

絶滅危惧Ⅰ類に指定されている紅藻アサクサノリの集団遺伝構造

大西舞¹・菊地則雄²・岩崎貴也³・河口莉子⁴・嶋田智^{1*}

¹ お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 (〒112-8610 文京区大塚 2-1-1)

² 千葉県立中央博物館分館海の博物館 (〒299-5242 千葉県勝浦市吉尾 123)

³ 東京大学大学院総合文化研究科 (〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1)

⁴ お茶の水女子大学理学部生物学科 (〒112-8610 文京区大塚 2-1-1)

Mai Ohnishi¹, Norio Kikuchi², Takaya Iwasaki³, Riko Kawaguchi⁴ and Satoshi Shimada^{1*}: Population genomic structures of endangered species (CR+EN), *Pyropia tenera* (Bangiales, Rhodophyta). Jpn. J. Phycol. (Sôru) 61: 87-96, July 10, 2013

Pyropia tenera (Kjellman) Kikuchi *et al.* (Bangiales, Rhodophyta) has been categorized as an endangered species (CR+EN) in Japan. This threatened species is morphologically and phylogenetically related to aquacultured laver species, *Pyropia yezoensis* (Ueda) Hwang *et al.* Choi. Firstly, we determined the distribution of *P. tenera*, *P. yezoensis* and intercross of *P. tenera*-*yezoensis* from 165 samples, that were first identified as *P. tenera* collected at 46 localities of 17 Prefectures. Sequence data of *rbcL* gene and the ITS1 region, and PCR-RFLP (*ARP4* gene) analyses suggested that *P. tenera* were distributed at 38 localities, including eight new localities. Samples of intercross of *P. tenera*-*yezoensis* were mostly located in Tokai and the Kanto to Tohoku regions. From SSR analysis of the *P. tenera*, we determined genotypes of three microsatellite markers (Pye13, Pye41, Pye53). Four genetic clusters (1, 2, 3 and 4) and three distinct clades (G1, G2 and G3) were detected by STRUCTURE analysis and population phylogenetic analysis, respectively. Cluster 1 was found in populations of Kumamoto and Nagasaki Prefectures (G1) and highly divergent from other clusters. Cluster 2 was mainly distributed in populations along the Pacific coast from Kanto to Tohoku region (G2). Cluster 3 and 4 were detected in many populations (G3), which were geographically scattered.

Key Index Words: endangered species, population genomic structures, *Pyropia tenera*, *Pyropia yezoensis*, SSRs marker

¹ Ochanomizu Univ., Ohtsuka 2-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

² Coastal Branch of Natural History Museum and Institute, Chiba, Yoshio 123, Katsuura-city, Chiba 299-5242, Japan

³ Univ. of Tokyo, Komaba 3-8-1, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

⁴ Ochanomizu Univ., Ohtsuka 2-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

*Author for correspondence: shimada.satoshi@ocha.ac.jp

緒言

紅藻アマノリ属アサクサノリ *Pyropia tenera* (Kjellman) Kikuchi *et al.* は、絶滅危惧Ⅰ類に指定され (環境庁 2000)、北海道南部から九州までの内湾および朝鮮半島に分布し、葉状体は秋から春にかけて繁茂し成熟藻体は 12 月下旬頃から 4 月頃まで出現する (能登谷 2000)。アサクサノリの生育場所は、ほとんど例外なく内湾や潮入の湖などの波静かな場所の淡水の流入する場所、特に大小の河川の河口付近に形成される干潟である (菊地ら 2002)。

アサクサノリの生育地は、1998 年の時点では全国で 4 カ所が知られていたのみだったが (三浦 1998)、その後の調査によって、2002 年には 8 カ所が報告された (菊地ら 2002)。海苔養殖の発祥地とされる東京湾 (宮下 2003) ではアサクサノリは絶滅したものと考えられていたが (三浦 1994)、2004 年から 2005 年にかけて行われた多摩川河口域における調査において、他の生育地に比べるとその個体数は少ないものの局所的に生育していることが確認された (菊地・二羽 2006)。また、2005 年に環境省のレッドリスト改訂に伴う長崎県での調査によって新たな生育地が確認され (川内野 2006)、さらに 2009 年の春に佐賀県唐津市佐志川河口近

くの干潟でも生育が確認されるなど (吉田・菊地 2009)、その後の調査によって徐々に新たな生育地が明らかとなってきた。そして、2012 年の時点でアサクサノリの生育地として 32 地点が報告された (菊地ら 2012)。

近年、アサクサノリの属するウシケノリ目で分子データに基づく属の再検討がおこなわれ (Sutherland *et al.* 2011)、日本産アマノリ属は *Porphyra* から *Pyropia* に変更された (菊地 2012)。アマノリ属は体構造が単純で分類形質が少なく、形態での種の識別が難しい面がある (菊地 2010)。特にアサクサノリとスサビノリは葉状体の形態のみで種を区別するのは困難であるが (菊地 2010)、近年では DNA 解析を用いた種判別が用いられるようになってきており、アサクサノリとスサビノリは異なる系統群として認識されている (Kunimoto *et al.* 2003, Niwa *et al.* 2005b, 2009, Abe *et al.* 2013)。ただし、ごく一部の地域でこれらの 2 種の交雑体が確認されている (Niwa *et al.* 2009)。これら交雑体は、スサビノリ♀×アサクサノリ♂の交雑の場合、*rbcL* 遺伝子はスサビノリの配列を、ITS1 領域はアサクサノリの配列を保持し (Choi *et al.* 2008, Niwa *et al.* 2009, 2010, Niwa & Sakamoto 2010)、一方で逆の組み合わせであるアサクサノリ♀×スサビ

表 1. 本研究に用いたサンプル情報と分子同定結果 (個体数).

採集場所, 採集日	既報地	合計	アサクサノリ	SSR (2n)	交雑体	スサビノリ
1 熊本県天草市河浦町河浦 一町田川河口干潟, 1999.01.17, 2000.01.22, 2004.01.19	○	4	4	3 (3)	0	0
倉岳町目玉 棚底湾, 2004.01.21	○	7	7	7 (2)	0	0
新和町大宮地 大宮地川河口, 2000.01.22, 2004.01.20	○	5	5	4 (2)	0	0
北浜町 本渡海浜浴場, 2000.01.22	新規	3	3	2 (0)	0	0
栖本町馬場, 2000.01.21	新規	2	2	1 (0)	0	0
上天草市大矢野町中宮津, 2004.01.20	○	2	2	2 (1)	0	0
姫戸町姫浦, 2000.01.21		1	0		0	1
2 長崎県佐世保市鹿町町土肥の浦水尻, 2005.02.25	○	2	2	2 (1)	0	0
明野平 鹿町川, 2005.02.25	新規	1	1	1 (0)	0	0
日野町 相浦川河口, 2005.02.25	○	2	1	1 (1)	1	0
江迎町長坂, 2005.02.25	○	3	3	3 (2)	0	0
小佐々町白ノ浦 小佐々浦, 2005.02.25	○	1	1	1 (1)	0	0
南島原市西有家町龍石 有馬川河口, 2005.02.24	○	2	2	1 (1)	0	0
深江町 深江川河口, 2005.02.24	新規	1	1	1 (0)	0	0
長崎市多以良町 多以良川河口, 2004.03.09	○	2	2	1 (0)	0	0
平戸市迎紐差町 中川安満川合流地点下流, 2005.02.26	○	3	3	2 (2)	0	0
北松浦郡佐々町小浦 佐々川河口, 2005.02.25	○	2	2	1 (1)	0	0
諫早市小長井町井崎 船津川河口, 2005.02.23	○	2	2	1 (1)	0	0
3 佐賀県唐津市 佐志川河口, 2008.04.02, 2009.03.11, 2009.03.21	○	10	10	7 (7)	0	0
4 福岡県行橋市稲童 長野間川河口, 2011.03.18	○	3	3	2 (1)	0	0
北九州市門司区大積 奥畑川河口大積干潟, 2011.03.18	○	2	2	1 (0)	0	0
京都郡菊田町 近衛川河口, 2011.03.18	○	1	1	1 (0)	0	0
5 大分県国東市国見町櫛来 櫛来川河口公民館下, 2006.03.16	○	2	2	1 (1)	0	0
竹田津 竹田津川河口国道下, 2006.03.16	○	2	2	2 (1)	0	0
豊後高田市 広瀬川上流側, 2006.03.16	○	1	1	1 (1)	0	0
6 山口県山陽小野田市津布田森本, 2001.02.25	新規	1	1		0	0
7 広島県呉市 大谷川河口, 2005.02.22	○	3	3	3 (2)	0	0
黒瀬川河口, 2006.03.02	○	5	5	2 (2)	0	0
甘日市市宮島町フェリー乗り場横, 2000.03.07, 2004.02.23	新規	2	1	1 (0)	0	1
8 徳島県徳島市住吉 吉野川河口, 2000.03.06	新規	1	1	1 (0)	0	0
9 三重県伊勢市大湊 宮川河口干潟, 2000.02.22, 2004.02.22	○	4	2	2 (1)	0	2
10 愛知県豊橋市前芝町 豊川河口干潟, 2000.02.21	○	3	3	1 (1)	0	0
田原市石神町, 2000.02.21		1	0		0	1
田原湾 汐川干潟, 2000.02.24		1	0		1	0
11 静岡県浜松市西区雄踏町 浜名湖河口付近ロイヤルホテル, 2000.02.20		1	0		1	0
12 神奈川県川崎市川崎区殿町 多摩川河口 (羽田側合), 2004.02.11, 2004.02.23, 2005.02.14, 2006.02.02, 2006.02.27, 2008.02.13, 2009.02.03, 2012.02.29	○	30	30	28 (15)	0	0
13 東京都江戸川区臨海町葛西海浜公園 東渚, 2007.03.22	○*	5	3	3 (2)	2	0
14 千葉県長生郡長生村一松 一宮川河口, 2004.02.27, 2006.02.14, 2008.03.06	○*	13	8	4 (1)	5	0
千葉浦安市舞浜 旧江戸川河口, 2006.02.28, 2008.02.10	○	6	6	5 (4)	0	0
15 福島県相馬市松川浦, 2003.03.06	○	3	0		3	0
16 宮城県亶理郡亶理町 鳥の海, 2003.03.05, 2006.03.05	○	10	6	5 (4)	4	0
石巻市 万石浦, 1999.03.20		1	0		1	0
長面 長面浦, 2004.03.10		2	0		2	0
仙台市若林区藤塚 名取川河口井土浦入口, 2006.03.05		3	0		2	1
気仙沼市松崎片浜 面瀬川河口, 2004.02.23	新規	1	1	1 (0)	0	0
17 岩手県下閉伊郡山田町船越 山田湾浦の浜湾奥の水門前, 2006.03.07	○	3	2	2 (1)	1	0
合計個体数		165	136	107 (62)	23	6
合計地域数		46	38	37 (27)	11	5

* 菊池ら (2012) では, 千葉県浦安市舞浜旧江戸川河口と東京都江戸川区臨海町葛西海浜公園東渚は同一地点とみなされていた

ノリ♂の交雑では, 両領域においてアサクサノリタイプの配列を保持することが確認された (Niwa *et al.* 2010)。つまり, *rbcL* 遺伝子と ITS1 領域の解析のみでは, アサクサノリとアサクサノリ × スサビノリ交雑体を区別することはできない。その後, このアサクサノリ × スサビノリ交雑体は *ARP4* 遺伝子を用いた PCR-RFLP 解析で確認できることが報告さ

れた (Niwa & Sakamoto 2010)。しかしこの方法では, 交雑体がアサクサノリ♀ × スサビノリ♂なのか, アサクサノリ♂ × スサビノリ♀なのか区別する事はできず, また他種アマノリ属藻類での解析例がなく, アサクサノリ, スサビノリもしくはアサクサノリ × スサビノリ交雑体を区別することにより有効な手段といえる。

表 2. 分子同定及び PCR-RFLP 解析に用いた各プライマー.

遺伝子	プライマー名	プライマーの配列 (5' - 3')
<i>rbcL</i> ^{*1}	Rh1	AAGTGAACGTTACGAATCTGG
	700R	GATGCTTTATTTACACCT
ITS1 ^{*2}	F-intron 2	TTAAGAGACAGTCGGTCCCT
	R-5.8S2	GCTGCGTTCTTCATCGTT
ARP4 ^{*3}	PFL027a12F10	GCCTGTTTGAGCGTCTCAG
	PFL027a12R4	CAGACCAAACGTGCAAGC

^{*1} Hanyuda *et al.* 2004, ^{*2} Niwa *et al.* 2005a, ^{*3} Park *et al.* 2008

生物種の保全についてはその生育地、遺伝的多様性、集団構造の把握が重要である (井鷲 2012)。その手法として形態分類や DNA 解析が挙げられるが、特に SSRs マーカーを用いたマイクロサテライト解析は、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数が多いこと、共優性であること、および実験が PCR と電気泳動だけで簡易であり多数のサンプルを扱いやすいことから、種内の遺伝的多様性や集団構造を把握するのに適した方法である (津村 2001)。藻類においても紅藻 *Mazzaella laminarioides* などの集団構造解析に用いられている (Montecinos *et al.* 2012)。アサクサノリの種内における遺伝的多様性や集団遺伝構造に関する報告はこれまでに例がないため、マイクロサテライト解析によって遺伝的な集団構造を調査することで、絶滅の危機に瀕するアサクサノリの保全にとって重要な情報が得られると考えられる。

本研究では、まず日本各地からアサクサノリと思われる藻体を採集し、*rbcL* 遺伝子および ITS1 領域の塩基配列と ARP4 遺伝子を用いた PCR-RFLP 解析による分子同定をおこない、アサクサノリの生育地を正確に把握するとともに、アサクサノリ × スサビノリ交雑体の有無についても確認した。次に、アサクサノリと分子同定できた藻体について、3 つのマイクロサテライト (SSRs) マーカーを用いた集団遺伝構造解析をおこなった。

材料と方法

採集

17 都県 46 地域からアサクサノリと思われる 165 個体を採集した (表 1)。採集した藻体はすべて葉状体で、ほとんどの藻体は葉状体から 1 つの糸状体を分離し糸状体世代の系統株として保存した。母藻および一部葉状体は、そのまま -20℃ で冷凍もしくは乾燥標本として保管した。証拠標本は国立科学博物館に収めた (TNS-AL: 181401-18454)。

DNA 解析

DNA の抽出には、Cica Geneus DNA Extraction Reagent (関東化学, 東京) を用い、まず、*rbcL* 遺伝子と ITS1 領域の塩基配列を決定した (Niwa *et al.* 2009)。プライマー配列は表 2 に示した。系統樹のモデルテストは KAKUSAN4 (Tanabe 2007) を用いた。AIC 基準に基づいて *rbcL* 遺伝子は TN93_Gamma モデル、ITS1 領域は J2ef_Gamma モデルを用い、Treefinder で最尤法系統樹を構築した (Jobb *et al.* 2004)。

表 3. マイクロサテライト遺伝子座における各プライマー.

プライマー名	プライマーの配列 (5' - 3')	Accession number
Pye13F	GTTTCTTCCGCGCTGCTA	AB191327
Pye13R	GGCTGACACGCAATCTACAC	
Pye41F	GACCGTGATTGCTTGGCTA	AB191330
Pye41R	TGAATGACAGTGCCTTGACG	
Pye53F	GTGCATGCATTCTGTTGATG	AB191332
Pye53R	AAAAGAAGGGGAGGGGAGAC	

Rooting に関しては、Niwa *et al.* (2009) に従った。*rbcL* 遺伝子と ITS1 領域の塩基配列による分子同定の結果アサクサノリと同定されたもの及び ITS1 配列が増幅できなかったものに対し、PCR-RFLP 解析を行った (Niwa & Sakamoto 2010)。

マイクロサテライト (SSRs) 解析

上述の分子同定の結果、アサクサノリと同定された個体に対し、Pye13, Pye41, Pye53 (Niwa *et al.* 2010) の 3 個の SSRs マーカーを用い、マイクロサテライト解析を行った。各 Primer の配列は表 3 に示す。Ultra Pure Water 7.3 μ l (和光純薬工業, 大阪), 10x Buffer 1.0 μ l (タカラバイオ, 滋賀), dNTPmix 0.8 μ l (タカラバイオ, 滋賀), DMSO 0.5 μ l (和光純薬工業, 大阪), 10 M のカセット配列 (Schuelke 2000) 付き Forward Primer と Reverse Primer 各 0.5 μ l, Takara EX taq 0.05 μ l (タカラバイオ, 滋賀) を含む反応液を作製し、抽出した DNA を各々 1.2 μ l 加え、94℃: 5 min で変性後、94℃: 30 sec, 53℃: 45 sec, 72℃: 45 sec を 37 サイクル、72℃: 10min で PCR 反応を行った。その後、Forward Primer の代わりに 8 pico mol の蛍光標識 ABI PRISM (Applied Biosystems, CA) を 0.5 μ l 加えた同様の PCR 反応液を作製し、そこにさきほどの反応産物を 1.0 μ l 加え、94℃: 5 min, 94℃: 30 sec, 53℃: 45 sec, 72℃: 45 sec を 11 サイクル、72℃: 10 min 行った。その後、それらを BigDye X Terminator TM Purification Kit (Applied Biosystems, CA) のプロトコルに従い精製し、96 穴プレートに反応産物を適量と GeneScanTM-500LIZ Size Standard (Applied Biosystems, CA) 7.0 μ l, そして全量が 20 μ l になるよう Hi-Di Formamide で調整し、ABI Model 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) と GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems, CA) を用いて遺伝子型を決定した。

集団遺伝学的解析

最初に全集団および各集団の遺伝的多様性について調べるため、2n であることが確実な孢子体系統保存株の 13 都県 27 地域 62 個体 (表 1) を用いて FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2001) による解析を行った。全集団の遺伝的多様性の指標として、対立遺伝子数 (TA; Total number of alleles), 対立遺伝子多様度 (AR, Allelic richness; El Mousadik & Petit 1996), 各集団における遺伝子多様度の平均 (H_s), 全集団での遺伝子

多様度 (H_T) を算出した (Nei 1987)。ここで算出した対立遺伝子多様度 AR は、各集団における対立遺伝子数をデータセット中で最小のサンプル数 (本研究では 1 個体) で標準化したものであり、サンプル数の影響を受けない遺伝的多様性の指標として用いることができる。また、この遺伝子多様度 (H_S , H_T) は、Nei (1987) の方法に基づく遺伝子多様度の不偏推定値である。各集団の遺伝的多様性の指標としては、対立遺伝子多様度 (AR)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)、ヘテロ接合度の観察値 (H_O)、Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) からのずれを示す近交係数 (F_{IS} ; $1 - H_O/H_E$) を算出した。更に、 F_{IS} については、0 (= HWE) からの偏りの有意性を 39,000 回の randomization test で確かめた。

集団間の遺伝的関係性については、2n であることが確実な胞子体だけでなく、葉状体も含めた 14 都県 37 地域 107 個体 (表 1) を用いて解析を行った。まず、populations version 1.2.31 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>) を用い、各集団間の総当たりの遺伝距離として Nei の遺伝距離 D_A (Nei *et al.* 1983) を算出、次にその結果に基づいて近隣結合法による集団系統樹を構築した。その際には、遺伝子座を 1000 回ブートストラップさせた系統樹を作成することで、各クレードの信頼性についても評価した。さらに、個体ベースでの遺伝構造について評価するため、連鎖不平衡および Hardy-Weinberg 不平衡が最小となるように供試全個体をベジアンクラスタリングで K 個のクラスターに割り振る STRUCTURE 解析を STRUCTURE version 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000) を用いて行った。推定の際には、クラスター間の対立遺伝子頻度に相関があることを仮定した上で、各個体が K 個のクラスターのうちの複数クラスターに由来する混合モデルを用いた。最初の Burnin Period は 100,000 世代、Burnin 後の MCMC は 100,000 世代に設定して計算を行った。クラスター数 (K) は 1-7 まで設定し、各 K について 10 回ずつランを行った。計算終了後、Structure Harvester v. 0.6.93 (Earl & von Holdt 2012) を用いて ΔK (Evanno *et al.* 2005) を算出し、 ΔK が最も高かった K の値を最適なクラスター数とした。更に、その最適なクラスター数で行われた 10 回のランの中で、最も対数尤度 $\ln P(D)$ が高かったランの結果を考察に用いた。また、各クラスター間の遺伝距離として出力される net nucleotide distance (Falush *et al.* 2003) の値に基づき、phylip version 3.69 (Felsenstein 2004) 中の NEIGHBOR プログラムを用いて、上の計算で得られた複数クラスターについての近隣結合法による系統樹を構築した。

結果

分子同定

rbcL 遺伝子の系統樹を図 1 に、ITS1 領域の系統樹を図 2 に示した。本研究で用いた 165 個体のうち、*rbcL* 遺伝子でアサクサノリ (AB243206) と同一の配列をもつものが 136 個体 (type 1, 図 1)、スサビノリ (AB366140) と同一の配列をもつものが 29 個体 (type 2, 図 1) であった。ITS1 では、

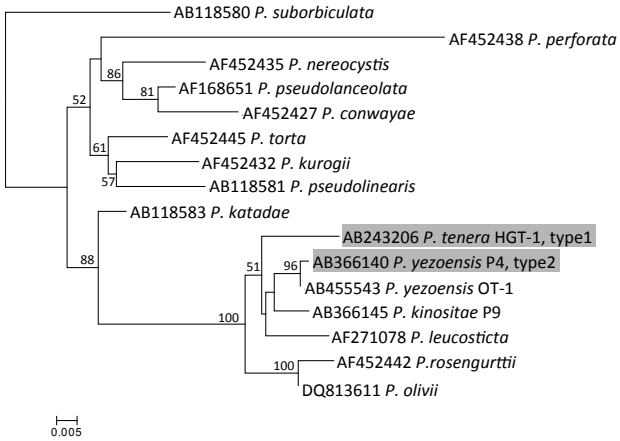


図 1. *rbcL* 遺伝子の ML 系統樹. 本研究で調査した 165 個体のうち、アサクサノリ (AB243206) と同一の配列をもつものが 136 個体 (type1)、スサビノリ (AB366140) と同一の配列をもつものが 29 個体 (type2) であった (灰色塗りつぶし). 枝上の数値: 100 回繰り返しブートストラップ値.

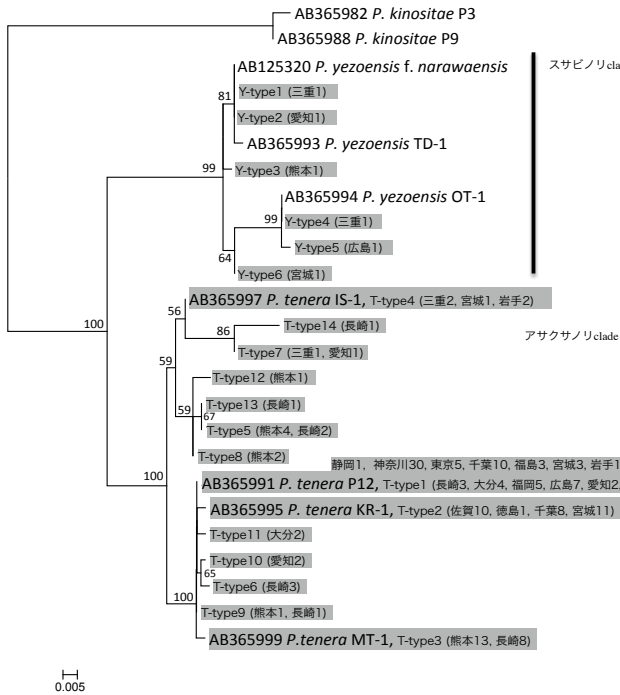


図 2. ITS1 領域の ML 系統樹. 本研究で用いた 165 個体のうち、ITS1 領域の塩基配列を決定できた 156 個体中、スサビノリクレードに含まれたのが 6 個体、アサクサノリクレードに含まれたのが 150 個体であった (灰色塗りつぶし). 枝上の数値: 100 回繰り返しブートストラップ値.

表 4. *rbcL* および ITS1 による分子同定 (個体数).

		<i>rbcL</i>		合計
		アサクサノリ	スサビノリ	
ITS1	アサクサノリ	127	23	150
	スサビノリ	0	6	6
	合計	136*	29	

*ITS1 未決定の 9 個体を含む

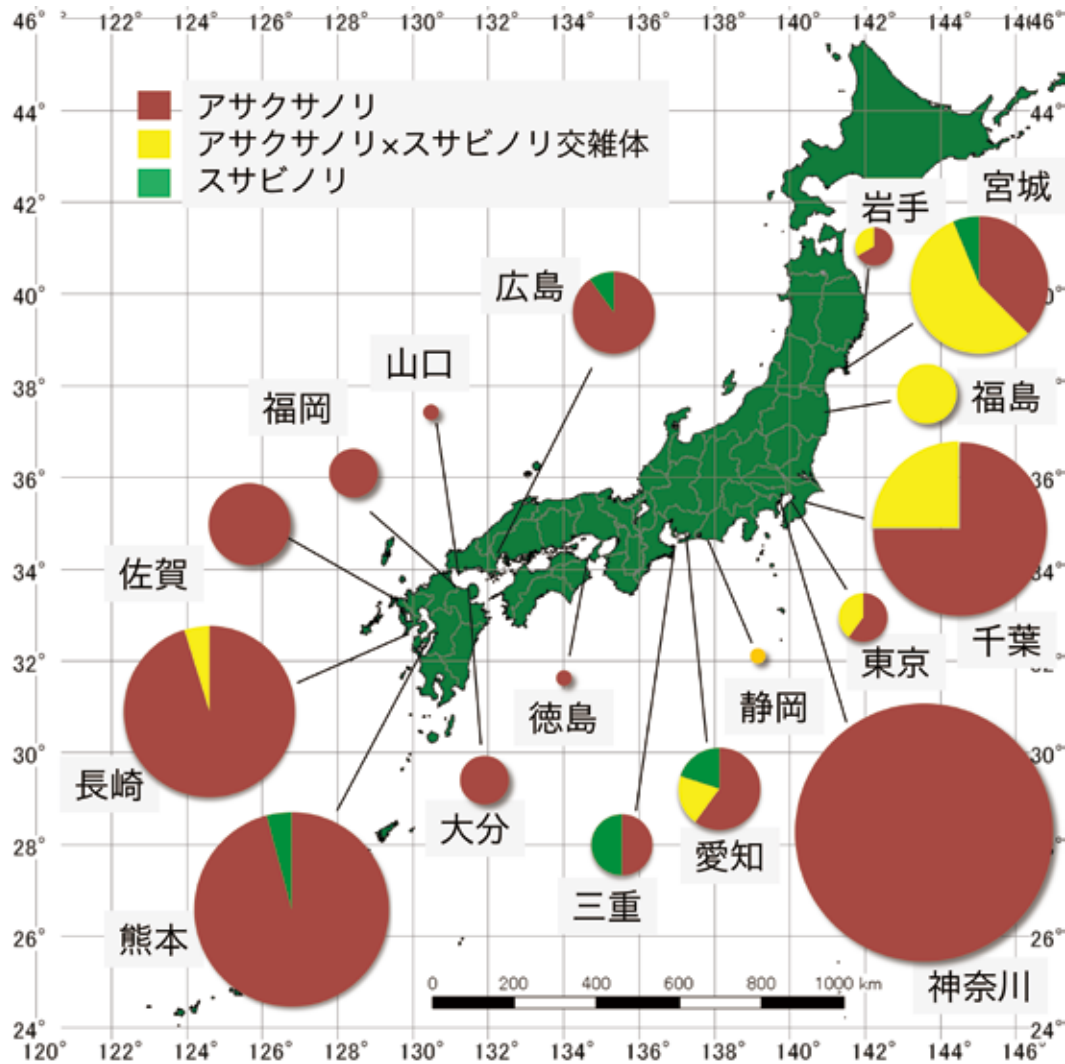


図3. アサクサノリ, アサクサノリ x スサビノリ交雑体およびスサビノリの分布.

アサクサノリクレードに含まれたのが150個体, スサビノリクレードに含まれたのが6個体で (Y-type1-6, AB822477-AB822482), 9個体は決定できなかった。アサクサノリクレードでは, 14 type の ITS1 配列が検出され (T-type1-14, AB822483-AB822492), 長崎県ではそのうちの7 type, 熊本県で5 type がみられた。上述の結果から各個体の *rbcL*-ITS1 タイプを確認した (表4)。アサクサノリ-アサクサノリ type が127個体, スサビノリ-スサビノリ type が6個体, スサビノリ-アサクサノリ type が23個体, *rbcL* のみ決定できたアサクサノリ-未決定 type が9個体であった。前述のように, アサクサノリ-アサクサノリ type の場合, アサクサノリ♀ x スサビノリ♂の交雑体の可能性もあることから, アサクサノリ-アサクサノリ type の127個体およびアサクサノリ-未決定 type の9個体に関しては, *ARP4* 遺伝子でのPCR-RFLP解析を行った。その結果, 136個すべてがアサクサノリと同じバンドパターンを示した。以上の結果をまとめると, 本研究で用いた165個体には, アサクサノリ

136個体, スサビノリ6個体, アサクサノリ x スサビノリ交雑体23個体が含まれていたことが明らかになった (表1)。

地域的な分布を図3に示した。アサクサノリは, 熊本県 (6地域), 長崎県 (11地域), 佐賀県 (1地域), 福岡県 (3地域), 大分県 (3地域), 山口県 (1地域), 広島県 (3地域), 徳島県 (1地域), 三重県 (1地域), 愛知県 (1地域), 神奈川県 (1地域), 東京都 (1地域), 千葉県 (2地域), 宮城県 (2地域), 岩手県 (1地域) の計15都県 (38地域) で検出された。交雑体は, 長崎県 (1地域), 愛知県 (1地域), 静岡県 (1地域), 東京都 (1地域), 千葉県 (1地域), 福島県 (1地域), 宮城県 (4地域), 岩手県 (1地域), の計8都県 (11地域) で確認することができた。

集団遺伝構造解析

次に, アサクサノリと分子同定された個体に対し, 3つのマイクロサテライトマーカー (Pye13, Pye41, Pye53) について遺伝子型の決定を試みた。その結果, 熊本県 (19個体),

長崎県 (15 個体), 佐賀県 (7 個体), 福岡県 (4 個体), 大分県 (4 個体), 広島県 (6 個体), 徳島県 (1 個体), 三重県 (2 個体), 愛知県 (1 個体), 神奈川県 (28 個体), 東京都 (3 個体), 千葉県 (9 個体), 宮城県 (6 個体), 岩手県 (2 個体) の 14 都県 (以下 1 都県 1 集団とする) 37 地域から合計 107 個体の遺伝子型を決定することができた (表 1)。そのうちの 2n 個体は 27 地域 62 個体で, 全集団 (62 個体) での遺伝的多様性は, 3 遺伝子座の平均で, TA が 5.0, AR は 1.444, H_S は 0.398, H_T は 0.425 であった (表 5)。各集団内の遺伝的多様性については, AR, H_E , H_O , F_{IS} の結果を表 6 に示した。遺伝的多様性の指標である AR の集団ごとの平均は 1.357 で, 最小は広島県で 1.226, 最大が長崎県の 1.615, 次いで熊本県の 1.542 となった。 F_{IS} は長崎県 (0.575) と熊本県 (0.556) で 0 (Hardy-Weinberg 平衡) からの有意な偏り (長崎県で $p < 0.001$, 熊本県で $p < 0.01$) が検出され, 地域内での分集団化や近親交配などが進んでいる可能性が示唆された。残りの集団については Hardy-Weinberg 平衡からの有意なずれは検出されなかった。全体で低頻度 (5% 以下) な対立遺伝子の数 N_R , 集団固有な対立遺伝子の数 N_P について表 6 に示した。また, 集団ごとの各対立遺伝子の頻度については, 表 7 にまとめた。

総当たりで求めた各集団間での Nei の遺伝距離 D_A は, 遺伝的分化がほとんどみられない 0.004 から最高で 0.500 まで, 値にかなりの幅がみられた (表 8)。次に, その遺伝距離 D_A を用いて, 近隣結合法による集団系統樹を構築した (図 4)。3 遺伝子座だけのブートストラップのためにブートストラップ値は全体的に低くなったが, 熊本県と長崎県の 2 集団のクレード (G1) (ブートストラップ値 85%), 東京都, 千葉県, 佐賀県, 徳島県, 宮城県, 三重県および岩手県の 7 集団のクレード (G2) (ブートストラップ値 51%), 残りの福岡県, 愛知県, 大分県, 広島県および神奈川県の 5 集団のクレード (G3) (ブートストラップ値 46%) という 3 つのクレードがみられた。

表 6. 各集団における遺伝的多様性。

集団番号	集団名	2n 個体	N_R	N_P	AR	H_E	H_O	F_{IS}^a
1	熊本県	8	2	1	1.542	0.508	0.250	0.556 **
2	長崎県	10	4	3	1.615	0.582	0.270	0.575 ***
3	佐賀県	7	0	1	1.270	0.244	0.389	-0.522
4	福岡県	1	0	0	1.333	0.167	0.333	NA
5	大分県	3	0	0	1.244	0.204	0.111	0.600
7	広島県	4	0	0	1.226	0.198	0.250	-0.125
9	三重県	1	0	0	1.333	0.167	0.333	NA
10	愛知県	1	0	0	1.333	0.167	0.333	NA
12	神奈川県	15	1	1	1.291	0.280	0.214	0.273
13	東京都	2	0	0	1.389	0.292	0.167	0.667
14	千葉県	5	0	0	1.357	0.313	0.167	0.571
16	宮城県	4	1	0	1.369	0.323	0.500	-0.440
17	岩手県	1	0	0	1.333	0.167	0.333	NA
	全体	62	7	6	1.444 ^b	0.278 ^b	0.281 ^b	0.239 ^b

N_R : 全体で低頻度 (5% 以下) な対立遺伝子の数, N_P : 集団固有の対立遺伝子の数, AR: 対立遺伝子多様度, H_E : ヘテロ接合の期待値, H_O : ヘテロ接合度の観測値, F_{IS} : 近交係数, ^a ボンフェローニ補正をかけて検定, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ^b 平均, NA: データ算出不可能

表 5. 全集団 (62 個体) における遺伝的多様性。

遺伝子座	TA	AR	H_S	H_T
Pye13	2	1.125	0.103	0.074
Pye41	6	1.465	0.425	0.434
Pye53	7	1.743	0.665	0.767
全体	5.0	1.444	0.398	0.425

TA: 対立遺伝子数, AR: 対立遺伝子多様度, H_S : 各集団における遺伝子多様度の平均, H_T : 全集団での遺伝子多様度

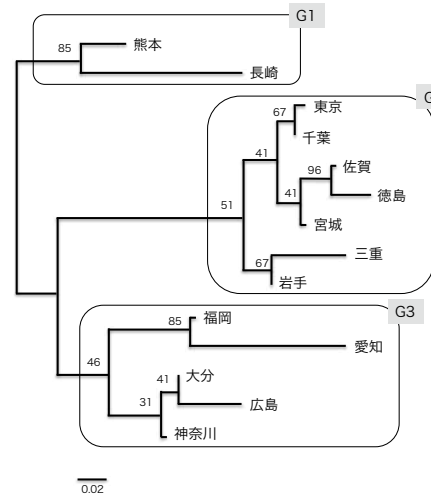


図 4. D_A を用いた近隣結合法による集団系統樹。

STRUCTURE 解析の結果, ΔK の基準からクラスター数は $K=4$ が最適であることが示唆された。 $K=4$ で行った 10 回のランの結果では全て同じパターンが認められたため, そのうちで Ln P(D) が最大であったランの結果を選び, 図 5 で示した。4 つのクラスターは地理的に偏った分布を示し, 地理的遺伝構造の存在が認められた (図 5a, b)。クラスター 1 (黄色) は, 前述の集団系統樹におけるクレード G1 に含まれた熊本県と長崎県の 2 集団のみでみられた。クラスター 1 を持つ個体は, ほぼこのクラスターだけで特徴付けられており, 他のクラスターとの混合があまりみられなかった。ク

表 7. 集団ごとの各対立遺伝子の頻度 (2n 個体のみ)。

集団番号	1	2	3	4	5	7	9	10	12	13	14	16	17	Total
集団名	熊本県	長崎県	佐賀県	福岡県	大分県	広島県	三重県	愛知県	神奈川県	東京都	千葉県	宮城県	岩手県	
遺伝子座: pye13														
解析個体数	8	9	7	1	3	4	1	1	14	2	5	4	1	60
対立遺伝子 149	0.250	0.222												0.067
151	0.750	0.778	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.933
遺伝子座: pye41														
解析個体数	8	9	6	1	3	4	1	1	14	2	4	4	1	58
対立遺伝子 176		0.278												0.043
177		0.167												0.026
179		0.111												0.017
180	0.125													0.017
182	0.313		0.083			0.125		1.000	0.214	0.500	0.375	0.250		0.190
183	0.563	0.444	0.917	1.000	1.000	0.875	1.000		0.786	0.500	0.625	0.750	1.000	0.707
遺伝子座: pye53														
解析個体数	8	10	5	1	3	4	1	1	12	2	4	4	1	56
対立遺伝子 190			0.100											0.009
193	0.563	0.450		0.500	0.500	0.750		0.500	0.667					0.402
195	0.063	0.100										0.125		0.036
197	0.063	0.100	0.400				0.500			0.750	0.625	0.375	0.500	0.179
229									0.042					0.009
230	0.313	0.200			0.333	0.250	0.500		0.083				0.500	0.152
231		0.150	0.500	0.500	0.167			0.500	0.208	0.250	0.375	0.500		0.214

各対立遺伝子の頻度について、全体で低頻度 (5% 以下) な対立遺伝子は下線付きで、集団固有な対立遺伝子は灰色塗りつぶしで示した

表 8. 各集団間総当たりで計算した Nei の遺伝距離 D_A 。

集団番号	集団名	熊本県												
1	熊本県		長崎県											
2	長崎県	0.152		佐賀県										
3	佐賀県	0.332	0.375		福岡県									
4	福岡県	0.219	0.375	0.277		大分県								
5	大分県	0.161	0.269	0.259	0.113		広島県							
7	広島県	0.211	0.282	0.333	0.184	0.032		徳島県						
8	徳島県	0.373	0.358	0.032	0.345	0.295	0.348		三重県					
9	三重県	0.312	0.398	0.160	0.358	0.250	0.268	0.174		愛知県				
10	愛知県	0.271	0.455	0.404	0.119	0.230	0.360	0.500	0.500		神奈川県			
12	神奈川県	0.155	0.291	0.287	0.070	0.010	0.049	0.339	0.265	0.181		東京都		
13	東京都	0.298	0.414	0.065	0.240	0.277	0.373	0.102	0.109	0.295	0.274		千葉県	
14	千葉県	0.303	0.400	0.049	0.256	0.273	0.353	0.074	0.092	0.342	0.278	0.004		宮城県
16	宮城県	0.288	0.356	0.038	0.267	0.261	0.336	0.047	0.131	0.382	0.280	0.041	0.030	
17	岩手県	0.264	0.349	0.075	0.275	0.191	0.268	0.094	0.046	0.382	0.212	0.056	0.047	0.063

クラスター 2 (赤色) は、前述のクレード G2 に含まれた東京都、千葉県、佐賀県、徳島県、宮城県、三重県および岩手県の 7 集団で多くみられた。クラスター 3 (緑色) とクラスター 4 (青色) は全国的に広くみられ、クラスター 3 は熊本県、長崎県、福岡県、愛知県、神奈川県で、クラスター 4 は熊本県、大分県、広島県、神奈川県で比較的多くみられた。前述のクレード G3 は、このクラスター 3 と 4 をあわせて 50% 以上もち、かつクラスター 1 を持たない集団で構成されていた。これらの 4 クラスターについての近隣結合法による系統樹では、クラスター 2 ~ 4 がまとまった一方、クラスター 1 だけが他のクラスターから遺伝的に大きく離れていた (図 5c)。

考察

アサクサノリとアサクサノリ × スサビノリ交雑体

本研究において、15 都県 (38 地域) でアサクサノリの存在を確認できた。このうち九州では、5 県 (24 地域) に分布し、本研究での調査地域の約三分の二を占めた。これまでの報告からも九州に多くのアサクサノリ生育地が残されていることが示されている (Niwa *et al.* 2009)。アサクサノリと同じく紅藻類で絶滅危惧 I 類のオキチモズクも、同じように九州地方で多く確認されており (Shimada *et al.* 2012)、九州地域は大型藻類の保全にとって重要性の高い土地といえる。また、これまでアサクサノリの生育地は 32 地点確認されていたが

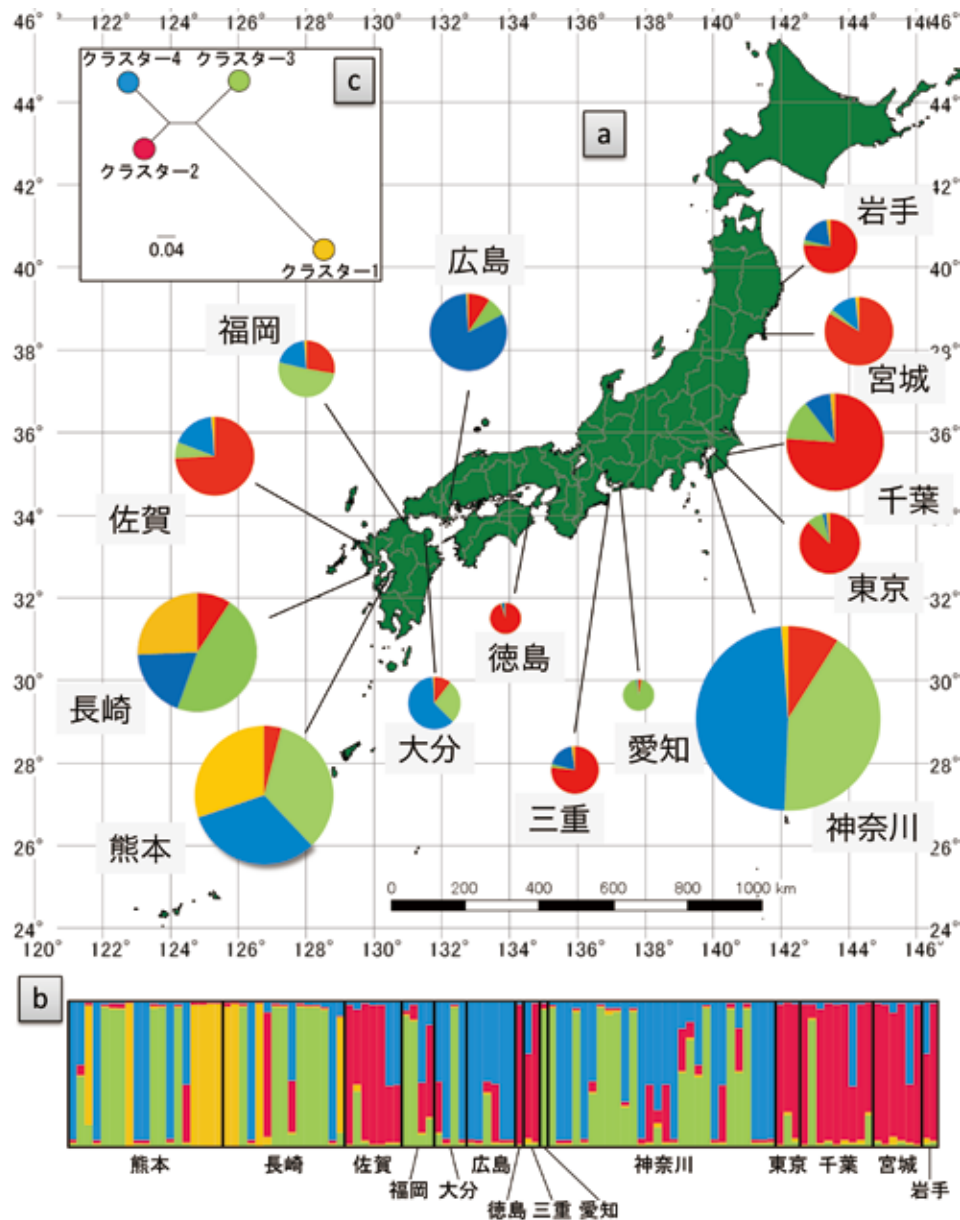


図5. K=4のSTRUCTURE解析. a: 都県毎のクラスター配分. b: 個体毎のクラスター配分. c: 4クラスターについての近隣結合法による系統樹.

(菊地ら 2012), 本研究により新たに 8 地点が確認された。さらなる詳細な現地調査と複数マーカーによる種の DNA 鑑定により, 絶滅危惧 I 類アサクサノリの正確な地理的分布の理解に貢献していきたい。

スサビノリ♀ × アサクサノリ♂の交雑体は 23 個体確認され, それらは東海から関東, 東北にかけて多くみられた。スサビノリは主に東北・北海道に分布しており (Niwa *et al.* 2009), 太平洋岸の自然分布は千葉県銚子を南限と言われているが (三浦 1994), 最近の調査では銚子よりもやや南の千葉県いすみ市付近まで確認されている (菊地 未発表)。今回交雑が確認された 23 個体のうち, 千葉県長生村以北の 18 個体の 7 生育地はスサビノリの自然分布域と重なることになる。また, スサビノリの自然分布域よりも南に位置する

交雑個体生育地 4 地点のうち少なくとも 3 地点は, 現在もしくは過去にノリ養殖場の周辺であった場所もしくは, 現在近傍にスサビノリの生育が認められる地点である。従って, スサビノリが近くに生育している場合, アサクサノリとスサビノリの 2 種間では比較的容易に交雑が起こる可能性が高いことが考えられた。一方, アサクサノリ♀ × スサビノリ♂の交雑体は確認できなかった。このタイプの交雑個体は, これまでの培養実験においてスサビノリ♀ × アサクサノリ♂の交雑個体に比べ, 殻胞子着生後, 正常な発芽をおこなう割合が著しく低くほとんどの個体は生き残ることはできないことが確認されている (Niwa & Sakamoto 2010)。全国的に採集を行った本研究からもこの交雑個体は確認されなかったことから, 天然においてもこの機構がはたらき, アサクサノリ♀ × スサ

ビノリ μ の交雑体はほとんど生育できないと考えられる。

集団遺伝構造解析

各集団における遺伝的多様性は、全集団の平均が $AR:1.444$ および $H_E:0.278$ で、九州の熊本県 ($AR = 1.542$, $H_E = 0.508$) と長崎県 ($AR = 1.615$, $H_E = 0.582$) では比較的高い値がみられた。また、この熊本県と長崎県の地域集団では、 F_{IS} がそれぞれ 0.556 と 0.578 と高く、任意交配を示唆するハーディ・ワインベルグ平衡から有意に外れていた。高い F_{IS} は、近親交配、あるいは地域集団内での分集団化などが進行していることなどを示す。本研究の 2n 個体に限定した遺伝的多様性解析において、熊本県は県内の 4 地域から、長崎県は 8 地域から採集したサンプルをまとめて解析しており、今回の結果は県内の各地点間での遺伝的分化を示唆しているのかもしれない。近親交配の可能性も含め、この地域ではより詳細な解析が必要であると思われる。

STRUCTURE 解析の結果、アサクサノリの分布域内には遺伝的に異なる 4 つのクラスターが存在することが分かった。クラスター 1 は、他のクラスターから遺伝的に大きく異なっており、熊本県および長崎県の 2 集団のみでみられた。この 2 集団は、集団系統樹においてもクレード G1 としてまとまっており、他の地域集団とは大きく異なる遺伝的組成を持っていると思われる。実際に、熊本県と長崎県では、これらの地域固有の対立遺伝子 (pye13 の対立遺伝子 149) や、それぞれの地域集団固有の対立遺伝子 (熊本県では pye41 の対立遺伝子 180, 長崎県では pye41 の対立遺伝子 176, 177, 179) がみられた (表 7)。熊本県の天草地方、天草市河浦町の一町田川河口に広がる干潟では、これまで一度もノリ養殖が行われたことがなく、ここに生育するアサクサノリは野生個体である可能性が高いことが示唆されている (吉田ら 1999, 菊地ら 2002)。従って、クラスター 1 はこの地域のアサクサノリ固有の遺伝子集団である可能性が高い。また、上述のように、この 2 集団では高い遺伝的多様性・固有性とともに、地域内での分集団化あるいは近親交配の可能性も示唆されており、保全を考える上で特に注意が必要な地域集団であると思われる。

クラスター 2 は、佐賀県、徳島県、三重県、東京都、千葉県、宮城県および岩手県の 7 集団で多くみられた。これらの 7 集団は集団系統樹においてもクレード G2 としてまとまっており、クラスター 1 と同じく、他の地域集団とは異なる遺伝的組成を持っていることが示唆された。地理的にみると、このクラスター 2 は佐賀県を除いて太平洋沿岸地域に広く分布しており、黒潮による分布の拡大の可能性が考えられる。

クラスター 3 は熊本県、長崎県、福岡県、愛知県、神奈川県で、クラスター 4 は熊本県、大分県、広島県、神奈川県で比較的多く分布していたが、その分布に明瞭な地理的パターンはみられず、全国的に広く分布していた。集団系統樹においては、クラスター 3 と 4 の両方あるいは片方を多く持ち、かつクラスター 1 をほとんど持たないような 5 集団 (大分県、

福岡県、広島県、愛知県および神奈川県) がクレード G3 としてまとまっていた。クラスター 3 と 4 はクラスター系統樹でも遺伝的に近いことから、これらの地域集団は似た遺伝的組成を持っていると思われる。その中の神奈川県個体群の生育地である多摩川が流れ込む東京湾では江戸時代からアサクサノリの養殖が行われ、文政期ごろには東京湾から東京湾外への移植も行われるようになった (岡村 1909, 宮下 2003)。しかし、1950 年代以後埋め立てや漁業環境の悪化が進み、東京都では 1962 年 (昭和 37 年) に漁業権が放棄され、神奈川県川崎市では 1973 年 (昭和 48 年) に川崎漁業協同組合が解散してからは、その付近で海苔養殖は全く行われていない (東京都内湾漁業興亡史刊行会 1971, 川崎市市民ミュージアム 1995)。よってこれ以降に採集されたアサクサノリは、その頃の生残個体由来するものと考えられている (菊地・二羽 2006)。本研究では、この神奈川県多摩川個体群において、この地域集団固有の対立遺伝子が 1 種類 (pye53 の対立遺伝子 229) みられ (表 7)、他地域とは異なる遺伝子が残っている可能性が高いことが考えられた。しかし近年、この地域の個体数が減少し、絶滅の危険度が高くなっていることが指摘されている (菊地・二羽 2006)。本研究の結果から示唆されたこの地域固有の遺伝的多様性を守るためにも、保全に向けた具体的な活動を早急に開始しなくてはならないと思われる。

本研究で使用した SSRs マーカーの数は 3 つと少なく、解析に用いた個体数が少ない集団も多かった。今後はより多くの遺伝マーカーおよび個体数で解析を進めることで、より詳細なアサクサノリ個体群の多様性、集団構造を理解していきたい。

謝辞

材料の採集にご協力いただいた吉田忠生博士、吉永一男氏、藤吉栄次氏、玉城泉也氏、田中博氏に感謝します。本研究は公益財団法人とうきゅう環境財団 H23~24 年度学術研究助成によりおこなわれた研究であり、ここに御礼申し上げます。

引用文献

- Abe, M., Kobayashi, M., Fijiyoshi, E., Tamaki, M., Kikuchi, N. & Murase, N. 2013. Use of PCR-RFLP for the discrimination of Japanese *Porphyra* and *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta). J. Appl. Phycol. 25: 225-232.
- Choi, S.-J., Park, E.-J., Endo, H., Kitade, Y. & Saga, N. 2008. Inheritance pattern of chloroplast and mitochondrial genomes in artificial hybrids of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). Fish. Sci. 74: 822-829.
- Earl, D. & von Holdt, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Con. Genet. Resour. 4: 359-361.
- El Mousadik, A. & Petit, R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic of Morocco. Theor. Appl. Genet. 92: 832-839.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14: 2611-2620.

- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*. 164: 1567–1587.
- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Goudet, J. 2001. FSTAT (version 2.9.3): A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. www.unil.ch/izea/software/fstat.html
- Hanyuda, T., Suzawa, Y., Suzawa, T., Arai, S., Sato, H., Ueda, K. & Kumano, S. 2004. Biogeography and taxonomy of *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Japan inferred from rbcL gene sequences. *J. Phycol.* 40: 581–588.
- 井鷲裕司 2012. 絶滅危惧種の分子保全遺伝学. 森の分子生態学 2, 第4章: 137–158. 文一総合出版, 東京.
- Jobb, G., von Haeseler, A. & Strimmer, K. 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 4: 18.
- 川崎市市民ミュージアム 1995. 海と人生—川崎で海苔が採れた頃—, 川崎市市民ミュージアム, 川崎.
- 川内野善治 2006. 長崎県北松浦半島及び平戸島の河口域における紅藻類の分布について. 長崎県生物学会誌, 61: 59–64.
- 環境庁編 2000. 改訂日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック 9 植物II (維管束植物以外). 財団法人自然環境法人センター, 東京.
- 菊地則雄・吉田忠生・吉永一男 2002. 絶滅が危惧される紅藻アマノリ属植物数種の生育状況. エコソフィア 9: 112–117.
- 菊地則雄 2010. 日本産紅藻アマノリ属藻類—特に分類, 生活史, 絶滅危惧種について—海藻資源 22: 2–21.
- 菊地則雄 2012. 紅藻ウシケノリ目の属の再編について. 藻類 60: 145–148.
- 菊地則雄・藤吉栄次・玉城泉也・二羽恭介・小林正裕・寺田竜太・吉田忠生 2012. 絶滅危惧種紅藻アサクサノリの生育地. 藻類 60: 77.
- 菊地則雄・二羽恭介 2006. 東京湾多摩川河口干潟における絶滅危惧種アサクサノリ (紅藻) の生育状況とその形態. 藻類 54: 149–156.
- Kunimoto, M., Kito, H., Mizukami, Y., Murase, N. & Levine, I. 2003. Molecular features of a defined genetic marker for the determination of the *Porphyra tenera* lineage. *J. Appl. Phycol.* 15: 337–343.
- 三浦昭雄 1994. アサクサノリ. 水産庁 (編), 日本の希少な野生水生生物に関する基礎資料 (I), pp. 664–672. 水産庁.
- 三浦昭雄 1998. アサクサノリ. 水産庁 (編), 日本の希少な野生水生生物に関するデータブック, pp. 298–299. 社団法人日本水産資源保護協会.
- 宮下章 2003. ものとなりの文化史 111・海苔 (のり). 法政大学出版局, 東京.
- Montecinos, A., Broitman, R. B., Faugeron, S., Haye, A. P., Tellier, F. & Guillemin, M.-L. 2012. Species replacement along a linear coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east pacific. *BMC Evolutionary Biology*. 12: 97.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., Tajima, F. & Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19: 153–170.
- Niwa, K., Kikuchi, N. & Aruga, Y. 2005a. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 41: 294–304.
- Niwa, K., Kobiyama, A. & Aruga, Y. 2005b. Confirmation of cultivated *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analyses of the plastid and nuclear DNA. *Phycol. Res.* 53: 296.
- Niwa, K., Iida, S., Kato, A., Kawai, H., Kikuchi, N., Kobiyama, A. & Aruga, Y. 2009. Genetic diversity and introgression in two cultivated species (*Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera*) and closely related wild species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 45: 493–502.
- Niwa, K., Kobiyama, A. & Sakamoto, T. 2010. Interspecific hybridization in the haploid blade-forming marine crop *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta): occurrence of allopolyploidy in surviving F1 gametophytic blades. *J. Phycol.* 46: 693–702.
- Niwa, K. & Sakamoto, T. 2010. Allopolyploidy in natural and cultivated populations of *Porphyra*. *J. Phycol.* 46, 1097–1105.
- 能登谷正浩 2000. 海苔の生物学. 成山堂書店, 東京.
- 岡村金太郎 1909. 浅草海苔. 博文館, 東京.
- Park, E.-J., Endo, H., Kitade, Y. & Saga, N. 2008. Simple differentiation of two closely related species *Porphyra tenera* and *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on length polymorphism of actin-related protein 4 gene (ARP4). *Fish. Sci.* 74: 613–20.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155: 945–959.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotech.* 18: 233–234.
- Shimada, S., Ichihara, K., Masakiyo, Y., Iima, M., Yoshida, Y. & Kumano, S. 2012. Threatened species *Nemalionopsis tortuosa* (Thoreales, Rhodophyta) in Japan, new locality and current condition of its all reported habitats. *Algal Resources* 5: 9–16.
- Sutherland, J. E., Lindstrom, S. C., Nelson, W. A., Brodie, J., Lynch, M. D., Hwang, M. S., Choi, H.-G., Miyata, M., Kikuchi, N., Oliveira, M. C., Farr, T., Neefus, C., Mols-Mortensen, A., Milstein, D. & Müller, K. M. 2011. A new look at an ancient order: Generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). *J. Phycol.* 47: 1131–1151.
- Tanabe, A. S. 2007. Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Mol. Ecol. Notes* 7: 962–964.
- 東京都内湾漁業興亡史刊行会 1971. 東京都内湾漁業興亡史, 東京都内湾漁業興亡史刊行会, 東京.
- 津村義彦 2001. プロローグ: 遺伝的多様性研究ガイド. 森の分子生態学—遺伝子が語る森林のすがた—: 158–169. 文一総合出版, 東京.
- 吉田忠生・菊地則雄 2009. 絶滅危惧種アサクサノリの新産地. http://www.sourui-koza.com/z_danwa/200910/asakusanori.html
- 吉田忠生・菊地則雄・吉永一男 1999. アサクサノリの野生個体. 藻類 47: 119–122.

(Received Apl. 29, 2013; Accepted May 15, 2013)