

日本沿岸における褐藻ヒジキの系統地理学的解析

堀内はるな¹・小林穂ノ佳¹・岩崎貴也²・畠田 智^{1*}

¹ お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系 (〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1)

² 神奈川大学理学部生物科学科 (〒259-1293 神奈川県平塚市土屋 2946)

Haruna Horiuchi¹, Honoka Kobayashi¹, Takaya Iwasaki² and Satoshi Shimada^{1*}: Phylogeographic analyses of *Sargassum fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyceae) distributed around Japanese coast. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 65: 139-148, Nov 10, 2017

Sargassum fusiforme (Harvey) Setchell (Sargassaceae, Phaeophyceae) is widely distributed around the Japanese coast. The species plays an important role in marine ecological systems by providing food, shelter, and a nursery for numerous marine organisms, including commercial fishes. In Japan, this species has long been consumed as the food Hiziki. Using newly developed simple sequence repeat (SSR) markers, we elucidated the distributional history and genetic diversity of the Japanese population of this ecologically and economically important species. Three distinct clades, POP1 (occurring in Okinawa), POP2 (occurring along the western part of Honshu along the Sea of Japan, and in Hokkaido), and POP3 (occurring along the Pacific coast from the Kanto to Tohoku region) were detected using both the STRUCTURE and NeighborNet analyses. The result of the Approximate Bayesian Computation (ABC) analysis indicated that the smallest clade POP1 diverged first, followed by the biggest, POP2, and the relatively small clade POP3 was the last to have diverged. The Okinawa population (POP1) showed low genetic diversity raising concerns about the possible decline of this population in future with a rise in seawater temperatures..

Key Index Words: ABC analysis, Phaeophyceae, phylogeography, *Sargassum fusiforme*, SSR marker

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

² Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan.

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

緒言

褐藻ヒジキ *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell はホンダワラ科に属する多年生の大型海藻類で、潮間帯の主要な藻場構成種となっている (伊藤 2013)。ヒジキは食用として古くから日本人に親しまれ (宮下 1974)、最近では養殖技術の向上に関する研究開発も盛んである (愛媛県農林水産研究所水産研究センター 2016)。ヒジキは中国の福建省や浙江省、台湾、韓国の全羅南道、および日本の沖縄本島東部から中国、四国、太平洋沿岸、日本海は能登半島以南、北海道は南岸に広く分布している (堀 1993, Kitayama & Lin 2012)。海藻類の多くの種は、分布域が狭く、例えば緑藻カサノリ *Acetabularia ryukyuensis* Okamura et Yamada in Okamura は南西諸島にのみ、褐藻リシリコンブ *Saccharina japonica* var. *ochotensis* (Miyabe) Yotsukura et al. は日本では北海道北部にしか生育していない (吉田 1998)。ヒジキのように沖縄から北海道にまで広く分布する海藻種は、緑藻アナオサ *Ulva pertusa* Kjellman や紅藻マルバアマノリ *Pyropia suborbiculata* (Kjellman) J.E. Sutherland, H.G. Choi, M.S. Hwang & W.A. Nelson などいくつか存在するが非常に限られている (堀 1993, 1994)。

ヒジキを含む海藻類は沿岸域で藻場を構成し一次生産者として海域生態系を支えている (田中 2012)。また、魚類をはじめ様々な海の生物に生活や繁殖の場を与え、水質の浄化にも大きな役割を果たしている (川井 2000)。さらに最近では食品だけでなく、化粧品、医薬品などにも海藻類が有効利用されている (山田

2001)。このように海藻類は海域生態系や人間社会において重要な生物群である。海藻類の生育場所・群落・空間である藻場は、かつては日本全国の沿岸域に広く存在していたが、埋め立て等により消失が進んだほか、近年では海水温の上昇や植食性動物の摂食行動の活発化と分布域の拡大等により減少している (水産庁 2016)。

したがって、特にヒジキのように水産学上の重要種で、かつ、大きな藻場を広域に形成することで海域生態系に大きな影響を及ぼす海藻種に関しては、将来の分布シミュレーションや個体群維持のための環境整備をおこなう必要性が高く、分子系統地理学、保全生態学さらには生理生態学に関する解析で、地域個体群の多様性や健全性の検証、生育特性の把握、広域分布獲得の背景や分布変遷史の理解が急務である (Zhao et al. 2007, Yu et al. 2012, Hu et al. 2013, 諏訪 2006)。

SSR (単純反復配列: simple sequence repeat, マイクロサテライト) マーカーは、遺伝子座あたりの対立遺伝子数が多いこと、分析可能な遺伝子座が多いこと、共優性であること、微量のサンプルでも分析ができること、多数のサンプルを扱いやすいことなどの利点により、様々な生物種の遺伝的多様性や集団遺伝構造の解析に用いられている (井鷲 2007)。褐藻ホンダワラ類でも、ウミトラノオ *Sargassum thunbergii* (Mertens in Roth) Kuntze (Liu et al. 2016) やアカモク *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh (Shan et al. 2015), *Sargassum vachellianum* Greville (Bi et al. 2015) において、SSR マーカーの開発がおこなわれており、

その有用性が実証されている。

そこで本研究では、日本近海に広域分布し、海域生態系にとって重要な藻場構成種で水産学上も重要な経済種である褐藻ヒジキに注目して、新規に作成した SSR マーカーを用いた分子系統地理学的解析をおこない、ヒジキの分布変遷史や個体群の遺伝的多様性を把握する。また、海流、海水温、日照時間などの環境要因が海藻類の分布変遷や現在の分布に与えた影響を考慮し、本研究で得られた結果をもとに、将来のヒジキ分布について推測する。

材料と方法

採集

2014 年 2 月から 2015 年 4 月の間に日本全国 17 道県 20 地点で採集をおこなった。採集場所と採集日は表 1 に示した。各地域 10 個体を目標におおよそ 1 m おきに採集し、以下の SSR 解析に成功した 190 個体を分子系統地理学的解析に用いた。

SSR マーカーの新規開発

本研究では、最初にヒジキの SSR マーカーを新規に作出した。OneKP Project (<https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekp/>) が提供しているヒジキの RNA-seq データ (code number: LDRY) をダウンロードし、Msatcommander-1.0.8-beta (Faircloth 2008) を用いて、繰り返し配列は 3-6 回の繰り返し、perfect repeats という設定でスクリーニングをおこない、対象の SSR を含む配列を抽出した。更にそれらの配列について、Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) を用いて SSR 領域を増幅するためのプライマーを設計した。その際、高額な蛍光プライマーのコストを抑えるため、FAM, NED および VIC の 3 種類の蛍光マーカー (Life Technologies Japan, 東京) のそれぞれを複数の SSR マーカー共通で使用できるよう、Forward プライマー配列の 5' 末端に M13 配列 (CAGGACCAGGCTACCGTG) を加えた (Blacket *et al.* 2012)。また、Reverse プライマーには、アデニル化を抑制し、安定したピークを検出できるようにするため、5' 末端に GTTTCIT の配列を加

表 1. 本研究に用いたサンプル。

集団番号	集団名	採集場所	個体数	採集日
1	与那原	沖縄県与那原町	10	2014.3.1
2	鹿児島	鹿児島県鹿児島市桜島	10	2014.5.11
3	宮崎	宮崎県日向市細島	10	2014.7.15
4	大分	大分県国東市黒津崎	10	2014.7.14
5	愛媛	愛媛県八幡浜市大島	10	2014.3.31
6	淡路島	兵庫県淡路島洲本市由良	10	2014.5.7
7	三重	三重県志摩市麦崎	10	2014.5.1
8	土肥	静岡県伊豆市土肥	10	2015.4.20
9	下田	静岡県下田市白浜	9	2015.4.21
10	伊東	静岡県伊東市宇佐美	10	2015.4.20
11	館山	千葉県館山市沖ノ島	10	2014.5.30
12	銚子	千葉県銚子市犬吠埼	10	2014.7.25
13	福島	福島県いわき市久ノ浜田之網	10	2014.6.29
14	岩手	岩手宮古市浄土ヶ浜	9	2014.5.31
15	八戸	青森県八戸市葦毛崎	10	2014.5.20
16	福岡	福岡県福岡市東区志賀島	10	2014.5.22
17	長崎	長崎県壱岐市勝本町	10	2014.2.3
18	島根	島根県出雲市日御岬	9	2014.10.10
19	福井	福井県三方上中郡若狭町食見	4	2014.4.24
20	函館	北海道函館市志海苔町	9	2014.6.27

えた (Brownstein *et al.* 1996)。作成できた候補プライマーのうち、繰り返し数の多い 48 ペアを選び、PCR での増幅、アレルの多型性を考慮して、最終的に 7 つのプライマーセットを決定した (表 2)。

DNA 抽出, PCR, アレルの決定

DNA 抽出には、Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた。PCR は Takara Ex Taq (タカラバイオ, 滋賀) を用い、2 μ M の Forward プライマーおよび 8 μ M の Reverse プライマーと FAM, NED および VIC 蛍光プライマー (Life Technologies Japan, 東京) 各 0.3 μ L, DNA 抽出液 1.2 μ L を混合し全量を 10 μ L とした。PCR 反応条件は、94°C 5 分間の後、94°C 30 秒、53°C 45 秒、72°C 45 秒を 37 サイクル、最後に 72°C 10 分間とした。PCR 産物、GeneScan™-500LIZ Size Standard (Applied Biosystems, CA, USA) および Hi-Di Formamide (Ap-

表 2. 本研究で新規に開発した SSR マーカー。

プライマー名	繰り返し配列	プライマー配列 (5'-3')	アレルの長さ (bp)	アレル数	H_0	H_s	H_t	G_{ST}
hiziki2	ACTAT	F: CAGGACCAGGCTACCGTGTCTTCAGCGTTCGTTTCG R: GTTTCCTTAATGGGAGGCGGGTTTAGG	360~380	5	0.411	0.393	0.520	0.245
hiziki5	ACACG	F: CAGGACCAGGCTACCGTGCTCAAGAGACAACGCCAAG R: GTTTCCTTGCGGATGTAACGTGGAAGTC	365~395	8	0.318	0.291	0.332	0.124
hiziki22	AATC	F: CAGGACCAGGCTACCGTGCGTTGTGTCAGAGCAATTGGTTTC R: GTTTCCTTGATAGGGTAGCCTGCAAGAC	162~178	5	0.336	0.299	0.346	0.135
hiziki23	AGGC	F: CAGGACCAGGCTACCGTGAGCTCCGACCGTTGAGATC R: GTTTCCTTACCATTGTGCCATCCTTTGC	141~186	4	0.383	0.368	0.461	0.203
hiziki32	AACC	F: CAGGACCAGGCTACCGTGCTAAGAACACCGATCGATCCG R: GTTTCCTTCTGCCGTTTCGTTGTGGAAG	113~145	9	0.603	0.534	0.660	0.191
hiziki38	AAGG	F: CAGGACCAGGCTACCGTGAGAGCGAAATGAGGGACC R: GTTTCCTTGACGCTCGTGAGGATGTTTG	140~190	9	0.569	0.469	0.618	0.242
higiki44	AGG	F: CAGGACCAGGCTACCGTGATCCTCCGCTACTGTCTGAG R: GTTTCCTGACGCGATATCAACAGG	185~206	8	0.386	0.337	0.529	0.363
		平均		6.9	0.429	0.384	0.495	0.224

plied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を混合し, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) と GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて遺伝子型を決定した。

系統地理学的解析

最初に FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) を用い, 全集団での遺伝的多様性・遺伝的分化度に関する指標としてヘテロ接合度観察値 H_o , 分集団のヘテロ接合度期待値の平均値 H_s , 全集団のヘテロ接合度期待値の平均値 H_t , 遺伝子分化係数 G_{ST} を計算した。更に GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012) と FSTAT を用い, 各集団について, 遺伝的多様性に関する指標である対立遺伝子数 N_a , 有効対立遺伝子数 N_e , 期待されるヘテロ接合度 H_e , アレリックリッチネス AR を推定した。アレルの中で, 特定の 1 集団でのみ見られたものはプライベートアレル, 全体での頻度が 5% 以下のアレルをレアアレルとした。 H_o と H_e から近交係数 F_{IS} を計算し, ハーディ・ワインベルグ平衡からのずれを 9,999 回の permutation test によって調べた。また, 集団間の遺伝的分化度については, FSTAT を用いて固定指数 F_{ST} を, GenoDive (Meirmans & Tienderen 2004) を用いて遺伝的多様性やサンプル数で補正された遺伝子分化係数である G''_{ST} の値を計算した。 F_{ST} の値については 9,999 回の permutation test によって有意かどうか調べた。

次に, 地域的な集団遺伝構造を把握するために STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003) を用いて STRUCTURE 解析をおこなった。Admixture model を使用し, 最初の Burnin Period は 150,000 世代, Burnin 後の MCMC は 150,000 世代に設定して, 計算をおこなった。スラスタ数 K は 1 ~ 10 に設定し, 各 K でのクラスタリング結果の安定性を確認するため 20 回繰り返した。計算終了後, Structure Harvester v.6.93 (Earl & von Holdt 2012) (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) を用いて ΔK (Evanno *et al.* 2005) を算出し, 最適なクラスタ数を決めた。最適なクラスタでおこなわれた 20 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。更に MSAnalysier (Dieringer & Schlötterer 2003) を用いて, 集団間および個体間における Nei *et al.* (1983) の遺伝距離 D_A の距離行列を算出し, SplitsTree4 ver. 4.14.2 (Huson & Bryant 2006) を用いて NeighborNet を構築した。

集団のデモグラフィックな歴史を統計的に検証するため, DIYABC 2.1.0 (Cornuet *et al.* 2014) による Approximate Bayesian Computation (ABC) 解析をおこなった。まず, STRUCTURE 解析や NeighborNet 解析で大きく分かれた沖縄集団 (POP1), 九州, 四国, 日本海沿岸, 函館集団 (POP2), 東海, 関東, 東北の太平洋沿岸集団 (POP3) の 3 グループの集団動態について, 次に述べる 4 つのシナリオを構築した。1: 最初に POP1 が分岐し, その後に POP2 と POP3 が分かれた, 2: 最初に POP3 が分岐し, その後に POP1 と POP2 が分かれた, 3: 最初に POP2 が分岐し, その後に POP1 と POP3 が分かれた, 4:

POP1, POP2, POP3 が同時に分岐した。これらのシナリオの下で, 各種パラメータ (POP1, POP2, POP3, 祖先集団の有効集団サイズ N_1 , N_2 , N_3 , N_{anc} , 年代 t_1 , t_2 , t_3) について, それぞれ 10 - 10,000, 10 - 10,000, 10 - 10,000, 10 - 50,000, 1 - 10,000, 1 - 10,000, 10 - 50,000 の一様分布を事前分布としてシミュレーションをおこない, 各シナリオにつき 10,000,000, 合計 40,000,000 のデータセットを作成した。その際, 繰り返しサイズの違いに基づき, SSR マーカーは 3 つのグループ (グループ 1 は hiziki22, 23, 32, 38; グループ 2 は hiziki2, 5; グループ 3 は hiziki44) に分けて, それぞれで要約統計量 (グループ 1 は Mean number of alleles, Mean genetic diversity, Mean size variance, F_{ST} , admixture summary statistics, グループ 2 と 3 は Mean Garza-Milliamson's M , F_{ST} , admixture summary statistics) を計算した。要約統計量の値を用い, 得られたシミュレーションデータセットの中から現実のデータに近いものが再現された上位 1% のデータを抜き出し, それらを用いて Logistic 回帰による各シナリオの近似尤度を計算した。解析の結果, シナリオ 1 の近似尤度が他よりも有意に高かったため, このシナリオにおける有効集団サイズおよび分岐年代の事後分布を, 現生 3 集団の平均有効集団サイズ MeanN に対する比の形で推定した。

ヒジキ分布の有無と気象環境

気象庁ホームページ (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) から各地域の月別の日海水温の平均の最高値 (最高海水温) と最低値 (最低海水温) の直近 3 年間の平均, 日照時間の 2014 ~ 2016 年 1 ~ 3, 10 ~ 12 月の平均 (日照時間), 2017 年 4 ~ 6 月の最高潮位と最低潮位の差の平均 (潮位差) を算出した。ヒジキが確認

表 3. 遺伝的多様性を示す各種指標。

集団名	N	N_a	N_e	$AR^{\#}$	H_o	H_e	$F_{IS}^{\dagger}$
沖縄	9.857	1.714	1.418	1.253	0.286	0.24	-0.139
鹿児島	9.286	2.714	1.777	1.405	0.363	0.383	0.112
宮崎	9.429	2.143	1.909	1.457	0.713	0.432	-0.614 *
大分	10	3	2.245	1.568	0.643	0.539	-0.141
長崎	9.429	3	2.044	1.397	0.575	0.484	-0.134
愛媛	8.571	2.571	1.679	1.333	0.447	0.374	0.018
淡路島	8.714	2.429	1.519	1.437	0.327	0.314	-0.046
三重	9.714	2.714	1.881	1.370	0.456	0.414	-0.39 *
土肥	9	2.143	1.631	1.502	0.503	0.348	0.197
下田	8	2.571	1.911	1.222	0.412	0.462	-0.087
伊東	9.143	1.857	1.345	1.439	0.239	0.209	-0.218
館山	9.714	2.143	1.781	1.401	0.529	0.417	-0.155
銚子	9.571	2.286	1.694	1.341	0.46	0.38	-0.154
福島	9.571	2	1.585	1.408	0.39	0.324	-0.01
岩手	8.571	2.286	1.857	1.240	0.413	0.384	0.13
八戸	8.857	1.857	1.365	1.511	0.211	0.226	-0.134
福岡	9.429	2.143	1.702	1.380	0.44	0.36	-0.168
島根	6.714	2.429	1.966	1.443	0.425	0.409	0.043
福井	3.714	1.714	1.457	1.290	0.381	0.25	-0.391
函館	8.571	2.143	1.544	1.323	0.375	0.304	-0.175
平均	8.793	2.293	1.716	1.494	0.429	0.363	-0.123

[#]: 個体数 1 に標準化した時のアレリックリッチネスの値

[†]: ボンフェローニ補正後の p 値で, *: $p < 0.05$

されていない厚岸(北海道),小樽(北海道),男鹿(秋田),佐渡(新潟),石垣島(沖縄)と、ヒジキが確認されている函館(北海道),野田(岩手),浜田(島根),那覇(沖縄)とで、共通性や違いがあるか確認した。

結果

遺伝的多様性

各集団の遺伝的多様性については, N_a , N_E , AR , H_o , H_E , F_{IS} の結果を表3に示した。近交係数である F_{IS} は, 各集団で比較的低い値が検出され, マイナスの値をとるものも多かった。特に宮崎(-0.653), 土肥(-0.403), 福井(-0.500)で低かった。また, 遺伝的多様度を示す N_E や AR では, 大分($N_E=2.245$, $AR=1.568$)や長崎($N_E=2.044$, $AR=1.397$)などで比較的高い値が検出された。沖縄($N_E=1.418$, $AR=1.253$)や函館($N_E=1.544$, $AR=1.323$), 福井($N_E=1.457$, $AR=1.290$)では比較的低い値が検出された。

集団毎のプライベートアレル(集団固有アレル)PAとレアアレル(全体での頻度5%未満のアレル)RAの数をABC解析のグループ毎に集計した結果, 沖縄集団(POP1)はPA:RA=2:2, 九州, 四国, 日本海沿岸, 函館集団(POP2)がPA:RA=7:30, 東海, 関東, 東北の太平洋沿岸集団(POP3)がPA:RA=4:14となった。

それぞれの解析個体数で標準化したところ, POP1はPA:RA=2:2, POP2がPA:RA=0.7:3, POP3がPA:RA=0.4:1.6となり, POP3と比較してPOP1やPOP2で多くの固有あるいはレアなアレルが見られた。

集団間の遺伝的分化度

各集団間における F_{ST} 値と G''_{ST} 値について, 表4に示した。沖縄, 函館, 福井と他の集団との間の値は高かった。また, STRUCTURE解析でクラスターII(緑色)に含まれた集団間の G''_{ST} 値は低く算出され, 特に館山から八戸までの集団間の値が低かった。一方で, 地理的には近い函館と八戸間の F_{ST} , G''_{ST} は大きな値($F_{ST}=0.557$, $G''_{ST}=0.768$)が得られた。

集団遺伝構造

STRUCTURE解析から対数尤度 $\ln P(D)$ (図1a)と ΔK の変化(図1b)を確認したところ, 最適なクラスター数は $K=3, 5, 7$ が挙げられた。各々の K 値でおこなったランの結果は20回全て同様のパターンを示したので, そのうち対数尤度が最大であったランの結果を選択した。 $K=3$ においては, クラスターI(緑色)は沖縄から三重までの太平洋側, クラスターII(赤色)は伊豆から八戸までの太平洋側, クラスターIII(黄色)は九州, 四国, 日本海側に分かれた(図2)。 $K=5$ では, 各個体群を占めるクラスターの割合において, クラスターI(緑色)は沖縄のみで, クラスターII(黄緑色)は三重と伊豆の土肥と伊東で50%以上を占めていた。クラスターIII(赤色)は下田, 伊東, 館山, 銚子, 福島, 岩手, 八戸の7集団で75%以上を占めていた。クラスターIV(黄色)は宮崎, 大分, 愛媛, 淡路島, 福岡の5集団で50%以上を占めていた。クラスターV(青色)は鹿児島, 長崎, 出雲, 福井, 函館で45%以上を占めていた。この様に, これら5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確認された: 沖縄(緑), 三重から伊豆の東日本太平洋側(黄緑色), 千葉から八戸の東日本太平洋側(赤色), 九州, 四国(黄色), 日本海側(青色)(図3a)。これら5クラスターの近隣結合法による系統樹と(図3b), NeighborNet解析をSTRUCTURE解析 $K=5$ の時の色で示した結果は類似し(図4), クラスターIが他のクラスターから遺伝的に大きく離れており, IIとIII, IVとVがそれぞれまとまった。STRUCTURE解析でクラスター毎に推定される遺伝的多様性(図3cの H_E)は, クラスターIとIIIが低く, 祖先集団から分化後に受けた遺伝的浮動の強さ(STRUCTUREの F_{ST})は同じくクラスターIとIIIが大きくなっていた(図3c)。 $K=7$ においても同じような地理的に偏りのある分布が見られた(図5a)。クラスターI(緑色)は沖縄のみ, クラスターII(橙色)は土肥と伊東の2集団で50%以上を占めていた。クラスターIII(赤色)は下田, 館山, 銚子, 福島, 岩手, 八戸の6集団において39%以上を占めていた。クラスターIV(黄緑色)は三重で50%以上を占めていた。クラスターV(黄色)は宮崎, 大分, 愛媛, 淡路島, 福岡の5集団で多く見られ, 35%以上を占めていた。クラスターVI(茶色)は鹿児島のみであった。クラスターVII(青色)は日本海側に位置する長崎, 出雲, 福井, 函館で特に多く見られ,

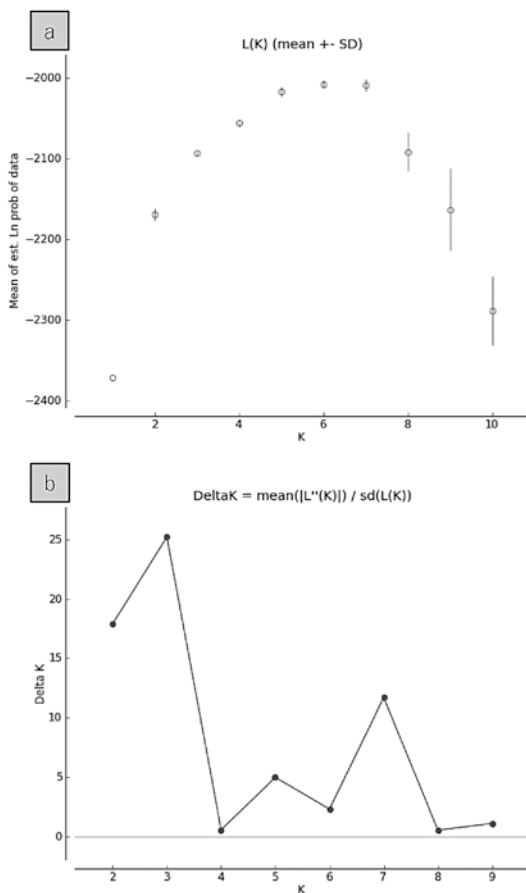


図1. STRUCTURE解析の結果から Structure Harvester v.6.93 を用いて算出した, 対数尤度 $\ln P(D)$ (a) と ΔK の変化 (b)。

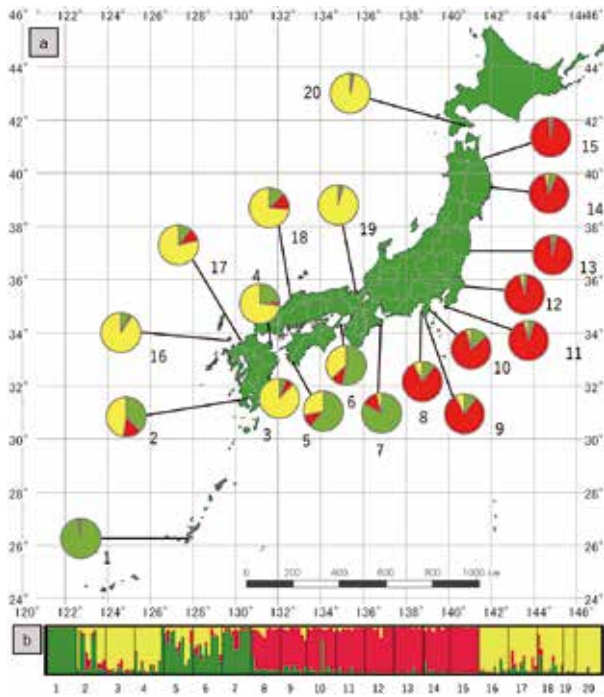


図2. K=3 のSTRUCTURE 解析. 地域毎のクラスター配分図 (a). 個体毎のクラスター配分図 (b). 番号は表1に対応している。

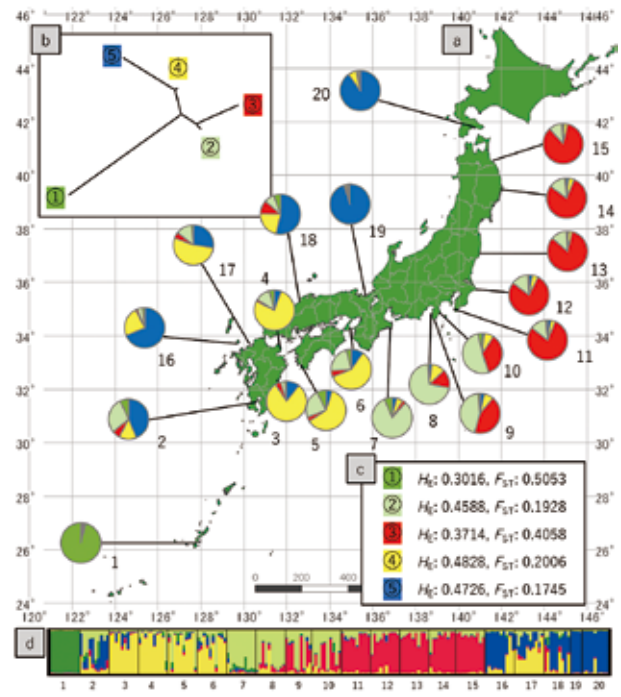


図3. K=5 のSTRUCTURE 解析. 地域毎のクラスター配分図 (a). 5クラスターについての近隣結合法による系統樹 (b) (クラスター番号の色は (a) の配分図に用いた色と対応), 各クラスターの遺伝的多様性 (H_E) および祖先集団から分岐後に受けた遺伝的浮動の強さ (F_{ST}) (c). 個体毎のクラスター配分図 (d). (a) および (d) の番号は表1に対応している。

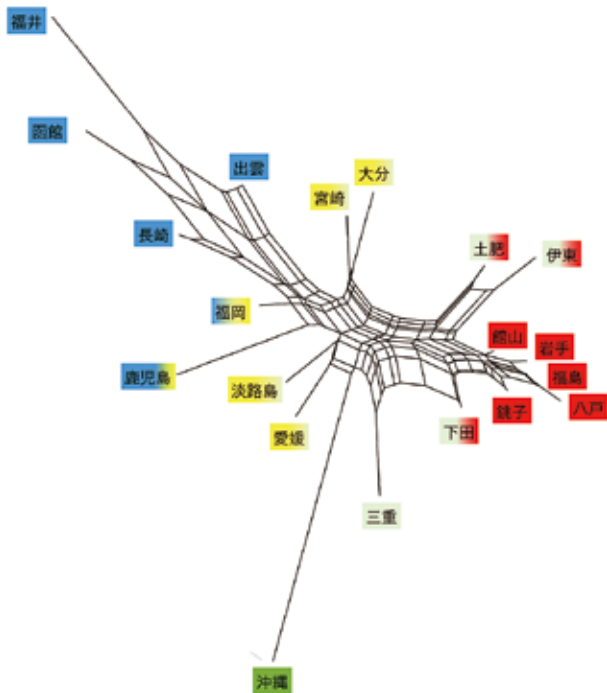


図4. NeighborNet 解析から得られた系統樹. STRUCTURE 解析 K=5 の時の色で示した。

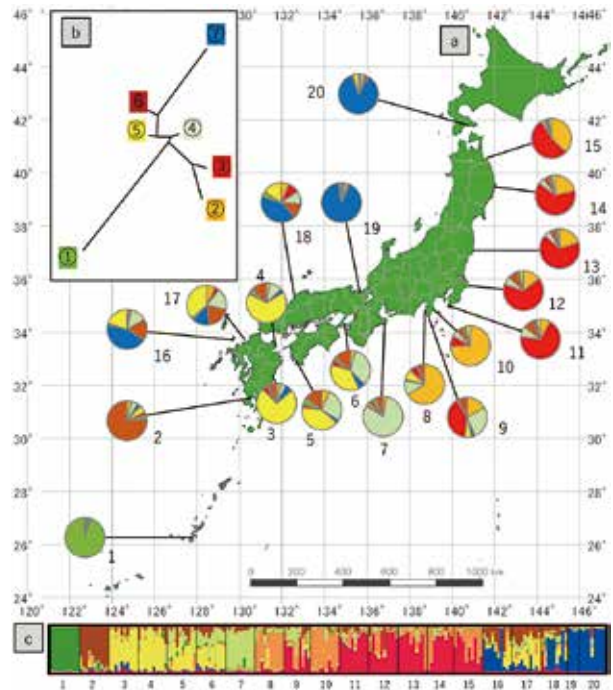


図5. K=7 のSTRUCTURE 解析. 地域毎のクラスター配分図 (a). 7クラスターについての近隣結合法による系統樹 (b) (クラスター番号の色は (a) の配分図に用いた色と対応). 個体毎のクラスター配分図 (c). (a) および (c) の番号は表1に対応している。

40%以上を占めた。これら7クラスターの近隣結合法による系統樹はK=5のものと類似し、クラスターIが他のクラスターから遺伝的に大きく離れており、IIとIII、V、VIおよびVIIがそれぞれまとまった(図5b)。

愛媛、淡路島、三重の3集団は、K=3の場合、沖縄ほどではないものの、クラスターIが優占したが、K=5の場合、愛媛、淡路島はそれらの西寄り集団と類似してクラスターVが優占し、一方、三重はそれより東寄り集団と類似してクラスターIVが優占した。K=7の場合、愛媛、淡路島はそれらの西寄り集団と類似してクラスターVが優占し、一方、三重はそれらおよびより東寄り集団と類似してクラスターIVが優占した。これらの結果は、K=3で沖縄と同じクラスターの割合が比較的高かった愛媛・淡路島、三重の集団が、実際にはそれぞれ西日本・日本海グループ、東日本グループの地域集団に遺伝的に近いことを示唆している。NeighborNet解析の結果でも、沖縄は愛媛、淡路島、三重の集団から大きく枝が伸びており、これらは遺伝的に別のものとして捉えるべきだと考えられる。また、K=3, 5, 7の結果を比較する際、上記の沖縄集団との関係性を除くと、基本的にK=5, 7はK=3の結果を更に細分化していくものであり、それらの間には大きな矛盾がない。以上の結果を総合し、ABC解析においては、沖縄集団、九州・四国・日本海沿岸・函館集団(愛媛、淡路島を含む)、東海・関東・東北の太平洋沿岸集団(三重を含む)という最も主要な3地域集団の分化をベースとしてグループを設定し、解析を進めた。

ABC 解析

図6に示したシナリオ1~4における、現実のデータに近い上位1%のデータを用いたLogistic回帰に基づく近似尤度はそ

れぞれ、0.4981 [0.4797-0.5164], 0.1980 [0.1852-0.2108], 0.0428 [0.0353-0.0502], 0.2612 [0.2462-0.2762]であった([]内は、95%信頼区間)。他よりも有意に高い近似尤度が得られたシナリオ1において推定された有効集団サイズおよび分岐年代の値の事後分布は、現生3集団の平均有効集団サイズMeanNに対する比の形で表5に示した。平均有効集団サイズに対する比という形で表示したのは、各遺伝マーカーの分子進化速度とそれに基づく有効集団サイズの真の値の推定が困難であり、推定値に大きな不確実性が含まれるためである。最頻値推定の結果に基づくと、日本のヒジキ集団は、小さな祖先集団(Nanc/MeanN = 1.54×10^{-2})から始まり、遠い昔(t3/MeanN = 7.47)に集団サイズを大きくした(N1/MeanN + N2/MeanN + N3/MeanN = 2.57)。その後、最近(t2/MeanN = 5.02×10^{-1})になってから、沖縄集団(POP1)が最も小さい集団サイズ(N1/MeanN = 1.65×10^{-1})で他から分かれ、さらにごく最近(t1/MeanN = 5.31×10^{-2})に、九州、四国、日本海沿岸、函館集団(POP2)が最も大きい集団サイズ(N2/MeanN = 1.04)で、比較的小さい集団サイズの東海、関東、東北の太平洋沿岸集団(POP3)(N3/MeanN = 4.17×10^{-1})と分化したと推定された。

ヒジキ分布の有無と気象環境

気象庁ホームページのデータから算出した月別最高気温、月別最低気温、月別最高海水温、月別最低海水温、10~3月の日照時間、潮位差を表6に示した。ヒジキが確認できない地域(表6灰色塗り)のうち佐渡(新潟)、男鹿(秋田)、小樽(北海道)は、ヒジキが確認された地域と比較して日照時間が少なく、潮位差も小さかった。

表4. 個体群間の遺伝的分化度を示す F_{ST} 値(上三角行列)と G''_{ST} 値(下三角行列)。

	沖縄	鹿兒島	宮崎	大分	愛媛	淡路島	三重	土肥	下田	伊東	館山	銚子	福島	岩手	八戸	長崎	福岡	島根	福井	函館
沖縄	0.443	0.351	0.296	0.292	0.360	0.313	0.379	0.320	0.488	0.335	0.413	0.385	0.322	0.463	0.376	0.397	0.145	0.568	0.500	
鹿兒島	0.659	0.242	0.208	0.259	0.290	0.259	0.242	0.241	0.334	0.144	0.153	0.262	0.197	0.358	0.114	0.128	0.120	0.309	0.365	
宮崎	0.536	0.424	0.058	0.112	0.154	0.219	0.182	0.142	0.254	0.130	0.207	0.190	0.143	0.274	0.146	0.117	0.130	0.360	0.271	
大分	0.502	0.405	0.118	0.054	0.109	0.136	0.147	0.103	0.236	0.131	0.199	0.199	0.150	0.278	0.112	0.126	0.119	0.312	0.235	
愛媛	0.423	0.432	0.194	0.106	0.026	0.104	0.178	0.140	0.260	0.146	0.254	0.228	0.162	0.346	0.136	0.133	0.123	0.374	0.255	
淡路島	0.507	0.461	0.252	0.203	0.04	0.164	0.210	0.176	0.291	0.139	0.286	0.276	0.198	0.403	0.150	0.133	0.129	0.356	0.229	
三重	0.475	0.447	0.393	0.273	0.184	0.269	0.182	0.075	0.303	0.148	0.199	0.202	0.161	0.307	0.190	0.182	0.153	0.382	0.346	
土肥	0.55	0.385	0.303	0.275	0.286	0.32	0.302	0.137	0.049	0.123	0.137	0.121	0.101	0.157	0.232	0.174	0.154	0.474	0.408	
下田	0.467	0.389	0.232	0.202	0.205	0.249	0.103	0.201	0.275	0.055	0.119	0.099	0.074	0.184	0.181	0.173	0.062	0.295	0.324	
伊東	0.627	0.474	0.372	0.394	0.369	0.392	0.451	0.064	0.364	0.208	0.223	0.177	0.186	0.242	0.335	0.247	0.267	0.598	0.512	
館山	0.508	0.248	0.231	0.262	0.253	0.227	0.261	0.208	0.05	0.309	0.021	0.056	0.003	0.146	0.145	0.121	0.053	0.294	0.302	
銚子	0.614	0.256	0.36	0.384	0.422	0.452	0.343	0.219	0.163	0.319	0.037	0.022	0.016	0.079	0.211	0.183	0.127	0.417	0.423	
福島	0.549	0.42	0.314	0.368	0.362	0.417	0.333	0.186	0.123	0.244	0.091	0.036	-0.018	0.001	0.265	0.213	0.125	0.477	0.453	
岩手	0.475	0.329	0.249	0.293	0.272	0.311	0.277	0.163	0.085	0.258	0.003	0.026	-0.031	0.046	0.190	0.158	0.060	0.392	0.377	
八戸	0.617	0.538	0.419	0.475	0.505	0.563	0.472	0.219	0.249	0.301	0.222	0.117	0.001	0.065	0.369	0.338	0.159	0.601	0.557	
長崎	0.603	0.209	0.278	0.242	0.248	0.262	0.361	0.418	0.326	0.528	0.275	0.389	0.464	0.354	0.597	0.075	0.087	0.179	0.112	
福岡	0.579	0.208	0.196	0.237	0.214	0.206	0.306	0.279	0.251	0.341	0.204	0.298	0.333	0.26	0.491	0.134	0.048	0.320	0.292	
島根	0.556	0.182	0.229	0.228	0.184	0.182	0.23	0.3	0.16	0.314	0.072	0.303	0.29	0.159	0.448	0.135	0.078	0.140	0.210	
福井	0.768	0.51	0.598	0.606	0.589	0.531	0.636	0.719	0.517	0.771	0.497	0.667	0.713	0.631	0.808	0.343	0.506	0.247	0.205	
函館	0.697	0.573	0.439	0.428	0.389	0.542	0.557	0.612	0.514	0.689	0.486	0.658	0.675	0.586	0.768	0.192	0.446	0.325	0.302	
	沖縄	鹿兒島	宮崎	大分	愛媛	淡路島	三重	土肥	下田	伊東	館山	銚子	福島	岩手	八戸	長崎	福岡	島根	福井	函館

F_{ST} はボンフェローニ補正をしたp値で有意(0.05基準)なものを、 G''_{ST} は0.5以上の値を太字で示した

考察

公開 RNA-Seq データを用いた SSR マーカー作成

SSR マーカーなど、系統地理学的解析に必要な新規 DNA マーカーの作出は、モデル生物種でない場合、時間と労力が掛かりコストベネフィットの面で懸念されていた（大西ら 2013）。一方で、系統地理学的解析に必要な新規 DNA マーカーを安価かつ効率的に作成するために、陸上植物では OneKP Project が取得する RNA-seq データを利用することが報告されていた（Sakaguchi & Ito 2014）。本研究でも、モデル生物種でない大型藻類において、この OneKP Project が取得する RNA-seq データを利用する方法で 7 組の新規 SSRs マーカーの作成が容易に出来た。今後、OneKP Project が取得している緑藻ミルや紅藻フクロフノリなどの大型藻や灰色藻類や黄金藻などの微細藻などの RNA-seq データの有効利用が期待される。

分布変遷史と遺伝的多様性

本研究では、新規 SSR マーカーでの系統地理学的解析で、海域生態系においても経済的にも重要な褐藻ヒジキの地理的な遺伝構造、個体群の遺伝的多様性、分布変遷史などを推察することができた。

まず、沖縄集団はプライベートアレルやレアアレルの割合が高く、かつ他の集団とは遺伝的に大きく分化していた。このように高い固有性があるにも関わらず、遺伝的多様性は比較的低くなっており、保全の必要性が強く示唆された。現在、沖縄県では与那原など沖縄島の一部のみにヒジキは生育していて、ヒジキは沖縄県の準絶滅危惧種（NT）に指定されており、将来的に地球温暖化の影響によりヒジキ藻場は衰退する可能性もあると考えられている（香村 2006）。本研究の結果からも、沖縄ヒジキは早急に保全活動の指針選定に取りかかる必要がある。

沖縄以外の残りの集団は、遺伝的に大きく 2 つのグループに分けられた。1 つ目は九州、四国、日本海沿岸、函館集団からなるグループである。これらは対馬海流の影響をうける地域で、対馬海流の流れる方向に分布が広がったと考えれば、函館が分布の末端と考えられる。もう一方のまとまりは、太平洋沿岸の東海、関東、東北地方の集団からなるグループで、こちらは黒潮およびその支流域であり、この流れの方向に分布が広がったと考えれば、黒潮が届かないとされる八戸が分布の末端と考え

られる。 F_{ST} や G'_{ST} の値から、地理的に近い函館と八戸集団の間で大きな遺伝的分化が見られ、これら 2 地点間で上述の 2 グループの間の分化が維持されている可能性が示された。

本州太平洋側の館山から八戸までの集団間での遺伝的分化度は低く、かつ遺伝構造解析においても一つのまとまりを形成したことから、急速にこの地域のヒジキの分布域が拡大したことが考えられた。ただし、多くの生物種において太平洋岸における浅海系の生物相は銚子付近を境にして黒潮系と親潮系のものと南北に分かれることが分かっている（堀越 1985）。ヒジキと同じ褐藻類では、ワカメ（上井 2010）が茨城と福島の間で遺伝的境界があり、今回のヒジキは、それよりも北に境界線がシフトしていることになる。気象庁（<http://www.data.jma.go.jp/kaiyou/data/db/kaikyo/ocean/forecast/predict.html>）が公開している海流の方向に関するデータを見ると、沿岸付近は季節によって沿岸流の方向が大きく異なり（図 7）、茨城から八戸まで移動することは可能と思われる。特にヒジキなどの潮間帯に生育する海藻類では、黒潮など大きな海流に加え、この沿岸域の小さな沿岸流も分布拡大の方向に関して重要なであろう。

ABC 解析で支持されたシナリオ 1 におけるパラメータ推定結果から、沖縄集団（POP1）や太平洋集団（POP3）と比較して、九州、四国、日本海沿岸、函館集団からなるグループ（POP2）で大きな有効集団サイズが維持されていることが示唆された。このグループでは多くの特異なアレルが存在し、多様性も高いことから、安定的に存在したこのグループがもととなって太平洋側（POP3）に分布を広げたのかもしれない。このグループが分布する地域のうち、九州地方は紅藻オキチモズク（Shimada *et al.* 2012）や紅藻アサクサノリ（大西ら 2013）など、いくつかの大型藻類でも多様性が高く起源であると推定されているものがあり、今回のヒジキも同じパターンの可能性が考えられる。Cheang *et al.* (2009) は、中国における褐藻ヒジキの系統地理学的解析をおこない、共通祖先を持つ 2 つの地理的に独立したヒジキの系統を明らかにした。また Hu *et al.* (2013) は 2 系統のうち 1 系統は第四紀の西南日本に形成されたレフュジアに存

表 5. シナリオ 1 における各パラメータ事後分布の推定結果。

パラメータ	推定された事後分布				
	平均	中央値	最頻値	95% 信用区間	
N1/MeanN*	4.01E-01	3.70E-01	3.26E-01	1.65E-01	7.35E-01
N2/MeanN	1.55E+00	1.55E+00	1.55E+00	1.04E+00	2.03E+00
N3/MeanN	7.65E-01	7.49E-01	6.94E-01	4.17E-01	1.17E+00
t1/MeanN	1.96E-01	1.62E-01	1.13E-01	5.31E-02	4.45E-01
t2/MeanN	1.18E+00	1.07E+00	9.18E-01	5.02E-01	2.25E+00
t3/MeanN	9.69E+00	8.59E+00	7.47E+00	1.20E+00	2.23E+01
Nanc/MeanN	7.54E+00	6.03E+00	1.54E-02	5.03E-01	1.97E+01

*MeanN は、現生 3 集団の有効集団サイズの平均

表 6. 各地の気象環境データ。

	最高海水温 (°C)	最低海水温 (°C)	日照時間 (h)	潮位差 (cm)
厚岸 (北海道)	18.1	-0.1	185.2	146.7
小樽 (北海道)	23.5	3.3	80.3	29.3
男鹿 (秋田)	26.4	7.2	85.6	34.7
佐渡 (新潟)	25.5	8.8	79.9	29.3
函館 (北海道)	20.4	7.1	131.9	104.3
野田 (岩手)	20.6	6.1	121.3	149.7
浜田 (島根)	27.4	11.6	107.5	53.3
本部 (沖縄)	28.8	21.3	119.9	231.3
石垣島 (沖縄)	28.9	21.4	117.3	200.3

海水温：月別の日海水温の平均の最高値（最高海水温）と最低値（最低海水温）の直近 3 年間の平均

日照時間：2014-2016 年 1-3, 10-12 月の平均

潮位差：2017 年 4, 5, 6 月の最高潮位と最低潮位の差の平均

灰色塗り：ヒジキの生育が確認できない地域

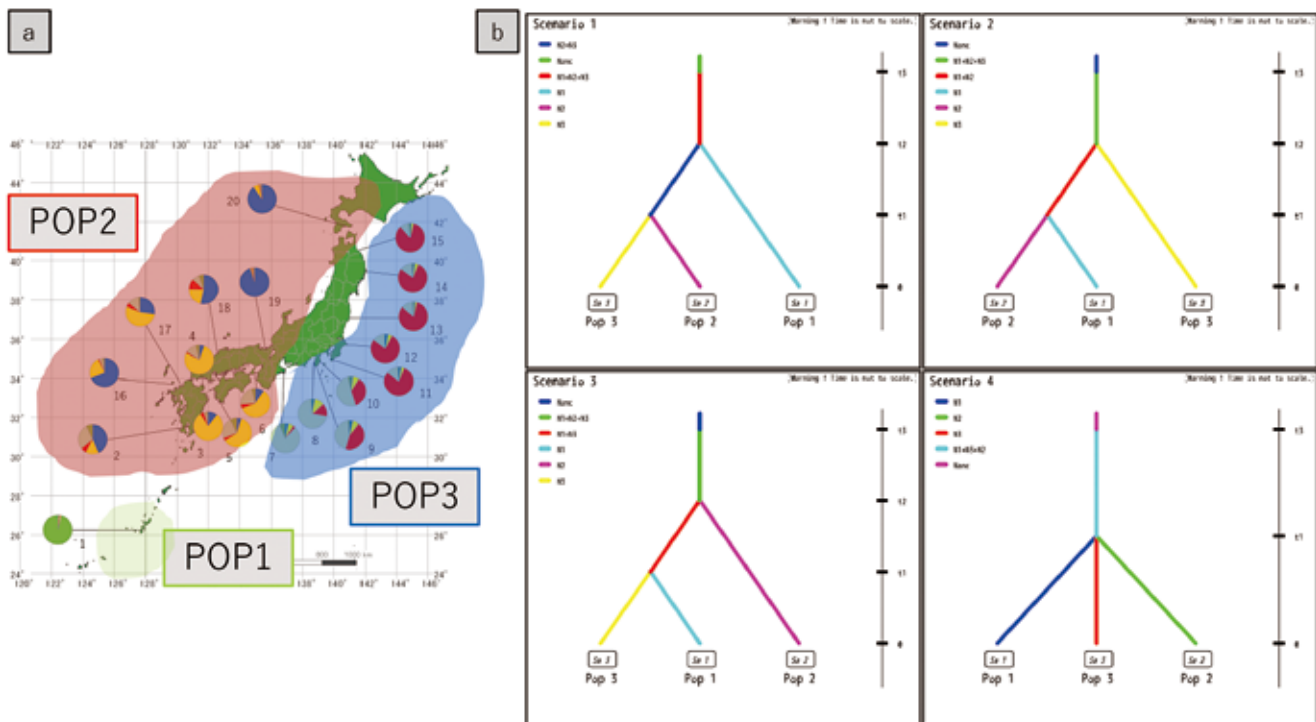


図6. STRUCTURE 解析や NeighborNet 解析で大きく分かれた沖縄集団 (POP1)、九州、四国、日本海沿岸、函館集団 (POP2)、東海、関東、東北の太平洋沿岸集団 (POP3) (a) の3グループの集団動態について、ABC 解析用に作成した4つのシナリオ (b)。

在していたヒジキに係る可能性があると記している。一方、ABC 解析のシナリオ1の結果から、日本産ヒジキは、日本国内の地域分化の年代よりも遙か昔に、小さな祖先集団から集団サイズを拡大したことが示唆された。これは、中国などの海外からの日本への分布拡大イベントに対応する可能性と、日本国内の小さなレフュジアからの分布拡大の両方の可能性が考えられる。また、日本国内の地域分化の年代が、最初の祖先集団の拡大よりもかなり最近であることも分かったが、それが最終氷期などの地史イベントのどのタイミングに係るのかまでは分からなかった。今後は、日本以外のサンプルを加え、更に分岐年代推定まで含めたより詳細な解析が待たれる。

ヒジキの分布域

今回の系統地理学的解析で、函館のヒジキは太平洋を北上したのではなく、日本海を北上してたどり着いたと推定できた。ただし、その途中の日本海の佐渡 (新潟)、男鹿 (秋田)、小樽 (北海道) ではヒジキを確認することができなかった。海藻類の分布域を決める要因に関しては古くから興味を持たれていて、例えば、海流 (岡村 1931)、生活史と水温 (中原・増田 1971)、塩濃度と水温 (谷口 1971)、海水汚染度 (Hirose 1978) などに関する報告がある。須藤 (1992) は海藻種の分布に関する総説で、重要かつ数値データが得られている環境要因として、年間最低および最高月水温、塩分、汚染度、波高、海底傾斜度をとりあげ、海藻 92 種が分布する環境幅を示している。最近では、田中 (2012) は月平均海水温が 15°C を超える温度を年間で積算して「海の温暖指数」を求め、海の温暖指数と海藻分布との関係を考察している。

そこで予備的ながら、ヒジキの分布を決める環境要因について推察してみた。本研究における気象環境データとヒジキの分布域との比較で、ヒジキが確認できなかった日本海側の佐渡 (新潟)、男鹿 (秋田)、小樽 (北海道) は、冬の日照時間と潮位差が小さく、これら地域ではヒジキにとって生育可能な最低光量に達していないことが予想できた。冬の日照時間が分布を決める要因であるのかどうか、今後の培養実験等での実証が望まれる。一方、日照時間が長く潮位差が大きい厚岸 (北海道) にヒジキが存在しないのは、北海道東部沿岸には親潮が流れており、物理的にヒジキが北海道東部沿岸まで流されないからか、もしくは海水温が低いことも可能性が残る。沖縄に関しては、気象

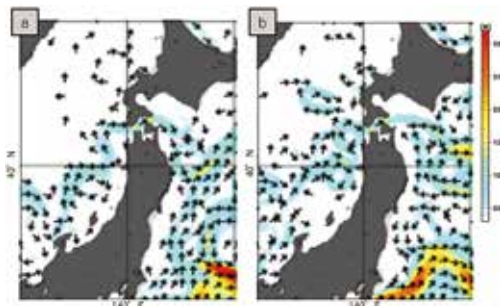


図7. 気象庁が公開している海流の方向に関するデータ。
(a) 2015年11月17日では、千葉から岩手へ北上する沿岸流が確認できる。
(b) 2016年10月31日では、岩手から青森へ北上する沿岸流が確認できる。

庁が公開している充分量の沖縄県の海水温データは沖縄島の本部と石垣島のみで、これらの間に大きな違いは見られなかった。どうして沖縄島のごく一部にヒジキが生育できているのかを明らかにするためにも、沖縄県の多くの箇所の充分量の海洋環境データの蓄積と比較解析が必要である。

今後の課題

本研究で得られた分布変遷史や個体群の遺伝的多様性を考慮すると、沖縄個体群は遺伝的多様性が低く新しい個体の移入も考えられず個体群の衰退が懸念される。日本近海における2016年までのおよそ100年間にわたる海域平均海面水温(年平均)の上昇率は $+1.09^{\circ}\text{C}/100$ 年で(気象庁2016)、今後の地球温暖化により、100年後は 2.9°C 上昇(桑原ら2006)もしくは 2.41°C 上昇(気象庁2008)すると推測されていて、沖縄個体群が消滅する可能性は大きい。海水温の上昇によって、ヒジキの分布が北にシフトするだけで日本全体のヒジキバイオマスには影響ないとも考えられるが、海水温が上昇しても日照時間や海流の影響でヒジキ分布が拡大することはできず、さらに高温にさらされていぬ函館(北海道)個体群も高温の影響で衰退する可能性さえある。今後、各地域のヒジキ個体群の生育特性を把握するなど、さらに詳細な将来の分布シミュレーションをおこない、海域生態系にとって重要な藻場構成種で水産学上も重要な経済種である褐藻ヒジキの個体群維持に貢献していきたい。

謝辞

材料の採集にご協力いただいた福井県立大学神谷充伸氏、長崎大学飯間雅文氏、三重大学倉島彰氏、九州大学栗原曉氏、いわき明星大学佐々木秀明氏、鹿児島大学寺田竜太氏、神戸大学羽生田岳昭氏、高知大学平岡雅規氏、千葉大学海洋バイオシステム研究センター羽賀秀樹氏、水産総合研究センター村岡大祐氏に感謝します。本研究は科学研究費補助金(基盤研究C)「日本近海に広域分布する海藻類の多種系アプローチによる比較系統地理学的解析」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

Bi, Y. H., Yang, X., Sun, Z. & Zhou, Z. G. 2015. Development and characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in *Sargassum vachellianum*. *Cons. Gen. Res.* 7: 203-205.

Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F. & Miller, A. D. 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol. Ecol. Res.* 12: 456-463.

Brownstein, M. J., Carpten, J. D. & Smith, J. R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20: 1004-1010.

Cheang, C. C., Chu, K. H. & Ang, P. O. 2009. The phylogeography of *Sargassum fusiforme* (Fueles, Heterokontophyta) in the north-western Pacific. *Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America*, pp. 63. Honolulu, Hawaii, 18-22.

Comuet, J. M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A., Gautier, M., Leblois, R., Marin, J. M. & Estoup, A. 2014. DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* 30: 1187-1189.

Dieringer, D. & Schlötterer, C. 2003. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol. Ecol. Notes* 3: 167-169.

Earl, D. & von Holdt, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Cons. Gen. Res.* 4: 359-361.

愛媛県農林水産研究所水産研究センター 2016. ヒジキ養殖マニュアル. http://ehime-suiken.jp/wordpress/wp-content/uploads/2014/09/hijiki_manual_050325.pdf

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.

Faircloth, B. C. 2008. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol. Ecol. Res.* 8: 92-94.

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.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

Hirose, H. 1978. Composition of benthic marine algae in relation to pollution in the Seto Inland Sea, Japan. In Jensen, A. & Stein, J. R. (eds) *Proc. Int. Seaweed Symp.* 9, p. 173-179. Science Press, Princeton.

堀越増興 1985. 日本の生物. 岩波書店, 東京.

堀輝三 1993. 藻類の生活史集成 第2巻 褐藻・紅藻類. 内田老鶴圃, 東京.

堀輝三 1994. 藻類の生活史集成 第1巻 緑色藻類. 内田老鶴圃, 東京.

Hu, Z., Jie, Z., Juan, L. B., De-Lin, D. 2013. Asymmetric genetic exchange in the brown seaweed *Sargassum fusiforme* (Phaeophyceae) driven by oceanic currents. *Mar. Biol.* 160: 1407-1414.

Huson, D. H. & Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254-267.

井鷲裕司 2001. 第3章 マイクロサテライトマーカーで探る樹木の更新過程: 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— 63-66. 文一総合出版, 東京.

伊藤龍星 2013. 褐藻ヒジキ *Sargassum fusiforme* の挟み込み養殖と人工種苗生産に関する研究. 大分県農林水産研究報(水産) 3: 21-56.

香村真徳 2006. 改訂版レッドデータおきなわ. 沖縄県.

川井浩史 2000. 新・神戸の自然シリーズ4 神戸の海藻—神戸・淡路地域の海藻—. 財団法人神戸市体育協会, 兵庫.

気象庁 2008. 地球温暖化予測情報 第7巻 IPCC 温室効果ガス排出シナリオ A1B および B1 による日本の気候変化予測. <http://www.data.jma.go.jp/cpdinfo/GWP/Vol7/pdf/synthesis.pdf>

Kitayama, T. & Lin, S. M. 2012. Brown algae from Chaojing, Keelung city, Taiwan. *Mem. Natl. Mus. Nat. Sci., Tokyo* 48: 149-157.

桑原久実・明田定満・小林聡・竹下彰・山下洋・城戸勝利 2006. 「温暖化影響特集」温暖化による我が国水産生物の分布域の変化予測. 地球環境, 11: 49-57.

Liu, F., Hu, Z., Liu, W., Li, J., Wang, W., Liang, Z., Wang, F. & Sun, X. 2016. Distribution, function and evolution characterization of microsatellite in *Sargassum thunbergii* (Fueles, Phaeophyta) transcriptome and their application in marker development. *Sci. Rep.* 6: 18947.

Meirmans, P. G. & Van Tienderen, P. H. 2004. Genotype and genotype: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol.* 4: 792-794.

宮下章 1974. 海藻—ものと人間の文化史 11—. 法政大学出版局, 東京.

中原紘之・増田道夫 1971. 緑藻と褐藻の生活史と水平分布. 海洋科学 3: 24-26.

Nei, M., Tajima, F. & Taten, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19: 153-170.

岡村金太郎 1931. 海産植物の地理的分布. 岩波講座地理学. 岩波書店, 東京.

大西舞・菊地則雄・岩崎貴也・河口莉子・島田智 2013. 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. 藻類 61: 84-97.

Peakall, R. & Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-

- 2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols*. pp 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Sakaguchi, S. & Ito, M. 2014. Development and characterization of EST-SSR markers for the *Solidago virgaurea* complex (Asteraceae) in the Japanese archipelago. *Appl. Plant Sci.* 2: apps.1400035.
- Shan, T., Pang, S., Li, J. & Su, L. 2015. Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci from the brown alga *Sargassum horneri*. *J. Appl. Phycol.* 27: 2419-2421.
- Shimada, S., Ichihara, K., Masakiyo, Y., Iima, M., Yoshida, S. & Kumano, S. 2012. Threatened species *Nemalionopsis tortuosa* (Thoreaales, Rhodophyta) in Japan, new locality and current condition of its all reported habitats. *Algal Res.* 5: 9-16.
- 水産庁 2016. 藻場・干潟ビジョン. 水産庁, 東京. http://www.jfa.maff.go.jp/j/gyoko_gyozyo/g_thema/sub53.html
- 須藤俊造 1992. 海藻・海草相とその環境条件との関連をより詰めて求める試み. *藻類* 40: 289-305.
- 諏訪剛 2006. 和歌山沿岸で採集されたホンダワラ類. 和歌山県農林水技センター研報 7:115~122.
- 田中次郎 2012. 藻場生態系. 渡邊信 (監修). *藻類ハンドブック*. pp. 145-151. (株) エヌ・ティー・エス. 東京.
- 谷口森俊 1971. 海洋植物の分布. *海洋科学* 3:778-784.
- 上井進也 2010. 日本沿岸における海藻集団の地理的構造. *日本植物学会, 植物科学の最前線* 1 (1): 57-65.
- 山田信夫 2001. *海藻利用の科学* (改訂版). 成山堂書店. 東京.
- 吉田忠生 1998. *新日本海藻誌*. 内田老鶴圃. 東京.
- Yu, S. H., Deng, Y. Y., Yao, J. T., Li, S. Y., Xin, X., Duan, D. L. 2012. Population genetics of wild *Hizikia fusiformis* (Sargassaceae, Phaeophyta) along China's coast. *J. Appl. Phycol.* 24: 1287-1294.
- Zhao, F. J., Wang, X. L., Liu, J. D. & Duan, D. L. 2007. Population genetic structure of *Sargassum thunbergii* (Fuciales, Phaeophyta) detected by RAPD and ISSR markers. *J. Appl. Phycol.* 19: 409-416.

(Received Aug. 24, 2017; Accepted Sep. 22, 2017)