HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	日本産寒海性コンブ科植物Saccharina japonicaの遺伝的多様性の保全に関する研究
Author(s)	前田, 高志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第6925号
Issue Date	2014-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6925
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56695
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Maeda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

日本産寒海性コンブ科植物 *Saccharina japonica* の遺伝的多様性の保全に関する研究

(Conservation research on genetic diversity in *Saccharina japonica* growing in northern part of Japan)

北海道大学大学院環境科学院

前 田 高 志

目　次

序論・・ 1

第1章　コンブ類からの高純度 DNA 抽出法の開発
1. 諸言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
2. 材料と方法
2.1. 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
2.2. 方法
2.2.1. 事前に多糖類除去処理を伴わない DNA 抽出法
2.2.1.1. DNA 抽出方法 1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
2.2.1.2. DNA 抽出方法 2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
2.2.1.3. DNA 抽出方法 3・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
2.2.1.4. DNA 抽出方法 4・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
2.2.2. 事前に多糖類除去処理を伴う DNA 抽出法
2.2.2.1. DNA 抽出方法 5・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
2.2.2.2. DNA 抽出方法 6・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
2.2.2.3. DNA 抽出方法 7・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
2.2.2.4. DNA 抽出方法 8・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
2.2.2.5. DNA 抽出方法 9・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
2.2.2.6. DNA 抽出方法 10・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
2.2.2.7. DNA 抽出方法 11・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
2.2.3. DNA の精製法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
2.2.4. DNA 濃度の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10
2.2.5. DNA 純度の評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10
3. 結果
3.1. 事前に多糖類除去類を伴わない DNA 抽出法
3.1.1. DNA 抽出法 1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
3.1.2. DNA 抽出法 2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
3.1.3. DNA 抽出法 3・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
3.1.4. DNA 抽出法 4・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
3.2. 事前に多糖類除去処理を伴う DNA 抽出法
3.2.1. DNA 抽出法 5・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12
3.2.2. DNA 抽出法 6・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13
3.2.3. DNA 抽出法 7・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13

3.2.4. DNA 抽出法 8・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
3.2.5. DNA 抽出法 9・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
3.2.6. DNA 抽出法 10・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
3.2.7. DNA 抽出法 11・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
3.3. AFLP 分析において高い再現性が示された鋳型 DNA の純度の再評価・・・・16
4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16

第 2 章 *Saccharina japonica* の個体群間の遺伝子構造の解明
1. 諸言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
2. 材料と方法
2.1. 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
2.2. 方法
2.2.1. AFLP 解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
2.2.2. 分子系統解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23
3. 結果
3.1. AFLP 分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
3.2. 分子系統解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28
4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29

第 3 章 共優性マーカーを用いた *Saccharina japonica* の地理的解明遺伝子構造の解明
1. 諸言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
2. 材料と方法
2.1. 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
2.2. 方法
2.2.1. DNA ライブラリの作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
2.2.2. SSR に隣接する片側の領域の塩基配列の決定・・・・・・・・・・・・・ 33
2.2.3. SSR に隣接する反対側の領域の塩基配列の決定・・・・・・・・・・・・ 34
2.2.4. SSR の増幅・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34
2.2.5. マイクロサテライトマーカーの開発と分析・・・・・・・・・・・・・・ 35
3. 結果
3.1. マイクロサテライトマーカー候補の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・35
3.2. マイクロサテライトマーカー分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38
4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39

第 4 章 *Saccharina japonica* の環境ストレス応答タンパク質の探索
1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46

2. 材料と方法
2.1. 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46
2.2. 方法
2.2.1. ストレス負荷胞子体の生産・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46
2.2.2. タンパク質の抽出と精製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47
2.2.3. タンパク質の定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48
2.2.4. 二次元電気泳動・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48
2.2.5. タンパク質の同定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48
3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49
4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

第 5 章 藻場造成に向けたコンブ葉体由来のバイオフレーバー活用の有効性の評価
1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
2. 材料と方法
2.1. 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
2.2. 方法
2.2.1. バイオフレーバーの抽出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
2.2.2. バイオフレーバーのウニ誘引効果の検証・・・・・・・・・・・・・・・・ 54
2.2.3. 天然コンブ藻体から抽出したバイオフレーバー添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54
2.2.4. コンブ葉体に含まれる特定揮発性化合物添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54
3. 結果
3.1. バイオフレーバーのウニ誘引効果の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・55
3.2. 天然コンブ葉体から抽出したバイオフレーバー添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 55
3.3. 葉体に含まれる特定揮発化合物添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証・・・ 56
4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 56

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 60

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 81

序　論

日本沿岸には、現在のところ37種類のコンブ目植物（コンブ類）が生育することが知られている（Yotsukura 2010）。なかでも北海道沿岸には27種が報告されており、これらは各地で単一種または複数の種からなるコンブ藻場を形成する。藻場は光合成による基礎生産や、過剰な栄養塩類を吸収することによる水質浄化などの環境調整機能を担っている（吉田ら 2011）。また、藻場はさまざまな沿岸生物の棲み処となり、さらに、産卵の場を提供するなど豊かな生態系を育むための重要な役割も果たしている（千川ら 2002）。とりわけ *Saccharina japonica*（Areschoug）C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders は広い分布域を持ち、大規模な藻場を形成する生態的に重要な種である。また、1000 年以上も前から食材として利用されてきた我が国の主要な水産資源でもある。

S. japonica は形態的特徴によって 100 年以上前から独立した 4 種：マコンブ *S. japonica*、ホソメコンブ *S. religiosa*（Miyabe）C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders、リシリコンブ *S. ochotensis*（Miyabe）C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders、オニコンブ *S. diabolica*（Miyabe）Selivanova, Zhigadlova & G.I.Hansen として扱われてきた（宮部 1902）。しかし、分類に用いられてきた形態形質の多くは変異が大きく、近年の分子系統学的解析においても、一般に種レベルの違いが検出される遺伝子領域の塩基配列に相違が見られていない（Yotsukura et al. 2008）。さらに、4 種の分布域はそれぞれ局所的かつ連続的であり自然交配が起こっていることが推察されていることから、現在ではこれらは異なる 4 変種（マコンブ -var. *japonica*、ホソメコンブ -var. *religiosa*、リシリコンブ -var. *ochotensis*、オニコンブ -var. *diabolica*）として扱われている（Yotsukura et al. 2008）。

近年、地球規模の環境変動や人為的な活動にともなう海洋環境の変化によって、北海道におけるコンブの資源量は著しく減少している（北海道水産現勢 2010、2011、2012）。特に、産業種である *S. japonica* では深刻であり、例えば、日本海沿岸では長期間にわたって藻場が衰退または消失した地域があり（名畑 1991、1992）、藻場衰退に関わる物理的・化学的要因の調査や（赤池ら 2002、道津ら 1999、桑原ら 1997、峰ら 2000）、藻場造成の一環としてウニの除去（桐原ら 2009）、人工礁の投入（堀江ら 2003a、2003b、佐藤ら 2010）、雑海藻の駆除（北川ら 2006）などの漁場整備が行われてきた。しかし、昨今、暖流勢力の増大による海水温の上昇が本種の生育域で広く深刻化しており、それにともなう分布域の変化から、これまでの漁場整備による藻場造成では十分な成果が期待できない。そのような地域では異産地の有用形質を持った株を移植することは、藻場を再生させるためのひとつの方策として挙げられる。しかし、移植は在来個体群の遺伝的固有性を失わせる可能性があり、地域個体群の遺伝的固有性を保持しながら藻場の保全を進めるためにはそれぞれの個体群が持つ遺伝的特性を把握する必要がある。

S. japonica の遺伝子情報としては、核ゲノム中の 18SrRNA と 5.8SrRNA の遺伝子間領域（ITS1）や、5.8SrRNA と 25SrRNA の遺伝子間領域（ITS2）（Yotsukura et al. 2008）、葉緑

体ゲノム（cpDNA）（Wang et al. 2013）、およびミトコンドリアゲノム（mtDNA）（Yotsukura et al. 2010）の全塩基配列などが既に解読されている。これらのなかで、葉緑体の全ゲノムについては種内変異を調べてはいないが、他の領域においては概して変異が乏しく、これら配列を比較することは種内の遺伝的変異を検出するうえで有効ではない。なお、5SrRNA遺伝子間領域の塩基配列にはわずかに変異が見つかっているが、その違いは産地の違いを反映していないことが報告されている（Yotsukura et al. 2006）。このような特定の遺伝子領域の塩基配列比較とは異なり、DNA 多型解析はゲノム全体に存在するわずかな遺伝的変異を検出することが可能である。特に、Amplified fragment length polymorphism（AFLP）分析やマイクロサテライトマーカー分析（Simple sequence repeat : SSR）は、コンブ類においても遺伝的多様性の調査で広く利用されている（Kusumo and Druehl 2000、Kusumo et al. 2006、Shan and Pang 2009、Shan et al. 2011）。AFLP 分析は、1 回の分析でゲノム全体の多数の遺伝子座に存在する多型を検出できることから、遺伝的多様性を調査するために効果的であると考えられる。しかし、AFLP は優性マーカーであり、ヘテロ接合体とホモ接合体の違いを検出することが出来ない。一方、マイクロサテライトマーカーは、共優性かつ多型性も高いため極めて有効なマーカーであると考えられる。しかし、一般にマイクロサテライトマーカーは開発に多大な時間とコストがかかるうえ（Zane et al. 2002）、高い突然変異率のために集団間の遺伝的分化の程度を過少評価する傾向があると報告されている（Hedrick 1999）。AFLP 分析は、マイクロサテライトマーカーの欠点を補い、多数の個体群を扱う遺伝的多様性の調査に効果的な手法であることから、これら 2 種類のマーカーを併用することで詳細な遺伝子構造を解明できる。

これまでコンブ類では数種について AFLP 分析が行われているが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた方法がほとんどであり（Kusumo and Druehl 2000、Shan et al. 2009、2011）、ゲル中に出現する曖昧なバンドは除外するか、鮮明なバンドが見られる範囲のみを選択して解析している。これらのことを踏まえ、客観的な情報を大量に得るためにはキャピラリーシークエンサーを利用した解析が望まれるが、本目植物を扱った Erting et al.（2004）の報告では一部の波形データでノイズが見られるほか、サンプル間で増幅の程度にも違いが見られている。従って、キャピラリーシークエンサーで精度の高い結果を得るためには、先ずは高純度な DNA を抽出する方法を開発する必要があると考えられる。

ところで、先に述べたことをふまえ、藻場造成を行ううえで地域個体群の持つ遺伝特性を考慮することは重要である。そのためには在来個体群の衰退を未然に防ぎ、遺伝資源を保全することが前提となる。近年、ストレス応答タンパク質の研究が様々な生物種で行われており、暖海性コンブ類のカジメ *Ecklonia cava* Kjellman についても高水温下で発現量が増加するタンパク質が検出されている（Yotsukura et al. 2012）。一方、*S. japonica* については、季節ごとに発現するタンパク質の同定と発現量の比較がされている（Yotsukura et al. 2010）。タンパク質の発現量を分析することで、その時、その場所における個体の生理状態を把握することができ、さらに環境ストレス応答タンパク質の発現量を指標として藻場の健全性

を評価することができる。また、これらのタンパク質を調べることにより環境ストレスの原因を特定し、藻場の衰退を未然に防ぐための具体策を立てられる。

なお、遺伝的多様性の保全に向けた藻場造成をするにあたり、*S. japonica* の生育域においてウニの食害対策は不可欠である。これまでコンブをウニから守る方法としては、嵩上げ礁やウニ防御フェンス、ダイバーによるウニの駆除等が行われてきた（桐原ら 2009）。しかし、広くコンブ漁場を考えた場合これらの継続的な実施は何れも困難であり、より効果的・効率的な方法が求められてきた。Boonprab et al.（2003）は、コンブに含まれるバイオフレーバーを検出し、数種類の揮発性成分やアルデヒドを同定している。これらの化合物を利用することで、コンブに対する摂餌選択性の高いウニを駆集し、効率的にコンブをウニから守ることができると思われる。

本研究では、北海道沿岸およびその周辺域に生育する *S. japonica* について、個体群間の遺伝的変異を検出するための DNA 多型解析に有用な高純度 DNA の抽出方法を開発し、AFLP 分析を行った。また、簡便な方法によるマイクロサテライトマーカーの開発を試み、得られた共優性マーカーにより個体群間の遺伝的多様性を調査した。一方、本種の生育に大きく影響を及ぼすとされている水温と栄養塩が異なる条件で育てた葉体からタンパク質を抽出し、環境ストレスマーカーの探索を行い藻場の診断技術の開発を試みた。さらに、バイオフレーバーを活用したウニの駆集法を考案し、既存の遺伝資源の持続的な利用を図るための包括的研究を行った。

第1章　コンブ葉体からの高純度 DNA 抽出法の開発

1. 緒言

DNA 多型解析を進めるなかでは、制限酵素による DNA の分解やポリメラーゼによる塩基配列の増幅が行われる。制限酵素反応やポリメラーゼ反応は、塩濃度や温度などの反応条件の影響を受けることが知られているが、一方で、抽出された DNA の損傷程度や純度によっても大きく左右されることが知られている。一般に、DNA 抽出時に混入する物質として多糖類やポリフェノールが挙げられる。多糖類は制限酵素反応や DNA ポリメラーゼ反応を阻害し（Crowley et al. 2003、Do and Adams 1991、Fang et al. 1992）、特に酸性多糖類の硫酸デキストランとガティガムは Taq ポリメラーゼを阻害することが報告されている（Demeke and Adams 1992）。さらに、これら 2 種の多糖類に加え、カラギーナン、カラヤガム、ペクチン、キシランによって Random amplified Polymorphic DNA（RAPD）分析の結果に影響を及ぼすことも確認されている（Pandey et al. 1996）。これらの問題のほか、粘性の高い多糖類は溶液の撹拌やピペッティング操作を妨げるために DNA 抽出そのものを困難にさせる。そのため、DNA 抽出の際に多糖類を除去するためのいくつかの方法が考案されている。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAB）は DNA 抽出に広く用いられる陽性界面活性剤であり、塩濃度存在下の CTAB 溶液中では DNA と多糖類の共沈を防ぐことができる（e.g. Ghosh et al. 2009、Jena et al. 2010）。一方、ポリフェノールは、内因性酵素活性によってキノン化合物に変化し、その強い酸化作用によって DNA を損傷させる（Loomis 1974）。ポリフェノールの影響を防ぐ方法としては、ポリビニルピロリドン（PVP）を利用したその除去（Bult et al. 1992、Dempster et al. 1999）や、還元性のある 2-メルカプトエタノールを添加することによるキノン化合物の酸化作用の軽減（Loomis 1974）が挙げられる。ポリフェノールと同様に、組織中に存在する DNase は DNA に損傷を与える。この酵素は Mg^{2+}存在下で活性を持つことが知られており（Adams et al. 1999）、その影響を防ぐために DNA を抽出する際に Mg^{2+}と錯体を形成するエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を添加する。しかし、他の金属イオンの存在下でも活性化する DNase が複数存在することが確認されており、例えばイネ科の *Oryza sative* では異なる金属イオンによって活性化される 13 種類の DNase の存在が報告されている（Sodmergen et al. 1991）。このほかにタンパク質や RNA もポリメラーゼ反応に影響を及ぼすと考えられえており、RNA については意図しない領域を増幅させるプライマーとなって増幅結果に影響を及ぼすことが分かっている（Pikkart and Villeponteau 1993、Yoon and Glawe 1993）。近年、これら酵素反応を阻害する物質を効率よく除去し、かつ短時間で DNA 抽出を済ますことができる DNA 抽出 Kit が市販されている。元来、Kit は広く植物や動物からの DNA 抽出に用いられるものであるが、やがて海藻類についても改変したプロトコルによって高純度な DNA を抽出する試みが起こり（Snirc et al. 2010）、現在では Kit を利用した研究が広く行われている（e.g. Ajisaka et al. 2007、Cassano et al. 2012、Kawai and Sasaki 2000、Kurihara et al. 2010、Yotsukura et al. 2010）。なお、組織中

に多量の多糖類やポリフェノーを含む生物については、各々に特化したDNA抽出法が開発されることも珍しくなく（e.g. Ghosh et al. 2009、Jena et al. 2010、Kejani et al. 2010）、海藻類でもその研究例は少なくはない（Mayes et al. 1992、Shivji et al. 1992、Saunders 1993、Kitade et al. 1996、Hu et al. 2004、McDevit and Saunders 2009）。

一般に、コンブ類は多糖類やポリフェノールの含量が多いことが知られているが、そのなかでもカラフトコンブ属 *Saccharina* に代表される所謂"コンブ"は著しく粘質多糖類に富み、DNA抽出は困難な場合が多い（Yi et al. 2010）。これらの多糖類の主成分と考えられるアルギン酸やフコイダンは先に述べた酸性多糖類に含まれるため、酵素反応の阻害要因になり得る。Shan et al.（2011）はCTABを用いてDNAを抽出し、AFLP分析において再現性のある結果を得ている。しかし一方で、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動像において不鮮明なバンドが現れることも報告している。従って、現状、コンブではDNA多型解析において再現性の高い良好な結果を得るために、如何に類雑物を伴わないDNAを抽出するかが大きな課題となっている。

本章では*S. japonica*について、多糖類の除去に有効とされるCTABと、多糖類のみならずタンパク質の除去にも効果のあるドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いた高純度DNAの抽出法を開発した。

2. 材料と方法

2.1. 材料

材料の*S. japonica* var. *diabolica*胞子体は、北海道厚岸町愛冠において3個体採集し（Table 1、Fig.1）、その後、4℃以下で冷蔵しながら速やかに実験室へ輸送した。

2.2. 方法

採取した胞子体葉状部の生長点付近の未成熟で付着物の少ない部分を片刃剃刀で15 cm^2程度切り取った。その後、組織表面から粘液が流出しなくなるまで滅菌海水中で組織表面を洗う作業と、ペーパータオルで組織表面の付着物と水分を拭き取る作業を繰返した。洗浄済の組織片は中粒シリカゲルと共にチャック付ポリ袋に封入し、冷蔵庫中で乾燥させた。乾燥後、組織片は実験に用いるまで-80℃で保存した。DNAを抽出する際は、20-30 mg（0.8 mm×0.8 mm）程度の組織片を0.5 mm^2程度になるまで細断し、2 mlマイクロチューブに移して試料とした。

2.2.1. 事前に多糖類除去処理を伴わないDNA抽出法

2.2.1.1. DNA抽出方法1

DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN、Valencia、CA）を用い、その操作は概ね製品付属の説明書に従った。具体的には、試料にAP1 buffer を400 µlとRNase A stock solution 4 µlを加え

て 5 分毎に転倒混和し、65℃に設定したヒートブロック中で 30 分間インキュベートした。その後、軽くスピンダウンし、全体の 1/3 量の AP2 buffer を加えて転倒混和した。これを 5 分間氷冷した後、室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を QIAshredder Mini Spin Column に移して室温、10,000 rpm で 2 分間の遠心分離を行い、濾液 300 µl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。濾液に対して 1.5 倍量の AP3 Buffer を加えて転倒混和し、スピンダウンを行った後、全体の半量を DNeasy Mini Spin Column に移して室温、10,000 rpm で 1 分間の遠心分離を行うことで Column のメンブレンフィルターに DNA を吸着させた。残りの半量も同様に濾過した後、Column を微小遠心管に装着した。続いて、Column に AW Buffer を 500 µl 加え、室温、10,000 rpm で 1 分間遠心分離を行うことでメンブレンフィルターに吸着された DNA を洗浄した。一旦、Column を外して微小遠心管内の濾液を捨てた後、Column を同じ微小遠心管に装着した。AW Buffer による DNA 洗浄の操作をもう一度繰返した後、Column を 1.5 µl マイクロチューブに装着した。Column のメンブレンフィルターに 65℃に加温しておいた 0.1 TE buffer を 50-100 µl 加え、室温で 5 分間インキュベートして DNA を溶出させた。次いで、室温で 10,000 rpm の遠心分離を行い、濾液を DNA 抽出液とした。

2.2.1.2. DNA 抽出方法 2

Wang et al.（2006）と Shan et al.（2009）にある CTAB を用いた方法を参考に DNA 抽出を行った。具体的には、試料に extraction buffer［3% CTAB（W/V）、1.4 M NaCl、20 mM EDTA、100mM Tris-HCl（pH 8.0）、1% PVP（W/V）、1% 2-mercaptoethanol（v/v）、10 µg/ml RNase A］を 700 µl 加えて 5 分毎に転倒混和し、65℃に設定したヒートブロック中で 60 分間インキュベートした。次いで、全体の 1/3 量の 5M 酢酸カリウムを加えて転倒混和した後、氷上で 15 分間インキュベートした。4℃、12,000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、上清を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。これに等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液（体積比 24:1）を加えて溶液全体が白濁するまで転倒混和し、4℃、12,000 rpm で 10 分間の遠心分離を行った後、水層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。次いで、これに等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液を加え、同様の操作を繰り返した。その後、得られた液量と等量の冷却した 2-プロパノールを加えて転倒混和した。これを-20℃で 20 分間放置して 4℃、12,000 rpm で 10 分間の遠心分離を行った後、DNA を沈殿させて上清を取り除いた。続いて、70% エタノールを加えて転倒混和し、12,000 rpm で 2 分間の遠心分離を行った後に上清を取り除き、沈殿物を真空デシケーター中で 10 分間乾燥させた。これに 0.1 TE を 50-100 µl 加え、DNA 抽出液とした。

2.2.1.3 DNA 抽出方法 3

Barnwell et al.（1998）と Haque et al.（2004）にある方法を参考に DNA 抽出を行った。具体的には、試料に extraction buffer［2% CTAB（W/V）、1.4 M NaCl、20 mM EDTA、100mM

Tris-HCl（pH 8.0）、1% PVP（W/V）、1% 2-mercaptoethanol（v/v）、10 μg/ml RNase A］を700 μl 加えて 5 分毎に転倒混和し、65℃に設定したヒートブロック中で 60 分間インキュベートした。室温、4,000 rpm で 20 分間の遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。これに等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液を加えて液全体が白濁するまで転倒混和し、室温、4,000 rpm で 20 分間の遠心分離を行った。水層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、全体と等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液を加えて同様の操作を繰り返した。得られた液量の 1/10 量の 10% CTAB buffer［10% CTAB（W/V）、0.7M NaCl］を加えて転倒混和した。これに等量の冷却した 2-プロパノールを加えて転倒混和し、-20℃で 20 分間放置した後、4℃、12,000 rpm で 10 分間の遠心分離を行った後に上清を取り除いた。続いて、70% エタノールを 150 μl 加えて転倒混和し、12,000 rpm で 2 分間の遠心分離を行った後に再度上清を取り除き、沈殿した DNA を真空デシケーター中で 10 分間乾燥させた。最後に 0.1 TE を 50-100 μl 加え、DNA 抽出液とした。

2.2.1.4 DNA 抽出方法 4

2.2.1 と同様に抽出を行った。ただし、700 μl の CTAB buffer に 100 μl の Plant RNA isolation aid（Ambion、Carlsbad、CA）を加えて 5 分間毎に転倒混和し、65℃で 60 分間インキュベートした。

2.2.2 事前に多糖類除去処理を伴う DNA 抽出法

2.2.2.1 DNA 抽出方法 5

Shiroma et al.（2007）にある方法を参考にして、試料中に含まれるアルギン酸の抽出を行った。具体的には、先ずは試料に 2% 過酸化水素を 1 ml 加え、室温で 3 時間放置した。2% 過酸化水素を取り除いた後、蒸留水を 1 ml 加えてボルテックスで撹拌した後、蒸留水を取り除いた。次に、3% 炭酸ナトリウムを 1 ml 加えて室温で 6 時間放置した後、4℃、12,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行った。上清を捨て、蒸留水を 1 ml 加えてボルテックスで撹拌し、4℃、12,000 rpm で 15 分間遠の心分離を行った後に再度上清を捨てた。アルギン酸を抽出した試料からの DNA 抽出は 2.2.1.2 の方法に従った。

2.2.2.2 DNA 抽出方法 6

試料に 0.1%（v/v）2-メルカプトエタノールを 1 ml 加えてボルテックスで撹拌した。室温で 90 分間放置した後、ボルテックスで撹拌し、室温、12,000 rpm で 1 分間の遠心を行った。ここで上清とともに組織から流出して塊状となった粘質の多糖類を取り除いた。次いで、試料に 1 ml の蒸留水を加えてボルテックスで撹拌した後、室温で 1 分間インキュベートした（①）。再びボルテックスで撹拌し、室温、12,000 rpm で 1 分間の遠心分離を行った後に上清を取り除いた（②）。以後、①から②の操作を 4 回繰り返した。続いて、1 ml の蒸留水を加えてボルテックスで撹拌した後、65℃で 3 分間インキュベートした（③）。さらに、ボ

ルテックスで撹拌した後、スピンダウンを行って蒸留水を取り除いた（④）。以後、③と④の操作を4回繰り返し、これに続くDNA抽出は2.2.1.2の方法に従った。

2.2.2.3 DNA抽出方法7

組織表面から流出する粘質多糖類の除去は2.2.2.2の方法に従い、続くDNA抽出は2.2.1.3のCTAB法に従った。

2.2.2.4 DNA抽出方法8

組織表面から流出する粘質多糖類の除去は2.2.2.2の方法に従い、続くDNA抽出は2.2.1.4の方法に従った。

2.2.2.5 DNA抽出方法9

組織表面から流出する粘質多糖類の除去は2.2.2.2の方法に従い、続くDNA抽出はDellaporta et al.（1983）にある方法を参考にした。具体的には、試料にextraction buffer（100 mM Tris-HCl、50 mM EDTA、500 mM NaCl、10 mM 2-mercaptoethanol）を750 µlと20% SDS溶液を50 µl加えて5分毎に転倒混和し、65℃に設定したヒートブロック中で30分間インキュベートした。全体の1/3量の5M酢酸カリウムを加えて転倒混和した後、氷上で15分間放置した。4℃、15,000 rpmで20分間の遠心分離を行った後に上清を新しいマイクロチューブに移し、0.7倍量の冷却した2-プロパノールを加えて転倒混和した。次いで、-20℃で一晩放置した後、4℃、15,000 rpmで20分間の遠心分離を行った。続いて、沈殿物を真空デシケーター内で完全に乾燥させた後、TEを700 µl加えて65℃で1時間インキュベートした。0.1倍量の3M酢酸ナトリウムと0.7倍量の冷却したイソプロパノールを加えて転倒混和し、-20℃で1時間放置した。さらに、4℃、15,000 rpmで10分間の遠心分離を行った後に上清を取り除いた。これに70%エタノールを150 µl加えて転倒混和し、12,000 rpmで2分間の遠心分離を行った後に再度上清を取り除き、沈殿物を真空デシケーター中で10分間乾燥させた。最後に0.1 TEを50-100 µl加えてDNA抽出液とした。

2.2.2.6 DNA抽出方法10

組織表面から流出する粘質多糖類の除去は2.2.2.2の方法に従い、続くDNA抽出は、Phillips et al.（2001）の方法を参考にした。具体的には、試料にextraction buffer［2% CTAB（W/V）、1.4M NaCl、200 mM EDTA、100 mM Tris-HCl、0.1% SDS（W/V）、1% 2-mercaptoethanol（V/V）、3% PVP（W/V）］を1 ml加え、65℃のヒートブロック中で30分間インキュベートした。これに等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液を加えて溶液全体が白濁するまで転倒混和し、2,500 gで10分間の遠心分離を行った。水層を新しい1.5 mlマイクロチューブに移し、同様のクロロホルム・イソアミルアルコール抽出の操作を水層の白濁が無くなるまで繰り返した。得られた水層に1.2倍量の冷却した2-プロパノールを加えて転倒混和した。

次いで、4℃、2,500 g で 10 分間の遠心分離を行った後に上清を捨てた。これに Wash buffer（76% エタノール、10 mM 酢酸アンモニウム）を 150 µl 加え、4℃、12,000 rpm で 2 分間の遠心分離を行った。その後、上清を取り除き、再度 Wash buffer を 150 µl 加えて同様の操作を繰り返した。沈殿物を真空デシケーター中で 10 分間乾燥させ、0.1 TE を 50-100 µl 加えて DNA 抽出液とした。

2.2.2.7 DNA 抽出方法 11

組織表面から流出する粘質多糖類の除去は 2.2.2.2 の方法に従った。続く DNA 抽出は、先ず、試料に 2.2.2.5 に示した extraction buffer（100 mM Tris-HCl、50 mM EDTA、500 mM NaCl、10 mM 2-mercaptoethanol）を 700 µl、20% SDS 溶液を 50 µl を加えて 5 分毎に転倒混和し、65℃に設定したヒートブロック中で 45-60 分間インキュベートした。これに 65℃に加温した 5 M 酢酸カリウムを全体の 1/3 量加え、溶液全体が均一になるように速やかに転倒混和した。-20℃で 15 分間放置した後、4℃、20,000 g で 10 分間の遠心分離を行い、上清を新しい 2.0 ml マイクロチューブに移した。次いで、上清内に混入した夾雑物を完全に取り除くため、4℃、20,000 g で 4 分間の遠心分離を行い、上清を新しいマイクロチューブに移した。得られた上清に 0.7-1.0 倍量の 2-プロパノールを加えて転倒混和し、-20℃で 15 分間放置した。続いて、4℃、20,000 g で 10 分間の遠心分離を行って上清を取り除いた。沈殿物に 70% エタノールを 150 µl 加え、4℃、20,000 g で 2 分間の遠心分離を行った。上清を取り除き、沈殿物を真空デシケーター中で 10 分間乾燥させた。これに 0.1 TE を 49 µl、100 mg /ml RNase A を 1 µl 加え、室温または 4℃で一晩放置した。次に、2.2.1.2 で示した extraction buffer 550 µl を加えて 65℃で 30 分間インキュベートした。全体の 1/3 量の 5 M 酢酸カリウムを加えて転倒混和し、氷上で 15 分間放置した。その後、4℃、20,000 g で 10 分間遠心分離を行って水層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。上清と等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液を加えて液全体が白濁するまで転倒混和し、4℃、20,000 g で 10 分間の遠心分離を行った後に水層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。このクロロホルム・イソアミルアルコール抽出の操作を再度繰り返した後、得られた水槽の 0.8 倍量の 2-プロパノールを加えて転倒混和し、4℃、20,000 g で 10 分間の遠心分離を行った。沈殿物を真空デシケーター中で 10 分間乾燥させ、これに 0.1 TE を 50-100 µl 加えて DNA 抽出液とした。

2.2.3 DNA 精製法

抽出した DNA の精製は、GENECLEAN II Kit（フナコシ株式会社、東京）を用い、その操作は概ね添付書に従ったが、いくつかの改変：(1) DNA 抽出液の濃度の如何に関わらず、GLASSMILK を 7 µl 加えた、(2) GLASSMILK を加えてから 10 分間インキュベートした、(3) NEWWASH による洗浄を 3 回繰り返した、(4) GLASSMILK の乾燥時間を室温で 8 分間、65℃で 3 分間とした、を行った。

2.2.4 DNA 濃度の測定

抽出 DNA の濃度は、V-530 UV/VIS Spectrophotometer（日本分光株式会社、東京）を用いた 230 nm、260 nm、280 nm の吸光度値から測定した。

2.2.5 DNA 純度の評価

DNA 抽出液の純度は、上記の方法による 260 nm/280 nm と 260 nm/230 nm の測定値から推定した（Gallagher and Desjardins 2007）。

一方、各手法によって得られたそれぞれ 3 個体の DNA 抽出液のなかで、1 個体分について 2 つのマイクロチューブに分注し、それぞれを鋳型 DNA として AFLP 分析（詳細な方法は第 2 章で示す）に用いた。分析のなかで得られたエレクトロフェログラムに見られるバンドの有無および相対蛍光強度（rfu）を Gene Mapper ver.4.1（Applied Biosystems Inc., CA）を用いて調べ、その再現性からも抽出 DNA の純度を評価した。なお、各バンドの検出誤差を調べるため、蛍光強度の検出範囲を 100 rfu、50 rfu、25 rfu、20 rfu、の 4 段階に設定し、それぞれの条件におけるバンドの出現数を比較した。次いで、高純度と評価された DNA の抽出法については、抽出を行った 3 個体を用いて再度同様の評価を行った。ただし、それぞれの個体から得られた DNA は 1 サンプルとして実験に供した。

3. 結果

3.1 事前に多糖類除去類を伴わない DNA 抽出法

3.1.1 DNA 抽出法 1

抽出 DNA の濃度は 18.7±6.1 ng/μl であり、AFLP 分析のために必要な最小鋳型 DNA 濃度（4 ng/μl）を上回った（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.46±0.24 であり、その値は高純度であるとされる 1.8-2.0 から大きく離れていた。さらに A260/A230 の値は 0.417±0.083 であり、その値は高純度であるとされる 1.8 以上にならなかった。一方、AFLP 分析のエレクトロフェログラムにおいて（Fig. 2）、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルについて各々17 本および 19 本のバンドが検出された（Table 3）。さらに検出範囲を 50 rfu 以上とした場合は、それぞれ 30 本および 33 本、25 rfu 以上とした場合は、それぞれ 48 本および 47 本、20 rfu 以上とした場合では 54 本と 60 本が検出された。それぞれの蛍光強度に見られるバンドについて、100 rfu 以上では 17 本、50 rfu 以上では 33 本、25 rfu 以上では 50 本が双方のサンプルで一致せず、これらは何れもバンドの有無による違いであった。同一の抽出 DNA サンプルを用いながらバンドパターンが大きく異なり、本法によって抽出された DNA は多型解析の鋳型として適さなかった。

3.1.2 DNA 抽出法 2

本手法においては 216.7±81 ng/μl と高濃度の抽出 DNA が得られ、AFLP 分析における鋳

型 DNA として必要な濃度を大きく上回った（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.87±0.018 であり、1.8-2.0 の範囲内であった。A260/A230 の値は 2.93±0.018 と 1.8 を大きく上回る値であった。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 3）、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルについて各々17 本および 19 本のバンドが検出された（Table 3）。検出範囲が 50 rfu 以上の場合は、それぞれ 23 本および 30 本、さらに 25 rfu 以上の場合は 39 本および 50 本、20 rfu 以上の場合は 53 本および 57 本が検出された。それぞれの蛍光強度に見られるバンドについて、100 rfu 以上では 4 本、50 rfu 以上では 8 本、25 rfu 以上では 13 本が 2 つのサンプルで一致せず、これらは一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。さらに 20 rfu 以上では 15 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 3 本はバンドの有無による違いのため、残り 12 本は一方のサンプルのバンドが検出範囲を下回ったために生じていた。本法によって得られた DNA は、抽出法 1 に比べ再現性は著しく改善されたが、蛍光強度の小さいバンドが一致しなかったため、多型解析において高精度な結果を得るためにはより高純度な DNA を得る必要があった。

3.1.3 DNA 抽出法 3

抽出 DNA の濃度は 78.0±13.6 ng/μl であり、AFLP 分析のために必要な最小鋳型 DNA 濃度以上であった（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.63±0.16 であり、1.8-2.0 との間に大きな差はなかった。また、A260/A230 の値は 1.86±0.37 であり、1.8 をわずかながら上回った。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 3）、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルについて各々28 本および 31 本のバンドが検出された（Table 3）。検出範囲が 50 rfu 以上の場合は、それぞれ 41 本および 40 本、さらに 25 rfu 以上の場合は 69 本および 60 本、20 rfu 以上の場合は 89 本および 75 本が検出された。それぞれの蛍光強度に見られるバンドについて、100 rfu 以上では 4 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 1 本はバンドの有無による違いのため、残り 13 本は一方のサンプルのバンドが検出範囲を下回ったために生じていた。50 rfu 以上では 16 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 2 本はバンドの有無による違いのため、14 本は一方のサンプルのバンドが検出範囲を下回ったために生じていた。また、25 rfu 以上では 21 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 5 本はバンドの有無による違いのため、16 本は一方のサンプルのバンドが検出範囲を下回ったために生じていた。20 rfu 以上では 34 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 7 本はバンドの有無による違いのため、27 本は一方のサンプルのバンドが検出範囲を下回ったために生じていた。本法も高い再現性のある結果が得られたが、抽出法 2 と同様の理由で多型解析には適さなかった。

3.1.4 DNA 抽出法 4

この手法における抽出 DNA の濃度は 89.3±12.1 ng/μl であり、先の DNA 抽出法 2 による値に次ぐものであった（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.54±0.128 であり、1.8-2.0 との間に大きな差はなかったものの、A260/A230 の値は 1.67±0.303 と 1.8 を下回っていた。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 3）、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルについて各々32 本および 28 本のバンドが検出された（Table 3）。これらについて、合計 8 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 2 本はバンドの有無による違いのため、6 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。検出範囲が 50 rfu 以上では、それぞれ 22 本および 19 本が検出され、双方で相違の見られる 9 本について、5 本はバンドの有無による違のため、4 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。25 rfu 以上ではそれぞれ 38 本および 36 本が検出された。これらについて、合計 15 本が双方のサンプルで一致せず、そのうちの 5 本はバンドの有無による違いのため、10 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。さらに、20 rfu 以上ではそれぞれ 51 本および 38 本が検出され、双方で相違の見られる 17 本について 12 本はバンドの有無による違いのため、5 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。本法は抽出法 2 を基本とした方法であり、より多くの夾雑物を取り除く方法として結果が期待されたが、再現性に改善は認められなかった。

3.2 事前に多糖類除去処理を伴う DNA 抽出法

3.2.1 DNA 抽出法 5

抽出 DNA の濃度は 2.7±0.002 ng/μl であり、DNA の回収量は極めて少なかったが（270 ng）、AFLP 分析のために必要な最小鋳型 DNA 量（50 ng）を上回っていた（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.33±0.577 であり、1.8-2.0 から大きく離れた。さらに、A260/A230 の値は 0.778±0.385 であり、1.8 を大きく下回っていた。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 4）、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルについて各々6 本および 10 本のバンドが検出された（Table 3）。これらのうち、2 つのサンプル間に違いの見られる 15 本のバンドについて、3 本はバンドの有無による違いのため、12 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。検出範囲が 50 rfu 以上では、それぞれ 7 本および 13 本が検出され、サンプル間に違いの見られる 20 本について 10 本はバンドの有無による違のため、10 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。25 rfu 以上では、それぞれ 12 本および 18 本が検出された。これらについて、サンプル間に違いの見られる 22 本について、18 本はバンドの有無による違いのため、4 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。さらに、20 rfu 以上では、それぞれ 20 本および 16 本が検出され、サンプル間に違いの見られる 27 本について 22 本はバンドの有無による違

いのため、5本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。検出バンドの再現性の低さとDNA回収量の低さから、本抽出法によって得られたDNAは鋳型として適さなかった。

3.2.2 DNA抽出法6

本手法によって抽出されたDNAの濃度は28.0±6.11 ng/μlであり、AFLP分析のために必要な最小鋳型DNA濃度を上回った（Table 2）。

DNA純度についてA260/A280の値は1.53±0.127であり、1.8-2.0との間に大きな差はなかった。さらに、A260/A230の値は1.56±0.148であり、1.8を下回っていた。一方、AFLP分析のフェログラムにおいて（Fig. 4）、バンドの出現数は検出範囲を蛍光強度100 rfu以上とした場合は21本および16本、50 rfu以上とした場合は30本および28本であった（Table 3）。それぞれ2つのサンプルの間で、100 rfu以上では2本、50 rfu以上では4本が一致せず、それらは何れもひとつのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。また、25 rfu以上とした場合、36本および37本、20 rfu以上とした場合、48本および47本であった。このうち、2つのサンプル間において25 rfu以上では5本、20 rfu以上では12 本が一致せず、それらは何れもひとつのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。本法による抽出DNAは抽出法2と同様の理由から分析には適さないが、DNA抽出前の多糖類除去処理は抽出操作を円滑にし、より多くの多糖類を除去できた。

3.2.3 DNA抽出法7

抽出DNAの濃度は68.0±8.08 ng/μlであり、AFLP分析のために必要な最小鋳型DNA濃度以上であった（Table 2）。

DNA純度についてA260/A280の値は1.60±0.039であり、1.8-2.0との間に大きな差はなかった。また、A260/A230の値は2.3±0.377であり、1.8を上回った。一方、AFLP分析のフェログラムにおいて（Fig. 5）、バンドの検出範囲を蛍光強度100 rfu以上とした場合、2つのサンプルについて各々10本および13本、50 rfu以上とした場合、ともに15本であった。このうち、双方のサンプル間において100 rfu以上では2本、50 rfuでは4本が一致せず、それらは何れも一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた（Table 3）。また、25 rfu以上とした場合は19本および23本、20 rfu以上とした場合は25本および28本であった。このうち、双方のサンプル間において25 rfu以上では6本、20 rfu以上では 7 本が一致せず、それらは何れも一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。本法によって得られたDNAは抽出法2から4や6と同様に、蛍光強度が小さいバンドの再現性について問題が改善されなったため、DNA多型解析には適さなかった。

3.2.4 DNA 抽出法 8

抽出 DNA の濃度は 86.0±19.0 ng/μl であり、AFLP 分析に求められる鋳型としての DNA 濃度を上回った（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.70±0.1 であり、1.8-2.0 に近かったものの A260/A230 の値は 1.79±0.121 にとどまった。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 5）、検出されたバンド数は検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上では 12 本および 11 本、50 rfu 以上では 13 本および 16 本であった（Table 3）。それぞれ 2 サンプル間の相違は、100 rfu 以上では 2 本、50 rfu 以上では 3 本のバンドが一致せず、何れもひとつのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。また、25 rfu 以上では 23 本および 24 本、20 rfu 以上では 25 本および 28 本であった。このうち、2 サンプル間の相違は、25 rfu 以上では 9 本、20 rfu 以上では 6 本のバンドが一致せず、前者では 2 本がバンドの有無による違いのため、7 本がサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたため、後者では 2 本がバンドの有無による違いのため、4 本がサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。本法は抽出法 6 や 7 と同様に DNA 抽出前の多糖類除去処理を行ったが、依然として蛍光強度の小さいバンドの問題が改善されなかった。

3.2.5 DNA 抽出法 9

本手法によって得られた DNA の濃度は 10.7±8.33 ng/μl であり、その値は抽出法 5 による抽出物に次いで低かった（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.19±0.17 であり、今回行った 11 通りの方法による抽出物のなかで最も 1.8-2.0 から離れていた。しかし、A260/A230 の値は 1.794±0.121 となり、1.8 よりわずかに小さい値を示したに過ぎない。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 5）、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルについて各々12 本および 15 本のバンドが検出された（Table 3）。これらについて、4 本のバンドは双方のサンプル間で一致せず、そのうちの 1 本はバンドの有無による違いのため、3 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。検出範囲が 50 rfu 以上では、何れも 15 本が検出され、それらの間で相違の見られる 3 本について 2 本はバンドの有無による違いのため、1 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。25 rfu 以上ではそれぞれ 19 本および 20 本が検出された。これらについて、5 本のバンドは双方のサンプル間で一致せず、そのうちの 2 本はバンドの有無による違いのため、3 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。さらに、20 rfu 以上では、それぞれ 25 本および 28 本が検出され、12 本の双方で相違の見られるバンドについて 7 本はバンドの有無による違いのため、5 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。本法は抽出法 1 から 9 にはないタンパク質の除去操作を行ったが、多型解析のための鋳型 DNA 抽出法として適さなかった。

3.2.6 DNA 抽出法 10

抽出 DNA の濃度は 44.7±31.7 ng/μl であり、その値は AFLP 分析のために必要な最小鋳型 DNA 濃度（4ng/μl）を超えた（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.67±0.39 であり、1.8-2.0 よりわずかに低いにすぎなかった。さらに、A260/A230 の値は 2.2±0.289 であり、1.8 を大きく上回った。一方、AFLP 分析のフェログラムにおいて（Fig. 5）、2 つのサンプルに検出されるバンド数は、検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合は 9 本および 10 本、50 rfu 以上とした場合は 13 本および 16 本であった。それぞれの検出範囲では 2 つのサンプル間に違いの見られる 2 本および 4 本のバンドは、何れもバンドの有無による違いのために生じていた（Table 3）。検出範囲を 25 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルではそれぞれ 23 本および 20 本が検出された。これらについて、サンプル間に違いの見られる 8 本について、5 本はバンドの有無による違いのため、3 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。さらに、20 rfu 以上の場合では、それぞれ 27 本および 28 本が検出され、サンプル間に違いの見られる 10 本について 9 本はバンドの有無による違いのため、1 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていたために生じていた。CTAB と SDS を併用することにより多くの夾雑物を除去することが期待されが、分析結果は CTAB のみを用いた方法と比べて大きな改善はが認められなかったため、多型解析のための鋳型 DNA 抽出法として適さなかった。

3.2.7 DNA 抽出法 11

本手法によって得られた DNA の濃度は 70.7±15.4 ng/μl であり、AFLP 分析を行う上で十分な値を示した（Table 2）。

DNA 純度について A260/A280 の値は 1.73±0.026 であり、1.8-2.0 に近かった。さらに、A260/A230 の値は 2.52±0.095 と抽出法 2 による値に次いで大きく、1.8 を大きく上回った。一方、AFLP 分析のエレクトロフェログラムにおいて（Fig. 5）、2 つのサンプルに検出されるバンド数は、検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合は 14 本および 15 本、50 rfu 以上とした場合は 21 本および 22 本、25 rfu とした場合はともに 37 本であった（Table 3）。それぞれの検出範囲では2つのサンプル間に違いの見られる 1 本、2 本および 5 本のバンドは、何れもバンドの有無による違いのために生じていた。検出範囲を 20 rfu 以上とした場合、2 つのサンプルではそれぞれ 41 本および 42 本が検出された。これらについて、サンプル間に違いの見られる 4 について、1 本はバンドの有無による違いのため、3 本は一方のサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。ここでは蛍光強度の検出範囲を低く設定した場合にわずかに一致しないバンドが認められたが、他の抽出法に比べ最も高い再現性のある結果が得られた。

3.3 AFLP 分析において高い再現性が示された鋳型 DNA の純度の再評価

先の 11 通りの抽出法で得られた DNA のなかで、抽出法 11 によるものは吸光度測定による純度、および AFLP 分析の再現性ある結果にもとづく鋳型 DNA としての純度が著しく他に比べて高かった。そこで、3 個体から抽出法 11 によって得た DNA を用いて上述と同様に AFLP 分析を行った（Fig. 6）。

このなかで、バンドの検出範囲を蛍光強度 100 rfu 以上とした場合、3 サンプルについて 35 本、30 本、33 本のバンドが検出された。このうち 7 本がサンプル間で一致せず、何かのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていた。検出範囲を 50 rfu 以上とした場合はそれぞれ 46 本、45 本、45 本が検出された。このうち 7 本がサンプル間で一致せず、これについても何かのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回っていた。また、検出範囲を 25 rfu 以上とした場合はそれぞれ 64 本、58 本、61 本が検出された。このうちサンプル間で一致が見られなかった 11 本のバンドについて、5 本はバンドの有無による違いのため、6 本は何かのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。さらに、検出範囲を 20 rfu 以上とした場合はそれぞれ 74 本、66 本、72 本が検出された。サンプル間で一致しない 11 本のバンドについて、6 本はバンドの有無による違いのため、5 本は何かのサンプルのバンドの蛍光強度が検出範囲を下回ったために生じていた。異なる個体から抽出した場合でも安定した結果が得られたことから、抽出法 11 のコンブ葉体からの高純度 DNA の抽出方法としての有効性が示された。

4. 考察

本研究では、DNA の抽出のために広く利用されている DNA 抽出 Kit を用いた方法（e.g. Ajisaka et al. 2007、Cassano et al. 2012、Kawai et al. 2000、Kurihara et al. 2010）、CTAB を用いた方法（Barnwell et al. 1998、Haque et al. 2004、Murray and Thompson 1980、Wang et al. 2006）や SDS を用いた方法（Dellaporta et al. 1983）、CTAB と SDS を併用した方法（Phillips et al. 2001）を含めた 11 通りの方法によって、多糖類とポリフェノールを多量に含むコンブ葉体から DNA 多型解析に有効な高純度 DNA の抽出を試みた。Kit を用いて抽出された DNA は、AFLP 分析において再現性のある結果が得られず、蛍光強度が 50 rfu 以上のバンド出現の有無に違いが見られた。再現性を損なわせる 1 つの原因として、抽出過程で DNA が物理的に損傷したことが考えられる。今回、利用した Kit では、DNA を抽出後、シリカ膜に吸着させて分離する点が他の抽出法と大きく異なっている。しかし、11 通りの方法によって抽出された DNA は、何れも GENECLEAN II Kit を用いて GLASSMILK（微粒状シリカ）に DNA を吸着させて精製を行っており、抽出法 1 において DNA の物理的な破壊が結果の再現性に影響を及ぼしたとは考えにくい。一方、AFLP 分析において、多糖類などの夾雑物の混入が制限酵素反応や DNA ポリメラーゼ反応を阻害することが知られており（Crowley et al. 2003、Do and Adams 1991、Fang et al. 1992）、このことから、今回、抽出の過程で混入する夾雑物が分析結果に影響を及ぼしたものとも考えられる。一般に、海藻類は組織中にこれらの多糖類

やポリフェノールが含まれ、高純度なDNAを抽出することが難しいだけではなく、多糖類が持つ高粘度によって抽出の操作自体が困難になる（Hong et al. 1997、Kitade et al. 1996、Phillips et al. 2001、Shivji et al. 1992）。なかでもコンブ科植物については、これらの物質を多量に含むため、高純度なDNAを抽出することが困難とされており（Yi et al. 2010）、抽出DNAの制限酵素処理がうまく進まないケースも多いことから抽出の際の夾雑物の混入が少なくないことが推察される（Shivji et al. 1992）。今回の結果から、使用したKitでは*S. japonica*から有効的に夾雑物を除去することは困難であったと思われる。DNA抽出Kitは、短時間かつ簡便にDNAを抽出することが可能で、海藻類でも広く利用されている。海藻類のAFLP分析について、アマノリ類やアオサ類を扱った研究ではKitの利用が少なからずあるが（Liu et al. 2011、Niwa et al. 2004、Yi et al. 2010）、他の海藻類では多くはない（Coyer et al. 2011、Donaldson et al. 1998、2000、Erting et al. 2004、Kusumo amd Druehl 2000、Ludington et al. 2004、Shan et al. 2009、2011）。本研究の材料である*S. japonica*についてKitのプロトコルを改変することによってAFLP分析において再現性の高い結果が得られた報告もあるが、その場合でも大盤ゲルの泳動像には不鮮明なバンドが多数見られている（Yi et al. 2010）。確かにKitは材料や目的によっては有効なツールであるが、付属の試薬の組成が明らかにされていないことからも夾雑物を除去するための改変は容易ではなく、本研究の目的を果たすために有用とは言えない。

夾雑物除去をともなうDNAの抽出法として、先ずはCTABを用いた抽出法2が挙げられる。この抽出法によって得られたDNAは、A260/A280の値から純度の高いものであった。CTABは高濃度の塩が存在する場合、多糖類を水層に留めて核酸だけを選択的に沈殿させることができることから、多糖類を多量に含む生物を材料にしたDNA抽出で広く利用されている（e.g. Barnwell et al. 1998、Ghosh et al. 2009、Jana et al. 2010）。DNA抽出法2は抽出法1に比べてAFLP分析においてより高い再現性が得られたことから、*S. japonica*では多糖類の混入が分析において大きく影響を及ぼしていることが示唆される。Shan et al.（2009、2011）はこの方法によって抽出された本種のDNAを用い、AFLP分析において成果を挙げている。しかし、これらの研究ではSelective PCRによって増幅された断片は大盤ゲルに泳動されたのち肉眼で観察されており、不明瞭なバンドは除外されている。今回、抽出法2によって得られたDNAは、エレクトロフェログラムにおいてサンプル間で蛍光強度が小さいバンドの有無に違いが見られた。従って、大盤ゲルよりも客観的かつバンドの検出感度が高いキャピラリーシークエンサーを用いた分析では、さらなる夾雑物の除去が必要と考えられる。

濃度の異なる2種類のCTAB bufferを用いた抽出法3は、抽出法2に比べて多糖類の除去に有用であると期待される。しかし、この方法によって抽出されたDNAはAFLP分析で再現性の高い結果が得られたものの、抽出法2と同様にサンプル間で蛍光強度が小さいバンドの有無や、一方の蛍光強度が検出範囲を下回ことによるバンド出現の違いが見られた。従って、未だ多糖類の除去が不十分である可能性が残るとともに、多糖類とは異なる夾雑物の影響が示唆される。

先述の通り、コンブ類は多糖類のみならずポリフェノール類が多量に含まれている。ポリフェノールは内因性酵素活性によってキノン化合物に変化し、その強い酸化作用がDNAを損傷させる（Loomis 1974）。ポリフェノールの除去には、多くの場合、PVPが用いられている（e.g. Bharmauria et al. 2010、Biss et al. 2003、Brunner et al. 2001、Dempster et al. 1999、Kejani et al. 2010、Khanuja et al. 1999、Porebski et al. 1997）。そこで、PVP処理を伴い、多糖類およびポリフェノールの高い除去効果が見込まれるPlant RNA isolation aidを添加する抽出法4は成果が期待される。しかし、得られたエレクトロフェログラムにおいて、抽出法2や3の結果に比べて進展はなく、サンプル間で一致しないバンドの数はむしろ増加した。従って、この結果と抽出法2と3の結果を受けて、更なる多糖類の除去が必要と推察された。

今回扱った*S. japonica*では、組織内のみならずサンプル表面に多量の多糖類が付着している。これら多糖類は抽出過程で溶液に粘性を与え、溶液の混合や撹拌の操作を妨げるため（Crowley et al. 2003）、抽出前に粘度の高い多糖類を除去することが求められる。そこで、アルギン酸抽出の際に用いられるアルカリソーダ法を伴う抽出法5は、組織中のアルギン酸が水溶性のナトリウム塩となり、組織外に流出することから多糖類による分析結果への影響を軽減させることが期待される。しかし、抽出法2、3、4で見られたような蛍光強度の小さいバンドの違いではなく、極めて強度の大きいバンドに多数の違いが生じていた。これは、長時間の酸処理と炭酸ナトリウム溶液処理によってDNAが破壊されたことによると考えられる。さらに、抽出の際、DNAの回収量が他の方法に比べて少なかったこともふまえ、本手法とは異なる抽出法が求められる。

サンプル表面に付着する多糖類をDNA抽出前に洗い流すことは、抽出過程で溶液の粘度が高まることを防ぐことができる。抽出法6、7、8は、それぞれ抽出法2、3、4に蒸留水を用いて多糖類を洗浄する操作を加えたものである。ところで、水に不溶性の多糖類は高温のお湯に長時間浸漬することによって組織外に溶出していくことが報告されている（佐藤ら 1980）。また、ワカメについて、組織中から溶出する成分は煮沸する温度によって組成が変化することも知られている（山中・小川 2000）。今回、抽出法6、7、8で行った蒸留水中での1時間のインキュベートと、2通りの異なる温度の蒸留水中（室温の蒸留水と65℃の蒸留水）での激しい撹拌は、水溶性のフコイダンのみならずアルギン酸等の不溶性の多糖類の除去にも働くと考えられる。分析の結果、これらは何れも再現性の高い結果が得られた。しかし、抽出法2、3、4と同様に、サンプル間で蛍光強度が小さいバンドの有無による違いが見られた。ただし、洗浄作業における溶液の粘性からみて、これらの方法では相当量の多糖類が組織内外から除去できていると思われる。従って、AFLPにおいてより高い再現性を得るためには多糖類やポリフェノールとは異なる夾雑物を取り除く必要があると考えられる。なお、抽出法6において、蒸留水の代わりに海水で組織を洗浄した場合、エレクトロフェログラムにサンプル間で一致しないバンドが著しく増加し、バンドパターンは大きく異なった（Fig.7）。これは海水中に含まれる種々の金属イオンによって

DNAaseが活性化され、DNAを分解したことが推察される。一般にDNaseはMg^{2+}の存在下で活性化することが知られていることから（Adams et al. 1999）、EDTAをキレート剤として添加し、Mg^{2+}を捕集することによってDNaseの活性化を妨げる。しかし、単一の生物が数種類のDNaseを持つことが報告されており、例えば*Oryza sative*では異なる金属イオンによって活性化される13種類のDNAaseの存在が確かめられている（Sodmeigen et al. 1991）。そのため、多種類の金属イオンが多量に含まれる海水中での洗浄は、EDTAのキレート効果を上回り、捕集されなかった金属イオンによって複数のDNaseの活性が高まり、DNAの分解が助長されたことが示唆された。

多糖類やポリフェノールと同様に抽出DNAの純度を低下させる夾雑物としてタンパク質が挙げられる。特に正電荷を持つタンパク質はDNAに吸着し、ポリメラーゼ反応を阻害する。SDSはCTABと同様にDNA抽出のために一般に用いられる陰性界面活性剤である。SDSは細胞膜の破壊とタンパク質の変性効果を持ち、高濃度の酢酸カリウム存在下で、タンパク質と多糖類を沈殿させることができる（Dellaporta et al. 1983、Niu et al. 2008）。今回、このSDSを用いた抽出法9によって得られたDNAを用いた場合、エレクトロフェログラムにおいて、サンプル間で一致しないバンドが多数出現したが、A260/A280の値からも多数の夾雑物が混入したことが原因であると考えられる。これはSDSがRNaseを阻害するため、RNaseをDNA抽出後に添加したことが影響をしていると推察できる。従って、抽出法6にある蒸留水を用いた多糖類の除去とSDSの除去効果だけでは夾雑物を目的に沿って除去することは難しい。

SDSとCTABをともに用いた抽出法10では、吸光度の値から抽出法9に比べて高純度なDNAを抽出することができた。これは、CTABによって多糖類除去効率が高まったためであると考えらえる。しかし、得られたエレクトロフェログラムでは、抽出法6、7、8の結果よりも多数の一致しないバンドが見られた。これは、陰性界面活性剤であるSDSと陽性界面活性剤であるCTABが溶液中に共存するため、互いの相反する性質によってこれらが析出したためにextraction bufferが常に不均一な状態となり（Tah et al. 2011）、添加されたCTABやSDSの溶液中濃度が低下したことで個々の界面活性剤が持つ多糖類やタンパク質の除去効率などの特性が失われたためであると考えられる。また、SDSが用いられているために抽出過程でRNAを分解しきれず、残存したRNAがPCRにおいてプライマーとして鋳型DNAに結合したことから（Pikkart and Villeponteau 1993、Yoon and Glawe 1993）、目的としない領域が増幅されたことも再現性に影響を及ぼしていると思われる。

抽出法10で考えられる問題点を改善するために行った抽出法11は、他の方法に比べてエレクトロフェログラムに見られる一致しないバンド数が著しく少なく、バンドの蛍光強度の検出範囲を20 rfu以上とした場合でも一致しないバンド数はほとんど増加せず、何れのサイズのバンドも一致していた。Erting et al.（2004）は今回と同様に、単一のDNA抽出液サンプルを用いてAFLP分析によるバンド出現の再現性を調べている。そのなかでは増幅された産物のなかで一致しない蛍光強度の小さいバンドが現れることを報告しており、サン

プル表面の付着生物由来のDNAがコンタミする可能性について言及している。しかし今回、異なるサンプル間のエレクトロフェログラムの比較において、およそ20 rfuの蛍光強度の小さいピークについても一致することが確かめられたことから、これまでに述べてきた通り、それらの増幅断片の有無は多糖類の混入による増幅反応阻害である可能性が高いと考えられる。抽出法11ではSDSとCTABを段階的に分けて用いることで、これらの海面活性剤が析出してしまう問題の解決を試みている。このなかでは、先ずはSDSによってDNAの抽出と多糖類・タンパク質の除去を行い、次いでCTABを用いて残存する多糖類の除去を行った。なお、SDSを用いた方法の後にDNAを再び溶解させる際に、RNaseを加えることで効果的にRNAを分解することができる。この方法では、抽出前の洗浄、SDS処理とCTAB処理による異なる3段階の作業によって多糖類の除去が行われるため、ポリメラーゼ反応にほとんど影響が見られない程度まで多糖類を除去することができると考えられる。ところで、SDS、CTABの順番で抽出を行うのは、タンパク質の変性作用を持つSDSの存在下では、taq polymerase反応が阻害されるため（Gelfand 1989、Goldenberger et al. 1995）、DNA抽出液へのSDSの残存を防ぐためである。さらに、SDSを用いる方法（Dellaporta et al. 1983, Weising et al. 2005）とCTABを用いる方法（Shan et al. 2009）では、何れも抽出液中に高濃度の塩化ナトリウムが含まれており、それによってDNAを沈殿させる際に多糖類の共沈を防ぐことができると推察される（Crowley et al. 2003）。また、アルギン酸などの高分子電解質の粘度は塩化ナトリウム濃度の上昇に伴って低下することも報告されており（山中・小川 2000）、同物質はDNA抽出の際に溶液の粘度が高まることを防ぐためにも役立つと思われる。ところで、先述の通りDNA抽出ではポリフェノールの存在も無視できないが、これについては抽出液中に含まれるPVPによってポリフェノールを除去することが可能である。さらに、今回の方法のなかで使用した2-メルカプトエタノールは、ポリフェノールに由来するキノン化合物の酸化作用を阻害する（e.g. Bharmauria et al. 2010、Biss et al. 2003、Brunner et al. 2001、Dempster et al. 1999、Kejani et al. 2010、Khanuja et al. 1999、Porebski et al. 1997）。

今回、*S. japonica*の葉体からDNAの抽出を試みた11通りの方法のなかで、多糖類の除去に重点を置いた抽出法11において抽出DNAを用いたAFLP分析で最も高い再現性が得られた。粘質多糖類を多量に含む生物を材料にしたDNA多型解析はこれまでのところ結果の再現性の低さからその知見は乏しかった。今回確立されたDNA抽出法を広く展開することにより、この分野の研究が進展することが期待される。

ところで、今回試した何れの方法においても抽出のあとにGENEKLEAN II Kitを用いたDNA精製を行っている。本研究のなかで予備的に精製を行わないでAFLP分析を行ったところ、検出されるDNA断片数が著しく減少することが少なくなかった。従って、この精製作業はDNA抽出時に除去しきれなかった多糖類やポリフェノールなどの夾雑物の除去に有効であると思われる。しかし、このKitは主にPCR産物の精製のために用いられるものであるため、添付書に示されたDNAの回収率を大きく下回り、多くの場合、およそ50%の

DNA が失われた。今回、AFLP 分析では、50 ng の DNA を用いたが、0.1-0.5 ng の微量サンプルでも再現性の高い結果が報告されていることから（Rosendahl & Taylor 1997）、わずかな鋳型 DNA 量でも分析を行うことができれば、GENECLEAN II Kit は極めて有効な精製方法であると考えられる。

第 2 章　*Saccharina japonica* の個体群間の遺伝子構造の解明

1. 緒言

AFLP 分析は二種類の制限酵素で分解した DNA に既知配列を持ったアダプターを結合させ、選択的に増幅した DNA 断片の有無によって多型を検出する方法であり、ゲノム情報が乏しい生物についても解析可能である（Vos et al. 1995）。北海道沿岸の *S. japonica* については、RAPD 分析によって変種間の遺伝的変異が検出されている（Yotsukura et al. 2001）。しかし、RAPD は解析に有用な客観的情報に乏しく、本種の個体群レベルの遺伝的変異を検出することは難しい。ところで、中国沿岸の *S. japonica* について、Shan et al.（2011）は AFLP 分析を行い、野生の個体間で多数の多型を検出するとともに産地特有のバンドを見出している。また、Kusumo and Druehl（2000）は *Alaria marginata* Postels & Ruprecht について同様の解析を行うことにより個体群間の変異を報告している。これらのことから、AFLP 分析は *S. japonica* について、変種の枠を超えた個体群間の遺伝的差異を明らかにすることができると期待される。

本章では、北海道沿岸およびその周辺域に生育する *S. japonica* について、AFLP 分析によって遺伝的多様性を示す種々の指数を求め、地域個体群の遺伝子構造を推定した。また、AFLP 分析の結果、遺伝的類似度が著しく低い個体群については、その変異がいかなる分類階級の違いに相当するかを評価するため、塩基配列比較に基づく分子系統解析を行った。

2. 材料と方法

2.1 材料

材料の *Saccharina japonica* 胞子体は、北海道沿岸 48 地点、青森県沿岸 11 地点、岩手県沿岸 1 地点、ロシアサハリン島南部沿岸 2 地点において採集した（Table 1、Fig. 1）。多数の個体が密生している生育場所ではそこから複数の個体を採取することはせず、周辺域からバランスよく採集した。なお、産地内の遺伝子構造を把握するため、忍路湾では 7 地点（群落）から各 5 個体ずつの胞子体を採集し、分析を行った。AFLP 分析に続く分子系統解析には、AFLP 分析の結果において遺伝的類似度が著しく低かった個体を用いた。

2.2 方法

採取した胞子体葉状部は、第 1 章のなかで示した方法で洗浄、保存し、続く実験に供した。

2.2.1 AFLP 解析

AFLP 分析に用いる鋳型 DNA として、第 1 章の抽出法 11 によって得た DNA を GENECLEAN II Kit で精製し、20 ng/μl の濃度に調整したものを用いた。分析は、Vos et al.（1995）と Shan et al.（2009）にある方法を参考にして以下の通り行った。制限酵素反応に

よって生じたDNA断片の末端に結合させるアダプターには、95℃で10分、22℃で10分間インキュベートした *Mse*I adaptor と *Eco*RI adaptor（AFLP Ligation and Preselective Amplification Module付属品）（Applied Biosystems）を使用した。制限酵素反応とアダプターライゲーションは、2.5 µlのDNA抽出液（20 ng/µl）に酵素混合液［10×T4 buffer DNA Ligase（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社、東京）、0.05M NaCl、0.1 mg/ml BSA（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社）、2.5 U/µl *Mse*I（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社）、9 U/µl *Eco*RI（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社）、70 U/µl T4 DNA Ligase（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社）］を8.5 µl、*Mse*I adaptorを1 µl、*Eco*RI adaptor を1 µl加え、37℃で14時間インキュベートした。反応液は、65℃で20分間、22℃で20分間インキュベートした後、0.1 TE bufferで10-20倍に希釈した。

Preselective PCRとそれに続くSelective PCRは、AFLP Plant Mapping Protocol（Applied Biosystems）に従って行い、後者については5種類のselectiveプライマーペア：*Eco*RI ACA-*Mse*I CAG、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTT（Selective Amplification Start-Up Kit for Regular Plant Genomes、500-6,000 Mb付属）（Applied Biosystems）を使用した。Selective PCR産物は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて泳動を行い、Gene Mapper ver.4.1（Applied Biosystems）によって各断片のサイジングおよびタイピングを行った。なお、バンドの検出範囲は20 rfu以上に設定し、検出された60 bpより大きなサイズの断片の有無を比較した。

遺伝的多様性を示すパラメーターのうち、遺伝的類似度（*S*）はDice（1945）、遺伝的多様度（*H*）はNei（1987）に従って算出し、遺伝的分化係数（*Gst*）の算出と、個体群間の遺伝的分化の評価するためのAMOVA分析はArlequin 3.11（Excoffier et al. 2005）を用いて行った。また、対立遺伝子座に基づく遺伝構造はSTRUCTURE ver. 2.4.3（Pritchard et al. 2000）を用いて推定し、各クラスターの*Fst*値を算出した。STRUCTUREによる解析はBurn-inを100,000、MCMCのシミュレーションを1,000,000に設定した。最適な集団数（*K*）は、*K*の尤度比較とΔK（Evanno et al. 2005）から推定し、ΔKはSTRUCTURE HARVESTER web v0.6.93（Earl and von Holdt 2012）によって算出した。

2.2.2 分子系統解析

核ゲノム中のITS1とITS2、葉緑体ゲノムのRuBisCO大サブユニット（rbcL）とRuBisCO小サブユニット（rbcS）の遺伝子間領域（rbc-sp）、さらにミトコンドリアゲノムのシトクロームオキシダーゼI遺伝子領域（COI）、についての塩基配列を決定し、比較した。PCRの反応液組成はAmpliTaq Gold 360 Mastermix（Applied Biosystems）を12.5 µl、GC Enhancer（Applied Biosystems）を1.0 µl、Forward PrimeとReverse Promerをそれぞれ25 µM（片山ら2006、Lane et al. 2007）（Table 4）、DNA抽出液を1 µl、そして純水で全量を25 µlとなるよ

うに調整した。PCR には GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を用い、反応条件は 95℃で 10 分間処理した後、熱変性を 95℃で 30 秒間、アニーリングをプライマーの Tm 値で 30 秒間、伸長反応を 72℃で 1 分間、この増幅反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。PCR 産物はミニサブマリン電気泳動装置 BE-560（株式会社バイオクラフト、東京）を用い、1.2% Agarose L03「TAKARA」（タカラバイオ株式会社、大津）（以下、アガロースゲル）に電気泳動して増幅を確認した。その後、PCR 産物は Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit（GE Healthcare、Piscataway、NJ）を用い、添付されているプロトコルに従って精製した。Cycle sequence 反応は、ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いたが、反応液の組成は、BigDye terminator を 0.5 μl、BigDye terminator 5×Sequence buffer を 3.0 μl、Forward Prime（または Reverse Primer）を 10 μM、精製した PCR 産物を 2 μl、そして精製水で全量を 10 μl となるように調整した。Cycle sequence の反応条件およびその産物の精製は付属のプロトコルに従い、サンプルは ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）によって電気泳動後、Sequence Analysis ver. 5.4（Applied Biosystems）を用いて配列を決定した。塩基配列のアライメントは MEGA 5（Tamura et al 2011）で行った。分子系統樹は、DDBJ に登録された塩基配列の情報を加え（Tabale 5）、PAUP4.0b10（Swofford 2002）を用いて近隣結合法、および最尤法によって構築した。最尤法における最適なモデルの選択には MrModeltest2.3（Nylander 2004）を用い、ITS1 と COI はは階層的尤度比較検定から K80+G と GTR+G、ITS2 と rbc-sp は赤池情報量基準から HKY+I+G と HKYI+G を設定し、初期系統樹は近隣結合法で構築し、次いで発見探索法によって最尤系統樹の探索を行った。なお、系統樹における各枝の再現性は、2000 の疑似データセットから算出したブートストラップ値から推定した。作製した系統樹は TreeView v. 1.6.6（Page 1996）で編集した。一方、ベイズ系統樹は、最尤法で選択されたモデルを設定し、MrBayes 3.2（Ronquist et al. 2011）を用いて構築した。なお、COI 遺伝子領域はパーティションを第 1、第 2、第 3 コドンをパーティションに設定した。今回、解析は 2,000,000 世代について、100 世代ごとにサンプリングを行い、ASDAF（Average standard deviation of split frequencies）が 0 に収束（<0.01）してから十分な世代数が経過していることを確認したうえで、最初の 1,500,000 サンプルの樹形を burn-in として扱い,最後の 500,000 サンプルの樹形を用いて事後確率を算出した。

3. 結果

3.1 AFLP 分析

AFLP 分析の結果、標津、婦羅理の個体は何れの産地とも遺伝的類似度が低く、その値は異種と比較した際の遺伝的類似度に相当した。同様に、住吉の 1 個体、温根元の 1 個体、愛冠の 1 個体も他産地の個体との間で遺伝的類似度が著しく低かったため、これらは解析データから除外した。

今回分析を行った材料について、Selective PCR によって増幅された断片数は、プライマ

一ペアとして *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG を用いた場合ではサイズの異なる 528、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT では 478、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA では 421、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG では 595、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC では 488 であった。なお、すべての産地に共通して見られる断片はなかった。断片数をもとに計算されたすべての産地についての遺伝的類似度（*S*）は、産地内では 0.53 から 0.82（0.71±0.07）であり、産地間では 0.29 から 0.75（0.46±0.08）であった（Table 7）。また、遺伝的多様度（*H*）は 0.149±0.031 であり（Table 6）、遺伝的分化係数（*Gst*）は-0.01 から 0.71（Table 8）であった。STRUCTURE 解析の結果、得られた ΔK の値から 2 つのクラスターの存在が支持された（Fig.8）。これらのなかで、青森県の泊、猿ヶ森、尻労、尻屋、木野部、下手浜、磯谷、長後、平舘、今別、岩手県の釜石、北海道の中野川、小谷石、塩釜、川白、大浜、黄金岬、温根元、友知では *Fst* 値に基づく祖先的なクラスターが優先した。青森県の三厩、北海道の日向、貝取間、島牧村港、忍路湾、濃昼、浜益、暑寒海岸町、力昼、鬼脇、沓形、新湊、鴛泊、香深、雄武、本町、二ツ岩、岬町、バラ島、温根元、友知、友知漁港、厚岸湖、サハリン南部のアニワ湾、ボグダノビッチは他方の派生的なクラスターが優先した。なお、鵜苫、有珠、礼文華、静狩、大船、安浦、臼尻、尾札部、木直、住吉、宝来、大岬、ウトロでは双方のクラスターが混成した。

既存の 4 変種について、Selective PCR によって増幅された断片数は、上記 5 組のプライマーペアを用いたところそれぞれ *S. japonica* var. *japonica* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 265、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 212、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 226、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 360、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 278、*S. japonica* var. *religiosa* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 301、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 286、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 264、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 403、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 310、*S. japonica* var. *ochotensis* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 178、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 224、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 183、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 300、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 221、*S. japonica* var. *diabolica* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 240、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 189、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 184、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 282、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 248 であった。また、それぞれの個体に共通する断片数は、*S. japonica* var. *japonica* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 1、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 0、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 1、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 0、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 0、*S. japonica* var. *religiosa* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 1、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 0、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 0、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 0、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 0、*S. japonica* var. *ochotensis* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 4、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 2、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 3、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 9、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 3、*S. japonica* var. *diabolica* では *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG で 2、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT で 1、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA で 0、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG で 1、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC で 0、であった。これをもとに計算された遺伝的類似度（*S*）は、変種内では 0.53±0.04 であり、変種間では 0.44±0.02 であった。変種内の類似度は、*S. japonica* var. *japonica* でついては 0.53±0.1、*S. japonica* var. *religiosa* については 0.47±0.12、*S. japonica* var. *ochotensis* については 0.57±0.1、*S. japonica* var. *diabolica* については 0.55±0.12 であった。一

方、それぞれの変種間の遺伝的類似度(*S*)は*S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *religiosa* では 0.46±0.08、*S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *ochotensis* では 0.45±0.06、*S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *diabolica* では 0.42±0.05、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *ochotensis* では 0.44±0.06、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *diabolica* では 0.40±0.05、*S. japonica* var. *ochotensis* と *S. japonica* var. *diabolica* では 0.45±0.05 であった。なお、分布域が接する変種間の類似度は 0.45±0.01 と概ね高くなる傾向が見られたが、*S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *ochotesis* では分布域は接しないにも関わらず高い類似度を示した。ところで、*S. japonica* var. *religiosa* 内の遺伝的類似度と、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *japonica* の間、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *ochotensis* の間の類似度に顕著な違いは認められなかった。また、それぞれの変種についての遺伝的多様度（*H*）は、*S. japonica* var. *japonica* では 0.68±0.013、*S. japonica* var. *religiosa* では 0.075±0.013、*S. japonica* var. *ochotensis* では 0.052±0.011、*S. japonica* var. *diabolica* では 0.059±0.022 であり、遺伝的分化係数（*Gst*）は *S. japonica* var. *japonica* では 0.27±0.113、*S. japonica* var. *religiosa* では 0.4±0.077、*S. japonica* var. *ochotensis* では 0.43±0.108、*S. japonica* var. *diabolica* では 0.51±0.093 であった。さらに、それぞれの変種間の *Fst* 値は *S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *religiosa* では 0.41±0.075、*S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *ochotensis* では 0.51±0.053、*S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *diabolica* では 0.53±0.062、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *ochotensis* では 0.047±0.092、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *diabolica* では 0.052±0.072、*S. japonica* var. *ochotensis* と *S. japonica* var. *diabolica* では 0.55±0.056 であった。この *Fst* 値は、*S. japonica* var. *japonica* を除いた何れの変種内においても高く、その値は変種間の値と同程度であった。さらに、変種ごとに STRUCTURE 解析を行った結果、それぞれの変種内の遺伝子組成について、*S. japonica* var. *japonica* では 2 つのクラスターの存在が支持され（Fig.9）、*Fst* 値から鵜苫、有珠、礼文華、静狩、中ノ川、小谷石、塩釜の個体に優先するクラスターが祖先的で、チャラツナイ、大船、安浦、臼尻、尾札部、木直、住吉、日向の個体に優先するクラスターが派生的であった。また、*S. japonica* var. *religiosa* では、2 つのクラスターの存在が支持され（Fig.10）、三厩を除く青森県沿岸や釜石の個体では一方のクラスターが優先するが、三厩と北海道日本海沿岸部では他方のクラスターが混成する個体が見られ、忍路ではこのクラスターが優先していた。大浜や川白では青森県沿岸や釜石と同じクラスターが優先していた。これら 2 つのクラスターについて、*Fst* 値から青森県沿岸や釜石で優先するクラスターが祖先的で、日本海側の個体に混成が見られるクラスターは派生的であった。*S. japonica* var. *ochotensis* では、2 つのクラスターの存在が支持された（Fig.11）。このうち、ほとんどの産地の個体は一方の祖先的なクラスターが優先したが、暑寒海岸町や黄金岬に限ってはもう一方の派生的なクラスターが混成、あるいは優先していた。同様に、*S. japonica* var. *diabolica* でも、2 つのクラスターの存在が支持された（Fig.12）。このうち、温根元、友知、落石、愛冠、大黒島の個体に優先するクラスターは祖先的であり、岬町、バラ島、友知漁港、厚岸湖の個

体に優するクラスターは派生的であった。これらについて、何れの産地も 2 つのクラスターが混成することはなく、明確な遺伝的分化が見られた。

今回調査した全 62 産地について、Selective PCR によって増幅された断片数は上記 5 組のプライマーペアを用いたところ、それぞれの産地で *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG を用いた場合は 27 から 84、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT では 31 から 94、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA では 24 から 80、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG では 130 から、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC では 34 から 96 であった (Table 5) 。また、それぞれの産地の個体に共通する断片の数は、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAG を用いた場合は 9 から 38、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT では 8 から 52、 *Eco*RI AAG-*Mse*I CTA では 6 から 42、 *Eco*RI AAG-*Mse*I CTG では 14 から 79、 *Eco*RI AAC-*Mse*I CTC では 9 から 44 であった。一般に、産地間の遺伝的類似度は近接する産地間で高く、そこから離れた産地になるほど低くなる傾向が見られた (Table 7)。しかし、尾札部、日向、川白、大浜、黄金岬はこれに従わず、遠方の産地との間で遺伝的類似度が高かった。これらの 5 つの局所個体群について、尾札部は、周辺の産地と比べ津軽海峡沿岸に位置する産地との類似度がわずかに高かった。日向は北海道日本沿岸の濃昼以北の産地と類似度が高かった。また、川白と大浜は互いの類似度は高いものの、これら産地に近い島牧村港や忍路との類似度が低く、今別以東の津軽海峡沿岸から鵜苫以西の太平洋沿岸の産地との間で類似度が高かった。黄金岬は猿ヶ森を除いた青森県沿岸および釜石、北海道沿岸の鵜苫、有珠、礼文華、静狩との間で類似度が高かった。それぞれの産地の遺伝的多様度 (*H*) は 0.038 から 0.116 (0.064±0.016) であり、産地間の遺伝的分化係数 (*Gst*) は-0.01 から 0.71 であった (Table 8)。AMOVA では、近接する地点間を除く、ほとんどの産地間で有意な差が示された。

忍路湾の 7 地点から採取した 35 個体について、Selective PCR によって増幅された断片数は、上記 5 組のプライマーペアを用いたところ、それぞれの地点で *Eco*RI ACA-*Mse*I CAG では 27 から 46、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT では 31 から 53、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA では 30 から 58、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG では 75 から 107、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC では 41 から 72 であった。また、それぞれの地点の個体に共通する断片の数は、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAG を用いた場合は 13 か 22、*Eco*RI ACA-*Mse*I CAT では 11 から 17、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTA では 10 から 20、*Eco*RI AAG-*Mse*I CTG では 24 から 60、*Eco*RI AAC-*Mse*I CTC では 12 から 22 であった。地点内の遺伝的類似度 (*S*) は 0.6±0.02 (0.56±0.06 から 0.64±0.04) であり、地点間の遺伝的類似度は 0.58±0.18 であった (Table 6)。7 地点において、遺伝的類似度は距離が最も離れた湾口部と湾奥部の間で低く、遺伝的多様度 (*H*) は湾奥部で低かった。遺伝的分化係数 (*Gst*) は-0.01 から 0.13 であり、湾口に近い 5 地点 (Fig.1 地点 1 から地点 5) と湾奥部 (Fig.1 地点 6、地点 7) との間にわずかな遺伝的分化が見られた。STRUCTURE 解析の結果、2 つのクラスターの存在が支持され、それぞれのクラスターの *Fst* 値には顕著な差が見られ、何れの個体も派生的なクラスターが優先した (Fig.13)。地点間の遺伝子組成に明瞭な違いは見られなかったが、AMOVA 解析の結果、地点 1 と地点 7、地点 2 と地点 6、地点 2 と地点 7、地点 3 と地点 7、地点 5 と地点 7 では、何れのプライマーペアを用いた場合も有意な差が示された。

3.2 分子系統解析

AFLP 分析の結果を受けて遺伝的類似度が低かった住吉（1 個体）、標津（1 個体）、温根元（1 個体）、婦羅理（2 個体）、愛冠（1 個体）について、ITS1 の全塩基配列 247-245bp、ITS2 の全塩基配列 258-262bp、rbc-sp の全塩基配列 207-283 bp、COI 領域の部分配列 576bp が決定された。住吉の rbc-sp、ITS2、COI は、それぞれ *S. japonica* で報告されている配列と一致した（rbcsp: GenBank Acss No.AB318979、ITS2: GenBank Acss No.AY582117、COI: GenBank Acss No.AP011496）。この ITS1 は、*Saccharina* sp.（GU288529）の配列と最も相同性が高かったが、1 塩基の置換が見られた。愛冠の rbc-sp と ITS1 の配列は、BLAST 検索の結果 *S. cichorioides*（rbcsp: GenBank Acss No.AB480850、ITS1: GenBank Acss No.AB022805）と一致した。この ITS2 の配列は、*S. cichorioides*（GenBank Acss No.GU097876）のものと最も相同性が高かったが、1 塩基の置換が見られた。また、この COI の部分配列は、*S. latissima* のものと最も相同性が高かったが、2 塩基の置換が見られた（GenBank Acss No.GU097819）。標津の rbc-sp と ITS2 の配列は *S. cichorioides*（GenBank Acss No.AB480849）と一致した。しかし、この ITS1 の配列は、*S. latissima* のものと最も相同性が高かったが、1 塩基の挿入・欠損が見られた（GenBank Acss No.FJ042746）。また、この COI の部分配列にも双方の間で 1 塩基の置換が検出された（GenBank Acss No.GU097819）。温根元の rbc-sp の配列は *S. cichorioides*（GenBank Acss No.AB480849）と相同性が最も高く、1 塩基の置換が見られた。また、双方の間で ITS1 の配列には 5 塩基の置換が見られた（GenBank Acss No. FJ042746）が、ITS2 の配列は一致した（GenBank Acss No.GU097876）。さらに、COI の部分配列は双方の間で 1 塩基の置換が見られた（GenBank Acss No.GU097819）。婦羅理の 2 個体の rbc-sp の配列は *S. cichorioides*（GenBank Acss No.AB480849）と一致した。しかし、この ITS1 の配列は最も相同性が高かった *S. cichorioides*（GenBank Acss No. FJ042746）との間に 1 塩基または 2 塩基の置換が見られた。また、この ITS2 の配列も 2 個体で異なり、一方の個体は *S. cichorioides*（GenBank Acss No.GU097876）の配列と相同性が最も高く、双方で 2 塩基の置換が見られた。もう一方の個体は、*S. kurilensis*（GenBank Acss No.AF319022）の配列と相同性が高く、3 塩基の置換が見られた。また、この COI の部分配列は一通りに決まり、*S. latissima*（GenBank Acss No.GU097819）と相同性が最も高く、1 塩基の置換が検出された。

以上 4 領域の配列をもとに系統解析を行った結果、ITS2 の塩基配列もとに構築した 3 種の系統樹のそれぞれについて、異なる分岐関係が支持されたため、これによって得られた系統樹は棄却した。他の 3 領域の塩基配列をもとに構築したいずれの系統樹でにおいても、標津、婦羅理、温根元の個体は *S. coriacea*、*S. cichorioides* や *S .latissim* を含めて一つのクレードを形成するか、*S. cichorioides* や *S. latissima* と姉妹群になった（Figs.14-16）。これらの結果から、ここで用いた個体はそれぞれ *S. coriacea*、*S. latissima*、*S. kurilensis* と近縁な独立種であると見なされた。

4. 考察

AFLP 分析は、生育環境の変化に伴って分断された集団間の遺伝的変異を検出きることから、*S. japonica* についても地域個体群を理解するための有効な手段である。これまで、コンブについては、*Alaria marginata.* で群落レベルの変異が検出されている（Kusumo and Druehl 2000)。今回、忍路湾内の 7 地点の群落から採集した個体は 2 つのクラスターに分けられた。忍路湾内では湾口部と湾奥部に本種の局所的な群落が見られることが報告されている（八木 1997)。しかし、これらの生育場所に関していくつかの環境調査が行われているものの（e.g. 中多ら 2001）、湾内の海水流動について詳細な知見はない。ただし、4 月から 5 月の雪解けの時期には湾口部近くでも塩分が著しく低下することから（八木 1997）、湾内外の海水の交換率は高くないことが示唆される。更に、本種を含めコンブ類の胞子の拡散距離は大して大きくはないことを考慮して（秋野ら 2005、Coyer et al. 1997）、湾口部と湾奥部で遺伝的差異が見られたのは湾内の流動関係が影響していると考えられる（Kusumo and Druehl 2000）。また、本種の寿命が遺伝形質であるならば（船野 1991）、湾奥部に比べて湾口に 2 年目に移行する個体が多いという実態（船野・坂井 1967）は今回の結果を支持するものである。ところで、忍路湾ではこれまでに他産地からの株の移植試験が行われており（名畑ら 1993）、移植株から放出された遊走子が遺伝的攪乱を引き起こした可能性も考えられる。以上のことから、本種は海流などの物理的環境の違いにより異なる遺伝子組成を持った小規模な個体群が生じていることが推察され、これら小規模群落の衰退は遺伝子資源の消失に繋がることが示唆される。

AFLP 分析によって得られる遺伝的多様性に関わるパラメーターの一つである遺伝的類似度 (*S*) は、*S. japonica* について地理的な関係を反映することが報告されており（Shan et al. 2011)、産地間の物理的距離が近くなるほどその産物間の遺伝的類似度が高くなる傾向が見られる。従って、遠方の産地との間で極めて高い遺伝的類似度が示された場合は、両者はもともと同一の遺伝子集団に属していたことが示唆される。この値を利用して産地の特定や種分化の流れを考察することができるが、例えば今回、函館市大船の個体は周辺の産地とは異なり、青森県の下手浜の個体と遺伝的に類似していた。また、青森県沿岸の猿ヶ森の個体もまた周辺産地との間よりも北海道福島町塩釜の個体との間で高い遺伝的類似度が見られた。これは産地間と遺伝的類似度の相関関係に従わず、また本研究において局所個体群とみなされた尾札部、日向、川白、日向、黄金岬のような遠方の複数の産地と遺伝的に類似している場合とも異なり 2 産地間でのみ顕著に高い値が得られていることから、産地間で人為的要因等による遺伝子の導入があったことが推察される。一方、遺伝的多様度 (*H*) は *S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica* var. *religiosa* に比べて、*S. japonica* var. *ochotensis* や *S. japonica* var. *diabolica* で低い値を示した。一般に、新しく成立した遺伝子集団の遺伝的多様度は低くなる傾向があることから、*S. japonica* var. *ochotensis* や *S. japonica* var. *diabolica* は、本種のなかで新しく分化した集団であると考えられる。

本種のなかに知られている 4 変種は、主に形態的特徴によって分けられ、それぞれ局所

的な分布域を持つ(*S. japonica* var. *japonica*:室蘭から白神岬までの渡島半島東および南岸と、本州北部太平洋沿岸;*S. japonica* var. *religiosa*:北海道日本海沿岸および青森県の津軽海峡沿岸一帯および下北半島東端から宮城県牡鹿半島にいたる三陸地方沿岸、福島と茨城県境;*S. japonica* var. *ochotensis*:日本海沿岸の石狩湾北側の厚田から稚内を経て知床半島先端;*S. japonica* var. *diabolica*:北海道東部の厚岸沿岸以東の太平洋沿岸、根室半島納沙布岬から知床半島にいたる根室海峡一帯)(川嶋 2012)。今回のSTRUCTURE解析の結果、同様に地域的な集団構造が見られたものの、既存の変種の枠組みには合致せず、変種内にそれぞれ2つのクラスターが認められた。それぞれの変種の遺伝子組成については、*S. japonica* var. *japonica*では、鵜苫、有珠、礼文華、静狩、中ノ川、小谷石、塩釜の個体で優先するクラスターが祖先的であり、チャラツナイ、函館市内の6産地(大船、安浦、臼尻、尾札部、木直、住吉)、日向の個体で優先するクラスターが派生的であることが*Fst*の値から示された。一方、*S. japonica* var. *religiosa*では、北海道日本海沿岸においても三厩を除く青森県内、および釜石の個体と同様に一方のクラスターが優先する個体がほとんどであるが、島牧村港と貝取間の個体では三厩のものと同様に、2つのクラスターが混在していた。更に、忍路の個体では釜石で優先していたクラスターの出現頻度は著しく低かった。2つのクラスターについて、*Fst*の値から島牧村港や貝取間で混在し、忍路で優先していたクラスターが派生的であると考えられるが、このことから本変種の北海道日本海沿岸の分布域においては、産地の地理的関係をふまえ、祖先的なクラスターのなかに北側から派生的なクラスターが侵入したものと推察される。また、*S. japonica* var. *ochotensis*では、ほとんどの産地の個体が一方のクラスターが優先したが、暑寒海岸町と黄金岬ではもう一方のクラスターが混成していた。今回、*Fst*の値から前者が祖先的であることが示された。*S. japonica* var. *diabolica*では、*Fst*の値から温根元、友知、落石、愛冠、大黒島の個体で優先するクラスターが祖先的であり、岬町、バラ島、友知漁港、厚岸湖の個体が優先するクラスターが派生的とみなされた。ただし、何れの産地についても2つのクラスターが混成することはなく、明確な遺伝的分化が見られた。これらのなかで、派生的クラスターに含まれる集団は地理的にまとまっていないことから、2つのクラスターは起源的に異なる可能性があることが推察される。

本研究の材料として扱った青森県沿岸や岩手県沿岸の個体は、上記の変種の分布域からみてその同定に迷うところであるが、今回の結果からこれらは北海道太平洋沿岸の *S. japonica* var. *japonica* と類似性が高く、*S. japonica* var. *religiosa* ではなく *S. japonica* var. *japonica* として扱うことが妥当である。一方、日本海沿岸に生育する *S. japonica* var. *religiosa* は *S. japonica* var. *ochotensis* と同じクラスターが優先するが、貝取間の個体のように *S. japonica* var. *japonica* と遺伝的に近いものもあるため、これらを何れの遺伝子集団に分けるべきか、あるいは独立した集団とすべきかはより詳細な分析が求められる。また、*S. japonica* var. *diabolica* は、いくつかの産地では *S. japonica* var. *ochotensis* と同じクラスターが優先していたため、これら2変種の分布境界を再検討すべきである。

ところで、今回材料に用いた全ての産地についての解析では、2つのクラスター(先の変

種レベルとは異なる）の存在が支持され、北海道渡島半島南東部沿岸の中ノ川、小谷石、塩釜、日本海沿岸の大浜、川白、黄金岬、道東部の岬町、友知漁港、厚岸湖、青森県沿岸および釜石の個体には祖先的なクラスターが、大浜と川白を除く北海道日本海沿岸部から知床半島のウトロまでの個体では派生的なクラスターがそれぞれ優先して見られた。なお、北海道鵜苫以西の太平洋沿岸から渡島半島南西部沿岸の住吉に至るまでの産地では、祖先的なクラスターが優先する個体と、2 つのクラスターが混成する個体の双方が認められた。このようなクラスターの混成は、一般に、（1）2 つのクラスターの二次的遭遇による場合、あるいは（2）元々の遺伝子集団が持つ 2 つのクラスターに起因する場合、の何れかによると考えられる（津田 2014)。本種の起源が、Yotsukura et al.（2006）に記されている通り北海道西部太平洋沿岸部であるとすれば、仮に後者（2）の場合に、今回北海道東部に祖先的なクラスターを持つ個体群が出現したことも説明できる。しかし、これまで行われてきた分子系統学的研究の結果から *S. japonica* var. *diaboliaha* は本種の変種分化の変遷における末端に位置していることが明らかにされており（Yotsukura et al. 2006)、既存の遺伝子構造が異なるクラスターの二次的遭遇によるものか、あるいは祖先多型によるものかを判断するためにはより詳細な情報が必要である。本種の種分化についての詳細な議論は、次章のマイクロサテライトマーカー分析の結果を踏まえ、改めて行うものとする。

本研究において、AFLP 分析では PCR の鋳型となる抽出 DNA の違いによって結果が大きく異なったが、確立した抽出法による DNA を用いた場合は高い再現性のある結果が得られた。AFLP 分析や RAPD 分析といった DNA 多型解析は、しばしば結果の再現性について問題が指摘されるが（Bonin et al. 2004)、増幅断片のなかから特定の多型バンドを切り出し、これを再現性の高い STS マーカーとして用いることができる（e.g. Griffths and Orr 1999)。今回、*S. japonica* について、特定の地域や産地の個体にのみ見られる増幅断片が少なからず確認できたことから、今後はこれらを STS マーカーとして用いることにより、断片出現の有無を確認するという簡便な作業によって本種の産地識別が可能となろう。

今回､伝的多様性が乏しいことが知られている *S. japonica* について（Yotsukura et al. 2006)、AFLP 分析から除外した個体ではいくつかで ITS 領域の塩基配列に変異が見られた。コンブ目植物では、例えば、*Macrocyctis pyrefera*（Linnaeus）C.Agardh では ITS1 と ITS2 にいくつかのハプロタイプが確認されていることから（Coyer et al. 2001）、ITS 領域の配列の比較結果からこれらを異種として扱うことはできないが、温根元の個体については DNA バーコディングとして種の識別に広く利用される COI 領域（Lane et al. 2007）にも変異が見られたことから、今後、形態的特徴を精査するなどして種の取り扱いを検討する必要がある。また、婦羅理の個体は、明瞭に *S. japonica* の形態的特徴を有しているにもかかわらず、調査した 4 領域の塩基配列比較に基づく分子系統学的解析から *S. cichilioides* との近縁性が高かった。これまで、婦羅理を分布域に含む *S. japonica* var. *diabolica* では、他種との交雑体と思われるものも見つかっており（川嶋 2012)、今後より詳細な解析が求められる。

第3章　共優性マーカーを用いた *Saccharina japonica* の地理的解明遺伝子構造の解明

1. 緒言

マイクロサテライト領域（Simmple sequence repeat：SSR）は核ゲノム中に多数散在し、2から6塩基からなるモチーフの繰返し配列である（e.g. Cardle et al. 2000）。SSRはDNA複製の際にミスが生じやすく、しばしば個体レベルの遺伝的変異を検出する際に比較される。先にも述べた通り、マイクロサテライトマーカーは共優性であることからAFLPの解析結果を補う有効なツールと考えられるが、北海道産の *S. japonica* に関する知見はない。一方、中国産の本種についてはいくつかの報告があり、養殖株の系統識別を目的として個体間の配列が比較されている（Liu et al. 2012）。さらに、Barner et al.（2011）はコンブ類の *Postelsia palmaeformis* Ruprechtについてマーカーを用いて自殖か他殖かの判定を行っている。これらのことから、マイクロサテライトマーカー分析により、*S. japonica* の地域個体群について遺伝子型を考慮した構造解析をすることができると考えられる。しかし、そのためには多数の遺伝子座についてのマーカーを開発する必要があるうえ、通常、それぞれのマーカーを開発するまでには多大な労力を要する（Zane et al. 2002）。マイクロサテライトマーカーの開発は、多くの場合、コロニーハイブリダイゼーションによる方法や磁性ビーズを用いた方法により行われてきた（Zane et al. 2002）。一方で、PCRを利用した方法もいくつか報告されており、これらにおいては高純度の鋳型DNAを用いることで良好な結果を得ることができることから、本研究材料では成果が期待できる。なかでも、Lian and Hogetsu（2001、2002、2006）によって考案されたDual-Suppression PCR法は、一度に多数のSSRを検出できることから極めて効率がよい方法である。

今回、Dual-Suppression PCR法により、*S. japonica* のマイクロサテライトマーカーの開発を試み、得られたマーカーを用いて4変種それぞれの地域個体群について遺伝的多様度を調査した。

2. 材料と方法

2.1 材料

マイクロサテライトマーカーの開発に用いるS. *japonica* var. *japonica* 胞子体は、北海道函館市臼尻（Table 1、Fig. 1）において10個体採集した。また、開発したマーカーの多型性を調べるため、同変種の胞子体を北海道函館市の6地点：大船、安浦、臼尻、川汲、尾札部、安浦、においてそれぞれ5個体ずつ採集した。また、マイクロサテライトマーカー分析を行うための材料は、北海道沿岸44産地、青森県沿岸11産地、岩手県沿岸1産地、ロシアサハリン南部沿岸2産地において採集した。

2.2 方法

2.2.1 DNA ライブラリの作製

DNA の抽出と精製は、第 1 章で述べた DNA 抽出法 11 に従った。抽出したゲノム DNA 500 ng は、平滑末端を生ずる 6 種類の制限酵素（*Alu*I、*Eco*RV、*Hae*III、*Hinc*II、*Rsa*I、*Ssp*I）（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社）を用いて分解した。反応液の組成と制限酵素反応条件はそれぞれの酵素に添付されたプロトコルに従った。反応によって生じた DNA 断片の平滑末端には、TaKaRa Ligation Kit ver. 1（タカラバイオ株式会社）を用いて既知配列を持った 2 種類のオリゴヌクレオチド（Lian and Hogetsu 2001）（Table 9）をライゲーションし、不等長アダプターが結合した DNA 断片（以下、不等長アダプター付制限断片）を作製した。ライゲーション反応液の組成と反応条件は、キット付属のプロトコルに従った。不等長アダプター付制限断片は、第 1 章の DNA 抽出法 2 で述べたクロロホルム・イソアミルアルコール抽出に従って精製し、2-プロパノールで沈殿させた後、真空デシケーター中で乾燥させた。その後、0.1 TE を加えて 5 ng/μl に調整した。

2.2.2 SSR に隣接する片側領域の塩基配列の決定

先ず、SSR と、それに隣接する片側領域の塩基配列を増幅するための PCR を行った。PCR の反応液組成は AmpliTaq Gold 360 Mastermix（Applied Biosystems）を 12.5 μl、GC Enhancer（Applied Biosystems）を 1.0 μl、SSR Prime を 25 μM、AP2 Primer を 25 μM（Lian and Hogetsu 2001）、不等長アダプター付制限断片 を 1 μl（5 ng/μl）、そして精製水を加えて全量を 25 μl となるように調整した。PCR には GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を用いた。反応条件は 95℃で 10 分間処理した後、熱変性を 95℃で 30 秒間、アニーリングを 57℃で 30 秒間、伸長反応を 72℃で 1 分間、この増幅反応を 1 サイクルとして 10 サイクル行い、次に熱変性を 95℃で 30 秒間、アニーリングを 55℃で 30 秒間、伸長反応を 72℃で 1 分間、この増幅反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。さらに予備伸長反応を 72℃で 5 分間行い、4℃でインキュベートした。得られた PCR 産物は、1.2% アガロースゲルに電気泳動し、増幅を確認した（Fig. 17）。次いで、Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit（GE Healthcare）を用い、添付されたプロトコルに従って精製した。精製した PCR 産物は、TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter（Invitrogen, CA）と One shot TOP10F' Competent Cell（Invitrogen）を用いて Denboh et al.（2003）を参考にクローニングを行った。インサート配列を増幅するためのコロニーPCR の反応液組成は、TaqGold 360 Mastermix 12.5 μl、GC Enhancer 1.0 μl、M13 Forward Primer 20 μM（Tabel 4）、M13 Reverse Primer 20 μM（Table 4）、に精製水を加えて全量を 25 μl となるように調整し、クローニングの結果得られたポジティブコロニーを加えた。反応条件は 95℃で 10 分間処理後、熱変性を 95℃で 30 秒間、アニーリングを 50℃で 30 秒間、伸長反応を 72℃で 1 分間、この増幅反応を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。さらに、予備伸長反応を 72℃で 5 分間行った後、4℃でインキュベートした。PCR 産物は、1.2% アガロースゲルに電気泳動し、500bp 以上の挿入が見込まれるバンドが確認できた産物は、第 2 章で述べた方法に従って塩基配列を決定した。得られた SSR

に隣接する領域の塩基配列を調べ、これをもとにSSR配列方向に伸長反応が進むようにIP1 Primer（Gel濾過 grade）（日本遺伝子研究所）とIP2 Primer（OPC grade）（日本遺伝子研究所）を設計した。なお、IP1 PrimerとIP2 PrimerのTm値は、AP1 Primer(Lian and Hogetsu 2001)とAP2 Primerに近くなるように設計した。

2.2.3 SSRに隣接するもう一方の領域の塩基配列の決定

SSRに隣接するもう一方の領域の塩基配列を増幅するため2回のPCRを行った。1回目の反応液の組成は、AmpliTaq Gold 360 Mastermixを12.5 μl、GC Enhancerを1.0 μl、IP1 Primerを20 μM、AP1 Primerを20 μM、不等長アダプター付制限断片を1 μl、そして精製水を加えて全量を25 μlとなるように調整した。反応条件は、95℃で10分間処理した後、熱変性を95℃で30秒間、アニーリングをIP1 PrimerのTm値で30秒間、伸長反応を72℃で1分30秒間、この増幅反応を1サイクルとして40サイクル行った。さらに、予備伸長反応を72℃で5分間処理した後、4℃でインキュベートした。PCR産物は精製水で500倍希釈し、これを2回目の鋳型DNAとした。反応液の組成はプライマーとしてIP2 PrimerとAP2 Primerを用いた他は1回目に準じた。増幅した産物は1.2% アガロースゲルに電気泳動し、1本のバンドが得られた産物は、第2章に述べた方法に従って塩基配列を決定した。一方、複数のバンドが現れた場合は、双方のPCRにおいてアニール時間を10-15秒にするか、1回目をタッチダウンPCRにして単一のバンドが得られるかどうかを確かめた。なお、タッチダウンPCRは、95℃で10分間処理した後、アニール温度が1サイクルごとに0.5℃低下するように、熱変性を95℃で30秒間、アニーリングをIP1 PrimerのTm値で30秒間、伸長反応を72℃で1分30秒間、この増幅反応を1サイクルとして10サイクル行い、さらに熱変性を95℃で30秒間、タッチダウン後の温度で30秒間、伸長反応を72℃で1分30秒間、これを1サイクルとして30サイクルの増幅を行った。次に、予備伸長反応を72℃で5分間処理した後、4℃でインキュベートした。得られたSSRに隣接する領域の塩基配列をもとにし、SSR方向に伸長反応が進むようにIP3 Primer（OPC grade）（日本遺伝子研究所）を設計した。

2.2.4 SSRの増幅

本章の2.2.2と2.2.3で作製したIP1 primerまたはIP2 Primerと、IP3 Primerを用いてSSRを含む領域を増幅した。PCRの反応条件は95℃で10分間処理した後、熱変性を95℃で30秒間、アニーリングをプライマーペアのTm値で30秒間、伸長反応を72℃で1分間、この増幅反応を1サイクルとして40サイクル行った。さらに、予備伸長反応を72℃で5分間行い、4℃でインキュベートした。PCR 産物は、1.2% アガロースゲル電気泳動によって増幅を確認し、1本または2本のバンドが出現したプライマーペアについては、10個体の胞子体から抽出したゲノムDNAの混液を鋳型DNAとして同様のPCRを行い、増幅産物をクローニングした。次いで、20個のポジティブコロニーを選択し、本章2.2.2の方法に従ってコロニーPCR を行い、塩基配列を決定して多型性を評価した。多型が認められた領域につい

てヘテロ接合体の頻度（ヘテロ接合度）を調べるため、恒温式塩基配列用電気泳動装置 NB-1214（日本エイドー、東京）を用いて 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって増幅された断片長の比較を行った。なお、泳動のための電源装置は POWER PAC 3000（Bio-Rad、CA）を用い、1500V-40A-60W で 2 時間 30 分の泳動を行った。その後、PCR 産物は臭化エチジウム（EtBr）で染色し、UV transilluminator（UVP、CA）を用い紫外線照射下でバンドサイズとヘテロ接合度を観察した。

2.2.5 マイクロサテライトマーカーの開発と分析

本章 2.2.4 において多型が認められた領域については、上述の 6 産地から得られた胞子体を材料に産地間の遺伝的差異を調べるため、それぞれ本章 2.2.4 に従った SSR の増幅を行った。得られた産物は、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、2.2.4 と同様に分離された断片のサイズとヘテロ接合度の比較を行った。また、多型性が高い領域や、特異的な対立遺伝子が見られた領域については、AFLP 分析によって得られた遺伝的に孤立した個体群（局所個体群）と、AFLP 分析によって単一種から成ると判別されたすべての個体群について、同様にマイクロサテライトマーカー分析を行い、局所個体群とその他の個体群が持つ対立遺伝子の組成を調べることにより各局所個体群が属する地域個体群を推定した。

3. 結果

3.1 マイクロサテライトマーカー候補の開発

今回設計した 49 組の IP1 Primer と IP2 Primer によって増幅された領域のなかで、28 組について増幅された SSR に隣接するもう一方の領域の配列を決定することができた。これら 28 領域のなかで、10 領域についてこの内部に含まれる SSR : $(GA)_n$、$(AC)_n$、$(TC)_n$、$(CA)_n$、(GCT)、$(TTCCTCCCTCTC)_n$、$(GGGACCAGTTC)_n$、$(GAC)_n$、$(CGCGCACACACA)_n$、$(GAGAGAGAGGAG)_n$、$(CGCGCACACACACCCCACACA)_n$、(Table 10) の反復数に違いが見られた。10 組のプライマーペアによって増幅された 10 領域 (MS1-MS10) のうち、MS7 を除いた 9 領域には 2 塩基の繰返し配列の反復数に違いが見られた。さらに、これら 9 領域のなかで MS2、MS4、MS5、MS9 については 12 塩基から 21 塩基をひとつの単位とした繰返し配列の反復数にも違いが見られた（Table 10)。それぞれの領域のなかに含まれる SSR の数と、それぞれの SSR に見られる多型の数は、MS1 には 2 つの SSR が含まれ、それぞれ 3 つと 4 つの多型が検出された。MS2 には 4 つの SSR が含まれ、そのうち 3 つの SSR にはそれぞれ 2 つの、1 つの SSR には 3 つの多型が検出され、前者のうちの 1 つの SSR では 12 塩基を単位とした挿入・欠損が見られた。MS3 には 1 つの複合 SSR が含まれ、そのなかに 9 つの多型が検出された。MS4 には 2 つの SSR が含まれ、それぞれ 2 つと 4 つの多型が検出された。MS5 と M6 にはともに 1 つの SSR が含まれ、前者には 6 つの多型が、後者には 2 つの多型が検出された。MS7 には 2 つの SSR が含まれており、それぞれ 2 つと 8 つの多型が検出された。さらに、MS8 には 1 つの SSR が含まれており、5 つの多型が見られ、

MS9 には 2 つの SSR が含まれ、1 領域にはそれぞれ 2 つと 4 つの多型が検出された。なお、MS9 には SSR ではないが、12 塩基を単位とし挿入・欠損が見られた。MS10 には 1 つの SSR が含まれており、2 つの多型が認められた。これらのヘテロ接合度は MS1 では 0.3、MS2 では 0.4、MS3 では 0.67、MS4 では 0.27、MS5 では 0.73、MS6 では 0.6、MS7 では 0.6、MS8 では 0.3、MS9 では 0.13、MS10 では 0 であった。

多型性調査に用いた 6 地点から得たサンプルについて、上記 10 領域のなかで MS1 について 12 の増幅断片長多型：354 bp、364 bp、368 bp、383 bp、385 bp、385 bp、387 bp、393 bp、395 bp、412 bp、420 bp、422 bp、が得られ、対立遺伝子のヘテロ接合度は 0.63 であった。それぞれの地点では、大船において 4 つの多型：393 bp、412 bp、420 bp、422 bp、安浦において 5 つの多型：364 bp、368 bp、387 bp、393 bp、395 bp、臼尻おいて 2 つの多型：387 bp、393 bp、尾札部において 3 つの多型：393 bp、407 bp、422 bp、川汲おいて 2 つの多型：354 bp、393 bp、木直において 3 つの多型：364 bp、393 bp、395 bp が認められた。このなかで、393 bp の増幅断片については採集地点の違いを反映していないものの、全 30 個体中すべての地点を含む 22 個体に見られ、出現頻度が最も高かった。また、400 bp 以上の増幅断片は大船と尾札部の個体のみに見られ、一方、360 bp の断片は安浦、川産、木直の個体に現れたものの、大船と尾札部には見られなかった。さらに、370 bp より短い断片は木直と安浦に、400 bp より長い断片は大船と尾札部にのみそれぞれ見られた。

MS2 については、8 つの増幅断片長多型：297 bp、301 bp、317 bp、321 bp、325 bp、333 bp、337 bp、341 bp、が得られた。それぞれの産地では、大船において 3 つの多型：301 bp、325 bp、333 bp、安浦において 4 つの多型：301 bp、321 bp、325 bp、333 bp、臼尻において 3 つの多型：321 bp、325 bp、333 bp、川汲において 4 つの多型：301 bp、317 bp、325 bp、333 bp、尾札部において 5 つの多型：301 bp、321 bp、325 bp、333 bp、337 bp、木直において 5 つの多型：297 bp、301 bp、317 bp、333 bp、341 bp が認められた。ヘテロ接合度は何れのマーカーよりも高く 0.69 であった。なお、川汲の 1 個体では断片の増幅が見られなかった。

MS3 については、電気泳動像において異なるサイズの増幅産物が一定間隔にハシゴ状にとなって現れた。この領域では 7 つの増幅断片長多型：161 bp、163 bp、165 bp、167 bp、169 bp、171 bp、173 bp、が得られた。それぞれの産地では、大船において 2 つの多型：163 bp、165 bp、安浦において 4 つの多型：163 bp、165 bp、169 bp、171 bp、臼尻において 4 つの多型：161 bp、163 bp、165 bp、167 bp、川汲において 4 つの多型：165 bp、167 bp、169 bp、171 bp、尾札部において 6 つの多型：163 bp、165 bp、167 bp、169 bp、171 bp、173 bp、木直において 5 つの多型：161 bp、163 bp、165 bp、167 bp、173 bp が認められた。大船産の個体では 163 bp と 165 bp の 2 つの増幅断片長多型対立遺伝子だけが見られた。この領域におけるヘテロ接合度は 0.57 であった。

MS4 については、川汲の 3 個体で増幅した産物が得られなかった。この領域では 4 つの増幅断片長多型：286 bp、297 bp、299 bp、301 bp、が得られ、それぞれの産地では、大船において 3 つの多型：286 bp、297 bp、301 bp、安浦において 2 つの多型：297 bp、301 bp、

臼尻において3つの多型：286 bp、297 bp、301 bp、川汲において2つの多型：286 bp、297 bp、尾札部において3つの多型：286 bp、297 bp、301 bp、木直において4つの多型：286 bp、297 bp、299 bp、301 bpが認められた。この領域における対立遺伝子のヘテロ接合度は0.2であった。

MS5については、6つの増幅断片長多型：171 bp、177 bp、179 bp、183 bp、185 bp、198 bpが得られ、それぞれの産地では、大船において3つの多型：177 bp、183 bp、198 bp、安浦において3つの多型：171 bp、177 bp、198 bp、臼尻において2つの多型：177 bp、198bp、川汲において5つの多型：171 bp、177 bp、183 bp、185 bp、198 bp、尾札部において3つの多型：177 bp、183 bp、198 bp、木直において3つの多型：177 bp、183 bp、198 bpが認められた。171 bpの増幅断片は安浦と川汲の個体に、183 bpのものは木直、尾札部、川汲の個体にだけ見られた。また、185 bpのものは、川汲の個体にだけ見られた。この領域におけるヘテロ接合は0.56であった。

MS6については、先のアリル数を調べた際のアガロースゲル電気泳動では見られなかったサイズの断片が増幅されたため、その先の分析から除外した。

MS7については、7つの増幅断片長多型：172 bp、およそ200 bp、およそ230 bp、253 bp、256 bp、259 bp、262 bp、が得られ、それぞれの産地では、大船において2つの多型：172 bp、256 bp、安浦において3つの多型：172 bp、200 bp、256 bp、臼尻において3つの多型：172 bp、256 bp、259 bp、川汲において4つの多型：200 bp、253 bp、256 bp、259 bp、尾札部において3つの多型：172 bp、253 bp、256 bp、木直において5つの多型：172 bp、230 bp、253 bp、256 bp、259 bpが認められた。安浦と川汲では200 bp、木直では230 bpの特有のバンドが検出された。この領域におけるヘテロ接合度は0.33であった。

MS8については、全体では5つの増幅断片長多型：191 bp、193 bp、195 bp、197 bp、177 bp、が得られ、それぞれの産地では、大船において2つの多型：193 bp、195 bp、安浦において1つの多型：193 bp、臼尻において3つの多型：191 bp、193 bp、195 bp、川汲において3つの多型：193 bp、195 bp、197 bp、尾札部において195 bp、木直において4つの多型：177 bp、193 bp、195 bp、197 bpが認められた。ヘテロ接合度は著しく低く0.07であった。この領域ではMS3と同様に、電気泳動像において異なるサイズの増幅産物が一定間隔にハシゴ状にとなって現れた。MS9については、4つの増幅断片長多型：179 bp、181 bp、183 bp、185 bp、が得られ、それぞれの産地では、大船において2つの多型：179 bp、181bp、安浦において2つの多型：181 bp、183 bp、臼尻において2つの多型：179 bp、181 bp、川汲において2つの多型：179 bp、181 bp、尾札部において3つの多型：179 bp、181 bp、185 bp、木直において2つの多型：179 bp、181 bpが認められた。MS10の領域では変異は見られたが、ヘテロ接合度が極めて低いためその先の分析からは除外した。

以上から、MS1-MS10をマーカー候補とし、続いてこれらを用いたマイクロサテライトマーカー分析を行った。

3.2 マイクロサテライトマーカー分析

上記 6 地点で、それぞれに特有の増幅断片長多型が見られた MS1、MS2、MS3、MS7 領域に着目し、AFLP 分析によって局所個体群と推定された 5 産地：尾札部、日向、大浜、川白、黄金岬、の個体について他産地の個体との間で断片長を比較した。なお、MS1 では、日向の 2 個体と大浜の 1 個体で、MS3 では日向と黄金岬の 1 個体で、MS7 では日向の 1 個体手で、それぞれ増幅産物が得られなかった。

MS1 では、5 産地のなかで尾札部は先述した通りである。また、日向では 3 つの多型：360 bp、364 bp、393 bp、川白では 1 つの断片：420 bp、大浜では 2 つの増幅断片長多型：399 bp、408 bp、黄金岬では 2 つの増幅断片長多型：412 bp、420 bp が得られた。これら断片を他産地のものと比較した結果は Table 11 に示す通りであるが、特に、360 bp と 364 bp の断片は、日向と距離の近い住吉や小谷石のみならず、有珠や木直志の個体においても認められた。なお、川白の 4 個体は何れもホモ接合体であった。ところで、393 bp の増幅断片長多型は、先述した通り採集した地点の違いを反映していなかったものの、釜石、長後、川白村、大浜、留萌、苫前、沓形、新湊、温根元、落石、大黒島、愛冠、厚岸湖を除くすべての産地に見られており、特に、宝来、大岬、本町、雄武、二ツ岩についてはすべての個体から検出された。また、温根元、落石、大黒島、愛冠、厚岸湖の個体については、愛冠の 1 個体を除いて 400 bp 以上の増幅断片のみが検出された。

次いで MS2 では、5 産地のなかで尾札部は先述した通りであり、5 つの増幅断片長多型が得られた。また、日向では 3 つの増幅断片長多型：321 bp、329 bp、333 bp、川白では 1 つの増幅断片長多型：329 bp、大浜では 4 つの増幅断片長多型：305 bp、325 bp、333 bp、341 bp、黄金岬では 3 つの増幅断片長多型：305 bp、321 bp、325 bp が得られた。これらの断片長多型は、何れも産地に特有のものではなく、他の産地においても認められた。MS1 と同様に、5 産地のなかで川白を除く 4 産地ではヘテロ接合度が 0.47 であったが、川白では何れの個体もホモ接合体であった。これら 5 産地に見られる断片を他産地で見られるものと比較した結果は Table 11 に示す通りであり、*S. japonica* var. *japonica* や *S japonica* var. *religiosa* の分布域内に位置する産地から採集された個体ではヘテロ接合度は 0.46 であったが、*S. japonica* var. *ochotensis* や *S. japonica* var. *diabolica* の分布域内に位置する産地から採集された個体では 0.28 と低い値を示した。なお、比較対象の鬼脇、新湊、沓形、鴛泊、礼文華の個体は何れもホモ接合体であり、329 bp の断片のみが検出された。

MS3 では、5 産地のなかで尾札部は先述した通りであり、6 つの増幅断片長多型が得られた。また、福島では 3 つの増幅断片長多型：161 bp、163 bp、165 bp、川白では 2 つの増幅断片長多型：159 bp、165 bp、大浜では 3 つの増幅断片長多型：161 bp、163 bp、165 bp、黄金岬では 3 つの増幅断片長多型：161 bp、167 bp、169 bp が得られた。これらの断片は、何れも他の産地でも認められ、産地の違いを反映していなかった。本領域についても他の領域と同様に川白産の 4 個体は何れもヘテロ接合体であった。なお、本領域では他の領域で見られたような産地に特異的なバンドは検出されなかった。

MS7 では、5 産地のなかで尾札部は先述した通り、3 つの増幅断片長多型が検出された。福島、川白村、大浜では何れも 2 つの増幅断片長多型：172 bp、181 bp、黄金岬では 1 つの増幅断片長多型：181 bp が得られた。これらのなかで 172 bp と 181 bp の対立遺伝子は、何れの産地においても認められたが、尾札部で見られた 250bp 付近のバンドは、住吉、木直、川汲、尾札部、臼尻、安浦、大船、静狩、礼文華、有珠、チャラツナイ、鵜苫でのみ見られた。

開発されたマイクロサテライトマーカーの断片長から STRUCTURE 解析を行った結果、4 つのクラスターの存在が示された（Fig. 18）。それぞれのクラスターの *Fst* 値は、クラスター1 では 1.8、クラスター2 では 3.4、クラスター3 では 1.3、クラスター4 では 1.4 となり、その値からクラスター3 と 4 は祖先的で、クラスター1 と 2 は派生的であることが示された。これらのクラスターはそれぞれ局所的に現れ、クラスター1 は日向を除く北海道渡島半島津軽海峡沿岸から日本海沿岸にかけて、クラスター2 はサハリン南部のアニワ湾、北海道オホーツク沿岸の宝来からウトロを経て厚岸湖にかけて、クラスター3 は日本海沿岸の濃昼から利尻島と礼文島にかけて、クラスター4 は北海道太平洋沿岸の鵜苫から木直にかけての産地に見られた。なお、日向を除く北海道渡島半島津軽海峡沿岸から日本海沿岸の貝取間以北から川白ではクラスター1 とクラスター3 が混在した。また、青森県沿岸の産地において採集された個体は複数のクラスターが混在しており、青森県太平洋沿岸から下北半島沿岸部の産地ではクラスター4 が優先するもののクラスター3 とクラスター1 が、下北半島西部沿岸および津軽半島平舘海峡沿岸の産地ではクラスター1 と 3 が、津軽半島北部ではクラスター1 と 4 が混在した。さらに、北海道渡島津軽海峡沿岸部の産地ではクラスター1 が優先したが、クラスター2 や 4 を持つ個体が見られた。AFLP 分析において局所個体群とみなされた 5 地点について、尾札部は周辺の地点と同じクラスター4 が優先した。日向は近隣産地の個体に見られないクラスター3 が優先する個体が見られた。大浜はクラスター1 が優先した。川白はクラスター近隣の大浜や島牧村港のようにクラスター3 が混在することはなく、クラスター1 が優先した。

4. 考察

現在、マイクロサテライトマーカーの開発は、コロニーハイブリダイゼーション法（Rassmann et al. 1991）、SSR配列を持つプライマーの伸長反応を利用した方法（e.g. Ostrander et al. 1992）、SSR配列持つ断片を濃縮する方法（e.g. Kijas et al. 1994.）によって行われることが多いが、これらの方法は操作が複雑であるうえ、開発までに多大な時間と費用を要する（Zane et al. 2002）。近年、次世代型シークエンサーを用いて、一度に多数のSSRを検出する方法が報告されているが（Dubut et al. 2010）、シークエンサーのランニングコストが高い現状ではその利用は容易ではない（Metzker 2010）。そのような現状のなかで、Dual-supression PCR法は（練・宝月 2004）SSR配列に結合するプライマーを用いてSSRとその隣接領域の塩基配列を決定し、隣接領域の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いてSuppression

PCR法 (Siebert et al. 1995) によってもう一方の隣接領域の塩基配列を決定する手法である。そのため、従来の方法にあるコロニーハイブリダイゼーションや濃縮といった作業が必要なく、DNAライブリの作製（制限酵素処理、アダプターライゲーション)、PCR、クローニング、シークエンスのみからなる簡便な方法である（Lian and Hogetsu 2002、練・宝月2004、Lian et al. 2001、2006)。今回、AFLP分析において高い再現性を示すDNA抽出法が確立された*S. japonica*については、制限酵素反応やポリメラーゼ反応が中心となるこの方法はマイクロサテライトマーカーの開発に有効であると考えらえる。練・宝月（2004）は、Dual-Suppression PCR法によるSSRを増幅するためのプライマーの設計までの期間を述べており、DNA抽出を含めても9日間でマイクロサテライトマーカー候補の探索が可能としている。さらに、複合SSRに結合するSSR Primerを用いることによりSSRの片側隣接領域の塩基配列を決定するだけで、マイクロサテライトマーカーを開発するというより簡便な方法も考案している（Lian and Hogetsu 2006)。これまで、多くの陸上植物について本手法によってマーカーが開発されており、その有効性が示されている（Islam et al. 2004、Kubota et al. 2006、Nakamura et al. 2012、Wu et al. 2004)。一方、藻類では*Alexsandrium tamarense* (Lebour) Balech（Nagai et al. 2004)、*A. minutum* Halim（Nagai et al. 2006a)、*Heterosigma akashiwo* (Y.Hada) Y.Hada ex Y.Hara & M.Chihara（Nagai et al. 2006b)、*Heterocapsa circularisquama* Horiguchi（Nishitani et al. 2007)、*Karenia mikimotoi* (Miyake & Kominami ex Oda) Gert Hansen & Ø.Moestrup（Nishitani et al. 2009）で成果が報告されてきたものの、これらは何れも微細藻である。

今回、*S. japonica* について Dual-suppression PCR によって、SSR と片側隣接領域の塩基配列を決定したなかから 49 組のプライマーペアを設計し、そのうちおよそ 57%の 28 組について両側の SSR 領域を決定できた。この割合は陸上植物の *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.（43 領域中 36 領域(83%)）(Watanabe et al. 2006) に比べて低い値であったが、藻類の *A. tamarense*（44 領域中 16 領域 (36%)）(練・宝月 2004)、*A. minutum* (63 領域中 17 領域 (27%)) (Nagai et al. 2006)、そして *Heterocapsa circularisquama* (63 領域中 28 領域(44%)) (Nishitani et al. 2007) に比べて高かった。*A. tamarense* についてマーカーを開発する過程で、ゲノム DNA がほとんどの制限酵素で切断されなかったことや、SSR のもう一方の配列を増幅した際に増幅されないか、増幅されたとしても配列が短いためにプライマーを設計するうえで不都合であることが報告されている（練・宝月 2004)。これついて、練・宝月（2004）では生物種に依存すると述べられているにとどまり、具体的な原因については言及していない。しかし、一般に、ゲノム中の SSR の数や出現頻度は生物種によって異なっており（e.g. Lagercrantz et al. 1993)、これが開発効率と関係していることが推察される。コンブ目植物では他の方法によってマーカーの開発が行われているが、設計した全プライマーの数のうち開発されたマイクロサテライトマーカーの数は、*E. cava* では 12/83（Itou et al. 2012)、*Lessonia nigrescens* Bory de Saint-Vincent では 9/78 (Faugeron et al. 2008)、*Macrocyctis pyrefera* (Linnaeus) C.Agardh では 16/37（Alberto et al. 2009)、*S. japonica* では 18/65（Shi et al. 2007)、*Undaria pinnatifida*

（Harvey）Suringar では 20/52（Daguin et al. 2005）と比較しても今回の値は高く（10/28）、本手法によるマーカーの開発は有効であることが示された。

ところで、IP1 Primer と IP2 Primer を設計する際、SSR と片側隣接領域を含む増幅産物をアガロースゲルに電気泳動したところスメアーなバンドのなかに幾つかの明瞭なバンドが現れる（Fig. 17）。これを切り出し、クローニングによって得られた断片の塩基配列を決定したところ断片には SSR は見られず、両端に AP2 Primer の塩基配列または長鎖アダプターの塩基配列が見られた。Dual-suppression PCR 法では、制限酵素反応によって生じた断片の末端に不等長アダプターを結合させ、不等長アダプター付き制限断片を作製する。SSR と片側隣接領域を増幅する際、これらの不等長アダプター付き制限断片を鋳型として SSR Primer がアニールし、そこから長鎖アダプターの相補配列を持つアンチセンス鎖が合成される。AP2 Primer は長鎖アダプターと相同な配列を持つため、合成されたアンチセンス鎖にはアニールすることができ、SSR と AP2 Primer 間の領域が増幅される。一方、SSR を含まない不等長アダプター付き制限断片は、SSR Primer や AP2 Primer がアニールできる相補配列がないため、材料となる生物種のゲノム配列に AP2 Primer と相同な配列が無い限り、通常ではこの断片が増幅されることはない。しかし、短鎖アダプターの 3'末端のブロックが完全でなければ、不等長アダプター付き制限断片の短鎖アダプターの 3'末端から伸長反応が進み、AP2 Primer がアニールできる長鎖アダプターの相補鎖が合成され、AP2 Primer だけで増幅される断片が生じる。

今回の方法は、Lian and Hogetsu（2002）や練・宝月（2004）、Lian et al.（2001、2006）にある Dual-suppression PCR 法をより簡易的な方法に改変しており、短鎖アダプターの 5'末端をアミノ基によって修飾しているが、末端のデオキシグアニンの付加を行わなかったため、両末端が AP2 または長鎖アダプターの配列の断片が生じた可能性がある。Watanabe et al.（2006）は、コロニーPCR の後、186 断片の塩基配列を決定し、そのうち 59 断片には SSR が含まれないことを報告している。また、Kubota et al.（2006）は特定のバンドではなく、300-600 bp の範囲の産物をアガロースゲルから切り出し、SSR を含む断片を得ている。しかし、このなかではデオキシグアニンの付加を行っているにもかかわらず、SSR を含まない断片を得ている。このことから、デオキシグアニンの付加の如何かかわらず、SSR を含まない断片が増幅されるものと考えられる。従って、コロニーPCR の産物をアガロースゲルに泳動し、インサートされた断片のサイズを確認したのち、先に述べた明瞭に現れるバンドサイズと同程度のサイズを持つインサート以外の断片を選択することで SSR 断片を含む断片を高確率で得られると思われる。ところで、IP1 と IP2 Primer の設計について、練・宝月（2004）はコロニーPCR の産物のなかで 100 から 150bp よりも長い挿入が見込まれる断片を選択することを推奨している。これは、このサイズであれば、IP1 Primer（24-27 bp）、IP2 Primer（19-24 bp）を設計するのに十分な領域であると判断したためと考えらえる。しかし今回、100 から 150bp の配列では、AC または GC 含量の偏りがある場合や、末端の SSR 配列の繰返し数が多い場合には Primer を設計するために適する配列が見つからないことが

あった。ところが、500bp よりも長い挿入配列を選択した場合には IP1 Primer と IP2 Primer の設計するために十分な配列が得られた。さらに、500bp よりも長い断片を選択することで、ターゲットとする SSR と別の SSR が断片内に含まれることもあった。本研究で用いた SSR Primer の配列が（AC）$_{10}$、（GA）$_{10}$、（AG）$_{5}$（AC）$_{6}$であったにもかかわらず、開発したマイクロサテライトマーカーの繰返し単位がこれらと異なっているのはこのためである。

今回、両側の隣接領域を決定することが出来た 28 領域のなかで、SSR Primer の配列と完全に一致する、あるいはそれ以上の長さを持つ繰返し配列は 3 領域のみだった（Table 12）。SSR の片側隣接領域の配列を決定する際、末端の SSR の繰返し数は SSR Primer と同じか、それ以上であったが、SSR に隣接する両側の領域の配列を決定すると、多くの場合、SSR の反復数は 5 から 7 回の繰返しにとどまった。これは SSR と片側の隣接領域の塩基配列を増幅するとき、SSR Primer の多くが 3'末端側の部分配列（10-14 塩基）だけがアニールしていることが原因であることが示唆される。また、SSR と片側の隣接領域の塩基配列を決定した際、同じ SSR 領域にも関わらず繰返し数の異なる断片が出現しており、SSR Primer のスリップが起こっていることも示唆された。複合 SSR 領域にアニールする SSR Primer は、5'末端側の SSR 配列がアンカー配列として働くことから SSR に隣接する両側の配列を決定する必要がなく、この SSR Primer と片側の隣接領域の塩基配列から設計したプライマーを用いることにより遺伝子型を正確に識別できることからしばしばマーカーの開発に利用されている（Lian et al. 2006）。しかし今回、複合 SSR 領域の両側隣接領域の配列を決定したところ、同様に SSR Primer の非特異的な結合が見られ（Table 12）、それらの多くは用いた SSR Primer 配列に比べて繰返し数が少ないことや、SSR 間に挿入配列があるという特徴がみられた。そのため、SSR Primer の種類に関わらず、SSR 領域とその両側の隣接領域の配列を決定することが求められる。なお、このような SSR Primer の非特異的結合は、PCR 条件のアニーリングの温度を上昇させても改善されなかった。そのため、IP1 Primer と IP2 Primer を設計するための配列を選択する際、末端にある SSR から数塩基隔てた末端の SSR と同じ繰返し単位からなる配列を選ぶことにより、数塩基か十数塩基の単位配列とした繰返し配列（ミニサテライト領域）が得られることが分かった。一般に、開発されるマイクロサテライトマーカーは 2 または 3 塩基を繰返し単位とするものが多く（Shi et al. 2007）、ミニサテライト領域を利用したマーカーの開発は行われていない。これらの領域はマイクロサテライトに比べ繰返し単位の塩基数が多く、変異を検出しやすい利点がある。また、本手法において、ミニサテライト領域をターゲットととしてマーカー開発を行うことは、SSR Primer の非特異的結合の問題を改善する利点もあると考えられる。

本研究で見出された 10 の SSR について、今回用いた材料のなかで何れも塩基配列に変異が見られた。このうち、MS1、MS2、MS3、MS4、MS7 については、多型の数とヘテロ接合度から *S. japonica* をはじめとする遺伝的多様性に乏しい本属植物について個体レベルの変異を得るためのマーカーとして有効であると考えられる。一方、MS5 は多型の数は多くはなく、またヘテロ接合度も低いが、この領域は 12 塩基または 21 塩基を基本の繰返し単位

にするため、アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルによる電気泳動によって断片のサイズを容易に決定できる。従って、本種の養殖の現場などにおいて株の簡易的な識別に利用できると見込まれる。MS4 は、検出された多型の数は多かったが、ヘテロ接合度が低かった。また、MS8、MS9、MS10 は多型が少なく、ヘテロ接合度も極めて低かった。しかし、*S. japonica* が含まれるコンブ目植物では *U. pinnatifida* や *P. palmaeformis* において、ヘテロ接合度が極めて低い値であるにも関わらず、マイクロサテライトマーカーとして利用されている領域もある（Daguin et al. 2005、Kusumo et al. 2004、Whitmer 2002）。今回、ヘテロ接合度が低かった 4 領域については、マーカーの多型性を調べるために異なる 3 地点において採集された個体の塩基配列を比較し、挿入・欠損があることを確認している。MS6 を含め、これらについては今後より多くの地点において採集された個体について分析を行い、マーカーとして有効性を検証する必要があろう。

今回得られた MS1、MS2、MS3、MS7 領域の増幅断片長多型を基に STRUCTURE 解析を行ったところ、4 つのクラスターの存在が支持された。AFLP 分析において局所個体群と見なされた黄金岬の個体はクラスター2 が優先していたが、濃昼、浜益、暑寒海岸、力昼、鬼脇にも少なからず同じクラスターを持つ個体が存在しており、黄金岬の個体が周辺地域から遺伝的隔離されていないことが示唆された。留萌地方は *S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *ochotensis* の分布域の境界とする考えがあり（川嶋 1989）、*S. japonica* var. *religiosa* と *S. japonica* var. *ochotensis* の中間的な形質を持つ個体が出現すると報告されている（川井・四ツ倉 2005）。本研究ではこの地方の個体は *S. japonica* var. *religiosa* に優先されるクラスターは持っていなかったが、忍路（後志地方）において採集された個体では *S. japonica* var. *religiosa* に優先されるクラスターが見られたため、これらの間に異なる遺伝子集団の境界が存在することが示唆される。一方、川白の個体についてはクラスター3 が優先したが、これは忍路湾奥部を含め、日向、貝取間、島牧村港、大浜の個体にも少なからず見られた。大浜の個体はクラスター4 が混成する個体が見られたが、何れの個体も周辺産地の個体と同様にクラスター1 が優先していた。これらのことから川白、大浜の個体も黄金岬と同様に、遺伝的に隔離された集団ではないことが考えられる。ところで、本分析において互いに異なるクラスターが優先する川白（クラスター3）と大浜（クラスター1）の個体は、AFLP 分析では共に *S. japonica* var. *japonica* と遺伝的に近いことが示されている。このことから、既存の 2 変種 *S. japonica* var. *japonica* と *S. japonica var. ochotensis* は分布域が接しないものの、遺伝的近い集団であることが示唆された。一方、尾札部の個体はマイクロサテライトマーカー分析では、隣接する産地と遺伝的相違が認められなかった。AFLP 分析との結果の相違が生じた原因は明確ではないが、種々の多型解析のなか AFLP 分析は最も高い effective multiplex ratio が得られており（Powell et al. 1996）、マイクロサテライトに比べて検出される多型の頻度の違いが影響しているものと思われる。また、青森県沿岸の個体は複数のクラスターの混成が見られる個体が多かった。青森県では、育種の観点から移植実験が行われており（Kirihara et al. 1989、能登谷・桐原 1989）、白糠、平舘、三厩に移植された

八戸の個体について子嚢斑の形成が観察されている。今回、八戸の個体の分析は行っていないが、今後これらの地域について詳細な分析を行うことで、移植による遺伝子組成への影響を評価することができるであろう。

ところで、船野（1984）は北海道における本種の起源は北海道太平洋沿岸東部に見られる *S. japonica* var. *diabolica* にあると考え、さらに古生物地理学的な観点からおよそ 20 万年以前に石狩低地が海峡だった時代に太平洋沿いに南下した本変種がこの海峡を通って日本海北部に出て *S. japonica* var. *ochotensis* となり、一方で、南下を続けたものが *S. japonica* var. *japonica* を経て *S. japonica* var. *religiosa* に分化したことを推察している。ところが今回、*S. japonica* var. *diabolica* についてはいくつかの産地を除いて遺伝的多様度は低く、マイクロサテライトマーカーの多型による STRUCTURE 解析では、本変種が持つクラスター2 は他の 3 つのクラスターに比べ最も派生的であった。この結果は、本種の起源を北海道西部太平洋沿岸とする考えに合致するものである（Yotsukura et al. 2006）。一方で、今回の分析の結果、北海道太平洋沿岸の鵜苫から木直にかけての個体が持つクラスター4、日本海沿岸の濃昼から利尻島と礼文島にかけての個体が持つクラスター3 は、*Fst* の値からともに祖先的なクラスターであることが示された。これは本種のなかで北海道太平洋沿岸西部の *S. japonica* var. *japonica* が先述の石狩海峡を通って *S. japonica* var. *ochotensis* に分化し、石狩海峡を通らなかったものが南下して津軽海峡に到達したものが北海道南部沿岸の *S. japonica* var. *religiosa* になったという考えを支持するものである。ただし、本研究ではクラスター3 は北海道日本海沿岸部から北海道津軽海峡沿岸部にも見られており、石狩海峡を通って分化した *S. japonica* var. *ochotensis* の多くは北上を続けるものの、あるものは南下していったと考えられる。なお、先の AFLP 分析の結果では、*S. japonica var. japonica* や *S. japonica* var. *diabolica* に優先するクラスターが祖先的であるという結果が得られており、マイクロサテライトマーカーの結果に矛盾する。先に述べた通り *S. japonica* var. *japonica* が *S. japonica* var. *diabolica* から派生したとは考えにくいが、これについては前章でも述べた祖先多型によって道東地域で祖先的なクラスターが出現することを説明できる。

サハリン南部のボグダノビッチとアニワ湾の個体は、AFLP 分析の結果では *S. japonica* var. *ochotensis* と遺伝的に近かったが、アニワ湾では *S. japonica var. japonica* や *S. japonica* var. *diabolica* に優先するクラスターを持つ個体も見られた。日本からサハリンへコンブ種苗が導入された記録はないが、サハリン南部の個体ではそれぞれの変種の形態的特徴を示す群が存在するということが知られており（川嶋 2012）、両地域の個体の比較を詳細に行うことで、本種の種分化やその変遷について深い考察が期待できる。

S. japonica は日本において重要な産業種であり、その価値は変種や産地の違いによって大きく異なる。しかし、これまで本種の 4 変種の分布域については大まかに前章の考察のなかで記した通りに考えられているが、その客観的な裏付けはない。今回、マイクロサテライトマーカー分析および AFLP 分析の結果から、遺伝的類似性が高い異なる 4 つの集団について分布域を検討することができた（第 1 集団：青森県沿岸部および岩手県の釜石、北海

道鵜苫以西太平洋沿岸から日向にかけて分布；第 2 集団：北海道日本海沿岸南部の貝取間から忍路にかけて離散的に分布；第 3 集団：北海道日本海沿岸の濃昼から利尻、礼文島にかけて分布し、その分布域はサハリン南部に至る；第 4 集団：北海道オホーツク海沿岸から北海道東部鵜太平洋沿岸に分布)。これら各集団の分布域は、既存の 4 変種で考えられている分布域と明瞭に対応してはいないが、各々の遺伝特性から第 1 集団を *S. japonica* var. *japonica* と、第 2 集団を *S. japonica* var. *religiosa* と、第 3 集団を *S. japonica* var. *ochotensis* と、第4集団を *S. japonica* var. *diabolica* として扱うことが妥当と考えられる。なお、*S. japonica* var. *religiosa* について、分布域の南部では *S. japonica* var. *japonica* の遺伝子組成が、北部では *S japonica* var. *ochotensis* の遺伝子組成が見られ、これら集団は *S. japonica* var. *religiosa* の分集団として扱うべきであろう。

これらの変種はそれぞれ特有の遺伝的特徴を持っており、これらを異なる遺伝子資源ととらえ維持していく必要がある。また、これら変種の枠組みに沿わない産地群落は、種分化の段階で孤立した個体群や物理環境の変化に伴って遺伝的交流が断たれた個体群、あるいは他の遺伝子集団に属する個体の移入によって形成された個体群であると考えられる。今後、このような特異的な遺伝子組成を持つ集団を存続させていくことは、本種の遺伝的多様性の保全するうえで重要な意味を持つ。

今回、得られたマイクロサテライトマーカーは高い遺伝的多様度 (ヘテロ接合度) を示し、先の AFLP 分析の結果を補完し、より多くの遺伝子集団の存在を明らかにすることができた。本分析はゲノム全体ではなく、特定領域のみを対象とするため、DNA が大きく破損しているような古いサンプルについても解析が可能であり、今後、現在に至るまでの環境変化に伴う本種の分布域の変遷や将来の個体群ダイナミクスを推定することが期待される。

第 4 章　*Saccharina japonica* の環境ストレス応答タンパク質の探索

1. 緒言

生育環境に化学的変化あるいは物理的変化が起きたとき、しばしばその変化に応じた生理的な反応が起こり、生体内ではタンパク質の発現量に増減が見られる。この発現量が変化する環境ストレス応答タンパク質は、それぞれ個々の環境変化の因子の違いによって異なることから、タンパク質のプロファイリングを行うことで生体に係るストレス因子を特定することができる。

2 次元電気泳動を用いたプロテオーム解析は、遺伝子発現の複雑パターンをタンパク質レベルで解明する有効な手法である。ストレスタンパク質の発現と環境因子の関係について調べた研究は多いが、海藻類を材料にしたものは少ない。コンブ類については *E. cava* で、高水温下および低水温下で発現量が増減するいくつかのタンパク質が同定されてきた（Yotsukura et al. 2012）。また、*S. japonica* については、近年、北海道産のもので季節ごとにタンパク発現が調べられ、高水温期に特有の環境ストレス応答タンパク質が検出されている（Yotsukura et al. 2010）。さらに、本種では中国産について異なった pH 条件下で培養された藻体を材料に発現が調べられ、将来の育種に向けた基礎的知見が得られている（Kim et al. 2011）。これらのことをふまえ、*S. japonica* の藻場の衰退や消失に大きく影響を及ぼす環境因子に依存して増減するタンパク質が特定されれば、通常、藻場衰退の後追いになりがちな藻場造成の必要性を早い段階で検知でき、現存する遺伝資源を活用した保全策を企てることができる。

本章では、北海道沿岸に生育する *S. japonica* について、本種の群落維持に大きく関わる磯焼けの発生に関与すると考えられている水温と栄養塩濃度に依存して発現量が変化するタンパクを探索した。さらに、プロファイリングを行ってこれらの同定を行い、藻場の健全性の診断に有益な環境ストレスマーカーの開発を試みた。

2. 材料と方法

2.1 材料

材料である *S. japonica* var. *japonica* の子嚢斑を形成した胞子体は、北海道函館市住吉（Table 1、Fig.1）において採集した。

2.2 方法

2.2.1 ストレス負荷胞子体の生産

採取した胞子体は第 1 章のなかで示した方法で洗浄した後、遊走子を単離し、雌雄配偶体クローン株の自家交配によって次世代の胞子体を得た。なお、配偶体および胞子体の培養には 0.35 μm グラスフィルター（millipore）で濾過した滅菌した海水に PES（Provasoli 1968）を添加した 2% PES 培地を用いた。直径 1-2 mm 程度の雌性配偶体コロニーと雄性配偶体コ

ロニーをそれぞれ両刃メスで細断し、1本の50 mlファルコンチューブに入れ、10℃、短日（10L:14D）条件下で振とう培養した。発芽した胞子体は、順次1.5 Lの2% PES培養液を満たした培養器に移し、葉状部が3 cm程度に達するまで同一の温度・光条件のもとで通気培養した。次に、10℃に冷却した海水をかけ流した100 L水槽に移し、短日（10L:14D）条件で培養を続けた。湿重量がおよそ8 gに達した段階で水温または栄養塩濃度を調整し[水温条件：5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃；栄養塩濃度（硝酸とリン）条件：0.29 mM NO_3^-と0.06 mM PO_4^{3-}、0.59 mM NO_3^-と0.12 mM PO_4^{3-}、1.18 mM NO_3^-と0.24 mM PO_4^{3-}、2.26 mM NO_3^-と0.48 mM PO_4^{3-}、4.52 mM NO_3^-と0.96 mM PO_4^{3-}]、本培養を開始した。なお、水温別試験では予備培養と同様に2% PES培地を用い、5L中に1個体の胞子体を入れ培養した。一方、栄養塩濃度別試験では5 Lの培養液中に1個体の胞子体を入れて10℃培養した。何れの試験においても光周期は短日（10L:14D）にし、1週間の通気培養を行った。ただし、水温が30℃の条件では培養開始2日目に胞子体は変色して直ちに枯死したため、培養期間を1日間に短縮した。それぞれの培養胞子体は、試験終了後速やかに-80℃で凍結保存した。

2.2.2 タンパク質の抽出と精製

タンパク質の抽出は、Nagai et al.（2008）にあるethanol/phenol法を参考にした。具体的には、胞子体葉状部から湿重量3 g程度の葉片を解剖用バサミで切り出し、氷上に置いたプラスチックトレイの上で5 mm×5 mm程度になるまで細断した。これら葉片を15 mlファルコンチューブに移し、氷冷した100% EtOHを4 ml加え、ポリトロンホモジナイザーAHG-160A（アズワン株式会社, 大阪）を用いて180秒間破砕した。得られた組織懸濁液は-20℃で一晩インキュベートした。次いで、懸濁液をボルテックスし、全量を金属メッシュで濾した。濾液は等量ずつ4本のマイクロチューブに分注し、4 ℃、15,000 rpmで10分間の遠心分離を行った後、上清を完全に除いた。沈殿物に1 mlの氷冷した100% EtOHを加え（①）、ボルテックスした（②）後、氷冷下で5分間の超音波処理を行った（③）。4℃、14,000 rpmで5分間の遠心分離を行い（④）、上清を取り除いた（⑤）。この①から⑤の操作は、沈殿が白色ないし灰白色になるまで繰り返した。次に、氷冷した99%アセトン1 mlを加え、ボルテックスで攪拌した後、氷冷下で5分間の超音波処理を行った。4℃、14,000 rpmで5分間の遠心分離を行った後、上清を取り除き、沈殿物を真空デシケーター中で乾燥させた。

乾燥した試料に500 µlのDense SDS buffer[30% Sucrose、2% SDS、0.1 M Tris-HCl（pH 8.0）、5% 2-mercaptoethanol]を加え、ボルテックスした。次いで、3分間の超音波処理を行った後、400 µlの平衡化中性フェノールを加え、再度5分間の超音波処理を行った。ボルテックスした後、14,000 rpmで5分間の遠心分離を行い、上層を300 µlずつ新しいマイクロチューブに分注し、それぞれに0.1 M 酢酸アンモニウム含有メタノールを1.5 ml加えて転倒混和後、-20℃で一晩インキュベートした。次に、4℃、14,000 rpmで10分間の遠心分離を行い、上清を取り除いた。沈殿物に0.1 M 酢酸アンモニウム含有メタノールを1 ml加え、ボルテックスで撹拌した。4℃、14,000 rpmで5 分間の遠心分離を行い、上清を取り除いた後、0.1 M

酢酸アンモニウム含有メタノールを 1 ml 加えて同様の操作を繰返した。さらに 80% アセトンを 1 ml を加えてボルテックスした。4℃、14,000 rpm で 5 分間の遠心分離を行い、上清を取り除いた後、80% アセトンを 1 ml 加えて、同様の操作を繰返した。得られた沈殿物は真空デシケーター中で乾燥させタンパク試料とした。

2.2.3 タンパク質の定量

試料に膨潤液［7M Urea、2M Thiourea、4% 3-（(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio) -1-propanesulfonate、0.5% IPG buffer（GE healthcare)、0.05% Tri-n-butylphosphine、微量の Bromophenol blue（BPB)］を 50 µl 加えてボルテックスで撹拌し、泳動に用いた。膨潤液に溶解したタンパク質濃度は、プロテインアッセイ濃縮色素試薬（Bio-Rad）を用い、Bradford アッセイ法（Bradford 1976）を参考に行った。

2.2.4 二次元電気泳動

一次元目は 13 cm の Immobiline DryStrip（pH 4-7）（GE healthcare）を使用し、IPGphor 3（GE healthcare）を用いて電気泳動を行った。泳動条件は IPGphor 3 付属のプロトコルを参考にし、0 V で 10 時間（サンプルの膨潤のため)、500 V（電圧変化パターン Step and Hold）で 1 時間、1000 V（電圧変化パターン：Gradient）で 1 時間、8000 V（電圧変化パターン：Gradient）で 2 時間 30 分、8000 V（電圧変化パターン：Step and Hold）で 55 分とした。タンパク質が泳動された DryStrip は SDS 平衡化バッファーA ［50 mM Tris-HCl（pH 8.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.25% Dithiothreitol（DTT)、微量の BPB］を 5 ml 中で振とうしながら室温で 15 分間放置した。SDS 平衡化 buffer A を取り除き、SDS 平衡化 buffer B［50 mM Tris-HCl（pH 8.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.5% iodoacetamide 微量の BPB］を 10 ml に移し替え、室温で 15 分間放置した。次いで、DryStrip を SDS-PAGE 泳動用 buffer（25 mM tris、196 mM glycine、0.1% SDS）で洗浄し、SE 600 Ruby（GE healthcare）と EPS 601（GE healthcare）を用いて 10% アクリルアミドゲルで二次元目の電気泳動を行った。泳動後、分離されたタンパク質のスポットは Coomassie Brilliant Blue（CBB）染色を行った。タンパク質スポットの画像解析は PDQest Basic version 8.0（Bio-Rad）によって解像度と色調を調整し、タンパク質スポットの検出を行った。また、各タンパク質の発現量は PDQest Basic version 8.0 を用いて二点比較法によって算出した。なお、泳動像に生じる染色誤差は LOESS 法に基づく局所回帰モデルに従った。検出されたタンパク質のスポットは、本種について Yotsukura et al.（2010）および Kim et al.（2011）によって同定されたタンパク質をもとに推定した。

2.2.5 タンパク質の同定

二次元泳動サンプルは画像解析後、精製水で繰返し洗浄を行った。次いで、栄養塩濃度に依存して発現量が増加するタンパク質のスポットのなかから、発現量が顕著に増加し、

かつゲルから容易に分離が可能であった 5 個のスポットを切り出した。これらのゲル断片は、ゲル内消化プロトコル（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜）にある方法に従い、トリプシンによる泳動ゲル内消化を行った。続く MS/MS 分析は、LTQ Orbitrap XL（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を用い、解析のためのデータベースは Swiss Prot（2013 年 9 月 27 日更新）を使用した。

2. 結果

今回、何れの培養株についても ethanol/phenol extraction method（Nagai et al. 2008）によってプロテオーム解析を行うのに良質なタンパク質が抽出され、二次元電気泳動において良好に分離された。培養水温を変えて育てた葉体について、泳動像の画像解析によってそれぞれ 30℃のものでは 315 個、25℃のものでは 490 個、20℃のものでは 564 個、15℃のものでは 713 個、10℃のものでは 743 個、5℃のものでは 834 個のタンパク質スポットが検出された。今回得られた二次元泳動像は、*S. japonica* 天然株を用いた既存の研究結果（Yotsukura et al. 2010）と類似性が高かった。30℃で特異的あるいは発現量が増加したタンパク質のスポットは 26 個（Fig. 19）、25℃では 32 個（Fig. 20）、20℃では 28 個検出された（Fig. 21）。これらのうち、すでに同定されているタンパク質は、30℃で検出された 26 個のスポットのうち 4 個（5733、5807、5613、7626:Vanadium-dependen bromoperoxidase 2）、25℃で検出された 32 個のスポットのうち 5 個（3811: Transketolase、4512: ATP synthase F1, alpha subunit、4817: Transketolase、5405: ATP synthase F1 subunit alpha、5510: Vacuolar ATP synthase subunit B）、20℃で検出された 28 個のスポットのうち 10 個（4512: ATP synthase F1, 4817: Transketolase、alpha subunit、5405: ATP synthase F1 subunit alpha、6410: Glucose-6-phosphate isomerase、6706: Vanadium-dependen bromoperoxidase 2、7408: Translation elongation factor Tu、7502: Vacuolar ATP synthase subunit B、7618: Vanadium-dependen bromoperoxidase 2、7624: Vanadium-dependen bromoperoxidase 2、7707: probable cell division protein FtsH）であり、これらのうち 3811、4817、6410、6706、7624、7707 は本種天然株のうち夏季（8 月）に採集された個体で発現量が増加するタンパク質であった。

一方、培養栄養塩濃度を変えて育てた培養した葉体については、それぞれ栄養塩無添加のものでは 423 個、0.29 mM NO_3^-と 0.06 mM PO_4^{3-}を添加したものでは 395 個、0.59 mM NO_3^-と 0.12 mM PO_4^{3-}を添加したものでは 328 個、1.18 mM NO_3^-と 0.24 mM PO_4^{3-}を添加したもの（コントロール）では 387 個のタンパク質スポットが検出され、二次元泳動像は *S. japonica* 天然株を用いた既存の研究結果（Yotsukura et al. 2010）と類似していた。しかし、2.26 mM NO_3^-と 0.48 mM PO_4^{3-}、4.52 mM NO_3^-と 0.96 mM PO_4^{3-}を添加したものでは他の培養条件のものと結果が大きく異なり、*Pyropia haitanensis* Chang et Zheng 培養株を用いた既存の研究結果（Kim et al. 2011）と類似性が高かった。従って、これら 2 つの培養条件で育てた個体についてタンパク質の発現量を他の条件で育てた個体のものと比較することは困難であった。今回、行った全ての条件で共通して現れたタンパク質スポットは 107 個であり、これらの

うち、栄養塩の添加量が少なくなるにつれ、発現量が増加する傾向が見られタンパク質スポットは 51 個検出された。そのなかで、著しく発現量が増加したものは 14 個で（1402、、2208、2307、2613、3309、3407、3413、3513、4206、4307、5416、5308、6403、7511）（Fig. 22）、栄養塩無添加条件で著しく増加したものは 9 個であった。著しく発現量が増加した 15 個のタンパク質スポットのなかで、今回、5 スポット（1402: 14-3-3 like protein、3407: Putative malate dehydrogenase または Catalase-peroxidase、5416: Nicotinate phosphoribosyltransferase または tRNA（His）guanyltransferase、6403: DNA-directed RNA polymerase III subunit rpc3、7511: Ferredoxin-NADP reductase）についてタンパク質を同定することができた（Table 13）。

3. 考察

生物体にかかる環境ストレスの検出は、ストレス応答性タンパク質の発現を制御する遺伝子の発現量を調べることもできるが、一般に、RNA 抽出後の遺伝子の特定までの過程は複雑であり、そもそも本研究で扱う *S. japonica* のような多糖類を多く含む組織からの RNA 抽出は容易ではない（Hong et al. 1997）。一方、AFLP 分析によってもストレスの影響を調べる試みが行われているが、本研究のなかでもしばしば述べている通り、AFLP 分析は再現性のある結果を得ることが難しいうえ、これを用いた方法は長期的なストレスによって集団内に生じた遺伝的変異からストレスの影響を調べるものであり（e.g. 亀田ら 2004）、今回のように環境変異によって変化した生理状態を知ることは出来ない。また、近年ではトランスクリプトーム解析を利用したストレスの研究も行われるようになっているが、その研究例は少ない（Heinrich et al. 2012）。一方、生体内におけるタンパク質は生育環境条件に応じて発現量が変化するため、その環境下における生理状態を知ることができる。従って、ストレスに応答する遺伝子の発現によって生産されるタンパク質を指標とすることにより、対象とする生物が生育環境から受けるストレスを検知することが可能である。これまで、海藻類を材料にしたストレス応答性タンパク質の研究は多くはないが（e.g. Xu et al. 2013）、コンブ類でも暖海性の *E. cava* について温度ストレスタンパク質に関する知見が次第に蓄えられつつあり（Yotsukura et al. 2012、Nagai et al. 2013）、タンパク質のプロファイリングによる比較は藻体が受ける環境ストレスを理解する手段として有効であることが示唆される。

本研究では、Nagai et al.（2008）の方法を参考にタンパク質を抽出したが、この方法は他の海藻類で行われている方法（e.g. Wong et al. 2006）に比べて簡易的かつ効果的である。Kim et al.（2011）は、今回の方法を用いて *S. japonica* についてタンパク質の単離や二次元電気泳動を試みているが、解析に有効な泳動像が得られなかったことを報告している。しかし今回、解析に足る十分な量のタンパク質が得られ、かつ分析可能な泳動像が得られたため、本抽出法は本種においても有効であることが示された。なお、将来、本種の遺伝的多様性の保全に向けて、本解析において大量のサンプルを扱う必要性が考えられる。Kim et al.（2011）はタンパク質抽出後の精製を簡便かつ短時間で行うことが出来る市販の Kit を利用して好成果をあげていることから、今後、Kit を利用することにより多くの試料を効率的に調整す

ることができるものと期待される。

今回、*S. japonica* について異なる水温条件と栄養塩濃度条件に依存して発現量が増減する複数のタンパク質スポットが得らえた。特に、水温 25℃から 30℃で培養した個体では、本種天然株で夏季（8 月）に顕著に発現量が増加する Vanadium-dependen bromoperoxidase 2（Yotsukura et al. 2010）が検出されており、発現量が増加したほかのスポットについても高温ストレスによって発現量が増加したものであると思われる。なお、BPO は有機物質のブロモ化を行う酵素で、halo-organic compounds の合成や、peroxidase の消費に関わっている。また、紅藻類では、藻体上の微細藻類の着生防御や、藻体上の biofilm formation の防御に働くことが知られており（Givckov et al. 1996、Gram et al. 1996、Ohsawa et al. 2001）、これらのことから、高水温の生育環境のもとではこの酵素が SOD とともに活性酸素種を消去し、酸素障害を防御していることが考えられる。ところで、今回の材料として用いた胞子体は函館市住吉産の個体に由来するが、採集地点の 8 月の水温は 22℃であったことから、25℃以上の水温は本種の生育条件として適さない。従って、25℃から 30℃で発現量が増加したタンパク質スポットは高温ストレスマーカーとして有効であると考えられる。今後、これらのスポットについてもタンパク質の同定を行い、その機能から有効なマーカーを選択し、藻場の健全性をより的確に測ることに努める必要がある。近年、日本近海における海水温の上昇が指摘されており（桑原ら 2006）、ロシア極東域が起源と考えられている（Yotsukura et al. 2006）北日本の寒海性コンブにとって高水温化は深刻である。また、本種を含め、多くのコンブは雑海藻や食植動物との競合から次第にその生育場所を水温の高い浅海域に移していることも報告されている（邵 2013）。今回得られた高水温ストレスマーカーは、既に知られている *E. cava* と共通するものも多いことから、これらマーカーは本種のみならず、広く北日本沿岸のコンブの保全にとって役立つことが期待される。なお、本種の垂直分布は潮間帯中部から漸深帯である（吉田 1998）。一般に、深所では浅海域に比べて夏季でも水温は低く、本研究で材料を集める際に行った環境調査によると、例えば、忍路湾の水深 1.5 m 付近では水温が 23.6℃であったが、水深 3.5 m 付近では 21.3℃であった。深所性の個体群について、通常浅海域では 1 年で寿命を終える北海道日本海沿岸南部において 2 年目に移行することが報告されている。本種の寿命がこれまで報告されているように遺伝形質であるならば（船野・坂井 1964）、遺伝的多様性の保全の観点から鑑みて、これらの小規模な群落も維持に努めなければならない。従って、今後は 20℃条件下で発現量が増減するタンパク質についても、藻場の健全性の評価のために検討する必要があろう。

これまで *S. japonica* について、貧栄養ストレスによって発現量が増減するタンパク質についての報告はない。しかし今回、貧栄養条件で培養した個体について、コントロールのものと比べて発現量が増減するスポットが検出された。また、栄養塩を添加せずに培養した個体では発現量が増加した 51 スポットを検出し、著しく発現量の変化した 9 スポットのうち 5 スポットについてタンパク質を同定することができた。本種の分布域の栄養塩濃度はさまざまであるが、例えば、貧栄養海域であり磯焼けの進行する北海道日本海沿岸南部

においては、今回の栄養塩無添加を除く全ての条件以上の窒素・リン濃度が検出されていることから（中多ら 2001）、本研究によってそれぞれの条件下で検出された特異スポットはストレスマーカーとして利用できると考えられる。今後は、得られたタンパク質の機能を精査し、それぞれの生育場所においてわずかな栄養塩濃度の違いを反映するマーカーの検出を試みる必要がある。ところで、栄養塩濃度はコンブ葉体の成熟に影響することが報告されている（e.g. 水田ら 2003）。今後、本研究を継続していくなかで、各地の藻場の維持存続に大きく関わる種（胞子）の供給について議論できるかもしれない。

第5章　藻場造成に向けたコンブ葉体由来のバイオフレーバー活用の有効性の評価

1. 緒言

海洋生物が有するさまざまな揮発性の匂い物質（バイオフレーバー）が生態系で化学信号として巧みに利用されていることが明らかになっている（梶原 1993）。コンブ類のバイオフレーバーについては、広くコンブ類の糸状配偶体から放出される性フェロモンであるラモキシレンや、*S. angustata*（Kjellman）C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders や *Laminaria digitata*（Hudson）J.V.Lamouroux の葉状胞子体から放出されるアルデヒドを含めた数種類の揮発性成分が知られている（Boonprab et al. 2003、Goulitquer et al. 2009）。ラモキシレンは雌性配偶体が卵を形成すると分泌され、雄性配偶体から精子の放出を促すとともに精子を卵に誘引する。しかし、コンブ類の胞子体から放出されるバイオフレーバーが発する化学信号については未だ不明である。Akakabe and Kajiwara（2008）は緑藻 *Ulva pertusa* Kjellman とそれを摂時する巻貝 *Lunella. coronata coreensis*（Recluz）について、後者は前者葉状体が放つバイオフレーバーに誘引されることを報告している。北海道沿岸において、*S. japonica* はウニによる高い摂餌圧を受け、各地で藻場の衰退・消失が深刻化している。そこで、*S. japonica* の葉体が放出するバイオフレーバーによってウニを駆集することができれば、本種遺伝資源の保全にむけて明確な指針が得られる。

本章では、コンブ葉体から抽出したバイオフレーバーがウニを誘引する性質があるか否かを検証したうえで、これらをアルギン酸ゲルに添加した際のウニの誘引効果を検証した。さらに、11 種類の揮発性成分混液を添加した高分子ゲルによるウニの駆集効果を調べ、コンブ遺伝資源の保全に向けた効果的なウニ除去法の開発を試みた。

2. 材料と方法

2.1 材料

材料の *S. angustata* 胞子体は、北海道様似町冬島において採集した（Fig. 1）。採集した胞子体は、4℃以下で冷却しながら速やかに実験室に輸送した。一方、行動実験に用いるキタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus*（A. Agassiz）は、北海道小樽市忍路において 12 個体採集し、実験に供与するまで北海道大学忍路臨海実験所の室内水槽のなかで海水を掛け流した状態で飼育した。

2.2 方法

2.2.1 バイオフレーバーの抽出

採取した胞子体は、付着器と、葉状部の先端部分および枯死した部分を切除し、蒸留水で表面をよく洗浄した後、1-2cm 角に細断したものを液体窒素で急速凍結させた。その後、試料は実験に供するまで-80℃で保存した。葉体中のバイオフレーバーは、Boonprab et al.

（2003）にある方法を参考に抽出した。具体的には、-80℃で保存された葉片をおよそ 16 g 計量し、氷上に置いた乳鉢に移して液体窒素を加えながら粉末になるまで磨り潰した。次いで、これを 100 ml ビーカーに移し、0.05 M 2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）buffer を 80 mL 加えて氷冷しながらポリトロンホモジナイザー（AHG-160A）を用いて破砕した。その後、組織懸濁液をマグネチックスターラーで穏やかに撹拌しながら、4℃で 80 分間インキュベートした。懸濁液は 8 重にしたガーゼで濾過し、これをバイオフレーバー抽出液として実験に用いるまで 4℃で保存した。

2.2.2 バイオフレーバーのウニ誘引効果の検証

上記バイオフレーバー抽出液 30 ml と 2.0% アルギン酸ナトリウム溶液 30 ml を混合し、1.0%のバイオフレーバー含有アルギン酸ナトリウムゲルを調整した。これを直方体水槽の両端にそれぞれゲルとコンブ葉体を静かに沈め、6 個体のウニを投入してから、30 分ウニの行動を観察した。なお直方体水槽の短辺は 50 cm、長辺は 120 cm で、水槽内にはウニが浸る程度の海水を加えた（Fig. 23）。誘引効果の判別は、観察時間内のウニの行動：①移動の様子と②ゲルに接触後の様子、から判断した。

2.2.3 天然コンブ葉体から抽出したバイオフレーバー添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証

2 種類の高分子ゲル［①3.0% アルギン酸ナトリウム溶液 10 mL とバイオフレーバー抽出液 10 mL を混合して得られた 2.5% のバイオフレーバー含有アルギン酸ナトリウムゲルと、②バイオフレーバー無添加ゲル］を調整した。なお、作製したゲルの形状によってウニの誘引効果に違いが生じないようにゲルの形は球型に統一し、ゲルが水底に留まるように沈子として 3 個の直径 9 ml のアルミナボールをゲルのなかに包埋した。

ウニの行動観察直前に、短辺 15 cm、長辺 25 cm の角型水槽に海水量が 1.8L になるように調整した。観察は、1 個体のウニと、ひとつのゲルを同時に Fig. 24 に示す通り水槽の両端に静かに沈め、直後から時間を計測した。バイオフレーバーの誘引効果は、ゲル投入後からのウニがゲル表面に接触するまでの時間から評価した。なお、管足をゲルに積極的に伸ばしている状態を接触とし、ウニが移動の過程で棘がゲルに触れた場合は接触として扱わなかった。また、ウニのゲルへの接触の有無にかかわらず、観察は 30 分間で終了し、バイオフレーバー無添加ゲルと添加ゲルについて観察をそれぞれ 5 回行った。一回の観察が終了した時点で水槽をよく洗浄し、海水を全量交換した。

2.2.4 コンブ葉体に含まれる特定揮発性化合物添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証

Boonprab et al.（2003）にある *S. angustata* に含まれる 11 種類の揮発性化合物：n-Hexanal、（E）-2-Hexenal、1-Octen-3-one、（E）-2-Octenal、1-Octen-3-ol、（E, E）-2, 4-Heptadienal、（E）-2-Nonenal、（E, Z）-2, 6-Nonadienal、（E）-2-Nonen-1-ol、（E, E）-2, 4-Dodecadienal、tridecanal

の混合溶液を調整した。ゲルの組成は、2.5% アルギン酸ナトリウム溶液 20 ml に異なる量の揮発性成分混合液を添加し（Table 14）、それを蒸留水で 40 ml となるように調整した。ウニの行動観察直前に、長辺 80 cm、短辺 40 cm の水槽内で海水量を 5L に調整した。6 個体のウニを入れた水槽の中央部にゲルを静かに沈め（Fig. 25）、直後から時間を計測し、60 分間ウニの行動を観察した。ウニの誘引効果は、本章の 2.2.2 と同様に評価した。作製した 4 種類のゲルについて、それぞれ 3 回の試験を行った。

3. 結果

3.1 バイオフレーバーのウニ誘引効果の検証

観察開始直後、バイオフレーバー添加ゲルへ向かうウニは 2 個体、コンブ葉体へ向かうは 1 個体であった。実験開始 11 分後には、コンブ葉体にさらに 1 個体のウニが移動したが、コンブ葉体に到達後、その場には留まらず、その直後にゲルの方向に移動を開始した。開始からおよそ 24 分後には 5 個体がゲル周辺に留まっていた。

3.2 天然コンブ藻体から抽出したバイオフレーバー添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証

バイオフレーバー無添加ゲルを用いた場合、1 回目の観察では、ウニは投入後静止を続け、ゲルに接触することはなかった。2 回目は、ウニは投入直後から水槽の接触面に沿って移動し、開始 3 秒後には接触面の隅に達し、さらに 44 秒後には反対側の隅に移動し、その後は静止し続けた。3 回目は、8 秒後に接触面の隅に移動し、その後壁面に沿ってゲルを設置した壁面側に移動を開始した。その 36 秒後にゲルに到達し、2 分 1 秒間ゲルに管足を接触し続けたが、やがて管足をゲルから離して静止し続けた。4 回目は、ウニはゲルを沈めた方向へ移動し、開始 29 秒後にゲルと接触したものの、間もなく壁面に沿って移動し、隅で静止し続けた。なお、ウニはゲルと棘が接する位置にあったが、管足による接触は見られなかった。5 回目は、開始から接触面に沿って移動し、5 秒後に隅に到達した後、壁面に沿ってゲルを沈めた壁面側に移動した。さらに、50 秒後にゲルに到達し、隅に留まりながら 2 分 4 秒間ゲルに管足を接触し続けた。

一方、バイオフレーバー添加ゲルを用いた場合、一回目の観察では、ウニは投入直後から水槽の接触面に沿って移動し、開始 30 秒後には水槽の隅に達して静止し続けた。2 回目は、ウニは 1 回目と同様に水槽壁面に到達した後、長辺壁面からゲルの配置壁面に沿って移動してゲルに接触した。しかし、その直後にゲルから離れ、実験終了までゲルの傍らで静止を続けた。3 回目は、実験開始直後にゲルを沈めた方向に移動し、開始 44 秒後にゲルに接触してその状態を保った。4 回目は、ウニは直ちに水槽壁面から離れて長辺壁面に移り、壁面に沿ってゲルを沈めた壁面に移動した。観察開始から 51 秒後にウニはゲルに接触したが、直後に長辺壁側に移動して静止を続けた。5 回目は、ウニは観察開始から 4 回目と同様の動きを見せ、41 秒後には管足をゲルに伸ばして接触していたが、1 分 58 秒後には管足を

離して壁面で静止を続けた。

以上、2種類のゲルを用いた実験を通して、水槽内でウニがゲルに直行することはなかった。

3.3 葉体に含まれる特定揮発化合物添加ゲルを用いたウニの誘引効果の検証

ゲルの重量40 gと同じ湿重量の*S. angustata*胞子体に含まれる揮発性成分をゲルに添加した場合、1回目の観察ではゲルに接触したウニは見られず、ウニは開始からほとんど移動しなかった。2回目は、開始から14分8秒後に1個体がゲルに到達し、21分36秒までゲルの傍に留まったていたが、管足を伸ばして接触する行動は認められなかった。なお、ゲルに接触したのはこの1個体のみで、他の個体は水槽内を移動したが、ゲルに向かって移動しなかった。3回目は、1回目と同様にゲルに接触した個体はなかった。

コンブ葉体に含まれる揮発性成分の5倍量を添加したゲルでは、1回目にはゲルに接触する個体は見られなかった。この際、ウニは水槽内の壁面に沿って活発に移動し、開始から26分10秒後に1個体がゲルの設置場所に到達したが、管足をゲルに接触するに至らなかった。2回目はゲルに向かって移動する個体は見られなった。3回目は25分40秒後に1個体がゲルに接触したが、1回目と同様に管足をゲルに接触するに至らなず、その直後にゲルから離れた。

一方、10倍量では、開始から16分01秒後、1個体がゲルに接触し、観察を終えるまでゲルに留まった。この個体はゲルに到達後、管足をゲルに接触させ、さらにゲルの摂食を行った（Fig. 26)。2回目は2分24秒後に1個体目のウニがゲルに到達し、次いで開始から32分後に2個体目、40分後に3個体目がゲルに到達した。ゲルに接触したウニのうち、2個体は観察終了まで管足をゲルに接触し続けていた。3回目、4分28秒後に1個体目が、16分19秒後には2個体目がゲルに到達した。開始から19分50秒頃に3個体目がゲルに接触したが、この個体は間もなくゲル離れた。

以上の通り、10倍量のバイオフレーバーを添加したゲルでは、ウニを誘引する効果がみられたが（Fig. 26)、それ以下の濃度を添加したゲルは誘引効果がなく、また、ゲルの近くに接近しても管足にる接触はなかった。

4. 考察

本研究における遺伝的多様性調査の結果、周辺の地域とは遺伝的に分化した産地がいくつか見つかった。また、忍路湾における7地点において採集された個体を材料に、同産地内でも群落レベルで遺伝的差異を検出することができた。これらの小規模な個体群を保全することは本種の遺伝的多様性を維持するために極めて重要と考えられる。これまで、藻場の衰退の原因について調査が行われており、物理的・化学的要因のみならず（道津ら 1999、峰ら 2000)、ウニの摂餌圧が大きく関与していることが明らかになっている（桑原ら 2000)。ウニの除去によってコンブ類の群落が回復することが各地で観察されており（Watanuki et al.

2010）、*S. japonica*群落とキタムラサキウニの生育量に関しては1 m^2の群落あたり85 g以下の重量に管理する必要があることが指摘されている（桐原ら 2009）。このように、ウニの除去はコンブ藻場の衰退を防ぐために有効な手段であると考えらえるが、一般に、ウニの除去はダイバーによる人力で採りあげる方法によって行われており、その継続的な実施は容易ではない。ウニは摂餌選択性が高く、例えばアカウニ *Pseudocentrotus Depressus*（A. Agassiz）では紅藻や緑藻よりも褐藻のワカメやヒジキを好んで摂餌することが報告さている（中村・芳永1962）。しかし、褐藻のなかでもフロロタンニンを持つホンダワラ類やテルペン類を持つアミジグサ類などは好んで食さない（谷口ら 1994）。キタムラサキウニの餌料効果については、様々な海藻類のなかで特にコンブ類の摂餌量が多いことが報告されているが（名畑 1999）、この種のウニはコンブについて高い摂餌選択性があることが広く経験的にも知られている。

食植性動物の小型巻貝のスガイ *Lunella coronata coreensis* は、海藻類に含まれる揮発性成分を感知することで、餌となる海藻を認識していると考えられている（Akakabe and Kajiwara 2008）。今回、ウニにコンブ葉体とバイオフレーバー添加ゲルを同時に与えたとところゲルを選択する個体が見られたことから、キタムラサキウニもこれらの揮発性成分を感知して索餌を行っていることが推察され、これらの揮発性成分を利用することでウニを誘引することの可能性が示された。しかし、バイオフレーバー添加ゲルと無添加ゲルを用いた場合、ウニがゲルに到達しても管足をゲル表面に短時間伸ばすだけにとどまり、管足を離した後は水槽壁面で静止していたことから、添加したバイオフレーバーの誘引効果が目立って表れなかった。ウニの誘引効果が見られた先の実験では、1.0% アルギン酸ナトリウムゲルを用いたが、バイオフレーバー添加ゲルと無添加のゲルの比較では 1.5% アルギン酸ナトリウムゲルを用いており、この濃度差が誘引効果に影響を与えたことが考えらえる。一般に、ゲル中の物質の拡散挙動は網目鎖濃度に依存し、ゲルの濃度が高まるとともに網目鎖濃度も高まることが知られている（長田・梶原 1997）。なお、ゲルの架橋度もゲル中の物質の拡散挙動に影響を及ぼすが、今回、ゲル化時間を統一しているためにこの要因は排除される。これらのことから、アルギン酸ナトリウムの濃度調整によりバイオフレーバーの放出速度を調整することが可能であり、アルギン酸ナトリウム濃度 1% 以下のゲルを作製することにより高い誘引効果のあるゲルが作製できると期待される。一方で、ゲル濃度の低下はゲル本体の耐久性の低下を招く。今回、バイオフレーバー添加ゲルは実海域におけるウニの駆集を目的に開発を進めており、ゲルには実海域の物理環境に耐える強度を持たせる必要がある。ゲルの強度は、アルギン酸ナトリウムの濃度に依存しており、サガラメ胞子体の着底を助長させるための補助剤としてアルギン酸ナトリウムゲルを利用した報告では、1% ゲルは塗布直後にすべて流出しており、2% では 4 日後、3% では 19 日後に流出している（蒲原 2007）。また、本研究における予備試験として 1%、1.5%、2% のアルギン酸ゲルを基質に塗布して実海域に設置したところ、1% のゲルは数日で流出する様子が観察されている（平成 22 年度地域イノベーション創出研究開発事業成果報告書）。これらのことを

ふまえ、ゲル中のバイオフレーバーの放散能と、ゲル本体の耐久性から最適なゲル濃度は1.25%ゲルと見込まれる。

今回、11種類の揮発性化合物について天然*S. angustata*葉体に含まれる10倍量の添加ゲルをキタムラサキウニに与えたところ、水槽内でゲルに直行する個体が見られた。この結果から、これらの揮発性化合物がウニの誘引に関与していることが確かめられた。ところで、化合物の添加量が1倍量と5倍量では誘引効果が認められず、10倍量ではじめて効果が得られたが、これは添加した化合物が何れも疎水性が強くいためにバイオフレーバー抽出液に比べゲルからの放出が起こりにくいことによると思われる。これらの化合物が疎水性であるにもかかわらずゲルから放出されたのは、一般に溶媒中の物質の拡散が濃度勾配によって起こり（山本 2010）、その拡散係数は濃度に依存して変化する（古賀・佐藤 1989）ためであると考えられる。また、アルギン酸ナトリウムゲルは、Ca^{2+}を介してポリマー間に架橋が起こることから、海水中に設置したゲルは海水中に存在するCa^{2+}によって徐々に架橋が進み、収縮が起こることでスクイージング効果によってゲルから成分が放出されたとも考えられる。これらのことから、揮発性成分の添加量に関わらずこれらの物質はゲル本体から放出されており、濃度変化させることでウニの誘引効果が得られると期待される。なお、本研究の結果から、10倍量を添加したときにゲルから放出される揮発性成分の量がウニの感知できる閾値であったと推察される。

今回、バイオフレーバーを用いたウニの駆集にゲルを利用したのは、その徐放性除を見込んだためである（長田 1997）。また、その成分としてアルギン酸ナトリウムを用いたのは、実海域に投入しても生分解性であるため環境負荷がほとんどないことや、ゲル化の際に温度変化を伴わないこと、さらにはゲル化の際に熱を放出しないことによる（平成22年度地域イノベーション創出研究開発事業成果報告書）。一方、今回用いた何れの揮発性物質も環境中に存在する物質であるが、今後、これらを多量に利用することは環境への負荷の点から問題がないわけではない。コンブ類から抽出されたバイオフレーバーの組成について、（2E）- Nonenal、（2E）- Nonenol、Hexenal、（2E）- Hexenol、（3Z）- Hexenolが主成分であり、これらのC6とC9の不飽和アルデヒド類が陸上職物の香り成分でもあることが報告されている（梶原 1993）。キュウリの破砕液中に含まれる臭気成分にも2E）-ノネナールやヘキサノールが含まれることから（Cho and Buescher 2011）、これらを活用することで安全かつ安価にウニの駆集効果が得られる誘引ゲルを開発することが可能かもしれない。

本稿の第2章と第3章で述べた遺伝的多様性の調査の結果、現在産業種として取り扱われている*S. japonica*4変種の枠組みとは異なる4つの遺伝子集団が見出され、それぞれの集団は明確な遺伝的分化が認められた。これらの4集団に属する産地の多くはひとつの遺伝子組成が優先していたが、地域によっては複数の組成の混在が見られた。本種の遊走子の拡散能力は高くないため（秋野ら 2006）、このような遺伝的組成の混在は遺伝的攪乱に起因することも大いに考えられる。そのため、今後、このような遺伝的攪乱を避け、地域個体群が持つ遺伝的特性を持続させることが本種の多様性を維持するために必要であろう。

さらに、単一産地に生育する個体であっても群落レベルで遺伝的な違いが検出されたことから、それぞれの遺伝特性を持つ小規模な群落の衰退・消失を防ぐことも本種の遺伝的多様性を保全するうえで重要である。これら多様性の保全策を施すにあたり、第 4 章で述べた環境ストレス応答性タンパク質を利用した藻場診断技術は藻場の健全性を評価し、環境ストレスの原因を特定することで藻場の衰退を未然に防ぐための足掛かりとなろう。また、本章で述べたバイオフレーバー添加ゲルによるウニの駆集は、胞子の供給源となる核藻場や小規模な地域個体群を食植性動物から守り、コンブの遺伝的多様性を保全するための現実的な施策として期待されるものである。

謝　辞

本研究を纏めるにあたり、ご指導と校閲の労を賜った北海道大学北方生物圏フィールド科学センターの四ツ倉典滋准教授に深甚なる謝意を表すとともに、本校の取り纏めに際して有益なご教示をいただいた北海道大学北方生物圏フィールド科学センターの仲岡雅裕教授と宮下和士教授に厚くお礼を申し上げる。

研究を遂行する上で種々のご助言をいただいた Kamchatka State Technical University の Prof. Nina G. Klochkova、Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences の Prof. Shao Jun Pang 北海道大学総合博物館の阿部剛史講師、Kasetsart University の Assist. Prof. Kangsadan Boonprab、北海道大学北方生物圏フィールド科学センターの福井信一氏、北海道立総合研究機構水産研究本部の川井唯史博士と佐々木正義氏、青森県水産総合センターの藤川義一氏、株式会社 GEL-Design の勝山吉徳博士に深く感謝する。さらに、材料の収集にご協力をいただいた北海道大学忍路臨海実験所の柴崎康二氏、北海道大学臼尻水産実験所の宮島侑也氏、渡島中部地区水産技術普及指導所の中尾博己氏、函館市南茅部漁業協同組合の吉崎欣也氏、函館市漁業協同組合の井上敏夫氏と佐々木浩之氏、様似町役場産業課の杉本記史氏にお礼申し上げる。

最後に、日々の作業にご助力いただいた所属研究室の加藤弘美氏、河村美恵氏、木下大旗氏、鴻江麻淑氏、谷昌也氏、玉野聖子氏、永井野風氏、藁科亜友美氏に感謝します。

要　約

コンブの一種 *Saccharina japonica* は、北海道を中心とする北太平洋沿岸西部の寒海域に広く分布し、各地で大規模な藻場を形成する生態的な重要種である。本種は形態変異に富み、その生育環境もさまざまであるが、近年の地球規模の環境変化によって北日本沿岸で広く資源量は減少している。今後、本種在来個体群の遺伝的固有性を考慮した藻場造成を行う

ために、集団構造を詳細に理解し、適切にその多様性の保全に努める必要がある。

本研究では、北海道沿岸とその周辺域の *S. japonica* について、個体群間の遺伝的多様性を DNA 多型解析によって明らかにするため、先ずは、粘質多糖類を多量に含む葉体から解析に有用な高純度 DNA の抽出方法の確立を試みた。そのなかで今回、組織の洗浄、SDS 処理、CTAB 処理を作業の柱とする方法が見出され、得られた DNA を用いた AFLP 分析では高い再現性のある結果が得られた。また、抽出 DNA を鋳型とした Dual-Suppression PCR 法によりマイクロサテライトマーカー10 種類も開発することができた。AFLP 分析とマイクロサテライトマーカー分析の結果、本種内の既存変種の枠組みを超えた地域個体群の存在が認められたほか、周辺の地域とは遺伝的特性の異なる孤立した遺伝子集団の存在も明らかになった。さらに、単一産地内の群落についても物理的環境要因によって遺伝的な分化が生じることが示唆され、このような小規模群落を維持こと も本種の遺伝的多様性を保全するうえで重要であることが示された。また、本研究では *S. japonica* 藻場の衰退に深く関わる環境因子である水温と栄養塩濃度の変化に依存して発現量が増減するタンパク質を探索し、vBPO などの環境ストレス応答タンパク質をマーカーとした藻場の健全性を計る技術を開発した。さらに、本種の小規模群落や、胞子の供給源となる核藻場の保全に向けて、コンブ葉体由来の揮発性化合物がコンブ摂餌動物（キタムラサキウニ）の誘引に働くことを確かめ、化合物添加の高分子ゲルを利用した新たなウニの駆集方法を提案した。

文　献

Adams RP, Zhong M, Fei Y (1999) Preservation of DNA in Plant specimens: inactivation and re-activation of DNases in field specimens. Molecular Ecology 8:681-684

Ajisaka T, Kim SH, Uwai S, Kawai H (2007) *Cladosiphon umezakii* sp. nov. (Ectocarpales, Phaeophyceae) from Japan. Phycological Research 55:193-202

赤池章一, 津田藤典, 桑原久実 (2002) 北海道岩内沿岸における天然コンブ群落の形成と維持. 北海道立水産試験場研究報 63:41-54

Akakabe Y, Kajiwara T (2008) Bioactive volatile compounds from marine algae: feeding attractants. Journal of Applied Phycology, 20:661-664

秋野秀樹, 川井唯史, 四ツ倉典滋, 河野時廣 (2005) 北海道泊村沿岸におけるホソメコンブ遊走子の挙動解析の試み. 日本水産工学会学術講演会講演論文集 17:43-46

Alberto F, Raimondi PT, Reed DC, Watson JR, Siegel DA, Mitarai S, Nelson C, Serrao EA (2011) Isolation by oceanographic distance explains genetic structure for *Macrocystis pyrifera* in the Santa Barbara Channel. Molecular Ecology 20:2543-2554

Barner AK, Pfister CA, Wootton JT (2011) The mixed mating system of the sea palm kelp *Postelsia palmaeformis*: few costs to selfing. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 278:1347-1355

Barnwell P, Blanchard AN, Bryant JA, Smirnoff N, Weir AF (1998) Isolation of DNA from the highly mucilagenous succulent plant *sedum telphium*. Plant Molecular Biology Reporter 16:133-138

Bharmauria V, Verma V, Narang N, Sharma S (2010) Efficient DNA isolation from *Emblica officinalis* for effective PCR. Scientific Research and Essays 5:105-109

Biss P, Freeland J, Silvertown J, McConway K, Lutman P (2003) Successful amplification of rice chloroplast microsatellites from century-old grass samples from the park grass experiment. Plant Molecular Biology Reporter 21:249-257

Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. Molecular Ecology 13:3261-3273

Boonprab K, Matsuia K, Yoshidaa M, Akakabea Y, Chirapartb A, Kajiwaraa T (2003) C6-aldehyde formation by fatty acid hydroperoxide lyase in the brown alga *Laminaria angustata*. Zeitschrift für Naturforschung 58:207-214

Boonprab K, Matsui K, Akakabe Y, Yotsukura N, Kajiwara T (2003) Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and (Z) -3-and (E) -2-nonenal formation in *Laminaria angustata*. Phytochemistry 63:669-678

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72:248-254

Brunner I, Brodbeck S, Büchler U, Sperisen C (2001) Molecular identification of fine roots of trees from the Alps: reliable and fast DNA extraction and PCR-RFLP analyses of plastid DNA.

Molecular Ecology 10:2079-2087

Bult C, Källersjö M, Suh Y (1992) Amplification and sequencing of 16/18S rDNA from gel-purified total plant DNA. Plant Molecular Biology Reporter 10:273-284

Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, Macaulay M, Marshall D, Waugh R (2000) Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. Genetics 156:847-854

Cassano V, Oliveira MC, Gil-Rodríguez MC, Sentíes A, Díaz-Larrea J, Fujii MT (2012) Molecular support for the establishment of the new genus *Laurenciella* within the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta). Botanica Marina 55:349-357

Cho MJ, Buescher R (2011) Degradation of cucumber flavor aldehydes in juice. Food Research International 44:2975-2977

Coyer JA, Olsen JL, Stam TW (1997) Genetic variability and spatial separation in the sea palm kelp *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) as assessed with M13 fingerprints and RAPDs. Journal of Phycology 33:561-568

Coyer JA, Smith GJ, Andersen RA, (2001) Evolution of *Macrocystis* spp. (Phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. Journal of Phycology 37:574-585

Coyer JA, Hoarau G, Pearson G, Mota C, Jüterbock A, Alpermann T, John U, Olsen JL (2011) Genomic scans detect signatures of selection along a salinity gradient in populations of the intertidal seaweed Fucus serratus on a 12 km scale. Marine Genomics 4:41-49

Crowley TM, Muralitharan MS, Stevenson TW (2003) Isolating conifer DNA: A superior polysaccharide elimination method. Plant Molecular Biology Reporter 21:97-97

Daguin C, Voisin M, Engel C, Viard F (2005) Microsatellites isolation and polymorphism in introduced populations of the cultivated seaweed *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales). Conservation genetics 6:647-650

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21

Demeke T, Adams RP (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Biotechniques 12:332-334

Dempster EL, Pryor KV, Francis D, Young JE (1999) Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based Analyses. Biotechniques 27:66-68

Denboh T, Ichimura T, Hendrayanti D, Coleman AW (2003) *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. Journal of Phycology 39:960-977

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297-302

Do N, Adams RP (1991) A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. BioTechniques 10:162-164

Donaldson SL, Chopin T, Saunders GW (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as a source of genetic markers for red algae. Journal of Applied Phycology 10:365-370

Donaldson SL, Chopin T, Saunders GW (2000) An assessment of the AFLP method for investigating population structure in the red alga *Chondrus crispus* Stackhouse (Gigartinales, Florideophyceaae) . Journal of Applied Phycology 12:25-35

道津光生, 野村浩貴, 太田雅隆, 岩倉祐二 (1999) 北海道南西部沿岸の磯焼け海域におけるホソメコンブ群落の形成要因について. 日本水産学会誌 65:216-222

Dubut V, Grenier R., Meglécz E, Chappaz R, Costedoat C, Danancher D, Gilles A (2010) Development of 55 novel polymorphic microsatellite loci for the critically endangered Zingel asper L. (Actinopterygii: Perciformes: Percidae) and cross-species amplification in five other percids. European journal of wildlife research 56:931-938

Earl DA, von Holdt BM (2011) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4:359-361

Erting L, Daugbjerg N, Møller Pedersen P (2004) Nucleotide diversity within and between four species of *Laminaria* (Phaeophyceae) analysed using partial LSU and ITS rDNA sequences and AFLP. European Journal of Phycology 39:243-256

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14:2611-2620.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0) : an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics online:1-47

Fang G, Hammar S, Grumet R (1992) A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13:52-4

Faugeron S, Veliz D, Peralta G, Tapia J, Tellier F, Billot C, Martinez E (2009) Development and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in the Chilean kelp *Lessonia nigrescens*. Molecular Ecology Resources 9:937-939.

船野隆, 坂井与志雄 (1967) 忍路湾における2年目ホソメコンブの生態. 北海道立水産試験場研究報告 8:1-37

船野隆 (1984) 北海道の産業種コンブ *Laminariales* の特性と種分化. 水産生物遺伝資源研究会報告書 1. 海藻類. 日本水産資源保護協議会:37-48

船野隆 (1991) ホソメコンブと残留マコンブ, 残留リシリコンブの種苗移植による比較. 水産増殖 39:91-95

Gallagher SR, Desjardins PR (2007) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. Current Z Protocols in Human Genetics:A-3D

Gelfand DH (1989) Taq DNA polymerase. PCR technology: principles and applications for DNA amplification 17-22.

Ghosh R, Paul S, Ghosh SK, Roy A (2009) An improved method of DNA isolation suitable for PCR-based detection of begomoviruses from jute and other mucilaginous plants. Journal of Virological Methods 159:34-39

Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD, Kjelleberg S (1996) Eukaryotic interference with homoserine loctone-mediated prokaryotic signaling. Journal of Bacteriology 178:6618-6622

Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M (1995) A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. Genome Research 4:368-370

Goulitquer S, Ritter A, Thomas F, Ferec C, Salaün JP, Potin P (2009) Release of volatile aldehydes by the brown algal kelp *Laminaria digitata* in response to both biotic and abiotic stress. ChemBioChem 10:977-982

Gram L, de Nys R, Maximilien R, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S (1996) Inhibitory effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* on swarming motility of *Proteus mirablis*. Applied and Environmental Microbiology 62:4284-4287

Griffiths R, Orr K, (1999) The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex - specific markers. Molecular Ecology 8:671-674

Haque S, Ashraf N, Awal A, Sarker RH, Begum S, Khan H (2004) Method for quality DNA isolation from different parts of jute plant: *Corchorus capsularis L.* and *C. olitorius L.*. Plant Tissue Cult 14:143-148

Hedrick PW (1999) Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation evolution 5:313-318

Heinrich S, Valentin K, Frickenhaus S, John U, Wiencke C (2012) Transcriptomic analysis of acclimation to temperature and light stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) .PloS ONE 7:1-13

北海道経済産業局 (2011) 平成 22 年度地域イノベーション創出研究開発事業「高機能ジェルを活用したコンブ目藻類の藻場育成システムの開発」成果報告書

北海道水産林務部 (2010) 平成 22 年北海道水産現勢 (水産林務部総務課編集) . 札幌, 北海道庁

北海道水産林務部（2011）平成 23 年北海道水産現勢（水産林務部総務課編集）. 札幌, 北海道庁

北海道水産林務部（2012）平成 24 年北海道水産現勢（水産林務部総務課編集）. 札幌, 北海道庁

Hong YK, Sohn CH, Lee KW, Kim HG（1997）Nucleic acid extraction from seaweed tissues for polymerase chain reaction. Journal of Marine Biotechnology 5:95-99

堀江秀夫, 菊地伸一, 阿部龍雄, 清水光弘, 小川尚久, 東智則（2003a）木質セメント成型体の海藻礁としての効果（第 1 報）- 上ノ国町沿岸に設置した実大試験体の現存量調査結果-. 林産試験場報 17:1-7

堀江秀夫, 竹花邦夫（2003b）木質セメント成型体の海藻礁としての効果（第 2 報）- 上ノ国町沿岸に設置した実大試験体の現存量調査結果-. 林産試験場報 17:1-7

千川裕, 田嶋健一郎, 川井唯史（2002）ニシン産卵床の形成に及ぼす植生と地形の影響. 北海道立水産試験場研究報告 62:105-111

Hu Z, Zeng X, Wang A, Shi C, Duan D（2004）An efficient method for DNA isolation from red algae. Journal of Applied Phycology 16:161-166

Islam MS, Lian C, Kameyama N, Wu B, Hogetsu T (2004) Development of microsatellite markers in *Rhizophora stylosa* using a dual-suppression-polymerase chain reaction technique. Molecular Ecology Notes 4:110-112

Itou T, Kanno M, Suyama Y, Kamiyama A, Sakamoto SX, Kijima A, Inaba K, Aoki MN（2012）. Development of 12 polymorphic microsatellite DNA markers for the kelp *Ecklonia cava*（Phaeophyceae, Laminariales）. Conservation Genetics Resources, 4:459-461

Jena RC, Samal KC, Das BK（2010）Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of *Mangifera indica L.*. Journal of Agriculture and Food Technology 6:559-571

梶原忠彦（1993）海藻の香り. 化学と生物 31:676-681

亀田豊, 鍵谷澄絵, 益永茂樹（2004）AFLP 手法を用いた *Pseudorasbora parva* に影響する実環境中のストレッサー同定手法の開発. 水環境学会誌 27:699-705

蒲原聡, 伏屋満, 柳澤豊重, 服部克也（2007）アルギン酸ナトリウムと砂の混合ゾルに混入させたサガラメ幼葉の海底基質への移植法. 水産工学 43:201-206

片山貴之, 山盛愛子, 赤崎哲也, 朝長洋祐, 四ツ倉典滋（2006）DNA を利用したコンブ類の種判別. 関税中央分析所報 46:5-12

Kawai H, Sasaki H (2000) Molecular phylogeny of the brown algal genera *Akkesiphycus* and *Halosiphon* (Laminariales), resulting in the circumscription of the new families Akkesiphycaceae and Halosiphonaceae. Phycologia 39:416-428

川井唯史, 四ツ倉典滋（2005）北海道産コンブ属植物の系統分類の現状 -リシリコンブを中心に-. 利尻研究 37-47:2005

川嶋昭二（1989）日本産コンブ類図鑑. 札幌, 北日本海洋センター

川嶋昭二（2012）日本寒海性コンブ類の形態と分類. 東京, 生物研究社

Kejani AA, Tafreshi SAH, Nekouei SMK, Mofid MR (2010) Efficient isolation of high quality nucleic acids from different tissues of *Taxus baccata L.*. Molecular Biology Reporter 37:797-800

Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP, Kumar S (1999) Rapid isolation from dry fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter 17:1-7

Kijas JM., Fowler JC, Garbett CA, Thomas MR. (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. Biotechniques 16:656-662

Kim E, Kim Y, Kim DG, Kim YR., Hwang HJ, Nam TJ, Kong IS (2011) An improved method of protein isolation and proteome analysis with *Saccharina japonica* (Laminariales) incubated under different pH conditions. Journal of Applied Phycology 23:123-130

Kirihara S, Notoya M, Aruga M（1989）Cultivation of *Laminaria japonica* at Hachinohe, Aomori Prefecture, Japan. The Korean Joural of Phycology 4:199-206

桐原慎二, 藤川義一, 今男人, 能登谷正浩（2009）青森県佐井沿岸の磯焼け海域からのキタムラサキウニ除去によるマコンブ群落の形成. Algal Resources 1:45-60

Kitade Y, Yamazaki S, Saga N（1996）A method for extraction of high molecular weight DNA from the macroalga *Porphyra yezoensis*（Rhodophyta）. Journal of Phycology 32:496-498

北川英雄, 大槻忠, 猪尾知弘, 森永勤（2006）マコンブ漁場における水中バックホウを用いた雑海藻除去. 水産工学 42:245-251

古賀満男, 佐藤秀左エ門（1989）ゲル内の拡散質濃度分布と拡散係数の濃度依存性の測定. 福井大学工学部研究報告 37:13-18

Kurihara A, Abe T, Tani M, Sherwood AR（2010）Molecular phylogeny and evolution of red algal palasites: a case study of *Benzaitenia*, *Janczewskia*, and *Ululania*（Ceramiales）. Journal of phycology 46:580-590

Kubota S, Kameyama Y, Ohara M（2006）Characterization of six microsatellite markers in *Trillium camschatcense* using a dual-suppression-polymerase chain reaction technique. Molecular Ecology Notes 6:1135-1137

Kusumo HT, Druehl LD（2000）Variability over space and time in the genetic structure of the winged kelp *Alaria marginata*. Marine Biology 136:397-409

Kusumo HT, Pfister CA, Wootton JT（2006）Small-scale genetic structure in the sea palm Postelsia palmaeformis Ruprecht（Phaeophyceae）. Marine Biology 149:731-742

桑原久実, 赤池章一, 林久哲, 山下俊彦（1997）磯焼け地帯における海藻群落の生育要因に関する研究. 海岸工学論文集 44:1181-1185

桑原久実, 明田定満, 小林聡, 竹下彰, 山下洋, 城戸勝利, 京都大学（2006）温暖化による我学に水産生物の分布域の変化予測. 地球環境 11:49-57

Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Research 21:1111-1115

Lane CE, Lindstrom SC, Saunders GW (2007) A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. Molecular phylogenetics and evolution 44:634-648

Lian C, Zhou Z, Hogetsu T (2001) A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat (ISSR). Journal of Plant Research 114:381-385

Lian C, Hogetsu T (2002) Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-supression-PCR technique. Molecular Ecology Notes 2:211-213

練春蘭, 宝月岱造 (2004) 効率的マイクロサテライト (SSR) マーカー作製のためのプロトコル (< 特集> マイクロサテライトマーカーは森林科学に何をもたらしたか?). 日本林學會誌 86:191-198

Lian C, Wadud MA, Geng Q, Shimatani K, Hogetsu T (2006) An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. Journal of Plant Research 119:415-417

Liu C, Zhang J, Sun X, Li J, Zhang X, Liu T (2011) Genetic analysis of floating *Enteromorpha prolifera* in the Yellow Sea with AFLP marker. Journal of Ocean University of China 10:263-269

Liu F, Yao J, Wang X, Repnikova A, Galanin DA, Duan D (2012) Genetic diversity and structure within and between wild and cultivated *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) revealed by SSR markers. Aquaculture 358:139-145

Loomis WD (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. Methods in Enzymology 31:528-545

Ludington WB, Callicott K, Detomaso AW (2004) Genetic variation in *Mastocarpus papillatus* (Rhodophyta) in central California using amplified fragment length polymorphisms. Plant Species Biology 19:107-113

Mayes C, Saunders GW, Tan IH, Druehl LD (1992) DNA extraction methods for kelp (Laminariales) tissue. Journal of phycology 28:712-716

McDevit DC, Saunders GW (2009) On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. Phycological research 57:131-141

Metzker ML (2010) Sequencing technologies—the next generation. Nature Reviews Genetics 11: 31-46

峰寛明, 高橋和寛, 山下俊彦 (2000) 北海道の磯焼け帯におけるホソメコンブ分布特性への物理環境の影響. 海岸工学論文集 47:1176-1180

宮部金吾 (1902) 北両道水産調査報告巻之三昆布採取業 (第篇分類) . 札幌, 北海道庁殖民部水産課

水田浩之 (2003) 沿岸親潮域に生育するコンブ属植物の分布と栄養塩要求特性 (シンポジウム: 沿岸親潮) . 沿岸海洋研究 41:33-38

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 19:4321-4325

名畑進一 (1991) 北海道後志沿岸の海藻. 北海道立水産試験場研究報告 36:19-38

名畑進一 (1992) 北海道南西部大成町の磯焼け. 北水試研報 38:1-14

名畑進一, 阿部英治, 垣内政宏 (1993) 寿都町磯谷の 2 年生コンブの生態と種苗移植実験. 北海道立水産試験場研究報告 38:25-35

名畑進一, 千川裕, 酒井勇一, 船岡輝幸, 大堀忠志, 今村琢磨 (1999) キタムラサキウニに対する数種海藻の餌料価値. 北海道立水産試験場研究報告 54:33-40

Nagai K, Yotsukura N, Ikegami H, Kimura H, Morimoto K (2008) Protein extraction for 2 - DE from the lamina of *Ecklonia kurome* (Laminariales) : Recalcitrant tissue containing high levels of viscous polysaccharides. Electrophoresis 29:672-681

Nagai K, Morimoto K, Ikegami H, Kimura H, Yotsukura N (2013) Investigation of proteomic profiles of lamina of *Ecklonia kurome* (Laminariales) (: Homology-based cross-species protein identification and analysis of the post-translational processing of vanadium-dependent bromoperoxidases using MALDI-TOF/TOF. Marine Biotechnology 15:487-498

Nagai S, Lian C, Hamaguchi M, Matsuyama Y, Itakura S, Hogetsu T (2004) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). Molecular Ecology Notes 4:83-85

Nagai S, McCauley L, Yasuda N, Erdner DL, Kulis DM, Matsuyama Y., Itakura S, Anderson DM (2006a) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). Molecular Ecology Notes 6:756-758

Nagai S, Yamaguchi S, Lian CL, Matsuyama Y, Itakura S (2006b) Development of microsatellite markers in the noxious red tide - causing algae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Molecular Ecology Notes 6:477-479

Nagai S, Nishitani G, Yamaguchi S, Yasuda N, Lian CL, Itakura S, Yamaguchi M (2007) Development of microsatellite markers in the noxious red tide - causing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). Molecular ecology notes 7:1108-1110

Nakamura K, Huang CJ, Rubite RR, Leong WC, Kono Y, Yang HA, (2012) Isolation of compound microsatellite markers *Begonia fenicis* (Begoniaceae) endemic to and southeast Asian islands. American Journal of Botany 99:e20-e23

中村達夫, 芳永春夫 (1962) 山口県外海産のウニについて. 水産増殖 9:189-200

中多章文, 八木宏樹, 宮園章, 安永倫明, 川井唯史, 飯泉仁 (2001) 忍路湾における沿岸水温と栄養塩の関係. 北海道立水産試験場研究報告 59:31-41

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583-590

Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press

Nishitani G, Nagai S, Lian C, Sakiyama S, Oohashi A, Miyamura K (2009) Development of microsatellite markers in the marine phytoplankton *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae). Conservation genetics 10:713-715

Niu C, Kebede H, Auld DL, Woodward, Burow G, Wright RJ (2008) A safe inexpensive method to i solate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. African Journal of Biotechnolgy 7:2818-2822

Niwa K, Kikuchi N, Iwabuchi M, Aruga Y (2004) Morphological and AFLP variation of *Porphyra yezoensis* Ueda form. *Narawaensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta). Phycological Research 52:180-190

能登谷正浩, 桐原慎二 (1989) 青森県沿岸における天然および移殖マコンブの形態について. 月刊海洋 21:355-361

Nylander JAA (2004) MrModelTest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden. Program distributed by the author

Ohsawa N, Ogata Y, Okada N, Itoh N (2001) Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. Phytochemistry 58:683-692

長田義仁, 梶原完爾編 (1997) ゲルハンドブック. 東京, エヌ・ティー・エス

Ostrander EA, Jong, PM, Rine J, Duyk G (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences 89:3419-3423

Page RDM (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12:357–358

Pandey RN, Adams RP, Flournoy LE (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. Plant Molecular Biology Reporter 14:17-22

Phillips N, Smith CM, Morden CW (2001) An effective DNA extraction protocol for brown algae. Phycol Res 49:97-102

Pikaart MJ, Villeponteau B (1993) Suppression of PCR amplification by high levels of RNA. Biotechniques 14:24

Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15:8-15

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular breeding 2:225-238

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959

Provasoli L (1968) Media and prospects for the cultivation of marine algae. Culture and collection of algae. Proc. U. S.–Japan Conf. Hakone, September 1966:63-75

Rassmann K, Schlötterer C, Tautz D (1991) Isolation of simple - sequence loci for use in polymerase chain reaction - based DNA fingerprinting. Electrophoresis 12:113-118

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic biology 61:539-542

Rosendahl S, Taylor JW (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. Molecular Ecology 6:821-829

佐藤仁, 熊谷直哉, 福田光男 (2010) 自然環境調和型構造物の防波堤背後小段の藻場形成について. 寒地土木研究所月報 684:11-19

佐藤孜郎, 丹原敬子 (1980) 昆布藻体の内・外両層組織の金属組成および多糖類組成 [海藻の調理加工に関する基礎的研究-3-] . 日本水産学会誌 46:749-756

Saunders GW (1993) Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and raid method for the isoplantation of polymerase chain reaction – friendly DNA. Journal of phycology

29:251-254

Shan TF, Pang SJ (2009) Assessing genetic identity of sporophytic offspring of the brown alga *Undaria pinnatifida* derived from mono - crossing of gametophyte clones by use of amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. Phycological research 57:36-44

Shan TF, Pang SJ, Zhang YR, Yakovleva IM, Skriptsova AV (2011) An AFLP-based survey of genetic diversity and relationships of major farmed cultivars and geographically isolated wild populations of *Saccharina japonica* (Phaeophyta) along the northwest coasts of the Pacific. Journal of Applied Phycology 23:35-45

邵花梅 (2012) 音響および直接計測手法を用いた磯焼け海域におけるコンブ林の分布特性の時空間解析. 北海道大学大学院環境科学生物圏科学専攻院修士論文.

Shi Y, Yang G, Liu Y, Liao M, Li X, Cong Y (2007) Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae) . Molecular Ecology Notes 7:620-622

Shiroma R, Uechi S, Tawata S, Tako M (2007) Isolation and characterization of alginate from *Hizikia fusifolmis* and preparation of its oligosaccharides. Journal of Applied Glycoscience 54:85-90

Shivji MS, Rogers SO, Stanhope MJ (1992) Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. Marine Ecology Progress Series 84:197-203

Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995) An improved PCR method for walkingin uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Research 23:1087-1088.

Snirc A, Silberfeld T, Bonnet J, Tillier A, Tuffet S, Sun JS (2010) Optimization of DNA extraction from brown algae (Phaeophyceae) based on a commercial kit. Journal of phycology 46:616-621

Sodmergen K, Kawano S, Tano S, Kuroiwa T (1991) Degradation of chloroplast DNA in second leaves of rice (*Oryza sativa*) before leaf yellowing. Protoplasma 160:89-98

Swofford DL (2002) PAUP* version 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)

Tah B, Pal P, Mahato M, Talapatra GB (2011) Aggregation behavior of SDS/CTAB catanionic surfactant mixture in aqueous solution and at the air/water interface. The Journal of Physical

Chemistry B 115:8493-8499

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5:Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Molecualr Biology and Evolution 28:2731–2739

谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木稔 (1994) 海藻のケミカルシグナル生存戦略としての化学的防御. 化学と生物 32:434-442

津田吉晃 (2014) シリーズ：日本の森林樹木の地理的遺伝構造 (4) ウダイカンバ (カバノキ科カバノキ属. 森林遺伝育種 3:23-29

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van De Lee T, Hornes M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23:4407-4414

Wang D, Wang X, Li D, Wang F, Duan D (2006) The genetic analysis and germplasm identification of the gametophytes of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) with RAPD method. Journal of Applied Phycology 18:801-809

Wang X, Shao Z, Fu W, Yao J, Hu Q, Duan D (2013) Chloroplast genome of one brown seaweed, *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) : Its structural features and phylogenetic analyses with other photosynthetic plastids. Marine genomics 10:1-9

Watanabe A, Iwaizumi MG, Ubukata M, Kondo T, Lian C, Hogetsu T (2006) Isolation of microsatellite markers from *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. using a dual PCR technique. Molecular Ecology Notes 6:80-82

Watanuki A, Aota T, Otsuka E, Kawai T, Iwahashi Y, Kuwahara H, Fujita D (2010) Restoration of kelp beds on an urchin barren: Removal of sea urchins by citizen divers in southwestern Hokkaido. Bulletin of Fisheries Research Agency 32:83-87

Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd edn. Taylor and Francis group, United States

Whitmer AC (2002) Microsatellite markers for the intertidal kelp *Postelsia palmaeformis* (Heterokontophyta; Laminariales) . Molecular Ecology Notes 2:469-471

Wong PF, Tan LJ, Nawi H, AbuBakar S (2006) Proteomics Of The red alga, *gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of phycology 42:113-120

Wu B, Lian C, Hogetsu T (2004) Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). Molecular Ecology Notes 2:413-415

Xu Y, Chen C, Ji D, Hang N, Xie C (2013) Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress. Journal of Applied Phycology 1-12

八木宏樹 (1997) 海藻類の群落構成と植食動物の生息量からみた磯焼け発生機構の解明. 農林水産技術会議事務局 6-15

山本修一 (2010) 物質移動としての拡散係数と水分吸脱着 (乾燥). 日本食品工学会誌 11:73-83

山中なつみ, 小川宜子 (2000) メカブより溶出する粘性物質の理化学的特性 (第 2 報) 調整条件がメカブ粘性物質の粘度に与える影響. 日本調理科学会誌 33:44-52

Yi H, Sui Z, Bao Z (2010) Preliminary analysis of population genetic diversity of cultivated *Laminaria japonica* sporophyte via AFLP technique. Journal of Ocean University of China 9:53-58

Yoon CS, Glawe DA (1993) Pretreatment with RNase to improve PCR amplification of DNA using 10-mer primers. BioTechniques 14:908

吉田吾郎, 新村陽子, 樽谷賢治, 浜口昌巳 (2011) 海藻類の一次生産と栄養塩の関係に関する研究レビュー- および瀬戸内海藻場の栄養塩環境の相対評価-. Bulletin of Fisheries Research Agency 34:1-31

吉田忠生 (1998) 新日本海藻誌. 内田老鶴圃, 東京

Yotsukura N, Kawai T, Motomura T, Ichimura T (2001) Random amplified polymorphic DNA markers for three Japanese laminarian species. Fisheries Science 67:857-862

Yotsukura N, Kawai T, Kawashima S, Ebata H, Ichimura T (2006) Nucleotide sequence diversity of the 5S rDNA spacer in the simple blade kelp genera *Laminaria*, *Cymathaere* and *Kjellmaniella* (Laminariales, Phaeophyceae) from northern Japan. Phycological Research 54:269-279

Yotsukura N, Kawashima S, Kawai T, Abe T, Druehl LD (2008) A systematic re-examination of four *Laminaria* species: *L. japonica*, *L. religiosa*, *L. ochotensis* and *L. diabolica*. Journal of Japanese Botany 83:165-176

Yotsukura N (2010) The hierarchy of Laminariales in Japan. Algal Resources 3:193-198

Yotsukura N, Nagai K, Kimura H, Morimoto K (2010) Seasonal changes in proteomic profiles of Japanese kelp: *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) . Journal of Applied Phycology 22:443-451

Yotsukura N, Shimizu T, Katayama T, Druehl LD (2010) Mitochondrial DNA sequence variation of four *Saccharina* species (Laminariales, Phaeophyceae) growing in Japan. Journal of Applied Phycology 22:243-251

Yotsukura N, Nagai K, Tanaka T, Kimura H, Morimoto K (2012) Temperature stress-induced changes in the proteomic profiles of *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyceae) . Journal of Applied Phycology 24:163-171

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11:1-16

図 表

Fig.1 Distribution ranges of the varieties in *Saccharina japonica* defined by Kawashima (2011) and collecting sites of samples used for AFLP analysis in this study.

Fig. 2 Comparison of electrophelogram in the AFLP analysis with primer pair E-ACC/M-CAC on two samples (1 and 1') originated from one individual. The template DNA was extracted by DNA extraction method I in this study. Arrows indicated main discrepancy between samples. The horizontal scale represents the size of fragment in base pairs (bp), while the vertical scales represents the fluorescence intensity of a fragment (rfu) in a run.

Fig. 3 Comparison of electrophelograms in the AFLP analysis with primer pair E-ACC/M-CAC on two samples originated from one individual. The template DNA was extracted by DNA extraction methods II (2 and 2'), DNA extraction methods III (3 and 3'), DNA extraction methods IVIII (4 and 4') in this study. The horizontal scale represents the size of fragment in base pairs (bp), while the vertical scales represents the fluorescence intensity of a fragment (rfu) in a run.

Fig. 4 Comparison of electrophelograms in the AFLP analysis with primer pair E-ACC/M-CAC on two samples originated from one individual. The template DNA was extracted by DNA extraction method V (5 and 5') and VI (6 and 6') in this study. The horizontal scale represents the size of fragment in base pairs (bp), while the vertical scales represents the fluorescence intensity of a fragment (rfu) in a run.

Fig 5 Comparison of electrophelograms in the AFLP analysis with primer pair E-ACC/M-CAC on two samples originated from one individual. The template DNA was extracted by DNA extraction method VII (7 and 7'), VIII (8 and 8'), IV (9 and 9'), X (10 and 10'), XI (11 and 11') in this study. The horizontal scale represents the size of fragment in base pairs (bp), while the vertical scales represents the fluorescence intensity of a fragment (rfu) in a run.

Fig 6 Comparison of electrophelograms in the AFLP analysis with primer pair E-ACC/M-CAC for three individuals. The horizontal scale represents the size of fragment in base pairs (bp), while the vertical scales represents the fluorescence intensity of a fragment (rfu) in a run.

Fig. 7 Comparison of electrophelogram in the AFLP analysis with primer pair E-ACC/M-CAC on two samples (1 and 1') originated from one individual. The template DNA was extracted by modified DNA extraction method VI in this study. Arrows indicated main discrepancy between samples. The horizontal scale represents the size of fragment in base pairs (bp), while the vertical scales represents the fluorescence intensity of a fragment (rfu) in a run.

Fig. 8 Genetic structure in *Saccharina japonica* estimated by Bayesian clustering analysis based on AFLP. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 9 Genetic structure in *Saccharina japonica* var. *japonica* estimated by Bayesian clustering analysis based on AFLP. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 10 Genetic structure in *Saccharina japonica* var. *religiosa* estimated by Bayesian clustering analysis based on AFLP. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 11 Genetic structure in *Saccharina japonica* var. *ochotensis* estimated by Bayesian clustering analysis based on AFLP. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 12 Genetic structure in *Saccharina japonica* var. *diabolica* estimated by Bayesian clustering analysis based on AFLP. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 13 Genetic structure of seven populations in Oshoro Bay (*Saccharina japonica* var. *religiosa*) estimated by Bayesian clustering analysis based on AFLP. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 14 One of Bayesian trees based on complete sequence of internal transcribed spacer region 1 (ITS1) . Support values are Bayesian posterior probabilities, neighbor-joining and maximum likelihood bootstrap, respectively. Bayesian posterior probabilities with support values higher than 95% are represented by thick branches. The symbol "*" represents 100% support. The symbol "-" represents <50% (or <95% of Bayesian posterior probabilities) support for an analysis.

Fig15 One of Bayesian trees based on partial sequence of RuBisCO spacer region (rbc-sp) .Support values are Bayesian posterior probabilities, neighbor-joining and maximum likelihood bootstrap, respectively. Bayesian posterior probabilities with support values higher than 95% are represented by thick branches. The symbol "*" represents 100% support. The symbol "-" represents <50% (or <95% of Bayesian posterior probabilities) support for an analysis.

Fig16 One of Bayesian trees based on partial sequence of cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) .Support values are Bayesian posterior probabilities, neighbor-joining and maximum likelihood bootstrap, respectively. Bayesian posterior probabilities with support values higher than 95% are represented by thick branches. The symbol "*" represents 100% support. The symbol "-" represents <50% (or <95% of Bayesian posterior probabilities) support for an analysis.

Fig. 17 PCR products amplified using AP2 primer and SSR primer [lane 1-3: $(AC)_{10}$, lane 4-6: $(GA)_{10}$, lane 7-9: $(AC)_6(AG)_5$] . These products were separated in a 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Arrows indicate the fragments that did not include SSR.

Fig. 18 Genetic structure in *Saccharina japonica* estimated by Bayesian clustering analysis based on microsatellite analysis. One pillar corresponds to one individual. Two clusters obtained were classified by different two colors.

Fig. 19 Protein spots up-regulated in the sporophyte of *Saccharina japonica* cultured at 30℃. Each spot was separated by 2-DE and was visualized with CBB. The number assigned each protein spot was special spot number (SSPs) used in PDQest Basic version 8.0.

Fig. 20 Protein spots up-regulated in the sporophyte of *Saccharina japonica* cultured at 25℃. Each spot was separated by 2-DE and was visualized with CBB. The number assigned each protein spot was special spot number (SSPs) used in PDQest Basic version 8.0.

Fig. 21 Protein spots up-regulated in the sporophyte of *Saccharina japonica* cultured at 20℃. Each spot was separated by 2-DE and was visualized with CBB. The number assigned each protein spot was special spot number (SSPs) used in PDQest Basic version 8.0.

Fig. 22 Protein spots up-regulated with significantly high levels in the sporophyte of *Saccharina japonica* cultured under low nutrient concentration. Each spot was separated by 2-DE and was visualized with CBB. Spots underlined were identified by MS analysis. The number assigned each protein spot was special spot number (SSPs) used in PDQest Basic version 8.0.

Fig. 23 Appearance of feeding experiment on the test of incitement of sea urchin using the 1.0% sodium alginate gel which 50% bioflavor solution extracted from the wild sporophyte of *S. angustata* was contained (G) and the thallus of *Saccharina angustata* (T) .

Fig. 24 Appearance of feeding experiment on the test of incitement of sea urchin ~~to~~ using the 1.5% sodium alginate gel bioflavor solution extracted from the wild sporophyte of *S. angustata* (G) was contained.

Fig. 25 Appearance of feeding experiment on the test of incitement of sea urchin using the 1.25% sodium alginate gel which eleven kinds of volatile compound contained in the wild sporophyte of *Saccharina angustata* (G) were contained.

Fig. 26 Appearance of conglomeration of sea urchin in the test using the 1.25% sodium alginate gel which the volatile compounds with effective concentration were contained. Sea urchins go direct to the gel (A) and bite the gel (B).

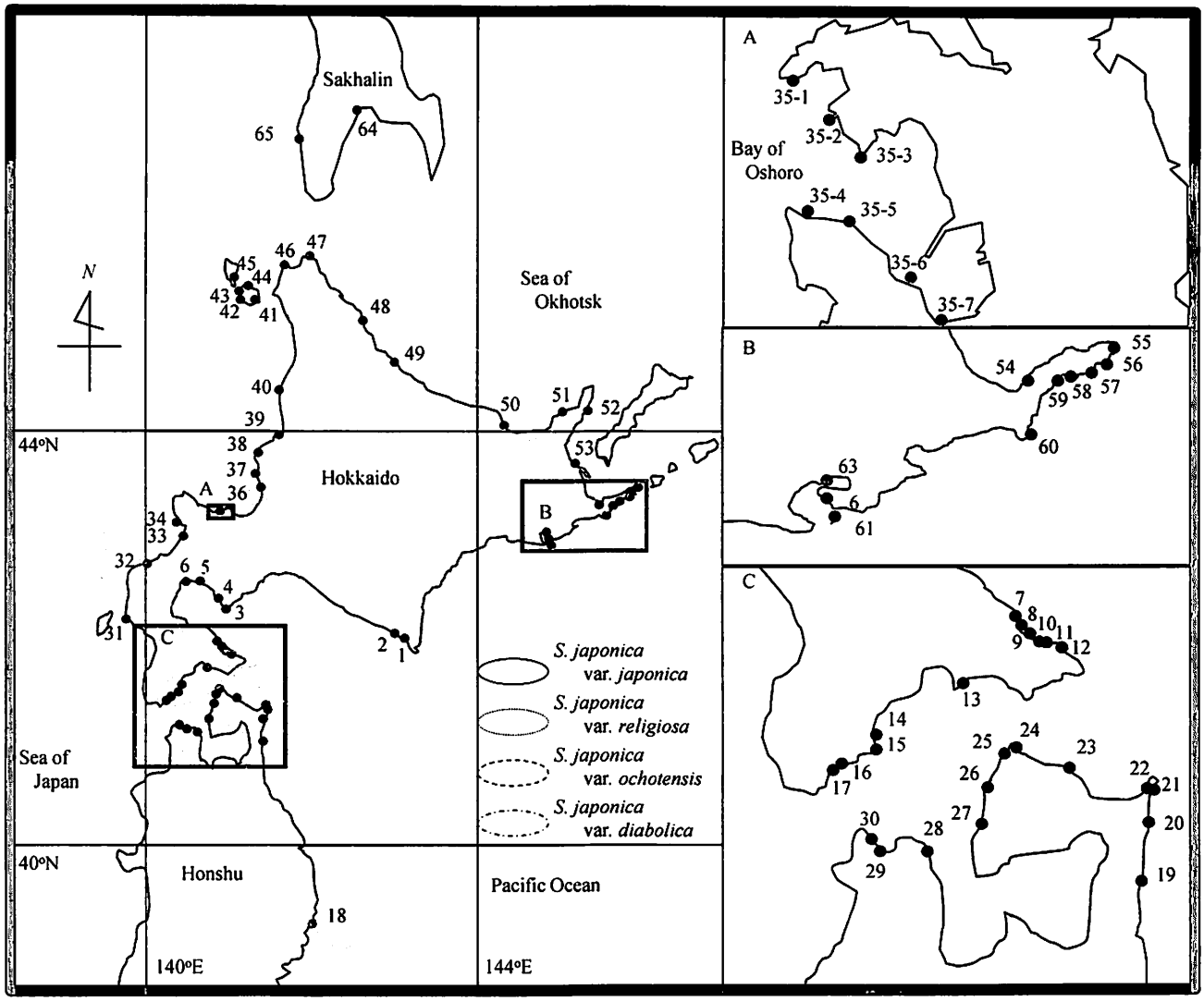

Sakhalin
65
64
N
45
46
47
44
43
42
41
48
49
40
39
Sea of
Okhotsk
50
51
52
53
44°N
38
37
A
36
Hokkaido
34
33
32
6
5
4
3
31
C
2
1
B
S. japonica
var. japonica
S. japonica
var. religiosa
S. japonica
var. ochotensis
S. japonica
var. diabolica
Sea of
Japan
40°N
Honshu
18
140°E
Pacific Ocean
144°E
A
35-1
35-2
35-3
Bay of
Oshoro
35-4
35-5
35-6
35-7
B
55
54
56
59
58
57
60
63
6
61
C
7
8
10
11
9
12
13
14
15
25
24
23
16
17
26
22
21
27
30
28
20
29
19

Fig. 2

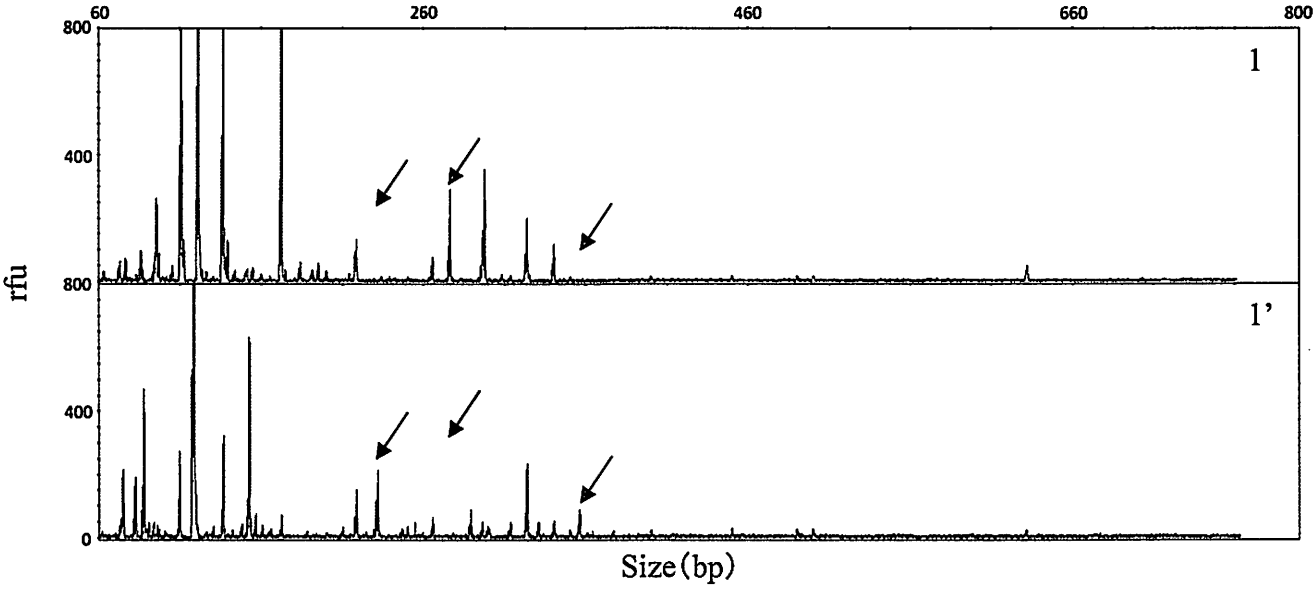


Fig. 3

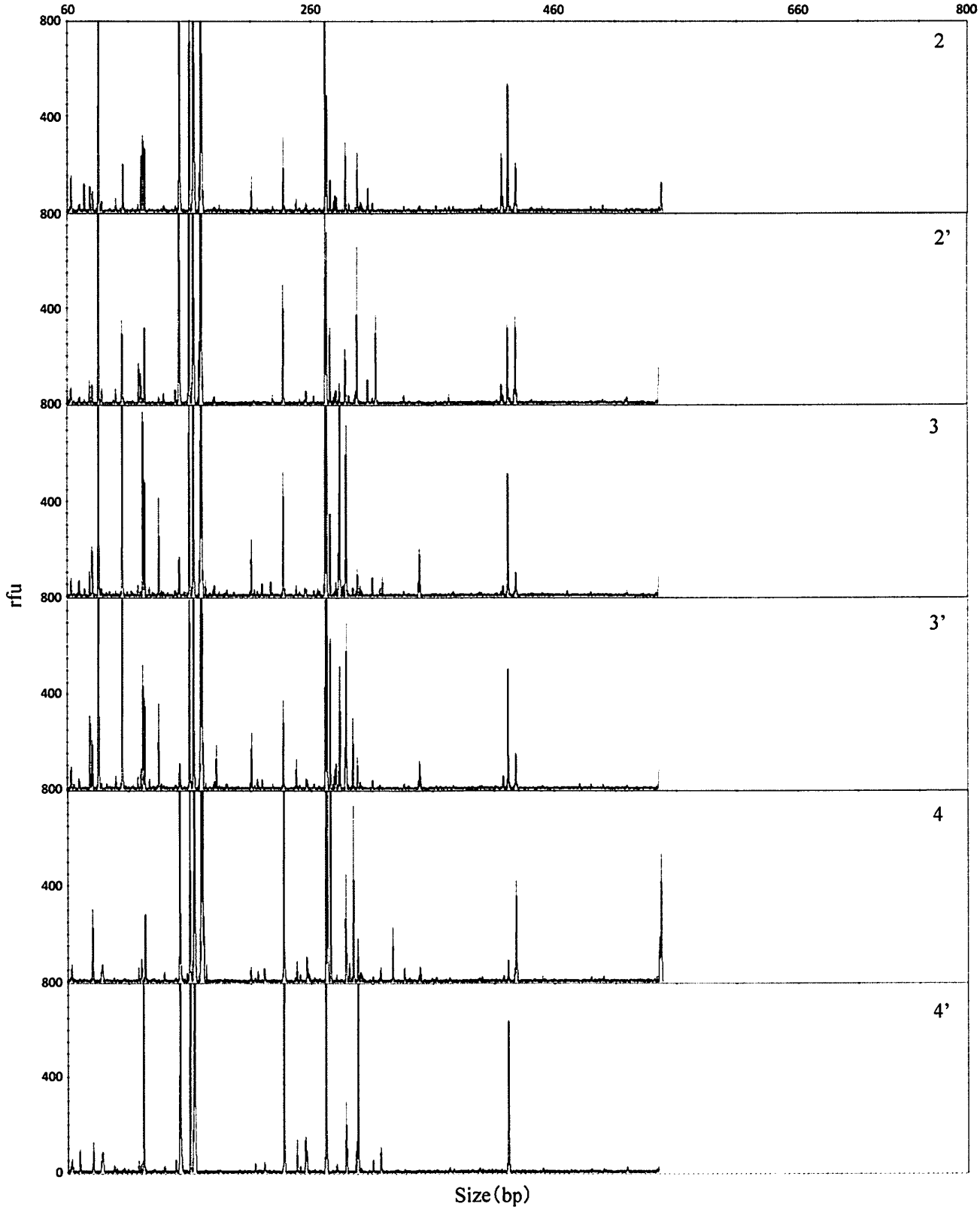


Fig. 4

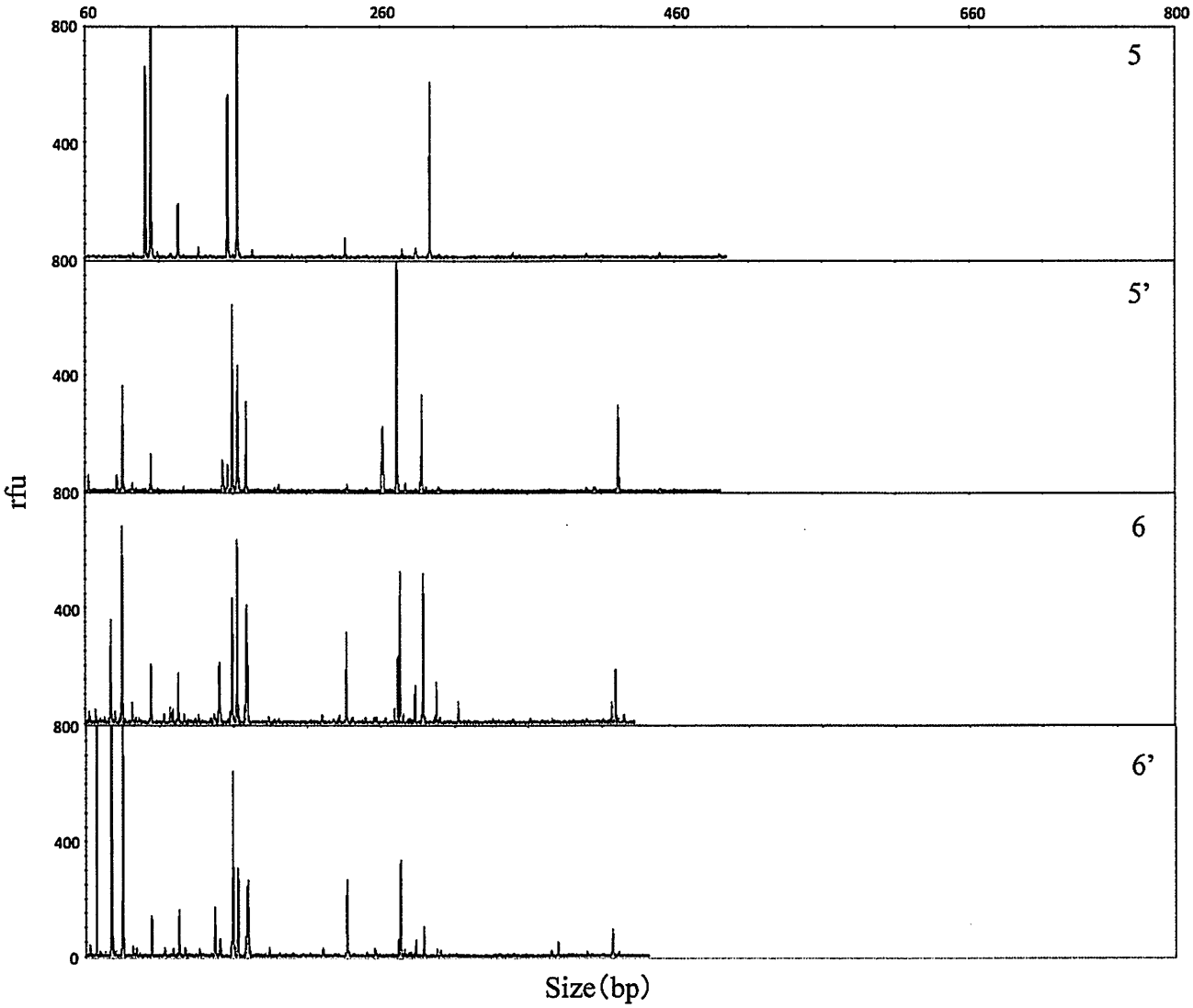


Fig. 5

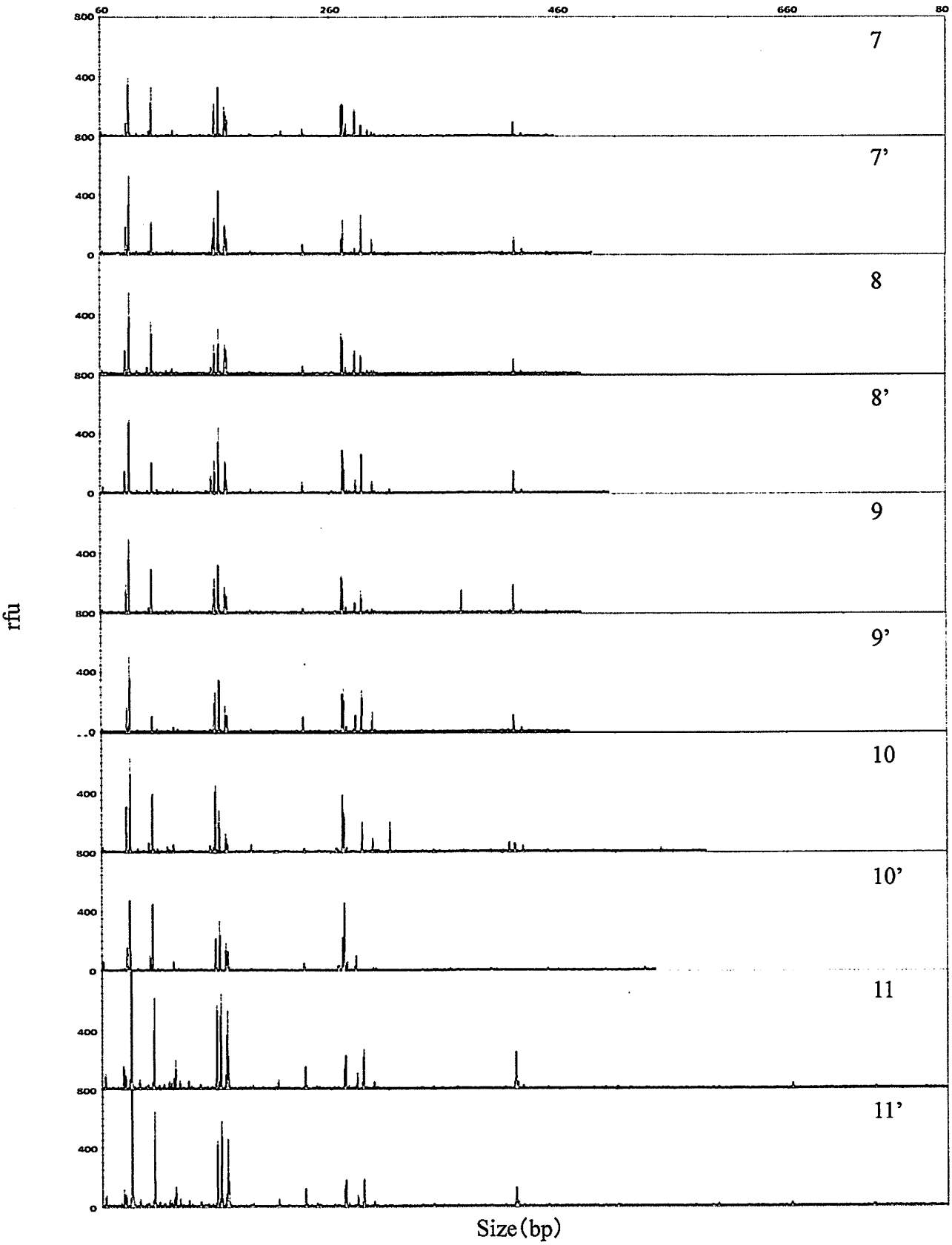


Fig. 6

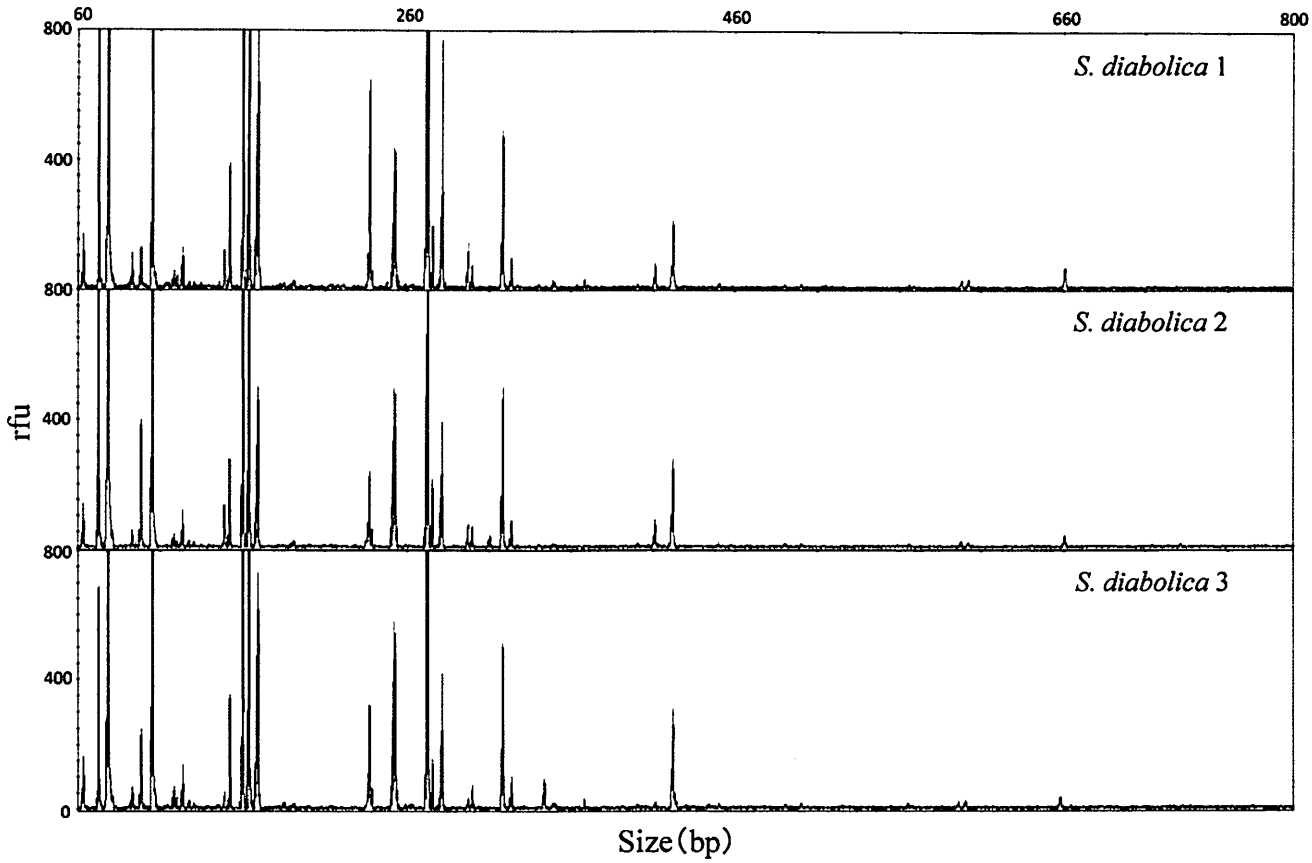
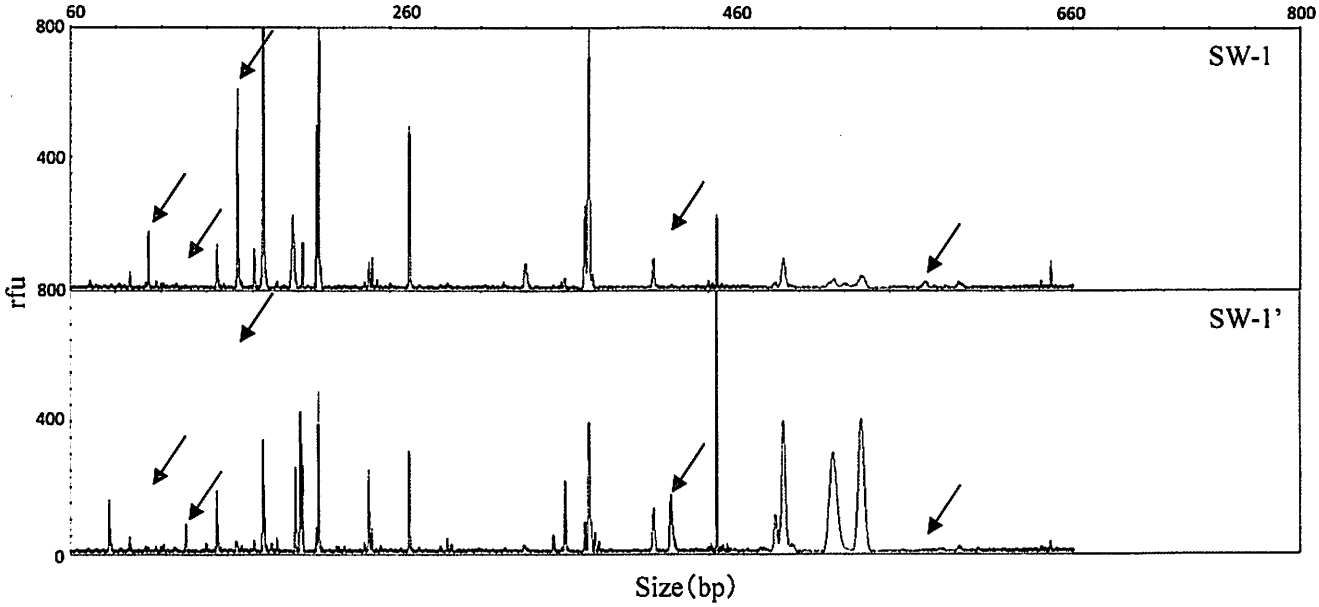
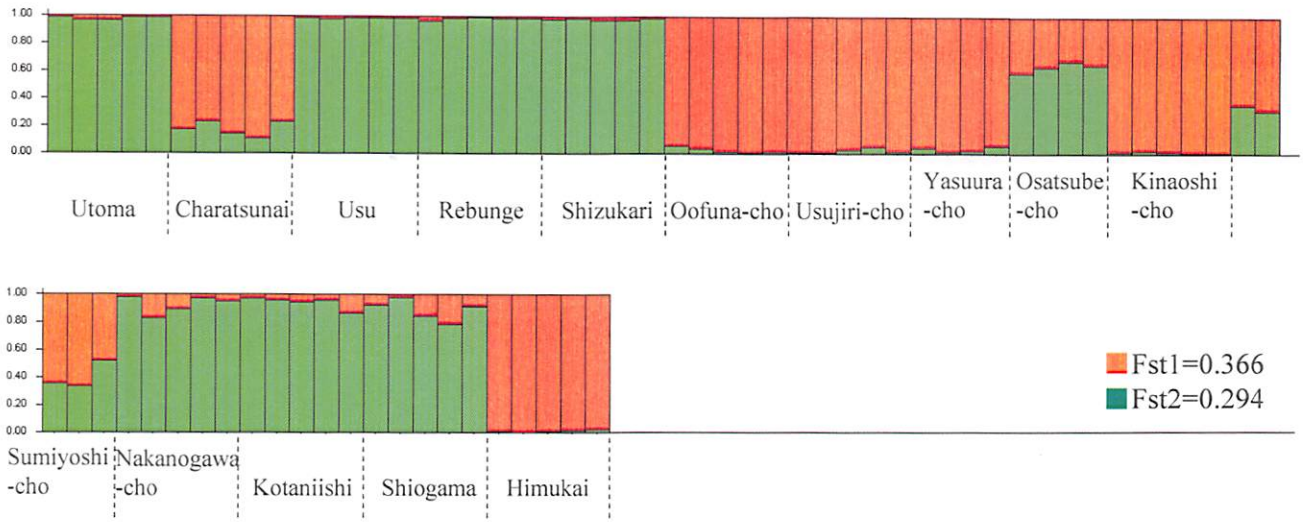

60
260
460
660
800
800
400
800
S. diabolica 1
S. diabolica 2
S. diabolica 3
rfu
400
800
400
0
Size(bp)

Fig. 7



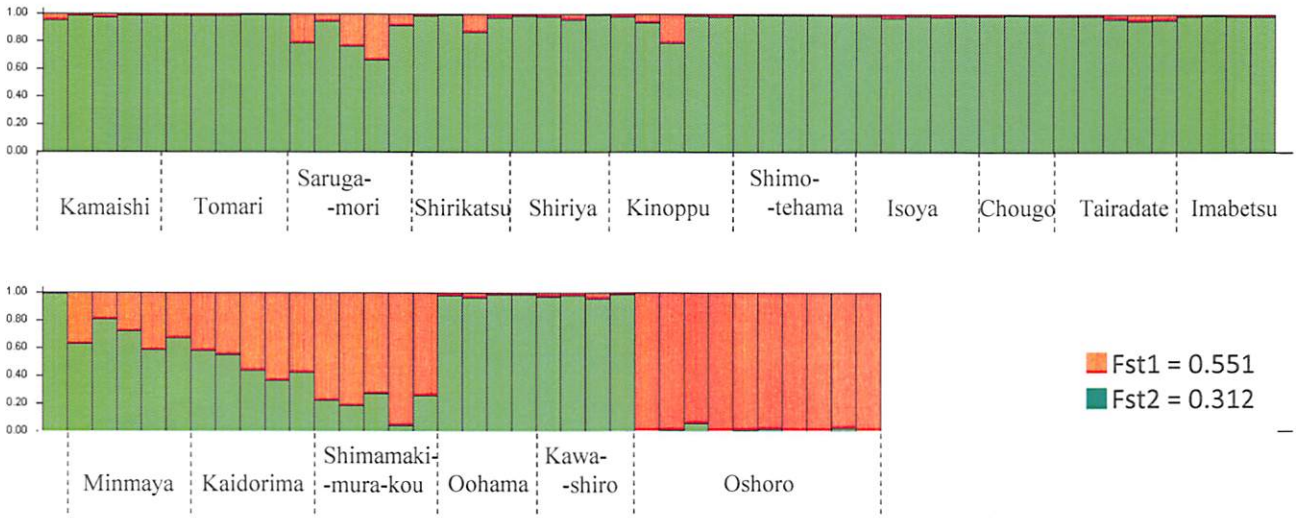

1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Utoma
Charatsunai
Usu
Rebunge
Shizukari
Oofune -cho
Usujiri -cho
Yasuura -cho
Osatsube -cho
Kinaoshi -cho
Saccharina var. japonica
Sumiyoshi -cho
Nakanogawa -cho
Kotaniishi
Shiogama
Himukai
Kamaishi
Tomari
Saruga mori
Shirikatsu
Shiriya
Kinoppu
Saccharina var. religiosa
Shimote hama
Isoya
Chougo
Tairadate
Imabetsu
Minmaya
Kaidorima
Shimamaki mura-kou
Oohama
Kawa shiro
Oshoro
Gokibiru
Hamamasu
Shokankaigan -cho
Ougon- -misaki
Rikibiru
Oniwaki
Kutsukata
Shinminato
Oshidomari
Saccharina var. ochotensis
Kafuka
Horai
Oomisaki
Hon-cho
Oomu
Futastsuiwa
Utoro
Misaki-cho
Barajima
Onnemoto
Saccharina var. ochotensis
Tomoshiri
Tomoshiri -gyokou
Ochiishi
Daikokujima
Aikappu
Akkeshi-Ko
Aniwa
Bogdanovci
Saccharina var. diabolica
Unknown
Fst1=0.475
Fst2=0.334

Fig. 9


1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Utoma
Charatsunai
Usu
Rebunge
Shizukari
Oofuna-cho
Usujiri-cho
Yasuura -cho
Osatsube -cho
Kinaoshi -cho

1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Sumiyoshi -cho
Nakanogawa -cho
Kotaniishi
Shiogama
Himukai
Fst1=0.366
Fst2=0.294

Fig. 10


1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Kamaishi
Tomari
Saruga-
-mori
Shirikatsu
Shiriya
Kinoppu
Shimo-
-tehama
Isoya
Chougo
Tairadate
Imabetsu
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Minmaya
Kaidorima
Shimamaki-
-mura-kou
Oohama
Kawa-
-shiro
Oshoro
Fst1 = 0.551
Fst2 = 0.312

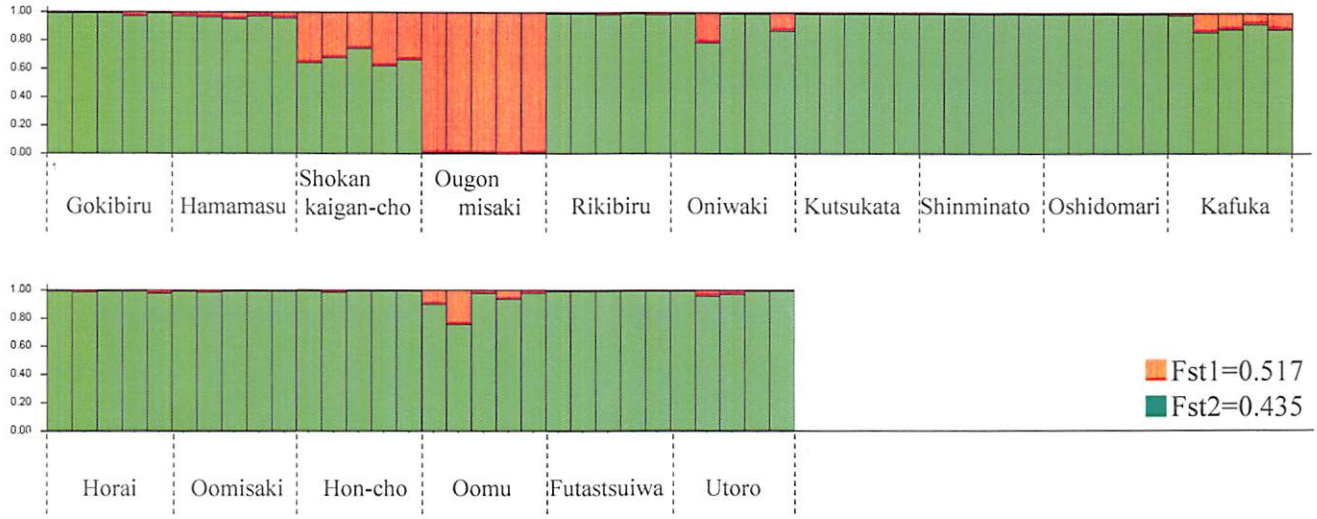

1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Gokibiru
Hamamasu
Shokan kaigan-cho
Ougon misaki
Rikibiru
Oniwaki
Kutsukata
Shinminato
Oshidomari
Kafuka
Horai
Oomisaki
Hon-cho
Oomu
Futastsuiwa
Utoro
Fst1=0.517
Fst2=0.435

Fig. 12

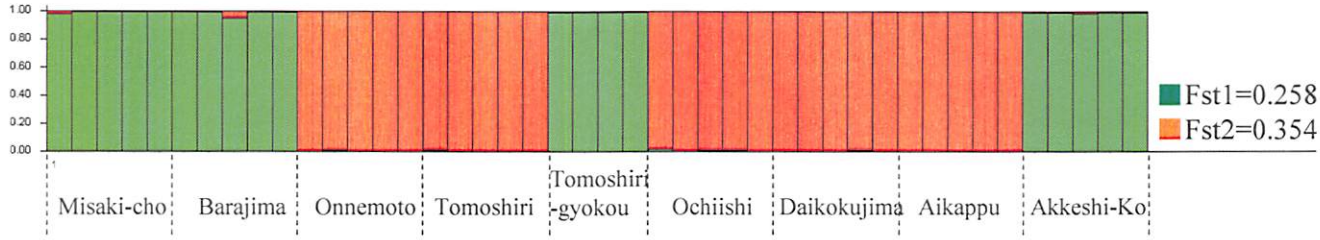
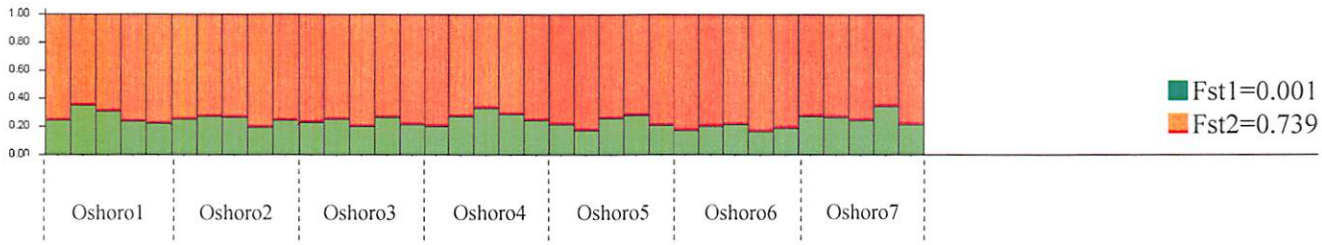
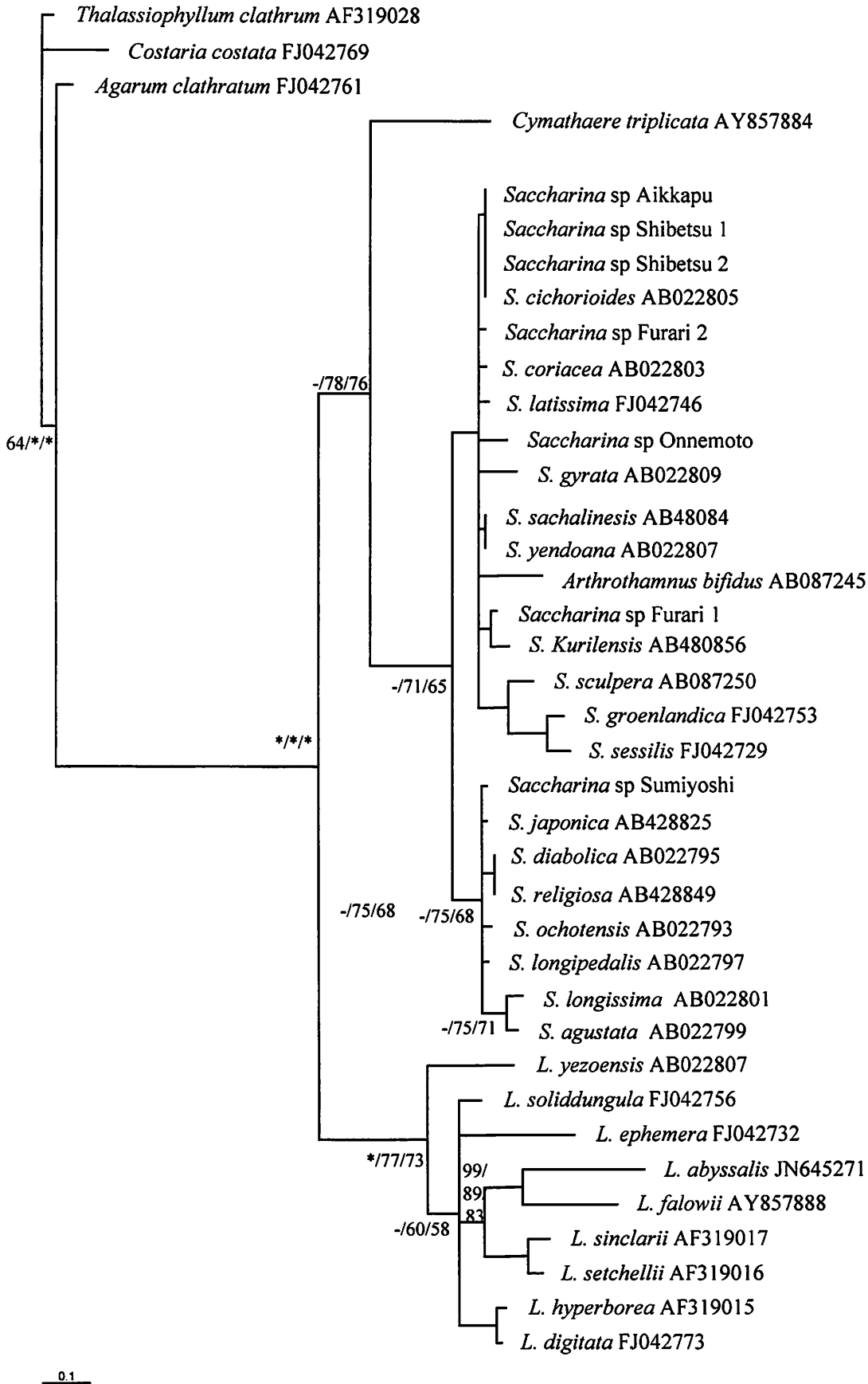
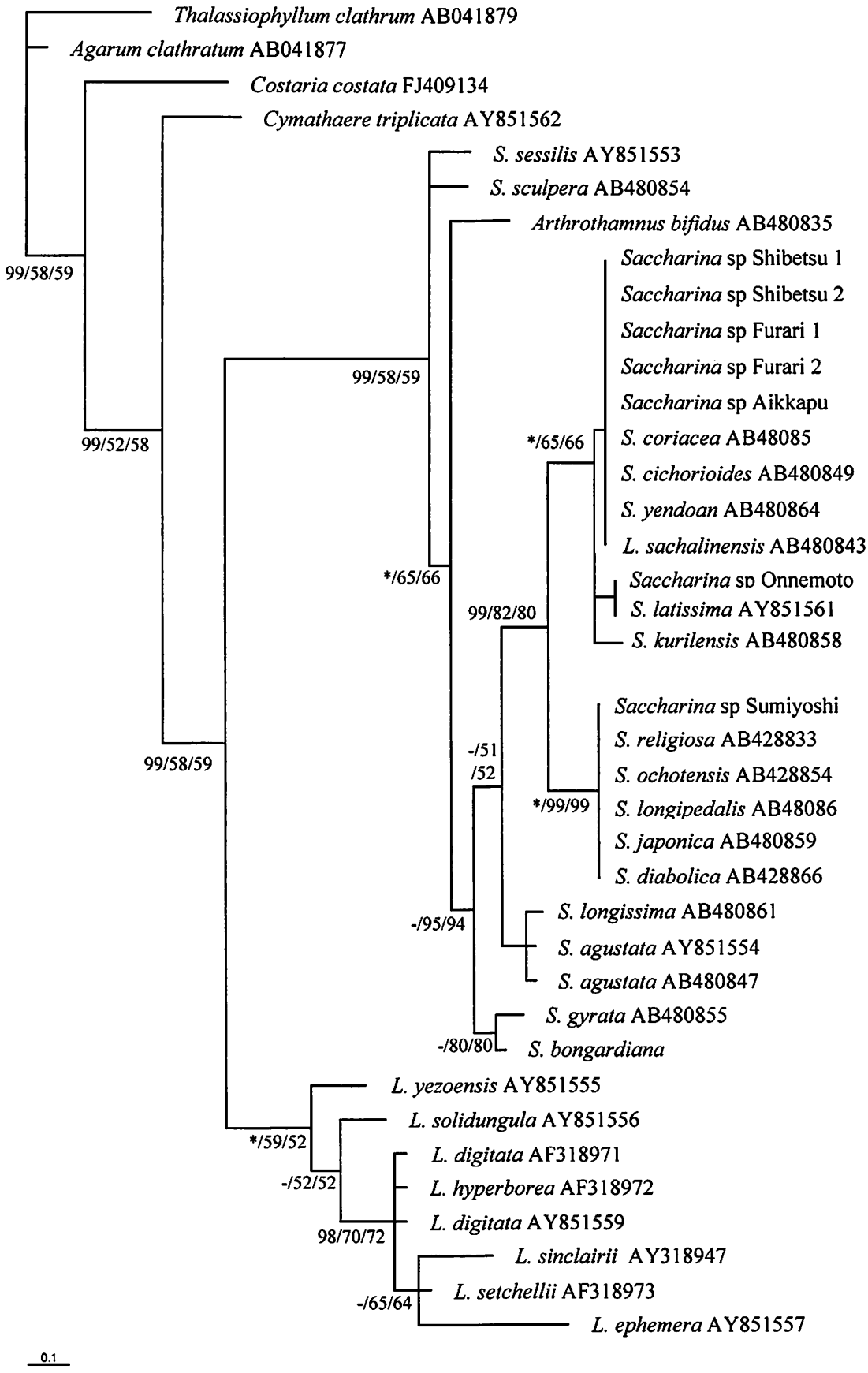

1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Fst1=0.258
Fst2=0.354
Misaki-cho
Barajima
Onnemoto
Tomoshiri
Tomoshiri-gyokou
Ochiishi
Daikokujima
Aikappu
Akkeshi-Ko

Fig. 13


1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Fst1=0.001
Fst2=0.739
Oshoro1
Oshoro2
Oshoro3
Oshoro4
Oshoro5
Oshoro6
Oshoro7


Thalassiophyllum clathrum AF319028
Costaria costata FJ042769
Agarum clathratum FJ042761
Cymathaere triplicata AY857884
Saccharina sp Aikkapu
Saccharina sp Shibetsu 1
Saccharina sp Shibetsu 2
S. cichorioides AB022805
Saccharina sp Furari 2
S. coriacea AB022803
S. latissima FJ042746
Saccharina sp Onnemoto
S. gyrata AB022809
S. sachalinesis AB48084
S. yendoana AB022807
Arthrothamnus bifidus AB087245
Saccharina sp Furari 1
S. Kurilensis AB480856
S. sculpera AB087250
S. groenlandica FJ042753
S. sessilis FJ042729
Saccharina sp Sumiyoshi
S. japonica AB428825
S. diabolica AB022795
S. religiosa AB428849
S. ochotensis AB022793
S. longipedalis AB022797
S. longissima AB022801
S. agustata AB022799
L. yezoensis AB022807
L. soliddungula FJ042756
L. ephemera FJ042732
L. abyssalis JN645271
L. falowii AY857888
L. sinclarii AF319017
L. setchellii AF319016
L. hyperborea AF319015
L. digitata FJ042773
64/*/*
-/78/76
-/71/65
//*
-/75/68
-/75/68
-/75/71
*/77/73
99/
89/
83
-/60/58
0.1


Thalassiophyllum clathrum AB041879
Agarum clathratum AB041877
Costaria costata FJ409134
Cymathaere triplicata AY851562
S. sessilis AY851553
S. sculpera AB480854
Arthrothamnus bifidus AB480835
Saccharina sp Shibetsu 1
Saccharina sp Shibetsu 2
Saccharina sp Furari 1
Saccharina sp Furari 2
Saccharina sp Aikkapu
S. coriacea AB48085
S. cichorioides AB480849
S. yendoan AB480864
L. sachalinensis AB480843
Saccharina sp Onnemoto
S. latissima AY851561
S. kurilensis AB480858
Saccharina sp Sumiyoshi
S. religiosa AB428833
S. ochotensis AB428854
S. longipedalis AB48086
S. japonica AB480859
S. diabolica AB428866
S. longissima AB480861
S. agustata AY851554
S. agustata AB480847
S. gyrata AB480855
S. bongardiana
L. yezoensis AY851555
L. solidungula AY851556
L. digitata AF318971
L. hyperborea AF318972
L. digitata AY851559
L. sinclairii AY318947
L. setchellii AF318973
L. ephemera AY851557
99/58/59
99/52/58
99/58/59
99/58/59
*/65/66
99/82/80
*/65/66
-/51
/52
*/99/99
-/95/94
-/80/80
*/59/52
-/52/52
98/70/72
-/65/64
0.1

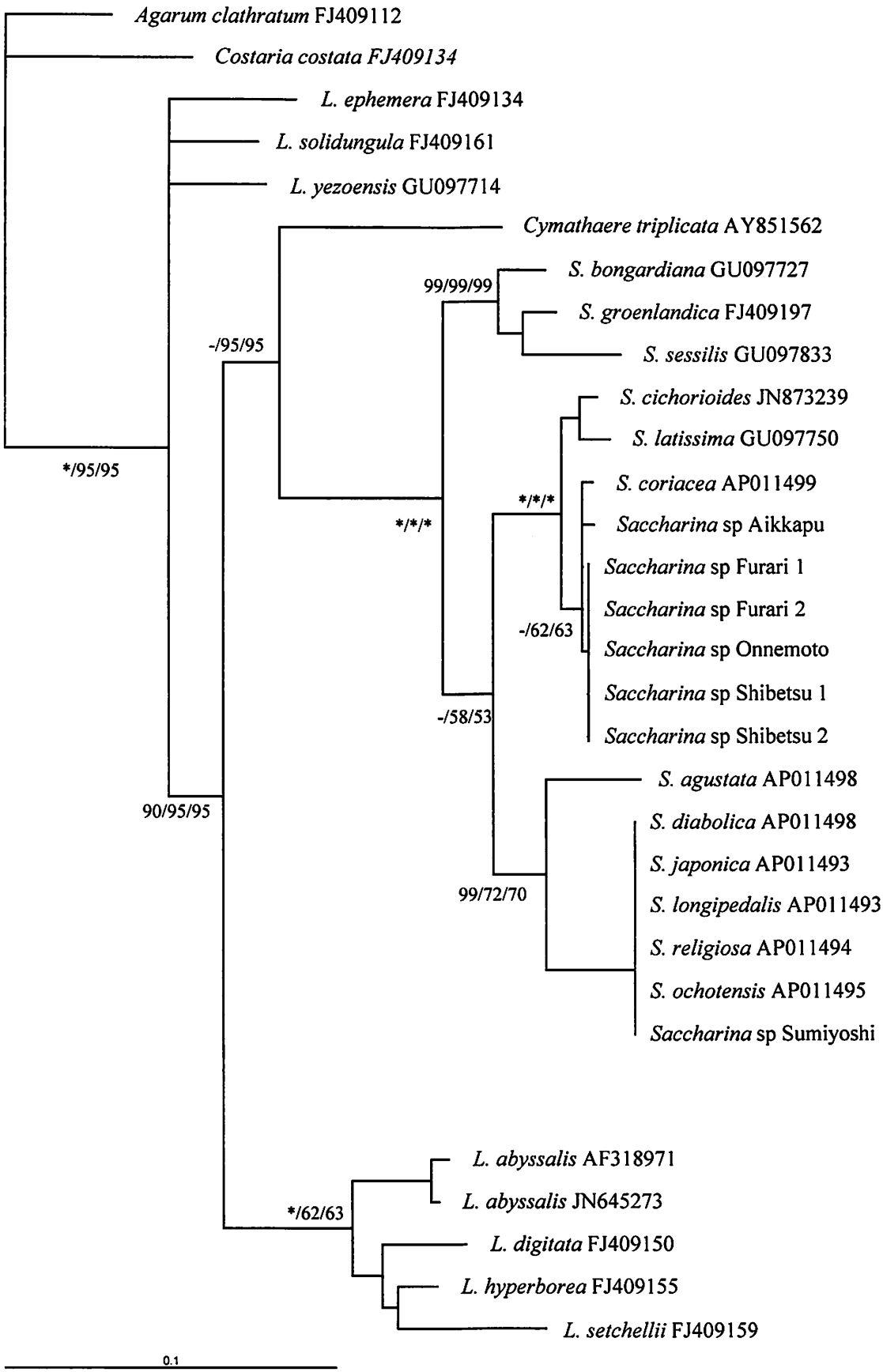
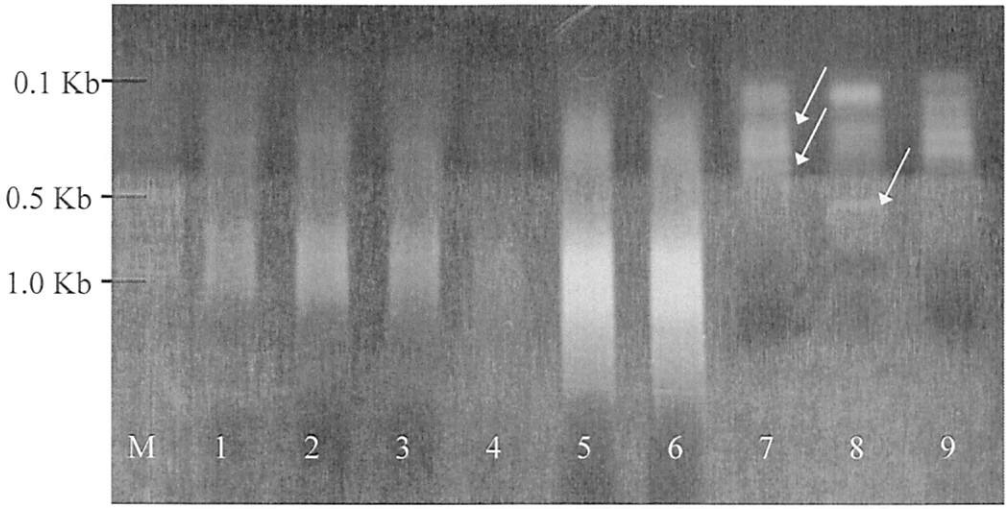
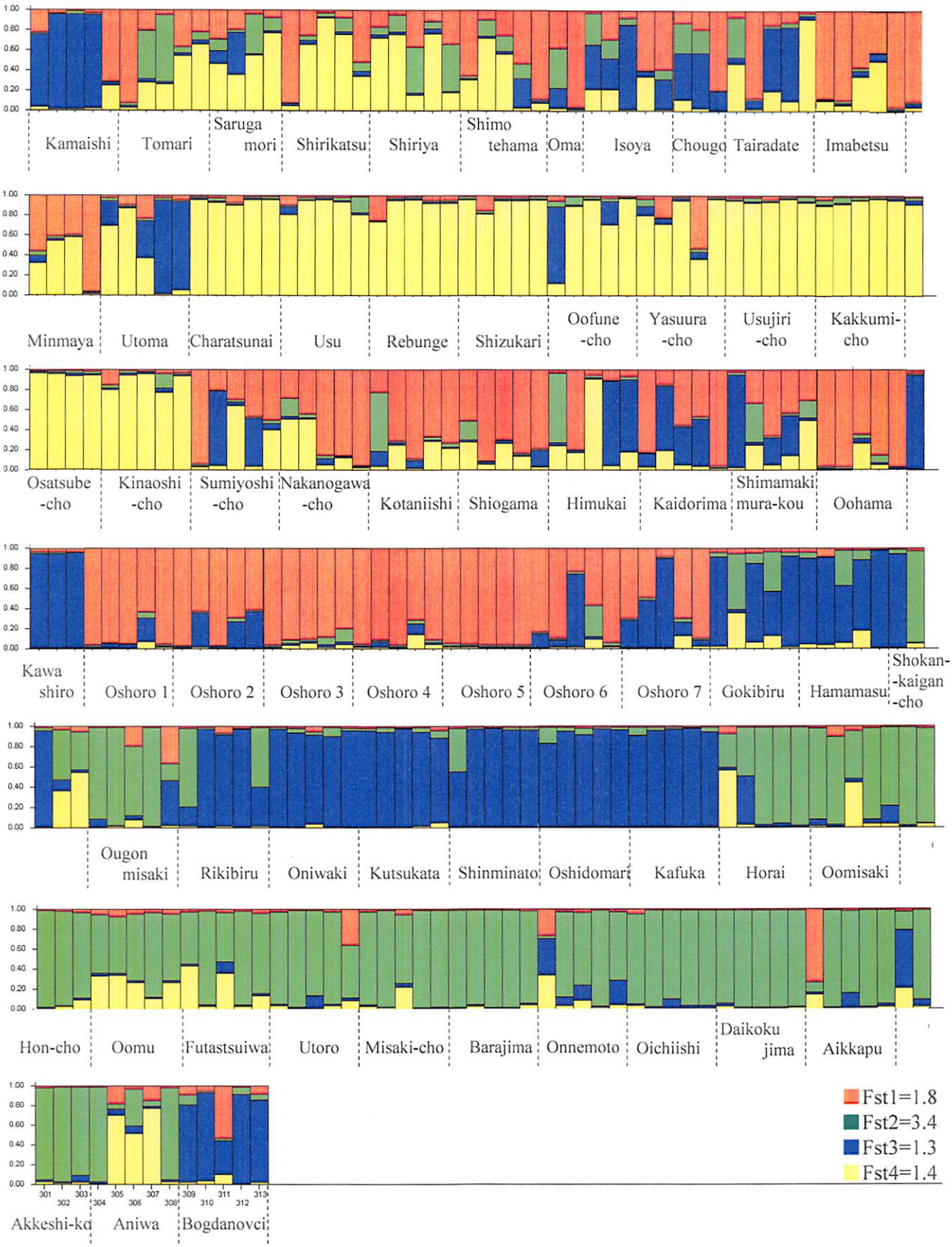
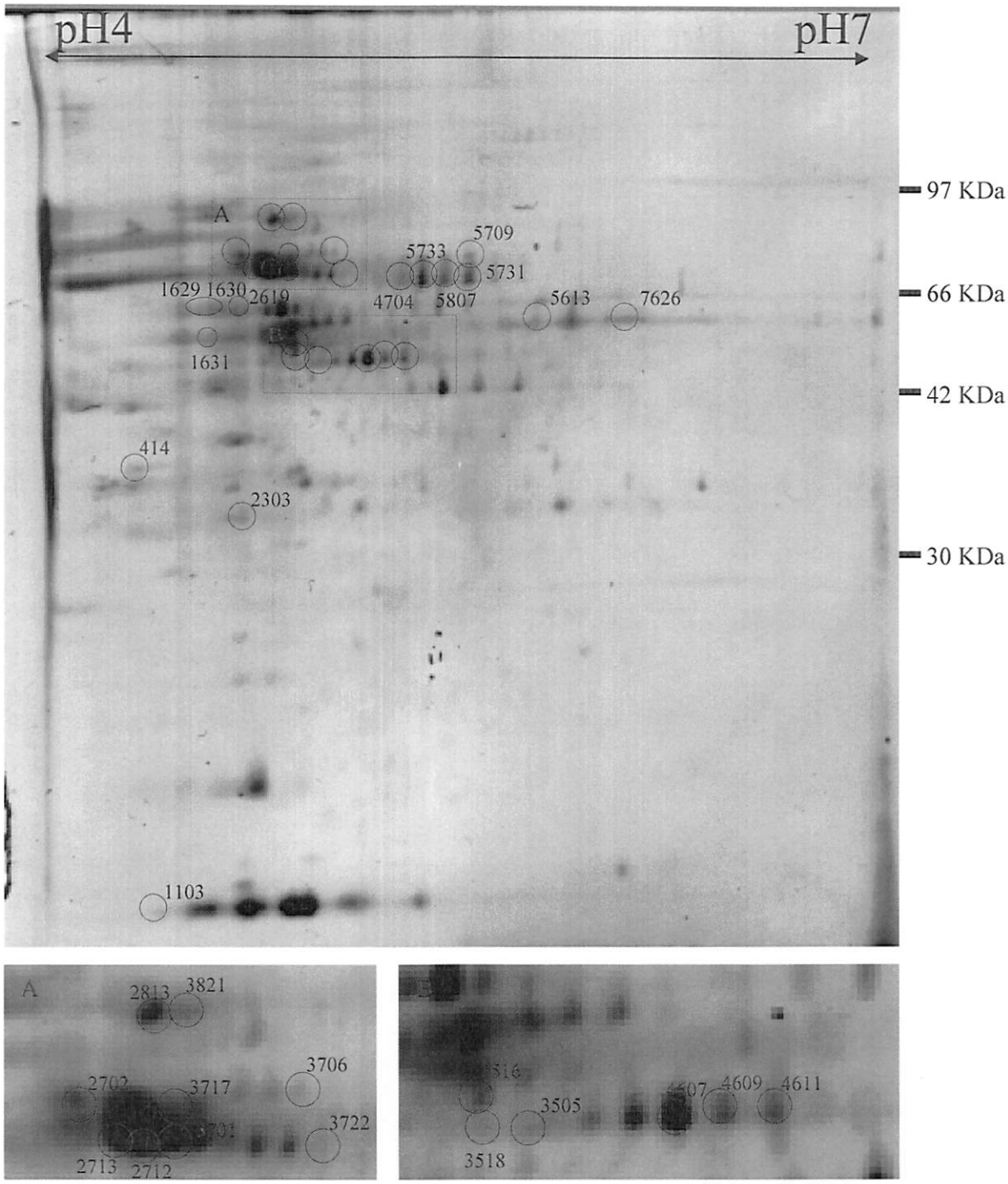
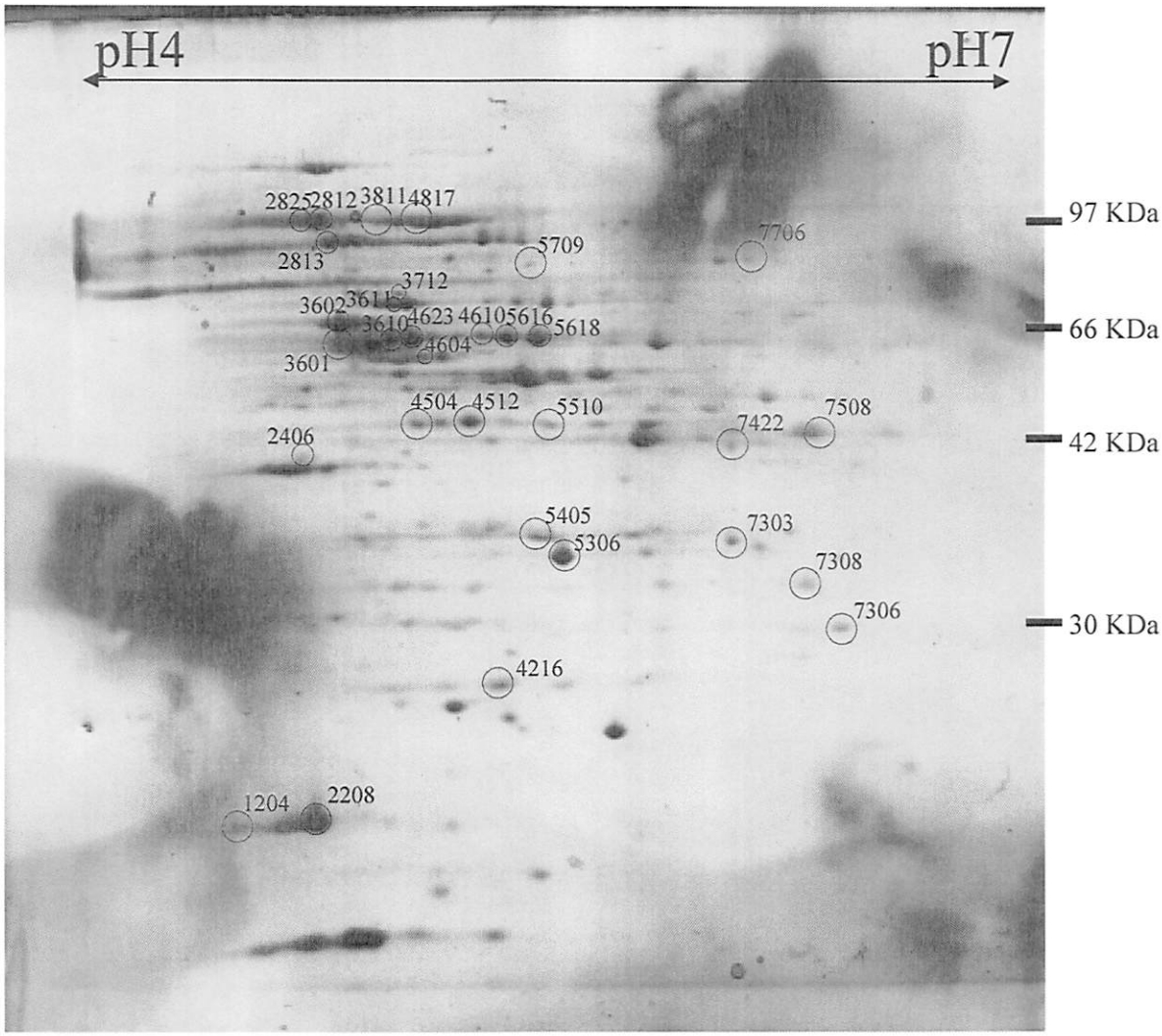

Agarum clathratum FJ409112
Costaria costata FJ409134
L. ephemera FJ409134
L. solidungula FJ409161
L. yezoensis GU097714
Cymathaere triplicata AY851562
S. bongardiana GU097727
S. groenlandica FJ409197
S. sessilis GU097833
S. cichorioides JN873239
S. latissima GU097750
S. coriacea AP011499
Saccharina sp Aikkapu
Saccharina sp Furari 1
Saccharina sp Furari 2
Saccharina sp Onnemoto
Saccharina sp Shibetsu 1
Saccharina sp Shibetsu 2
S. agustata AP011498
S. diabolica AP011498
S. japonica AP011493
S. longipedalis AP011493
S. religiosa AP011494
S. ochotensis AP011495
Saccharina sp Sumiyoshi
L. abyssalis AF318971
L. abyssalis JN645273
L. digitata FJ409150
L. hyperborea FJ409155
L. setchellii FJ409159
*/95/95
-/95/95
90/95/95
99/99/99
//*
//*
-/62/63
-/58/53
99/72/70
*/62/63
0.1

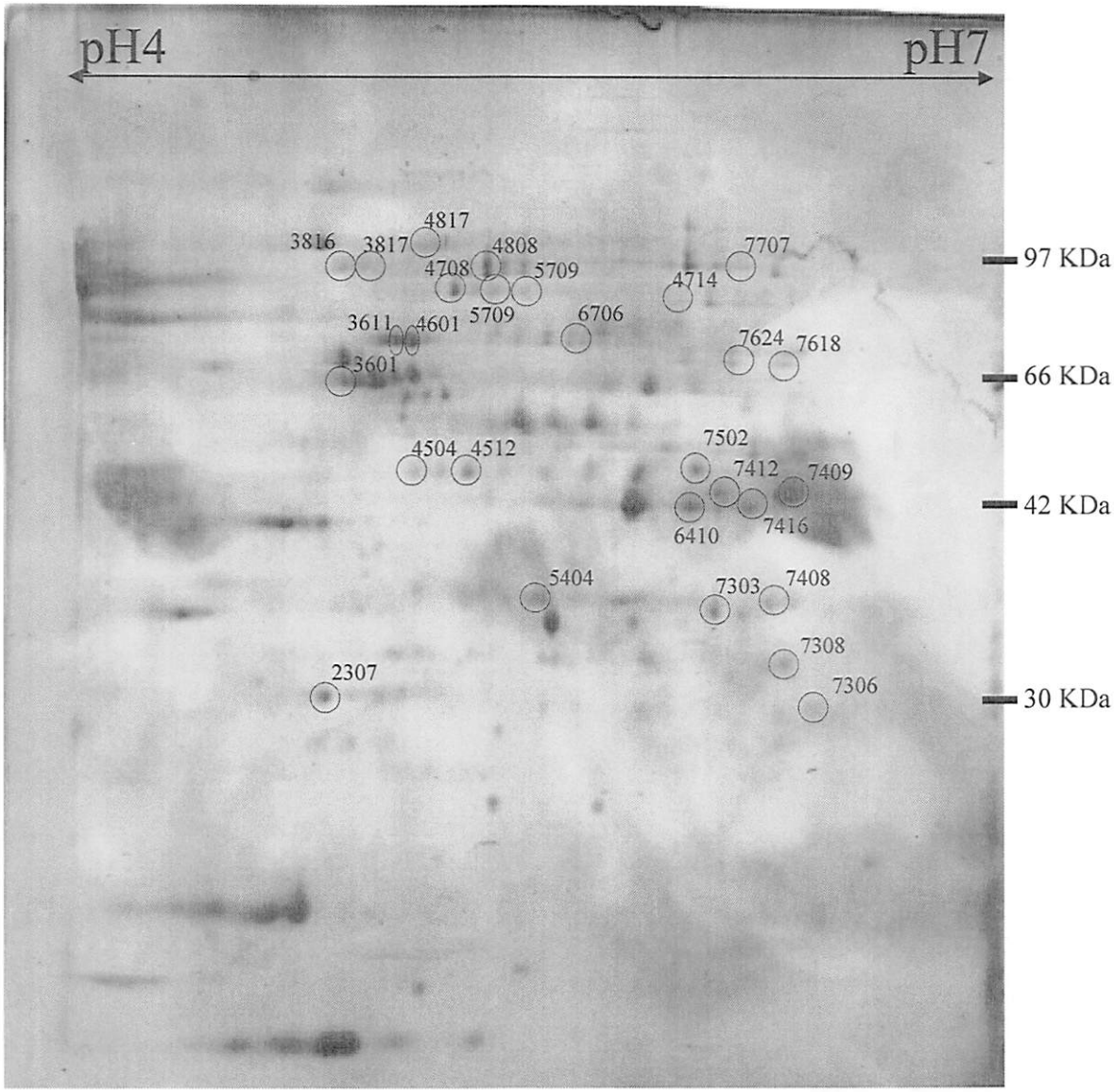
Fig. 17

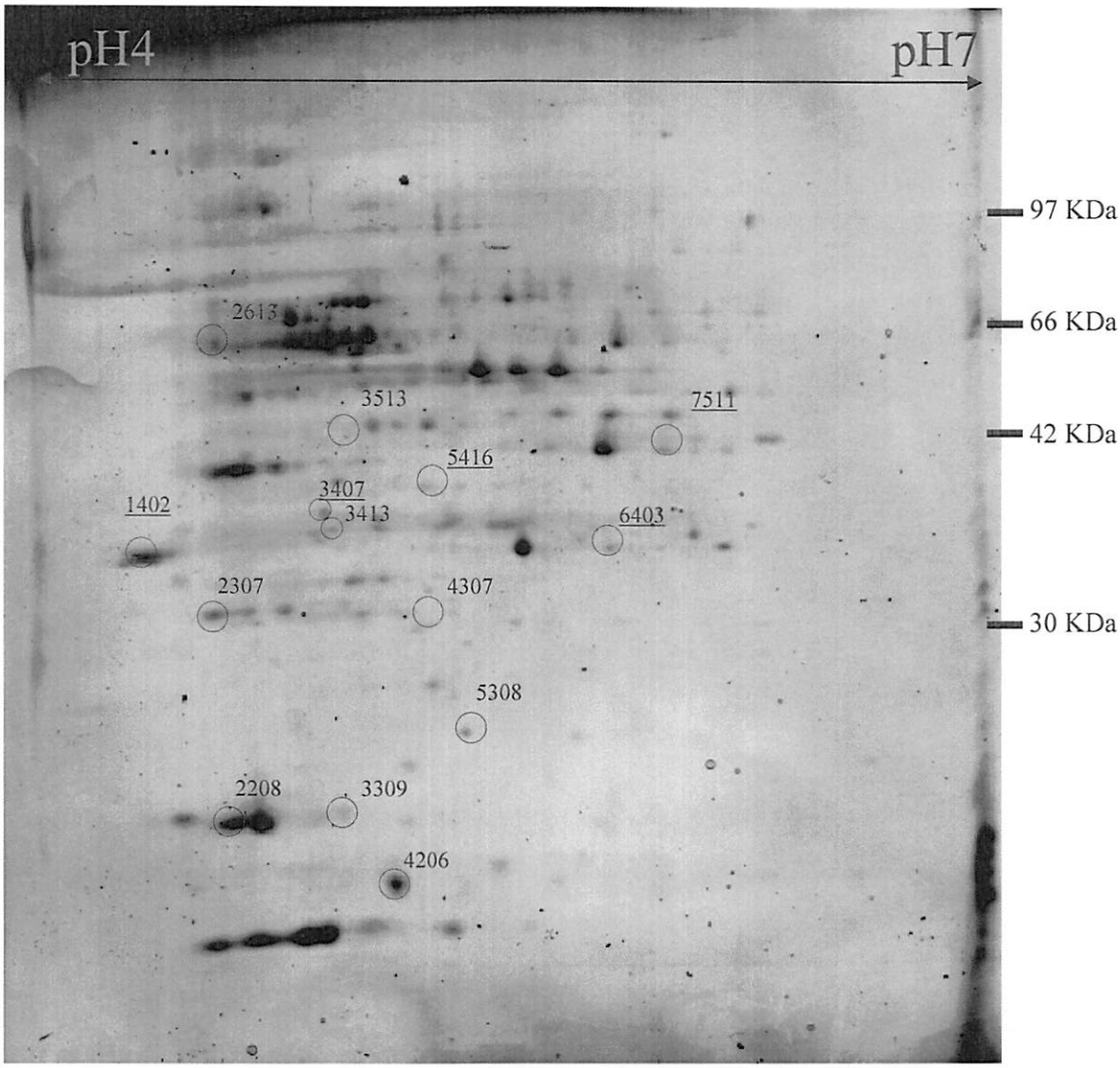


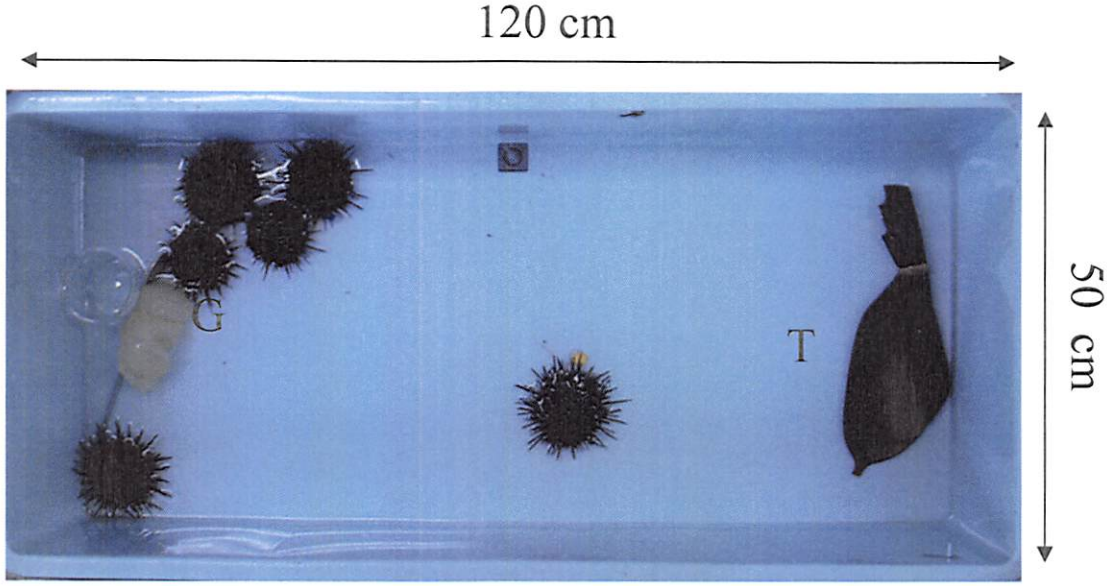

1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Kamaishi
Tomari
Saruga mori
Shirikatsu
Shiriya
Shimo tehama
Oma
Isoya
Chougo
Tairadate
Imabetsu
Minmaya
Utoma
Charatsunai
Usu
Rebunge
Shizukari
Oofune -cho
Yasuura -cho
Usujiri -cho
Kakkumi- cho
Osatsube -cho
Kinaoshi -cho
Sumiyoshi -cho
Nakanogawa -cho
Kotaniishi
Shiogama
Himukai
Kaidorima
Shimamaki mura-kou
Oohama
Kawa shiro
Oshoro 1
Oshoro 2
Oshoro 3
Oshoro 4
Oshoro 5
Oshoro 6
Oshoro 7
Gokibiru
Hamamasu
Shokan- -kaigan -cho
Ougon misaki
Rikibiru
Oniwaki
Kutsukata
Shinminato
Oshidomari
Kafuka
Horai
Oomisaki
Hon-cho
Oomu
Futastsuiwa
Utoro
Misaki-cho
Barajima
Onnemoto
Oichiishi
Daikoku jima
Aikkapu
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
Akkeshi-ko
Aniwa
Bogdanovci
Fst1=1.8
Fst2=3.4
Fst3=1.3
Fst4=1.4

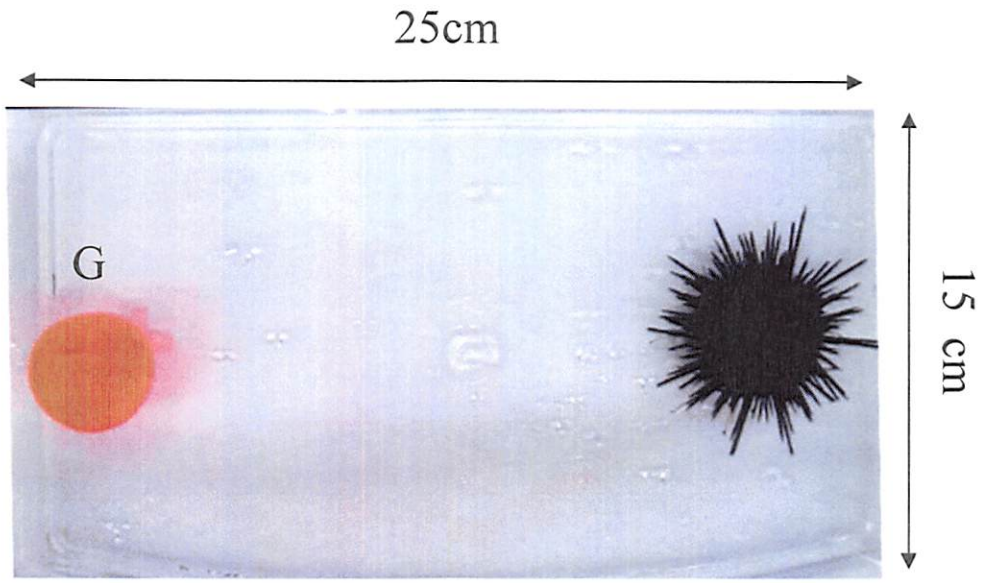

pH4
pH7
97 KDa
66 KDa
42 KDa
30 KDa
A
B
5709
5733
5731
1629
1630
2619
4704
5807
5613
7626
1631
414
2303
1103
A
2813
3821
3706
2702
3717
3722
2713
2712
3505
3518
4609
4611

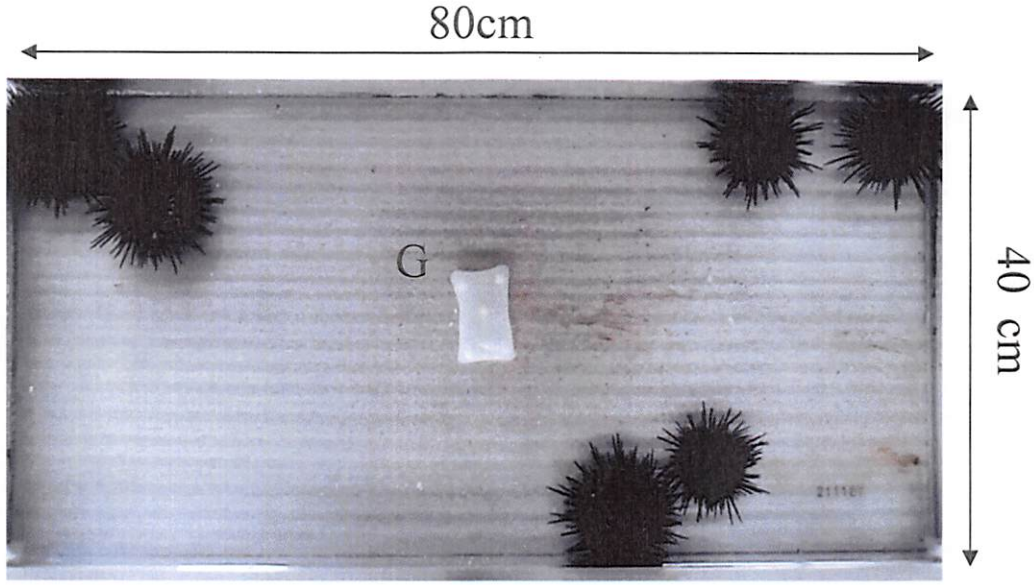

pH4
pH7
2825
2812
3811
4817
2813
5709
7706
3712
3602
3611
3610
4623
4610
5616
5618
4604
3601
4504
4512
5510
7422
7508
2406
5405
7303
5306
7308
7306
4216
1204
2208
97 KDa
66 KDa
42 KDa
30 KDa

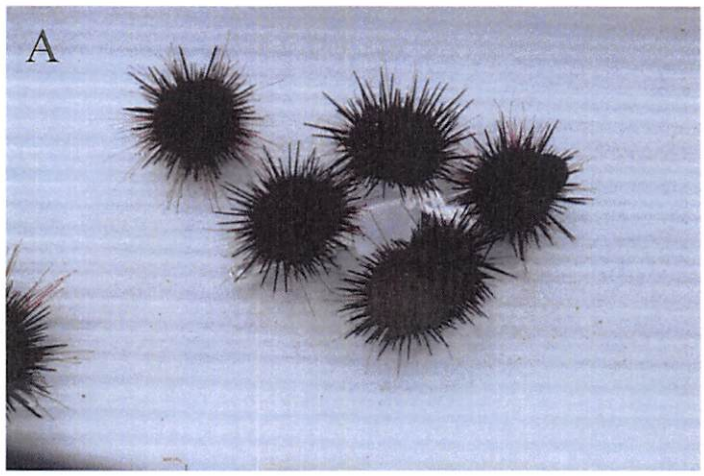

pH4
pH7
4817
3816
3817
4808
4708
5709
7707
4714
5709
6706
3611
4601
3601
7624
7618
4504
4512
7502
7412
7409
6410
7416
5404
7303
7408
7308
2307
7306
97 KDa
66 KDa
42 KDa
30 KDa


pH4
pH7
97 KDa
66 KDa
42 KDa
30 KDa
2613
3513
7511
5416
3407
3413
1402
6403
2307
4307
5308
2208
3309
4206


120 cm
50 cm
G
T


25cm
G
15 cm


80cm
G
40 cm


A

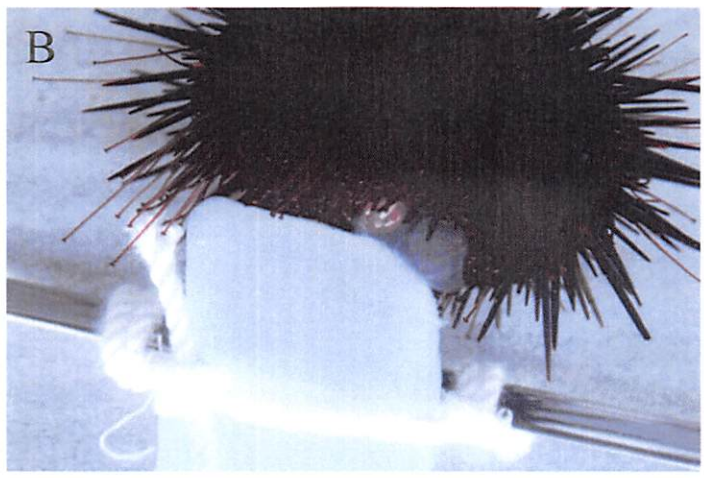

B

Table 1 Collection date and sites of materials used for this study.

Number of collection site	Collection date	Collenction site		Number of individuals	Species and variety
1	2012.6.21	Fuyushima, Samani	*5	1	*Saccharina. angustata*
2	2012.9.27	Utoma, Samani	*2 *3	5	unknown
3	2010.3.19	Charatsunai, Muroran	*2 *3	10	*S. japonica* var. *japonica*
4	2013.6.19	Usu, Date	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
5	2013.6.19	Rebunge, Toyoura	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
6	2013.6.19	Shizukari, Oshamanbe	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
7	2011.8.7	Oofune-cho, Hakodate	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
8	2010.3.18	Usujiri-cho, Hakodate	*2 *3	10	*S. japonica* var. *japonica*
9	2011.8.7	Yasuura-cho, Hakodate	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
10	2011.8.15	Kakkumi-cho, Hakodate	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
11	2011.8.15	Osatube-cho, Hakodate	*2 *3	4	*S. japonica* var. *japonica*
12	2011.8.9	Kinaoshi-cho, Hokkaido	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
13	2011.8.16	Sumiyoshi-cho, Hokkaido	*2 *3 *4	7	*S. japonica* var. *japonica*
14	2013.6.21	Nakanogawa-cho, Shiriuchi	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
15	2013.6.21	Kotaniishi, Shiriuchi	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
16	2013.6.21	Shiogama, Fukushima	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
17	2013.6.21	Himukai, Fukushima	*2 *3	5	*S. japonica* var. *japonica*
18	2013.7.16	Kamaishi, Iwate	*2 *3	6	*S. japonica* var. *religiosa*
19	2011.8.15	Tomari, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
20	2010.10.30	Sarugamori, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
21	2011.8.15	Shirikatsu, Aomori pref.	*2 *3	4	*S. japonica* var. *religiosa*
22	2011.8.15	Shiriya, Aomori pref.	*2 *3	4	*S. japonica* var. *religiosa*
23	2011.11.9	Kinopppu, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
24	2011.8.15	Shimotehama, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
25	2010.10.7	Oma, Aomori pref.	*2 *3	2	*S. japonica* var. *religiosa*
26	2011.8.16	Isoya, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
27	2011.8.16	chougo, Aomori pref.	*2 *3	3	*S. japonica* var. *religiosa*
28	2010.10.7	Tairadate, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
29	2011.8.17	Imabetsu, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
30	2010.10.18	Minmaya, Aomori pref.	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
31	2011.7.22	Kaidorima, Setana	*2 *3	5	*S. japonica* var. *religiosa*
32	2011.9.12	Shimamakimura-kou, Shimamaki	*2 *3	6	*S. japonica* var. *religiosa*
33	2013.5.22	Oohama, Iwanai	*2 *3	4	*S. japonica* var. *religiosa*

*1:Samples for development of DNA extraction method, *2:Samples for AFLP analysis, *3:Samples for microsatellite analysis, continued
*4:Samples for proteomic analysis, *5:Samples for bio flavor extraction

Table 1 Collection date and sites of materials used for this study.

Number of collection site	Collection date	Collenction site		Number of individuals	Species and variety
34	2013.6.30	Kawashiro, Kamoenai	*2 *3	4	*S. japonica* var. *religiosa*
35	2010.3.16	Oshoro, Otaru	*2 *3	35	*S. japonica* var. *religiosa*
36	2013.7.21	Gokibiru, Ishikari	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
37	2013.7.20	Hamamasu, Ishikari	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
38	2013.7.19	Shokankaigan-cho, Mashike	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
39	2013.7.18	Ougonmisaki, Rumoi	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
40	2011.11.16	Rikibiru, Tomamae	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
41	2011.10.13	Oniwaki, Rshirifuji	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
42	2011.10.13	Kutukata, Rishirifuji	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
43	2011.10.13	Shinminato, Rishirifuji	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
44	2011.10.13	Oshidomari, Rishirifuji	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
45	2011.11.28	Kafuka, Rebun	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
46	2010.3.10	Hourai, Wakkanai	*2 *3	10	*S. japonica* var. *ochotensis*
47	2011.9.1	Oomisaki, Wakkanai	*2 *3	10	*S. japonica* var. *ochotensis*
48	2011.10.19	Hon-cho, Esashi	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
49	2011.10.19	Oomu, Monbetsu	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
50	2011.10.19	Futatsuiwa, Abashiri	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
51	2011.10.27	Utoro, Shari	*2 *3	5	*S. japonica* var. *ochotensis*
52	2011.5.13	Misaki-cho, Rausu	*2 *3	10	*S. japonica* var. *diabolica*
53	2011.10.27	Shibetsu, Shibetu	*2 *3	5	*S. japonica* var. *diabolica*
54	2011.5.12	Barajima, Nemuro	*2 *3	5	*S. japonica* var. *diabolica*
55	2012.8.28	Onnemoto, Nemuro	*2 *3	7	*S. japonica* var. *diabolica*
56	2012.8.28	Furari, Nemuro	*2 *3	9	*S. japonica* var. *diabolica*
57	2011.10.26	Futaoki, Nemuro	*2 *3	5	*S. japonica* var. *diabolica*
58	2013.8.28	Tomoshiri, Nemuro	*2 *3	10	*S. japonica* var. *diabolica*
59	2013.8.28	Tomoshiri-gyokou, Nemuro	*2 *3	4	*S. japonica* var. *diabolica*
60	2012.8.23	Ochiishi, Nemuro	*2 *3	7	*S. japonica* var. *diabolica*
61	2012.10.29	Daikokujima, Akkeshi	*2 *3	5	*S. japonica* var. *diabolica*
62	2010.5.10	Aikappu, Akkeshi	*1 *2 *3	10	*S. japonica* var. *diabolica*
63	2012.10.29	Akkeshi-ko, Akkeshi	*2 *3	5	*S. japonica* var. *diabolica*
64	2013.8.16	Aniwa, Sakhalin	*2 *3	5	unknown
65	2013.8.14	Bogdanovci, Sakhalin	*2 *3	5	unknown

*1:Samples for development of DNA extraction method, *2:Samples for AFLP analysis, *3:Samples for microsatellite analysis,
*4:Samples for proteomic analysis, *5:Samples for bio flavor extraction

Table 2 Measurement values on extracted DNA of *Saccharina japonica* var. *diabolica* by a spectrophotometer according to DNA extraction method.

	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230
DNA extraction method 1	0.024	0.01	0.006		
	0.018	0.006	0.004	1.46±0.23	0.417±0.08
	0.024	0.012	0.01		
DNA extraction method 2	0.014	0.045	0.024		
	0.071	0.19	0.103	1.87±0.02	2.93±0.27
	0.031	0.09	0.048		
DNA extraction method 3	0.023	0.036	0.022		
	0.015	0.034	0.019	1.63±0.16	1.86±0.37
	0.027	0.047	0.032		
DNA extraction method 4	0.029	0.047	0.03		
	0.019	0.038	0.023	1.54±0.13	1.67±0.3
	0.035	0.049	0.035		
DNA extraction method 5	0.001	0.001	0.001		
	0.003	0.001	0.001	1.33±0.58	0.78±0.39
	0.002	0.002	0.001		
DNA extraction method 6	0.01	0.017	0.012		
	0.009	0.015	0.01	1.53±0.13	1.6±0.15
	0.007	0.01	0.006		
DNA extraction method 7	0.015	0.029	0.016		
	0.033	0.057	0.035	1.7±0.1	1.79±0.121
	0.025	0.043	0.026		
DNA extraction method 8	0.01	0.027	0.017		
	0.016	0.036	0.022	1.59±0.04	2.3±0.38
	0.02	0.039	0.025		
DNA extraction method 9	0.01	0.004	0.003		
	0.031	0.011	0.009	1.19±0.17	0.34±0.08
	0.004	0.001	0.001		
DNA extraction method 10	0.008	0.016	0.008		
	0.03	0.048	0.032	1.67±0.29	2.2±0.72
	0.001	0.003	0.002		
DNA extraction method 11	0.01	0.026	0.015		
	0.02	0.051	0.029	1.73±0.03	2.52±0.1
	0.012	0.029	0.017		

Table 3 Comparison of number of bands detected in certain extent of fluorescence intensity in AFLP analysis on *Saccharina japonica* var. *diabolica*. NP indicates the number of bands in the electropherogram. ND indicates the total number of inconsistent bands between in two electropherograms.

DNA extraction method	NP	ND	NP	ND	NP	ND	NP	ND
	100 rfu <		50 rfu <		25 rfu <		20 rfu <	
DNA extraction method 1	17	17	30	33	48	50	54	65
	19		33		47		60	
DNA extraction method 2	17	4	23	8	39	13	53	15
	18		30		50		57	
DNA extraction method 3	31	4	41	16	69	21	89	34
	28		40		60		75	
DNA extraction method 4	32	8	22	9	38	15	51	17
	28		19		36		38	
DNA extraction method 5	6	15	7	31	24	22	20	27
	10		26		36		32	
DNA extraction method 6	21	5	30	4	36	5	48	12
	16		28		37		47	
DNA extraction method 7	12	5	13	3	25	9	23	11
	22		16		20		24	
DNA extraction method 8	10	5	13	4	19	7	25	7
	13		16		23		28	
DNA extraction method 9	12	4	15	3	19	5	25	12
	15		15		20		28	
DNA extraction method 10	9	2	13	7	23	8	27	10
	10		16		20		28	
DNA extraction method 11	14	1	21	1	37	5	41	4
	15		22		37		42	

Table 4 Primers used for DNA amplifying and DNA sequencing.

Code	Synthesis direction	Sequences (5'-3')	Amplified DNA region
18S-F	forward	GTGGGAAGTTATCTAAACCTC	ITS1
5.8S-R	reverse	ATGCGTTCAAAGTTTTGATG	
5.8S-F	forward	ACGCAGCGAAATGCGATAC	ITS2
25S-R	reverse	GGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCT	
rbcL-F	forward	ACTATTGGTCACCCTGATG	rbc-sp
rbcS-R	reverse	GGAAGACCCCATAATTCCC	
Gaz2F	forward	CCAACCAYAAAGATATWGGTAC	COI
Gaz2R	reverse	GGATGACCAAARAACCAAAA	
M13F	forward	GTAAAACGACGGCCAG	Insert site in TOPO TA cloning vector
M13R	reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	

Table 5 Comparison of appearance bands within each local population in AFLP analysis on *Saccharina japonica.*

Species	DNA Data Bank of Japan (DDBJ) accession no. ITS1	ITS2	rbc-sp	COI
Costariaceae				
Agarum clathratum	FJ042761	FJ042761	AB041877	FJ409112
Costaria costata	FJ042769	AF319027	AF318988	FJ409134
Cymathaere triplicata	AY857884	AY857884	AY851562	GU097665
Thalassiophyllum clathrum	AF319028	AB087252	AB041879	—
Laminariaceae				
Arthrothamnus bifidus	AB087245	AB087245	AB480835	—
Laminaria abyssalis	JN645271	JN645267	—	JN645274, JN645273
L. digitata	FJ042773	AF319014	AY851559, AF318971	FJ409150
L. ephemera	FJ042732	FJ042732	AY851557	FJ409152
L. farlowii	AY857888	AY857888	—	—
L. hyperborea	AF319015	AY441771	AF318972	FJ409155
L. sachalinensis	AB48084	AB48084	AB480843	—
L. setchellii	AF319016	AF319016	AF318973	FJ409159
L. sinclairii	AF319017	AF319017	AF318974	—
L. solidungula	FJ042756	FJ042756	AY851556	FJ409161
L. yezoensis	FJ042749	FJ042749	AY851555	GU097714
Saccharina sp Aikkapu	※	※	※	※
Saccharina sp Furari1	※	※	※	※
Saccharina sp Furari2	※	※	※	※
Saccharina sp Onnemoto	※	※	※	※
Saccharina sp Shibetsu1	※	※	※	※
Saccharina sp Shibetsu1	※	※	※	※
Saccharina sp Sumiyoshi	※	※	※	※
S. angustata	AB022799	AY465867	AB480847, AY851554	AP011498
S. bongardiana	—	—	—	GU097727
S. cichorioides	AB022805	AB022806	AB480849	JN873239
S. coriacea	AB022803	AB022804	AB480850	—
S. diabolica	AB022795	AB022796	AB428866	AP011496
S. dentigera	—	AY857895	—	
S. groenlandica	FJ042753	FJ042753	—	FJ409197
S. gyrata	AB022809	AB022810	AB480855	—
S. japonica	AB428825	AF319018	AB480859	AP011493
S. kurilensis	AB480856	AF319022	AB480858	—
S. latissima	FJ042746	FJ042746	AY851561	GU097750
S. longipedalis	AB022797	—	AB48086	AP011497
S. longissima	AB022801	AB022802	AB480861	—
S. ochotensis	AB022793	AB022794	AB428854	AP011495
S. religiosa	AB428849	AB022792	AB428833	AP011494
S. sculpera	AB087250	AB087250	AB480854	—
S. sessilis	FJ042729	FJ042729	AY851553	GU097833
S. yendoan	AB022807	—	AB480864	—

※Sequence obtained in this study.

Table 6 Comparison of appearance bands within each local population in AFLP analysis on *Saccharina japonica*.

No.	Locality	Variety	Number of total bands	Number of common bands	Number of polymorphic bands	*P*(%)	*H*
2	Utoma, Samani	Unknown	613	180	433	0.173	0.072
3	Charatsunai, Muroran	*S. japonica* var. *japonica*	564	170	394	0.157	0.058
4	Usu, Date	*S. japonica* var. *japonica*	607	202	405	0.161	0.070
5	Rebunge, Toyoura	*S. japonica* var. *japonica*	599	209	390	0.155	0.065
6	Shizukari, Oshamanbe	*S. japonica* var. *japonica*	633	204	429	0.171	0.073
7	Oofune-cho, Hakodate	*S. japonica* var. *japonica*	568	148	420	0.167	0.067
8	Usujiri-cho, Hakodate	*S. japonica* var. *japonica*	591	168	423	0.169	0.058
9	Yasuura-cho, Hakodate	*S. japonica* var. *japonica*	485	158	327	0.130	0.057
11	Osatube-cho, Hakodate	*S. japonica* var. *japonica*	467	149	318	0.127	0.053
12	Kinaoshi-cho, Hokkaido	*S. japonica* var. *japonica*	548	169	379	0.151	0.061
13	Sumiyoshi-cho, Hokkaido	*S. japonica* var. *japonica*	708	74	634	0.253	0.099
14	Nakanogawa-cho, Shiriuchi	*S. japonica* var. *japonica*	571	181	390	0.155	0.067
15	Kotaniishi, Shiriuchi	*S. japonica* var. *japonica*	610	194	416	0.166	0.075
16	Shiogama, Fukushima	*S. japonica* var. *japonica*	672	138	534	0.213	0.094
17	Himukai, Fukushima	*S. japonica* var. *japonica*	436	131	305	0.122	0.051
18	Kamaishi, Iwate	*S. japonica* var. *religiosa*	610	182	428	0.171	0.072
19	Tomari, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	617	188	429	0.171	0.074
20	Sarugamori, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	729	69	660	0.263	0.116
21	Shirikatsu, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	590	194	396	0.158	0.074
22	Shiriya, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	604	192	412	0.164	0.076
23	Kinopppu, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	638	120	518	0.206	0.090
24	Shimotehama, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	555	170	385	0.153	0.068
26	Isoya, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	559	169	390	0.155	0.068
27	Chougo, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	487	203	284	0.113	0.057
28	Tairadate, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	558	155	403	0.161	0.074
29	Imabetsu, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	598	189	409	0.163	0.071
30	Minmaya, Aomori pref.	*S. japonica* var. *religiosa*	702	111	591	0.235	0.101
31	Kaidorima, Setana	*S. japonica* var. *religiosa*	612	125	487	0.194	0.066
32	Shimamakimura-kou, Shimamaki	*S. japonica* var. *religiosa*	593	66	527	0.210	0.079
33	Oohama, Iwanai	*S. japonica* var. *religiosa*	574	196	378	0.151	0.069
34	Kawashiro, Kamoenai	*S. japonica* var. *religiosa*	464	222	242	0.096	0.046
35-1	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	580	104	476	0.190	0.075
35-2	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	548	108	440	0.175	0.072

Common bands within population from each locality indicate the bands shared by all individuals in that population. Polymorphic bands indicate the bands except for common bands. *P* percentage of polymorphic loci, *H* Nei's (1973) gene diversity.

continued

Table 6 Comparison of appearance bands within each local population in AFLP analysis on *Saccharina japonica*.

No.	Locality	Variety	Number of total bands	Number of common bands	Number of polymorphic bands	*P*(%)	*H*
35-3	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	577	78	499	0.199	0.080
35-4	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	537	95	442	0.176	0.071
35-5	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	531	80	451	0.180	0.073
35-6	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	546	106	440	0.175	0.071
35-7	Oshoro, Otaru	*S. japonica* var. *religiosa*	572	100	472	0.188	0.077
36	Gokibiru, Ishikari	*S. japonica* var. *ochotensis*	442	152	290	0.116	0.045
37	Hamamasu, Ishikari	*S. japonica* var. *ochotensis*	440	142	298	0.119	0.050
38	Shokankaigan-chou, Mashike	*S. japonica* var. *ochotensis*	517	133	384	0.153	0.068
39	Ougonmisaki, Rumoi	*S. japonica* var. *ochotensis*	569	225	344	0.137	0.062
40	Rikibiru, Tomamae	*S. japonica* var. *ochotensis*	428	156	272	0.108	0.047
41	Shokankaigan-chou, Mashike	*S. japonica* var. *ochotensis*	517	133	384	0.153	0.068
42	Oniwaki, Rshirifuji	*S. japonica* var. *ochotensis*	597	158	439	0.175	0.075
43	Kutukata, Rishirifuji	*S. japonica* var. *ochotensis*	429	192	237	0.094	0.039
44	Shinminato, Rishirifuji	*S. japonica* var. *ochotensis*	424	185	239	0.095	0.042
45	Oshidomari, Rishirifuji	*S. japonica* var. *ochotensis*	449	176	273	0.109	0.046
46	Kafuka, Rebun	*S. japonica* var. *ochotensis*	504	151	353	0.141	0.060
47	Hourai, Wakkanai	*S. japonica* var. *ochotensis*	468	172	296	0.118	0.044
48	Oomisaki, Wakkanai	*S. japonica* var. *ochotensis*	408	116	292	0.116	0.042
49	Hon-cho, Esashi	*S. japonica* var. *ochotensis*	535	196	339	0.135	0.056
50	Oomu, Monbetsu	*S. japonica* var. *ochotensis*	539	188	351	0.140	0.060
51	Futatsuiwa, Abashiri	*S. japonica* var. *ochotensis*	446	187	259	0.103	0.043
52	Utoro, Shari	*S. japonica* var. *ochotensis*	424	140	284	0.113	0.049
53	Misaki-chou, Rausu	*S. japonica* var. *diabolica*	540	194	346	0.138	0.046
54	Barajima, Nemuro	*S. japonica* var. *diabolica*	438	92	346	0.138	0.051
55	Onnemoto, Nemuro	*S. japonica* var. *diabolica*	696	81	615	0.245	0.095
58	Tomoshiri, Nemuro	*S. japonica* var. *diabolica*	569	140	429	0.171	0.061
59	Tomoshiri-gyokou, Nemuro	*S. japonica* var. *diabolica*	433	206	227	0.090	0.038
60	Ochiishi, Nemuro	*S. japonica* var. *diabolica*	705	93	612	0.244	0.095
61	Daikokujima, Akkeshi	*S. japonica* var. *diabolica*	490	213	277	0.110	0.048
62	Aikappu, Akkeshi	*S. japonica* var. *diabolica*	554	190	364	0.145	0.052
63	Akkeshi-ko, Akkeshi	*S. japonica* var. *diabolica*	429	172	257	0.102	0.042
64	Aniwa, Sakhalin	Unknown	425	154	271	0.108	0.044
65	Bogdanovci, Sakhalin	Unknown	411	156	255	0.102	0.043

Common bands within population from each locality indicate the bands shared by all individuals in that population. Polymorphic bands indicate the bands except for common bands. *P* percentage of polymorphic loci, *H* Nei's (1973) gene diversity.

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Utoma	Charatsunai	Usu	Rebunge	Shizukari	Oofune-cho	Usujiri-cho	Yasuura-cho	Osatube-cho	Kinaoshi-cho
Utoma	0.70									
Charatsunai	0.57	0.78								
Usu	0.65	0.61	0.73							
Rebunge	0.65	0.59	0.69	0.75						
Shizukar	0.63	0.60	0.67	0.70	0.73					
Oofune-cho	0.51	0.54	0.52	0.52	0.54	0.69				
Usujiri-cho	0.51	0.60	0.54	0.52	0.54	0.58	0.78			
Yasuura-cho	0.48	0.46	0.48	0.47	0.47	0.49	0.47	0.70		
Osatube-cho	0.44	0.41	0.43	0.42	0.43	0.40	0.41	0.41	0.70	
Kinaoshi-cho	0.48	0.52	0.51	0.50	0.52	0.64	0.59	0.48	0.41	0.72
Sumiyoshi-cho	0.45	0.49	0.44	0.44	0.46	0.44	0.51	0.38	0.35	0.45
Nakanogawa-cho	0.59	0.55	0.60	0.60	0.61	0.52	0.55	0.48	0.44	0.52
Kotaniishi	0.58	0.55	0.60	0.60	0.60	0.50	0.55	0.48	0.44	0.51
Shiogama	0.46	0.44	0.47	0.46	0.47	0.42	0.42	0.39	0.37	0.42
Himukai	0.42	0.46	0.44	0.43	0.44	0.51	0.51	0.41	0.33	0.54
Kamaishi	0.57	0.52	0.58	0.59	0.59	0.47	0.51	0.46	0.44	0.46
Tomari	0.59	0.53	0.59	0.61	0.61	0.49	0.52	0.47	0.44	0.49
Sarugamori	0.43	0.40	0.43	0.43	0.44	0.39	0.39	0.36	0.36	0.38
Shirikatsu	0.58	0.53	0.58	0.59	0.60	0.48	0.52	0.47	0.45	0.47
Shiriya	0.58	0.53	0.57	0.58	0.58	0.47	0.51	0.47	0.44	0.46
Kinopppu	0.52	0.47	0.52	0.51	0.51	0.43	0.46	0.43	0.41	0.42
Shimotehama	0.58	0.53	0.57	0.57	0.70	0.48	0.52	0.47	0.45	0.48
Isoya	0.59	0.52	0.58	0.58	0.58	0.49	0.52	0.48	0.45	0.49
Chougo	0.58	0.51	0.56	0.56	0.56	0.48	0.51	0.46	0.44	0.48
Tairadate	0.48	0.50	0.47	0.47	0.48	0.46	0.49	0.39	0.38	0.47
Imabetsu	0.57	0.50	0.56	0.56	0.57	0.46	0.51	0.46	0.43	0.46
Minmaya	0.48	0.44	0.48	0.48	0.48	0.44	0.44	0.41	0.39	0.44
Kaidorima	0.49	0.54	0.50	0.49	0.50	0.51	0.57	0.43	0.36	0.52
Shimamakimura-kou	0.37	0.42	0.40	0.39	0.40	0.47	0.46	0.38	0.30	0.48
Oohama	0.51	0.46	0.49	0.50	0.50	0.40	0.43	0.44	0.42	0.39
Kawashiro	0.51	0.45	0.49	0.48	0.48	0.41	0.43	0.44	0.42	0.40

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Utoma	Charatsunai	Usu	Rebunge	Shizukari	Oofunc-cho	Usujiri-cho	Yasuura-cho	Osatubc-cho	Kinaoshi-cho
Oshoro 1	0.38	0.42	0.40	0.40	0.41	0.45	0.45	0.39	0.30	0.45
Oshoro 2	0.39	0.42	0.41	0.40	0.41	0.46	0.45	0.39	0.31	0.46
Oshoro 3	0.37	0.40	0.39	0.38	0.38	0.43	0.43	0.37	0.29	0.44
Oshoro 4	0.38	0.40	0.39	0.38	0.39	0.43	0.43	0.38	0.29	0.43
Oshoro 5	0.37	0.40	0.39	0.38	0.39	0.42	0.44	0.37	0.29	0.44
Oshoro 6	0.38	0.42	0.40	0.39	0.40	0.44	0.44	0.37	0.30	0.44
Oshoro 7	0.38	0.41	0.40	0.39	0.40	0.45	0.46	0.37	0.30	0.45
Gokibiru	0.39	0.43	0.41	0.41	0.41	0.48	0.47	0.39	0.32	0.49
Hamamasu	0.39	0.44	0.41	0.41	0.41	0.47	0.46	0.37	0.30	0.47
Shokankaigan-cho	0.39	0.44	0.40	0.41	0.41	0.47	0.46	0.39	0.32	0.47
Ougonmisaki	0.56	0.49	0.55	0.56	0.55	0.46	0.48	0.44	0.42	0.45
Rikibiru	0.41	0.44	0.42	0.42	0.44	0.47	0.49	0.37	0.34	0.47
Oniwaki	0.42	0.44	0.42	0.42	0.43	0.45	0.47	0.36	0.31	0.47
Kutukata	0.47	0.51	0.48	0.48	0.49	0.50	0.55	0.43	0.35	0.53
Shinminato	0.45	0.49	0.46	0.46	0.47	0.49	0.53	0.42	0.33	0.51
Oshidomari	0.43	0.47	0.44	0.44	0.45	0.47	0.52	0.40	0.33	0.50
Kafuka	0.42	0.44	0.43	0.43	0.44	0.46	0.48	0.38	0.32	0.47
Hourai	0.47	0.53	0.47	0.48	0.49	0.50	0.57	0.42	0.36	0.50
Oomisaki	0.40	0.45	0.42	0.42	0.42	0.48	0.50	0.39	0.32	0.48
Hon-cho	0.46	0.50	0.46	0.46	0.49	0.49	0.54	0.41	0.35	0.51
Oomu	0.47	0.50	0.48	0.48	0.49	0.49	0.53	0.42	0.35	0.51
Futatsuiwa	0.46	0.50	0.47	0.47	0.49	0.50	0.53	0.42	0.35	0.51
Utoro	0.42	0.45	0.43	0.42	0.43	0.47	0.51	0.37	0.33	0.48
Misaki-cho	0.48	0.51	0.49	0.48	0.49	0.50	0.54	0.42	0.37	0.50
Barajima	0.42	0.44	0.42	0.41	0.43	0.45	0.48	0.37	0.33	0.44
Onnemoto	0.43	0.46	0.43	0.42	0.42	0.40	0.47	0.37	0.37	0.41
Tomoshiri	0.42	0.46	0.43	0.42	0.43	0.43	0.48	0.37	0.35	0.43
Tomoshiri-gyokou	0.35	0.37	0.38	0.36	0.37	0.41	0.41	0.35	0.29	0.43
Ochiishi	0.39	0.42	0.40	0.39	0.41	0.40	0.45	0.34	0.33	0.40
Daikokujima	0.41	0.44	0.42	0.42	0.44	0.44	0.47	0.39	0.37	0.46
Aikappu	0.41	0.46	0.42	0.42	0.43	0.43	0.52	0.37	0.34	0.43
Akkeshi-ko	0.33	0.37	0.36	0.35	0.37	0.42	0.41	0.34	0.29	0.42
Aniwa	0.39	0.42	0.41	0.40	0.41	0.48	0.47	0.38	0.31	0.50
Bogdanovci	0.37	0.41	0.40	0.38	0.40	0.46	0.46	0.37	0.30	0.48

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Sumiyoshi-cho	Nakanogawa-cho	Kotaniishi	Shiogama	Himukai	Kamaishi	Tomari	Sarugamori	Shirikatsu	Shiriya
Sumiyoshi-cho	0.57									
Nakanogawa-cho	0.50	0.71								
Kotaniishi	0.48	0.68	0.71							
Shiogama	0.39	0.51	0.54	0.63						
Himukai	0.45	0.47	0.45	0.39	0.72					
Kamaishi	0.45	0.61	0.60	0.46	0.41	0.73				
Tomari	0.47	0.64	0.63	0.49	0.43	0.65	0.71			
Sarugamori	0.36	0.46	0.47	0.51	0.34	0.46	0.48	0.53		
Shirikatsu	0.46	0.63	0.63	0.49	0.41	0.64	0.69	0.49	0.69	
Shiriya	0.46	0.63	0.63	0.48	0.41	0.63	0.67	0.49	0.68	0.69
Kinopppu	0.43	0.56	0.56	0.45	0.37	0.55	0.57	0.44	0.58	0.60
Shimotchama	0.48	0.63	0.63	0.49	0.42	0.61	0.66	0.49	0.65	0.67
Isoya	0.46	0.63	0.62	0.49	0.43	0.63	0.65	0.48	0.65	0.66
Chougo	0.48	0.62	0.61	0.48	0.41	0.60	0.63	0.48	0.65	0.65
Tairadate	0.45	0.49	0.50	0.45	0.44	0.47	0.50	0.42	0.49	0.49
Imabetsu	0.47	0.60	0.60	0.47	0.40	0.60	0.63	0.46	0.64	0.64
Minmaya	0.38	0.50	0.51	0.44	0.38	0.51	0.52	0.44	0.52	0.53
Kaidorima	0.52	0.53	0.52	0.43	0.52	0.48	0.51	0.40	0.49	0.49
Shimamakimura-kou	0.39	0.42	0.41	0.36	0.56	0.37	0.38	0.32	0.38	0.38
Oohama	0.42	0.50	0.51	0.40	0.33	0.51	0.52	0.37	0.54	0.53
Kawashiro	0.43	0.51	0.51	0.42	0.34	0.52	0.51	0.39	0.52	0.52
Oshoro 1	0.40	0.40	0.39	0.34	0.51	0.38	0.38	0.32	0.37	0.38
Oshoro 2	0.40	0.40	0.40	0.35	0.51	0.37	0.38	0.32	0.38	0.38
Oshoro 3	0.38	0.38	0.38	0.34	0.48	0.35	0.36	0.31	0.36	0.36
Oshoro 4	0.38	0.39	0.38	0.34	0.48	0.36	0.37	0.31	0.36	0.37
Oshoro 5	0.38	0.38	0.38	0.33	0.47	0.35	0.36	0.30	0.35	0.36
Oshoro 6	0.39	0.39	0.39	0.36	0.51	0.36	0.37	0.32	0.37	0.37
Oshoro 7	0.39	0.40	0.39	0.35	0.49	0.36	0.38	0.32	0.37	0.37

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Sumiyoshi-cho	Nakanogawa-cho	Kotaniishi	Shiogama	Himukai	Kamaishi	Tomari	Sarugamori	Shirikatsu	Shiriya
Gokibiru	0.42	0.43	0.41	0.36	0.59	0.38	0.40	0.33	0.39	0.39
Hamamasu	0.41	0.43	0.40	0.36	0.57	0.38	0.39	0.32	0.38	0.38
Shokankaigan-chou	0.40	0.43	0.42	0.37	0.47	0.39	0.41	0.34	0.40	0.40
Ougonmisaki	0.45	0.60	0.61	0.46	0.40	0.57	0.59	0.43	0.59	0.59
Rikibiru	0.43	0.46	0.44	0.37	0.52	0.40	0.42	0.34	0.42	0.41
Oniwaki	0.42	0.44	0.43	0.38	0.51	0.39	0.41	0.33	0.40	0.41
Kutukata	0.48	0.50	0.48	0.39	0.55	0.44	0.45	0.36	0.44	0.44
Shinminato	0.45	0.48	0.46	0.38	0.55	0.41	0.44	0.34	0.43	0.43
Oshidomari	0.45	0.46	0.45	0.37	0.55	0.40	0.42	0.33	0.41	0.41
Kafuka	0.42	0.44	0.43	0.37	0.50	0.39	0.41	0.33	0.39	0.39
Hourai	0.50	0.50	0.49	0.38	0.50	0.44	0.47	0.36	0.47	0.46
Oomisaki	0.43	0.43	0.42	0.36	0.51	0.38	0.40	0.33	0.40	0.39
Hon-cho	0.46	0.48	0.47	0.38	0.51	0.44	0.45	0.35	0.44	0.43
Oomu	0.46	0.50	0.49	0.39	0.50	0.44	0.47	0.35	0.45	0.45
Futatsuiwa	0.46	0.49	0.48	0.38	0.52	0.43	0.46	0.35	0.44	0.44
Utoro	0.46	0.46	0.45	0.37	0.52	0.40	0.42	0.33	0.41	0.42
Misaki-cho	0.48	0.51	0.51	0.38	0.48	0.46	0.50	0.37	0.48	0.48
Barajima	0.44	0.45	0.42	0.34	0.49	0.40	0.43	0.34	0.41	0.42
Onnemoto	0.46	0.46	0.46	0.37	0.39	0.43	0.44	0.35	0.44	0.45
Tomoshiri	0.47	0.46	0.47	0.37	0.42	0.43	0.44	0.35	0.44	0.45
Tomoshiri-gyokou	0.37	0.39	0.37	0.32	0.47	0.35	0.37	0.29	0.35	0.36
Ochiishi	0.45	0.43	0.43	0.35	0.38	0.40	0.40	0.34	0.41	0.41
Daikokujima	0.43	0.46	0.47	0.39	0.45	0.43	0.44	0.36	0.44	0.44
Aikappu	0.47	0.46	0.46	0.36	0.44	0.42	0.43	0.34	0.44	0.44
Akkeshi-ko	0.37	0.39	0.37	0.31	0.51	0.34	0.36	0.29	0.35	0.34
Aniwa	0.41	0.43	0.42	0.36	0.60	0.39	0.39	0.32	0.39	0.39
Bogdanovci	0.40	0.42	0.39	0.34	0.61	0.36	0.39	0.30	0.37	0.37

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Kinopppu	Shimotehama	Isoya	Chougo	Tairadate	Imabetsu	Minmaya	Kaidorima	Shimamakimura-kou	Oohama
Kinopppu	0.61									
Shimotehama	0.62	0.72								
Isoya	0.60	0.70	0.71							
Chougo	0.61	0.68	0.68	0.71						
Tairadate	0.46	0.52	0.51	0.52	0.68					
Imabetsu	0.60	0.66	0.66	0.67	0.49	0.71				
Minmaya	0.48	0.55	0.55	0.54	0.45	0.53	0.58			
Kaidorima	0.44	0.51	0.50	0.49	0.47	0.48	0.42	0.72		
Shimamakimura-kou	0.34	0.38	0.39	0.38	0.39	0.37	0.35	0.45	0.55	
Oohama	0.48	0.52	0.51	0.52	0.43	0.54	0.41	0.41	0.31	0.72
Kawashiro	0.49	0.52	0.51	0.52	0.42	0.53	0.42	0.42	0.31	0.61
Oshoro 1	0.34	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.36	0.45	0.46	0.32
Oshoro 2	0.35	0.38	0.39	0.39	0.39	0.37	0.37	0.46	0.47	0.32
Oshoro 3	0.32	0.36	0.37	0.36	0.37	0.35	0.35	0.43	0.46	0.30
Oshoro 4	0.35	0.37	0.38	0.38	0.37	0.36	0.36	0.44	0.45	0.32
Oshoro 5	0.33	0.35	0.36	0.37	0.36	0.35	0.35	0.43	0.46	0.31
Oshoro 6	0.34	0.38	0.38	0.38	0.39	0.36	0.36	0.45	0.47	0.31
Oshoro 7	0.34	0.38	0.38	0.38	0.38	0.37	0.36	0.45	0.47	0.30
Gokibiru	0.36	0.39	0.40	0.38	0.41	0.39	0.36	0.49	0.52	0.34
Hamamasu	0.35	0.39	0.39	0.38	0.41	0.38	0.36	0.47	0.51	0.34
Shokankaigan-cho	0.37	0.41	0.41	0.40	0.43	0.40	0.38	0.43	0.44	0.36
Ougonmisaki	0.53	0.60	0.58	0.56	0.46	0.58	0.48	0.47	0.36	0.51

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Kinopppu	Shimotehama	Isoya	Chougo	Tairadate	Imabetsu	Minmaya	Kaidorima	Shimamakimura-kou	Oohama
Rikibiru	0.39	0.42	0.42	0.41	0.41	0.42	0.37	0.48	0.45	0.36
Oniwaki	0.37	0.41	0.41	0.41	0.41	0.39	0.36	0.46	0.44	0.36
Kutukata	0.41	0.46	0.46	0.46	0.44	0.45	0.40	0.51	0.47	0.40
Shinminato	0.39	0.43	0.43	0.44	0.42	0.43	0.39	0.49	0.47	0.40
Oshidomari	0.38	0.42	0.42	0.42	0.41	0.42	0.37	0.50	0.46	0.36
Kafuka	0.36	0.39	0.41	0.40	0.40	0.39	0.36	0.47	0.44	0.35
Hourai	0.42	0.49	0.48	0.48	0.44	0.46	0.40	0.54	0.44	0.41
Oomisaki	0.36	0.41	0.41	0.40	0.41	0.38	0.37	0.49	0.44	0.34
Hon-cho	0.41	0.46	0.46	0.45	0.41	0.45	0.38	0.51	0.45	0.39
Oomu	0.41	0.47	0.46	0.44	0.42	0.45	0.39	0.50	0.45	0.39
Futatsuiwa	0.41	0.46	0.46	0.44	0.42	0.45	0.39	0.51	0.46	0.38
Utoro	0.39	0.43	0.43	0.42	0.41	0.41	0.35	0.50	0.47	0.35
Misaki-cho	0.43	0.50	0.49	0.47	0.44	0.47	0.40	0.59	0.42	0.42
Barajima	0.39	0.42	0.42	0.41	0.38	0.40	0.35	0.47	0.43	0.36
Onnemoto	0.42	0.46	0.45	0.44	0.39	0.45	0.38	0.47	0.36	0.43
Tomoshiri	0.41	0.45	0.45	0.44	0.43	0.45	0.39	0.48	0.38	0.40
Tomoshiri-gyokou	0.33	0.37	0.37	0.35	0.35	0.35	0.33	0.39	0.40	0.30
Ochiishi	0.39	0.42	0.41	0.40	0.40	0.42	0.36	0.43	0.35	0.39
Daikokujima	0.41	0.46	0.45	0.44	0.46	0.45	0.40	0.42	0.40	0.42
Aikappu	0.40	0.45	0.44	0.44	0.45	0.44	0.38	0.47	0.39	0.39
Akkeshi-ko	0.32	0.35	0.35	0.35	0.34	0.35	0.32	0.39	0.43	0.31
Aniwa	0.35	0.39	0.39	0.39	0.38	0.38	0.35	0.47	0.51	0.33
Bogdanovci	0.35	0.36	0.38	0.37	0.38	0.37	0.33	0.46	0.52	0.33

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Kawashiro	Oshoro 1	Oshoro 2	Oshoro 3	Oshoro 4	Oshoro 5	Oshoro 6	Oshoro 7	Gokibiru	Hamamasu
Kawashiro	0.79									
Oshoro 1	0.31	0.61								
Oshoro 2	0.33	0.59	0.61							
Oshoro 3	0.30	0.57	0.57	0.55						
Oshoro 4	0.32	0.58	0.56	0.55	0.59					
Oshoro 5	0.32	0.58	0.58	0.57	0.56	0.58				
Oshoro 6	0.32	0.58	0.62	0.57	0.56	0.58	0.62			
Oshoro 7	0.31	0.56	0.57	0.54	0.54	0.55	0.59	0.60		
Gokibiru	0.33	0.56	0.57	0.53	0.53	0.54	0.56	0.57	0.75	
Hamamasu	0.33	0.55	0.56	0.52	0.52	0.53	0.55	0.56	0.72	0.73
Shokankaigan-cho	0.35	0.47	0.48	0.46	0.44	0.46	0.48	0.48	0.55	0.56
Ougonmisaki	0.53	0.37	0.38	0.36	0.36	0.35	0.37	0.38	0.41	0.42
Rikibiru	0.37	0.50	0.50	0.47	0.47	0.47	0.50	0.49	0.56	0.56
Oniwaki	0.35	0.45	0.45	0.43	0.42	0.43	0.45	0.45	0.48	0.47
Kutukata	0.40	0.50	0.49	0.46	0.47	0.48	0.50	0.49	0.53	0.52
Shinminato	0.38	0.50	0.49	0.46	0.47	0.48	0.49	0.48	0.51	0.51
Oshidomari	0.36	0.50	0.49	0.46	0.47	0.48	0.49	0.48	0.52	0.50
Kafuka	0.34	0.47	0.46	0.44	0.44	0.45	0.47	0.46	0.50	0.48
Hourai	0.40	0.47	0.48	0.44	0.45	0.45	0.48	0.47	0.53	0.51
Oomisaki	0.36	0.48	0.48	0.46	0.47	0.46	0.48	0.48	0.56	0.53
Hon-cho	0.39	0.47	0.48	0.45	0.44	0.46	0.47	0.49	0.54	0.54
Oomu	0.40	0.47	0.48	0.45	0.44	0.46	0.48	0.49	0.55	0.54
Futatsuiwa	0.39	0.51	0.51	0.48	0.48	0.50	0.52	0.51	0.57	0.56
Utoro	0.36	0.51	0.51	0.47	0.48	0.48	0.51	0.50	0.58	0.56
Misaki-cho	0.41	0.45	0.45	0.42	0.44	0.43	0.45	0.44	0.49	0.49
Barajima	0.36	0.48	0.46	0.45	0.47	0.46	0.46	0.46	0.52	0.51
Onnemoto	0.42	0.37	0.36	0.36	0.37	0.36	0.36	0.37	0.40	0.39
Tomoshiri	0.41	0.39	0.39	0.37	0.38	0.37	0.39	0.38	0.42	0.43
Tomoshiri-gyokou	0.29	0.41	0.42	0.39	0.40	0.41	0.41	0.40	0.46	0.46
Ochiishi	0.38	0.37	0.36	0.35	0.36	0.35	0.36	0.37	0.39	0.39
Daikokujima	0.42	0.39	0.40	0.38	0.38	0.38	0.40	0.40	0.43	0.44
Aikappu	0.40	0.40	0.42	0.38	0.39	0.38	0.41	0.40	0.44	0.44
Akkeshi-ko	0.31	0.44	0.45	0.41	0.43	0.43	0.44	0.43	0.51	0.50
Aniwa	0.35	0.51	0.50	0.47	0.47	0.47	0.49	0.48	0.59	0.57
Bogdanovci	0.33	0.50	0.50	0.47	0.47	0.47	0.50	0.48	0.59	0.57

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Shokankaigan-cho	Ougonmisaki	Rikibiru	Oniwaki	Kutukata	Shinminato	Oshidomari	Kafuka	Hourai	Oomisaki
Shokankaigan-cho	0.67									
Ougonmisaki	0.46	0.77								
Rikibiru	0.51	0.43	0.77							
Oniwaki	0.43	0.39	0.53	0.67						
Kutukata	0.49	0.43	0.58	0.63	0.81					
Shinminato	0.47	0.41	0.58	0.63	0.75	0.79				
Oshidomari	0.48	0.40	0.58	0.63	0.75	0.73	0.76			
Kafuka	0.44	0.39	0.53	0.60	0.65	0.63	0.64	0.72		
Hourai	0.51	0.50	0.54	0.51	0.58	0.55	0.56	0.53	0.81	
Oomisaki	0.47	0.41	0.49	0.46	0.53	0.52	0.51	0.50	0.62	0.77
Hon-cho	0.52	0.47	0.57	0.54	0.62	0.58	0.60	0.59	0.64	0.56
Oomu	0.51	0.48	0.55	0.54	0.62	0.60	0.60	0.57	0.62	0.55
Futatsuiwa	0.53	0.47	0.58	0.55	0.65	0.61	0.62	0.61	0.64	0.60
Utoro	0.50	0.43	0.60	0.53	0.60	0.59	0.61	0.56	0.59	0.55
Misaki-cho	0.46	0.50	0.51	0.46	0.52	0.49	0.51	0.47	0.59	0.53
Barajima	0.46	0.41	0.53	0.46	0.54	0.52	0.53	0.49	0.54	0.52
Onnemoto	0.39	0.47	0.39	0.41	0.44	0.43	0.43	0.40	0.51	0.44
Tomoshiri	0.42	0.46	0.42	0.42	0.45	0.44	0.43	0.40	0.49	0.46
Tomoshiri-gyokou	0.41	0.35	0.46	0.42	0.45	0.44	0.44	0.41	0.42	0.42
Ochiishi	0.38	0.43	0.38	0.39	0.41	0.40	0.39	0.37	0.45	0.41
Daikokujima	0.43	0.46	0.44	0.42	0.46	0.45	0.43	0.41	0.47	0.46
Aikappu	0.43	0.45	0.45	0.43	0.46	0.44	0.44	0.42	0.52	0.47
Akkeshi-ko	0.44	0.36	0.46	0.40	0.45	0.45	0.45	0.40	0.43	0.44
Aniwa	0.47	0.39	0.51	0.49	0.53	0.53	0.54	0.48	0.48	0.51
Bogdanovci	0.47	0.37	0.51	0.50	0.54	0.54	0.54	0.49	0.48	0.51

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Hon-cho	Oomu	Futatsuiwa	Utoro	Misaki-cho	Barajima	Onnemoto	Tomoshiri	Tomoshiri-gyokou	Ochiishi
Hon-cho	0.75									
Oomu	0.70	0.75								
Futatsuiwa	0.72	0.72	0.79							
Utoro	0.63	0.63	0.65	0.73						
Misaki-cho	0.55	0.54	0.56	0.55	0.82					
Barajima	0.53	0.52	0.55	0.58	0.55	0.72				
Onnemoto	0.46	0.46	0.45	0.44	0.55	0.50	0.64			
Tomoshiri	0.46	0.45	0.45	0.45	0.54	0.48	0.54	0.76		
Tomoshiri-gyokou	0.46	0.45	0.46	0.46	0.46	0.49	0.40	0.48	0.80	
Ochiishi	0.42	0.41	0.42	0.41	0.49	0.44	0.52	0.61	0.44	0.63
Daikokujima	0.47	0.46	0.47	0.46	0.49	0.47	0.48	0.56	0.47	0.50
Aikappu	0.48	0.48	0.48	0.48	0.53	0.46	0.49	0.58	0.50	0.53
Akkeshi-ko	0.47	0.45	0.48	0.48	0.47	0.46	0.39	0.44	0.59	0.40
Aniwa	0.49	0.50	0.51	0.54	0.48	0.49	0.39	0.42	0.47	0.38
Bogdanovci	0.50	0.50	0.52	0.53	0.48	0.49	0.38	0.41	0.47	0.37

continued

Table 7 Dice similarity coefficiency (S) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Daikokujima	Aikappu	Akkeshi-ko	Aniwa	Bogdanovci
Daikokujima	0.79				
Aikappu	0.59	0.77			
Akkeshi-ko	0.51	0.53	0.79		
Aniwa	0.44	0.45	0.54	0.76	
Bogdanovci	0.43	0.44	0.53	0.70	0.76

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Utoma	Charatsunai	Usu	Rebunge	Shizukari	Oofune-cho	Usujiri-cho	Yasuura-cho	Osatsube-cho	Kinaoshi-cho
Utoma										
Charatsunai	0.20									
Usu	0.32	0.27								
Rebunge	0.18	0.04	0.24							
Shizukari	0.20	0.08	0.23	0.02						
Oofune-cho	0.27	0.21	0.22	0.16	0.13					
Usujiri-cho	0.24	0.16	0.26	0.13	0.11	0.13				
Yasuura-cho	0.28	0.16	0.26	0.16	0.11	0.12	0.04			
Osatsube-cho	0.28	0.19	0.23	0.13	0.13	0.10	0.09	0.10		
Kinaoshi-cho	0.44	0.38	0.29	0.37	0.37	0.33	0.37	0.36	0.35	
Sumiyoshi-cho	0.29	0.21	0.30	0.18	0.16	0.16	0.13	0.14	0.11	0.40
Nakanogawa-cho	0.30	0.26	0.20	0.23	0.23	0.22	0.21	0.21	0.20	0.31
Kotaniishi	0.33	0.27	0.33	0.26	0.27	0.28	0.27	0.29	0.29	0.40
Shiogama	0.48	0.44	0.42	0.44	0.44	0.42	0.46	0.47	0.49	0.45
Himukai	0.35	0.31	0.35	0.31	0.32	0.32	0.32	0.35	0.35	0.43
Kamaishi	0.36	0.31	0.37	0.31	0.32	0.36	0.35	0.38	0.39	0.45
Tomari	0.33	0.28	0.35	0.28	0.30	0.34	0.33	0.36	0.36	0.42
Sarugamori	0.45	0.41	0.34	0.41	0.41	0.39	0.41	0.42	0.42	0.40
Shirikatsu	0.47	0.44	0.38	0.42	0.43	0.38	0.43	0.45	0.46	0.47
Shiriya	0.50	0.46	0.43	0.45	0.46	0.43	0.46	0.47	0.50	0.47
Kinoppu	0.49	0.47	0.37	0.44	0.46	0.40	0.46	0.47	0.48	0.47
Shimotehama	0.49	0.44	0.39	0.44	0.46	0.42	0.44	0.46	0.46	0.42
Isoya	0.39	0.36	0.32	0.35	0.34	0.32	0.36	0.35	0.33	0.34
Chougo	0.28	0.19	0.30	0.19	0.20	0.24	0.21	0.24	0.23	0.40
Tairadate	0.29	0.22	0.29	0.20	0.20	0.23	0.24	0.23	0.25	0.39
Imabetsu	0.39	0.35	0.14	0.34	0.34	0.31	0.35	0.35	0.34	0.36
Minmaya	0.53	0.49	0.41	0.50	0.51	0.46	0.49	0.51	0.53	0.44
Kaidorima	0.47	0.41	0.37	0.42	0.43	0.40	0.43	0.43	0.45	0.42
Shimamakimura-kou	0.44	0.42	0.31	0.40	0.41	0.37	0.40	0.42	0.40	0.36
Oohama	0.43	0.39	0.39	0.35	0.35	0.34	0.41	0.41	0.39	0.46
Kawashiro	0.48	0.47	0.42	0.45	0.44	0.40	0.47	0.48	0.48	0.52

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Utoma	Charatsunai	Usu	Rebunge	Shizukari	Oofune-cho	Usujiri-cho	Yasuura-cho	Osatsube-cho	Kinaoshi-cho
Oshoro-1	0.48	0.46	0.36	0.45	0.44	0.40	0.45	0.46	0.45	0.41
Oshoro-2	0.48	0.46	0.36	0.45	0.45	0.39	0.45	0.46	0.44	0.41
Oshoro-3	0.49	0.46	0.36	0.45	0.45	0.40	0.45	0.47	0.45	0.41
Oshoro-4	0.46	0.44	0.33	0.43	0.43	0.38	0.43	0.45	0.42	0.39
Oshoro-5	0.49	0.47	0.36	0.45	0.45	0.41	0.45	0.47	0.45	0.41
Oshoro-6	0.50	0.48	0.37	0.46	0.46	0.42	0.46	0.48	0.46	0.41
Oshoro-7	0.49	0.46	0.35	0.44	0.44	0.40	0.45	0.46	0.45	0.40
Gokibiru	0.57	0.54	0.44	0.54	0.55	0.48	0.54	0.56	0.57	0.50
Hamamasu	0.56	0.53	0.44	0.54	0.54	0.48	0.53	0.55	0.56	0.48
Shokankaigan-cho	0.51	0.47	0.38	0.46	0.47	0.42	0.47	0.47	0.48	0.40
Ougonmisaki	0.42	0.36	0.39	0.35	0.35	0.35	0.38	0.35	0.41	0.48
Rikibiru	0.57	0.54	0.45	0.53	0.54	0.48	0.53	0.54	0.57	0.51
Oniwaki	0.51	0.48	0.40	0.48	0.47	0.43	0.48	0.49	0.48	0.44
Kutsukata	0.59	0.55	0.47	0.56	0.55	0.50	0.55	0.57	0.58	0.53
Shinminato	0.58	0.55	0.47	0.55	0.55	0.50	0.55	0.56	0.57	0.52
Oshidomari	0.57	0.53	0.46	0.54	0.54	0.49	0.54	0.55	0.56	0.51
Rebun	0.54	0.51	0.42	0.52	0.52	0.47	0.51	0.53	0.52	0.48
Hourai	0.59	0.55	0.48	0.55	0.55	0.50	0.55	0.55	0.57	0.55
Oomisaki	0.59	0.55	0.44	0.55	0.56	0.49	0.55	0.56	0.59	0.51
Hon-chou	0.55	0.51	0.46	0.51	0.52	0.48	0.52	0.52	0.54	0.52
Oomu	0.52	0.47	0.42	0.48	0.48	0.43	0.47	0.48	0.50	0.48
Futastuiwa	0.57	0.53	0.46	0.54	0.54	0.49	0.53	0.54	0.57	0.52
Utoro	0.54	0.51	0.42	0.51	0.50	0.44	0.50	0.50	0.53	0.48
Misaki-Cho	0.57	0.52	0.48	0.53	0.53	0.50	0.53	0.53	0.57	0.54
Barajima	0.55	0.51	0.42	0.51	0.51	0.45	0.51	0.52	0.55	0.52
Onnemoto	0.50	0.46	0.42	0.45	0.45	0.41	0.46	0.46	0.47	0.50
Tomoshiri	0.55	0.52	0.44	0.51	0.50	0.46	0.51	0.51	0.54	0.50
Tomoshiri-gyokou	0.62	0.58	0.48	0.59	0.59	0.53	0.59	0.60	0.63	0.57
Ochiishi	0.48	0.45	0.38	0.43	0.43	0.39	0.44	0.44	0.43	0.41
Daikokujima	0.58	0.55	0.46	0.55	0.54	0.49	0.55	0.54	0.57	0.51
Aikappu	0.60	0.57	0.50	0.56	0.56	0.52	0.58	0.57	0.60	0.55
Akkeshi-ko	0.62	0.59	0.50	0.59	0.60	0.54	0.60	0.61	0.63	0.58
Aniwa	0.58	0.55	0.45	0.55	0.55	0.50	0.55	0.56	0.57	0.52
Bogdanovci,	0.60	0.56	0.47	0.57	0.56	0.51	0.56	0.58	0.60	0.52

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Sumiyoshi-cho	Nakanogawa-cho	Kotaniishi	Shiogama	Himukai	Kamaishi	Tomari	Sarugamori	Shirikatsu	Shiriya
Sumiyoshi										
Nakanogawa-cho	0.26									
Kotaniishi	0.32	0.32								
Shiogama	0.49	0.43	0.39							
Himukai	0.36	0.34	0.20	0.36						
Kamaishi	0.38	0.37	0.22	0.42	0.15					
Tomari	0.35	0.35	0.23	0.39	0.17	0.11				
Sarugamori	0.45	0.34	0.38	0.41	0.39	0.42	0.37			
Shirikatsu	0.46	0.37	0.42	0.53	0.45	0.48	0.45	0.37		
Shiriya	0.48	0.43	0.47	0.45	0.47	0.51	0.46	0.38	0.51	
Kinoppu	0.48	0.39	0.46	0.57	0.49	0.53	0.50	0.48	0.49	0.57
Shimotehama	0.48	0.37	0.44	0.48	0.44	0.47	0.42	0.17	0.43	0.41
Isoya	0.36	0.34	0.38	0.40	0.40	0.43	0.39	0.37	0.43	0.37
Chougo	0.27	0.30	0.29	0.43	0.29	0.33	0.28	0.38	0.43	0.44
Tairadate	0.27	0.29	0.29	0.44	0.29	0.32	0.29	0.40	0.43	0.44
Imabetsu	0.38	0.29	0.38	0.47	0.39	0.42	0.39	0.40	0.43	0.49
Minmaya	0.52	0.42	0.50	0.54	0.51	0.54	0.51	0.38	0.51	0.50
Kaidorima	0.45	0.38	0.43	0.46	0.45	0.48	0.45	0.39	0.48	0.43
Shimamakimura-kou	0.44	0.32	0.42	0.45	0.42	0.45	0.43	0.29	0.39	0.41
Oohama	0.37	0.40	0.39	0.54	0.45	0.45	0.43	0.50	0.48	0.56
Kawashiro	0.46	0.44	0.47	0.61	0.51	0.54	0.52	0.55	0.54	0.62
Oshoro-1	0.46	0.35	0.45	0.49	0.46	0.48	0.45	0.37	0.42	0.45
Oshoro-2	0.47	0.35	0.45	0.50	0.46	0.49	0.46	0.37	0.43	0.47
Oshoro-3	0.47	0.35	0.45	0.50	0.46	0.49	0.46	0.37	0.43	0.46
Oshoro-4	0.46	0.34	0.43	0.47	0.44	0.46	0.44	0.35	0.41	0.44
Oshoro-5	0.48	0.36	0.45	0.49	0.45	0.49	0.46	0.36	0.43	0.46
Oshoro-6	0.49	0.37	0.46	0.50	0.47	0.50	0.48	0.38	0.45	0.47
Oshoro-7	0.47	0.35	0.45	0.50	0.46	0.49	0.46	0.36	0.44	0.45

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Sumiyoshi-cho	Nakanogawa-cho	Kotaniishi	Shiogama	Himukai	Kamaishi	Tomari	Sarugamori	Shirikatsu	Shiriya
Gokibiru	0.55	0.46	0.54	0.59	0.55	0.57	0.55	0.44	0.55	0.56
Hamamasu	0.55	0.45	0.53	0.57	0.54	0.56	0.54	0.44	0.55	0.55
Shokankaigan-cho	0.49	0.39	0.48	0.52	0.50	0.52	0.50	0.39	0.48	0.50
Ougonmisaki	0.39	0.38	0.39	0.55	0.43	0.45	0.43	0.50	0.53	0.57
Rikibiru	0.54	0.47	0.53	0.60	0.55	0.57	0.54	0.47	0.57	0.55
Oniwaki	0.50	0.41	0.47	0.51	0.49	0.51	0.48	0.42	0.50	0.48
Kutsukata	0.56	0.47	0.53	0.58	0.54	0.57	0.54	0.49	0.57	0.54
Shinminato	0.56	0.48	0.53	0.57	0.54	0.57	0.54	0.49	0.58	0.54
Oshidomari	0.55	0.47	0.53	0.57	0.54	0.56	0.54	0.48	0.56	0.53
Rebun	0.53	0.45	0.50	0.55	0.51	0.53	0.51	0.45	0.53	0.52
Hourai	0.56	0.49	0.54	0.58	0.56	0.58	0.55	0.52	0.59	0.55
Oomisaki	0.57	0.45	0.55	0.59	0.56	0.58	0.56	0.46	0.57	0.55
Hon-cho	0.53	0.47	0.50	0.55	0.52	0.54	0.51	0.47	0.55	0.50
Oomu	0.49	0.43	0.47	0.51	0.47	0.50	0.47	0.43	0.51	0.48
Futastuiwa	0.54	0.47	0.52	0.57	0.53	0.56	0.52	0.48	0.57	0.53
Utoro	0.52	0.45	0.51	0.56	0.52	0.55	0.52	0.44	0.55	0.49
Misaki-cho	0.54	0.50	0.53	0.58	0.55	0.58	0.55	0.51	0.60	0.55
Barajima	0.54	0.45	0.52	0.59	0.54	0.57	0.54	0.48	0.56	0.54
Onnemoto	0.47	0.43	0.47	0.53	0.50	0.52	0.51	0.49	0.53	0.50
Tomoshiri	0.52	0.45	0.53	0.57	0.54	0.57	0.54	0.51	0.57	0.55
Tomoshiri-gyokou	0.60	0.51	0.59	0.66	0.60	0.63	0.60	0.54	0.61	0.63
Ochiishi	0.45	0.39	0.46	0.49	0.46	0.49	0.47	0.44	0.49	0.46
Daikokujima	0.55	0.47	0.57	0.62	0.58	0.60	0.57	0.53	0.59	0.60
Aikappu	0.57	0.51	0.59	0.62	0.60	0.62	0.59	0.57	0.63	0.58
Akkeshi-ko	0.60	0.52	0.61	0.66	0.61	0.63	0.60	0.53	0.61	0.62
Aniwa	0.56	0.47	0.54	0.60	0.55	0.58	0.56	0.45	0.55	0.56
Bogdanovci,	0.58	0.49	0.57	0.62	0.57	0.60	0.58	0.49	0.58	0.57

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Kinoppu	Shimotehama	Isoya	Chougo	Tairadate	Imabetsu	Minmaya	Kaidorima	Shimamakimura-kou	Oohama
Kinoppu										
Shimotehama	0.51									
Isoya	0.46	0.39								
Chougo	0.48	0.41	0.32							
Tairadate	0.48	0.42	0.34	0.12						
Imabetsu	0.44	0.43	0.39	0.33	0.29					
Minmaya	0.57	0.39	0.38	0.46	0.48	0.45				
Kaidorima	0.55	0.42	0.29	0.40	0.42	0.42	0.41			
Shimamakimura-kou	0.45	0.31	0.31	0.38	0.40	0.36	0.16	0.35		
Oohama	0.49	0.54	0.42	0.42	0.41	0.45	0.58	0.53	0.48	
Kawashiro	0.56	0.59	0.48	0.48	0.47	0.48	0.63	0.57	0.53	0.36
Oshoro-1	0.50	0.40	0.35	0.44	0.45	0.41	0.31	0.38	0.21	0.51
Oshoro-2	0.50	0.41	0.36	0.44	0.45	0.41	0.33	0.39	0.22	0.51
Oshoro-3	0.50	0.40	0.36	0.45	0.45	0.42	0.34	0.39	0.19	0.51
Oshoro-4	0.47	0.37	0.33	0.43	0.43	0.39	0.29	0.37	0.17	0.50
Oshoro-5	0.50	0.40	0.36	0.45	0.45	0.41	0.31	0.39	0.20	0.52
Oshoro-6	0.51	0.42	0.37	0.46	0.46	0.42	0.33	0.40	0.22	0.53
Oshoro-7	0.49	0.40	0.37	0.44	0.45	0.41	0.33	0.38	0.20	0.52
Gokibiru	0.60	0.48	0.44	0.52	0.54	0.49	0.35	0.48	0.28	0.60
Hamamasu	0.59	0.48	0.44	0.51	0.53	0.49	0.37	0.48	0.27	0.59
Shokankaigan-cho	0.53	0.43	0.40	0.46	0.47	0.43	0.41	0.46	0.30	0.53
Ougonmisaki	0.55	0.54	0.44	0.36	0.33	0.45	0.58	0.52	0.49	0.47

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Kinoppu	Shimotchama	Isoya	Chougo	Tairadate	Imabetsu	Minmaya	Kaidorima	Shimamakimura-kou	Oohama
Rikibiru	0.60	0.51	0.44	0.51	0.52	0.50	0.47	0.50	0.38	0.59
Oniwaki	0.54	0.44	0.38	0.46	0.46	0.44	0.38	0.44	0.32	0.52
Kutsukata	0.63	0.50	0.45	0.52	0.53	0.52	0.45	0.52	0.39	0.59
Shinminato	0.63	0.50	0.43	0.52	0.52	0.52	0.48	0.51	0.41	0.61
Oshidomari	0.60	0.48	0.42	0.51	0.51	0.50	0.43	0.48	0.37	0.59
Rebun	0.57	0.47	0.42	0.50	0.50	0.47	0.43	0.47	0.36	0.57
Hourai	0.64	0.55	0.44	0.54	0.53	0.55	0.55	0.50	0.46	0.61
Oomisaki	0.61	0.51	0.45	0.55	0.55	0.51	0.48	0.50	0.38	0.61
Hon-cho	0.60	0.48	0.43	0.50	0.49	0.51	0.48	0.48	0.40	0.58
Oomu	0.56	0.45	0.39	0.45	0.46	0.47	0.45	0.44	0.36	0.54
Futastuiwa	0.62	0.50	0.43	0.51	0.51	0.51	0.49	0.51	0.40	0.60
Utoro	0.58	0.47	0.37	0.48	0.49	0.48	0.42	0.44	0.33	0.57
Misaki-cho	0.63	0.54	0.45	0.52	0.51	0.55	0.56	0.44	0.48	0.60
Barajima	0.59	0.52	0.41	0.50	0.52	0.50	0.47	0.50	0.38	0.58
Onnemoto	0.53	0.52	0.36	0.45	0.45	0.47	0.52	0.45	0.44	0.49
Tomoshiri	0.58	0.54	0.40	0.50	0.49	0.50	0.55	0.49	0.45	0.56
Tomoshiri-gyokou	0.65	0.56	0.51	0.58	0.58	0.55	0.53	0.59	0.44	0.65
Ochiishi	0.49	0.46	0.31	0.43	0.43	0.44	0.47	0.44	0.38	0.46
Daikokujima	0.60	0.55	0.48	0.54	0.53	0.52	0.57	0.59	0.47	0.58
Aikappu	0.65	0.59	0.47	0.56	0.55	0.56	0.60	0.56	0.51	0.62
Akkeshi-ko	0.64	0.56	0.51	0.58	0.59	0.56	0.48	0.58	0.41	0.64
Aniwa	0.61	0.48	0.45	0.53	0.53	0.50	0.36	0.49	0.29	0.60
Bogdanovci,	0.62	0.50	0.47	0.55	0.56	0.52	0.35	0.52	0.29	0.62

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Kawashiro	Oshoro-1	Oshoro-2	Oshoro-3	Oshoro-4	Oshoro-5	Oshoro-6	Oshoro-7	Gokibiru	Hamamasu
Kawashiro										
Oshoro-1	0.56									
Oshoro-2	0.55	0.04								
Oshoro-3	0.55	0.03	0.06							
Oshoro-4	0.54	0.03	0.05	-0.01						
Oshoro-5	0.56	0.05	0.09	0.04	0.02					
Oshoro-6	0.57	0.07	0.11	0.06	0.04	0.00				
Oshoro-7	0.56	0.11	0.13	0.10	0.08	0.09	0.06			
Gokibiru	0.65	0.25	0.30	0.27	0.25	0.26	0.27	0.24		
Hamamasu	0.64	0.26	0.30	0.27	0.26	0.25	0.28	0.23	0.08	
Shokankaigan-cho	0.58	0.31	0.34	0.32	0.29	0.31	0.32	0.31	0.35	0.31
Ougonmisaki	0.52	0.52	0.52	0.52	0.50	0.52	0.53	0.50	0.59	0.57
Rikibiru	0.64	0.37	0.40	0.40	0.37	0.39	0.40	0.39	0.45	0.43
Oniwaki	0.58	0.34	0.37	0.35	0.34	0.36	0.36	0.36	0.44	0.43
Kutsukata	0.66	0.40	0.42	0.41	0.40	0.43	0.43	0.42	0.52	0.51
Shinminato	0.67	0.42	0.45	0.43	0.42	0.44	0.44	0.43	0.53	0.52
Oshidomari	0.65	0.37	0.39	0.38	0.38	0.40	0.40	0.39	0.49	0.49
Rebun	0.62	0.37	0.39	0.37	0.35	0.38	0.38	0.37	0.46	0.46
Hourai	0.68	0.47	0.48	0.48	0.46	0.47	0.47	0.46	0.54	0.55
Oomisaki	0.67	0.40	0.39	0.39	0.37	0.40	0.41	0.38	0.45	0.47
Hon-cho	0.63	0.41	0.44	0.41	0.40	0.42	0.43	0.39	0.46	0.45
Oomu	0.59	0.38	0.40	0.38	0.37	0.39	0.39	0.36	0.42	0.42
Futastuiwa	0.65	0.39	0.41	0.39	0.38	0.40	0.40	0.38	0.46	0.46
Utoro	0.63	0.32	0.34	0.33	0.32	0.33	0.34	0.33	0.38	0.39
Misaki-cho	0.66	0.50	0.50	0.50	0.49	0.50	0.51	0.50	0.58	0.57
Barajima	0.64	0.36	0.37	0.38	0.36	0.40	0.41	0.39	0.48	0.48
Onnemoto	0.55	0.45	0.46	0.46	0.44	0.48	0.48	0.47	0.54	0.53
Tomoshiri	0.61	0.48	0.49	0.49	0.47	0.49	0.50	0.49	0.57	0.55
Tomoshiri-gyokou	0.71	0.47	0.48	0.47	0.45	0.48	0.49	0.48	0.56	0.55
Ochiishi	0.52	0.41	0.41	0.42	0.39	0.42	0.43	0.41	0.49	0.47
Daikokujima	0.64	0.51	0.52	0.51	0.49	0.51	0.52	0.51	0.60	0.58
Aikappu	0.68	0.53	0.54	0.54	0.52	0.53	0.54	0.53	0.62	0.60
Akkeshi-ko	0.69	0.45	0.46	0.45	0.44	0.45	0.46	0.46	0.51	0.49
Aniwa	0.65	0.35	0.39	0.38	0.36	0.37	0.39	0.38	0.40	0.41
Bogdanovci,	0.66	0.37	0.40	0.39	0.37	0.37	0.40	0.39	0.42	0.42

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Shokankaigan-cho	Ougonmisaki	Rikibiru	Oniwaki	Kutsukata	Shinminato	Oshidomari	Rebun	Hourai	Oomisaki
Shokankaigan-cho										
Ougonmisaki	0.48									
Rikibiru	0.42	0.57								
Oniwaki	0.43	0.55	0.40							
Kutsukata	0.50	0.62	0.48	0.27						
Shinminato	0.49	0.62	0.49	0.30	0.20					
Oshidomari	0.46	0.61	0.43	0.23	0.17	0.13				
Rebun	0.45	0.58	0.45	0.24	0.34	0.32	0.27			
Hourai	0.49	0.59	0.56	0.49	0.58	0.56	0.54	0.51		
Oomisaki	0.47	0.61	0.56	0.48	0.55	0.56	0.53	0.48	0.47	
Hon-cho	0.43	0.56	0.46	0.40	0.45	0.43	0.40	0.38	0.41	0.45
Oomu	0.40	0.51	0.43	0.36	0.42	0.40	0.38	0.35	0.41	0.43
Futastuiwa	0.44	0.57	0.48	0.40	0.46	0.42	0.41	0.37	0.45	0.44
Utoro	0.39	0.56	0.38	0.36	0.42	0.43	0.35	0.36	0.46	0.44
Misaki-cho	0.54	0.58	0.58	0.53	0.62	0.61	0.57	0.57	0.56	0.57
Barajima	0.45	0.58	0.50	0.45	0.53	0.52	0.48	0.46	0.54	0.49
Onnemoto	0.50	0.49	0.56	0.48	0.56	0.56	0.53	0.52	0.50	0.52
Tomoshiri	0.51	0.55	0.58	0.51	0.60	0.60	0.58	0.56	0.59	0.56
Tomoshiri-gyokou	0.53	0.65	0.59	0.52	0.63	0.64	0.60	0.57	0.66	0.62
Ochiishi	0.44	0.47	0.51	0.44	0.51	0.51	0.50	0.48	0.49	0.48
Daikokujima	0.53	0.59	0.60	0.54	0.63	0.64	0.61	0.59	0.63	0.59
Aikappu	0.55	0.61	0.63	0.56	0.66	0.66	0.63	0.61	0.62	0.62
Akkeshi-ko	0.50	0.64	0.57	0.53	0.60	0.62	0.58	0.57	0.64	0.60
Aniwa	0.46	0.60	0.51	0.44	0.52	0.53	0.48	0.50	0.59	0.51
Bogdanovci,	0.47	0.63	0.53	0.45	0.52	0.56	0.50	0.51	0.61	0.52

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Hon-cho	Oomu	Futastuiwa	Utoro	Misaki-cho	Barajima	Onnemoto	Tomoshiri	Tomoshiri-gyokou	Ochiishi
Hon-cho										
Oomu	0.15									
Futastuiwa	0.20	0.16								
Utoro	0.31	0.29	0.31							
Misaki-cho	0.54	0.50	0.57	0.52						
Barajima	0.49	0.45	0.48	0.37	0.53					
Onnemoto	0.51	0.46	0.53	0.48	0.46	0.42				
Tomoshiri	0.57	0.53	0.59	0.53	0.53	0.53	0.38			
Tomoshiri-gyokou	0.58	0.53	0.60	0.54	0.62	0.53	0.56	0.56		
Ochiishi	0.49	0.45	0.50	0.45	0.47	0.44	0.29	0.21	0.47	
Daikokujima	0.59	0.55	0.61	0.56	0.62	0.57	0.49	0.50	0.61	0.41
Aikappu	0.60	0.56	0.62	0.58	0.59	0.61	0.52	0.50	0.62	0.40
Akkeshi-ko	0.57	0.54	0.58	0.52	0.61	0.55	0.57	0.59	0.49	0.50
Aniwa	0.53	0.49	0.53	0.44	0.59	0.51	0.55	0.57	0.58	0.49
Bogdanovci,	0.53	0.50	0.54	0.48	0.61	0.53	0.58	0.59	0.58	0.51

continued

Table 8 Pairwise genetic differentiation (*Gst*) between local populations of *Saccharina japonica*.

	Daikokujima	Aikappu	Akkeshi-ko	Aniwa	Bogdanovci,
Daikokujima					
Aikappu	0.52				
Akkeshi-ko	0.57	0.57			
Aniwa	0.59	0.62	0.48		
Bogdanovci,	0.61	0.63	0.50	0.21	

Table 9 Adaptors and primers used for development of microsatellite markers.

Code	Sequence (5'-3')
Long adaptor	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT
Short adaptor	ACCAGCCC-NH_2
AP1	CCATCGTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	CTATAGGGCACGCGTGGT
SSR Primer	ACACACACACACACACACAC
	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
	AGAGAGAGAGACACACACACAC

The symbol"-NH_2" indinate 3' end capped by an amino residue

Table 10 Characterization of 10 candidate microsatellite markers found in this study and the polymorphism.

Locus name	Primer sequence (5'-3')	Polymorphism pettern in the locus amplified by the primer pair	Tm (℃)	Size range (bp)	Number of Alleles
MS1	TTTTACTTCCGGGTTGTTGC	$(TC)_{3 \text{ or } 4}$, $(CA)_{5\text{-}8}$, $(AC)_{5 \text{ or } 6}$	53℃	391-397	8
	GAAGTATGCAAGGTGTAGATTT				
MS2	CCCATTTATTTATCTCTCTCCAC	$(TTCCTCCCTCTC)_{3 \text{ or } 4}$, $(TC)_{4 \text{ or } 5}$, $(TC)_{5\text{-}7}$	53℃	404-416	8
	GACAGCGATATTACATACATGC				
MS3	AACGACAGGGAGTAACATGG	$(CA)_{5\text{-}7}(GA)_{12\text{-}16}$	50℃	163-173	9
	AAGAGCATTTTTGTTGTTGT				
MS4	GTATTTTGTCCCCATATTCG	$(CA)_{6\text{-}9}$, $(GGGACCAGTTC)_{0 \text{ or } 1}$, $(GAC)_{1 \text{ or } 2}$	53℃	277-297	6
	GTATTACCGTCATGTTGCAGTA				
MS5	CATCCCACTCGACACCAAC	$(CGCGCACACACA)_{3 \text{ or } 4}$,	55℃	171-202	4
	GTGTTGTGTTGTTGCGAGATT	$(CGCGCACACACACCCCACACA)_{1 \text{ or } 3}$			
MS6	CACTCAGGACAACACAAAAAC	$(AC)_{4 \text{ or } 5}$	53℃	674-676	2
	GTTGCTGCTGTTGTTCAATG				
MS7	GGAGGACGGAAAGAAGAAGC	$(GCT)_2GCC(GCT)_5$ or $(GCT)_3GCC(GCT)_{15}$ or	57℃	172-262	5
	ACCTTGGCTGCGTCTAACTC	$(GCT)_3GCC(GCT)_{11\text{-}13}GCCGTTGCC(GCT)_3GCC(GCT)_{10 \text{ or } 15}$			
MS8	ACAAAAGGCACCGGGAGTTAG	$(AG)_3GG(AG)_4$ or $(AG)_{16 \text{ or } 18 \text{ or } 20\text{-}21}$	57℃	177-203	5
	GCTTTCGGTGTTAGAACTCG				
MS9	CGTATGCCCATAGACCCTTG	$(GA)_{10\text{-}11 \text{ or } 15\text{-}16}$, $(GAGAGAGAGGAG)_{0 \text{ or } 1}$	57℃	177-189	6
	CGGGCGAACACTCTCTCTC				
MS10	CAACCACAACATTCATCAGG	$(AG)_{9 \text{ or } 10}$	55℃	244-246	2
	TTGGGACGGGAAGTCAAAG				

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Kamaishi	1	420	337	171	172
		393	325	167	172
	2	393	325	163	172
		393	325	163	172
	3	420	325	161	172
		391	317	161	172
	4	420	337	169	—
		391	325	169	—
	5	420	337	163	172
		391	325	163	172
Tomari	1	393	325	—	181
		393	325	—	181
	2	393	333	167	181
		393	325	167	172
	3	393	333	165	181
		393	333	165	181
	4	397	321	167	172
		393	309	159	172
	5	393	333	163	181
		385	321	159	172
Sarugamori	1	393	309	171	181
		393	309	169	172
	2	389	329	173	181
		389	321	171	172
	3	393	333	167	172
		393	321	167	172
	4	393	333	163	181
		393	321	163	172
Shirikatsu	1	389	325	165	181
		389	325	161	172
	2	389	333	173	181
		389	325	173	172
	3	393	333	165	172
		393	321	165	172
	4	393	321	165	181
		393	321	165	172
	5	381	333	169	172
		381	325	163	172
Shiya	1	393	333	173	181
		393	325	165	172
	2	393	333	173	181
		393	321	165	172
	3	405	321	163	181
		405	309	161	172
	4	385	321	163	181
		385	321	163	172
	5	393	341	167	181
		393	321	167	172
Shimotehama	1	381	321	161	172
		381	321	161	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment.

continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Shimotehama	2	397	321	167	172
		393	321	167	172
	3	393	325	167	181
		393	321	163	172
	4	395	341	163	181
		395	341	163	172
	5	397	325	165	181
		393	325	161	172
Isoya	1	395	321	165	172
		395	321	165	172
	2	397	325	167	172
		391	325	167	172
	3	395	329	167	181
		391	329	161	172
	4	397	325	165	172
		389	325	165	172
	5	395	325	161	181
		391	325	161	172
Tairadate	1	393	321	171	172
		393	321	163	172
	2	420	337	165	181
		393	313	165	181
	3	393	329	171	172
		393	329	163	172
	4	—	349	163	172
		—	345	161	172
	5	393	321	171	181
		393	321	163	181
Chougo	1	420	341	161	172
		420	325	159	172
	2	420	337	157	181
		420	333	157	181
	3	420	333	165	172
		420	333	157	172
Imabetsu	1	393	325	163	172
		393	325	161	172
	2	393	325	163	181
		393	325	163	181
	3	393	325	169	172
		393	325	163	172
	4	397	325	173	172
		397	325	163	172
	5	393	325	159	181
		393	325	159	181
Minmaya	1	389	329	161	172
		389	325	161	172
	2	397	325	163	181
		397	321	163	181
	3	393	341	165	172
		393	321	165	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Minmaya	3	393	341	165	172
		393	321	165	172
	4	393	317	161	172
		393	317	161	172
	5	393	325	159	181
		393	325	159	172
Oma	1	401	333	157	172
		401	325	157	172
	2	393	341	161	172
		393	341	157	172
Utoma	1	420	325	163	256
		420	325	163	256
	2	420	327	163	256
		420	327	163	200
	3	420	329	167	256
		420	329	165	178
	4	420	327	163	172
		420	327	163	172
	5	381	325	163	172
		381	325	163	172
Charatsunai	1	393	321	165	256
		393	321	165	256
	2	393	321	167	256
		393	309	163	172
	3	397	333	163	256
		397	321	163	172
	4	393	333	163	256
		393	321	163	256
	5	393	333	163	253
		393	333	163	253
Usu	1	366	321	165	253
		366	313	161	172
	2	393	333	163	259
		393	333	163	172
	3	393	333	163	253
		393	321	163	253
	4	393	321	167	253
		393	321	163	172
	5	401	333	163	253
		393	321	163	253
Rebunge	1	389	321	161	253
		389	309	161	253
	2	393	333	163	256
		393	321	163	172
	3	393	337	165	253
		393	333	165	253
	4	389	333	165	256
		389	333	163	172
	5	389	333	165	259
		389	333	163	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment.

continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Shizukari	1	393	333	165	253
		393	333	165	253
	2	393	333	161	253
		393	321	161	172
	3	393	333	163	256
		393	333	163	172
	4	393	333	163	253
		393	309	163	253
	5	393	333	163	253
		393	333	163	259
Ofune-cho	1	420	333	165	172
		420	325	165	172
	2	412	333	163	256
		413	301	163	256
	3	393	333	165	256
		393	333	165	256
	4	420	321	163	256
		420	301	163	256
	5	422	333	165	256
		422	301	165	256
Usujiri-cho	1	393	333	165	256
		393	325	165	256
	2	393	321	167	259
		393	321	165	172
	3	393	321	163	256
		393	321	161	256
	4	393	333	165	256
		387	321	165	256
	5	393	333	167	256
		393	333	165	256
Yasuura-cho	1	393	333	165	256
		395	325	163	172
	2	393	325	165	200
		368	325	165	172
	3	393	333	171	256
		364	321	165	256
	4	393	325	169	172
		393	325	165	172
	5	393	333	165	256
		387	301	165	256
Osatsube-cho	1	393	337	171	256
		393	333	169	256
	2	393	301	173	256
		393	301	165	256
	3	393	321	165	256
		393	321	165	256
	4	407	333	171	256
		393	321	171	253
	5	422	333	167	256
		422	325	163	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment.

continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Kakkumi-cho	1	393	325	169	256
		393	317	167	200
	2	393	333	169	259
		393	333	165	253
	3	393	333	171	256
		393	301	167	256
	4	393	301	165	256
		393	301	165	256
	5	354	—	165	256
		354	—	165	256
Kinaoshi-cho	1	—	341	167	256
		—	301	163	172
	2	364	333	167	259
		364	317	163	253
	3	393	301	173	253
		393	301	165	230
	4	395	333	167	256
		393	297	161	256
	5	393	333	165	172
		393	317	165	172
Sumiyoshi-cho	1	393	341	163	181
		393	341	163	181
	2	364	329	163	181
		364	329	161	172
	3	397	333	161	172
		364	321	161	172
	4	393	329	155	172
		364	329	155	172
	5	393	341	167	256
		389	329	161	172
Nakanogawa-cho	1	397	333	167	181
		397	321	161	172
	2	397	333	161	172
		389	321	161	172
	3	393	329	161	181
		393	321	157	172
	4	389	325	163	181
		389	301	159	172
	5	389	341	161	172
		389	341	155	172
Kotaniishi	1	401	333	157	172
		401	321	157	172
	2	360	341	163	172
		360	321	163	172
	3	420	341	155	172
		393	341	155	172
	4	393	321	159	172
		360	321	159	172
	5	393	333	159	172
		389	325	159	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Shiogama	1	393	333	159	181
		393	333	159	172
	2	397	341	157	172
		389	309	157	172
	3	397	345	165	172
		397	309	163	172
	4	393	341	163	181
		393	309	163	172
	5	397	329	161	181
		393	329	161	172
Himukai	1	—	333	—	—
		—	333	—	—
	2	360	—	161	172
		360	—	161	172
	3	393	321	163	172
		393	321	163	172
	4	364	329	163	181
		364	329	163	172
	5	—	329	165	172
		—	321	165	172
Kaidorima	1	393	329	161	172
		393	329	161	172
	2	339	321	163	172
		339	313	159	172
	3	397	329	163	181
		393	329	159	172
	4	395	329	161	172
		393	329	161	172
	5	393	341	161	181
		393	325	161	172
Shiimamakimura-kou	1	395	329	163	181
		339	329	163	172
	2	393	333	163	181
		393	333	159	181
	3	393	329	165	181
		393	329	161	172
	4	393	329	163	181
		393	329	163	172
	5	393	333	163	181
		393	333	159	172
Oshoro 1	1	399	341	157	181
		393	305	157	181
	2	393	329	159	181
		393	305	159	181
	3	393	329	161	181
		393	305	161	181
	4	420	321	161	181
		420	301	161	181
	5	408	305	161	181
		399	301	161	181

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Oshoro 2	1	—	347	159	181
		—	347	159	181
	2	—	325	163	181
		—	325	159	181
	3	420	351	163	181
		420	349	163	181
	4	393	—	—	181
		393	—	—	181
	5	393	345	—	181
		393	345	—	181
Oshoro 3	1	393	345	161	181
		393	345	161	181
	2	420	349	163	181
		408	349	163	181
	3	393	345	161	181
		393	341	161	181
	4	420	345	163	181
		420	345	163	181
	5	420	349	161	181
		420	349	161	181
Oshoro 4	1	393	345	165	181
		393	329	161	181
	2	393	341	161	181
		393	341	157	181
	3	393	341	165	181
		393	313	165	181
	4	393	341	165	181
		393	341	165	181
	5	393	341	165	181
		393	341	161	181
Oshoro 5	1	393	345	165	181
		393	345	161	181
	2	393	325	161	181
		393	325	161	181
	3	393	345	159	181
		393	345	159	181
	4	393	325	161	181
		393	325	161	181
	5	393	345	159	181
		393	345	159	181
Oshoro 6	1	393	345	165	181
		393	345	165	181
	2	393	325	165	181
		381	325	161	181
	3	393	345	169	181
		393	345	159	181
	4	393	325	167	181
		393	325	161	181
	5	393	325	161	181
		393	325	161	181

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Oshoro 7	1	420	347	161	181
		420	347	161	181
	2	420	347	165	181
		420	347	163	181
	3	420	349	165	181
		420	329	165	181
	4	393	349	165	181
		393	235	163	181
	5	393	347	163	181
		393	347	161	181
Gokibiru	1	395	329	175	181
		393	329	171	181
	2	393	321	173	181
		393	321	169	181
	3	420	329	171	181
		393	321	171	181
	4	420	321	171	181
		393	321	171	181
	5	420	325	175	181
		399	321	171	181
Hamamasu	1	393	329	169	172
		395	329	169	172
	2	—	325	175	172
		—	325	171	172
	3	395	333	175	172
		395	321	169	172
	4	420	333	179	172
		420	321	173	172
	5	420	329	175	172
		420	329	169	172
Shokankaigan-cho	1	428	329	169	181
		428	329	169	181
	2	393	321	167	181
		393	321	167	181
	3	395	329	173	181
		395	329	171	181
	4	412	333	169	181
		412	333	167	181
	5	420	321	—	181
		420	305	—	181
Rikibiru	1	420	333	169	181
		420	333	165	181
	2	420	329	171	181
		420	329	163	181
	3	418	325	165	181
		418	325	165	181
	4	420	329	171	181
		420	325	171	178
	5	418	333	169	181
		418	333	169	181

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Oniwaki	1	420	329	171	172
		401	329	165	172
	2	420	329	163	181
		401	329	163	181
	3	420	329	171	181
		393	313	171	181
	4	401	329	171	181
		401	329	171	181
	5	420	329	169	190
		420	325	169	181
Kutsuakta	1	395	329	165	181
		377	329	165	181
	2	375	329	167	181
		375	329	165	181
	3	420	329	171	181
		420	329	171	172
	4	395	329	173	181
		395	329	173	181
	5	420	329	167	172
		397	329	167	172
Shinminato	1	401	329	167	181
		401	329	167	172
	2	420	329	171	181
		399	329	171	172
	3	418	329	171	181
		418	329	171	172
	4	420	329	179	184
		401	329	171	181
	5	420	329	171	172
		420	329	167	172
Oshidomari	1	401	329	169	181
		395	329	169	181
	2	420	329	167	181
		420	329	165	172
	3	401	329	—	—
		395	329	—	—
	4	418	329	165	181
		375	329	165	181
	5	418	329	165	181
		395	329	165	181
Kafuka	1	395	329	169	181
		395	329	169	181
	2	391	329	165	181
		391	329	165	172
	3	420	329	165	181
		395	329	165	172
	4	420	329	171	172
		399	329	171	172
	5	420	329	169	181
		395	329	169	181

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Horai	1	393	321	173	181
		393	321	173	181
	2	395	321	171	181
		395	321	171	181
	3	395	333	169	181
		395	321	169	181
	4	395	321	169	181
		395	321	169	181
	5	395	333	169	181
		395	321	167	181
Omisaki	1	395	333	169	181
		395	321	169	172
	2	395	345	167	181
		395	333	167	181
	3	393	333	169	172
		393	333	169	172
	4	395	333	167	181
		395	333	163	172
	5	395	333	171	181
		395	333	165	181
Hon-cho	1	395	333	167	181
		395	321	167	181
	2	393	333	167	181
		393	321	167	181
	3	395	333	167	181
		395	333	167	181
	4	393	333	167	181
		393	333	167	181
	5	393	333	169	181
		393	333	165	181
Omu	1	393	333	165	181
		393	321	165	181
	2	393	333	163	181
		393	333	163	181
	3	393	333	165	181
		393	333	165	181
	4	393	333	167	181
		393	333	167	172
	5	393	333	165	181
		393	333	165	181
Futatsuiwa	1	393	333	169	—
		393	333	165	—
	2	393	333	169	181
		393	333	167	181
	3	393	333	171	181
		393	321	171	181
	4	393	333	169	181
		393	333	167	181
	5	393	333	169	181
		393	333	169	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment. continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Utoro	1	393	333	169	181
		393	321	167	181
	2	391	333	169	181
		391	333	167	181
	3	420	333	169	181
		420	333	169	181
	4	393	333	169	181
		393	321	167	181
	5	393	345	169	181
		393	333	169	172
Misaki-cho	1	405	333	167	181
		393	333	167	172
	2	405	333	169	181
		393	333	169	181
	3	401	333	163	181
		393	333	163	172
	4	401	333	167	181
		391	333	167	181
	5	391	333	167	181
		391	333	167	181
barajima	1	405	333	167	181
		395	333	167	175
	2	405	333	163	175
		395	333	163	175
	3	405	333	167	181
		395	321	167	175
	4	405	333	167	181
		391	333	167	175
	5	401	333	165	181
		393	333	165	175
Ochiishi	1	401	321	167	181
		401	309	167	181
	2	401	321	167	181
		401	321	167	181
	3	420	321	167	181
		420	321	167	181
	4	420	333	167	181
		401	321	167	181
	5	420	321	167	181
		401	321	167	181
Daikokujima	1	401	321	165	181
		401	321	165	181
	2	401	333	167	181
		401	321	167	181
	3	401	333	167	181
		401	321	167	181
	4	401	333	167	181
		401	333	167	181
	5	401	333	167	—
		401	321	167	—

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment.

continued

Table 11 Comparison of allele size of microsatellite marker between local populations.

Collecting site	Identification number of individuals	Allele size			
		MS1	MS2	MS3	MS7
Aikkapu	1	393	309	—	181
		393	309	—	181
	2	401	333	167	181
		401	321	167	181
	3	401	333	167	181
		401	329	167	181
	4	401	321	167	181
		401	321	167	181
	5	401	333	165	181
		401	321	165	181
Akkesho-ko	1	428	333	165	172
		420	321	165	172
	2	428	333	165	181
		401	333	165	181
	3	401	333	163	181
		401	333	163	181
	4	401	333	167	181
		401	321	165	181
	5	428	333	165	181
		401	333	165	181
Aniva	1	428	333	167	181
		401	333	167	181
	2	424	321	163	181
		397	321	163	172
	3	413	321	163	181
		401	321	163	172
	4	397	321	167	172
		397	321	163	172
	5	401	333	163	181
		401	333	163	181
Bogdanovci	1	428	325	165	181
		401	325	165	181
	2	428	329	165	181
		397	329	163	172
	3	—	325	165	181
		—	325	165	172
	4	428	329	167	181
		428	329	163	181
	5	428	325	165	181
		401	325	165	172

The symbol "—" indicate lack of amplified fragment.

Table 12 Non-specific priming of SSR primer to template DNA.

SSR Primer used for Dual-suppression PCR	Actual sequence obtained by sequence analyses
$(AC)_6(GA)_5$	ACACAGTACGCACAGAGAGAGAG
	ACAACACACAGAGAGAGGGAG
	CACACACACACGGAGAGAGA
	ACACTTGAAACACAGAGAGAGAG
	ATACACACTACAGAGAGAGAG
	ACACACACAGAGAGAGAG
	GCACACACACACGGAGAGAGAG
	ACACACACACAACACAGAGAGAG
$(GA)_{10}$	GAGGAGACGAGAGGAAAGAGGAGAGGAGAGAGAGAGA
	GGAGAGAGAGAGAGAGAGA
$(AC)_{10}$	GAAGAACACACACACACACC
	AAAAAAAAACAAACACACACACACACA
	TCACACACACACACACACAC
	ACGCACACGCGCACAGACAC
	CACACCCTCACACACACACA

Table 13 Identified proteins up-regulated in the sporephyte of *Saccharina japonica* cultured under low nutrient concentration. Spots underlined were identified by MS analysis. The number assigned each protein spot was special spot number (SSPs) used in PDQest Basic version 8.0.

Spot number	Protein name	Taxnomy	pH	Molecular weight (kDa)	Accession ID	Score	Covarage	Function
1402	14-3-3 like protein	*Fucus vesiculosus*	4.65	28.2	Q39757	109.24	26.29	Signal transduction
3407	Putative malate dehydrogenase	*Bos taurus*	8.43	53.1	A3KMX7	2.8	3.59	Oxidoreductase
	Catalase-peroxidase	*Thioalkalivibrio sp*	5.55	79.9	B8GPM6	2.28	2.49	Oxidoreductase, Peroxidase
5416	RNA (His) guanyltransferase	*Bradyrhizobium sp*	7.37	31.0	Q9Y7T3	2.42	4.38	Nucleotidyltransferase, Transferase
	Nicotinate phosphoribosyltransferase	*Schizosaccharomyces pombe*	8.21	49.5	A5E8V7	2.17	7.28	Ligase, Transferase
6403	DNA-directed RNA polymerase III subunit rpc3	*Botryotinia fuckeliana*	6.28	71.7	A6RPU8	2.06	1.57	DNA binding, DNA-directed RNA polymerase activity
7511	Ferredoxin-NADP reductase, cyanelle	*Chlamydomonas reinhardtii*	8.66	40.5	P53991	3.87	4.24	ferredoxin-NADP+ reductase activity

Table 14 Composition of volatile compounds in sodium alginate gel (40 ml) in this study.

	Control*	5× of control	10×of control
n-Hexanal (2)	13.08 μM	65.4 μM	130.79 μM1
(E) -2-Hexenal	7.11 μM	35.56 μM	71.12 μM
1-Octen-3-one	17.12 μM	85.58 μM	171.15 μM
(E) -2-Octenal	10.35 μM	51.74 μM	103.49 μM
1-Octen-3-ol	9.36 μM	46.8 μM	93.6 μM
(E, E) -2, 4-Heptadienal	3.52 μM	17.61 μM	35.22 μM
(E) -2-Nonenal (1)	77.95 μM	389.74 μM	779.49 μM
(E, Z) -2, 6-Nonadienal	17.51 μM	87.55 μM	175.1 μM
(E) -2-Nonen-1-ol	8.37 μM	41.83 μM	83.66 μM
(E, E) -2, 4-Dodecadienal	5.71 μM	28.57 μM	57.13 μM
tridecanal	1.58 μM	7.89 μM	15.77 μM

*same as the composition in the wild sporophyte of *Saccharina angustata* (40 g)