

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学研究系自然環境学専攻

自然環境評価学分野

2008年度

修士論文

小笠原諸島の植物に共生している

アーバスキュラー菌根菌の群集構造の解明

**Community structure of Arbuscular mycorrhizal fungi
colonizing plant roots in the Bonin (Ogasawara) islands, Japan.**

提出2009年1月30日

2008年度3月修了

指導教員 福田健二 教授

076718 坂田益朗

目次

第1章.....	4
背景と目的.....	4
1.1 アーバスキュラー菌根菌とは	4
1.2 AM 菌の既往研究.....	5
1.3 日本の絶滅危惧種問題.....	5
1.4 目的.....	6
第2章.....	7
調査地と植物採取.....	7
2.1 小笠原諸島の概要	7
2.2 調査地.....	8
2.3 植物の特徴.....	9
第3章.....	15
植物への AM 菌感染の確認.....	15
3.1 方法.....	15
3.1.1 試料.....	15
3.1.1 トリパンプルー染色.....	15
3.2 結果.....	16
3.3 考察.....	21
3.3.1 小笠原諸島での AM 菌の存在の確認	21
3.3.2 植物の分布特性と AM 菌感染.....	21
3.3.3 AM 菌感染の見られなかった植物	22
3.3.4 絶滅危惧種への AM 菌感染	22
第4章.....	23
PCR-DGGE 法を用いた根内 AM 菌種の推定	23
4.1 実験 1 18S rDNA による AM 菌種の推定	23
4.1.1 方法.....	23
4.1.1.1 試料	23

4.1.1.2	根からの DNA 抽出と PCR.....	24
4.1.1.3	DGGE 法.....	24
4.1.1.4	DNA の精製.....	25
4.1.1.5	シーケンスと系統解析.....	25
4.1.2	結果.....	25
4.1.2.1	DGGE 法の泳動結果.....	25
4.1.2.2	系統解析の結果.....	25
4.1.3	考察.....	28
4.1.3.1	DGGE 法の考察.....	28
4.1.3.2	系統解析の考察.....	28
4.2	実験 2 28S rDNA による AM 菌種の同定.....	30
4.2.1	方法.....	30
4.2.1.1	試料.....	30
4.2.1.2	AM 菌 28S rDNA の nested PCR による増幅.....	30
4.2.1.3	DGGE 法.....	30
4.2.1.4	DNA の精製.....	30
4.2.1.5	シーケンスと系統解析.....	31
4.2.2	結果.....	31
4.2.2.1	DGGE 法の結果.....	31
4.2.2.2	系統解析の結果.....	31
4.2.3	考察.....	31
4.2.3.1	DGGE 法の考察.....	31
4.2.3.2	系統解析の考察.....	31
第 5 章	結論.....	33

参考文献

謝辞

第1章

背景と目的

1.1 アーバスキュラー菌根菌とは

真菌類が植物の根に共生してつくるものを菌根 (Mycorrhiza) と呼ぶ (Frank 1885). 菌根菌は, 菌根を形成する菌, すなわち植物体の根の内部に入り込んだり, 根の表面に付着したりして植物体と共生関係を結ぶ糸状菌の総称である. 菌根菌は菌糸を土壤中に伸ばすことによって, 植物根が養分を吸収できない範囲からも無機養分を吸収することができる. 菌根菌は吸収した養分を宿主植物に供給している一方, 宿主植物から光合成産物である有機物を受け取っている. 陸上植物の 90%以上がこのような物質の授受によって, 菌根菌と共生関係を築いていると言われている (Allen 1997).

菌根は, 菌糸が宿主植物の根の表面と皮層の細胞間隙にとどまっている外生菌根, 菌糸が根の細胞内まで侵入する内生菌根の 2 種類に大別される. 内生菌根を作るものとして, アーバスキュラー菌根菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi 以下 AM 菌) が挙げられる. AM 菌は宿主植物の根に樹枝状体 (Arbuscule) と嚢状体 (Vesicle) と呼ばれる器官を形成する. Arbuscule は菌糸が皮層細胞内に侵入したもので, そこでは宿主植物との養分交換を行っているといわれている. また, Vesicle は細胞間隙にのびた菌糸の先端や途中の部分が嚢状にふくれた構造で, そこで養分を貯蔵しているといわれている (Allen 1997). 従来, この特異的な器官の頭文字をとり VA 菌根菌と呼ばれてきたが, ギガスポラ科 (Gigasporaceae) の菌根菌は vesicle を形成しないことから, 現在は AM 菌と呼ばれることが多い. AM 菌は 10 科 13 属 (*Acaulospora*, *Archaeospora*, *Entrophospore*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Paraglomus*, *Scutellospora*, *Diversispora* 等) に分類されている (Helgason et al. 2007 等). 従来, AM 菌の分類は胞子の形態に基づいて行われ, これまで約 160 種が報告されているが, 現在では分子生物学的手法を用いた分類が試みられている. しかし, AM 菌は菌糸に隔壁がなく同一の細胞の中に遺伝的に異なる多数の核が存在しており, 種の同定を困難なものにしている. 種の同定は一般には AM 菌 rDNA の PCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅と, クローニング (Daniell et al. 2001 等) や T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法 (Jhonson et al. 2004 等), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法 (Kowalchuk et al. 2002 等) が併用され, 時間と労力を要する.

1.2 AM 菌の既往研究

近年、宿主との共生に関与するシグナル物質が特定され(Akiyama et al. 2005), AM 菌の共生機構の解明が進んできてはいるが, AM 菌の生態に関しては現在も不明な点が多く, 研究の基礎となる AM 菌群集構造や各菌種の地理的分布についての知見の蓄積も不十分である. 日本では畑土壌(Isobe et al. 2007)や富士山の一次遷移地帯(Wu et al. 2007), 海岸植生(AN et al. 2008, Abe et al. 1994, Yamato et al. 2008), 落葉広葉樹林(Yamato et al. 2005)等で AM 菌の群集構造が研究されているが, AM 菌の存在が確認されていない地域もまだ多く残っている. それらの研究結果や, その他の結果もあわせて見ると, それぞれの地域に存在する AM 菌種は異なる傾向にある. そのような土中の AM 菌群集構造の変化は, pH, 温度, 地上植生等によって変化すると言われているが(Allen 1997), 詳細はまだ明らかになっていない. 今後も更なる野外調査が必要である.

AM 菌の利用面に関しては, 日本では農業作物への AM 菌の肥料的利用が研究されてきている(小川 1987 等). しかし, AM 菌が純粋培養のできない絶対共生菌であることや, 生物資材であるがゆえの効果の不確性から実際の農業の現場への導入はあまり進んでいない. また, AM 菌の機能面での研究も不足しており, 菌種間の植物成長促進能力の違い等が明らかになっていないことも, 利用が進んでいない原因のひとつと考えられる.

海外でも AM 菌利用研究は行われてきているが, 近年では生物多様性保全への AM 菌の利用も試みられている. Sharma et al. (2007) はインドにおいて絶滅危惧種である *Curculigo orchoides* Gaertn. の根に共生する AM 菌 (*Glomus geosporum*, *Gl. microcarpum*) を明らかにし, それらの菌を苗に接種することで生長を促進することに成功している. また, Gemma et al. (2002) はハワイの AM 菌 *Gl. aggregatum* の接種試験を絶滅危惧種の *Sesbania tomentosa* と *Colubrina oppositifolia* を対象に行い, 苗の生長を促進することに成功した. 国内ではそのような保全目的での AM 菌利用はまだ研究例がない. しかし, 環境省発行のレッドリスト(環境省 2007)には2000種を超える植物種が掲載されており, 多くの植物が絶滅の危惧に瀕している現状にある. 今後, 国内においても絶滅危惧種に共生する AM 菌種の把握を進めることは, 有効な保全手法の確立に寄与できるであろう.

1.3 日本の絶滅危惧種問題

国内で多くの絶滅危惧種を有する地域のひとつとして, 小笠原諸島があげられる. 小笠原諸島は, 島の誕生以来一度も大陸と繋がったことのない海洋島であるため, 植物は島で独自の進化を遂げており固有種が多い. 小笠原諸島に自生する植物(外来種を除く)447 種中, 161 種が固有種であるが, 外来種蔓延等の影響でその内の 107 種がレッドリストに掲載されている. そのため, 島内では精力的に生態系保全のための研究が行われているが, AM 菌に着目した研究はまだない. 第一に, 小笠原諸島では今までに AM 菌に関する研究は全く行われておらず, 島内にどのような AM 菌が分布しているかといった生態系保全の基礎となるインベントリー的知見も皆無である.

全国的に見ても海洋島の AM 菌に関する知見は極めて少ない。島内での植物と AM 菌の共生関係を把握することは、絶滅危惧種保全への重要な基礎的知見になると考えられる。

1.4 目的

本研究においては、小笠原諸島の植物に共生している AM 菌群集を把握することを目的とした。まず、根内組織の光学顕微鏡観察により小笠原諸島内の AM 菌の存在有無を確認し、次に DGGE 法を用い AM 菌 rDNA による AM 菌種の同定を試みた。

第2章

調査地と植物採取

2.1 小笠原諸島の概要

小笠原諸島は、日本列島南方の北西太平洋上に散在する島々の総称である。日本列島から約 1000km, マリアナ諸島から約 550km 離れており、どの島も成立以来大陸と陸続きになったことがない海洋島である (Fig.2-1)。小笠原諸島には空港がなく、定期船 (週に1回出航) で、東京竹芝桟橋から父島まで片道およそ 25.5 時間を要す。

気候は亜熱帯海洋性気候で、年平均気温は 22.9°C, 年間の降水量の平均は 1261mm である (東京管区気象台)。

小笠原諸島のうち父島列島と母島列島は、古第三世紀始新世-中新世 (7000-3500 万年前) に海底火山の噴出物が堆積し、第四紀 (1000-500 万年前) に降段階的に隆起してできた隆起列島といわれている。地質は、主に安山岩の熔岩、集塊岩、凝灰岩からなるが、南島と父島の一部および母島の沖港周辺と石門地域にサンゴ礁に由来するといわれている石灰岩が分布し、カルスト地形を形成している (森田 1981)。

土壌は赤黄色土 (FAO/Unesco 分類の Orthic Acrisols, Dystric Cambisols に相当) および暗赤色土 (FAO/Unesco 分類の Vertic Cambisols, Chromic Vertisols に相当) の 2 つの土壌タイプが広く分布する。その他、海岸沿いに岩石地、砂浜付近に砂丘未熟土が認められる。

小笠原諸島の大部分を占める森林植生は、父島や兄島に広く分布する乾性低木林で、シャリンバイ *Rhaphiolepis indica* (L.) Lindl. ex Ker var. *umbellata* (Thunb.) H.Ohashi, シマイスノキ *Distylium lepidotum* Nakai, アデク *Syzygium buxifolium* Hook. et Arn., など硬い小型の葉をもった常緑樹から構成される。このような乾性低木林に生育する樹種は、浅い土壌でも乾燥に耐えられるような水利用様式を備えていることが報告されている (Mishio 1992)。もうひとつの代表的な植生タイプは湿生高木林で、ウドノキ *Pisonia umbellifera* (J.R. et G.Forst.) Seem., シマホルトノキ *Elaeocarpus photiniaefolius* Hook.et Arn., モクタチバナ *Ardisia sieboldii* Miq.などが生い茂り、シダやランなどの着生植物やヘゴ *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook., マルハチ *Cyathea mertensiana* (Kunze) Copel.といった木性シダが豊富に見られる (山下 2002)。海洋島であることおよび海流の影響を受けて、小笠原固有種の占める割合が極めて高い。しかし、アカギ *Bischofia javanica*

Blume, ギンネム *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, モクマオウ *Casuarina stricta* Aiton 等の外来種が繁茂し、原生植生に悪影響を与えており問題となっている(豊田 2003).

2.2 調査地

小笠原諸島の兄島, 父島, 南島, 母島の計4島を本研究の調査地とした. 兄島では, 滝ノ浦海岸付近(BR1), 見返山中腹(BR2), 見返山山頂付近(BR3)の3地域, 父島では, 宮之浜海岸付近(FA1), 扇浦海岸(FA2), コペペ海岸(FA3), 小湊海岸(FA4), 衝立山(FA5), 千尋岩付近(FA6), 東平南側草地(FA7), 初寝山(FA8)の8地域, 南島では, 南島北側ラピエ(SO1), ドリーネ付近(SO2)の2地域, 母島では, 石門(MO1), 境ヶ岳(MO2), 桑の木山(MO3), 乳房山(MO4), 静沢の海岸付近(MO5), 南崎歩道(MO6), 南崎(MO7)の7地域, 合計20地域とした. Fig.2-2 に島内の調査地の位置を示した. 図中の各島内の番号は, 上記の採取地番号と対応している.

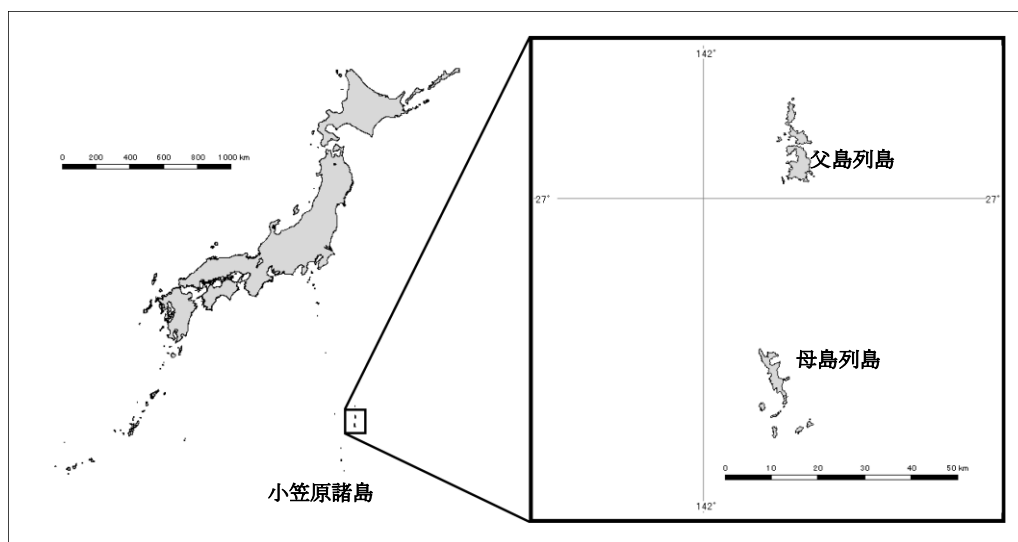


Fig. 2-1 小笠原諸島の位置

2.3 植物の採取

各地域において、草本及び幼齢の木本植物の根を地上部とともに採取した。小笠原諸島固有種、広域分布種、外来種という3つのカテゴリー(分布特性)にもとづいて対象種を分類し、分布特性を種名と共に記録した。分類は、文献(豊田 2003)と小笠原自然情報センターホームページ(<http://ogasawara-info.jp/> 2009.1.30 確認)に基づいて行った。自然公園法に従い、固有種は1種あたり3個体まで採取した。GARMIN GPSMAP 60CSx を用いて採取位置を記録した。採取は2008年6月から7月に行った。

兄島26種、父島30種、南島16種、母島25種、各島合計で40科73種の植物を採取した。分布特性、採取地、生活型、環境省発行のレッドリスト(環境省 2007)に記載されたカテゴリーをまとめた表を Table.2-1～Table.2-3 に示す。絶滅危惧のカテゴリーは、準絶滅危惧(NT)、絶滅危惧 I B類(EN)、絶滅危惧 IA類(CR)、の順に危惧レベルが高くなっている。

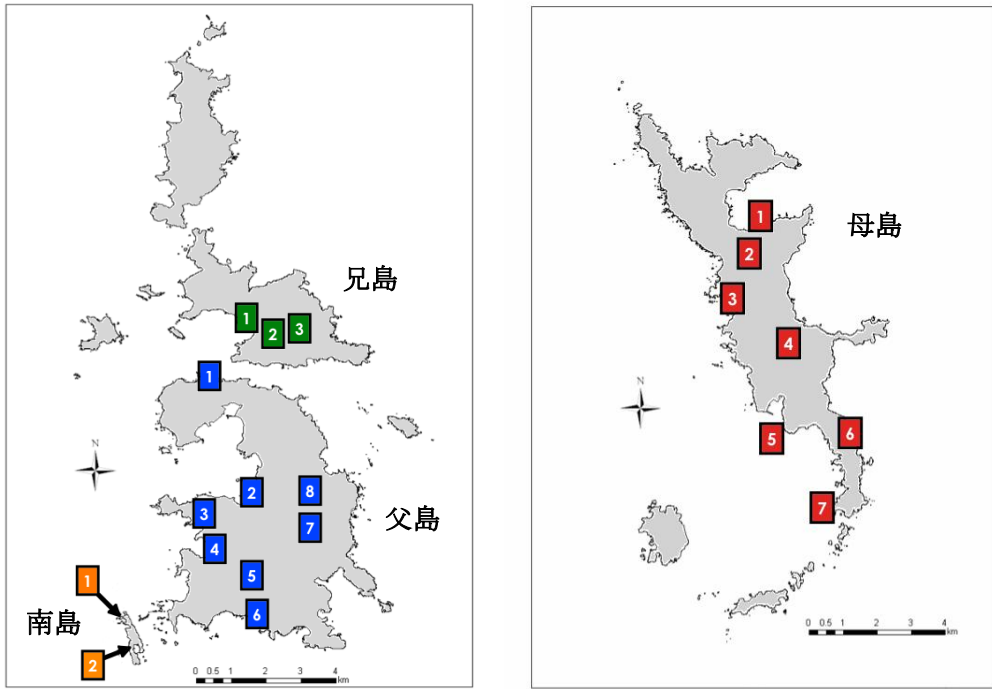


Fig. 2-2 小笠原諸島の調査地



Fig. 2-3 各島の様子 A:兄島, B:父島, C:南島, D:母島

Table 2-1 採取植物 (固有種)

科名	Family	種名	Species	分布特性	採取地	生活型	環境レッドデータ
ヒノキ科	Cupressaceae	シマムロ	<i>Juniperus taxifolia</i> Hook. et Arn.	固有種	BR3 BR3	常緑針葉小高木	絶滅危惧B類(VU)
クワ科	Moraceae	トキワイヌビワ	<i>Ficus boninensis</i> Koidz.	固有種	MO2	常緑高木	記載なし
イラクサ科	Urticaceae	オガサワラモクマオ	<i>Boehmeria boninensis</i> Nakai	固有種	MO1	常緑低木	記載なし
キンボウグサ科	Ranunculaceae	ムニンセンニンソウ	<i>Clematis terniflora</i> DC. var. <i>boninensis</i> (Nakai) Tuyama 10	固有種	MO1	多年草	絶滅危惧B類(VU)
コシヨウ科	Piperaceae	シマゴシヨウ	<i>Peperomia boninensis</i> Makino	固有種	FA8	多年草	絶滅危惧B類(VU)
マンサク科	Hamamelidaceae	シマイスノキ	<i>Disyllum leptotum</i> Nakai	固有種	BR2	常緑高木	記載なし
ミカン科	Rutaceae	オオバシロツツ	<i>Boninia grisea</i> Planch.	固有種	MO1	常緑高木	記載なし
		アウコザンシヨウ	<i>Zanthoxylum ailanthoides</i> Siebold et Zucc. var. <i>boninshimae</i> (Koidz. ex H.Hara) T.Yamaz. ex H.Ohba	固有種	FA5	常緑高木	記載なし
ホルトノキ科	Elaeocarpaceae	シマホルトノキ	<i>Elaeocarpus photiniaefolius</i> Hook. et Arn.	固有種	MO2	常緑高木	記載なし
アオイ科	Malvaceae	フリハハマボウ	<i>Hibiscus glaber</i> (Matsum. ex Hatt.) Matsum. ex Nakai	固有種	MO6 MO7	常緑高木	記載なし
ジンチヨウグサ科	Thymelaeaceae	ムニンアオガンピ	<i>Wikstroemia pseudoretusa</i> Koidz.	固有種	BR2 FA5	常緑高木	絶滅危惧B類(VU)
フトモモ科	Myrtaceae	ヒメフトモモ	<i>Speygium cleverifolium</i> (Yatabe) Makino	固有種	BR2 FA5	常緑高木	絶滅危惧B類(VU)
ノボタン科	Melastomataceae	ハハジマノボタン	<i>Melastoma teneranum</i> Hayata var. <i>pentapetalum</i> Toyoda	固有種	MO4 MO4	常緑小高木	絶滅危惧B類(VU)
サクラソウ科	Primulaceae	オオハマボウツ	<i>Lysimachia rubida</i> Koidz.	固有種	SO2	多年草	記載なし
キヨウチクトウ科	Apocynaceae	ヤロード	<i>Neispermia nakianum</i> (Koidz.) Fosberg et Sachet	固有種	MO1	常緑高木	記載なし
アカネ科	Rubiaceae	シマザクラ	<i>Hebevis grayi</i> Hook.f.	固有種	MO2	常緑低木	準絶滅危惧(NT)
クマツヅラ科	Verbenaceae	オオバシマムラサキ	<i>Callicarpa subpubescens</i> Hook. et Arn.	固有種	FA6	常緑低木	記載なし
シソ科	Lamiaceae	ムニンタツツナミノソウ	<i>Scutellaria longinaba</i> Koidz.	固有種	BR2	多年草	準絶滅危惧(NT)
キク科	Asteraceae	オガサワラアザミ	<i>Cirsium boninense</i> Koidz.	固有種	SO2	多年草	絶滅危惧B類(VU)
		ユズリハワダン	<i>Crepidiastrum amerisophyllum</i> (Nakai) Nakai	固有種	MO1	常緑小低木	絶滅危惧A類(CR)
		ワダンノキ	<i>Dendrocalia crepidifolia</i> (Nakai) Nakai	固有種	MO2	常緑高木	絶滅危惧B類(VU)
イネ科	Poaceae	ツルワダン	<i>Iseris longirostris</i> (Hayata) Nakai	固有種	SO1	多年草	絶滅危惧B類(VU)
		マツバシバ	<i>Aristida cumingiana</i> Trin. et Rupr.	固有種	BR3	多年草	絶滅危惧B類(EN)
		シマギヨウキシバ	<i>Digitaria playcarpha</i> (Trin.) Stupf	固有種	BR3 FA7	多年草	絶滅危惧B類(EN)
ヤシ科	Arecaceae	オガサワラヒロウ	<i>Livistona chinensis</i> (Jacq.) R.Br. ex Mart. var. <i>boninensis</i> Becc.	固有種	FA5	常緑高木	準絶滅危惧(NT)
タコノキ科	Pandanaceae	タコノキ	<i>Pandanus boninensis</i> Warb.	固有種	BR1 MO5 MO7	常緑高木	準絶滅危惧(NT)
カヤツリグサ科	Cyperaceae	ムニンテンツキ	<i>Fimbristylis longispica</i> Steud. var. <i>boninensis</i> (Hayata) Ohwi	固有種	BR3	多年草	絶滅危惧B類(EN)
		シマイガクサ	<i>Rhynchospora boninensis</i> Nakai	固有種	BR2 FA7	多年草	情報不足(DD)
シヨウガ科	Zingiberaceae	シマクマタケラン	<i>Machaerina rubiginosa</i> (Sol. ex G.Forst.) T.Koyama	固有種	FA7	多年草	記載なし
			<i>Alpinia boninensis</i> Makino	固有種	FA8	多年草	絶滅危惧B類(EN)

Table 2-2 採取植物 (広域分布種)

科名	Family	種名	Species	分布特性	採取地	生活型	環境省レッドデータ
ニレ科	Ulmaceae	ウラジロエノキ	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	広域分布種	BR2	常緑高木	記載なし
ハスノハギリ科	Hernandiaceae	ハスノハギリ	<i>Hernandia nymphaeifolia</i> (C.Presl) Kubitzki	広域分布種	BR1	常緑高木	記載なし
オトギリソウ科	Clusiaceae	チリハボク	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	広域分布種	BR1 FA3	常緑高木	記載なし
マメ科	Fabaceae	ハマナタマメ	<i>Canavalia lineata</i> (Thunb.) DC.	広域分布種	M07	多年草	記載なし
シクンシク科	Combretaceae	モモタマナ	<i>Terminalia catappa</i> L.	広域分布種	BR1 FA3 M06	落葉高木	記載なし
ヒルガオ科	Convolvulaceae	グンバイヒルガオ	<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域分布種	BR1 FA1 FA2 FA3 FA4 S02 M05	多年草	記載なし
クマツヅラ科	Verbenaceae	ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	広域分布種	BR1 FA1 FA4 S02 M05	常緑低木	記載なし
ナス科	Solanaceae	イズホオズキ	<i>Solanum nigrum</i> L.	広域分布種	S02	一年草	記載なし
クサトペラ科	Goodeniaceae	クサトペラ	<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.	広域分布種	FA1	常緑低木	記載なし
キク科	Asteraceae	ノゲン	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	広域分布種	S02	一年草	記載なし
イネ科	Poaceae	ギョウキシバ	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	広域分布種	FA4 S02	一年草	記載なし
		エダウチチヂミザサ	<i>Opilismenus compositus</i> P.Beauv.	広域分布種	M01 M03 M04 M04	多年草	記載なし
		スズメノコビエ	<i>Paspalum scrobiculatum</i> L. var. <i>scrobiculatum</i>	広域分布種	BR1 M03 M04 M04	多年草	記載なし
		フタシハネズミノオ	<i>Sporobolus diander</i> (Retz.) P.Beauv.	広域分布種	BR1 FA3 FA6	多年草	記載なし
		コウライシバ	<i>Zoysia tenuifolia</i> Willd.	広域分布種	FA5	多年草	記載なし
		ヒガスダ	<i>Carex wakuensis</i> C.A.Mey. var. <i>robusta</i> (Franch. et Sav.) Franch. et Sav.	広域分布種	S02	多年草	記載なし
カヤツリグサ科	Cyperaceae	ヒラアンペライ	<i>Machaerina glomerata</i> (Gaudich.) T.Koyama	広域分布種	BR1 BR2	多年草	記載なし

Table 2-3 採取植物 (外来種)

科名	Family	種名	Species	分布特性	採取地	生活型	環境省レッドデータ
モクマオウ科	Casuarinaceae	モクマオウ	<i>Casuarina stricta</i> Alton	外来種	BR1 BR3	常緑高木	記載なし
オシロイバナ科	Nyctaginaceae	ナハカノコソウ	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	外来種	SO2	多年草	記載なし
スベリヒユ科	Portulacaceae	スベリヒユ	<i>Portulaca oleracea</i> L.	外来種	FA5	多年草	記載なし
ペンケイソウ科	Crassulaceae	トウロウソウ	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	外来種	FA5 FA5 MO4	多年草	記載なし
マメ科	Fabaceae	ギンネム	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	外来種	BR1 FA3	常緑高木	記載なし
トウダイグサ科	Euphorbiaceae	アカギ	<i>Bischofia javanica</i> Blume	外来種	MO3	常緑高木	記載なし
		シマニシキソウ	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	外来種	BR1 FA3	一年草	記載なし
		ハイニシキソウ	<i>Chamaesyce prostrata</i> (Alton) Small	外来種	FA3 MO4	一年草	記載なし
フトモモ科	Myrtaceae	フトモモ	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	外来種	FA8	常緑高木	記載なし
アカバナ科	Onagraceae	コマツヨイダサ	<i>Oenothera laciniosa</i> Hill	外来種	FA1 SO2	二年草	記載なし
サクラソウ科	Primulaceae	アカバナルリハユベ	<i>Anagallis arvensis</i> L. f. <i>arvensis</i>	外来種	FA1 FA6	一年草	記載なし
クマツヅラ科	Verbenaceae	シチヘンダ	<i>Anagallis arvensis</i> L. var. <i>aculeata</i> (L.) Moldenke	外来種	BR1	常緑低木	記載なし
		ナガボソウ	<i>Lantana camara</i> L. var. <i>aculeata</i> (L.) Moldenke	外来種	FA5 FA6	多年草	記載なし
シソ科	Lamiaceae	ヤンバルツルハルハツカ	<i>Stachytarpheta urticifolia</i> Sims	外来種	FA1	多年草	記載なし
ナス科	Solanaceae	タバコ	<i>Nicotiana longiflora</i> Cav.	外来種	SO2	多年草	記載なし
キク科	Asteraceae	オオバナノセンダングサ	<i>Bidens pilosa</i> L. var. <i>radiata</i> Sch. Bip.	外来種	FA5	一年草	記載なし
		オオアレチノギク	<i>Conyza sumatrensis</i> (Retz.) E. Walker	外来種	SO2	一年草	記載なし
		ウスベニニガナ	<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC.	外来種	SO2	一年草	記載なし
		コトブキギク	<i>Tridax procumbens</i> L.	外来種	BR1 SO2	一年〜二年草	記載なし
		コバナムラサキムカシヨモギ	<i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less. var. <i>parviflora</i> (Reinw. ex Blume) DC.	外来種	BR2	多年草	記載なし
ユリ科	Liliaceae	テッポウユリ	<i>Lilium longiflorum</i> Thunb.	外来種	FA1	多年草	記載なし
リュウゼツラン科	Agavaceae	チトセラン	<i>Sansiveria nilotica</i> Boeckl	外来種	MO4	多年草	記載なし
イネ科	Poaceae	シメツクリノイガ	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	外来種	SO2 MO5	一年草	記載なし
		シマヒダシバ	<i>Chloris barbata</i> Sw.	外来種	BR1	一年草	記載なし
		オガサワラスズメノヒエ	<i>Paspalum conjugatum</i> Bergius	外来種	MO3 MO4	多年草	記載なし
サトイモ科	Araceae	ホウライイシヨウ	<i>Monstera deliciosa</i> Liebm. ex Kjoeb	外来種	FA1	多年草	記載なし

Table 2-4 絶滅危惧カテゴリーとその定義(環境省 2007)

絶滅危惧カテゴリー	定義
絶滅 (EX)	我が国ではすでに絶滅したと考えられる種
野生絶滅 (EW)	飼育・栽培下でのみ存続している種
絶滅危惧IA類 (CR)	ごく近い将来における絶滅の危険性が極めて高い種
絶滅危惧IB類 (EN)	IA類ほどではないが、近い将来における絶滅の危険性が高い種
絶滅危惧II類 (VU)	絶滅の危険が増大している種
準絶滅危惧 (NT)	現時点では絶滅危険度は小さいが、生息条件の変化によっては「絶滅危惧」に移行する可能性のある種
情報不足 (DD)	評価するだけの情報が不足している種

第3章

植物への AM 菌感染の確認

AM 菌は根の中に感染しているため、根を透明化し菌体を染色しなければ観察が出来ない。そこで、採取した全ての植物について常法(トリパンブルー染色法:Phillips and Hayman 1970)にて染色し、光学顕微鏡で AM 菌の感染の有無を確認した。

3.1 方法

3.1.1 試料

第2章にて小笠原諸島の兄島, 父島, 南島, 母島から採取したすべての植物種の根を試料に用いた。採取した根は流水洗浄した後, 更に超音波洗浄機で洗浄した。水気を拭き取り, チャック付きビニール袋に入れ4°Cで冷蔵保存した。保存後, 一週間以内に実験に使用した。

3.1.2 トリパンブルー染色

洗浄した根を 10%水酸化カリウム水溶液中に浸漬し, 沸騰水中で約 30 分加熱した。10%水酸化カリウム水溶液を捨て, 水道水で根を洗浄し, 脱色のためにアルカリ性過酸化水素水に約 10 分浸漬した。アルカリ性過酸化水素水を捨て, 2%塩酸を加え数分間浸漬した。塩酸を捨て, トリパンブルー染色液を加え約 15 分間沸騰水中で加熱した(Fig. 3-1)。染色液をよく切った後, ラクトグリセロール中に保存した。染色された根サンプルを約 1cm に切り, 各サンプルあたり 30 本を基準に顕微鏡下で観察した(Fig. 3-2)。小笠原では植物採取可能個体数に制限があるので, 一定量の根が確保できなかったものもあった。感染の有無, Vesicle, Arbuscule, の有無を記録した。感染率を低(1~30%), 中(31~70%), 高(71~100%)の三段階で記した(Mcgonigles et al. 1996)。

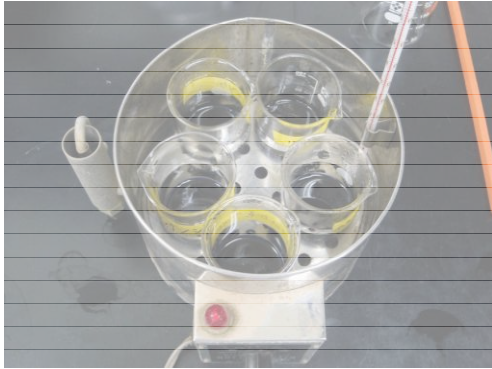


Fig. 3-1 染色の様子

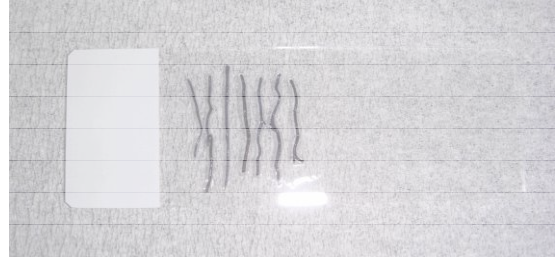


Fig. 3-2 染色根

3.2 結果

AM 菌感染観察結果を島ごとにまとめた表を Table 3-1~3-4 に示す. 採取した 40 科 73 種のうち, 65 種の根内で AM 菌が確認された(Fig.3-3). 小笠原諸島の固有植物種には, 30 種中 26 種の根内で AM 菌が見られた. 外来種アカギには高い感染率で AM 菌が感染していた. 今回採取できた絶滅危惧種 27 種のうち, シマイガクサを除く全ての絶滅危惧種に AM 菌が感染していた. 広域分布種は 16 種中 14 種, 外来種は 27 種中 25 種に AM 菌感染が見られた.

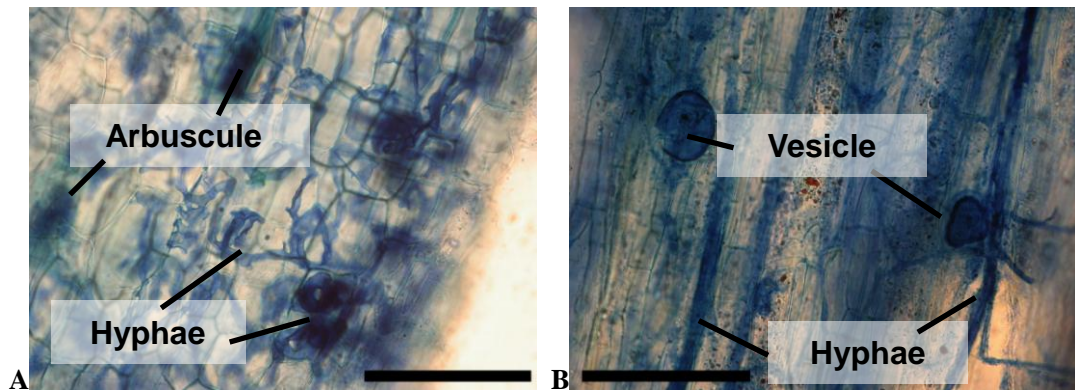


Fig. 3-3 根内 AM 菌の様子 (bar は 100 μ m)

A:ユズリハワダン B:アカギ

Table 3-1 兄島におけるAM菌感染観察結果

種名	学名	分布	特標	取場	感染	Vesicle	Arbuscule	感染
タコノキ	<i>Pandanus boninensis</i> Warb.	固有	BR1	+	+	-		低
グンバイヒルガオ	<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	BR1	+	+	-		低
スズメノコビエ	<i>Paspalum scrobiculatum</i> L. var. <i>scrobiculatum</i>	広域	BR1	+	+	+		中
テリハボク	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	広域	BR1	+	+	-		低
ハスノハギリ	<i>Hernandia nymphaeifolia</i> (C.Presl) Kubitzki	広域	BR1	+	+	+		低
ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	広域	BR1	+	+	+		中
ヒゲスゲ	<i>Carex wahuensis</i> C.A.Mey. var. <i>robusta</i> (Franch. et Sav.) Franch. et Sav.	広域	BR1	-	-	-		-
モモタマナ	<i>Terminalia catappa</i> L.	広域	BR1	+	+	-		高
ギンネム	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	外来	BR1	+	+	+		高
コトブキギク	<i>Tridax procumbens</i> L.	外来	BR1	+	-	+		高
コバナムラサキムカシヨ	<i>Vernonia cinerea</i> (L.) Less. var. <i>parviflora</i> (Reinw. ex Blume) DC.	外来	BR1	+	+	-		中
シテヘンゲ	<i>Lantana camara</i> L. var. <i>aculeata</i> (L.) Moldenke	外来	BR1	+	+	+		高
シマニシキソウ	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	外来	BR1	+	+	-		低
シマヒゲシバ	<i>Chloris barbata</i> Sw.	外来	BR1	+	+	-		中
モクマオウ	<i>Casuarina stricta</i> Aiton	外来	BR1	+	+	-		中
シマイガクサ	<i>Rhynchospora boninensis</i> Nakai	固有	BR2	-	-	-		-
シマイスノキ	<i>Distylium lepidotum</i> Nakai	固有	BR2	+	+	+		高
ヒメフトモモ	<i>Syzygium cleyerifolium</i> (Yatabe) Makino	固有	BR2	+	+	-		高
ムニンアオガンピ	<i>Wikstroemia pseudoretusa</i> Koidz.	固有	BR2	+	+	-		高
ムニントツナミソウ	<i>Scutellaria longituba</i> Koidz.	固有	BR2	+	+	+		高
ウラジロエノキ	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	広域	BR2	+	+	+		高
ヒラアンペライ	<i>Machaerina glomerata</i> (Gaudich.) T.Koyama	広域	BR2	+	+	-		低
シマギョウギシバ	<i>Digitaria platycarpa</i> (Trin.) Stapf	固有	BR3	+	+	+		中
シマムロ	<i>Juniperus taxifolia</i> Hook. et Arn.	固有	BR3	+	+	+		高
シマムロ	<i>Juniperus taxifolia</i> Hook. et Arn.	固有	BR3	+	+	+		高
マツバシバ	<i>Aristida cumingiana</i> Trin. et Rupr.	固有	BR3	+	+	+		中
ムニンテンツキ	<i>Fimbristylis longispica</i> Steud. var. <i>boninensis</i> (Hayata) Ohwi	固有	BR3	+	+	-		高
モクマオウ	<i>Casuarina stricta</i> Aiton	外来	BR3	+	+	-		低

Table 3-2 父島における AM 菌感染観察結果

種名	学名	分布特	採取場	胞袋	Vesicle	Arbuscule	感染
クサトベラ	<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.	広域	FA1	+	+	+	高
グンバイヒルガ	<i>Opomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	FA1	+	+	-	低
ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	広域	FA1	+	+	+	低
アカバナリハコ	<i>Argallis arvensis</i> L. f. <i>arvensis</i>	外来	FA1	+	+	+	高
コマツヨイグサ	<i>Oenothera lacinata</i> Hill	外来	FA1	+	+	-	低
テッポウユリ	<i>Lilium longiflorum</i> Thunb.	外来	FA1	+	+	+	高
ホウライシヨウ	<i>Monstera deliciosa</i> Liebm. ex Kjoeb	外来	FA1	+	+	-	中
グンバイヒルガ	<i>Opomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	FA2	+	+	-	高
グンバイヒルガ	<i>Opomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	FA3	-	-	-	-
スズメノコビエ	<i>Paspalum scrobiculatum</i> L. var. <i>scrobiculatum</i>	広域	FA3	+	+	+	高
テリハボク	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	広域	FA3	-	-	-	-
モモタマナ	<i>Terminalia catappa</i> L.	広域	FA3	-	-	-	-
ギンネム	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	外来	FA3	+	+	-	低
シマニシキソウ	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	外来	FA3	+	+	+	高
ハイニシキソウ	<i>Chamaesyce prostrata</i> (Aiton) Small	外来	FA3	+	+	+	中
ギョウギシバ	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	広域	FA4	+	-	+	低
グンバイヒルガ	<i>Opomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	FA4	+	+	-	中
ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	広域	FA4	+	-	+	低
アコウザンシヨ	<i>Anthoxylum ailanthoides</i> Siebold et Zucc. var. <i>boninshimae</i> (Koidz. ex H.Hara) T.Yamaz. ex H.Ohba	固有	FA5	+	+	-	低
オオバシマムラサ	<i>Allicarpha subpubescens</i> Hook. et Arn.	固有	FA5	+	+	-	中
オガサワラビロ	<i>Clivistona chinensis</i> (Jacq.) R.Br. ex Mart. var. <i>boninensis</i> Becc.	固有	FA5	+	+	-	高
ヒメフトモモ	<i>Syzygium cleyerifolium</i> (Yatabe) Makino	固有	FA5	+	+	-	低
ムニンアオガン	<i>Wikstroemia pseudoretusa</i> Koidz.	固有	FA5	+	+	-	低
フタシベネズミ	<i>Sporobolus diander</i> (Retz.) P.Beauv.	広域	FA5	+	+	-	高
オオバナノセンダ	<i>Bidens pilosa</i> L. var. <i>radiata</i> Sch. Bip.	外来	FA5	+	+	-	低
スベリヒユ	<i>Portulaca oleracea</i> L.	外来	FA5	+	+	-	中
トウロウソウ	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	外来	FA5	+	+	-	高
トウロウソウ	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	外来	FA5	+	+	+	高
ナガボソウ	<i>Stachytarpheta urticifolia</i> Sims	外来	FA5	+	+	-	低
スズメノコビエ	<i>Paspalum scrobiculatum</i> L. var. <i>scrobiculatum</i>	広域	FA6	+	+	-	低
ナガボソウ	<i>Stachytarpheta urticifolia</i> Sims	外来	FA6	+	+	-	中
アカバナリハコ	<i>Argallis arvensis</i> L. f. <i>arvensis</i>	外来	FA6	+	+	-	低
シマイガクサ	<i>Rhynchospora boninensis</i> Nakai	固有	FA7	-	-	-	-
シマギョウギシ	<i>Digitaria platycarpa</i> (Trin.) Stapf	固有	FA7	+	+	+	低
ムニンアンペラ	<i>Machaerina rubiginosa</i> (Sol. ex G.Forst.) T.Koyama	固有	FA7	-	-	-	-
シマクマタケラ	<i>Alpinia boninsimensis</i> Makino	固有	FA8	+	+	-	中
シマゴシヨウ	<i>Peperomia boninsimensis</i> Makino	固有	FA8	+	+	-	高
フトモモ	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston	外来	FA8	+	+	-	低

Table 3-3 南島におけるAM菌感染観察結果

種名	学名	分布特	標取場	感染	Vesicle	Arbuscule	感染
ツルワダン	<i>Ixeris longirostra</i> (Hayata) Nakai	固有	SO1	+	+	-	中
オオハマボツ	<i>Æsimachia rubida</i> Koidz.	固有	SO2	+	+	+	高
オガサワラア	<i>Ætirium boninense</i> Koidz.	固有	SO2	+	+	-	高
イヌホオズキ	<i>Solanum nigrum</i> L.	広域	SO2	-	-	-	-
ギョウギシバ	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	広域	SO2	+	+	-	中
グンバイヒル	<i>Hiponoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	SO2	+	+	+	低
コウライシバ	<i>Zoysia tenuifolia</i> Willd.	広域	SO2	+	+	-	高
ノゲシ	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	広域	SO2	+	+	+	高
ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	広域	SO2	+	+	+	低
ウスベニニガ	<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC.	外来	SO2	+	+	-	低
オオアレチノギク	<i>Cyrtandra sumatrensis</i> (Retz.) E.Walker	外来	SO2	+	+	+	中
コトブキギク	<i>Tridax procumbens</i> L.	外来	SO2	+	-	+	低
コマツヨイグサ	<i>Oenothera laciniata</i> Hill	外来	SO2	-	-	-	-
シンクリノイ	<i>Gnaphalium echinatum</i> L.	外来	SO2	+	+	+	中
タバコ	<i>Nicotiana longiflora</i> Cav.	外来	SO2	-	-	-	-
ナハカノコソ	<i>Berhavia diffusa</i> L.	外来	SO2	-	-	-	-

Table 3-4 母島におけるAM菌感染観察結果

種名	学名	分布特	採取場	感染	Vesicle	Arbuscule	感染度
オオバシロテツ	<i>Boninia grisea</i> Planch.	固有	MO1	+	+	+	中
オガサワラモク	<i>Boehmeria boninensis</i> Nakai	固有	MO1	+	+	-	低
ムニンセンニン	<i>Clerodendron terniflora</i> DC. var. <i>boninensis</i> (Nakai) Tuyama	固有	MO1	+	+	+	中
ヤロード	<i>Neisosperma nakaianum</i> (Koidz.) Fosberg et Sachet	固有	MO1	+	+	+	低
ユズリハワダン	<i>Crepidiastrum ameristophyllum</i> (Nakai) Nakai	固有	MO1	+	+	+	高
エダウチチヂミ	<i>Opisthomenus compositus</i> P.Beauv.	広域	MO1	-	-	-	-
シマザクラ	<i>Hedyotis grayi</i> Hook.f.	固有	MO2	+	+	+	低
シマホルトノキ	<i>Elaeocarpus photiniaefolius</i> Hook.et Arn.	固有	MO2	-	-	-	-
トキワイヌビ	<i>Ficus boninsimae</i> Koidz.	固有	MO2	-	-	-	-
ワダンノキ	<i>Dendrocacalia crepidifolia</i> (Nakai) Nakai	固有	MO2	+	+	-	高
エダウチチヂミ	<i>Opisthomenus compositus</i> P.Beauv.	広域	MO3	+	+	+	高
アカギ	<i>Bischofia javanica</i> Blume	外来	MO3	+	+	+	高
オガサワラスズメ	<i>Paspalum conjugatum</i> Bergius	外来	MO3	+	+	-	高
ハハジマノボタ	<i>Melastoma tetramerum</i> Hayata var. <i>varpentapetalum</i> Toyoda	固有	MO4	+	+	+	中
ハハジマノボタ	<i>Melastoma tetramerum</i> Hayata var. <i>varpentapetalum</i> Toyoda	固有	MO4	+	+	+	中
エダウチチヂミ	<i>Opisthomenus compositus</i> P.Beauv.	広域	MO4	+	+	-	低
エダウチチヂミ	<i>Opisthomenus compositus</i> P.Beauv.	広域	MO4	+	+	-	低
オガサワラスズメ	<i>Paspalum conjugatum</i> Bergius	外来	MO4	+	+	+	高
チトセラン	<i>Sansevieria nilotica</i> Backer	外来	MO4	+	+	-	中
トウロウソウ	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	外来	MO4	+	+	+	高
ハイニシキソウ	<i>Chamaesyce prostrata</i> (Aiton) Small	外来	MO4	+	+	+	高
ヤンバルツルハ	<i>Leucas chinensis</i> (Retz.) R.Br.	外来	MO4	+	+	+	高
タコノキ	<i>Pandanus boninensis</i> Warb.	固有	MO5	+	+	+	高
グンバイヒルガ	<i>Homoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	広域	MO5	+	+	+	高
ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	広域	MO5	+	+	+	高
シンクリノイ	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	外来	MO5	+	+	+	中
テリハハマボウ	<i>Hibiscus glaber</i> (Matsum. ex Hatt.) Matsum. ex Nakai	固有	MO6	+	+	-	高
モモタマナ	<i>Terminalia catappa</i> L.	広域	MO6	+	+	-	低
タコノキ	<i>Pandanus boninensis</i> Warb.	固有	MO7	+	+	+	中
テリハハマボウ	<i>Hibiscus glaber</i> (Matsum. ex Hatt.) Matsum. ex Nakai	固有	MO7	+	+	-	低
ハマナタマメ	<i>Canavalia lineata</i> (Thunb.) DC.	広域	MO7	+	+	+	高

3.3 考察

3.3.1 小笠原諸島での AM 菌の存在の確認

小笠原諸島で採取された植物の根を染色し、根の内部を観察することで 40 科 73 種のうち、65 種の根内で AM 菌の存在が確認された。日本国内の海洋島における AM 菌の存在を示した研究は本研究が初めてである。北海道や本州、沖縄での AM 菌の存在は既に確認されているので(江沢ら 2004)、国内にはほぼ全域に AM 菌が存在していると考えられる。

小笠原諸島は海底からの隆起によって誕生した海洋島であるため、誕生当時は地表には AM 菌をはじめ陸生生物のいない状態であったと考えられる。そのような海洋島での AM 菌研究は世界的に見ても少なく、例としてはハワイ諸島やガラパゴス諸島が挙げられるが、両諸島とも AM 菌の存在が確認されている(Koske and Gemma 1990, Steve et al. 1986)。AM 菌は、孢子、感染根からの外生菌糸、感染根との接触によってその分布域を広げる(Smith and Read 1997)。AM 菌の孢子は大きく(30-700 μ m)、また土壌中に形成されるため、他の真菌類の孢子と比べると散布力に乏しいといわれている(Molina et al. 1992)。AM 菌孢子は主に風によって運ばれると言われているが(Warner et al. 1987)、その報告によると連続した地表面での孢子的約 2km の飛散が確認されたのみであり、海域を挟んだ更なる長距離輸送に関してはまだよくわかっていない。本研究では、植物を採取した兄島、父島、南島、母島の4島すべてに AM 菌は存在していた。同様に、Koske and Gemma(1990)はハワイ諸島においても複数島で AM 菌感染を確認している。これらの結果は Mosse et al.(1981)が提唱した AM 菌の全世界的分布を支持する結果と言える。

3.3.2 植物の分布特性と AM 菌感染

小笠原諸島の固有植物種には、30 種中 26 種の根内で AM 菌が見られた。小笠原諸島固有属であるミカン科シロテツ属のオオバシロテツ *Boninia grisea* Planch., キク科ワダンノキ属のワダンノキ *Dendrocacalia crepidifolia* (Nakai) Nakai の両種ともに AM 菌の感染が見られた。ワダンノキは木化するキク科の常緑低木である。木本キク科アゼトウナ属の固有種ユズリハワダン *Crepidiastrum ameristophyllum* (Nakai) Nakai には高い感染率で AM 菌が確認された。ガラパゴス諸島においても木本キク科スカレシア属 *Scalesia pedunculata* に AM 菌感染が見られている(Steve et al. 1986)。小笠原諸島唯一の針葉樹の固有種であるヒノキ科ネズミサシ属のシマムロ *Juniperus taxifolia* Hook. et Arn. の根内にも AM 菌が見られた。

広域分布種、外来種にも同様に AM 菌は感染していた。外来種のうち、現在小笠原諸島の原生植生に甚大な悪影響を与えているものの代表であるアカギには高い感染率で AM 菌が感染していた。感染率は、一般に AM 菌と植物との親和性を示す指標であることから(Allen 1997)、アカギの島内での異常繁茂の原因のひとつとして AM 菌を効果的に利用している可能性が示された。

3.3.3 AM 菌感染の見られなかった植物

固有種でカヤツリグサ科のシマイガクサ *Rhynchospora boninensis* Nakai やムニンアンペライ *Machaerina rubiginosa* (Sol. ex G.Forst.) T.Koyama には AM 菌は感染していなかった。カヤツリグサ科は一般に AM 菌を感染させにくいと言われているが(小川 1987), 同科ムニンテンツキ *Fimbristylis longispica* Steud. var. *boninensis* (Hayata) Ohwi の根には高い感染率で AM 菌が感染していた。ホルトノキ科ホルトノキ属の固有種シマホルトノキ *Elaeocarpus photiniaefolius* Hook.et Arn.や、クワ科イチジク属の固有種トキワイヌビワ *Ficus boninsimae* Koidz.には AM 菌は感染していなかった。小川(1987)によると、ホルトノキ科およびクワ科は一般に AM 菌と共生することがわかっている。シマホルトノキおよびトキワイヌビワは母島境ヶ岳の MO2 地点で採取されたサンプルであるが、森田ら(2008)によると、この付近は土壌中の有効態リン酸が非常に高い値(100mg P₂O₅/100g 乾土 以上)で存在していることがわかっている。普通畑での基本値は 10mg~75mg P₂O₅/100g 乾土といわれている(尾和ら 2006)。土壌中に過剰にリン酸が存在すると AM 菌の活性が低下するという報告があるため(Allen 1997), 過剰なリン酸がこれらの植物に AM 菌感染がなかったことの原因であるかもしれない。小笠原では海鳥の糞の影響で土壌中リン酸濃度が偏在的に高まっていることが考えられるため、小笠原諸島の植生成立に AM 菌とリン酸がどのように関わってきたかを解明するためには、今後の更なる研究が必要である。

3.3.4 絶滅危惧種への AM 菌感染

小笠原諸島では 161 種の固有植物種が自生しているが、外来種蔓延等の影響で固有種 107 種がレッドリストに掲載されている。今回の調査ではその内の 27 種を採取できた。その中で絶滅危惧のカテゴリーレベルが一番高かったのはユズリハワダン(絶滅危惧 IA 類 (CR))で、ごく近い将来における絶滅の危険性が極めて高い種とされている。前述のとおりユズリハワダンには高い感染率で AM 菌が感染していた。他の絶滅危惧種に関しても、シマイガクサを除く全ての絶滅危惧種に AM 菌が感染していた。現在、東京大学大学院理学研究系研究科附属植物園(小石川植物園)において環境省の「希少野生動植物種保護増殖事業」として絶滅危惧種の保護育成が行われているが、小笠原諸島の土着 AM 菌の利用はされていないため、AM 菌の導入により育成施設内での絶滅危惧植物の成長促進効果が期待できる。今後は絶滅危惧種の幼苗への AM 菌接種のための土壌中孢子採取や、ポットカルチャーによるその孢子の純粋培養等の実験が必要である。

第4章

PCR-DGGE 法を用いた根内 AM 菌種の推定

AM 菌は孢子形態によって分類されているため、根内の菌体観察による AM 菌種の同定は不可能であり、根内 AM 菌の同定は rDNA を用いて行われている。根内には複数種の AM 菌が感染していることが多いため、根から抽出した rDNA の PCR 産物はダイレクトシーケンスには向かない。塩基長が同程度の DNA を塩基配列の違いによって分離できる DGGE 法 (Kowalchuk et al. 2002) を用いて、PCR 産物内の AM 菌 rDNA をクローンごとに分離し、得られた塩基配列を解読した。

4.1 実験 1 18S rDNA による AM 菌種の推定

分子生物学の分野で種の同定に広く用いられている小サブユニット (SSU, 18S) rDNA を対象にし、小笠原諸島の植物に共生している AM 菌種の同定を試みた。

4.1.1 方法

4.1.1.1 試料

第2章にて小笠原諸島の兄島、父島、南島、母島から採取した植物根を試料に用いた。採取した根は流水洗浄した後、更に超音波洗浄機で洗浄した。水気を拭き取り、乾熱器にて 40°C で 24 時間乾燥させた。島内ではシリカゲルを入れたチャック付きビニール袋内に乾燥根を入れ、常温で保存した。帰還後は -30°C の冷凍庫で保存した。本実験では、固有種であるタコノキ、シママロ、ムニンテンツキ、ヒメフトモモ、オオバシママラサキ、シマクマタケラン、ツルワダン、オオハマボス、ユズリハワダン、ワダンノキ、ハハジマノボタン、広域分布種であるグンバイヒルガオ、ハマゴウ、外来種であるモクマオウ、ギンネム、シンクリノイガ、アカギを使用した。

Table 4-1-1 rDNA での共生根内の AM 菌種推定に用いた植物サンプル

分布特性	種名	学名	採取地	
固有種	タコノキ	<i>Pandanus boninensis</i> Warb.	BR1, MO5, MO7	
	ヒメフトモモ	<i>Syzygium cleverifolium</i> (Yatabe) Makino	BR2	
	ムニンテンツキ	<i>Fimbristylis longispica</i> Steud. var. <i>boninensis</i> (Hayata) Ohwi	BR3, FA5	
	シマムロ	<i>Juniperus taxifolia</i> Hook. et Arn.	BR3 A, BR3 B	
	オオバシマムラサキ	<i>Callicarpa subpubescens</i> Hook. et Arn.	FA6	
	シマクマタケラン	<i>Alpinia boninsimensis</i> Makino	FA8	
	ユズリハワダン	<i>Crepidiastrum ameristophyllum</i> (Nakai) Nakai	MO1	
	ワダンノキ	<i>Dendrocalalia crepidifolia</i> (Nakai) Nakai	MO2	
	ハハジマノボタン	<i>Melastoma tetramerum</i> Hayata var. <i>pentapetalum</i> Toyoda	MO4 A, MO4 B	
	ツルワダン	<i>Ixeris longirostra</i> (Hayata) Nakai	SO1	
	オオハマボス	<i>Lysimachia rubida</i> Koidz.	SO2	
	広域分布種	グンバイヒルガオ	<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) Sweet	BR1, FA1, FA2, FA3, FA4, SO2, MO5
		ハマゴウ	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	BR1, FA1, FA4, MO5
外来種	モクマオウ	<i>Casuarina stricta</i> Aiton	BR1, BR3	
	ギンネム	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	BR1, FA3	
	シンクリノイガ	<i>Cenchrus echinatus</i> L.	MO5, SO2	
	アカギ	<i>Bischofia javanica</i> Blume	MO3	

4.1.1.2 根からの DNA 抽出と PCR

DNA 抽出キット(DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen)を用いて各採取根の乾燥重量約 20mg から DNA を抽出した. サンプルごとに2反復の抽出を行い, それらを混合し PCR の Template DNA として使用した. 抽出液は滅菌水で適宜 10~10000 倍希釈した. 根から抽出された DNA を用い, AM 菌 18S rDNA をターゲットとした nested PCR (Saito et al. 2001)を行った. 最初に真核生物を幅広く増幅できる AMV4.5F 及び AMV4.5R のプライマーペアで first PCR を行い, 次に AM 菌特異的な GC-AMV4.5NF 及び AMDGR のペアで second PCR を行った(佐藤ら 2006) (Table.4-1-1). 反応液は first PCR 時は 20 μ l, second PCR 時は 50 μ l で, それぞれ 1 \times PCR Buffer (Applied Biosystems), 2.5mM MgCl₂, 200 μ M each dNTP, 0.025U/ μ l の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 0.4 μ M の各プライマーに, first PCR では 2 μ l, second PCR では 5 μ l の Template DNA を加え反応させた. サーマルサイクラーは 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)を使用し, 反応プログラムは 95°C10 分, 94°C30 秒, 55°C30 秒, 72°C1 分を 30 サイクル, 72°C9 分と設定した.

Table 4-1-2 実験1で使用したプライマー

名称	塩基配列	方向	増幅領域	参考文献
AMV4.5F	5'-AATTGGAGGGCAAGTCTGG-3'	Forward	SSU	Saito et al. 2004
AMV4.5R	5'-AGCAGGTTAAGGTCTCGTTTCGT-3'	Reverse	SSU	Saito et al. 2004
AMV4.5NF	5'-AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3'	Forward	SSU	Saito et al. 2004
AMDGR	5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3'	Reverse	SSU	Saito et al. 2005
GC-AMV4.5NF	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGG- -GGCGGGGGCACGGGGGG(GC-clamp)- -AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3'	Forward	SSU	Saito et al. 2004

4.1.1.3 DGGE 法

PCR 産物を 20~40%の変性剤濃度勾配 (40%フォルムアミドと 7M 尿素を 100%とする)をもつ 8%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=37.5:1)で 60°C, 100V, 8 時間の DGGE を行った. DGGE には Dcode mutation detection system(Bio-Rad)を用いた. 泳動後, 臭化エチジウムにて染色し UV トランスイルミネーターでバンドパターンを撮影した. 明瞭なバンド

数を数えた。その際、次の結果 4.1.2.2 で得られた塩基配列のうち、AM 菌以外の菌類と推定されたバンドは除いて数えた。明瞭なバンドに関して、1000 μ l マイクロピペッター用チップを使いゲルからバンド片を PCR チューブに回収した。

4.1.1.4 DNA の精製

得られたバンド片を先述の PCR と同様の反応液濃度の容量 50 μ l にて PCR を行った。プライマーは AMV4.5NF 及び AMDGR のペアを用いた。PCR 産物の全量を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、300bp 付近の明瞭なバンドを滅菌メスで切り出した。FavorPrep GEL Purification Kit (Favorgen) を用い、ゲルから DNA を抽出した。

4.1.1.5 シーケンスと系統解析

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。塩基配列解読は DNA シーケンサー (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) で行った。得られた塩基配列はデータベース上の AM 菌の塩基配列とともに ClustalX (European Bioinformatics Institute, version 1.81) を用いてアラインメントし、neighbour-joining 法 (Saitou and Nei 1987) によって系統樹を作成した。系統樹の形態、ブートストラップ値、DGGE ゲルでのバンドの配置から系統型 (phylotype) を決定した。

4.1.2 結果

4.1.2.1 DGGE 法の泳動結果

18S rDNA をターゲットにした PCR-DGGE による電気泳動の結果を Fig. 4.1.1~Fig. 4.1.2 に示した。1レーンあたりの明瞭なバンド数の平均は、固有種 3.1 本、広域分布種 1.4 本、外来種 1.9 本となり、固有種が多い傾向を示した。

4.1.2.2 系統解析の結果

18S rDNA を対象にした PCR-DGGE 法で得られた 51 クローンの系統解析から、合計 19 系統が得られた (Fig.4-1-3)。19 系統のうち、14 系統 (GloS1~GloS14) が *Glomus* 属、2 系統 (AcaS1, AcaS2) が *Acaulospora* 属、1 系統 (DivS1) が *Diversispora* 属、2 系統 (UngS1, UngS2) が既知データとともにグルーピングされなかった。

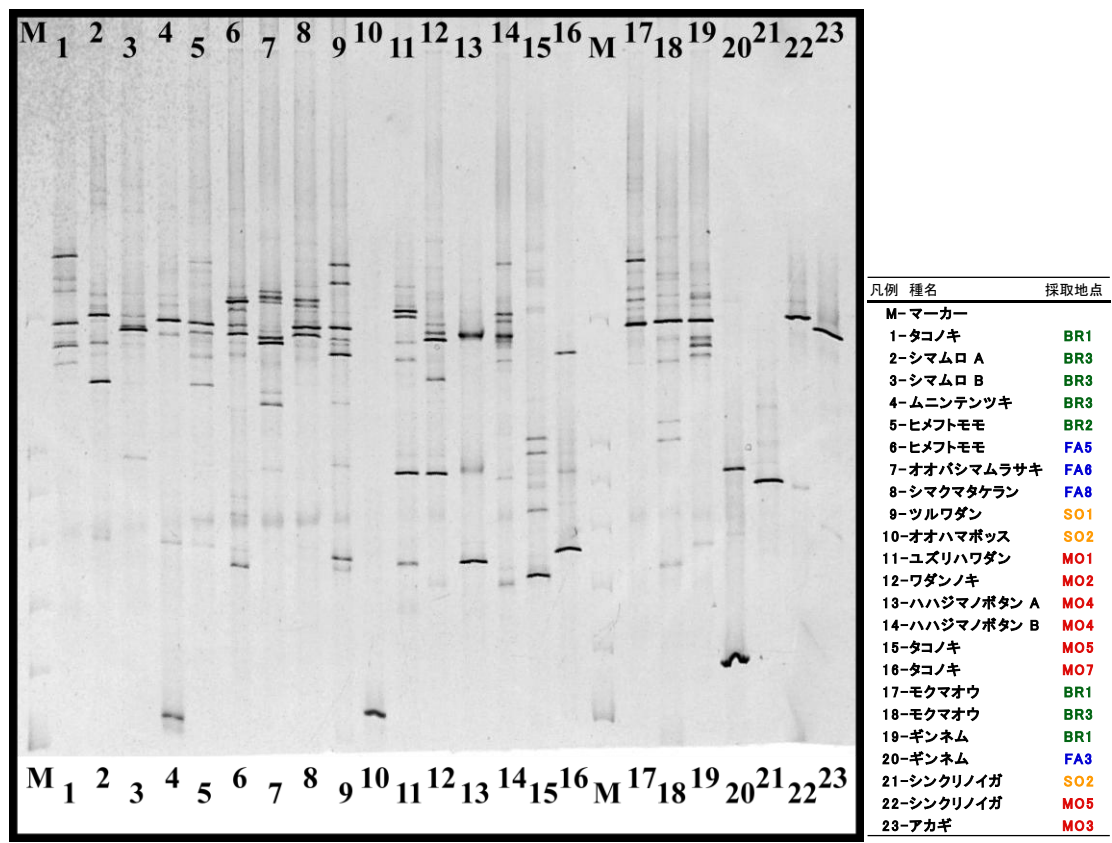


Fig. 4-1-1 18S rDNA の DGGE の結果(固有種, 外来種)

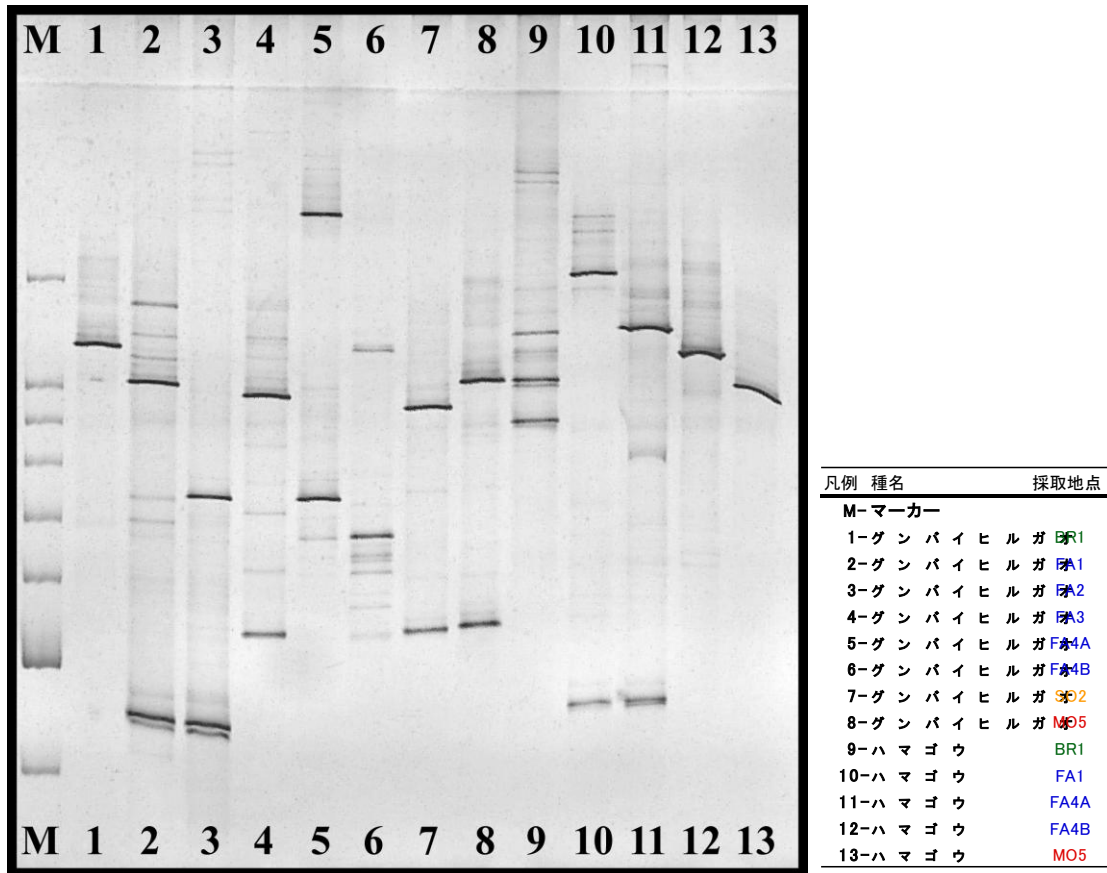


Fig. 4-1-2 18S rDNA の DGGE の結果(広域分布種)

4.1.3 考察

4.1.3.1 DGGE 法の考察

DGGE 法によって根内の AM 菌の複数種のクローンを分けることが出来た (Fig. 4-1-1, Fig. 4-1-2). ゲル中に分けられた AM 菌由来の DNA バンド数を比較すると, 固有種からは平均 3.1 本, 広域分布種平均 1.4 本, 外来種平均 1.9 本となった. バンドの数は感染している AM 菌の種数の目安となるため, 固有種には複数種の AM 菌が感染していることが考えられた. 一方, 外来種のアカギは出現バンドが 1 本であった. つまり, アカギには単一の AM 菌のみが感染していることが示唆された. アカギをサンプリングした地点は, 母島の桑の木山である. 桑の木山はほぼアカギの純林状態であり, 地上部のアカギが単一に増殖すると, 地下部の AM 菌相が単純化してしまうことが考えられた. 固有種には複数種の AM 菌が感染しやすいことから, アカギによる植生の単純化による影響は地下部にも及び, アカギを駆除しても地下部の AM 菌は単一なままであるので, アカギ駆除後の固有種の植え戻しの際に AM 菌の多様性低下により成長に悪影響を及ぼす可能性が考えられた.

4.1.3.2 系統解析の考察

18S rDNA を対象にした PCR-DGGE 法で得られた 51 のクローンから合計 19 系統が得られた. *Glomus* 属, *Acaulospora* 属, *Diversispora* 属の存在が示唆された. 中でも, *Glomus* 属が 14 系統ともっとも多かった. *Gigaspora* 属, *Scutellospora* 属は検出されなかった.

種名まで推定できたのは, GloS2, GloS3, GloS7 で, それぞれ *Glomus constrictum*, *Gl. viscosum*, *Gl. hoi* と推定された.

アカギには *Glomus* 属の 1 種 GloS4 が感染していた. GloS4 は 4 島全てのサンプルで見られ, 固有種にも感染していた. アカギに共生している AM 菌は小笠原諸島に広く分布している種であることが示唆された. アカギのパートナーとなりうる AM 菌が広範囲で見つかったことから, 今後の動態にも更なる注意が必要である.

一方で, 固有種のサンプルからのみ得られたグループも存在した (GloS7, GloS11, GloS14, UngS1). それらは固有種への感染に偏向性がある可能性がある. 今後の詳細な研究が必要である.

本研究で用いたプライマーペア AMV4.5F/AMV4.5R および AMV4.5NF/AMDGR は, nestedPCR により約 200bp の塩基配列を増幅できるが, 得られた塩基配列を既知種とともに系統解析をすると, ブートストラップ値というグルーピングの信頼性を示す値がやや低い値を示した. よって, 系統解析によるグルーピングの信頼性を向上させるため, より長い塩基長を解析に用いる必要性が示唆された. よって, 本章の実験 2 ではより長い塩基配列を増幅できる rDNA の 28S 領域をターゲットとした AM 菌の同定を試みた.

SSU rDNA

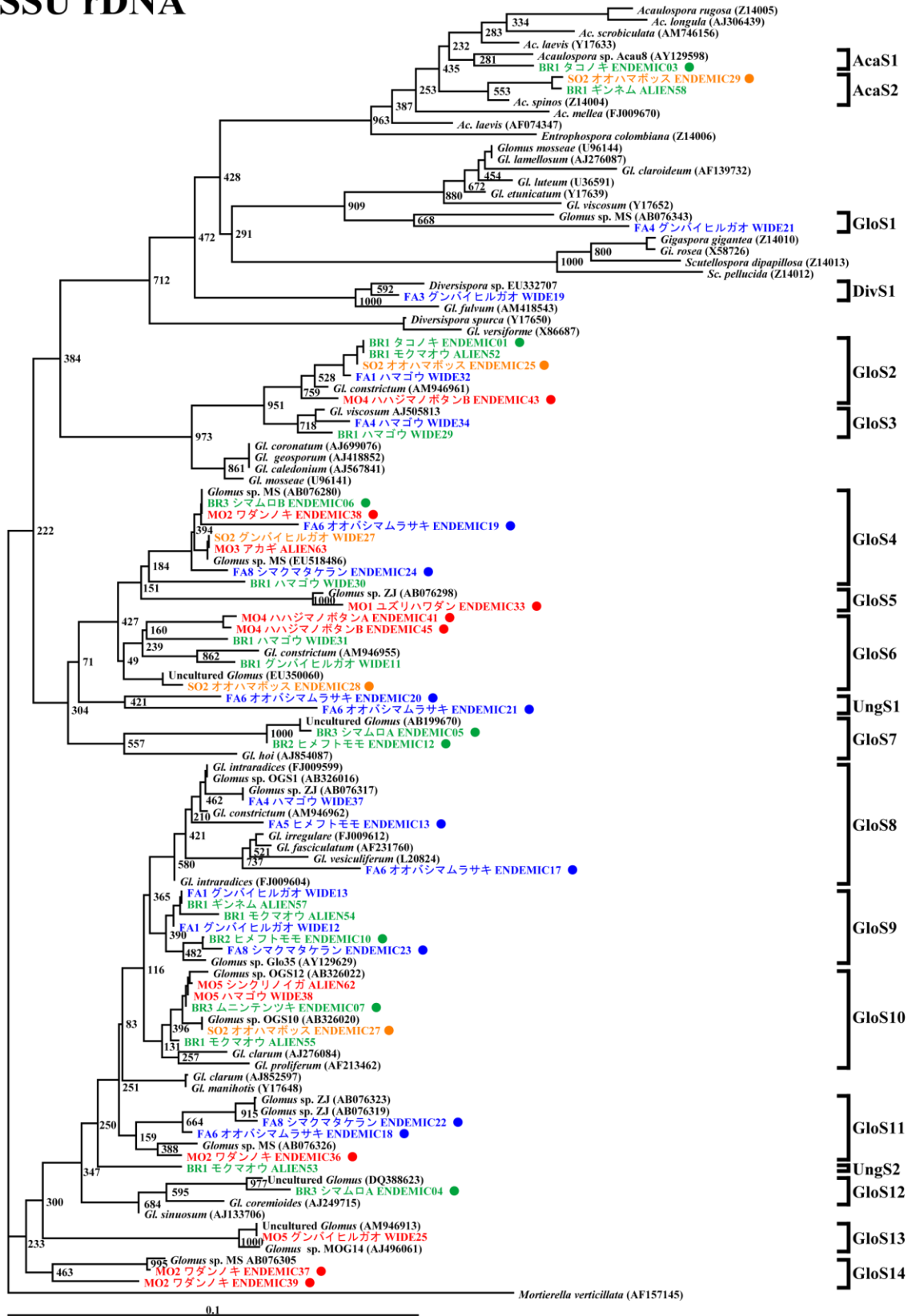


Fig. 4-1-3 18S(SSU) rDNA による AM 菌の系統解析 (●は固有種)

4.2 実験 2 28S rDNA による AM 菌種の同定

AM 菌系統解析での phylotype のグルーピング信頼度向上のため, 得られる塩基配列が実験 1 のものよりも長い大サブユニット(LSU, 28S)rDNA を対象にした AM 菌種の同定を試みた.

4.2.1 方法

4.2.1.1 試料

実験 1 で使用した DNA 抽出液のうち固有種の抽出 DNA を使用した.

4.2.1.2 AM 菌 28S rDNA の nested PCR による増幅

根から抽出されたDNAを用い, AM菌28S rDNAをターゲットとしたnested PCRを行った. 最初に真核生物を幅広く増幅できるLR1及び真菌のDNAを増幅するFLR2のプライマーペア (van Tuinen et al. 1998; Trouvelot et al. 1999) でfirst PCRを行い, 次にAM菌特異的なGC-FLR3及びFLR4のペア (Susana et al. 2008; Golotte et al. 2004) でsecond PCRを行った (Table.4-2-1). GC-FLR3は, Susana et al.(2008)によって初めてDGGE法に使われたが, GC-clampの配列部分が未発表であるため本実験で新たに設計した. 反応液はfirst PCR時は20 μ l, second PCR時は50 μ lで, 実験1と同様の組成で行った. 反応プログラムは95°C10分, 93°C1分, 55°C1分, 72°C1分を30サイクル, 72°C7分と設定した.

Table 4-2-1 実験2で使用したプライマー

名称	塩基配列	方向	増幅領域	参考文献
LR1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3'	Forward	LSU	van Tuinen et al. 1998
FLR2	5'-GTCGTTTAAAGCCATTACGT-3'	Reverse	LSU	van Tuinen et al. 1998
FLR3	5'-TTGAAAGGGAACGATTGAAGT-3'	Forward	LSU	Golotte et al. 2004
FLR4	5'-TACGTCAACATCCTTAACGAA-3'	Reverse	LSU	Golotte et al. 2004
GC-FLR3	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGG- -GGCGGGGCACGGGGG(GC-clamp)- -TTGAAAGGGAACGATTGAAGT-3'	Forward	LSU	*New designed primer

4.2.1.3 DGGE 法

PCR 産物を 30~50%の変性剤濃度勾配をもつ 8%ポリアクリルアミドゲルで 60°C, 100V, 8 時間の DGGE を行った. 泳動後, 臭化エチジウムにて染色し UV トランスイルミネーターでバンドパターンを撮影した. 明瞭なバンドに関して, 1000 μ l マイクロピペッター用チップを使いゲルからバンド片を PCR チューブに回収した.

4.2.1.4 DNA の精製

first PCRと同様の反応液濃度で, 得られたバンド片を 50 μ lにてPCRを行った. プライマーはFLR3 及び FLR4 のペアを用いた. PCR 産物の全量を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し, 380bp 付近の明瞭なバンドを滅菌メスで切り出した. FavorPrep GEL Purification Kit (Favorgen) を用い, ゲルから DNA を抽出した.

4.2.1.5 シーケンスと系統解析

実験1と同様にシーケンス反応を行った。得られた塩基配列から系統樹を作成し、*phylotype* を決定した。

4.2.2 結果

4.2.2.1 DGGE 法の結果

DGGE 法により 28S rDNA でも AM 菌のクローンが複数バンドとして現れ、それらを分離することが出来た。

4.2.2.2 系統解析の結果

28S rDNA を対象にした PCR-DGGE 法では 49 クローンから合計 13 系統が得られた。*Glomus* 属が 7 系統 (GloL1~GloL7), *Acaulospora* 属が 1 系統 (AcaL1), *Gigaspora* 属が 1 系統 (GigL1), 未分類の AM 菌である *Uncultured glomeromycete* が 2 系統 (UncL1, UncL2), 既知種が同じグループに入らなかった系統型が 1 系統 (UngL1), 既知種が同じグループに入らず、かつ既知種との塩基配列の相同性検索で類似配列が得られなかった系統型が 1 系統 (NosL1) 得られた。

4.2.3 考察

4.2.3.1 DGGE 法の考察

18S の解析のように他の菌類が混入することはなかった。28S rDNA をターゲットとしたプライマーペアを用いた結果、AM 菌検出能が向上したと言える。

4.2.3.2 系統解析の考察

LR1/FLR2 および FLR3/FLR4 のプライマーペアによる nestedPCR では約 350bp の塩基配列が得られた。ブートストラップ値は実験 1 の 18S のものよりも向上し、系統樹の信頼性が向上した。

28S では合計 13 系統が得られた。*Glomus* 属, *Acaulospora* 属は 18S の解析と同様に得られたが, *Diversispora* 属は得られなかった。一方, 18S では得られなかった *Gigaspora* 属が 28S では検出された。

種名まで推定できたものは GloL4 で, *Gl.microaggregatum* と推定された。この種は国内で新潟県の海岸でも見つかっている (Evelyn et al. 2006)。

NosL1 は既知種との相同性検索で類似配列が得られなかったが, 系統解析では *Glomus* 属と思われるグループに入った。つまり, NosL1 は新種の AM 菌である可能性が示唆され, 小笠原諸島の固有種であるかどうか興味が持たれる。

LSU rDNA

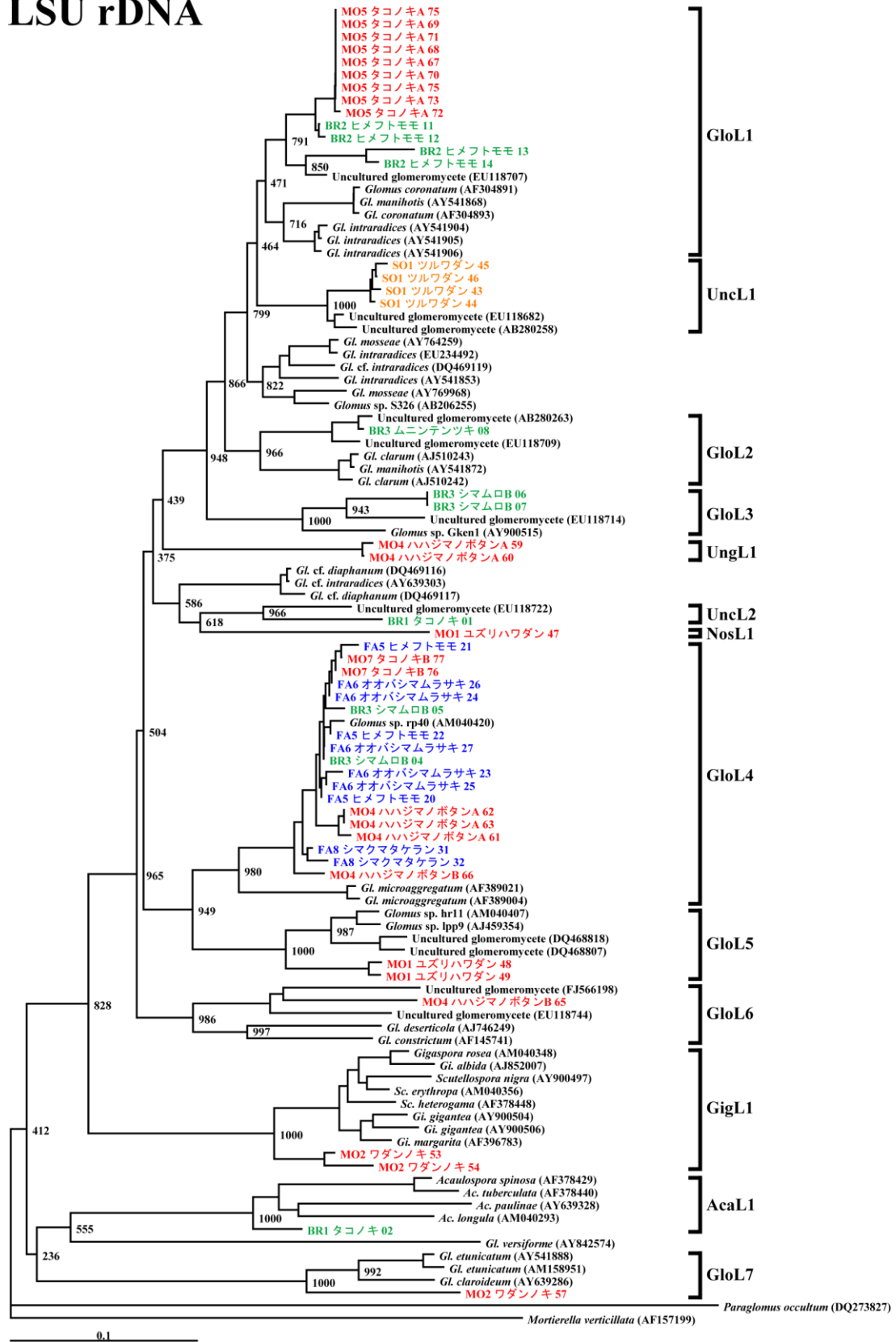


Fig. 4-2-1 28S(LSU) rDNA による AM 菌の系統解析

第5章 結論

ほとんどの絶滅危惧種に AM 菌が共生することが判明した。よって絶滅危惧種の保護育成に AM 菌導入が可能であることが示された。今後は AM 菌胞子を採取し、実際に絶滅危惧種保護育成への AM 菌導入に向けての接種試験が必要である。

海洋島での外来種の繁茂により、原生植生だけではなく地下部の AM 菌にも多様性の低下がもたらされることが考えられた。

いくつかの固有種には、固有種に偏向的に共生していると考えられる AM 菌種および、新種の AM 菌が共生していると考えられた。今後の小笠原による生物多様性保全において、「共生菌類の保全」という新たな観点も必要であると言えるのではないかと考える。

今後の展望としては、土壌中から AM 菌胞子を採取し、実際に絶滅危惧種の幼苗に摂取することが求められる。また、小笠原諸島だけでなく、他地域でも本研究のような AM 菌に着目した保全対策を進めていく価値はあると考える。

参考文献

- Abe Jun-Ichi P., Masuhara Gaku, Katsuya Keizo (1994) : Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coastal dune plant communities I. Spore formation of *Glomus* spp. predominates under a patch of *Elymus mollis*. *Mycoscience*. 35 :233-238
- Akiyama K. (2005) : Signaling molecules in symbiotic interactions between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY*. 46 :S4.
- An GH, Miyakawa S, Kawahara A, Osaki M, Ezawa T, (2008) : Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pioneer grass species *Miscanthus sinensis* in acid sulfate soils: Habitat segregation along pH gradients. *SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION*. 54 :517-528
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young (2001) : Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY*. 36 :203-209.
- Deepika Sharma, Rupam Kapoor, Ashok K. Bhatnagar (2008) : Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of *Curculigo orchioides* Gaertn. : an endangered medicinal herb. *World J Microbiol Biotechnol* 24 : 395-400
- 江沢辰広・斎藤勝晴・青野俊裕 (2004) :アーバスキュラー菌根における物質代謝と輸送 : 4億年前に確立された共生システムへの温故知"最新"的アプローチ. *日本土壤肥料学雑誌*. 75 :737-746
- Evelyn Matekwor Ahulu, Armelle Gollotte, Vivienne Gianinazzi-Pearson, Masanori Nonaka (2006) : Cooccurring plants forming distinct arbuscular mycorrhizal morphologies harbor similar AM fungal species. *Mycorrhiza*. 17 :37-49

Frank AB (1885) : On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15:267-275

Gemma JN, Koske RE, Habte M (2002) : Mycorrhizal dependency of some endemic and endangered Hawaiian plant species. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*. 89:337-345

Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004) : Diversity of mycorrhizal fungi colonizing roots of grass species *Agrostis capillaries* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14:111-117

Helgason T, Merryweather JW, Young JPW, Fitter AH (2007) : Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *JOURNAL OF ECOLOGY*. 95:623-630.

Isobe K, Aizawa E, Iguchi Y, Ishii R. (2007) : Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in upland field soil of Japan. Relationship between spore density and the soil environmental factor. *PLANT PRODUCTION SCIENCE*. 10:122-128.

Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, Grime JP, Young JPW, Read DJ (2004) : Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *NEW PHYTOLOGIST*. 161:503-515.

環境省(2007) :『哺乳類, 汽水・淡水魚類, 昆虫類, 貝類, 植物 I 及び植物 II のレッドリストの見直しについて』

Koske RE, Gemma JN (1990) : VA-MYCORRHIZAE IN STRAND VEGETATION OF HAWAII - EVIDENCE FOR LONG-DISTANCE CODISPERSAL OF PLANTS AND FUNGI. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*. 77:466-474

Kowalchuk GA, De Souza FA, Van Veen JA (2002) : Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *MOLECULAR ECOLOGY*. 11:571-581.

McGonigle T.P., Miller M.H. (1996) : Mycorrhizae, phosphorus absorption, and yield of maize in response to tillage. *Soil Sci. Soc. Am.* 60: 1856-1861.

Michael, F., Allen. (1991): *The ecology of mycorrhizae.* Cambridge University Press, New York. (マイケル・F. アレン 中坪孝之・堀越孝雄(訳)(1995). 菌根の生態学. 共立出版, 東京, 1-217)

Moline R., Massicotte H. Trappe J. M. (1992): Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis : community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal Functioning* (ed. M. F. Allen), 357-423. Chapman and Hall, London.

森田沙綾香・楠本良延・加藤英寿・岩崎亘典・大東健太郎・藤井義晴・平舘俊太郎(2008) 小笠原諸島の土壌における有効態リン酸の異常な蓄積. 2008年日本生態学会ポスター発表

森田 佳行(1981): 小笠原諸島の暗赤色を呈する森林土壌について(I): 環境条件, 形態, 粒径組成, ならびに一般化学性について. *日本林學會誌.* 63:1-7

Mosse B, Stribley DP, Letacon F. (1981) : ECOLOGY OF MYCORRHIZAE AND MYCORRHIZAL FUNGI. *ADVANCES IN MICROBIAL ECOLOGY.* 5: 137-210

小笠原自然情報センターホームページ(2009) : (<http://ogasawara-info.jp/> 2009.1.30 確認)

小川眞(1987): 作物と土をつなぐ共生微生物 : 菌根の生態学. 農山漁村文化協会. 1-241

尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦[ほか](2006) 肥料の事典. 朝倉書店. 207-218

Phillips JM, Hayman DS (1970): Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British. Mycological Society* 55 : 158

- Rodríguez-Echeverría, Susana de la Peña, Eduardo Moens, Maurice Freitas, Helena van der Putten, Wim H. (2008) : Can root-feeders alter the composition of AMF communities? Experimental evidence from the dune grass *Ammophila arenaria* Basic and Applied Ecology. In Press, Corrected Proof. 1-10
- Saito K, Nishiwaki A, Sugawara K (2001) : Nested PCR Amplification of Arbuscular Mycorrhizal Fungal 18 S rRNA Genes from Field-collected Roots. *Grassl Sci.* 47: 1-8
- 佐藤航一・斎藤勝晴・菅原和夫 (2006) : シロクローバ(*Trifolium repens* L.)とアーバスキュラー菌根菌の共生関係およびその群集構造に及ぼすリン酸施肥の影響 日本草地学会誌 54:333-340
- Smith SE, and Read DJ (1997) : *Mycorrhizal Symbiosis*, Second Edition. Academic, London 1-605
- Steve K. Schmidt, Kate M. Scow (1986) : *Mycorrhizal Fungi on the Galapagos Islands* *Biotropica*, 18:236-240
- 豊田武司 (2003): 小笠原植物図譜. アボック社, 鎌倉, 1-522
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijiri M, Gianinazzi-Pearson V (1999): Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei. 48 *Mycorrhiza* (2006) 17:37–49 of Glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8:203-206
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998) : Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7: 879-887
- Warner N.J., Allen M.F. and MacMahon J.A. (1987) : Dispersal agents of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a disturbed arid ecosystem. *Mycologia* 79: 721-730.

Wu BY, Hogetsu T, Isobe K, Ishii R. (2007) : Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. MYCORRHIZA. 17:495-506.

山下直子 (2002):小笠原に侵入した木本種アカギの生理生態と環境保全に関する研究.
北海道大学博士論文

Yamato M, Ikeda S, Iwase K (2008) : Community of arbuscular mycorrhizal fungi in a coastal vegetation on Okinawa island and effect of the isolated fungi on growth of sorghum under salt-treated conditions. MYCORRHIZA. 18:241-249

Yamato Masahide, Iwase Koji (2005) : Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in a warm-temperate deciduous broad-leaved forest and introduction of the fungal community into the seedlings of indigenous woody plants. Mycoscience. 46:334-342

謝辞

指導教員である東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻自然環境評価学分野 福田健二教授には的確なご指導ご鞭撻いただき本当に感謝しております。深く御礼申し上げます。東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻生物機能学分野 大澤雅彦教授, Zaal Kikvidze 准教授にはいつもアドバイスをしていただきました。ありがとうございました。

共同研究を引き受けてくださった東京都小笠原亜熱帯農業センター 小嶋禎夫所長には、大変感謝しております。同センターの皆様にも色々とお世話していただきました。ありがとうございました。

首都大学東京大学院理工学研究科生命科学専攻 可知直毅教授ならびに首都大学東京牧野標本館 加藤英寿助教には小笠原研究への多大なる助けとコメントを頂きました。ありがとうございました。同大学の石神さん, 藤沼くん, 森くん, 須貝さん, 島で調査を手伝ってくれてありがとうございました。

横浜国立大学大学院 深澤圭太氏, 日本自然保護協会 朱宮丈晴氏, 森林総合研究所 杉浦真治氏, 環境省自然公園指導員 延島冬生氏, 小笠原自然文化研究所 堀越和夫氏, 首都大学東京大学院 ダニエル・ロング准教授, 東京大学 大久保省良氏の皆様には小笠原での調査で大変お世話になりました。ありがとうございました。

東京大学大学院新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻 佐藤弘泰准教授, 押木守氏, には実験操作のご指導いただきました。ありがとうございました。

千葉大学大学院園芸学研究科土壌学研究室 坂本一憲准教授, 東京大学大学院農学生命科学研究科森林植物学研究室 呉炳雲氏, 新潟大学大学院自然科学研究科 野中昌法教授, 鈴木蘭氏, 武藤拓也氏, 海津朋之氏には AM 菌研究のことでいつも相談にのっていただきました。ありがとうございました。

本研究室小田あゆみ氏, 清水淳子氏, 橋詰洋介氏, 臼杵裕之氏, 小此木宏明氏, 松村愛美氏をはじめ, 機能・評価研の皆様には研究のご指導いただきました。ありがとうございました。

最後の最後まで一緒に頑張った松田くん, 米谷さん, お互い倒れなくて本当に良かったです。

お父さん, お母さん, えり, ばあちゃん, 巻じいちゃん, 巻ばあちゃん, 今まで育ててくれてありがとうございました。