含めて、主要マングローブ樹種である、ツノヤブコウジ (*Aegiceras corniculatum*)、*Acanthus ilicifolius*、ヒルギモドキおよびヒルギダマシの集団遺伝的構造の解析を始めている。

(3)外生菌根菌の繁殖特性

富士山火山荒原で、二年間（2004 と 2005 年）に渡って、*Cenococcum geophilum* 菌根およびウラムラサキ子実体、キツネタケ子実体のジェネット解析を、SSR 多型マーカーを用いて行った。その結果、*C. geophilum* は菌核などの無性的な手段によって生息域を拡大していることが明らかになった。また、ウラムラサキとキツネタケは多数の小さなジェネットを形成していることから、二種はともに孢子による有性繁殖が生息域の拡大や集団の維持に重要なことが明らかになった。岩手県盛岡市近郊のアカマツ林内のマツタケについても、三年間にわたって DNA 多型解析を行った。その結果、シロの両側には多数の菌種が菌根を形成しているが、マツタケ菌根は全く存在しないこと、シロは、複数の松個体の根に菌根を形成しながら拡大すること、等が分かった。

6. ITS 塩基配列による菌類群集構造解析

上記富士山火山荒原およびアカマツ林では、共生菌のリボソーム DNA 領域の配列解読により菌種の同定を行い、群集構造の解析も行った。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

#### 1. 新たな SSR マーカーの作製方法の確立

SSR 多型解析の最大の困難は、対象種ごとに特異的な SSR マーカーを作製しなくてはならないことである。従来からマーカー作製には多大な労力、時間および費用がかかり、研究上の大きな障害となってきたが、様々な改良がなされた現在でも、基本的にその状況に変わりはない。こうした SSR マーカー作製の困難を解消すべく、既に私たちは、suppression-PCR を応用して、極めて簡便な SSR マーカー作製法を確立し、dual-suppression-PCR 法と名付けた。本研究では、dual-suppression-PCR 法を、複合 SSR に対象を限定することによりさらに簡易化し、労力、時間、経費が dual-suppression-PCR 法のおよそ半分で済むよう改良した (Lian et al., *Journal of Plant Research*, in press)。この方法により、本研究の主題の一つである、多数の樹木種および菌根菌種での SSR マーカー作製を、より簡易に、迅速に、安価に行うことが可能になった。この方法は、本研究にとどまらず、共優性多型マーカーを必要とする研究全てに貢献することが期待できる。

#### 2. 新たな花粉散布モデルの構築

従来の父性解析では、花粉散布のうち、相当の割合がプロット外からの長距離散布に由来することが示唆されていたが、プロット外の距離分布について情報を得ることができなかった。本研究課題では、ヤチダモを対象樹種として、プロット内の情報だけでなく、プロット外からの情報も含めて花粉散布全体の曲線を推定できる新たな花粉散布モデルを考案した (Goto et al. *Molecular Ecology*, in press)。本モデルはあらゆる植物種に適用可能であり、長距離花粉散布の実態把握に大きく貢献できると考えられる。また、本プロジェクトで解析する全ての樹種に同じモデルを適用することにより、樹木種の花粉散布の一般的な傾向を掴むことができると期待される。現在、構築したモデルのプログラム化に取り組んでおり、これが完成すれば長距離花粉散布の実態把握という命題に対して世界的な貢献が可能となる。

#### 3. 外生菌根菌塩基配列データベース

根に共生する菌根菌の同定には ITS 領域等の塩基配列情報が不可欠である。これまで日本の菌根菌の塩基配列情報はほとんど登録されていなかったが、私たちの研究によって飛躍的に DNA データベース上の登録情報が充実した。これは今後、我が国のみならず世界の菌根菌研究の基礎資料として欠かせないものとなるはずである。さらに、菌根菌での SSR マーカーの開発は我々のグループが先鞭を付け、今でも世界をリードしているが、開発した新たな SSR マーカーによる解析結果もまた、世界をリードするものであり、菌根菌の繁殖様式の解明に大きく貢献するはずである。

#### 4. 稚樹成立に於ける外生菌根菌共生木の実証

富士山火山荒原の植生遷移初期状態での、菌根菌群集構造および繁殖生態に関する成果自体、新規性が高く、これまでの菌根菌分野の知見を大きく前進させるもので、英国国際誌 *New Phytologist* の *Commentary* に二度取り上げられ、また発表後すぐに4件の国際学会に招待講演を依頼される等 (一件は日時の都合により受けなかった)、国際的にも高く評価されている。特に、既存の樹木に共生する菌根菌が新たに参入する実生の菌根菌感染を促進し実生定着を助けることが野外で証明された点は、今後の一次遷移研究におけるマイルストーンを築いたものと言っても良い。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

学術誌等に発表した論文

1. 宝月岱造(2004) 共生系としての森林。鈴木和夫編著「森林保護学」 pp.49-57
- ② 練春蘭・宝月岱造(2004) 効率的マイクロサテライト(SSR)マーカー作製のためのプロトコル。日本林学会誌 86:191-198 2004
3. Irino KO, Iba Y, Ishizuka S, Kenzo T, Ripot S, Kendawang JJ, Miyashita N, Nara K, Hogetsu T, Ninomiya I, Iwasaki K, Sakurai K (2004) Effects of controlled-release fertilizer on growth and ectomycorrhizal colonization of pot-grown seedlings of the dipterocarp *Dryobalanops lanceolata* in a tropical nursery. *Soil Science and Plant Nutrition* 50:747-753
4. Lian C, Oishi R, Miyashita N, Hogetsu T (2004) High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:836-841
5. Islam MS, Lian C, Kameyama N, Wu B, Hogetsu T (2004) Development of microsatellite markers in *Rhizophora stylosa* using a dual-suppression-PCR technique. *Molecular Ecology Notes* 4:110-112
6. Nagai S, Lian C, Hamaguchi M, Matsuyama Y, Itakura S, Hogetsu T (2004) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes* 4:83-85
- ⑦ Nara K, Hogetsu T (2004) Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology* 85:1700-1707
8. Goto S., Miyahara F., Mori Y., Watanabe A (2004) Genetic assessment of orchard crops in Japanese Black Pine clonal seed orchard consisting of pinewood nematode-resistant clones. Proceeding of 2004 IUFRO Joint Conference Division 2, Forest Genetics and Tree breeding in the age of genomics: progress and future. 242-245.
9. 森口喜成・後藤 晋・高橋 誠 (2005) 分子マーカー情報に基づく採種園の遺伝的管理。日本林学会誌 87:161-169
10. Goto S, Watanabe A, Miyahara F, Mori Y (2005) Reproductive success of pollen derived from selected and non-selected sources and its impact on the performance of crops in a nematode-resistant Japanese black pine seed orchard. *Silvae Genetica* 54, 69-76
11. Goto S, Iwata H, Shibano S, Ohya K, Suzuki A, Ogawa H (2005) Fruit shape variation in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* characterized by elliptic Fourier descriptors and its effect on flight duration. *Ecological Research* 20, 733-738
12. Hogetsu T (2005) 富士山火山荒原における先駆植物の定着様式 「学際」 15:16-20
13. Watanabe A, Iwaisumi MG, Ubukata M, Kondo T, Lian C, Hogetsu T (2005) Isolation of microsatellite markers from *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. using a dual PCR technique. *Molecular Ecology Notes* 6:80-82
14. Shimizu M, Ishida A, Hogetsu T (2005) Root hydraulic conductivity and whole-plant water balance in tropical saplings following a shade-to-sun transfer. *Oecologia* 143:189-197
15. Tahara K, Norisada M, Hogetsu T, Kojima K (2005) Aluminum tolerance and aluminum-induced deposition of callose and lignin in the root tips of *Melaleuca* and *Eucalyptus* species. *Journal of Forest Research* 10:325-333
16. Saito Y, Lian C, Hogetsu T, Ide Y (2005) Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma* and inter-specific amplification in Japanese *Abies* species. *Molecular Ecology Notes* 5:234-235
17. 長井敏、鈴木雅巳、浜口昌巳、松山幸彦、板倉茂、練春蘭、島田宏、加賀新之助、山内洋幸、尊田佳子、西川哲也、金昌勲、宝月岱造(2005) 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* 個体群のマイクロサテライトマーカーによる多型解析 DNA多型13:130-134
18. Terui H, Lian CL, Saito Y, Ide Y (2006) Development of microsatellite markers in *Acer capillipes*. *Mol. Ecol. Notes*, 6, 77-79.
19. Sato T, Isagi Y, Sakio H, Osumi K, Goto S (2006) Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. *Heredity* 96, 79-84
20. Islam MS, Lian CL, Kameyama N, Wu B, Hogetsu T (2006) Development and characterization of microsatellite markers in a mangrove tree species *Bruguiera gymnorrhiza* (L.). *Mol. Ecol. Notes*, 6, 30-32.
21. Wadud MA, Lian CL, Nara K, Ishida TA, Hogetsu T (2006) Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystina*, by a dual-suppression-PCR technique. *Mol. Ecol. Notes*, 6:130-132.
22. Wadud MA, Lian C, Nara K, Hogetsu T (2006) Isolation and characterization of five microsatellite loci in an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Molecular Ecology Notes: in press*

- ⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

23. Islam MS, Lian CL, Geng QF, Tao JM, Hogetsu T (2006) Isolation and characterization of eight co-dominant compound microsatellite markers in a mangrove tree: *Kandelia candel* (L.)Druce. Molecular Ecology Notes Online-First
24. Lian CL, Wadud MA, Gueng QF, Shimatani k, Hogetsu T (2006) An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. Journal of Plant Research Online-First
25. Yan XF, Lian CL, Hogetsu T (2006) Development of microsatellite markers in ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) Molecular Ecology Notes Online-First
26. Nara K (2006) Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. New Phytologist 169: 169-178
27. Nara K (2006) Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. New Phytologist in press
28. Goto S, Shimatani K, Yoshimaru H, Takahashi Y (2006) Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species, *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. Molecular Ecology, in press.

国際会議、学会等における発表

1. Goto S, Miyahara F, Mori Y, Watanabe A (2004) Genetic Assessment of Orchard Crops in Japanese Black Pine Clonal Seed Orchard consisting of Pinewood Nematode-Resistant Clones. 2004 IUFRO Joint Conference Division 2 (Charleston, USA)
2. 後藤晋・渡辺敦史・宮原文彦・森康浩(2005) マツ材線虫病抵抗性採種園における花粉汚染が種苗の抵抗性と生産コストに及ぼす影響, 第116回日本林学会(札幌)
3. 練春蘭・後藤進・中川昌彦・宝月岱造(2005) 東京大学北海道演習林のトドマツ天然林における種子と花粉の散布様式。第116回日本林学会(札幌)
4. 奈良一秀(2005) 富士山火山荒原の樹種遷移に伴う外生菌根菌相の変化 第116回日本林学会大会(札幌)
5. 石田孝英、奈良一秀、宝月岱造(2005) 冷温帯林の主要8樹種による外生菌根菌相の比較 第116回日本林学会大会(札幌)
6. 呉炳雲・宝月岱造(東大院農)・磯部勝孝・石井龍一(2005) 胞子から見た富士山火山荒原におけるアーバスキュラー菌根菌の一次遷移。第116回日本林学会(札幌)
7. 前原忠・坂上大翼・練春蘭・寶月岱造(2005)マツノマダラカミキリの繁殖生態。第116回日本林学会(札幌)
8. 田中恵・奈良一秀(2006) アカマツ外生菌根圏バクテリアの群集構造 第117回日本森林学会大会(東京)
9. 奈良一秀・田中恵(2006) 外生菌根共生がアカマツの成長に及ぼす中長期的な影響 第117回日本森林学会大会(東京)
10. 井口亜希・太田誠一・大和政秀・奈良一秀・坂本正弘・Hardjono Arisman(2006) Acacia mangium のアーバスキュラー菌根菌感染に対して林齢および土壌特性が及ぼす影響 第117回日本森林学会大会(東京)
11. Geng Q, Lian CL, Wadud MA, Hogetsu T (2006) Compound microsatellite-anchored markers (CMA markers): A simple technique of codominant marker development. 第117回日本森林学会大会(東京)
12. Wadud M.A., Nara K, Lian CL, Ishida TA, Hogetsu T (2006) Reproduction patterns of two early-successional ectomycorrhizal fungi, *Laccaria amethystina* and *L. laccata*, in the volcanic desert on Mount Fuji. 第117回日本森林学会大会(東京)
13. 後藤晋(2006)プロット外からのジーンフローといかに向き合うかーモデルを用いたアプローチ。第117回日本森林学会大会(東京)
14. 鄭性喆・呉炳雲・松下範久・寶月岱造(2006)海岸林におけるニセアカシアの繁殖様式。第117回日本森林学会大会(東京)
15. 黒河内寛之・松下範久・呉炳雲・進藤克実・寶月岱造(2006)天竜川砂防堰堤堆砂地への樹木の定着過程。第117回日本森林学会大会(東京)

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

16. 近藤 那海子・呉 炳雲・松下 範久・宝月 岱造(2006)九十九里浜海岸クロマツ林における外生菌根菌群集構造。第 117 回日本森林学会大会(東京)
17. 白石彩水・松下範久・呉 炳雲・寶月岱造(2006)海岸林におけるニセアカシアを宿主とした根粒菌の多様性。第 117 回日本森林学会大会(東京)
18. 西森大輔・奈良一秀・寶月岱造(2006)アカマツと広葉樹根系が同所的に存在する場所における外生菌根菌群集の研究。第 117 回日本森林学会大会(東京)
19. 石田孝英・奈良一秀・寶月岱造(2006)実生の菌根形成における近傍成木の役割。第 117 回日本森林学会大会(東京)
20. 菊池研介・松下範久・宝月岱造(2006)アミタケの胞子接種により形成された菌根の遺伝子型と核相。第 117 回日本森林学会大会(東京)
21. 呉 炳雲・宝月岱造(2006)富士山火山荒原に進出した草本植物の定着を助けるアーバスキュラー菌根共生。第 117 回日本森林学会大会(東京)
22. Nara K (2006) Functional ecology of ectomycorrhizal symbiosis during early primary succession. The 5th International Conference on Mycorrhiza (Granada, Spain). (予定；招待講演)
23. Nara K (2006) Ectomycorrhizal symbioses and vegetation development in the primary successional volcanic desert on Mount Fuji. The 8th International Mycological Congress (Cairns, Australia). (予定；招待講演)
24. Nara K (2006) Ectomycorrhizal fungal networks facilitate plant succession. British Mycological Society Annual Conservation & Taxonomy Meeting in partnership with The Royal Botanic Gardens, Kew (London, UK). (予定；招待講演)