

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25年 5月17日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22405005

研究課題名（和文） マングローブ林の保全と再生に必要な遺伝的多様性の全球的解析

研究課題名（英文） Global genetic diversity analyses of mangrove trees toward conservation and restoration.

研究代表者

梶田 忠 (KAJITA TADASHI)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80301117

研究成果の概要（和文）：マングローブ林の保全と再生のための科学的基盤情報である遺伝的多様性を把握するために、現地調査と集団遺伝学的解析を行った。マングローブ林主要構成種6種群について広域サンプリングを実施し、15ヶ国から数千サンプル以上を収集した。これらについて統一的な遺伝マーカーを用いて遺伝解析を行ったところ、オヒルギでは、インド洋・太平洋のそれぞれの海域内で明瞭な遺伝構造が存在する等、遺伝的多様性保全の方策を検討するためのデータが得られた。

研究成果の概要（英文）：Extensive field works and population genetic analyses were performed aiming at understanding global genetic diversity of mangrove plants, which is fundamental information for genetic conservation of mangroves. Performing field works in 15 countries, more than three thousand samples were collected from six groups of major component tree species of mangroves. Population genetic analyses were performed for the samples using common genetic markers. Preliminary analysis revealed genetic structure of some target species. For *Bruguiera gymnorhiza*, distinct genetic structure even in the Indian Oceanic and Pacific regions was revealed, and this data can be used to plan further genetic conservation of the species

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：資源保全学

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：海外調査、マングローブ、保全遺伝学、系統地理、海流散布、種子散布、広域分布種、多国籍

1. 研究開始当初の背景

全世界の熱帯・亜熱帯の海岸域に広がるマングローブ林は極めて多岐にわたる生態的機能を有するため、代替不可能な貴重な生態系として知られている。しかし、近年、人間活動の影響によって急速に失われつつある。保全と再生のための活動が各国で始まっているが、科学的基盤情報である遺伝的多様性は、十分に把握されてはいない。広域的な研究が進展していない最大の原因は、分布域があまりにも広大なため、統一的なサンプリングが困難なせいであった。

2. 研究の目的

我々は、本研究の3年間で、1)アジア、アフリカ、中南米において現地調査を実施し、オオバヒルギ属をはじめとするマングローブ林の主要構成種のサンプルを採集し、2)これまでに蓄積した集団サンプルと合わせて、統一的なDNAマーカーを用いた遺伝的多様性解析に着手し、3)GISデータを用いて、遺伝的多様性の地理的分布パターンの形成に影響を与えた生態的要因の解析を行うことを目的とする研究を行った。

3. 研究の方法

1) 海外調査

対象としたマングローブ林主要構成種5群は

- a) *Rhizophora mucronata - stylosa*,
R. apiculata
- b) *Bruguiera gymnorrhiza - sexangula*
- c) *Xylocarpus granatum - mollucensis*
- d) *Sonneratia alba - caseolaris*
- e) *Acrostichum aureum - stipulacea*

である。上記のうち、1群に2種以上が含まれているものはそれぞれ姉妹種や近縁種であると考えられているものであり、遺伝構造を解析する上で、交雑の影響を検討することが必要とされる。これら5種群の分布域を広く網羅するように調査地点を策定し、現地協力機関や研究者の協力のもとに、海外調査を実施した。海外調査では、1集団からおおよそ30個体のサンプルを採集し、葉の断片をシリカゲルによって乾燥させた。また、同定の証拠となる標本を採集した。葉の断片は研究室に持ち帰って、DNAを抽出した。

2) 遺伝マーカーを用いた解析

遺伝マーカーとしては、地理的構造を把握しやすい葉緑体DNAのいくつかの遺伝子の遺伝子間領域やイントロンの塩基配列を、オートシーケンサーにより決定して用いた。葉緑体DNAの塩基配列決定には、多くの植物に有効なユニバーサルプライマーを用いた。また、集団間の遺伝的分化や遺伝子流動の把握には、核DNAのマикроサテライトマーカーを

用いた。マーカーの開発には、従来から使われている複合マイクロサテライトマーカーを用いた方法の他、次世代シーケンシングによる方法も用いた。

3) GISデータを用いた解析

これまでの遺伝構造の解析で、分布域内に明瞭な遺伝構造が見つかったアメリカハマボウ (*Hibiscus pernambucensis*) を対象に、標本データと、環境要因データから推定された種分布モデルと遺伝構造を把握する解析を行った

4. 研究成果

1) 海外調査

3年間の研究期間内に、以下の海外調査を実施した。2010年5月ベトナム、7月バヌアツ、11月インド、12月モザンビーク；2011年3月メキシコ、6月フィリピン、7月・マレーシア(サバ)、12月マレーシア(半島部)、12月・パラオ；2012年1月ミャンマー、2-3月シンガポール、2月セーシェル、7月スリランカ、9月メキシコ、12月マイクロネシア連邦；2013年2月ニューカレドニア、3月オーストラリア。

これらの現地調査と、これまでの科研費およびJSPS若手研究者招聘事業(H21, H23)で得られたサンプルを合わせることで、IWP域における複数種群の横断解析を行うのに十分な数のサンプルが得られた(表1)。

また、これらの現地調査を通して、マングローブの遺伝的多様性の全球的解析に関する共同研究体制を拡充した。特に、シンガポール国立大学のE. L. Webb博士と、メキシコ自治大学のNunez Farfan博士とは、緊密な共同研究体制を樹立することができた。

表1. 2012年度までに蓄積されたマングローブ主要構成種のサンプルの概数

属	種	サンプル数
<i>Rhizophora</i>	<i>mucronata</i> , <i>stylosa</i> , <i>apiculata</i>	42 集団 2,000 個体以上
<i>Bruguiera</i>	<i>gymnorhiza</i> , <i>sexangula</i>	51 集団 1,380 個体以上
<i>Sonneratia</i>	<i>alba</i> , <i>caseolaris</i>	28 集団 760 個体以上
<i>Xylocarpus</i>	<i>granatum</i> , <i>mollucensis</i>	28 集団 672 個体以上
<i>Acrostichum</i>	<i>aureum</i> , <i>speciosum</i>	26 集団 699 個体以上

2) 遺伝マーカーを用いた解析

2-1) マイクロサテライトマーカーの開発

複合マイクロサテライトマーカーを対象とする方法により、*Bruguiera gymnorrhiza* (雑誌論文⑤)、及び、*Sonneratia alba*、*Rhizophora mucronata* (雑誌論文②)のマイクロサテライトマーカーを開発した。

また、次世代シーケンサを用いた解析により、マングローブ植物 5 種のマーカーを開発し (表 2)、*Sonneratia alba* と *Rhizophora mucronata*、のマーカーについては、論文発表を行った (雑誌論文③、④)

表 2. 次世代シーケンシングによって開発されたマイクロサテライトマーカー

種名	リード数	候補マーカー数	
		総数	>10 repeats
<i>R. mucronata</i>	19,163	763	76
<i>B. sexangula</i>	13,024	580	78
<i>S. alba</i>	18,358	596	59
<i>X. granatum</i>	43,576	860	61
<i>A. aureurum</i>	81,415	1,716	d145

2-2) *Bruguiera gymnorrhiza* の遺伝構造の解析
 葉緑体マーカーと核マーカーを用いて *Bruguiera gymnorrhiza* (オヒルギ) とその近縁種である *B. sexangula* の遺伝構造を明らかにした。*B. gymnorrhiza* は、東アフリカから南太平洋に至る広い分布域を持っており、このような分布域は、オヒルギの胎生種子が海流で長距離散布されることで、獲得・維持されてきたと考えられていた。先行研究の結果、マレー半島を境に東西に分化した遺伝構造と、東西それぞれの海域内で遺伝的組成が均一であることが報告されていたが、使われた集団は全分布域の約半分であり、解析に用いられた遺伝子領域も短く、地理的構造を十分に検出していない可能性があった。さらに、オヒルギとの雑種形成が報告されている *B. sexangula* を用いておらず、これら 2 種の交雑の影響が考慮されていなかった。そこで、両種の遺伝子組成の違いを明らかにすることと、オヒルギの分布域全体における遺伝構造を明らかにすることを目的として、分布域全体を網羅するようなサンプルと、葉緑体 2 マーカーと核のマイクロサテライトマーカー 8 マーカーを用いて研究を行った。

その結果、*B. gymnorrhiza* と *B. sexangula* の両種は葉緑体と核どちらのマーカーでも区別できた。しかし一部の混生集団で両種の交雑が見られた。*B. sexangula* を除いてオヒルギのみで解析を行った結果、マレー半島を境とした遺伝構造に加え、インド洋と太平洋それぞれの海域内で明瞭な地理的構造が存在することが、葉緑体と核いずれのマーカーでも確かめられた (図 1、2)。また、地理的距離と遺伝的距離の相関を確かめたところ、どちらの海域でも有意な相関が見られた。

これらの結果から、インド洋と太平洋それぞれの海域内には、明瞭な地理的な障壁は無いが、オヒルギの胎生種子の散布距離には制限があり、そのことが遺伝構造を維持しているということが示唆された。

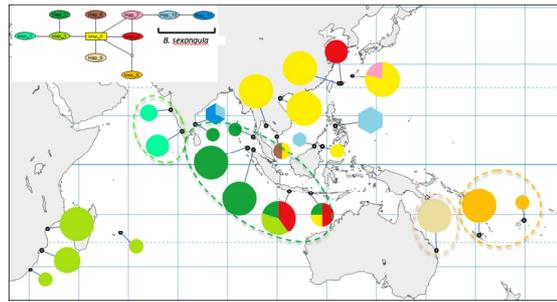


図 1. IWP 域における *Bruguiera* 属の葉緑体ハプロタイプの地理的分布。囲みの中はハプロタイプネットワーク。地図上の円グラフは *B. gymnorrhiza* のハプロタイプ、六角形は *B. sexangula* のハプロタイプを示す。

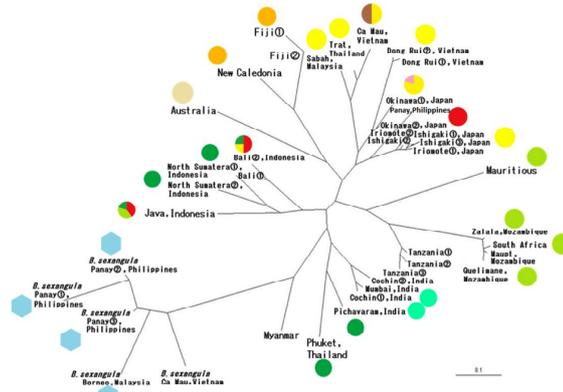


図 2. マイクロサテライトマーカーを用いて算出した *Bruguiera* 属の集団間の遺伝距離に基づく NJ tree と、葉緑体ハプロタイプの対応。集団が地域ごとにクラスターを作っていることが分かる。円グラフは図 1 と対応。

2-3) *Xylocarpus granatum* の遺伝構造

葉緑体遺伝子の複数領域の塩基配列を用いて、*Xylocarpus granatum* (和名: ホウガンヒルギ) の遺伝構造を明らかにした。ホウガンヒルギは、アフリカ東部から東南アジアを経てオセアニア地域に至るインド洋・西太平洋地域 (Indo-West Pacific: IWP) 全体に分布するマングローブ植物で前項のオヒルギとともに、IWP 地域のマングローブ植物の中では最も広い分布域を持つ植物の一つである。また、近縁種で同じくマングローブ植物の *X. mollucensis* は東南アジアからオセアニア地域にかけてホウガンヒルギと分布域が広く重複している。両種は成木の幹や果実などの外部形態によって区別されるが、遺伝的な違いは明らかにされていない。分布が重複する近縁種が交雑を行う場合、地理的構造の解析に影響が出るため、本研究では *X. mollucensis* も解析に加え、両種の遺伝的差異を明らかにすることも目的とした。モザンビーク、マレーシア、バヌアツなど 10 か国 15 集団から合計 459 個体を採集し、葉のサンプルから DNA の抽出を行った。各集団から 2~10 個体を用い、葉緑体 DNA の遺伝子間領

域 trnD-trnT, trnL-trnF, accD-psaI (全長 1702bp) を PCR で増幅し、シーケンサーによって塩基配列を決定した。3 領域の配列データをつなげて最節約系統樹を作成したところ、大きく 2 つのクレードが認識され、それぞれ *X. granatum* と *X. mollucensis* に対応した。すなわち、両種は葉緑体 DNA を用いて遺伝子レベルで区別できることが示された (図 3)。また、得られた 9 つのハプロタイプの分布を地図上に表すと、2 つのハプロタイプはマレー半島域の東西両側に分布し、そのうち 1 つは東アフリカからフィリピンまでの広い範囲に分布していた (図 4)。この結果は、*X. granatum* では、マレー半島域が遺伝子流動を妨げる明瞭な障壁になっていないことを示唆している。

本研究の結果示された、マレー半島域が上記の *B. gymnorhiza* では明瞭な地理的障壁になっている一方で、*X. granatum* で地理的障壁となっていないことは、非常に興味深い発見である。このことは、おそらく、両種の持つ散布能力の違いや、種内の葉緑体ハプロタイプの歴史の深さによって生じたと考えられる。

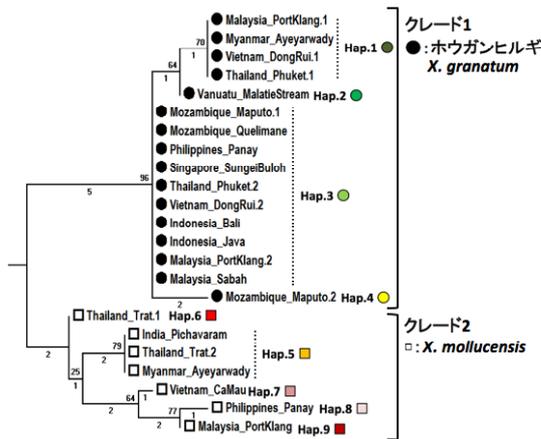


図 3. 葉緑体遺伝子の 3 領域を用いて作成した、*X. granatum* と *X. mollucensis* の系統樹。両種は葉緑体 DNA で明瞭に区別できることが示されている。

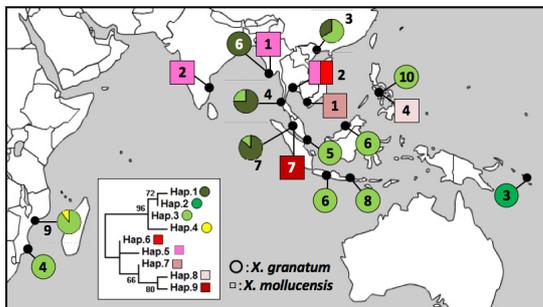


図 4. *X. granatum* と *X. mollucensis* の葉緑体ハプロタイプの地理的分布。マレー半島域を境界とする明瞭な地理的構造は見られない。

3) GIS データを用いた解析

アメリカハマボウ (*Hibiscus pernambucensis*) は南北アメリカ大陸の沿岸部に広く分布するバックマングローブ植物であり、海流によって種子を散布することで、広い分布域を維持していると考えられてきた。アメリカ大陸におけるこの種の遺伝構造は Takayama ら (2008) によって、6 つのマイクロサテライトマーカーを使って研究され、その結果、ブラジル南部の集団のみが遺伝的に分化していることが示された。ブラジル南部の集団とそれより北の集団の間には、明瞭な地理的構造は存在しないにもかかわらず遺伝的分化が見られた原因として、Takayama ら (2008) は、南赤道海流が種子散布を妨げたと考察している。しかし、集団間の生態的・環境的な違いについては考慮されていなかった。そこで、研究対象種の標本分布データ (GIS データ) と気候等の環境要因データから、当該種の分布確率を計算することにより、潜在的な分布域を推定する Species Distribution Modeling の手法を用いて、アメリカハマボウの北集団と南集団に、生態的分化があるかどうかを検証し、アメリカハマボウ遺伝構造の成立過程について議論することを目的とした。オンラインのデータベース 4 つと論文 18 編から、北集団で 225 地点、南集団で 49 地点の presence data を取得した。環境データは、WorldClim から取得したものから、空間解像度 30 秒 (約 1km²) の、標高、Bio2 (気温変化の範囲の平均)、Bio3 (等温性 (月内気温範囲/年間気温範囲))、Bio5 (月気温の最大値)、Bio7 (年間の気温の範囲)、Bio10 (暖かい 3 か月の平均気温)、Bio13 (月降水量の最大値)、Bio15 (降水量の変動係数)、Bio17 (降水の少ない 3 か月の降水量)、Bio18 (暖かい 3 か月の降水量) の 10 変数を使用した。モデリングには最大エントロピー法に基づくプログラム、Maxent を用いた。解析の結果、北集団の presence data から作ったモデル (North model) と南集団から作ったモデル (South model) は大きく異なった (図 5)。South model では、presence data 付近にしか分布が予測されなかったが、North model では、南集団の presence data 付近にも潜在的な生存適地が現れた。また、North model では、南集団と北集団の間に分布確率のギャップが示された。以上の結果から、Takayama ら (2008) が明らかにしたブラジル南部の集団は、それ以外の集団と生態的に分化している可能性が示唆された。一方、北集団の構成要素は潜在的には南集団に分布できることも示唆された。北集団が南集団の分布域まで進出していない要因としては、両地域間に存在する分布不適地の存在や、Takayama ら (2008) が指摘した海流の存在が示唆された。

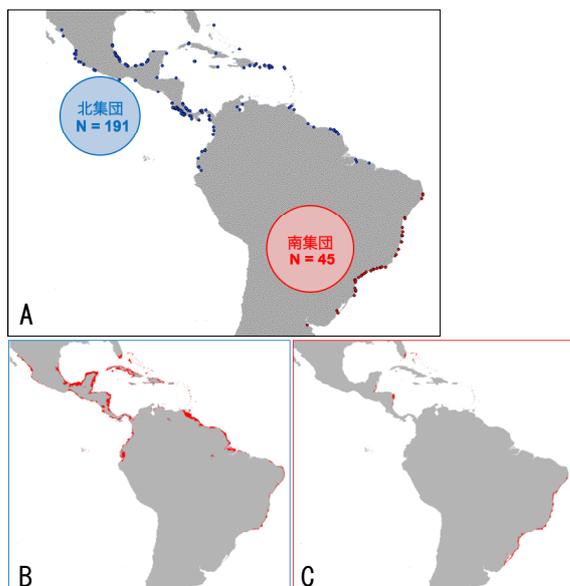


図5. アメリカハマボウの標本データと環境データから推定された潜在分布域。A: SDM 解析に用いられた北集団と南集団の分布地点。この2つの集団間には、遺伝的分化が見られる。B: North Model, C: South Model.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Takayama, K., M. Tamura, Y. Tateishi, E. Webb and T. Kajita. 2013. Strong genetic structure over the American continents and transoceanic dispersal in the mangrove genus *Rhizophora* (Rhizophoraceae), revealed by broad-scale nuclear and chloroplast DNA analysis. *American Journal of Botany*. 査読有り、(in press).
- ② Wee, AKS, K. Takayama, T. Kajita and EL Webb. 2013. Microsatellite loci for *Avicennia alba* (Avicenniaceae), *Sonneratia alba* (Lythraceae) and *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae). *Journal of Tropical Forest Science*. 査読有り、25(1): 1-8.
- ③ Shinmura Y, Wee AKS, Takayama K, Meenakshisundaram SH, Asakawa T, Onrizal, Adjie B, Ardli ER, Sungkaew S, Malekal NB, Tung NX, Salmo III SG, Yllano OB, Saleh MN, Soe KK, Oguri E, Murakami N, Watano Y, Baba S, Webb EL and Kajita T. 2012. Isolation and characterization of 14 microsatellite markers for *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) and their potential

use in range-wide population studies. *Conservation Genetics Resources*. 査読有り、4(4): 951-954.

- ④ Shinmura, Y., A. K. S. Wee, K. Takayama, T. Asakawa, O. B. Yllano, S. I. G. Salmo, E. R. Ardli, N. X. Tung, N. B. Malekal, Onrizal, S. H. Meenakshisundaram, S. Sungkaew, M. N. B. Saleh, B. Adjie, M. K. K. Soe, E. Oguri, N. Murakami, Y. Watano, S. Baba, E. L. Webb & T. Kajita. 2012. Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci in *Sonneratia alba* (Lythraceae) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*. 査読有り、4: 811-814.
- ⑤ Takayama, K., M. Tamura, J. Ono, Y. Tateishi, T. Kajita, 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci in the large-leafed mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. In Permanent genetic resource note, *Molecular Ecology Resources*. 査読有り、11: 219-222.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 小野潤哉・高山浩司・Meenakshisundaram S. H.・Wee A. K. S.・Saleh M. N.・Webb E. L.・朝川 毅守 1・Adjie B.・Ardli E. R.・Soe K. K.・Tung N. X.・Malekal N. B.・Onrizal・Yllano O. B.・Sungkaew S・Salmo III S. G.・綿野 泰行・馬場 繁幸・立石庸二・梶田忠. マングローブ植物オヒルギの分子系統地理学的解析. 2013 年 3 月 14-17 日. 日本植物分類学会第 12 回大会 (千葉大学・西千葉キャンパス, 日本).
- ② 小野潤哉, 高山浩司, A. K. S. Wee, S. H. Meenakshisundaram, M. N. Saleh, E. L. Webb, 朝川毅守, Bayu Adjie, E. R. Ardli, K. K. Soe, N. X. Tung, N. B. Malekal, Onrizal, O. B. Yllano, S. Sungkaew1, S. G. Salmo III, 綿野泰行, 馬場繁幸, 立石庸二, 梶田忠. マングローブ植物オヒルギの分子系統地理. 2012 年 9 月 17 日. 日本植物学会第 76 回大会 (姫路県立大学・姫路書写キャンパス, 日本).
- ③ Kajita, T., K. Takayama, T. Asakawa, S. G. Salmo III, B. Adjie, E. R. Ardli, M. K. K. Soe, M. N. B. Saleh, N. X. Tung, N. B. Malekal, Onrizal, O. B. Yllano, S. H. Meenakshisundaram, S. Sungkaew, W. K. Shan, Y. Watano and S. Baba. Formation of a research network for conservation of genetic diversity of mangroves: knowledge gaps, studies, and future directions. Meeting on Mangrove ecology, functioning and Management

- (MMM3). 2012年7月2日-6日. (Galle, Sri Lanka) .
- ④ Kajita, T., K. Takayama, M. Vatanarast, N. Wakita and Y. Tateishi. Comparison of population structures of widely distributed sea-dispersal plants with mangrove species. Meeting on Mangrove ecology, functioning and Management (MMM3). 2012年7月2日-6日. (Galle, Sri Lanka) .
- ⑤ Takayama, K., M. Tamura, Y. Tateishi and T. Kajita. Global phylogeography of Rhizophora species. Meeting on Mangrove ecology, functioning and Management (MMM3). 2012年7月2日-6日. (Galle, Sri Lanka) .
- ⑥ Ono, J., K. Takayama, S.H. Meenakshisundaram, W.K. Shan, M.N.B. Saleh, E.L. Webb, T. Asakawa, B. Adjie, E.R. Ardli, M.K.K. Soe, N.X. Tung, N.B. Malekal, Onrizal, O.B. Yllano, S. Sungkaew, S.G. Salmo III, Y. Watano, S. Baba, Y. Tateishi and T. Kajita. Phylogeography of Bruguiera gymnorrhiza. Meeting on Mangrove ecology, functioning and Management (MMM3). 2012年7月2日-6日. (Galle, Sri Lanka)
- ⑦ Yoshimi Shinmura. Development of SSR markers for Mangrove species: Next generation sequencer vs. Lian method. The 2nd International Workshop for Conservation Genetics of Mangroves. 2011年10月18日. ていりる那覇(沖縄県, 日本) .
- ⑧ 木内将史・高山浩司・梶田忠. Ecological Niche Modeling によって示唆されたアメリカハマボウ (*Hibiscus pernambucensis*) の北集団と南集団間の生態的分化. 日本植物学会第75回大会. 2011年9月19日. 東大駒場キャンパス(東京都, 日本) .
- ⑨ Kajita, T., K. Takayama, V. Mohammad, N. Wakita and Y. Tateishi. Phylogeographic pattern of pantropical plants with sea - drifted seeds over the globe. Evolution of Life on Pacific Islands and Reefs: Past, present, and future. 2011年5月28日. (Honolulu, Hawaii. USA) .
- ⑩ 高山浩司・梶田忠. 全球レベルの系統地理: 海に浮かんで地球一周. 第42回種生物学シンポジウム. 2010年12月11日. (京都大学, 日本) .
- ⑪ Tadashi Kajita. Global phylogeography of mangroves. The 2010 International Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation. 2010年7月

22日. (Bali, Indonesia)

- ⑫ 高山浩司. 汎熱帯海流散布植物の全球レベルの系統地理. 第121回日本森林学会. 2010年4月4日. (筑波大学, 日本) .

(他5件)

[図書] (計 1件)

- ① 梶田忠・高山浩司. 「汎熱帯海流散布植物と固有種」. 2011. 加藤雅啓・海老原淳編. 「日本の固有植物」p. 22-23所収. 東海大学出版. 梶田 忠. 東海大学出版.

[その他]

ホームページ等:

<http://bean.bio.chiba-u.jp/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 忠 (KAJITA TADASHI)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 80301117

(2) 研究分担者

立石 庸一 (TATEISHI YOICHI)

琉球大学・教育学部・教授
研究者番号: 80114544

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高山 浩司 (TAKAYAMA KOJI)

東京大学・総合研究博物館・特任助教
研究者番号: 60647478

Alison Wee Kim Shan

シンガポール国立大学・博士課程学生

新村芳美 (SHINMURA YOSHIMI)

千葉大学・大学院理学研究科・博士前期課程学生

小野潤哉 (ONO JUNYA)

千葉大学・大学院理学研究科・博士前期課程学生

富澤祐紀 (TOMIZAWA YUKI)

千葉大学・大学院理学研究科・博士前期課程学生