

ISSN 2433-7196

# MANGROVE SCIENCE

Vol.8 2011



日本マングローブ学会  
Japan Society for Mangroves

---

# MANGROVE SCIENCE

---

## 日本マングローブ学会 Japan Society for Mangroves

第八卷  
2011 年 12 月

### 目 次

#### 追悼文

中村武久：菊池多賀夫先生の逝去を悼む .....	2
鈴木邦雄：中村武久先生の逝去を悼む .....	3

#### 総説論文

菊池多賀夫：マングローブ植生と立地の地形特性：日本，ミクロネシア，フィリピンにおける調査から .....	5
--	---

#### 原著論文

Ai Hasegawa, Shinji Hayashi, Asami Kurita, Fumiki Kaai, Yoshifumi Kawana, Takeshi Fukumoto and Hamako Sasamoto : Stimulatory and inhibitory effects of abscisic acid on cell growth in protoplast cultures and the relation to its endogenous levels in Avicenniaceae mangrove cells .....	11
Janine Caynap and Katsuhiko Kondo : Analysis of the genetic diversity between plantation grown and natural grown <i>Kandelia obovata</i> by the inter-simple sequence repeats (ISSR) method .....	19

#### 書 評

皆川 礼子：マングローブ環境物理学 松田義弘 著 .....	27
--------------------------------	----

#### 資 料

平成 22 年年度総会報告 .....	29
平成 23 年年度総会報告 .....	31

平成 22 年度日本マングローブ学会大会プログラム .....	34
---------------------------------	----

平成 23 年度日本マングローブ学会大会プログラム .....	35
---------------------------------	----

日本マングローブ学会会則 .....	36
--------------------	----

MANGROVE SCIENCE 投稿規定・執筆要領 .....	37
----------------------------------	----

## 菊池多賀夫先生の逝去を悼む

中村武久

日本マングローブ学会の副会長、前横浜国立大学教授の菊池多賀夫先生には、去る8月29日永眠されました。先生のこの訃報に接した時、私は先生の急逝に只々びっくりしたのですが、後で伺うところ、一昨年辺りから腸のポリープを切除していたのが、進行して癌になり、このところあちこちに転移していて、遂に帰らぬ人となられたとのことでした。それを伺った時驚いたのは、昨年のマングローブ学会大会にも元気でお出でになっていましたが、そんな様子は全く見せませんでした。普段から温和で芯の強い先生のことですから、そんな状態を人には感じさせないようにしておられたのだと思います。

私にとって先生は年齢こそ若いのですが、何を隠そう、私が東北大学の飯泉茂先生に学位論文を提出した時、当時菊池先生は助教授として飯泉先生の下に居られ、私の論文の実質的な査読者であり、指導者でありました。論文の草稿を見てもらいに時々先生の研究室へ伺った折、私がやっていたミクロネシアや東南アジアのマングローブのお話を致しました。そのようなご縁から先生のマングローブ関連の研究も始められたように記憶しております。

何時のことだったか、先生がマングローブ調査で、南太平洋のボナベ島やコスラエ島に行かれ、そこで採集されたマングローブの標本数枚と、私の論文で御承知であったのか、マングローブ林には見られないシダの標本を30枚ほど送ってこられ、同定してくれと言うことでした。早速同定し、ご返事を差し上げましたが、この時こそ、先生の本当に優しいというか、思いやりの心を持った人柄を実感しました。

日本マングローブ学会を組織してから、先生は学会員として協力していただき、更には2000年からは、副会長として学会の運営ならびにマングローブ関連の研究指導に当たっていただきました。先生の専門は生態学でしたが、特にマングローブの生態については、地形や潮の流れ等、マングローブ立地との関係について、大変優れた研究成果を残しておられます。

私より若い先生が逝かれたことは、なんとも寂しい限りであります。マングローブ学会にとっても、大変大事な指導者を亡くしたことは、なんとも残念です。深く御冥福をお祈り申し上げます。

## 中村武久先生の逝去を悼む

鈴木邦雄

去る 2011 年 11 月 29 日に、前会長・中村武久先生がご逝去されたという悲しいニュースが届きました。本学会誌が印刷直前になっていましたが、特にお願いして、追悼文を掲載させていただきました。本追悼文は、12 月 3 日に行われた告別式にて、不肖の弟子・鈴木邦雄が読み上げた「弔辞」です。

### 弔 辞

中村武久先生あまりにも突然の訃報に接しまして、私をはじめ国内外の多くのマングローブ研究者・植物学関係者は深い悲しみに包まれております。ひと月前の 11 月 5 日に東京農業大学でマングローブ学会総会が開催された際には、体力的に厳しいにもかかわらず、無理をして、きっと無理されて役員会に出席いただきました。「鈴木さん」というお言葉もかけていただき、マングローブ研究への変わらぬ情熱を語られておりました。

それから間もない 11 月 29 日に、あまりにも思いがけない訃報が届き、ただただ驚き、悲しみの念に打ちひしがれ、残念な思いで一杯です。突然の出来事にご遺族・ご親族のご心中はいかばかりかと、お察しするに余りあるものがあり、お慰めする言葉もございません。多くのマングローブそして植物学研究者を代表し、ここに謹んで中村先生にお別れを申し上げます。

私から改めて申すまでもなく、1980 年頃から故杉二郎先生とそれを支える中村先生らが中心となり、タイと日本のマングローブ共同研究プロジェクトを始められ、その後、日本マングローブ協会と日本マングローブ学会を立ち上げなさいました。日本マングローブ学会の二代目の会長として中村先生が、日本の多くの研究者をまとめて、マングローブ研究の普及啓もうと発展にご尽力いただきました。中村先生は、長い間シダ植物、ミクロネシア・アジアの植物の研究をされており、その延長上にマングローブ研究があるとも話されておりました。

『バナナ学入門』、『マングローブ入門』、『ポナペーその自然と植物』などの著書からもわかるように学問の幅が広く、最近まで足場の悪い湿地のフィールド調査を続けられていました。これまで数えきれないほど頻繁にタイを訪ねておられ、タイには多くのお弟子さんがおります。中村先生もこよなくタイの皆さんを愛されていました。そして、故サンガ先生、サニット先生をはじめとする世界中のマングローブ関係者からは、温情あふれるお姿で接することで、強い人間的信頼を得ておりました。

個人的なことですが、30 年前から何度も熱帯の調査研究にお声をかけていただき、数多く海外調査にご一緒させていただきました。中村先生と二人だけでミクロネシアからオセアニアにかけて 6 か国を 14 日かけて調査したり、フィジーでは遭難をしたり、時には豪快な釣りをさせていただきました。熱帯の植物名を知らなかった私は、そのたびごとに個人指導をいただいた幸せ者でした。中村先生もお酒は強くな

かったですが、ステーキが特に好きで、私も一緒にするたびにお相伴にあずかった次第です。これからは、博学の中村先生から温かい個人指導を受けられなくなり、今は心が沈んでおります。

日本が中心となり、日本がスポンサーとなり、マングローブの調査研究そしてマングローブの再生へ、熱心に取り組んでおられ、多くのお弟子さんを養成された中村武久先生の足跡には、多くの学ぶべきものが含まれております。

中村先生、先生の大きなご功績に心より敬意を、温情に感謝を表すとともに、残された私どもは、深く哀悼の意をささげ、中村先生のご遺志に答えてマングローブ研究・植物学研究の一層の発展に尽くすことをお約束申し上げます。

悲しみに措辞ととのわず、意を尽くせませんが、お別れを申し上げなければなりません。中村先生、本当にありがとうございました。天上から、ご遺族の皆様の将来とともに、先生が育てられたマングローブ研究・熱帯植物研究の発展を温かく見守っていただきたいと存じます。ご指導ありがとうございました。どうか、安らかに眠りください。

# マングローブ植生と立地の地形特性:日本, ミクロネシア, フィリピンにおける調査から

菊池多賀夫

## Mangrove vegetation and landform features of the habitats: a review of the author's research in Japan, F. S. Micronesia and the Philippines

Takao Kikuchi

**Abstract:** This paper presents a review of the author's research on mangrove vegetation and its associated habitats in Japan, F. S. Micronesia and the Philippines. An alluvial plain mangrove site was studied in Japan and its sedimentation and erosion histories were described in relation with sea-level changes. Longitudinal-scale (along the river) mangrove habitats were differentiated through such long-term landform process, whereas transverse-scale habitats were differentiated within longitudinal habitats by current sedimentation of organic and inorganic fine materials imported from river and tidal channels. Mangrove vegetation is affected by the habitat controls operating at both scales. Mangrove forests supported by a peaty habitat were also examined in F. S. Micronesia and the Philippines. The habitat of these forests was maintained by accumulation of organic materials provided by the trees themselves in spite of a sea-level rise from approximately 2000 to 1000 years ago.

**Keywords:** habitat, mangrove, peat, scale, sedimentation

### 諸言

生産活動も居住も平野を中心に展開してきた日本では、土地利用でも環境管理でも、また自然保護でも、まず取り上げられるのは平野であり、その自然的特性、構造への十分な理解が求められる。環境への関心が急激に高まった1970年代、著者らはそのように考え、平野を対象とする植生・立地の研究を思い立った。しかし、日本は水田にイネを栽培して発展してきた国である。すでに平野は隅々まで開発しつくされ、研究の場を探そうにもほぼ不可能である。唯一探しあてたのが沖縄県西表島仲間川下流の沖積平野で、ここで、沖積平野の自然の成り立ちを植生と地形との両面から理解しようとする研究を立ち上げたが、すくなくとも当初、筆者らの関心は沖積平野の自然的成り立ちに向いていて、かならずしもマングローブではなかった。とりあげた沖積平野の植生がたまたまマングローブだったということである。以後、マングローブ植生とその立地、特に地形要因の研究にかかわることとなり、菊池ほか(1978, 1980)、菊池(1995)、Kikuchi(1995)、Kikuchi et al.(1999)などに報告してきた。それらにもとついて研究の概要をふり返ってみたい。

### I. 立地の地形動態とマングローブ植生:

#### 仲間川下流沖積平野の調査

この沖積平野は縦断方向(上-下流方向)に3 km、横断方向に最大1 kmほどの広さで、上流部のセミマングローブ林を含めてほぼ全面が自然状態のマングローブ林に覆われている。ひとつの沖積平野の自然構成を、ほぼ原形

のままに見ることができる調査地であった。上流側は流路ぞいに自然堤防をとまなう氾濫原で、セミマングローブにあたるサガリバナ林が成立している。下流側にはデルタが展開し、オヒルギ、ヤエヤマヒルギのマングローブ林に覆われている。その先は河口湾が海に向かって開き、沿岸とデルタ先端部にはマヤブシキとヒルギダマシが顕著なマングローブ林が見られる(菊池ほか 1978, 1980)。

### 1. 仲間川下流沖積平野の地形変遷:

#### 縦断スケールの立地分化と植生

沖積平野を形成する堆積作用は海面の高さに同調して進むので、先端は海面付近の高さに広がる平坦な堆積面をつくりながら拡大し、デルタ(三角州)が形成される。しかし、海面の水準はかならずしも一定ではない。長期的には変化し、それにつれて堆積面は時に陸化して侵蝕を受け、時には海底に沈んでその上にあらたな堆積が進むことになる。

仲間川のデルタの地表は厚さ1 - 2m程度の細粒物(粘土、細砂)の堆積層で、ここには有機物が豊富に含まれるが、その下に、無機質な細粒物質の堆積層が普遍的に分布していた。この層は貝殻片を含む海成の堆積層で、一部は有機質層を突き抜けて地表に露出し、デルタ面に微高地をなして散在している。この事実から、かつて海は現在のデルタ域まで陸側に入り込み、海底でも現在のデルタ面よりも高かったことがわかる。上流の氾濫源域でこれに対応する堆積層は陸成相を示しているの、この時の海進は氾濫原の地域には及んでいなかった。この海成

堆積層の上の面には明らかな凹凸がある。この層が海底に形成された後、海面は低下し、海底が離水（陸化）して侵蝕を受けたしるしである。その後海面はふたたびわずかに上昇し、侵蝕された低地を埋める形であらたな堆積が進み、現在のデルタを形成した。こうして現在のマングローブ林の環境が整えられたが、海退の時の削り残しが上記の微高地で、そこだけはアダン林が成立し、デルタの植生をやや複雑にしている（菊池ほか 1978, 1980）。

以上の変遷を菊池ほか（1978, 1980）は縄文海進を想定して述べているが、特に確証にもとづくわけではなかった。西表島の別の地域で、2000 年から 1000 年前に向かって海面が上昇し、1000 年前頃に相対的な海面低下があった事が指摘されており（Fujimoto and Ohnuki 1995）、あるいはこの海水準の変遷がかかわるものかもしれない。いずれにしても、海水準の変動を含む長期的な過程が深くかかわって縦断方向（河川流路の方向）の立地の分化が生まれていることは確かで、本稿ではこれを、次に述べる横断スケールの立地分化にたいして縦断スケールの立地分化と呼びたい。

## 2. 搬入物質の堆積：横断スケールの立地分化と植生

デルタには仲間川本流やその支流が流れ、ほかにも潮汐の出入りで刻まれる浅い水路がある。これらの水路から船で観察するかぎり、このデルタの主要なマングローブはオヒルギのように見える。しかし、デルタ面上に踏み込んでみると、そこにはヤエヤマヒギ主体のマングローブ林がある。植生図で見るとデルタ中心部にヤエヤマヒルギ林があり、これを縁取るように陸側の縁辺部や水路沿いにオヒルギ林が多い（菊池ほか 1978）。デルタの表面では水路を通じて搬入される物質やマングローブ自身の生産物（泥炭）の堆積が現に進行しており、メキシコ湾南岸のデルタで Thom (1967) が詳細に述べたように、その堆積が微細な立地の分化につながる。仲間川のデルタでも水路を通じて搬入される浮遊物質の堆積が進行しているが、堆積は流路沿いに集中する傾向を示し、その背後には及びにくい。その結果、この作用による堆積地が、言わばデルタを“修飾”するように流路沿いに発達していた（菊池ほか 1978）。これは現に進行しているデルタ内部の立地分化である。

前節の縦断スケールの立地分化は基本的には掃流物質の堆積によるデルタ、広くは沖積平野の発達にともなうものである。これに対して上記の流路ぞいの堆積はすでに成立したデルタの上にもたらされる浮遊物質の堆積で、現に進行しているものである。この堆積による立地の分化を、本稿では横断スケールの立地分化とよびたい。

## 3. マングローブの配列構造：

### スケールの異なる二つのゾーネーション

水域（海水・汽水）と陸域との境界域に成立するマングローブ植生の様態は、ゾーネーションとして捉えられることが多い。Watson(1928)はそうした研究の先駆的、古典的成果で、潮汐による冠水の頻度、それを生み出す土地の比高との関係でゾーネーションを捉え、水路からデルタ面にかけて連続的、直線的に高くなる土地を想定し、その上に展開するマングローブの交替を示した。Mochida et al. (1999) がマレー半島のマングローブのゾーネーションを潮位を目安にして示したのも同じ捉え方である。これらは条件の変化に対するマングローブ種や群落の応答を抽象化して示すもので、現実の空間に展開する植生の姿を直接あらわすわけではない。菊池ほか（1978, 1980）が仲間川で得た地形断面・植生配置図をみると、オヒルギ林が優占するデルタの面は直接水路に接していて、水路側に低い土地は付随していない。仲間川でも低い土地はあり、メヒルギ、ヒルギダマシ、マヤブシキなどが生育するのは事実だし、そうした例をつないで理想化すれば、かつて宮田・小谷（1963）が示したように直線的な傾斜にそったゾーネーションを示すことはできる。しかし、それらの低い立地は水路の中の中州や寄り州、拡大中のデルタ先端などで、デルタの面に直接連続するものではない。そのような不連続性も注目すべき立地の特性である。

Macnae(1968)は、立地特性の軸上に展開させるのではなく、類型化したマングローブ林そのものの配置をゾーネーションと捉えた。これももう一つの古典的研究である。前節で、流路沿いに集中する搬入物質の堆積をデルタの“修飾”と例えたが、修飾をとり払ったデルタの本体は流路間のより無機質な物質の堆積地で、そこにはヤエヤマヒルギが優占している。ここは Macnae(1968) の *Rhizophora*（オオバヒルギ属）帯にあたることになる。その上流側に位置するはずの *Bruguiera*（オヒルギ属）帯はデルタの上流側の縁にせまく見られるオヒルギ林がそれで、さらに上流側の陸側縁辺に当たるのはサガリバナ林である。下流側では、デルタの末端部にマヤブシキがめだつ小林分がみられ、これは *Sonneratia*（ハマザクロ属）帯にあてることができる。並べれば仲間川のマングローブでもこのようになるが、ただし、各ゾーンは同じ幅をもってはいるわけではない。デルタの大半は *Rhizophora* 帯が占めており（オヒルギ林の“修飾”はある）、ほかのゾーンはさして広くない（菊池ほか 1978, 1980）。

デルタは海面を基準とする堆積によって形成されるので、基本的には海面付近の高さに一様に広がる土地である。その限りでは立地としての一様性が高く、特定のタイプの群落が広くひろがるための条件をそなえている。フィリピンのボホール島に、海側にせまくヒルギダマシ属のゾー

ンがあるほかは大部分がニッパヤシでおおわれた沖積平野がある。ボーリング調査の結果、地下には泥炭が広く存在していることがわかっており (Fujimoto et al. 1995), かつてはおそらくオヒルギ属やオオバヒルギ属主体のマングローブ林があったのであろう。その泥炭を覆う粘土質の堆積を基質にして本来陸側縁辺にあるはずのニッパヤシがデルタ上にひろがったと推定される。C-14 年代測定では 400 年から 500 年前ころのことで (Fujimoto et al. 1995), このような出来事にしてもデルタの大半にわたって均一に広がっている。空間的ひろがりや植生や景観の重要な属性である。ゾーンや群落の配置に不均等があれば、それにも意味がある。そのような意味を地形的構造を背景にして理解することが著者らの主要な課題のひとつであった。

以上の記述にはスケールの異なる 2 つのゾーネーションが含まれている。1 つは海から陸への群落の交替で、他の 1 つは水路に直行する方向の交替である。それぞれ縦断スケールの立地分化、横断スケールの立地分化にそって展開するものなので、本稿ではそれぞれ縦断スケールのゾーネーション、横断スケールのゾーネーションと呼びたい。横断スケールのゾーネーションの内容は縦断方向の位置によって変わるはずで、例えば仲間川では、横断スケールにおけるゾーネーションの最前線の種が、河口部ではヒルギダマシやマヤブシキ、内陸部ではメヒルギというように変わることが観察される。マングローブ植生の全体像を的確に理解するためには、両スケールの配列構造を分けて認識し、その上で両者を統合的に表現することが求められる。中村 (2010) がマングローブ林の配分・分布を上流-下流の軸と河川-内陸の軸からなる座標上に示したのも同じ考え方であろう。

## II. 海面の上昇とマングローブの応答： ミクロネシア・フィリピンの調査

昨今、懸念されている地球温暖化の影響の 1 つに海面（海水準）の上昇がある。マングローブの生育は平均海面から高潮位までの範囲におよそ限られるので、海面が上昇すると今あるマングローブ林は水没・消滅するのではないかと危惧されるのである。しかし、海面の上昇はこれまでの地球の歴史に幾度となくあった。そのような時に、マングローブ泥炭の集積が海面上昇に拮抗して地盤を高め、マングローブ林が維持されてきた事実がある。そのようなマングローブ林を、ミクロネシアとフィリピンで調査した。

### 1. 調査地のマングローブ林と泥炭層

ミクロネシアではボンベイ島とコスラエ島、フィリピンでは中部のボホール島で調査を行った。各島から多様な植物群落が記録されているが (Mochida et al. 1995,

Mochida et al. 2006), Kikuchi et al. (1999) は 3 島を通しての比較から 6 群落タイプにまとめた。そのうちニッパヤシ群落とサガリバナ林は陸側縁匹の無機的な立地のセミマングローブ林である。残り、ヤエヤマヒルギ林、フタバナヒルギ-ヒルギダマシ林、マヤブシキ-オヒルギ林、ハウガンヒルギ-オヒルギ林と呼んだタイプは真正のマングローブ林である。そのうち、ヤエヤマヒルギ林の立地は無機的で、泥炭地ではない。フタバナヒルギ-ヒルギダマシ林はおおむね 0.5 m 以下の比較的薄い泥炭層、マヤブシキ-オヒルギ林はやや厚い 0.5 m から 1 m 前後の厚さの泥炭層、ハウガンヒルギ-オヒルギ林は 1.5 m 程度からそれ以上に達する厚い泥炭層の上に成立している (Fujimoto et al. 1995, Fujimoto et al. 1996)。

泥炭地は主に未分解の有機物からできており、無機物質の堆積がさかんな土地では形成されにくい。調査したマングローブ林はいずれも島嶼の礁湖沿岸に発達したもので、陸地から直接供給される物質には乏しい立地である。

### 2. 海水準の上昇とマングローブ泥炭の形成、立地の維持

マングローブ泥炭の形成は、原則的に、マングローブの生育範囲に準じて平均海面の高さから始まり、高潮位付近で上限に達する。泥炭はマングローブ自身の生産物で造られ、マングローブはそれを基質にして生育するからである。ミクロネシアの潮位差は 1.5 m 程度で、期待できる泥炭層の厚さは単純に計算してその半分、0.75 m 程度ということになる。フタバナヒルギ-ヒルギダマシ林やマヤブシキ-オヒルギ林の泥炭層の厚さは、おおむねこの範囲におさまる。しかし、ハウガンヒルギ-オヒルギ林の泥炭層はこれを超えて 1.5 m から 2 m にも達する。底部はマングローブが生育できる下限潮位よりもはるかに下にあり、その泥炭の C-14 年代値はおよそ 1800 年前であった (Fujimoto et al. 1996)。当時のマングローブはその高さに生育していたはずなので、海面もその高さにあったことになる。その後海面は現在の高さまで上昇し、その上昇分を泥炭が埋めることによって立地が維持され、現在に至った (Kikuchi et al. 1999)。フタバナヒルギ-ヒルギダマシ林やマヤブシキ-オヒルギ林の薄い泥炭層では底部で 700 年前から約 500 前の年代であった (Fujimoto 1996)。

Kawana et al. (1995) は、コスラエ島について、このような泥炭の情報やサンゴ片の年代測定値、ビーチロックやベンチなどの地形学的痕跡などを総合して、海水準の変動史を明らかにしている。それによると約 3700 年前頃に現在よりも 1 m ほど高かった海面がその後低下に向かって約 2000 年前頃には現在よりも 2 m 近く低くなり、その後はふたたび上昇に転じて約 700 年前頃にはほぼ現在と同じ高さに達した。この経緯をふまえると、現在ハウガンヒ



ルギー・オヒルギ林が成立している立地には約 2000 年前にすでにマングローブ林が存在し、その後の海面の上昇は泥炭の埋積でしのいで立地を維持し、約 700 年前以降は現海面のもとに安定に継続してきたことになる。フタバナヒルギー・ヒルギダマシ林とマヤブシキ・オヒルギ林の立地は現海面のもとに形成されたものであった。

泥炭層の厚さと C-14 年代値から単純に割り出した泥炭の平均的な堆積速度は、多くの報告と同程度で約 2 mm/yr. であったが、短期的には最大 4-5 mm/yr. という値が得られた (Miyagi et al. 1995)。

### 3. マングローブ林の遷移

ミクロネシアのマングローブの遷移については古く今西・吉良 (1944) が論じ、Hosokawa et al. (1977) もこれを紹介している。アマモ社会 (沈水植物社会) から始まってヤエヤマヒルギ・フタバナヒルギ林が成立し、マヤブシキ優占林を経て、または直接、極相林としてのハウガンヒルギ・マヤブシキ・オヒルギ林に到達するというものであった。途中相とされるマヤブシキ優占林は概略的に本稿のマヤブシキ・オヒルギ林に相当するものようであるが、そうだとすればこのタイプのマングローブ林はすでに安定した海水準のもとに 500 年またはそれ以上の期間を経ている (上述)。一方、ハウガンヒルギ・オヒルギ林はたしかに 2000 年の歴史を経ているが、立地の厚い泥炭層は海水準の上昇なくしては形成されなかった。マヤブシキ・オヒルギ林の 500 年の過程を 1000 年、2000 年に延ばしても、海水準が一定であるかぎり厚い泥炭層の発達はある得ない。それでも時間とともにハウガンヒルギ・オヒルギ林に替わっていくのか、または厚い泥炭層が形成されない以上、後者の実現はないのか。この点はいずれとも決することはできないが、すでに 500 年の歴史をもつマヤブシキ・オヒルギ林を遷移の途中層と見ることが妥当かどうか。今西・吉良 (1944) も論じているように、それぞれ並立的に安定して存在しているものとみるのが実態に則しているのではなかろうか。

今西・吉良 (1944) はパイオニアとしてヤエヤマヒルギ・フタバナヒルギ林をあげたが、Chapman (1976) は、これに加えて砂質の土地のパイオニアとしてマヤブシキをあげている。Ishihara et al. (2006a) が礁湖内に形成された平均海面より 20 cm 程度高い砂州に定着したマヤブシキの実生・幼樹個体群を報告しているのはそれに当たるであろう。そのように発生したマヤブシキ個体群にはその後、ヤエヤマヒルギやオヒルギが加わり、マヤブシキ自体は、種子からの新たな芽生えはないものの伏枝からの萌芽によって幹数を増やしていく。こうして混交林が形成されていくことを (Ishihara et al. 2006b) が報告している。

### おわりに

マングローブの立地を堆積作用や泥炭の集積の視点から解明する研究は Thom (1982), Woodroffe (1992, 1999) などによって進められ、Miyagi (1995, 1999), Fujimoto (1995, 1996, 1999) らも取り組んでいる。これらによって完新世の海水準変動がかかわる長期的なマングローブ立地の形成、動態に関する研究が大きく進展しており、著者らが当初めざした沖積平野の植生、その一部をなすデルタの植生 (マングローブ植生) の十分な理解のために喜ばしい状況が形成されている。今後のさらなる発展のために、生態学的時間で現に進行している横断スケールの立地分化、それに対する生物の応答を加えた 3 者をバランス良く取り上げた研究の展開を期待したい。

### 引用文献

- Chapman, V. J. (1976): Mangrove Vegetation, J. Cramer, Vaduz. 447pp.
- Fujimoto, K. and Y. Ohnuki (1995): Developmental processes of mangrove habitat related to relative sea-level changes at the mouth of the Urauchi River, Iriomote Island, southwestern Japan. *Quarterly Journal of Geography*, 47, 1-12.
- Fujimoto, K., T. Miyagi, and T. Kikuchi (1995): Formative and Maintainable mechanisms of mangrove habitats in Micronesia and the Philippines. In, *Rapid Sea Level Rise and Mangrove Habitat* (ed. T. Kikuchi), Institute for Basin Ecosystem Studies, Gifu University, Gifu, 9-18.
- Fujimoto, K., T. Miyagi, T. Kikuchi and T. Kawana, (1996): Mangrove habitat formation and response to Holocene sea-level changes on Kosrae Island, Micronesia. *Mangroves and Salt Marshes*, 1, 47-57.
- Fujimoto K., T. Miyagi, T. Murofushi, Y. Mochida, M. Umitsu, H. Adachi and P. Pramodjane (1999): Mangrove habitat dynamics and Holocene sea-level change in the southwestern coast of Thailand. *TROPICS*, 8, 239-255.
- Hosokawa, T., H. Tagawa and V. J. Chapman (1977): Mangals of Micronesia, Taiwan, Japan, the Philippines and Oceania. In, *Wet Coastal Ecosystems* (ed. V. J. Chapman), Elsevier, Amsterdam, 271-291.
- 今西錦司・吉良龍夫 (1944): 生物。ポナペ島 - 生態学的研究 - (今西錦司編), 講談社. (1975, 復刻版)
- Ishihara, S., T. Kikuchi, Y. Mochida, R. Tabuchi, S. Kuramoto, K. Fujimoto, K. Ono, M. Hiraide, K.

- Miyazaki, Y. Hirata, A. Simpson, E. E. Waguk, and S. Lihpai (2006) Establishment and regeneration of mangrove forests dominated by *Sonneratia alba* J. Smith in Micronesia. In, Evaluation of the Carbon Fixation and Organic Matter Decomposition Functions in Natural Mangrove Forests (R. Tabuchi ed.), 11-24.
- Ishihara, S., T. Kikuchi, Y. Mochida, R. Tabuchi, S. Kuramoto and K. Fujimoto (2006) Vegetative propagation of *Sonneratia alba* in the Micronesian Islands. In, Evaluation of the Carbon Fixation and Organic Matter Decomposition Functions in Natural Mangrove Forests (R. Tabuchi ed.), 25-32.
- Kawana, T., T. Miyagi, K. Fujimoto, and T. Kikuchi (1995): Late Holocene sea-level changes and mangrove development in Kosrae Island, the Carolines, Micronesia. In, Rapid Sea Level Rise and Mangrove Habitat (T. Kikuchi ed.), Institute for Basin Ecosystem Studies, Gifu University, Gifu, 1-7.
- 菊池多賀夫 (1995): 海面の上昇とマングローブ. 学術月報, 48:31-35.
- Kikuchi, T. (ed.) (1995): Rapid Sea Level Rise and Mangrove Habitat. 55pp. Institute for Basin Ecosystem Studies, Gifu University, Gifu, 55pp.
- Kikuchi, T., Y. Mochida, T. Miyagi, K. Fujimoto and S. Tsuda (1999): Mangrove forests supported by peaty habitats on several islands in the western Pacific. TROPICS, 8, 197-205.
- 菊池多賀夫・田村俊和・牧田 肇・宮城豊彦 (1978): 西表島仲間川下流域の沖積平野にみられる植物群落の配列とこれにかかわる地形 I。マングローブ林. 東北地理, 30: 71-81.
- 菊池多賀夫・田村俊和・牧田 肇・宮城豊彦 (1980): 西表島仲間川下流域の沖積平野にみられる植物群落の配列とこれにかかわる地形 II。サガリバナ林・アダン林. 東北地理, 32: 185-193.
- Macnae, W. (1968): A general account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the Indo-West-Pacific Region. Adv. Mar. Biol., 6, 73-270.
- Miyagi, T., K. Fujimoto and T. Kikuchi (1995): Late Holocene sealevel changes and the mangrove peat accumulation / habitat dynamics in the western Pacific area. In, Rapid Sea Level Rise and Mangrove Habitat (T. Kikuchi ed.), Institute for Basin Ecosystem Studies, Gifu University, Gifu, 19-26.
- Miyagi, T., C. Tanavud, P. Pramojanee, K. Fujimoto and Y. Mochida (1999): Mangrove habitat dynamics and sea - level change-A scenario and GIS mapping of the changing process of the delta and estuary type mangrove habitat in southwestern Thailand. TROPICS, 8, 179-196.
- Mochida, Y., K. Fujimoto, T. Miyagi, S. Ishihara T. Murofushi, T. Kikuchi and P. Pramojanee, (1999) A phytosociological study of the mangrove vegetation in the Malay Peninsula. TROPICS, 8, 207-220.
- Mochida, Y., T. Kikuchi, K. Fujimoto, Y. Hirata, and R. Tabuchi (2006): A pytosociological study of the mangrove forests on Pohnpei Island, Micronesia. In, Evaluation of the Carbon Fixation and Organic Matter Decomposition Functions in Natural Mangrove Forests (R. Tabuchi ed.), 4-10.
- Mochida, Y., M. Yamanaka, S. Tsuda, E. E. Melana, A. M. Mapalo, S. D. Bagalihog and T. Kikuchi (1995): A phytosociological description of the mangrove forests on Kosrae Island, Micronesia, and Bohol Island, the Philippines. Ecological Review, 23, 67-76.
- 中村 武久 (2010): マングローブ研究の目指すところ. Mangrove Science, 7: 1-7.
- 宮田逸夫・小谷信夫 (1963): 八重山群島・西表島の植生. 九州大学八重山群島学術調査報告第I集, 23-42.
- Thom, B. G. (1967): Mangrove Ecology and Deltaic Geomorphology, Tabasco, Mexico. J. Ecol., 55, 301-343.
- Thom, B. G. (1982): Mangrove ecology-A geomorphological perspective. In, Mangrove Ecosystems in Australia: Structure, Function and Management (B. F. Clough ed.), Australian Institute of Marine Science, Townsville, 3-17.
- Watson, J. G. (1928): Mangrove forest of the Malay Peninsula. Malayan Forest Records, 6, 275pp.
- Woodroffe, C. (1992): Mangrove sediments and geomorphology. In, Coastal and Estuarine Studies (A. I. Robertson and D. M. Alongi eds.), American Geophysical Union, Washington, DC, 7-41.
- Woodroffe, C. (1999): Response of mangrove shorelines to sea-level change. TROPICS, 8, 159-171.



## Stimulatory and inhibitory effects of abscisic acid on cell growth in protoplast cultures and the relation to its endogenous levels in Avicenniaceae mangrove cells

Ai Hasegawa<sup>1)</sup>, Shinji Hayashi<sup>1)</sup>, Asami Kurita<sup>1)</sup>, Fumiki Kaai<sup>1)</sup>, Yoshifumi Kawana<sup>1)</sup>, Takeshi Fukumoto<sup>2)</sup>, Hamako Sasamoto<sup>3)</sup>

**Abstract:** Effects of 0.1-100  $\mu$ M of abscisic acid (ABA) was investigated in protoplast cultures of mangrove plants generated from a suspension culture of *Avicennia alba* and *A. marina* cotyledons at 30°C. Inhibition of cell divisions by ABA was observed in *A. alba*, however, stimulation was observed in *A. marina*. Sterile protoplast culture of *A. marina* cotyledons was first possible after long period (1-3 months) of seed imbibitions in tap water. Endogenous levels of ABA in protoplasts were measured by enzyme-linked immunosorbent assay after small-scale extraction and purification steps with thin layer chromatography. Endogenous level of ABA in cotyledon protoplasts of *A. marina* was very low compared to that of suspension cells of *A. alba*. High and low endogenous content of ABA in each *Avicennia* protoplast might be related to the inhibition and stimulation of colony formation by ABA in the culture medium.

**Keywords:** ABA content, *Avicennia*, Mangroves, Plant growth regulators, Protoplasts

### Introduction

Mangrove plants tolerate high salty conditions as well as different osmotic conditions between river and sea water, in tropical and subtropical brackish water. Elucidation of the unique salt-tolerance mechanisms of mangrove plants and introducing these characteristics to tree-crops, such as poplar through cell fusion (Sasamoto *et al.*, 2006) would be a promising tool of biotechnological breeding. As yearly fruiting is not stable and long term storage of (crypto) viviparous seeds is not possible, the development of in vitro culture system would be useful to augment whole plant studies in the investigation of mechanisms in this group of plants (Kawana *et al.*, 2008). Axenic cell and tissue cultures would also be a useful tool for the maintenance and micropropagation of mangrove plants for conservation of such natural resources and environment (Ogita *et al.*, 2004). In mangrove forests more than 100 species from different families can be found in or near the coastal areas in the world (Tomlinson, 1986). Leaf protoplast isolation is possible from 8 different species of three different families including Avicenniaceae mangroves (Kawana *et al.*, 2004). However, mangrove plants are very recalcitrant in cell culture with the exception of a

few species in the families Rhizophoraceae (*Bruguiera sexangula* (Lour.) Poir.) (Mimura *et al.*, 1997; Kura-Hotta *et al.*, 2001) and Sonneratiaceae (*Sonneratia alba* J. Smith and *S. caseolaris* (L.) Engl.) (Kawana *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2009) which are amenable to suspension culture studies. Callus formation from protoplasts of *B. sexangula* suspension cells was successful and tolerant or halophilic nature to sea salts of them were shown (Fukumoto *et al.*, 2004).

*Avicennia alba* Blume and *A. marina* (Forssk.) Vierh. are two dominant species in Avicenniaceae in a mangrove forest at the coast in Myanmar or Thailand. The latter is also found in the Iriomote island, Okinawa, Japan. These species can grow in the most seaside areas and are highly salt tolerant. Recently, we succeeded in the induction of suspension culture from cotyledons of *A. alba* using a combination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and thidiazuron (TDZ) as plant hormones and found halophilic nature and characteristics of tolerance of these cells to sea salts (Hayashi *et al.*, 2009). However, *A. marina* has been difficult for obtaining sub-culturable callus or the generation of a suspension culture using similar combinations of plant hormones.

Abscisic acid (ABA) is one of the plant hormones

<sup>1)</sup> Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, Yokohama 240-8501, Japan

<sup>2)</sup> Faculty of Agriculture, Department of Life Sciences, Kagawa University, Miki, Kagawa 761-0795, Japan

<sup>3)</sup> Faculty of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, Yokohama 240-8501, Japan

which plays important roles in seed development and in stress tolerance (Clipson *et al.*, 1988). We found that one of the causes of recalcitrancy in protoplast regeneration of a mangrove, *Kandelia obovata* Sheue, H.Y. Liu & J.W.H. Yong (Rhizophoraceae) is the high endogenous ABA level in leaf protoplasts comparing to the regenerable poplar leaf protoplasts (Kaai *et al.*, 2008). Information of endogenous ABA levels enables further optimization of culture conditions which were useful for the regeneration of plants from protoplasts of a recalcitrant broad leaved tree, *Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara (Sasamoto *et al.*, 2002).

The purpose of this study was to investigate whether the endogenous levels of ABA plays a role in protoplast cultures of Avicenniaceae mangrove plants. Since another group of plant hormone, gibberellins, is known to antagonize ABA effect in poplar protoplast cultures (Sasamoto *et al.* 1995), the effects of gibberellins were also investigated. Protoplasts were first isolated from suspension cells of *A. alba* and cotyledons of *A. marina*. The effects of ABA and gibberellic acid ( $GA_3$ ) on these protoplast cultures were studied and the endogenous levels of ABA in their protoplasts were compared.

## Materials and methods

### Materials

Seeds of *A. marina* were collected on Iriomote-island, Okinawa Japan. Fresh and clean seeds were selected and imbibed with tap water changing once a day. Or after surface sterilization by successive treatment with neutral detergent for 1 min, and with 2% NaClO for 40 min, they were imbibed with pure water (Millipore Elix3) after sterilization (autoclaved at 121°C, 15 min) or with tap water, changing water occasionally, during 3 months at room temperature before protoplast isolation. Suspension culture of *A. alba* was induced and sub-cultured as previously described (Hayashi *et al.* 2009). Briefly, seeds were collected in Thailand and a suspension culture was induced from cotyledons of two seeds and sub-cultured at 3-4 week intervals in mAA basal medium, in which the glycine content was decreased to 1/10 of AA medium (Mimura *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1986), containing 2  $\mu$ M each of 2,4-D and TDZ and 3% sucrose in 100 ml flasks. They were cultured at 30°C, on a rotary shaker in the dark at 100 rpm speed and sub-cultured at least for 1 year before use.

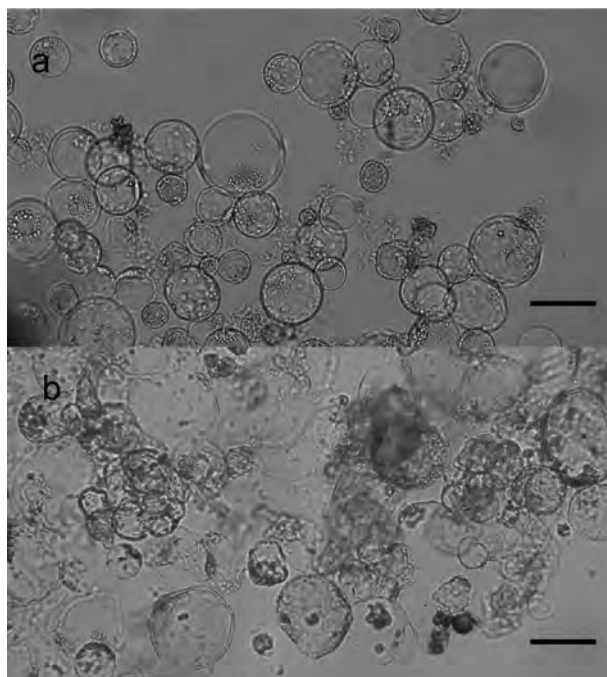
### Protoplast isolation

After imbibition of seeds, cotyledons of *A. marina* were re-sterilized with neutral detergent for 1 min and 1% NaClO for 45 min and washed three times with sterilized water. Cut sections were treated with 2% each of Cellulase RS and Driselase 20 (provided by Kyowa Hakko Co. Ltd.) in 1.3-1.4 M sorbitol solution as described previously (Sasamoto *et al.*, 1997). Incubation time at room temperature or at 30°C was prolonged from 24 to 67 hrs. Protoplasts were purified by passing through nylon mesh (95  $\mu$ m size) and centrifuged at 100g speed for 4 min. They were washed three times with sorbitol solution by centrifugation. Viability of protoplasts was determined under fluorescent microscope (Olympus CK40) by staining with fluorescein diacetate (final 0.01%).

For protoplast isolation from suspension cells of *A. alba*, the 24-well culture plate method (Sasamoto *et al.*, 1997) was used to optimize the various combinations of cell wall degrading enzymes needed for wall digestion. Six different kinds of enzymes were tested, i.e. 1% each of Cellulase R10, Cellulase RS, Hemicellulase, Driselase 20, Macerozyme R10 and 0.25% of Pectolyase Y23. The final optimized solution was consisted of a 1.2 M sorbitol solution with 1% each of Cellulase RS and Driselase 20. Suspension cells were filtered with 40  $\mu$ m nylon mesh and were treated for 3-13 hr at 30°C with the enzyme solution. Protoplasts were purified similar to *A. marina*. The protoplasts were used at once for culture or stored at -80°C after freezing with liquid nitrogen before ABA extraction.

### Protoplast culture

Multi-well (96-well) culture plates (Falcon No.3705) were used to culture the protoplasts and to determine the effects of ABA and  $GA_3$  on protoplast growth. The 5  $\mu$ L of isolated protoplast suspension were put in 50  $\mu$ L liquid mAA medium containing 3% sucrose and 1.2 M sorbitol in each well. Hormonal conditions were 2  $\mu$ M each of 2,4-D and TDZ in *A. alba* and 1  $\mu$ M each in *A. marina*. 100  $\mu$ L of ultra pure water was supplied between wells. Culture was incubated at 30°C in a CO<sub>2</sub>-incubator for humidity maintenance without the supply of CO<sub>2</sub> gas. Cell density was adjusted to 2-10  $\times 10^4$  mL<sup>-1</sup>. When cited in the text, 0, 0.1, 1, 10  $\mu$ M of ABA and  $GA_3$  were added. Culture of *A. marina* was also incubated at 28°C. Culture was observed under an inverted microscope (Olympus CK40) and numbers of enlarged cells and divided cells were counted. The



**Figure. 1** Colony formation in protoplast culture of suspension cells of *A. alba*. Photographed at 0 day (a) and after 46 days (b) of culture. Basal medium was mAA containing 1.2 M sorbitol and 3% sucrose in combination with 2  $\mu$ M each of 2,4-D and TDZ. Bar=50  $\mu$ m

percentage of reacted cells was described as the total numbers of enlarged cells and cell colonies divided by the initial numbers of protoplasts plated in a well.

#### *Micro-scale extraction and measurements of endogenous ABA in protoplasts*

The extraction procedures were carried out as previously described (Sasamoto *et al.*, 2002). Protoplasts were extracted with 0.5 ml of 80% methanol at 4°C for 18 h. After centrifugation at 1600g, the precipitate was re-extracted for 4 h with 0.3 ml of cold 80% methanol. After further centrifugation, the combined extracts were dried in vacuo at 38°C using a Vacuum centrifugal evaporator (CVE-3100, EYELA, Tokyo, Japan) with a glass cold trap (Uni trap UT-1000, EYELA). The residual precipitate was dried at 80°C for 18 h for dry weight measurement. After addition of 0.6 ml or 0.5 ml of H<sub>2</sub>O to the extract, the pH was adjusted to 2.5 with 6 N HCl and extracted three times with 1/3 volume of methylene chloride. The combined solvent fraction was dried in vacuo and stored at -80°C before purification by TLC. Purification by TLC was performed after elution of the dried samples with 10 to 20  $\mu$ l of 80% methanol, with a solvent system of *iso*-propanol: ammonia (28%): water (10:1:1) or *iso*-propanol: 2M ammonia in 2-propanol (015-19841 Wako pure chemi-

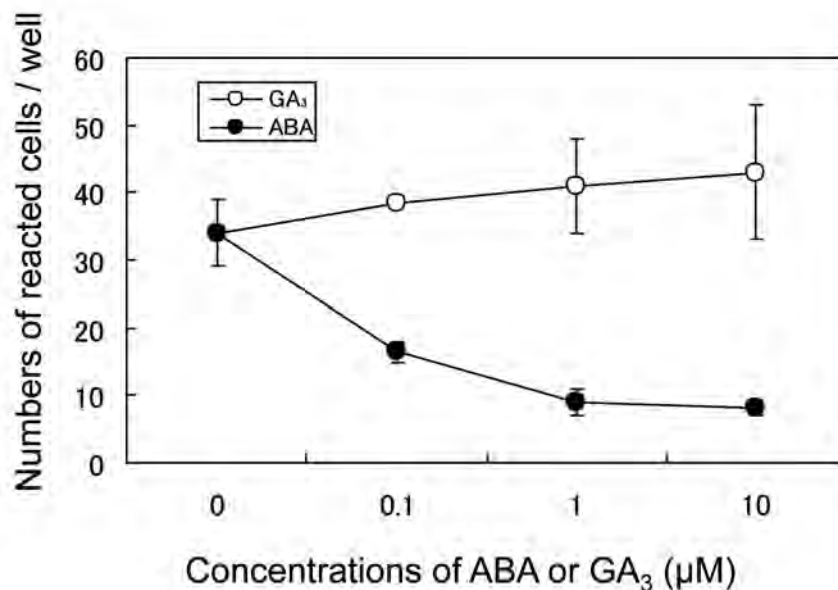
cal Industries Ltd.): water (3:7:2), using Silica gel K6 (Whatman) plates (5 x 10 cm). The 0.8 cm band of 3 cm width at the R<sub>f</sub> value of standard ABA was eluted twice with a total of 300  $\mu$ l of 80% methanol. The extract was dried in vacuo and frozen at -80°C before the ELISA test was performed.

ELISA test: ABA was re-eluted with 200  $\mu$ l of 25 mM Tris buffered saline (0.125 M NaCl, 2.6 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). The ELISA test, using monoclonal antibody for *cis*-(+)-ABA (ABA Immunoassay detection kit, Sigma PGR-1) (Weiler, 1982), was performed as instructed by the manufacturer. The amount of ABA was calculated from at least three different concentration measurements using a linear Log-Logit standard curve.

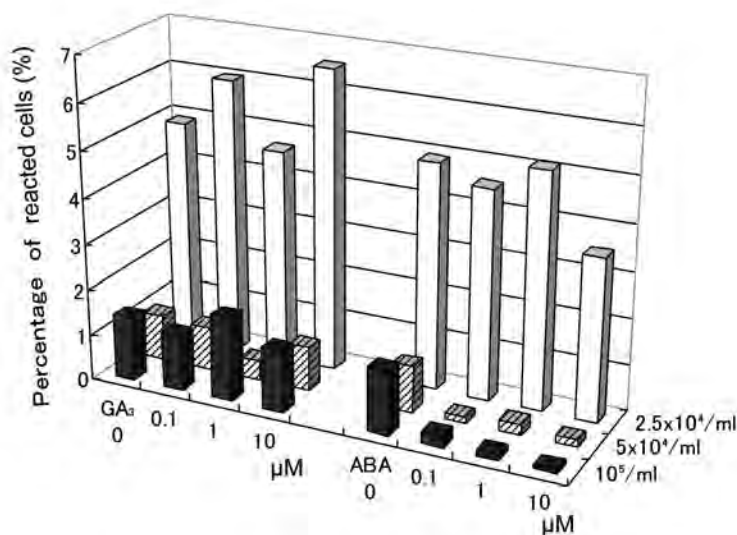
## Results

#### *Effects of ABA and GA<sub>3</sub> in protoplast cultures of A. alba suspension cells*

Fig. 1a shows isolated protoplasts of the *A. alba* suspension cells. Colony formation (Fig. 1b) was observed in the protoplast culture in mAA medium containing 1.2 M sorbitol and 3% sucrose in combination with 2  $\mu$ M each of 2,4-D and TDA. When 19 day-old *suspension cells* were used as the source of protoplasts, ABA inhibited the growth of *A. alba* protoplasts at all concen-



**Figure. 2** Effects of ABA and GA<sub>3</sub> on protoplast cultures of 19 day-old *A. alba* suspension cells. Basal medium was the same as in Fig. 1. Cell density was  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (2500 protoplasts in each well). Days of culture were 19 days. Data were average of numbers of non-circular enlarged cells and divided cells in two wells.



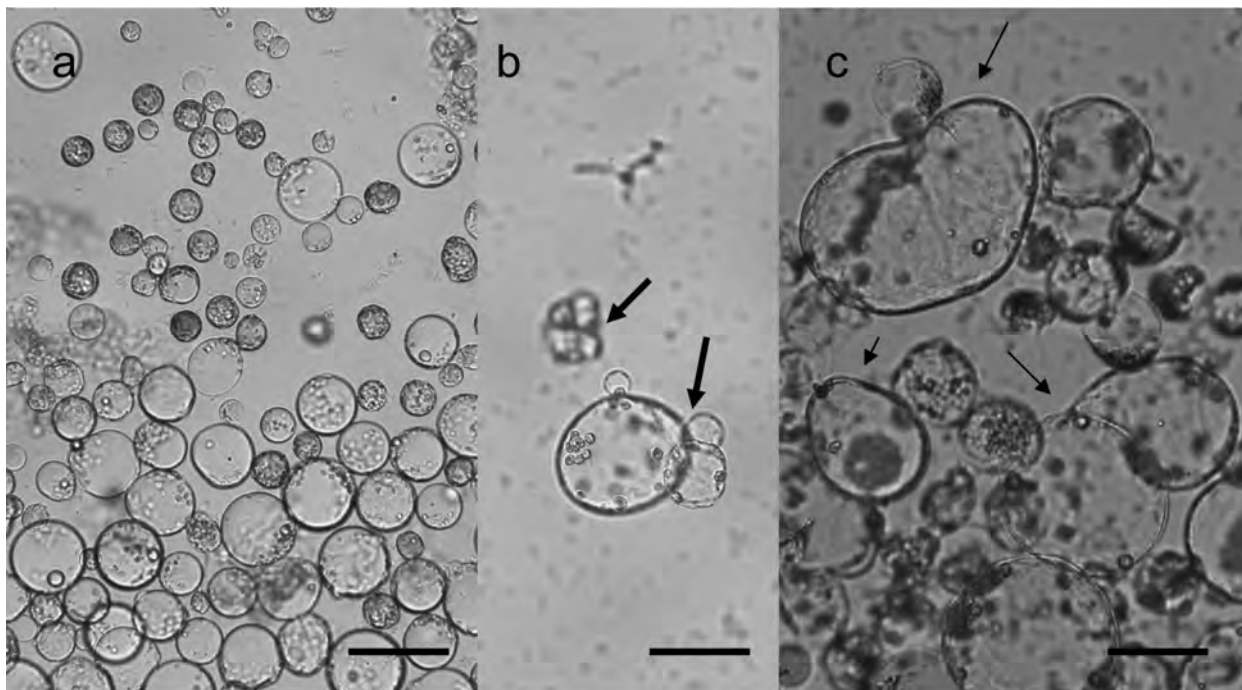
**Figure. 3** Effects of ABA and GA<sub>3</sub> on percentage of reacted protoplasts in protoplast cultures of 30 day-old *A. alba* suspension cells. Basal medium was the same as in Fig. 1. Cell densities were  $2.5, 5, 10 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ . Days of culture were 17 days. Data were % of enlarged and divided cells.

tration tested, while GA<sub>3</sub> had no inhibitory nor stimulatory effect at a cell density of  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (Fig. 2). As shown in Fig. 3 when 30 day-old suspension cells were used, similar effects of ABA and GA<sub>3</sub> were observed at  $5\text{--}10 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  when 55 day-old cells were used (data not shown). At a low cell density,  $2.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , ABA was inhibitory only at  $10 \mu\text{M}$ , while GA<sub>3</sub> slightly

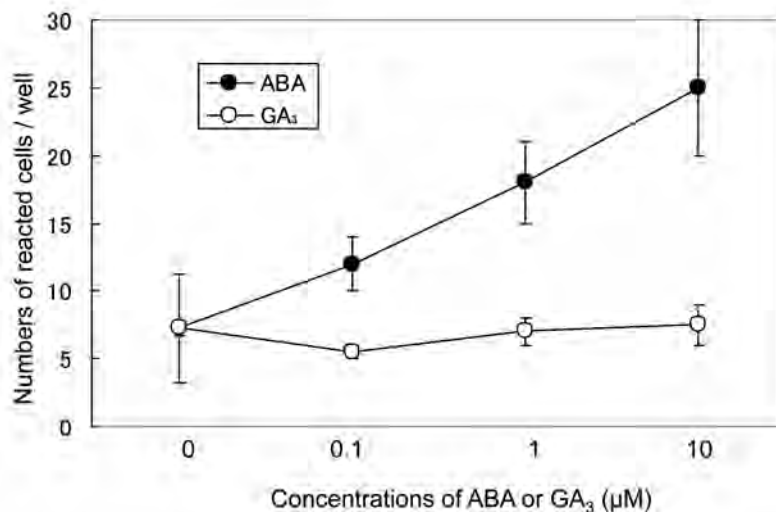
stimulated cell growth at  $0.1$  and  $10 \mu\text{M}$ . Percentage of reacted cells was higher at low cell density than at high cell density.

#### *Effect of imbibing condition on protoplast isolation of A. marina cotyledons*

Viable protoplasts of two different sizes, larger than



**Figure. 4** Cell divisions in protoplast culture of *A. marina* cotyledons. **a**, isolated protoplasts at 0 day. **b**, divided protoplast (arrow) after 5 day at 1  $\mu\text{M}$  of ABA. **c**, non-circular enlarged protoplasts (arrow) after 7 day at 100  $\mu\text{M}$  of ABA. Basal medium is mAA containing 1.2 M sorbitol and 3% sucrose in combination with 1  $\mu\text{M}$  each of 2,4-D and TDZ. Bar=50  $\mu\text{m}$ . Seeds were imbibed for 1 month (a, b), and 1.5 month (c).

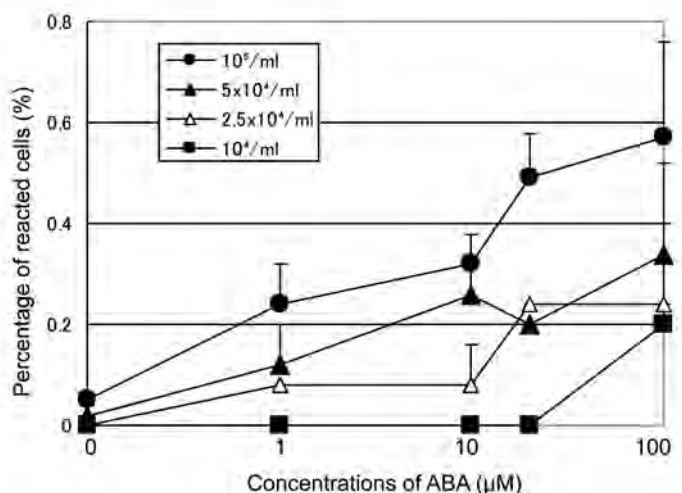


**Figure. 5** Effects of ABA and GA<sub>3</sub> on cotyledon protoplast cultures of *A. marina*. Basal medium was the same as in Fig. 4. Cell density was  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (2500 protoplasts in each well). Days of culture were 9 days. Numbers of protoplasts enlarged more than 70  $\mu\text{m}$  diameter and divided cells were counted. Seeds were imbibed for 1 month.

25  $\mu\text{m}$  and smaller than 20  $\mu\text{m}$ , were obtained (Fig. 4a). Imbibing seeds for less than one month was not enough for efficient protoplast isolation from axenic

cotyledons of *A. marina*. When autoclaved pure water was used for imbibition, seeds were browned and not successful for protoplast isolation. Sterile protoplast





**Figure. 6** Effects of ABA concentrations and cell densities on percentage of reacted protoplasts in protoplast culture of *A. marina* cotyledons. Basal medium is the same as of Fig. 4. Days of culture were 13 days. Data were averages of % of enlarged cells (larger than 100 μm diameter) and divided cells of two wells. Seeds were imbibed for 1.5 months.

**Table. 1** Endogenous levels of ABA in protoplasts isolated from suspension cells of *A. alba* and from cotyledons of *A. marina*

ABA content	pmoles / $6 \times 10^6$ protoplasts	pmoles / mg dry weight
<i>A. alba</i> suspension cells <sup>a</sup>	$3.74 \pm 1.42$	$0.866 \pm 0.433$
<i>A. marina</i> cotyledons <sup>b</sup>	$0.625 \pm 0.066$	$0.059 \pm 0.006$

<sup>a</sup>Average of four samples (22 to 35 days old cells) with standard error.

<sup>b</sup>Average of two samples (imbibed in tap water for 1.5 month)

cultures were obtained when fresh clean seeds were imbibed with tap water for up to a 3 months period. During the imbibition period, the color of the cotyledons remained green. It is important to note that it took three times longer incubation time for protoplast isolation than in previous work, which was less than one day, at the same high concentrations (2%) of Cellulase RS and Driselase (Sasamoto *et al.*, 1997).

#### *Stimulatory effect of ABA in protoplast culture of A. marina cotyledon*

As shown in Fig. 5, ABA stimulated cell enlargement and divisions in protoplast culture of *A. marina* cotyledons, which were imbibed for 1 month in tap water though no increase was observed at any concentrations of GA<sub>3</sub> tested. Fig. 4b shows the cell division of *A. marina* cotyledon protoplast photographed after 5 days of culture at 30°C in 1 μM of ABA. The seed had been imbibed in tap water for 1.5 months. No cell division

was observed when cultured at 28°C.

When 1.5 months-imbibed seeds were used, stimulation of cell growth by ABA was repeatedly observed (Fig. 6). 100 μM of ABA had a stronger stimulatory effect on cell divisions and enlargement in protoplasts larger than 100 μm diameter (Fig. 4c). No difference in number was found among protoplasts smaller than 50 μm diameter. The percentage of reacted cells was higher at higher cell densities. When seeds were imbibed for 3 months (data not shown), the number of non-circular enlarged-cells increased by the addition of 1 and 10 μM of ABA at cell density of 2 and 5 × 10<sup>4</sup> mL<sup>-1</sup>; however, cell divisions were not readily observed in cultures.

#### *Endogenous levels of ABA in protoplasts of A. alba suspension cells and of A. marina cotyledons*

As shown in Table 1, high ABA contents in protoplasts of *A. alba* suspension cells were obtained during

culture from 22 to 35 days. In the old culture (49-day) a much high ABA content ( $42.7 \pm 10.1$  pmoles/ $6 \times 10^6$  cells) was obtained.

On the contrary, after 1.5 months of imbibition, a much lower (1/6) endogenous level of ABA was obtained in protoplasts from cotyledonary cells of *A. marina* (Table 1).

## Discussion

Contamination is a common problem in mangrove research especially with cryptoviviparous *Avicennia* seeds (Anguelova-Merhar *et al.*, 2003). Though, a long imbibition period is needed to obtain viable protoplasts and the need of a high temperature, 30°C, in culture maintenance, axenic protoplast culture was successful for *A. marina* cotyledons by using fresh and clean seeds and tap water-imbibition. Tap water contains low concentrations of each ions;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  (Yokohama Waterworks Bureau, 2009). The need of tap water for imbibition of *Avicennia* seeds might reflect the halophilic nature of these mangrove plants.

It is known that ABA antagonize the effect of plant growth hormone,  $\text{GA}_3$ , and inhibit cell divisions in protoplast cultures (Sasamoto *et al.*, 2002). In this study, ABA application elicited a difference in response between *A. marina* and *A. alba* protoplasts, while  $\text{GA}_3$  application had not much effect. Clear stimulation of cell divisions by ABA was found only in the former. This difference could be explained by the difference in the endogenous contents of ABA. Stimulation of cell divisions at up to 100  $\mu\text{M}$  of ABA in *A. marina* cotyledons protoplast culture might be related to the low content of ABA after long imbibition period. On the contrary, in *A. alba* suspension cells, because of the high endogenous ABA content, further addition of exogenous ABA to the culture medium resulted in the inhibition of growth. The high endogenous ABA content might be related to the salt tolerance or halophilic nature of *A. alba* suspension cells (Hayashi *et al.*, 2009). Percentage of reacted cells was improved at lowest cell density in *A. alba* protoplasat culture. Such a phenomenon was also observed in the cotyledon protoplast cultures of a conifer, *Chamaecyparis obtusa*, which showed much high ABA content (Sasamoto and Ogita, 2001). The inhibition of growth by ABA was also found in leaf protoplast cultures of another mangrove, *Kandelia obovata*, in which cell enlargement

was prevented. This is most likely caused by the high endogenous ABA level (Kaai *et al.*, 2008).

On the other hand, stimulation of cell divisions by ABA was recently found in another mangrove protoplast culture of *S. alba*, where plants are grown at the most seaside area of a mangrove forest. In *S. alba* (Kawana *et al.*, 2009), the ABA content was high similar to *A. alba* suspension protoplasts. In the *K. obovata* and *S. alba*, exogenously supplied cytokinins inhibits cell proliferation from these mangrove tissues (Kawana *et al.*, 2007; Kaai *et al.*, 2008). This observation is very different from *A. alba*, in which a strong cytokinin, TDZ is needed for growth of suspension cells (Hayashi *et al.*, 2009). In *A. marina*, a weak cytokinin, benzyladenine at high concentration, 10  $\mu\text{M}$ , in MS medium was useful in the maintenance of leaf cultures (Hayashi *et al.* 2009). In preliminary experiments with cotyledon culture of *A. marina*, 1  $\mu\text{M}$  of TDZ in combination with 1  $\mu\text{M}$  of 2,4-D, in mAA medium, showed positive results in callus induction (unpublished results). This hormonal condition was used in this present study for protoplast culture of *A. marina* cotyledons. Therefore, different mechanism in effects of plant growth regulators between cytokinins and ABA might be considered for stimulation of cell divisions of *S. alba* by ABA.

In this study, by optimizing the ABA level endogenously and exogenous application, colony formation from protoplast cultures of *Avicennia* mangrove can be achieved. Using this protoplast culture system, effects of sea salts can be investigated quantitatively and the mechanisms of salts tolerance in Avicenniaceae mangrove cells can be investigated. Such a work is under way.

## Acknowledgements

The authors thank Prof. E. C. Yeung of the University of Calgary for his critical reading of this manuscript. T. F. is supported by the Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 21780153), Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

## References

- Anguelova-Merhar V.S., Calistru C., Berjak P. (2003) A Study of Some Biochemical and Histopathological Responses of Wet-stored Recalcitrant Seeds of *Avi-*

- cennia marina* infected by *Fusarium moniliforme*. Ann Bot, 92, 401-408.
- Clipson N.J.W., Lanchno D.R., Flowers T.J. (1988) Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* L. Dum: Absciscic acid concentrations in response to constant and altered salinity. J Exp Bot, 39, 1381-1388.
- Fukumoto T., Nakamura T., Suzuki M., Ogita S., Mimura T., Sasamoto H. (2004) Different effects of four salts and pHs on protoplast cultures of a mangrove, *Bruguiera sexangula* suspension cells, *Populus alba* leaves and tobacco BY-2 cells. Plant Biotechnol, 21, 177-182.
- Hayashi S., Kuriyama S., Kawana Y., Hasegawa A., Kurita A., Minagawa R., Sasamoto H. (2009) Stimulatory effects of sea salts on cell growth in liquid culture of Avicenniaceae mangrove. Plant Biotechnol, 26, 561-564.
- Kaai F., Kawana Y., Sasamoto H. (2008) The relation between recalcitrancy of a mangrove plant, *Kandelia obovata*, and high endogenous level of abscisic acid. Plant Cell Tiss Organ Cult, 94, 125-130.
- Kawana Y., Sasamoto H., Mochida Y., Suzuki K. (2004) Leaf protoplast isolation from eight mangrove species of three different families; Avicenniaceae, Rhizophoraceae and Sonneratiaceae. Mangrove Sci, 3, 25-31.
- Kawana Y., Sasamoto H., Ashihara H. (2008) Mechanism of salt tolerance in mangrove plants. Bull Soc Sea Water Sci Jpn, 62, 207-214 (in Japanese).
- Kawana Y., Yamamoto R., Mochida Y., Suzuki K., Baba S., Sasamoto H. (2007) Generation and maintenance of suspension cultures from cotyledons and their organogenic potential of two mangrove species, *Sonneratia alba* and *S. caseolaris*. Plant Biotechnol Rep, 1, 219-226.
- Kawana Y., Kaai F., Sasamoto H. (2009) Absciscic acid stimulates cell divisions in cultures of protoplasts isolated from cotyledons and suspension cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*: Small-scale measurements of abscisic acid and gibberellins in protoplasts. Mangrove Sci, 6, 9-15.
- Kura-Hotta M., Mimura M., Tsujimura T., Washitani-Nemoto S., Mimura T. (2001) High salt-treatment-induced Na<sup>+</sup> extrusion and low salt-treatment-induced Na<sup>+</sup> accumulation in suspension cultured cells of the mangrove plant *Bruguiera sexangula*. Plant Cell Environ, 24, 1105-1112.
- Mimura T., Mimura M., Washitani-Nemoto S., Sakano K., Shimmen T., Siripatanadilok S. (1997) Efficient callus initiation from leaf of mangrove plant, *Bruguiera sexangula* in amino acid medium: Effect of NaCl on callus initiation. J Plant Res, 110, 25-29.
- Ogita S., Yeung E.C., Sasamoto H. (2004) Histological analysis in shoot organogenesis from hypocotyls explant of *Kandelia candel* (Rhizophoraceae). J Plant Res, 117, 457-464.
- Sasamoto H., Ogita S. (2001) Endogenous plant hormones in protoplasts of embryogenic cells of conifers. In: Molecular Breeding of Woody Plants, 279-288, Elsevier Science, Tokyo.
- Sasamoto H., Hosoi H., Koshioka M. (1995) Endogenous levels of four plant hormones may affect the culture conditions of poplar protoplasts to regenerate plants. In: Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, pp481-486, Kluwer Academic Publishers.
- Sasamoto H., Wakita Y., Baba S. (1997) Effect of high sorbitol concentration on protoplast isolation from cotyledons of mangroves, *Avicennia marina* and *A. lanata*. Plant Biotechnol, 14, 101-104.
- Sasamoto H., Ogita S., Wakita Y., Fukui M. (2002) Endogenous levels of abscisic acid and gibberellins in leaf protoplasts competent for plant regeneration in *Betula platyphylla* and *Populus alba*. Plant Growth Regul, 38, 195-201.
- Sasamoto H., Wakita Y., Yokota S., Yoshizawa N., Katsuki T., Nishiyama Y., Yokoyama T., Fukui M. (2006) Effects of electric cell fusion treatment among leaf protoplasts of *Populus alba* and *Alnus firma* on growth, leaf morphology, and RAPD pattern of eleven acclimatized plants. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 42, 174-178.
- Thompson J.A., Abdullah R., Cocking E.C. (1986): Protoplast culture of Rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. Plant Sci, 47, 123-133.
- Tomlinson P.B. (1986) The Botany of Mangroves. Cambridge University Press, USA, 419pp.
- Weiler E.W. (1982) An enzyme-immunoassay for cis-(+)- abscisic acid. Physiol Plant, 54, 510-514.
- Yamamoto R., Kawana Y., Minagawa R., Sasamoto H. (2009) Effects of carbon and nitrogen sources on induction of cell proliferation in tissue cultures of a mangrove plant, *Sonneratia caseolaris*. Mangrove Sci, 6, 1-6.
- Yokohama Waterworks Bureau (2009): <http://www.city.yokohama.jp/me/suidou/os/suidou-suishitsu/suidou/suishitsu-kekka.html>

## Analysis of the genetic diversity between plantation grown and natural grown *Kandelia obovata* by the inter-simple sequence repeats (ISSR) method

Janine Caynap and Katsuhiko Kondo

**Abstract:** Using the inter-simple sequence repeats (ISSR) method, the genetic diversities among a plantation population and two natural populations of *Kandelia obovata* Sheue, Liu & Yong were investigated. Eleven primers produced 114 band loci across a total of 60 individuals of *K. obovata* from the three populations. The results showed a relatively high genetic diversity at the species level ( $P=76.32\%$ ,  $He=0.1725$ ,  $SI=0.2788$ ) making the ISSR analysis a powerful tool for assessing genetic diversity of the species. Genetic diversity in the plantation population ( $P=42.11\%$ ,  $He=0.1047$ ,  $SI=0.1685$ ) was lower than the two natural populations (Mean  $P=59.65\%$ ,  $He=0.1692$ , and  $SI=0.2652$ ), owing to the cumulative effects of founder events, small population size and geographical isolation. The AMOVA revealed that most of the genetic variation was accounted for within populations (84%) with only 16% among the populations studied, indicating that the genetic diversity of the plantation population was fairly conserved. However, the result of the pairwise population differentiation,  $PHI_{PT}$  analysis indicated highly significant genetic differentiation between all pairs in the three populations ( $P<0.01$ ). The dendrogram based on the genetic distances showed two major clusters, separating the natural populations from the plantation population. The highly significant genetic differentiation of the plantation population from the natural populations highlights the need to enhance its genetic diversity by continued periodical planting of significant amount of seedlings from highly diverse natural populations.

**Keywords:** Founder events; Genetic diversity; Geographical isolation; ISSR; *Kandelia obovata*

### Introduction

The mangroves play an important role in our ecosystem. However, despite their ecological importance, mangrove forests are disappearing continuously as a direct result of human activities such as conversion to agriculture, aquaculture, tourism, urban development and overexploitation all over the world (Alongi, 2002; Giri *et al.*, 2008). To counteract the destruction made on the mangrove forests, activities to conserve existing forests and rehabilitate the denuded ones by establishing mangrove plantations are now being done in various parts of the world. The upsurge of mangrove restoration efforts started around the end of the 20th century where scientific concern began to focus on the unprecedented loss of naturally occurring mangrove ecosystems around the world (Walsh *et al.*, 1975) and due to the increased appreciation of their values. However, whether the genetic diversity of the species is also conserved in the process, needs to be investigated. Ge-

netic diversity is critical for the long term survival of a species. High genetic diversity means high potential to respond to new selection environmental changes (Ge and Sun, 1999). To attain a successful conservation program, knowledge of the genetic diversity within and among populations is important (Li and Chen, 2009). One possible way to assess if a conservation program, i.e. mangrove plantations, has been successful could be by examining if the genetic diversity of the planted species was maintained.

In this study, the ISSR method was used to investigate the genetic diversity of plantation grown and natural grown mangrove species *K. obovata* Sheue, Liu & Yong, one of the major mangrove species in Japan and was formerly recognized as *K. candel* (L.) Druce (Sheue *et al.*, 2003). ISSR analysis involves the polymerase chain reaction (PCR) amplification of regions between adjacent, inversely oriented microsatellites using a single simple sequence repeat (SSR)-containing primer (Zietkiewicz *et al.*, 1994). The ISSR method

**Table 1.** Three populations of *Kandelia obovata* studied

Population code	Population location	Population type	Latitude	Longitude	Sample size
AOR	Aono River, Minami-Izu, Shizuoka, Japan	plantation	34°38'N	138°53'E	20
MIR	Minato River, Nishi-no Omote City, Tanegashima Island, Kagoshima, Japan	natural forest	30°50'N	130°57'E	20
OHR	Oh-ura River, Nakatane-cho, Tanegashima Island, Kagoshima, Japan	natural forest	30°27'N	130°57'E	20

is a useful tool in evaluating genetic diversity and has been used in several studies in mangrove species such as those belonging to *Ceriops* (Huang *et al.*, 2008), *Sonneratia* (Li and Chen, 2008; 2009), *Lumnitzera racemosa* Willd. (Su *et al.*, 2006), and also *Heritiera littoralis* Aiton (Jian *et al.*, 2004).

The purposes of this study were: (i) to determine if there is a change in the genetic diversity of *K. obovata* individuals growing in plantation sites as compared to individuals in natural forests; (ii) to provide baseline data on genetic diversity of the species in particular areas that could be of potential use in restoration activities for this species, such as identification of germplasm sources; (iii) to evaluate the effectiveness of plantation activities in conserving the genetic diversity of the species; and (iv) to evaluate the efficiency of ISSR markers in studying this species.

## Materials and Methods

### Sampling areas

A plantation site studied was situated in the mouth of Aono River, Minami-Izu, Shizuoka prefecture, Japan (Table 1, AOR). This plantation was established by planting seedlings collected in Tanegashima Island in 1959 (51 years old by the year of 2010) according to Takeshita and Noguchi (1975). Two natural populations of *K. obovata* studied were located in Tanegashima Island, Kagoshima Prefecture: MIR was situated along Minato River and OHR was situated in Oh-ura River in the south (Table 1). Total of 60 individuals from the populations of *K. obovata* were collected by stratified sampling and stored at -80°C until DNA extraction.

### DNA extraction and PCR amplification

Total genome DNA was isolated using the modified CTAB method (Doyle and Doyle, 1987). Three hundred to 500 mg frozen leaf samples were homogenized with liquid nitrogen and put in individual 2 ml tubes and washed once with washing buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol, 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) and 0.05 M ascorbic acid). Two percent CTAB extraction buffer containing 2% 2-mercaptoethanol and 2% polyvinylpyrrolidone was then added and incubated at 60°C for at least 30 minutes. After incubation, the samples were centrifuged and the supernatant was collected. The DNA was then isolated with 500  $\mu$ l 24:1 chloroform-isoamyl alcohol (CIA), precipitated with equal volume of 2-propanol, and washed with 500  $\mu$ l 70% ethanol. The DNA pellet was briefly dried at room temperature, resuspended in 500  $\mu$ l sterilized distilled water, added with RNase for a final concentration of 10  $\mu$ g/ml and incubated for 30 minutes at 37°C. The solution was then washed with 50:50 volume of Phenol:Choroform to remove the proteins and followed by 24:1 CIA wash to remove the remaining phenol. The final precipitation was done by adding 1/10 volume of 7.5M ammonium acetate and 2.5 volumes of 99.5% ethanol, and incubated at -80°C for 15 minutes. The DNA pellet was collected by centrifuge, washed with 500  $\mu$ l 70% ethanol and was completely dried before resuspended in appropriate amount of sterilized distilled water. The DNA concentration was quantified using a spectrophotometer and a working sample solution, with concentration of 100 ng/ $\mu$ l, was prepared and stored at -20°C. Nineteen readily available ISSR primers: (AC)<sub>8</sub>GG, (TC)<sub>8</sub>C, (TG)<sub>8</sub>G, (AC)<sub>8</sub>GA, (GA)<sub>8</sub>C, (AC)<sub>8</sub>C, (AG)<sub>8</sub>G, (CT)<sub>8</sub>A, (TG)<sub>8</sub>A, (AG)<sub>8</sub>(CT)C, (AG)<sub>8</sub>(CT)A, (GA)<sub>8</sub>(CT)T, (GA)<sub>8</sub>(CT)G, (CA)<sub>8</sub>(AG)C, (AC)<sub>8</sub>G, (AC)<sub>8</sub>(CT)G, (ATG)<sub>6</sub>, (GAA)<sub>6</sub>,

**Table 2.** ISSR primers used, sequence, annealing temperature and loci after amplification

Primers	Primer sequences	Annealing temperature (°C)	No. of loci scored	No. of polymorphic loci
ISSR 1	(AG) <sub>8</sub> G	52	9	6
ISSR 2	(AG) <sub>8</sub> (CT)A	52	9	7
ISSR 3	(GA) <sub>8</sub> (CT)T	52	9	7
ISSR 4	(GA) <sub>8</sub> (CT)G	52	4	2
ISSR 5	(AC) <sub>8</sub> G	52	10	8
ISSR 6	(AC) <sub>8</sub> (CT)G	52	13	11
ISSR 7	(ATG) <sub>6</sub>	52	14	8
ISSR 8	(GAA) <sub>6</sub>	52	13	11
ISSR 9	(AC) <sub>8</sub> GG	52	11	9
ISSR 10	(GA) <sub>8</sub> C	52	8	6
ISSR 11	(AC) <sub>8</sub> C	52	14	12
<b>Total</b>			<b>114</b>	<b>87</b>

**Table 3.** The genetic variation statistics among sampling populations of *K. obovata*

Population	No. of polymorphic loci	<i>P</i> (%)	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>He</i>	<i>SI</i>
<i>Plantation population</i>						
AOR	48	42.11	1.4211±0.4959	1.1611±0.2655	0.1047±0.1525	0.1685±0.2278
<i>Natural populations</i>						
MIR	71	62.28	1.6228±0.4868	1.3040±0.3358	0.1869±0.1838	0.2886±0.2641
OHR	65	57.02	1.5702±0.4972	1.2315±0.2854	0.1514±0.1626	0.2419±0.2412
Mean	68	59.65	1.5965±0.4922	1.2678±0.3106	0.1692±0.1732	0.2652±0.2526
At the species level	87	76.32	1.7632±0.4270	1.2655±0.2964	0.1725±0.1632	0.2788±0.2327

*P*: the percentage of polymorphic loci; *Na*: observed number of alleles; *Ne*: effective number of alleles; *He*: the mean expected heterozygosity; *SI*: Shannon's information index. See Table 1 for abbreviations of the populations.

and (AGT)(ACG)(AGT)(TC)<sub>7</sub> were initially screened and 11 of which that produced reproducible and clear fragments were selected (Table 2) and used to provide polymorphic markers for genetic diversity.

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in 20 µl reactions, consisted of 1.25 U Taq DNA polymerase (Takara Ex Taq), 2 µl 10x reaction buffer containing 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.6 µl of dNTP mixture (2.5 mM each), 0.25 µM primer, and 100 ng template DNA. Amplification was performed using the same cycle profile as previously described by Jian *et al.* (2004). The amplification products were separated on 2% agarose gels buffered with 1x TAE and stained with ethidium bromide to visualize the bands. Band size was estimated using 200 bp Takara DNA ladder.

#### Data analysis

ISSR bands were assigned for each primer and scored as present (1) or absent (0) for each sample. The binary

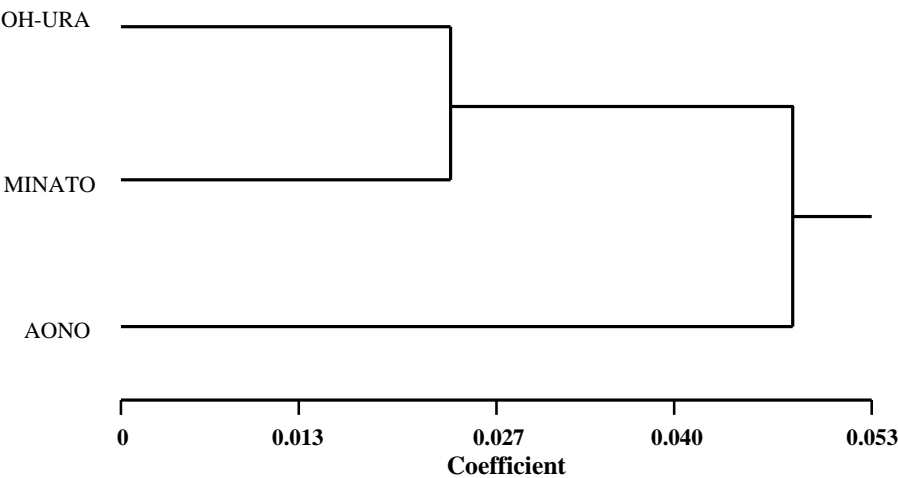
data matrix was analyzed by POPGENE version 1.31, assuming that the populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. The following indices were used to quantify the amount of genetic diversity within the populations examined: the percentage of polymorphic loci (*P*), the mean expected heterozygosity (*He*) (Nei, 1973), and Shannon's information index of diversity (*SI*). Genetic diversity indices (*P*, *He*, and *SI*) were also calculated at the species level. Unbiased measures of genetic distance and genetic identity between populations (Nei, 1978) was calculated using POPGENE version 1.31 and the generated genetic distance data was used to construct a group average dendrogram using the software statistiXL version 1.1.

Analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to calculate variance components and their significance levels within and among populations using GenAlEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006).

**Table 4.** Nei’s (1978) genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among the populations studied

Population	AOR	MIR	OHR
AOR	****	0.9517	0.9551
MIR	0.0495	****	0.9770
OHR	0.0460	0.0233	****

See Table 1 for abbreviations of the populations.



**Fig. 1.** Dendrogram from group average cluster analysis based on Nei’s (1978) unbiased genetic distances for all population pairs.

**Table 5.** Summary of AMOVA

Source	df	SSD	MSD	Est. Var.	% of total variance	P-value	PHI <sub>PT</sub>
Among Populations	2	85.133	42.567	1.685	16		
Within Populations	57	504.950	8.859	8.859	84		
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>590.083</b>		<b>10.544</b>	<b>100</b>	<b>&lt; 0.01</b>	<b>0.016</b>

df: degrees of freedom; SS: sum of squared deviation; MS: mean of squared deviation; Est. Var.: estimated variance; PHI<sub>PT</sub> : population differentiation.

## Results

### ISSR profile

A total of 114 reproducible band loci were detected from 60 individuals of *K. obovata* from the three populations using 11 primers (Table 2). The number of the amplified band loci per primer ranged from 4 to 14, with an average of 10.4 band loci per primer (Table 2). The size of the amplified fragments ranged from 400 to 4,000 bp. Out of the 114 bands detected, 87 (76.32%) were polymorphic (Table 2).

### Genetic diversity and differentiation

At the species level, the percentage of polymorphic loci ( $P$ ), the mean expected heterozygosity ( $He$ ), and Shannon's information index of diversity ( $SI$ ) were 76.32%, 0.1725, and 0.2788, respectively (Table 3). For all the population, the value of  $P$ ,  $He$  and  $SI$  ranged from 42.11 to 62.28%, 0.1047 to 0.1869, and 0.1685 to 0.2886, respectively (Table 3). The  $P$ ,  $He$  and  $SI$  values of MIR natural population were 62.28%, 0.1869, and 0.2886, respectively, and OHR natural population has 57.02%, 0.1514, and 0.2419. As compared to the genetic variation on the AOR plantation population, which has values of  $P=42.11\%$ ,  $He=0.1047$ , and  $SI=0.1685$ , both the natural populations showed higher genetic variation based on all the three genetic diversity indices.

The genetic distances (pairwise genetic distances shown in Table 4) between plantation population (AOR) and natural populations (MIR and OHR) were 0.0495 (AORx MIR) and 0.0460 (AORx OHR) with a mean of 0.0478. The genetic distance between the two natural populations (MIRx OHR) was 0.0233.

### Cluster analysis

Based on Nei's (1978) unbiased measures of genetic distances, a dendrogram of the three populations was generated using the group average cluster analysis. The three populations were divided into two main groups: natural populations MIR and OHR were in one group, and the plantation population AOR in another group (Fig. 1).

### AMOVA

Analysis of molecular variance revealed that only 16% of the total variation was accounted for among populations, while most of the variation (84%) was accounted for within populations (Table 5). Pairwise

population differentiation ( $PHI_{PT}$ ) analysis has values of 0.1991 (AORx MIR), 0.2103 (AORx OHR), and 0.0760 (MIRx OHR), and indicated highly significant genetic differentiation between all pairs of the three populations ( $P < 0.01$ ) (Table 6).

## Discussion

The high level of polymorphism detected (76.32%) made ISSR analysis a powerful tool for assessing genetic diversity in *K. obovata*. The result of the study of Takeuchi *et al.* (2001) on the genetic diversity of *K. candel* found in the Southwest Islands of Japan and now recognized as *K. obovata* (Sheue *et al.*, 2003), revealed very low levels of genetic variations: 4.2% polymorphic loci and gene diversity of 0.012, as compared to the levels of genetic variations detected in this study: 76.3% polymorphic loci and gene diversity of 0.1725. Takeuchi *et al.* (2001) used allozyme analysis on a total of 286 samples coming from seven natural populations. However, whether the detection of genetic variations of *K. obovata* using the ISSR analysis was more effective than using allozyme analysis, cannot be concluded because of the different localities sampled. Comparing to other ISSR studies with several mangrove species (Table 7), the genetic diversity detected in this study was relatively fair. Different mangrove species were likely to exhibit varying degree of polymorphism depending on their edaphic preferences and adaptations (Lakshmi *et al.*, 1997).

*Kandelia obovata* is usually situated in the downstream estuarine zone in the lower intertidal region (Robertson and Alongi, 1992). This species is considered a hardy species and can be easily propagated. Japan provides the northernmost and smallest habitat of the species (Takeuchi *et al.*, 2001). The data revealed that the values of genetic diversity of the two natural populations in Tanegashima Island were higher than the plantation population. According to Huang *et al.* (2008), geographic range, breeding systems, and dispersal pattern are among the several factors influencing the genetic diversity of a species. Geographical isolation and habitat divergence could affect the maintenance of genetic differentiation in mangrove species (Su *et al.*, 2006). The geographical location of the plantation population in Izu Peninsula, Shizuoka Prefecture was different from the two natural populations. The reason for the low genetic variation of the plantation population found along the Aono River could be



**Table 6.** Result of pairwise population differentiation ( $PHI_{PT}$ ) analysis ( $PHI_{PT}$ ) values below diagonal, probability values above diagonal)

Population	AOR	MIR	OHR
AOR	****	0.0010	0.0010
MIR	0.1991	****	0.0080
OHR	0.2103	0.0760	****

See Table 1 for abbreviations of the populations.

**Table 7.** Comparison of genetic diversity studies in mangrove species using the ISSR method

Species	P (%)	He	SI	Author (s)
<i>Aegiceras corniculatum</i>	16	0.039		Ge and Sun, 1999
<i>Ceriops decandra</i>	72	0.253	0.379	Tan <i>et al.</i> , 2005
<i>C. tagal</i>	9	0.016		Ge and Sun, 2001
<i>Heritiera littoralis</i>	93	0.236	0.365	Jian <i>et al.</i> , 2004
<i>Lumnitzera racemosa</i>	87	0.260	0.403	Su <i>et al.</i> , 2006
<i>L. littorea</i>	75	0.240	0.357	Su <i>et al.</i> , 2007
<i>Sonneratia paracaseolaris</i>	81	0.224	0.350	Li and Chen, 2009
<i>K. obovata</i>	76	0.173	0.279	Present study

P: Percentage of polymorphic loci; He: the mean expected heterozygosity; SI: Shannon's information index.

attributed to the cumulative effects of founder events, small population size and geographical isolation, lacking neighbouring populations as sources of more variation. The *K. obovata* population in Izu Peninsula, basing on its geographical location, are assumed to be subjected to colder temperature and this may also contribute to the genetic divergence of the species. The dendrogram based on the genetic distances showed two major clusters, separating the natural populations from the plantation population.

The genetic variation of *K. obovata* revealed by AMOVA was higher within populations (84%) than among populations (16%). Huang *et al.* (1994) suggested that if the genetic variation within populations in mangroves is low, it is an ecological consequence of high habitat homogenization, with physiological stress caused by unstable growing conditions. On this basis, results of this study could indicate that the genetic diversity of the plantation population along Aono River was fairly conserved. However, result of the pairwise population differentiation ( $PHI_{PT}$ ) analysis indicated highly significant genetic differentiation between all pairs in the three populations ( $P < 0.01$ ). Over time,

the genetic diversity of the Aono plantation population might continue to decrease as a trend.

For mangrove conservation strategy, the genetic diversity within donor populations and their genetic similarity to the individuals existing in the plantation site should be considered for the choice of populations as sources of seeds (Hamrick and Godt, 1996). This could increase their probability of survival. As a recommendation, the genetic diversity of the individuals grown at the Aono plantation could be enhanced by continued periodical planting of significant amount of seedlings from highly diverse natural populations. Continued monitoring and assessment of mangrove plantations are essential to know the outcomes, correct or improve present situations as deemed necessary, and aid in the improvement and optimization of mangrove conservation strategies especially in terms of maintaining high genetic diversity.

Additional sampling populations, especially plantations, and more extensive sampling will provide more information to conclude the level of genetic differences between plantation grown and natural grown *K. obovata*.

## Acknowledgements

We wish to express sincere appreciation to Prof. Emeritus T. Nakamura, Tokyo University of Agriculture, who has been especially helpful in many ways. We are similarly indebted to Dr. S. Matsumoto, National Museum of Nature and Science, and Mr. H. Noguchi, a forestry specialist, for their interests, their experiences, and helpful suggestions during the course of investigation. We are especially grateful to Dr. M. H. Abd El-Twab, Minia University and Dr. A. Kanbar, the University of Damascus for their valuable advices on experimental techniques and statistical analysis. This study was supported by the grants of research studies of the graduate course held in Tokyo University of Agriculture from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

## References

- Alongi, D.M., 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environm. Conserv.* 29: 331–349.
- Doyle, J. J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Ge, X.J. and Sun, M., 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Mol. Ecol.* 8, 2061–2069.
- Ge, X.J. and Sun, M., 2001. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. *Wetlands Ecol. Manag.* 9: 203–209.
- Giri, C., Zhu, Z., Tieszen, L.L., Singh, A., Gillette, S. and Kelmelis, J.A., 2008. Mangrove forest distributions and dynamics (1975–2005) of the tsunami-affected region of Asia. *Jour. Gogeogr.* 35: 519–528.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J. C. and Hamrick, J. L. (eds) *Conservation Genetics, Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York, pp. 281–304.
- Huang, H., Dane, F. and Norton, J.D., 1994. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.). *Theoret. Appl. Genet.* 88: 981–985.
- Huang, Y., Tan, F., Su, G., Deng, S., He, H. and Shi, S., 2008. Population genetic structure of three tree species in the mangrove genus *Ceriops* (Rhizophoraceae) from the Indo West Pacific. *Genetica* 133: 47–56.
- Jian, S.G., Tang, T., Zhong, Y. and Shi, S. B., 2004. Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia. *Aquat. Bot.* 79: 75–86.
- Lakshmi, M., Rajalakshmi, S., Parani, M., Anuratha, C.S. and Parida, A., 1997. Molecular phylogeny of mangroves: I. Use of molecular markers in accessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae). *Theor. Appl. Genet.* 94: 1121–1127.
- Li, H. and Chen, G., 2008. Genetic relationship among species in the genus *Sonneratia* in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 36: 392–398.
- Li, H. and Chen, G., 2009. Genetic variation within the endangered mangrove species *Sonneratia paracaseolaris* (Sonneratiaceae) detected by inter-simple sequence repeat repeats analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 37: 260–265.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceed. Natnl. Acad. Sci., U.S.A.* 70: 3321–3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Peakall, R. and Smouse, P. E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288–295.
- Robertson, A. I. and Alongi, D. M. Eds. 1992. *Tropical Mangrove Ecosystems*. Coastal and Estuarine Studies 41. Am. Geophys. Union, Washington D.C., p. 329.
- Sheue, C.R., Liu, H. Y. and Yong, J.W.H., 2003. *Kandelia obovata* (Rhizophoraceae), a new mangrove species from Eastern Asia. *Taxon* 52: 287–294.
- Su, G.H., Huang, Y.-L., Tan, F.X., Ni, X.W., Tang, T. and Shi, S.H., 2006. Genetic variation in *Lumnitzera racemosa*, a mangrove species from the Indo-West Pacific. *Aquat. Bot.* 84: 341–346.
- Su, G., Huang, Y. and Tan, F., 2007. Conservation genetics of *Lumnitzera littorea* (Combretaceae), an endangered mangrove from the Indo-West Pacific. *Mar. Biol.* 150: 321–8.
- Takeshita, Y. and Noguchi, H., 1975. Mangroves grown in Southern Izu Peninsula, Shizuoka Prefecture, Japan, pp. 55–56. In H. Okuyama, Superv. Ed.: *Plant Coll. News 77 (In Japanese)*.

- Takeuchi, T., Sugaya, T., Kanazashi, A., Yoshimaru, H. and Katsuta, M., 2001. Genetic diversity of *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza* in the Southwest Islands, Japan. *J. For. Res.* 6: 167-162.
- Tan, F., Huang, Y. and Ge, X., 2005. Population genetic structure and conservation implications of *Ceriops decandra* in Malay Peninsula and North Australia. *Aquat. Bot.* 81:175-88.
- Walsh, G., Snedaker, S. and Teas, H., Eds. 1975. Proceedings of the International Symposium on Biology and Management of Mangroves, Vols. 1 and 2. Institute of Food and Agricultural Sciences, Univ. Fla., Fla., p. 846.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-783.

## マングローブ環境物理学 松田義弘 著 東海大学出版会

皆川礼子

マングローブを様々な分野から解析し、その結果を還元していくことはマングローブの研究者にとって非常に喜ばしいことです。マングローブが陸域と海域のエコトーンであり、第3の生態系という位置づけをされてから、多くの分野の研究対象となってきました。昨今、津波や高潮に対する防潮林の効果が取り上げられマングローブの重要性も再認識されてきたところに、絶妙のタイミングで出版された本です。

「物理学」という表題がついており、難しい公式が書かれているとつい見逃してしまいそうになりますが、当初、この本には「干潟の生態系を支える海水流動」という副題がついていたことを著者から聞かされ、物理学が苦手ならば公式を飛ばして読んでもいいと勝手に理解させてもらいました。著者は海洋物理学の視点からマングローブを調査し、マングローブの維持、利用、再生には海水の動きが重要であることを説いています。そして、次の5点を考慮して執筆しています。

- 1) マングローブ域の生態系に対する物理課程の役割を啓蒙

- 2) マングローブ域における物理課程の特殊性を解説
  - 3) マングローブ域に適した調査・解析手法を提示
  - 4) マングローブ域の物理課程の若手研究者を育成
  - 5) マングローブ域における物理課程の研究論文の整理
- さらに、今後展開すべき研究課題と用語解説が加えられています。

読み終わったあと、この本に書かれていることは真実に基づいたデータ集だと気がつきました。世界各地のマングローブ林で長期にわたり調査したデータが整理され、マングローブ林のすみずみまで理解されていることが、マングローブ林へ新たな興味をもたらしてくれました。また、マングローブ林の調査をするたびに新知見に喜び、新疑問に悩むことの繰り返しのように多くの課題を読者に投げかけることでしょう。

マングローブの維持、利用、再生は一分野の研究で成立することはなく、いろいろな研究結果と意見を知ることが大切です。マングローブ研究者をはじめ多くの方に役立てていただきたいと思います。



## 平成22年度 日本マングローブ学会 総会報告

第1号議案 平成21年度事業報告および収支決算報告の件

委員：鈴木邦雄，飯島倫明，大田克洋，皆川礼子  
Sanit Aksornkoae, Gordon S. Maxwell

### 1. 会員移動状況

入会4名，退会0名，現在会員108名

### 3. 平成21年度収支決算報告 別紙-1 参照

### 2. 平成21年度事業報告

#### 2.1 役員会

平成21年5月29日 於：東京農業大学  
森林総合科学科会議室  
檜垣，中村（武），大田，飯島，中村（幸），皆川  
・平成21年度年次大会について打ち合わせた  
11月7，8日 東京農業大学において開催  
特別講演 11月7日（土）  
・Ecological Assessment on the Success of  
Mangrove Restoration in Pak Phanang Bay,  
Nakhon Si Thammarat, Southern Thailand  
Nittharatana Paphavasit (Chulalongkorn University)  
・Assessment of Community Capacity to sustain  
the On-going Mangrove Rehabilitation Programme  
in Pak Phanang Bay, Nakhon Si Thammarat,  
Southern Thailand  
Siriwan Siriboon (Chulalongkorn University)  
・平成21年度総会について  
・その他

#### 2.2 年次大会：第15回日本マングローブ学会大会

・研究発表 14件  
・特別講演 2件

#### 2.3 マングローブサイエンス 第7号の発行

平成22年3月 発行予定（平成22年6月に発行）

#### 2.4 編集委員会の開催

平成21年5月29日

#### 2.5 役員改選

2010年度・2011年度（平成22年4月～24年3月）

顧問：宮脇昭，神足勝浩，中村武久

会長：檜垣宮都

副会長：松田義弘，鈴木邦雄（編集担当），

大田克洋（会計担当）

理事：飯島倫明（総務担当），皆川礼子（庶務担当）

入江憲治，荻野和彦，菊池多賀夫，近藤勝彦，

佐々木寧，佐藤明，

長野敏英，中村幸人，馬場繁幸，宮城豊彦，

持田幸良

監事：河合省三，豊原秀和

編集委員会

委員長：持田幸良

第2号議案 平成22年度事業計画および収支予算案の件

### 1. 平成22年度事業計画（案）

#### 1.1 役員会

平成22年5月27日 於：東京農業大学 森林総合  
科学科会議室

檜垣，中村（武），大田，飯島，入江，持田，皆川

・平成22年度年次大会について打ち合わせた

11月6，8日 東京農業大学において開催

公開シンポジウム 11月6日（土）

「マングローブの30年」

コーディネーター 馬場繁幸

講師：向後元彦（マングローブ植林行動計画）

宮本千晴（マングローブ植林行動計画）

須田清治（マングローブ植林行動計画）

中村 亮（総合地球環境学研究所）

特別講演 11月7日（日）

「西表島4倍体ミミモチシダと起源」

松本 定（国立科学博物館植物研究部）

平成22年11月6日 於：東京農業大学

・平成22年度総会について

・その他

#### 1.2 年次大会：第16回日本マングローブ学会大会

・研究発表

・公開シンポジウム

#### 1.3 マングローブサイエンス 第8号の発行

平成23年5月 発行予定

原稿締め切り 平成23年1月31日

#### 1.4 編集委員会の開催

マングローブサイエンス 第8号の編集

平成22年5月27日 於：東京農業大学

平成22年7月13日 於：横浜国立大学

### 2. 平成22年度予算（案）省略

第3号議案

その他

・次年度以降の年次大会開催について

平成23年度 平成23年11月 東京農業大学にて開催

平成21年度 収支決算報告 (平成21年4月1日～平成22年3月31日)

収入の部 単位:円 別紙 -1

科目	平成21年度予算額	平成21年度決算額	対予算額増減△	摘要
前年度繰越金	1,010,244	1,010,244	0	
1.会費	270,000	200,000	△ 70,000	5,000円X37正会員、3,000円X5学生会員
2.事業収入(計)	300,000	193,000	△ 107,000	
学会費	300,000	193,000	△ 107,000	大会参加費(6,000円X28人、5,000円X1人、4,000円X5人)
受託事業	0	0	0	
3.寄付金	60,000	50,000	△ 10,000	東京農大からの学会開催助成金等
4.雑収入	1,500	9,718	8,218	普通預金利息、バックナンバー等頒布代金
5.合計	1,641,744	1,462,962	△ 178,782	

支出の部 単位:円

科目	予算額	決算額	増減△	摘要
1.事業費(計)	1,300,000	752,305	△ 1,041,195	平成21年度(第15回)大会(11月7,8日)開催費 Mangrove Science Vol.6刊行費
学会開催費	300,000	258,805	△ 41,195	
学会誌刊行費	1,000,000	493,500	△ 506,500	
受託事業費	0	0	0	
その他	0	0	0	
2.管理費(計)	110,000	18,249	△ 91,751	大会開催案内状送付および投稿者との連絡
会議費	30,000	0	△ 30,000	
旅費・交通費	10,000	0	△ 10,000	
通信費	30,000	13,861	△ 16,139	
印刷・製本費	0	0	0	
消耗品費	10,000	4,178	△ 5,822	
賃借料	0	0	0	
負担金	0	0	0	
雑費	30,000	210	△ 29,790	
3.予備費	50,000	0	△ 50,000	
4.小計(1.+2.+3.)	1,460,000	770,554	△ 689,446	
5.次年度繰越金	181,744	692,408	510,664	
6.合計	1,641,744	1,462,962	△ 178,782	

平成21年度 貸借対照表 (平成21年4月1日から平成22年3月31日まで)

収支決算	収入総額	1,462,962円
(平成22年3月31日現在)	支出総額	770,554円
	差引残高	692,408円
	単位:円	

借方(資産の部)			貸方(負債・資本の部)		
科目	金額	摘要	科目	金額	摘要
1.現金	9,050		負債		
2.普通預金	683,358		1.未払金	0	
3.郵便振替口座	0		2.預り金	0	
4.損益	0		資本		
			次年度繰越金	692,408	
資産合計	692,408		負債・資本合計	692,408	

会計監査報告

平成21年度会計監査の結果、適法であり正確であることを認めます。

平成22年10月31日

監事 河合省三  
監事 豊原秀和

## 平成23年度 日本マングローブ学会 総会報告

### 第1号議案 平成22年度事業報告および収支決算報告の件

#### 1. 会員移動状況

入会6名, 退会1名, 現在会員113名

#### 2. 平成22年度事業報告

##### 2.1 役員会

平成22年5月27日 於:東京農業大学

森林総合科学科会議室

檜垣, 中村(武), 大田, 飯島, 近藤, 入江, 持田, 皆川

・平成22年度年次大会について打ち合わせた

11月6, 7日 東京農業大学において開催

公開シンポジウム 11月6日(土)

「マングローブの30年」

コーディネーター 馬場繁幸

講師: 向後元彦 (マングローブ植林行動計画)

宮本千晴 (マングローブ植林行動計画)

須田清治 (マングローブ植林行動計画)

中村 亮 (総合地球環境学研究所)

特別講演 11月7日(日)

「西表島4倍体ミモチシダと起源」

松本 定 (国立科学博物館植物研究部)

平成22年11月6日 於:東京農業大学

・平成22年度総会について

・その他

##### 2.2 年次大会: 第16回日本マングローブ学会大会

・研究発表 14件

・公開シンポジウム 4件

・特別講演 1件

##### 2.3 Mangrove Science 第7号の発行

平成22年7月 発行

##### 2.4 編集委員会の開催

平成22年5月27日 於:東京農業大学

平成22年7月13日 於:横浜国立大学

#### 3. 平成22年度収支決算報告 別紙-2 参照

### 第2号議案 平成23年度事業計画および収支予算案の件

#### 1. 平成23年度事業計画 (案)

##### 1.1 役員会

平成23年6月23日 於:東京農業大学

森林総合科学科会議室

檜垣, 中村(武), 鈴木, 大田, 飯島, 持田, 佐藤, 入江, 皆川

・平成23年度年次大会について打ち合わせた

・役員改選について打ち合わせた

・会則について検討した

#### 1.2 年次大会

11月5, 6日 東京農業大学において開催

公開シンポジウム 11月5日(土)

「防潮・防災とマングローブ林」

コーディネーター 持田幸良

講師: 宮城豊彦 (東北学院大学)

田淵隆一 (JIRCAS)

Toe Toe Aung (横浜国立大学大学院)

コメンテーター

鈴木邦雄 (横浜国立大学)

馬場繁幸 (琉球大学 ISME)

#### 1.3 Mangrove Science 第8号の発行

平成23年12月発行予定

#### 1.4 編集委員会の開催

平成23年6月23日

#### 2. 平成23年度収支予算 (案) 別紙-3 参照

### 第3号議案 役員改選の件

#### 1. 役員改選

2012年度・2013年度(平成24年4月~26年3月)

顧問: 宮脇 昭, 神足勝浩, 中村武久, 檜垣宮都

会長: 鈴木邦雄

副会長: 松田義弘, 大田克洋(会計担当)

理事: 飯島倫明(総務担当), 入江憲治, 荻野和彦,

北宅善昭, 近藤勝彦, 佐々木 寧, 佐藤 明,

田淵隆一, 中村幸人, 馬場繁幸, 藤本 潔,

宮城豊彦, 皆川礼子(庶務担当),

持田幸良(編集担当)

監事: 河合省三, 豊原秀和

編集委員会

委員長: 持田幸良

委員: 飯島倫明, 大田克洋, 皆川礼子,

Sanit Aksornkoae, Gordon S. Maxwell

### 第4号議案 日本マングローブ学会会則 一部改正の件

#### 1. 日本マングローブ学会会則 別紙参照

### 第5号議案

#### その他

・次年度以降の年次大会開催について

平成24年度 東京農業大学 にて開催



## 平成22年度 収支決算報告 (平成22年4月1日～平成23年3月31日)

## 収入の部

単位:円

別紙 -2

科目	平成22年度予算額	平成22年度決算額	対予算額増減△	摘要
前年度繰越金	692,408	692,408	0	
1.年会費	270,000	206,000	△ 64,000	5,000円X34正会員(37件)3,000円X7学生会員
2.事業収入(計)	300,000	256,000	△ 44,000	
学会費	300,000	256,000	△ 44,000	大会参加費(6,000円X36人、4,000円X10人)
受託事業	0	0	0	
3.寄付金	60,000	65,000	5,000	東京農大からの学会開催助成金等
4.雑収入	10,000	2,149	△ 7,851	普通預金利息、バックナンバー等頒布代金
5.合計	1,332,408	1,221,557	△ 110,851	

## 支出の部

単位:円

科目	予算額	決算額	対予算額増減△	摘要
1.事業費(計)	810,300	801,229	△ 9,071	
学会開催費	300,000	290,929	△ 9,071	2010年度(第16回)大会(11月6,7日)開催費
学会誌刊行費	510,300	510,300	0	Mangrove Science Vol.7刊行費
受託事業費	0	0	0	
その他	0	0	0	
2.管理費(計)	110,000	20,823	△ 89,177	
会議費	30,000	0	△ 30,000	
旅費・交通費	10,000	0	△ 10,000	
通信費	30,000	11,900	△ 18,100	大会開催案内状送付および投稿者との連絡
印刷・製本費	0	0	0	
消耗品費	10,000	8,923	△ 1,077	大会案内・学会誌等送付用封筒ほか
賃借料	0	0	0	
負担金	0	0	0	
雑費	30,000	0	△ 30,000	
3.予備費	50,000	0	△ 50,000	
4.小計(1.+2.+3.)	970,300	822,052	△ 148,248	
5.次年度繰越金	362,108	399,505	37,397	
6.合計	1,332,408	1,221,557	△ 110,851	

## 平成22年度 貸借対照表 (平成22年4月1日から平成23年3月31日まで)

収支決算	収入総額	1,221,557 円
平成(23年3月31日現在)	支出総額	822,052 円
	差引残高	399,505 円
	単位:円	

借方(資産の部)			貸方(負債・資本の部)		
科目	金額	摘要	科目	金額	摘要
1.現金	998		負債		
2.普通預金	398,507		1.未払金	-	
3.郵便振替口座	-		2.預り金	-	
4.損益	-		資本		
			次年度繰越金	399,505	
資産合計	399,505		負債・資本合計	399,505	

## 会計監査報告

平成22年度会計監査の結果、適法であり正確であることを認めます。

平成23年5月31日

監事

河合省三

監事

豊原秀和

## 平成23年度（平成23年4月1日～平成24年3月31日）予算案

## 1.収入の部

単位:円

別紙-3

科目	平成22年度決算額	平成23年度予算額	増減△	摘要
前年度繰越金	692,408	399,505	△ 292,903	
1.会費	206,000	270,000	64,000	5,000円X45人+3,000円X15人
2.事業収入(計)	256,000	300,000	44,000	
学会費	256,000	300,000	44,000	大会参加費(6,000円X50人)
受託事業	0	0	0	
3.寄付金	65,000	60,000	△ 5,000	東京農大からの助成金ほか
4.雑収入	2,149	10,000	7,851	バックナンバー代金、預金利息ほか
5.合計	1,221,557	1,039,505	△ 182,052	

## 2.支出の部

単位:円

科目	22年度決算額	23年度予算額	増減△	摘要
1.事業費(計)	801,229	810,000	8,771	
学会開催費	290,929	300,000	9,071	第17回大会(2011年11月5, 6日)
学会誌刊行費	510,300	500,000	△ 10,300	Mangrove Science Vol.8刊行費
受託事業費	0	0	0	
その他	0	0	0	
2.管理費(計)	20,823	55,000	34,177	
会議費	0	10,000	10,000	
旅費・交通費	0	10,000	10,000	
通信費	11,900	20,000	8,100	学会誌(Vol.8)、18回大会案内等送料
印刷・製本費	0	0	0	
消耗品費	8,923	5,000	△ 3,923	
賃借料	0	0	0	
負担金	0	0	0	
雑費	0	10,000	10,000	
3.予備費	0	10,000	10,000	
4.小計(1.+2.+3.)	822,052	875,000	52,948	
5.次年度繰越金	399,505	164,505	△ 235,000	
6.合計	1,221,557	1,039,505	△ 182,052	

# 平成22年度日本マングローブ学会大会プログラム

(於:東京農業大学13号館2階)

## 第一日目 (11月6日)

サモア独立国におけるマングローブ林の津波減災効果に関する  
現地調査と数値解析

柳澤英明(東電設計)・宮城豊彦(東北学院大)・  
馬場繁幸(琉球大)

マングローブ生育土壌の化学特性

井上智美(環境研)・松本勝美(川上農場)・安西康晴(所属なし)

ロックウール培地を用いたマングローブ苗生産

北宅善昭(大阪府大)・Vipak Jintana (Kasetsart Univ.,  
Thailand)・Somsak Piriayotha (Dpt. Marine and Coastal  
Resources, Thailand)

タイ国カノム川マングローブ林に多発した *Leptococcus sp.* (コナ  
カイガラムシ科) の発生地拡散の経緯

皆川礼子・河合省三(東農大)

Impacts of Planting Mangrove on Brachyuran Crab  
Communities in South Sulawesi, Indonesia

古川文美子・小林繁男・岩田明久(京都大・院)・  
Ir. Yushinta Fujaya (UNHAS)

## 公開シンポジウム 「マングローブの30年」

総合司会 馬場繁幸(琉球大・ISME)

あいさつ 檜垣宮都(東農大)

1: 社会林業によるマングローブ植林支援-ミャンマー・イラワジ  
河口デルタ-

向後元彦(マングローブ植林行動計画)

2: マングローブ植林の現場から

宮本千晴(マングローブ植林行動計画)

3: カタール国でのマングローブ植林の取り組み

須田清治(マングローブ植林行動計画)

4: インド洋西海域世界のマングローブ海村文化の比較-タンザ  
ニア, ケニア, そしてエジプト-

中村 亮(総合地球環境研究所)

総合討論

懇親会(農大生協 カフェテリア・グリーン)

## 第二日目 (11月7日)

ベトナム南部カンザー地区のマングローブ域における人の自然利用

井上理咲子・藤本清(南山大)・Phan Van Trung・Cao Huy

Binh・Huyuh Duc Hoan (Can Gio Mangrove Protection  
Forest Managemen Board)・Nguyen Quynh Ha Nhu (Hong  
Bang Univ.)

サンドイッチ法とプロトプラスト法によるマングローブのアレロパ  
シー検定法開発-マメ科とマヤブシキ科-

井上文・長谷川愛・土屋慎平(横国大・院)・皆川礼子(東農大)・  
藤井義晴(農環研)・笹本浜子(横国大)

A *Avicennia alba* 胚軸由来の細胞培養系開発-カルス増殖と  
プロトプラスト単離-培養-

土屋慎平(横国大・院)・皆川礼子(東農大)・井上文・笹本浜子  
(横国大・院)

## 特別講演

西表島産4倍体ミモチシダの起源を探る

松本定・岩科司・田中法生・海老原淳・平山裕美子(国立科  
学博物館)・中村武久・皆川礼子(東農大)・綿野泰行・高山  
浩司(千葉大)

メヒルギ根の環境適応特性に関する基礎的研究

本間知夫(前橋工科大)・松尾喜義(野菜茶業研究所)・地下  
まゆみ(千葉科学大)・馬場繁幸(琉球大)

インドネシア中部ジャワならびに西部ジャワオオバヒルギ人工林  
における成長と林分形成

清藤城宏・後藤厳覚(オイスカ)・山中理恵子(富士森林施業  
技研)・prihartanto Nur Rahamat (オイスカインドネシア)

西表島における海側前縁マングローブ群落の分布の偏りと立地  
環境

真栄城 亮・持田幸良(横国大・院)

Post-cyclone perception and attitude of local community  
towards the ecosystem based mangrove management in  
Myanmar

Toe Toe Aung・Mochida Yukira (横国大・院)

Preliminary finding on the ISSR analysis of genetic diversity  
between plantation grown and natural grown *Kandelia  
obovata*

Janine Caynap・Kondo Katsuhiko (東農大・院)

*Sonneratia apetala* の髓腔の形態について

大田克洋・皆川礼子・中村武久(東農大)

# 平成23年度日本マングローブ学会大会プログラム

(於:東京農業大学 新1号館2階)

## 第一日目 (11月5日)

西表島に於けるマングローブの生態生理学的研究

渡辺信・石垣圭一・井村信弥・馬場繁幸(琉球大・西表)・  
Trevor Jones (SCION-NewZealand)

*Derris indica* 液体培養細胞の耐塩性試験とプロトプラスト法によるアレロパシー検定

森大祐・速水しおり・井上文・土屋慎平・長谷川愛・笹本浜子  
(横国大・院)

各種マングローブ培養細胞とプロトプラストのアミノ酸組成と培養培地条件との関係解明

土屋慎平・小柳朋也(横国大・院)・荻田信二郎(富山県大)・  
笹本浜子(横国大)

フィリピンにおける住民参加型マングローブ林再生の試み

古川恵太・岡田知也(国総研)

## 公開シンポジウム 「防潮・防災とマングローブ林」

総合司会 持田幸良(横国大)

あいさつ 檜垣宮都(東農大)

1: 大津波の後で-被害をうけたマングローブは回復したのか-

田淵隆一(JIRCAS)・藤岡義三(増養殖研)・平田泰雅(森林総研)・Patanaponpaiboon P.(チュラロンコン大)

2: Disturbance, resilience and restoration thinking in mangrove environment after cyclone impact in the Ayeyarwady Delta, Myanmar

Toe Toe Aung・Mochida Yukira・Ono Katsuhiko(横国大・院)・Maung Maung Than (DFID・ミャンマー)

3: マングローブ林・海岸林の津波減衰効果

宮城豊彦(東北学院大)

総合討論

田淵隆一・Toe Toe Aung・宮城豊彦・持田幸良

コメンテーター

鈴木邦雄(横国大)・馬場繁幸(琉球大)

懇親会(農大生協 カフェテリア・グリーン)

## 第二日目 (11月6日)

ミクロネシア連邦ポンペイ島エスチュアリ型マングローブ林の森林動態と炭素固定能力-1ha 固定プロットにおける17年間の観測研究-

宮崎さゆり・藤本潔(南山大)・平田泰雅(森林総研)・  
谷口真吾(琉球大)・小野賢二(森林総研東北)・西埜友美  
(南山大)・田淵隆一(JIRCAS)・Saimon Lihpai  
(Pohnpei State Government)

高密度に支柱根が発達した *Rhizophora stylosa* 林の地上部現存量の推定-ミクロネシア連邦ポンペイ島の事例-

西埜友美・藤本潔(南山大)・平田泰雅(森林総研)・  
谷口真吾(琉球大)・小野賢二(森林総研東北)・平館俊太郎  
(農環研)・宮崎さゆり(南山大)・田淵隆一(JIRCAS)・  
Saimon Lihpai (Pohnpei State Government)

マングローブ植物の窒素獲得メカニズム

井上智美(国立環境研)・安西康晴(所属なし)

外液イオン濃度変化に伴う耐塩性マングローブ培養細胞の元素分布変化の解析

早津学・小野真菜美(神奈川大)・長谷川愛・土屋慎平(横国大・院)・鈴木季直(神奈川大)・笹本浜子(横国大・院)

マダガスカル共和国・マハジャンガのマングローブ林-現状と問題点-

持田幸良・Toe Toe Aung・M. Jedai Attari(横国大・院)・  
Harifidy R. Ratsimba(アンタナナリボ大)

# 日本マングローブ学会会則

## 第1章 総則

(名称)

### 第1条 本会は日本マングローブ学会

(Japan Society for Mangroves) と称する。

(事務局)

### 第2条 本会の事務局は下記におく。

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

東京農工大学地域環境科学部森林総合科学科林産化学  
研究室内

## 第2章 目的および事業

(目的)

### 第3条 本会はマングローブに関する学理について、研究発表、知識の交換、情報の提供を行う場となることにより、マングローブに関する研究の普及を図り、わが国の学術と関連産業の発展に寄与することを目的とする。

(事業)

### 第4条 本会は、前条の目的を達成するために次の事業を行う。

- (1) 年次大会の開催
- (2) 会誌「Mangrove Science」の発行
- (3) その他本会の目的を達成するために必要な事業

## 第3章 会員の種別および年会費

(種別)

### 第5条 本会の会員種別は次のとおりとする。

- (1) 正会員 (一般会員と称する。) 本会の目的に賛同して入会した個人
- (2) 学生会員 本会の目的に賛同して入会した院生、学生の身分を有する個人
- (3) 賛助会員 本会の目的に賛同して入会し、規定の賛助会費を納めた団体または個人

(入会)

### 2. 本会に入会しようとする者は、所定の入会申込書に必要事項を記入し会長に申し込む。

### 3. 会員が退会しようとする時は、退会届けを会長に提出する。

(年会費)

### 第6条 本会の年会費は次のとおりとする。

- (1) 正会員 5,000 円
- (2) 学生会員 3,000 円
- (3) 賛助会員 1口 10,000 円以上
- (4) 年会費の改定は総会の決議による。

### 2. 納入した年会費はいかなる理由があっても返却しない。

## 第4章 役員等

(役員等)

### 第7条 本会には次の役員をおく。

- (1) 会長 1名
- (2) 副会長 3名以内
- (3) 理事 20名以内
- (4) 監事
- (5) 顧問

### 2. 役員は総会で選出する。

### 3. 役員は、会長の指示に従い、本会の事業が円滑に行われるように審議する。会計、総務、庶務および編集を担当する責任者を定める。

### 4. 役員の任期は4月1日よりの2年間とし再任は妨げない。

## 第5章 会議

(会議)

### 第8条 本会に総会、役員会、編集委員会をおく。

(総会)

### 第9条 総会は正会員、学生会員によって構成し、年1回会長が招集する。なお、必要に応じて、臨時総会を開催する。

### 2. 総会の議長は会長とし、総会の議事は出席会員の過半数で決する。

### 3. 総会は次の事項を決議する。

- (1) 事業計画および収支予算
- (2) 事業報告および収支決算
- (3) 役員の改選
- (4) 会則の変更
- (5) その他、会長、役員会が必要と認めた事項

(役員会)

### 第10条 役員会は役員によって構成し、会長が招集する。

### 2. 役員会は次の事項を審議する。

- (1) 総会に提案する事項
- (2) 年次大会の実行・運営に関する事項
- (3) 会誌「Mangrove Science」の発行に関する事項
- (4) その他、会長が必要と認めた事項

(Mangrove Science 編集委員会)

### 第11条 本会に会誌「Mangrove Science」編集委員会をおく。

### 2. 委員は編集委員長推薦により、会長が委嘱する。

### 3. 編集委員会は投稿原稿の審査、編集、発行を担当する。

### 4. Mangrove Science の投稿規定、執筆要領は別に定める。

## 第6章 会計

(会計)

### 第12条 本会の収支決算は会計年度終了後すみやかに監査を受け、役員会の審議を経て、総会の承認を受けなければならない。

### 第13条 本会の会計年度は毎年4月1日に始まり、翌年の3月31日に終わるものとする。

## 第7章 その他

### 第14条 年次大会、総会、編集委員会、会計等に関する細則は別にそれを定める。

## 付則

### 1) 平成元年12月、日本マングローブ協会会則として制定。

### 2) 平成6年から、日本マングローブ協会学術部会は日本マングローブ学会と称する。

### 3) 平成23年11月5日改正。

# MANGROVE SCIENCE 投稿規程

本学会誌に掲載する論文の種類は、原著論文、総説論文、短報、資料とする。

1. 本会正会員は本学会誌へ投稿できる。著者複数の場合は少なくともその内の一人が正会員でなければならない。但し、編集委員会が依頼した場合はこの限りではない。
2. 原著論文は和文または英文で書かれたオリジナルとし、別に定める執筆要領に従って作成されたものとする。
3. 総説論文は、編集委員会がテーマや分野を定め、これの執筆者を選定し依頼したもの、または会員が総説論文として投稿し、編集委員会が認めたものとする。
4. 短報は原著論文に準じ、内容が編集委員会において短報と判定されたもので、刷り上りは3ページを超えないものとする。
5. 原稿は紙ベースで3部提出する。
6. 原稿の採否は編集委員会が決定する。受け付けられた原稿の内、原著論文、短報については、編集委員会が選定した複数の専門家に校閲を依頼する。その結果、内容、体裁に問題ありと判断された場合は、その旨を著者に伝えて修正を求める。また受理できないと判定された論文は理由を明記

して著者に返却する。

7. 受理された場合は完全原稿を電子ファイル（Word 原稿）にて提出する。著者校正は原則として初稿に限っておこない、誤植の訂正にとどめる。
8. 論文は図表を含め、刷り上り原則 10 ページまでとし、超過分については著者負担とする。ただし編集委員会が依頼した原稿はこの限りではない。
9. 別刷りは 50 部までを無料とし、50 部以上は著者負担とする。
10. 原稿は下記住所に送付する。また本学会誌に関する問い合わせ先は編集委員会宛とする。

〒 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-2

横浜国立大学 大学院環境情報研究院

日本マングローブ学会編集委員会

持田 幸良

Tel & Fax: 045-339-3414 e-mail: mochida@ynu.ac.jp

## 執筆要領

1. 論文原稿は和文または英文とし、次の順序で記述する。  
和文の場合：(1) 表題、(2) 英文表題、(3) 著者名、(4) ローマ字著者名、(5) 所属、(6) 英文アブストラクト、(7) Key Word (アルファベット順に5語以内)、(8) 本文、(9) 文献。  
英文の場合：(1) 表題、(2) 著者名、(3) 所属、(4) 英文アブストラクト、(5) Key Word (アルファベット順に5語以内)、(6) 本文、(7) 文献。
2. 和文原稿の場合は MS 明朝 10.5 ポイント、英文原稿の場合は Times New Roman 10.5 ポイントを使用してください。フォーマットはとくに指定しませんが、1 段組み、40 字、36 行を目安に作成してください。
3. 論文中に引用した文献はすべて記載するものとし、文献の書式は下記の例にならない、配列は著者の ABC 順とする。Web サイトの場合は、そのアドレスとする。

<例>

Briggs S. V. (1977): Estimates of biomass in a temperate mangrove community. Journ. Austral. Ecol., 2, 369-373.

田川日出男 (1982) : マングローブとマンガルの生態 I. 海洋と生物 4, (2):82-91.

藤間剛・中村久美・Pipat PATANAPONPAIBOON・荻野和彦 (1991) : 冠水深と植栽密度がヒルギダマシ *Avicennia marina* の直立気根に与える影響. TROPICS 1,(1):75-82.

Watson J. G. (1928): Mangrove forest of the Malayan Peninsula. Malay. For. Rec. 6, 275pp.

4. 和文原稿で動植物名を記す場合、和名はカタカナ書きとし、学名はイタリック体とする。
5. 論文中への図表の掲載は自由であるが、そのまま印刷できるもの（清書した図表・プリント写真）であること。
6. 図 (Fig.) 表 (Tab.) および写真 (Fig. または Plate) には英文でキャプションをつける。その説明は別紙に書き、図表・写真と一致するよう記号および番号または記号を (Fig. 1, Tab. 1, Plate 1) のように明示する。
7. 本学会誌に関する問い合わせ先は編集委員会宛とする。



---

---

## 日本マングローブ学会役員名簿 (2010 年度・2011 年度)

---

---

顧問：宮脇 昭，神足勝浩，中村武久  
会長：槍垣宮都  
副会長：松田義弘，鈴木邦雄，大田克洋（会計担当）  
理事：飯島倫明（総務担当）  
皆川礼子（庶務担当）  
持田幸良（編集担当）  
人江憲治，荻野和彦，菊池多賀夫，近藤勝彦，佐々木 寧，  
佐藤 明，長野敏英，中村幸人，馬場繁幸，宮城豊彦  
監事：河合省三、豊原秀和

---

## Mangrove Science Vol.8.2011

---

編集・発行	日本マングローブ学会 持田幸良（編集委員長）
編集委員会	〒 240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-2 横浜国立大学大学院環境情報研究院 植物生態学研究室内 電話番号 045-339-3414
日本マングローブ学会事務局	〒 156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1 東京農業大学地域環境科学部森林総合科学科 林産化学研究室内 電話番号 03-5477-2280
印刷	土屋図形株式会社 横浜市中区山手町 27-5 507 号
印刷・発行	2011 年 12 月 印刷 2011 年 12 月 発行

---





