

E-1 熱帯環境林保全のための指標策定に関する研究

(3) 熱帯林内の構成樹種の遺伝的相関に関する研究

研究代表者 森林総合研究所生物機能開発部遺伝分析研究室 津村義彦

農林水産省林野庁森林総合研究所

生物機能開発部 遺伝分析研究室 津村義彦・吉村研介・宇治野徳子

集団遺伝研究室 吉丸博志

北海道支所 遺伝研究室 河原孝行

平成 8-10 年度合計予算額 26,175 千円

(平成 10 年度予算額 8,630 千円)

【要旨】 *Shorea curtisii* で開発した超多型 DNA マーカーであるマイクロサテライトマーカーを用いてマレー半島セマンゴック丘陵フタバガキ科林内にある *Shorea curtisii* の全個体の分析を行い、遺伝的多様性の調査を行った。またそれぞれのマイクロサテライトマーカーの多型性の程度も明らかにした。また *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーをフタバガキ科 10 属 30 種において使用可能かどうかの調査を行った。その結果、フタバガキ科ほとんどの種で *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーが使用できることが明らかになった。開発したマイクロサテライトマーカーでセマンゴックの *Shorea curtisii* の天然林及び択伐林でそれぞれで複数個体の他殖率の調査を行った。その結果、択伐の影響による外交配率の違いが観察された。

【キーワード】 フタバガキ科、 *Shorea curtisii*、マイクロサテライト、遺伝的多様性、自殖率

1. 序

熱帯林の保続的な保全のためにはそれらの遺伝的多様性を十分に守っていく必要がある。現在まで人為的攪乱のために多くの遺伝子の消失が起こっていることが想像される。今後は消失の程度が最小限にとどまるようにする保続的な林業を目指すべきである。また遺伝子資源保全もためにも十分な遺伝的多様性を保持した森林を対象に保存していかなければならない。そのためには林内の個体間の遺伝的関係、遺伝子流動の距離、交配様式等を把握しておく必要がある。現在までの研究では集団内及び集団間の遺伝的多様性がアイソザイム等を用いて主に研究されてきた。しかし、林内の個体間を調べる

にはアイソザイムでは不十分で、さらに超多型の遺伝マーカーを開発しなければならない。本研究では、現在、最も多型であると言われているマイクロサテライトマーカーを *Shorea curtisii* で開発し、天然林内で世代毎にどの程度遺伝的多様性が異なっているのかを目的に調査を行った。これらの知見を得ることにより、将来の遺伝資源の指標作りのための重要な情報となる。

2. 材料及び方法

(1) *Shorea curtisii* でのマイクロサテライトの開発

Shorea curtisii の全 DNA を *Eco*RI, *Eco*RV, *Xba*I 及び *Xho*I の制限酵素で消化後、約 500bp から 2500bp の DNA フラグメントを電気泳動後、ゲルから回収し pUC18 にクローニングを行ってゲノミックライブラリーを構築した。マイクロサテライトのスクリーニングを行うため以下の PCR を実行した。ゲノミックライブラリーの 10 ng DNA を鋳型にして以下のプライマーを用いて PCR を行った。primer 1; CCCAG TCAGC AGCTT GT or primer 3; GGAAA CAGCT ATGAC CATG (Nippon Gene Co.) と次の 12 種類のアンカープライマーの 1 つを用いた、(CT)₁₀A, (CT)₁₀T, (CT)₁₀G, (CT)₁₀CA, (CT)₁₀CG, (CT)₁₀CC, (CA)₁₀A, (CA)₁₀T, (CA)₁₀G, (CA)₁₀CT, (CA)₁₀CG, (CA)₁₀CC。また PCR 条件は以下のものを用いた、94°C で 3 分に続いて 94°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, の後 72°C で 30 秒を 34 サイクル行った。増幅 DNA フラグメントは 2% アガロースゲルで分離し、Suprec-02 columns (TAKARA Co) を用いて精製を行った。単離した DNA フラグメントは塩基配列を解読した。マイクロサテライトが含まれている DNA フラグメントについては PCR プライマーを、Oligo program (version 4.0; National Bioscience) を用いてデザインを行いプライマーを合成した。このプライマーとベクターに含まれる反対側のユニバーサルプライマーを用いて再度、PCR 増幅を行った。この増幅フラグメントも塩基配列の解読を行い、同様に PCR プライマーのデザインを行った。

デザインしたプライマーを用いて以下の条件で PCR を行った。10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM 各 dNTP, 0.128 μM 各プライマー, 12.5 ng の鋳型 DNA と 0.5 units の *Taq* ポリメラーゼ。94°C で 3 分に続いて 94°C で 45 秒, 52-56°C で 30 秒, の後 72°C で 45 秒を 35 サイクル行った後、72°C で 3 分を行った。これらは GeneAmp PCR System Model 9600 (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd) を用いて行った。

(2) *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーの他樹種への応用

Shorea curtisii で開発したマイクロサテライトマーカーをフタバガキ科 10 属 30 種に応用が可能かどうかの確認を行うため、開発したマイクロサテライトマーカー 5 個について 30 種の DNA を鋳型として PCR 増幅を試みた。PCR 条件は以下のもので行った。10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM 各 dNTP, 0.128 μM 各プラ

イマー、12.5 ng の鋳型 DNA と 0.5 units の *Taq* ポリメラーゼ。94°C で 3 分に続いて 94°C で 45 秒、50°C で 30 秒、の後 72°C で 45 秒を 35 サイクル行った後、72°C で 3 分を行った。これらは GeneAmp PCR System Model 9600 (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行った。また *Shc07* と *Shc11* については増幅 DNA 断片内にマイクロサテライトが含まれているかどうかを DNA シーケンスを行い確認した。

(3) *Shorea curtisii* の天然林の遺伝的多様性

マレー半島のセマンゴック丘陵林に設置されている天然林及び択伐林の調査地を対象とした（新山ら 1993、図-1、-2、-3）。この天然林は 6ha 及び択伐林 4ha の調査地で、胸高直径 5cm 以上の個体はすべて位置及び樹種の同定がなされている。天然林調査地の *Shorea curtisii* 84 個体及び胸高直径 5cm 以下の 132 個体及び当年生実生 58 個体から葉組織を採取し、全 DNA を抽出した。また択伐林でも母樹及び若木から葉組織を採取し全 DNA の抽出を行った。開発したマイクロサテライトマーカーのうち多型性の高い 4 遺伝子座を用いて全個体の解析を行い、それぞれの個体の遺伝子型の決定を行った。PCR は全量 20 μ L で、12.5 ng の鋳型 DNA を用いて行った。アニーリング温度はプライマーごとに調整し 52~56°C を用いた。PCR は以下の条件で行った、10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM each dNTP, 0.128 μ M の各プライマー、12.5 ng の鋳型 DNA, 及び 0.5 units の *Taq* ポリメラーゼ。94°C で 3 分に続いて 94°C で 45 秒、50°C で 30 秒、の後 72°C で 45 秒を 35 サイクル行った後、72°C で 3 分を行った。これらは GeneAmp PCR System Model 9600 (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行った。増幅した DNA フラグメントの解析は ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行い、それぞれのフラグメントサイズは GeneScan program (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて決定した（図-4）。また全遺伝子型データから遺伝的多様性及び遺伝子流動等の集団遺伝学的パラメーターの算出を行った。

(4) 98 年にこの付近の森林が一斉開花したため、天然林及び択伐林の *S. curtisii* の母樹から直接種子を採取した。天然林では 9 母樹、択伐林では 5 母樹から各 30 粒以上の種子を直接採取した。これらの種子から DNA を抽出し、天然林及び択伐林の各母樹の交配様式を調査した。母樹及び種子から抽出した DNA を鋳型に 3 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を調査した。各マイクロサテライトマーカーの PCR は以下の条件で行った。10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM each dNTP, 0.128 μ M の各プライマー、12.5 ng の鋳型 DNA, 及び 0.5 units の *Taq* ポリメラーゼ。94°C で 3 分に続いて 94°C で 45 秒、52~56°C で 30 秒、の後 72°C で 45 秒を 35 サイクル行った後、72°C で 3 分を行った。これらは GeneAmp PCR System Model 9600 (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行った。増幅した DNA フラグメントの解析は ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行い、それぞれのフラグメントサイズは GeneScan program (Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて決定した。自殖率の推定は超多型の

マイクロサテライト DNA マーカーを用いているので直接推定法を用いた。またこれらの種子群の多様性の違い（検出された対立遺伝子の数、ヘテロ接合体率）についても調査を行った。

3. 結果及び考察

(1) *Shorea curtisii* でのマイクロサテライトの開発

104 のクローンから最終的に 20 個が単離できた。これらをシーケンス解析し、最終的に合計で 10 個のマイクロサテライトの開発に成功した（表-1）。これらは *SHO3*、*SHO4*、*SHO8* の様に純粋なマイクロサテライトだけではなく、幾つかの繰返し配列がつながっているいわゆるコンパウンド状のものも多く検出された。従来法（コロニーハイブリダイゼーション法）での開発も試みたが 6000 クローンをスクリーニングしたがわずか 1 つのマイクロサテライトしか単離することができなかった。そのためアンカープライマー法で開発をおこなったところ、効率的にマイクロサテライトの単離ができた。一般的にマイクロサテライトの開発は種によって大きな難易があるため、比較的難しい種についてはアンカープライマー法はかなり有効な手段であるといえる。しかしながら開発の際の実験ステップが多いことから、ある程度の技術の習熟が必要である。

今回、対象とした繰返し配列は (CT)_n と (CA)_n であったが、単純な繰返し配列だけではなく他の配列を含んだものも単離された。これは開発の際の PCR 条件を変えるとによりコンパウンドな配列を含むものも単離されやすくなると考えられる。次に開発されたマイクロサテライトマーカーの多型性の調査を行った。その結果、単型なものも含まれていたが 6 つのマイクロサテライトマーカーはヘテロ接合体率が 0.500 を越えるもので高い多型性を示した。その中でも Shc01, Shc04, Shc07, Shc09 は特に高い多型性を示し、これらのヘテロ接合体率は 0.800 を越えていた（表-2）。

(2) *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーの他樹種への応用

PCR 条件を比較的緩い状態で試みたところ、*Shorea*, *Hopea*, *Parashorea*, *Neobalanocarpus* などの比較的近縁な属では *S. curtisii* で開発したほとんどのマイクロサテライトが使用可能であることが明らかとなった（表-4）。また基本染色体数の異なる *Vatica*, *Anisoptera*, *Upuna*, *Dipterocarps* でも半数以上のマイクロサテライトが使用できることが明らかとなった。また PCR 増幅が確認された Shc07 と Shc11 については DNA フラグメントのシーケンス解析を行った。これはこれらの DNA フラグメントの中にマイクロサテライトが含まれているかどうかの確認のために行ったもので、すべての種でマイクロサテライトが確認された。また含まれているマイクロサテライトと種の系統とに関係があるのかも合わせて調査した。その結果、基本染色体 $n=7$ 及び $n=11$ では何らかの関係があるように見えるが、その傾向は明瞭ではなかった。

これにより *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーはフタバガキ科全

体でほぼ使用できることが明らかになった。ある種で開発されたマイクロサテライトマーカーは近縁の種で使用できることが他の種でも報告があるため、近縁種では応用を試みるべきであろう。ただし、各樹種での多型性の程度については集団サンプルを用いて確認する必要がある。

(3) 天然林及び択伐林での *Shorea curtisii* の遺伝的多様性

開発したマイクロサテライトマーカー8 遺伝子の多型性の評価をするために、セマンガック丘陵林の *Shorea curtisii* 40 個体を用いて調査を行った（図-1、2、3）。その結果、Shc01, 04, 07, 09 の4 遺伝子座では9 から 20 の対立遺伝子が検出され、それらのヘテロ接合体率は 80%以上であった（表-2、図-5、6）。また他の 4 遺伝子では検出された遺伝子座は 2-4 個でそれほど高い多型性は示さなかった。

開発したマイクロサテライトマーカーのうち多型性の高い 4 つの遺伝子座を用いてセマンガック丘陵地の天然林及び択伐林の *Shorea curtisii* の解析を行った。天然林の母樹（DBH>30cm）のヘテロ接合体率は 0.786 で、若木は 0.739 で実生は 0.663 であった。これは分析個体数による歪みも考えられるので、普遍推定値（unbiased H_e ）を求めてみるとこれら 3 段階の成長過程では有意な差は見られなかった。同様に有効な対立遺伝子数（ N_e ）でもほとんど差は見られなかった。また択伐林の母樹及び若木の unbiased H_e 及び N_e も顕著な差は検出されなかった。また択伐林と天然林との比較では母樹及び若木ともに天然林の方がわずかではあるが高い値を示している。しかしながら有意な差は見られなかった。このことから考えると、択伐による遺伝的な浸食は受けていないように見える。しかしながら用いている遺伝的多様性のパラメーターが適切でないことも十分に考えられる。

(4) また 98 年 8 月及び 9 月に採取した母樹別種子についても同様に 3 つのマイクロサテライト遺伝子座を対象に調査を行った。天然林では 10 母樹についてそれぞれ約 30 種子の解析を行った。その結果、検出された対立遺伝子数は母樹ごとにそれほど大きな違いは見られなかった（表-3）。また自殖率は母樹ごとにやや幅があり 0.0~38.7%で平均は 13.6%であった（表-5）。この平均の値はフタバガキ科植物でこれまでに公表されているものとそれほど大きな差はなかった。

また択伐林でも天然林と同様の調査を行った。その結果、自殖率は 21.2~85.7%と幅があり、その平均は 53.6%であった（表-6）。またこのとき検出された対立遺伝子は No.7 の母樹で特に少なく、そのためか自殖率も最も高い値を示した。天然林と択伐林の比較ではヘテロ接合体率（ H_e ）では大きな違いはなかった。これは次世代の多様性を見る指数としては適当でないかもしれない。なぜなら対立遺伝子が少なくなってもそれらの遺伝子頻度が均等に集団中に存在していれば H_e は恒に比較的高い値を示すためである。マイクロサテライトのような超多型の遺伝マーカーを使う場合は特に注意が必要かもしれない。また天然林と択伐林の自殖率には大きな違いが見られた（表-7）。これら

の違いは次世代を構成する集団の遺伝的な構造に大きく影響すると考えられる。すなわち本来他殖率が高い種であるため、自殖が多くなれば発芽率が低下し、一旦発芽した実生のいくらかはその後の成長があまり良くないことが予想される。このような状況が続けば、開花が起こっても択伐林での *S. curtisii* の健全な更新は望めないと考えられる。ここの森林は営林署の記録では 1988 年に材容積で 30% の強度で択抜率が行われている。すなわち熱帯の樹種では花粉媒介者の種類によって択抜の強度を幾つかの段階に変える必要があると考える。すなわち行動範囲の小さなアザミウマや甲虫類を花粉媒介者を持つ種類は択抜強度を弱くし、ハナバチ等の行動範囲の広い花粉媒介者を持つものについては現行の択抜強度でも、次世代の遺伝的な劣化は少ないかもしれない。このようなことから少なくとも主要林業樹種で択抜の対象となるものについては花粉媒介者を正確に把握する必要がある。

4. まとめ

本研究ではマレーシアの丘陵フタバガキ林に優占する *S. curtisii* を使って、マイクロサテライトマーカーを開発した。また開発したマイクロサテライトマーカーの多型性の調査を行い、マーカーの評価を行った (Tabl 1)。またセマンゴックの *Shorea curtisii* の森林では、世代間で見ると実生が保有する遺伝的多様性が成熟及び稚樹個体群に比べ相対的に小さいことが明らかとなった。また開発したマイクロサテライトマーカーがフタバガキ科全体の種にどれだけ汎用性があるかどうかの検討もあわせて行った。その結果、開発したほとんどのマイクロサテライトマーカーがほぼ全ての属に使えることが明らかとなった。また、遺伝的多様性の保全または森林の継続的な維持のためには各樹種の遺伝的多様性、花粉媒介者の種類、繁殖様式等の情報を十分に把握しておく必要がある。

5. 本研究によって得られた成果

- (1) 東南アジア熱帯林の主要樹種であるフタバガキ科の *Shorea curtisii* でマイクロサテライトマーカーの開発を行った。
- (2) このマーカーは林内の花粉の散布距離及び種子の飛散距離等を正確に測ることのできる DNA マーカーである。
- (3) *Shorea curtisii* で開発したこれらのマーカーはフタバガキ科ほぼ全体に利用できることが明らかとなった。これによりフタバガキ科全体で林内の遺伝的関係が詳細に調査できるようになった。
- (4) 天然林及び択伐林での *Shorea curtisii* の遺伝的多様性には大きな違いはなかった。これは用いた集団遺伝学的なパラメーターがこの種の研究には適当でないことも考えられる。

(5) 天然林及び択伐林での *Shorea curtisii* の各母樹の交配様式（自殖率）の調査を行った。その結果、平均値で天然林 13.6%、択伐林 53.6%であった。これらは花粉媒介者の行動と開花個体の密度と関連があった。

(6) これらの結果は遺伝的な多様性保全から考えると、今後の択伐の施行を行う上での重要な指標となり得る。

6. 参考文献

- Appanah, S. 1981. Pollination in Malaysian primary forests. *Malay. Forest.* 44:37-42.
- Appanah, S., and M. R. A. Manaf 1990. Smaller trees can fruit in logged dipterocarp forests. *J. Trop. For. Sci.* 3: 80-87
- Bawa, K. S. 1992. Mating system, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. *Biotropica* 24: 250-255.
- Chan, H. T. 1981. Reproductive biology of some Malaysian dipterocarps III. Breeding systems. *Malay. Forest.* 44: 28-36.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P. and Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, **371**, 215-220.
- Chase, M., Kesseli, M. R. and Bawa, K. S. 1996a. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Am. J. Bot.*, **83**, 51-57.
- Chase, M., Kesseli, M. R. and Bawa, K. S. 1996b. Distant gene flow in tropical trees. *Nature* **383**, 398-399
- Cifarelli, R. A., Gallitelli, M. and Cellini, F. 1995. Random amplified hybridization microsatellites(RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA Clones. *Nucleic Acid Research*, **23**, 3802-3803.
- Condit, R. and Hubbell, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, **34**, 66-71.
- Dayanandan, S., Bawa, K. S. and Kesseli, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *Am. J. Bot.*, **84**, 1658-1663.
- Dow, B. D., Ashley, M. V. and Howe, H. F. 1995. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor. Appl. Genet.*, **91**, 137-141.
- Echt, C. S., May-Marquardt, P., Hsieh, M. and Zahorchak, R. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, **39**, 1102-1108.
- Ellegren, H., Moore, S., Robinson, N., Byrne, K., Ward, W. AND Sheldon, B. C. 1997. Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat length at homologous loci in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 854-860.
- Goldstein, D. B. and Pollock, D. D. 1997. Launching microsatellites: A review of mutation

- processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.*, **88**, 335-342.
- Jarne, P. and Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellite, from molecules to populations and back. *Trends. Ecol. Evol.*, **11**, 424-429.
- Kajis, J. M. H., Fowler, J. C. S. and Thomas, M. R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis *Citrus* and related species. *Genome*, **38**, 349-355.
- Kajita, T., Kamiya, K., Nakamura, K., Wickneswari, R., Yoshimaru, H., Tsumura, Y., Tachida, H. and Yamazaki, T. 1998. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequence of *matK*, *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer region in chloroplast DNA. *Mol. Phyl. Evol.*, (in press).
- Karagyozyov, L., Kalcheva, I. D. and Chapman, V. M. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3911-3912.
- Kirkpatrick, B.W., Bradshaw, M., Barendse, W. and Dentine, M. R. 1995. Development of bovine microsatellite markers from a microsatellite-enriched library. *Mammalian Genome*, **6**, 526-528.
- Kostia, S., Varvio, S. L., Vakkai, P., and Pulkkinen, P. 1995. Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. *Genome*, **38**, 1224-1248.
- Kimura, M. and Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kitamura, K., M. Y. B. A. Rahman, Y. Ochiai and H. Yoshimaru 1994. Estimating of the outcrossing rate on *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. in primary and secondary forests in Brunei, Borneo, Southeast Asia. *Plant Species Biol.* 9: 37-41.
- Kaur, A., C. O. Ha, K. Jong, V. E. Sands, H. T. Chan, E. Soepadmo and P. S. Ashton 1978. Apomixis may be widespread among trees of the climax rain forest. *Nature* 271: 440-442.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., and Andersson, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1111-1115.
- Lench, N. J., Norris, A., Bailey, A., Booth, A. and Markham, A. F. 1996. Vectorette PCR isolation of microsatellite repeat sequence using anchored dinucleotide repeat primers. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 2190-2191.
- Levine, I., Cheng, H. H., Bacter, J. C. and Hillel, J. 1995. Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken specific primers. *Anim. Genet.*, **26**, 107-110
- Lyall, J. E. W., Brown, G. M., Furlong, R. A., Ferguson-Smith, M. A., and Affara, N. A. 1993. A method for creating chromosome-specific plasmid libraries enriched in clones containing [CA]_n microsatellite repeat sequences directly from flow-sorted chromosome.

Nucl. Acids Res., **21**, 4641-4642.

- Momose, K., T. Yumoto, T. Nagamitsu, M. Kato, H. Nagamasu, S. Sakai, R. D. Harrison, T. Itioka, A. A. Hamid and T. Inoue 1998. Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in Sarawak, Malaysia. I. Characteristics of the plant-pollinator community in a lowland dipterocarp forest. *Am. J. Bot.* 85: 1477-1501.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Matick, J. S., Georges, M. and Hetzel, D. J. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, **10**, 654-660.
- Murawski, D. A. and J. L. Hamrick 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity* 67: 167-174.
- Murawski, D. A. and J. L. Hamrick 1994. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. *Am. J. Bot.* 81: 155-160.
- Murawski, D. A. and J. L. Hamrick 1992. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. *Biotropica* 24: 99-101.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. pp.521, Columbia University Press, New York.
- 新山馨・Abd.Rahman Kassim・飯田滋生・木村勝彦・S.Appanah.1993.半島マレーシアで開始した丘陵フタバガキ林での熱帯林研究の紹介. 森林立地 35: 25-29.
- Ostrander, E. A., Jong, P. M., Rine, J., and Duyk, G. 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3419-3423.
- Sakai, S., K. Momose, T. Yumoto, M. Kato and T. Inoue 1999. Beetle pollination of *Shorea parvifolia* (section *Mutica*, Dipterocarpaceae) in Sarawak, Malaysia. *Am. J. Bot.* 86: 62-69.
- Schlotterer, C., Amos, B. and Tautz, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63-65.
- Smith, D. N. and Devey, M. E. 1994. Occurrence and inheritance of microsatellite in *Pinus radiata*. *Genome*, **37**, 977-983.
- Takahashi, H., Nirawasa, N. and Furukawa, T. 1996. An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequence. *Jpn. Poultry Sci.*, **33**, 292-299.
- Tsumura, Y., Kawahara, T., Wiekneswari, R. and Yoshimura, H. 1996. Molecular phylogeny of dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.*, **93**, 22-29.
- Ujino, T., T. Kawahara, Y. Tsumura, T. Nagamitsu, Wiekneswari R. and H. Yoshimaru (1998) Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea*

- curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81:422-428
- Ven, W. T. G Van De and Mcnicol, R. J. 1996. Microsatellites as DNA markers in Sitka spruce. *Theor Appl Genet* 93: 613-617.
- Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G. and Tanksley, S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 1-6.
- White, G. and Powell, W. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Mol. Ecol.*, 6, 851-860.
- Wu, K. and Tanksley, S. D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.*, 241, 225-235.

7. 国際共同研究等の状況

カウンターパート：マレーシア森林研究所、Wickneswari Ratnam (現 UKM)、Norwati Muhammad, Lee Soon Leong, Chai-Ting Lee

8. 研究発表の状況

(口頭発表)

河原孝行・津村義彦・宇治野徳子・勝木俊雄・田内裕之・新山馨・吉丸博志・Abdul Rahman Kassim・Norwati Muhammad・吉村研介・Wickneswar Ratnum (1997) 第44回日本生態学会要旨

宇治野徳子・河原孝行・津村義彦・吉丸博志 (1997) *Shorea curtisii* のマイクロサテライトマーカーの開発とその多型性。日本植物学会要旨

河原孝行・津村義彦・宇治野徳子・永光輝義・吉丸博志・新山馨・田内裕之・Norwati Muhammad・Wickneswari Ratnum・Chai-Ting Lee・Lee Soon Leon (1999) マレーシア丘陵フタバガキ林の *Shorea ciurtisii* における択伐が遺伝的多様性にもたらす影響。第46回日本生態学会要旨

大林恭子・陶山佳久・津村義彦・Lee Chai Ting・Lee Soon Leon・新山馨・田内裕之・宇治野徳子・鷺谷いづみ (1999) マイクロサテライトを用いた *Shorea curtisii* 天然林および択伐林における種子群の遺伝的多様性比較。第46回日本生態学会要旨

(論文発表)

○Ujino, T., T. Kawahara, Y. Tsumura, T. Nagamitsu, Wickneswari R. and H. Yoshimaru (1998) Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81:422-428

○Kajita, T., K. Kamiya, K. Nakamura, R. Wickneswari, H. Yoshimaru, Y. Tsumura, H. Tachida and T. Yamazaki (1998) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequence of matK, trnL intron and trnL-trnF intergenic spacer region

in chloroplast DNA. *Molecular Phylogenetic Evolution* (in press)

- Tsumura, Y., Kawahara, T., Wiekneswari, R. and Yoshimura, H. (1996). Molecular phylogeny of dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor Appl Genet* **93**: 22-29.

表-1 *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカの PCR プライマー及び PCR 条件

Locus	Repeat	PCR primer (5' to 3')	PCR product length	Annealing tempratre
<i>Shc01</i>	(CT) ₈ (CA) ₁₀ CT(CA) ₄ CTCA	GCTAT TGGCA AGGAT GTTCA CTTAT GAGAT CAAAT TGACA G	152	56
<i>Shc02</i>	(CT) ₂ CA(CT) ₅	CACGC TTTCC CAATC TG TCAAGA GCAGA ATCCA G	149	54
<i>Shc03</i>	(CT) ₈	TTGAA GGGAA GGCTA TG CTTCT CAACT ACCCT ACC	124	54
<i>Shc04</i>	(CT) ₁₆	ATGAG TAACA AGTGA TGAG TATTG ACGTG GAATC TG	95	52
<i>Shc07</i>	(CT) ₈ CA(CT) ₅ CACCC(CTCA) ₃ CT(CA) ₁₀	ATGTC CATGT TTGAG TG CATGG ACATA AGTGG AG	169	54
<i>Shc08</i>	(CT) ₁₆	GAGTC TGTGG TTGAT ATG TTCTA TGCAAG GGCTT TTAG	247	52
<i>Shc09</i>	(CT) ₁₂	TTTCT GTATC CGTGT GTTG GCGAT AAGCG GACCT CAG	197	54
<i>Shc11</i>	(CT) ₄ TT(CT) ₅	ATCTG TTCTT CTACA AGCC TTAGA ACTTG AGTCA GATAC	166	54
<i>Shc17</i>	(CT) ₅ AT(CT) ₄	CTAGA ATCCG CCATT TCC CACAA ATACG TCTCC ATATC	78	56

表-2 *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーの多型性

Locus	Core sequence*	Number of allele	Heterozygosity (H_e)
<i>Shc01</i>	(CT) _n (CA) _m CT(CA) _l CTCA	20	0.922
<i>Shc02</i>	(CT) ₂ CA(CT) _n GC(AT) ₂	2	0.180
<i>Shc03</i>	(CT) _n	3	0.591
<i>Shc04</i>	(CT) _n	12	0.844
<i>Shc07</i>	(CT) _n CA(CT) _m CACCC(CTCA) _l CT(CA) _k	11	0.810
<i>Shc09</i>	(CT) _n	9	0.818
<i>Shc11</i>	(CT) _m (A/T)T(CT) _n	4	0.640
<i>Shc17</i>	(CT) ₅ AT(CT) _n	2	0.304
Average		7.9	0.639

表-3 セマンゴック *Shorea curtisii* の天然林及び択伐林での遺伝的多様性

Population	n	H_e	unbiased H_e	N_a	N_e
Natural DBH>30cm	45	0.800	0.786	9.00	4.63
Natural sapling	171	0.739	0.782	11.50	4.59
Natural seedling	58	0.663	0.769	7.25	4.33
Logged DBH>30cm	10	0.850	0.779	6.00	4.52
Logged sapling	26	0.865	0.768	7.75	4.44

表-4 *Shorea curtisii* で開発したマイクロサテライトマーカーの他種への応用

Species	Locus				
	<i>Shc01</i>	<i>Shc04</i>	<i>Shc07</i>	<i>Shc09</i>	<i>Shc11</i>
<i>Anisoptera oblonga</i>	S	W	S	S	S
<i>Cotylelobium malayanum</i>	S	W	W	W	S
<i>Dipterocarpus baudii</i>	S	W	S	W	S
<i>Dipterocarpus kerrii</i>	S	W	M	W	S
<i>Dipterocarpus oblongifolius</i>	S	W	S	S	S
<i>Dryobalanops aromatica</i>	S	S	S	S	S
<i>Hopea apiculata</i>	S	S	W	S	S
<i>Hopea dyeri</i>	S	S	S	W	S
<i>Hopea helferi</i>	S	W	S	W	S
<i>Hopea latifolia</i>	M	W	S	S	S
<i>Hopea nervosa</i>	S	W	S	-	S
<i>Hopea odorata</i>	S	S	S	S	S
<i>Hopea sangal</i>	S	W	S	S	S
<i>Hopea subalata</i>	S	W	S	S	S
<i>Hopea wightiana</i>	S	S	S	S	S
<i>Neobalanocarpus heimii</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea atrinervosa</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea bracteolata</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea kunstleri</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea lepidota</i>	M	S	S	M	S
<i>Shorea macrophylla</i>	M	S	S	S	S
<i>Shorea macroptera</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea multiflora</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea ovalis</i>	M	S	S	S	S
<i>Shorea parvifolia</i>	S	S	S	S	S
<i>Shorea scaberrima</i>	M	S	M	S	S
<i>Shorea singkawang</i>	S	S	S	S	S
<i>Parashorea lucida</i>	S	-	S	S	S
<i>Vatica odorata</i>	S	W	S	S	S
<i>Upuna bornensis</i>	M	-	S	S	W

S, strong amplification; W, weak amplification; -, amplification failed; M, multiple bands amplified.

表-5 セマンゴック *Shorea curtisii* の天然林での各母樹の自殖率

Mother tree	No. of analyzed seeds	No of detected alleles				Inbreeding rate (%)
		<i>Shc 09</i>	<i>Shc 07</i>	<i>Shc 11</i>	Total	
WY846	35	8	9	5	22	28.6
WY358	33	7	8	4	19	6.7
WY427	35	5	7	4	16	12.5
WY786	34	6	8	4	18	0.0
WY6	16	7	7	4	18	6.3
WB506	35	5	9	5	19	14.7
WB843	35	7	8	4	19	6.7
A	35	6	9	4	19	8.6
B	34	7	8	4	19	38.7
WY956	34	7	10	5	22	7.1
Average	32.6	6.5	8.3	4.3	19.1	13.6

表-6 セマンゴック *Shorea curtisii* の択伐林での各母樹の自殖率

Mother tree	No. of analyzed seeds	No of detected alleles				Inbreeding rate (%)
		<i>Shc 09</i>	<i>Shc 07</i>	<i>Shc 11</i>	Total	
No.2	35	5	8	4	17	67.6
No.3	31	6	7	4	17	51.6
No.4	35	8	7	2	17	21.2
No.6	33	5	8	4	17	53.1
No.7	35	4	3	4	11	85.7
Average	33.8	5.6	6.6	3.6	15.8	53.6

表-7 セマンゴック *Shorea curtisii* の天然林及び択伐林の自殖率及び次世代の遺伝的多様性の比較

	No. of investigated mother trees	No. of analyzed seeds	No of detected alleles	Inbreeding rate (%)	<i>He</i>
Natural Forest	10	326	31	13.6	0.761
Logged Forest	5	169	26	53.6	0.736

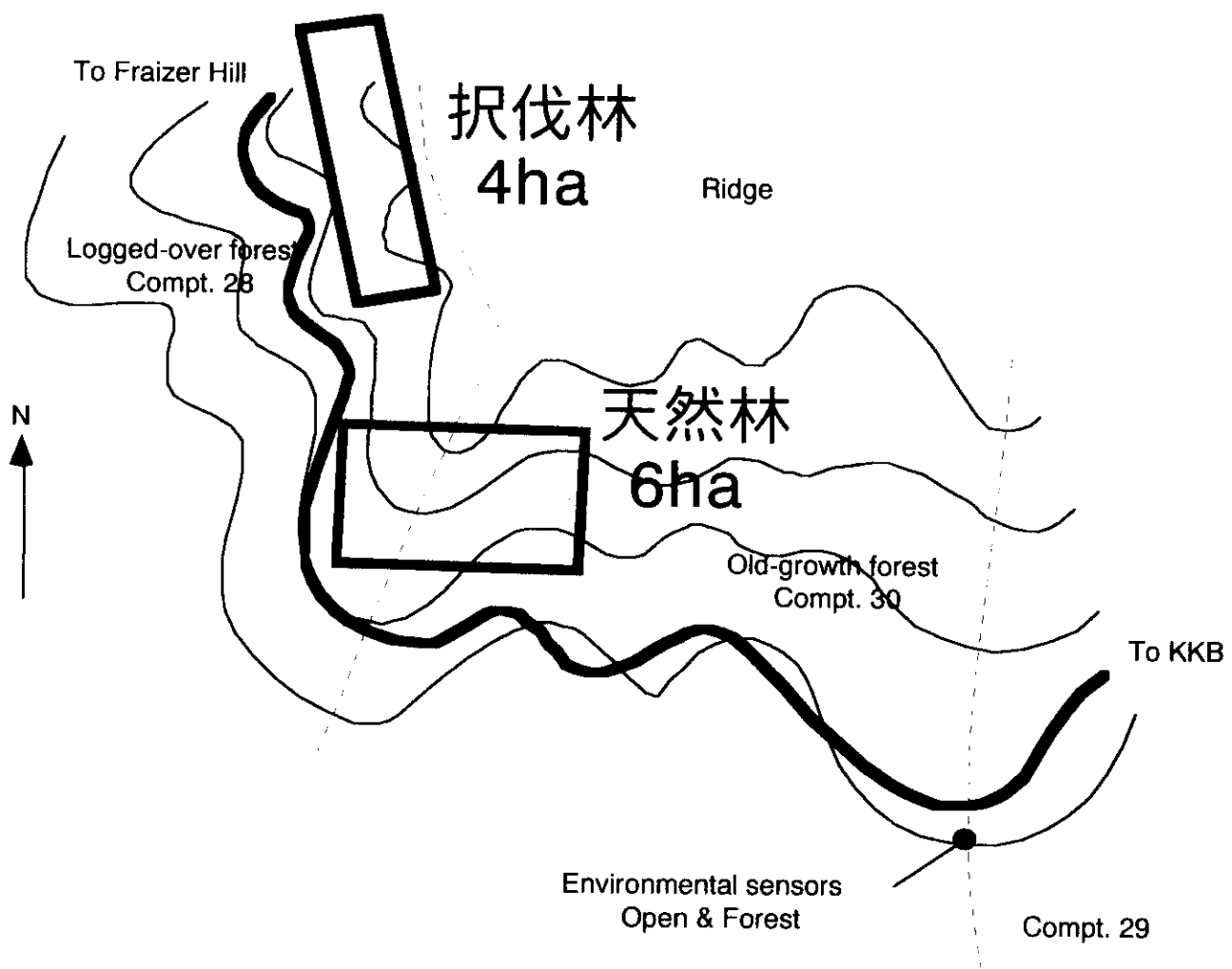


図-1 セマンゴック丘陵地の調査地

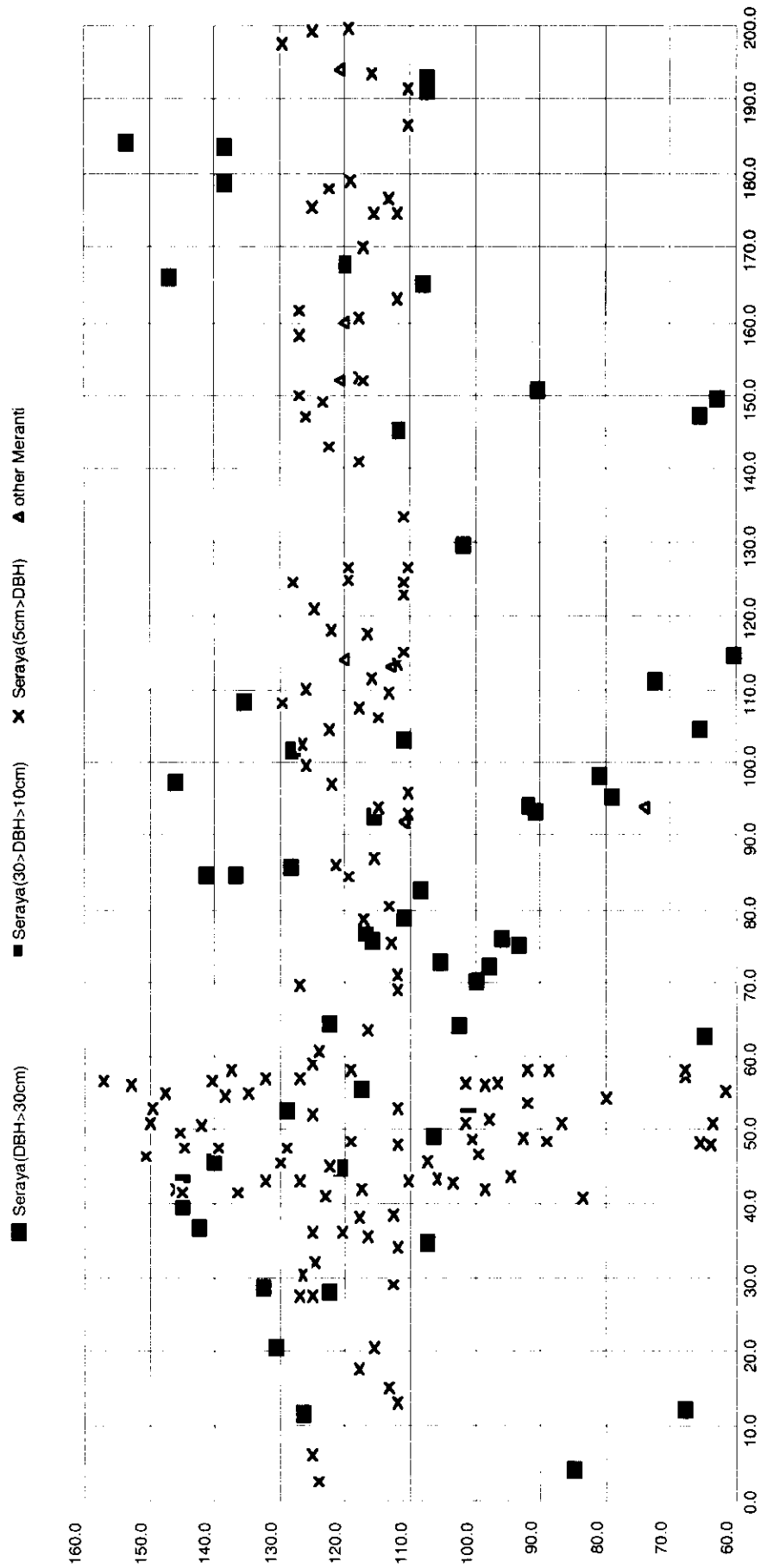


図-2 セマンゴック天然林で材料を採取した個体の分布図

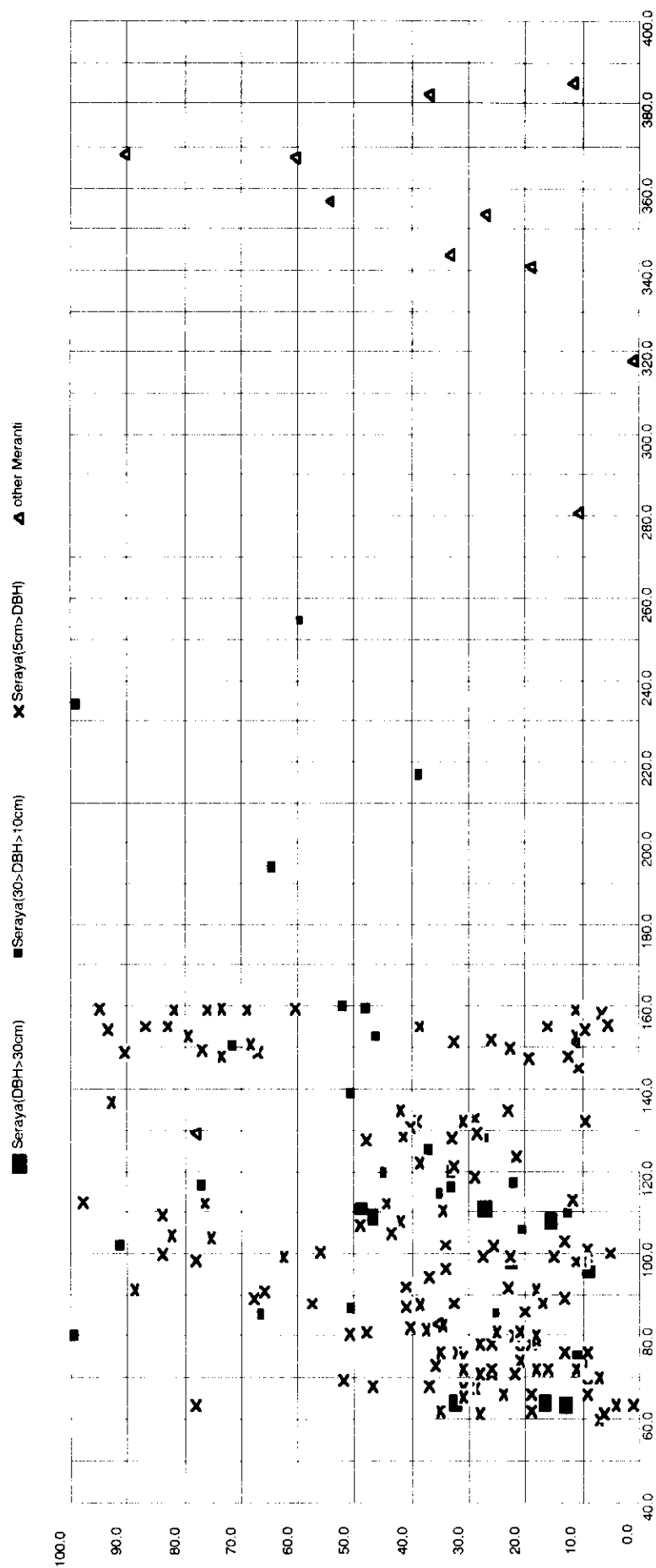


図-3 セマングック択抜林で材料を採取した個体の分布図

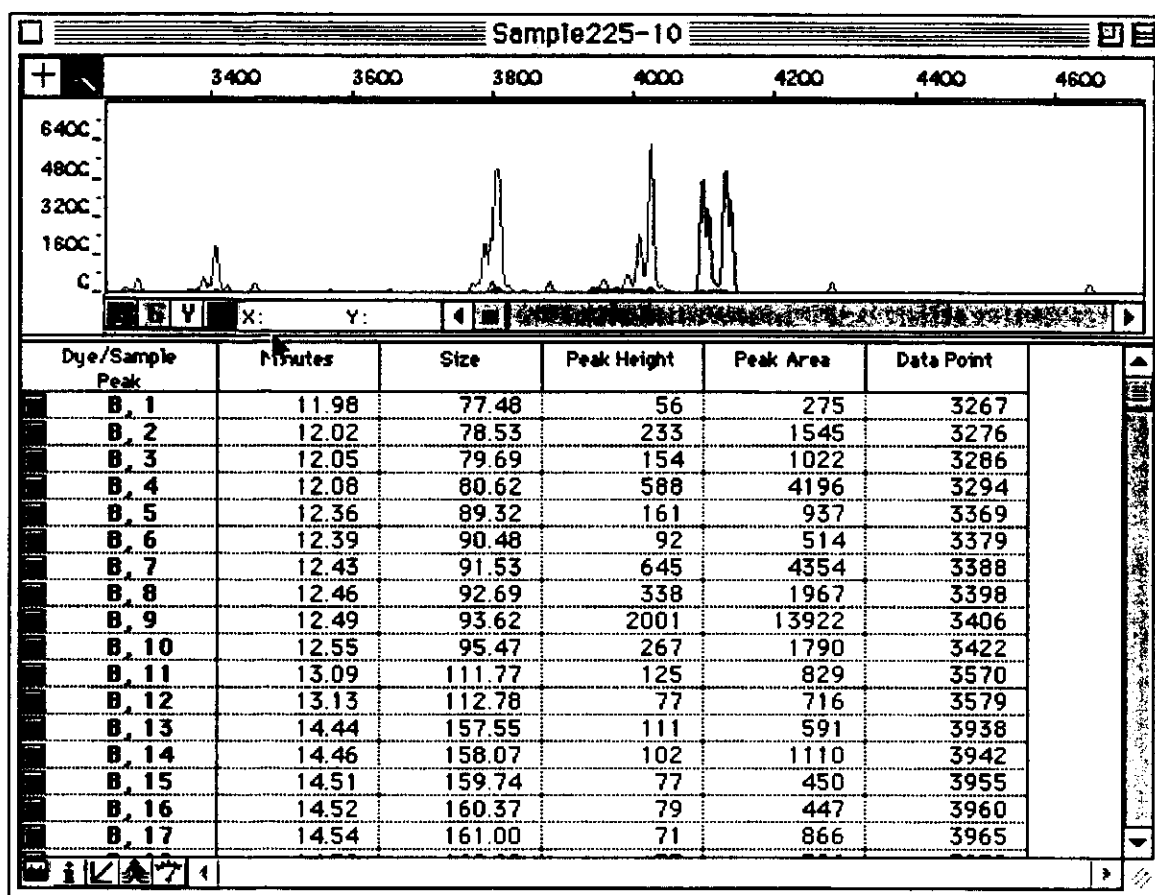
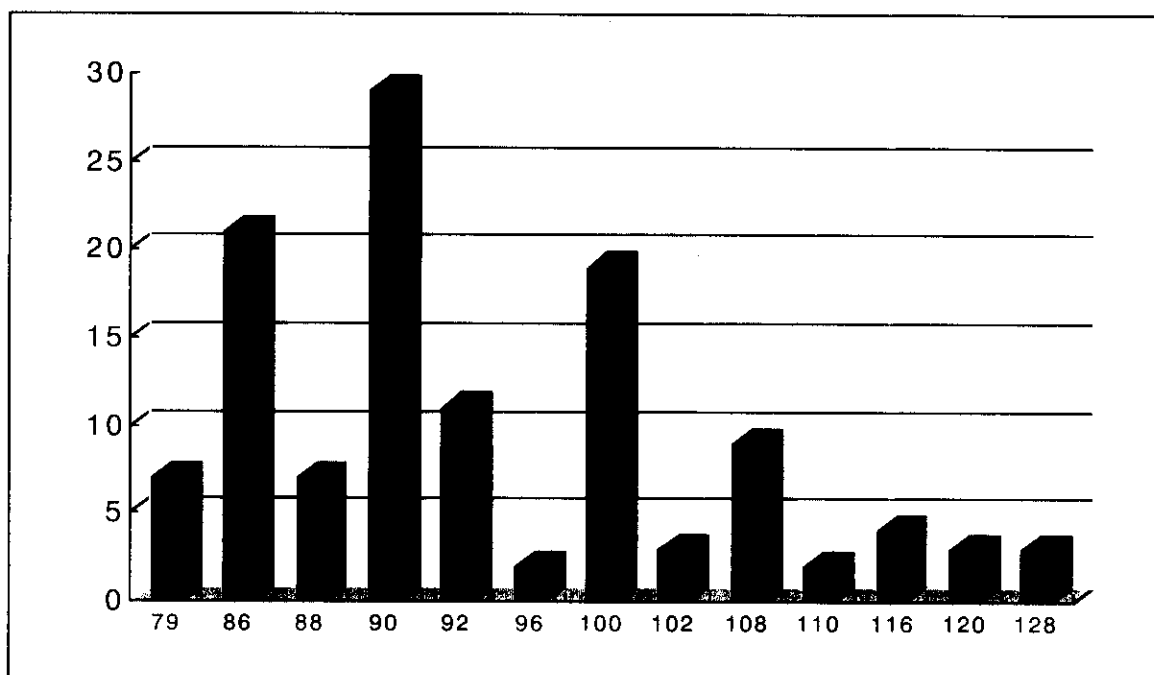
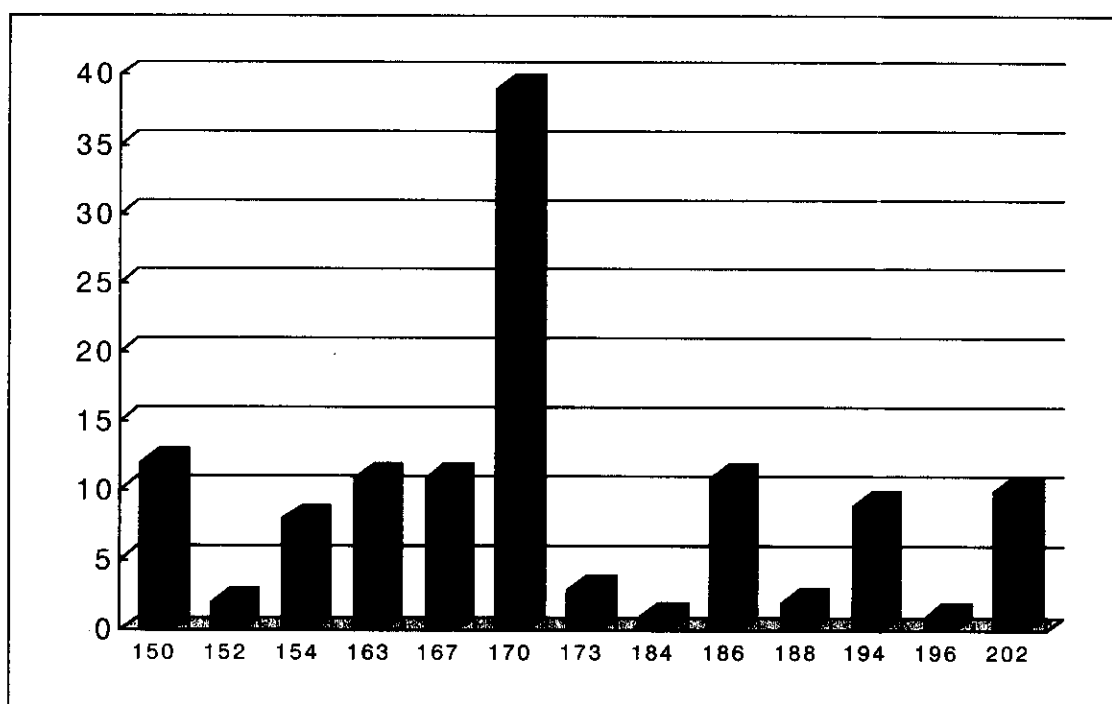


図-4 マイクロサテライトの遺伝子型の決定方法（例）

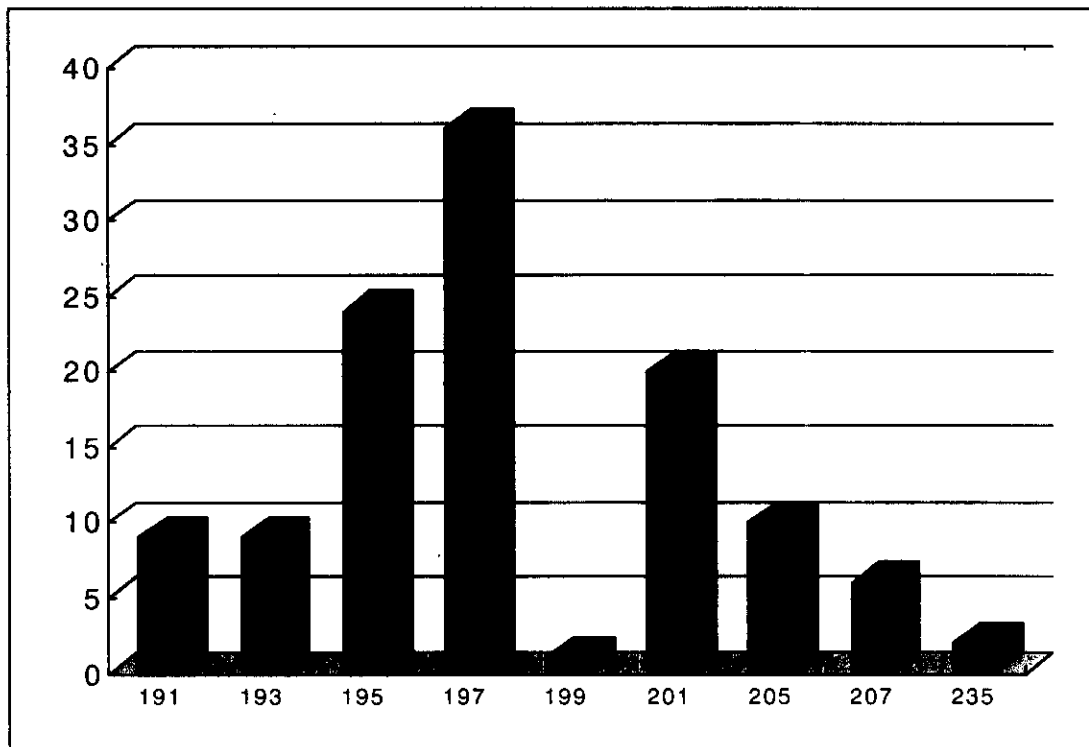


Shc04遺伝子座対立遺伝子頻度

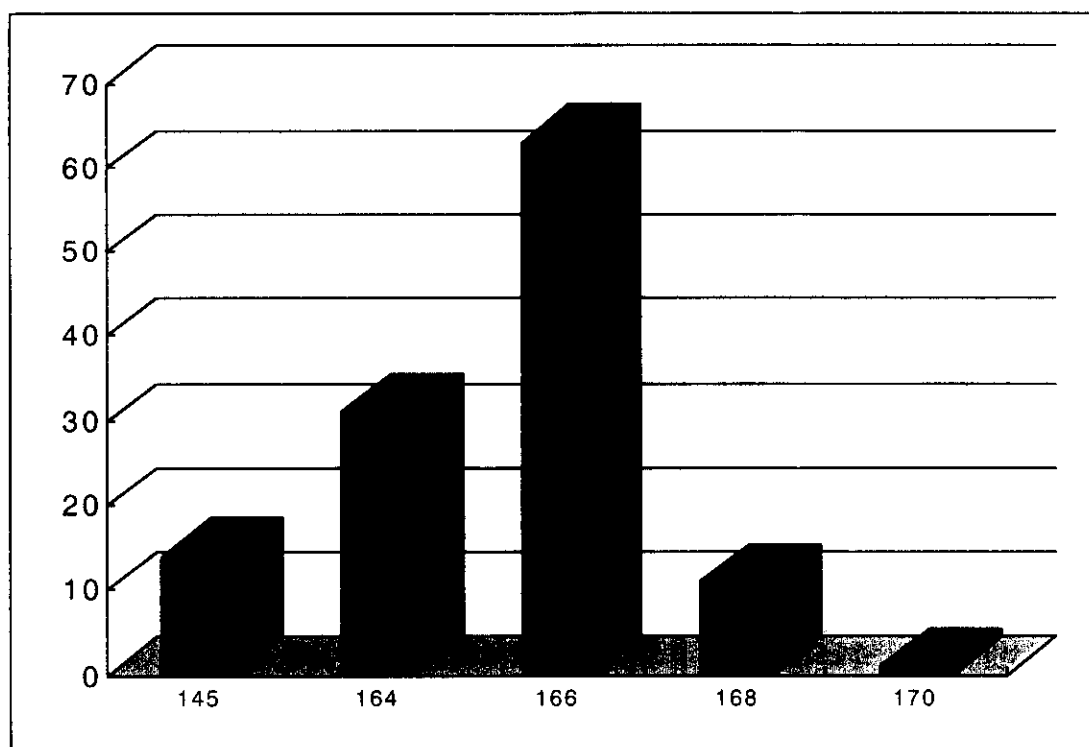


Shc07遺伝子座対立遺伝子頻度

図-5 Shc04及びShc07遺伝子座における対立遺伝子頻度



Shc09遺伝子座の対立遺伝子頻度



Shc11遺伝子座の対立遺伝子頻度

図-6 Shc09及びShc11遺伝子座における対立遺伝子頻度