

# 鳥取県のコアマモ(*Zostera japonica* Aschers. et Graebn.)個体群の遺伝的多様性

誌名	陸水学雑誌
ISSN	00215104
著者名	程木,義邦 大林,夏湖 宮本,康 田中,法生 國井,秀伸
発行元	日本陸水學會
巻/号	73巻2号
掲載ページ	p. 81-87
発行年月	2012年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



原著 [Original article]

鳥取県のコアマモ (*Zostera japonica* Aschers. et Graebn.) 個体群の  
遺伝的多様性

程木義邦<sup>1),4)</sup>・大林夏湖<sup>1),5)</sup>・宮本康<sup>2)</sup>・田中法生<sup>3)</sup>・國井秀伸<sup>1)</sup>

Evaluation of genetic diversity of *Zostera japonica* Aschers. & Graebn. populations  
located in Tottori prefecture

Yoshikuni HODOKI<sup>1),4)</sup>, Kako OHBAYASHI<sup>1),5)</sup>, Yasushi MIYAMOTO<sup>2)</sup>, Norio TANAKA<sup>3)</sup> and Hidenobu KUNII<sup>1)</sup>

Abstract

To evaluate current genetic diversities and further conservation efforts affecting the brackish water angiosperm, *Zostera japonica* Aschers. & Graebn., we carried out microsatellite analysis of three populations located in Tottori prefecture. The three populations consisted of one, four or 13 genotypes (genets), and the genotypic and genetic diversities were low compared with previously studied related species such as *Z. noltii* and *Z. marina*. Moreover, outcrossing reproduction but not self-reproduction was speculated by multi locus genotypes observed in one population in Lake Nakaumi. Observed heterozygosities were not significantly lower than expected in all populations. These results suggested that seed propagation was limited in the populations studied, and vegetative propagation was primarily involved in maintaining the populations. Moreover, limitations in seed propagation were not only caused by environmental factors, but might also be related to the breeding system or genetic factors such as inbreeding depression.

**Keywords:** genetic diversity, microsatellite, *Zostera japonica*

摘要

汽水域の典型的な海草であるコマモ (*Zostera japonica* Aschers. et Graebn.) の遺伝的多様性の評価と保全策の検討を目的とし、マイクロサテライトマーカーを用い鳥取県に点在する3つの個体群について

<sup>1)</sup> 島根大学汽水域研究センター 〒690-8504 島根県松江市西川津町1060. Research Center for Coastal Lagoon Environments, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

<sup>2)</sup> 鳥取県衛生環境研究所 〒682-0704 鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷526-1. Tottori Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 526-1 Minamidani, Yurihamacho, Tottori 682-0704, Japan

<sup>3)</sup> 国立科学博物館筑波実験植物園 〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1. Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science, 4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

<sup>4)</sup> 現所属：慶應義塾大学生物学教室 〒223-8521 神奈川県横浜市港北区日吉4-1-1. Department of Biology, Keio University, 4-1-1 Hiyoshi, Kouhoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8521, Japan

<sup>5)</sup> 現所属：国立環境研究所生物生態系環境研究センター生物多様性保全計画室 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2. Biodiversity Conservation Planning Section, Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba 305-8506, Japan

(連絡先 程木義邦 hodoki@z7.keio.jp)

解析を行った。3 個体群はそれぞれ、1, 4 または 13 個の遺伝子型で構成されており、近縁種と比べ遺伝子型の多様性と平均アレル数が低い傾向が見られた。また、中海の 1 個体群では、個体群内の種子繁殖に由来する遺伝子型が確認されたが、他の個体群では自殖由来の個体は確認されなかった。さらに、全ての個体群においてハーディ・ワインベルグ平衡からのヘテロ接合度の有意な低下は認められなかった。以上の結果より、対象とした 3 個体群は種子繁殖が制限されており、主に栄養繁殖によって維持されていることが考えられた。近縁種のアマモや *Z. noltii* を対象とした研究では、種子繁殖の制限は、環境条件の影響とともに集団遺伝学的問題の関与も指摘されているので、今後これらの詳細な解明が必要と考えられた。

キーワード：遺伝的多様性、コアマモ、マイクロサテライト

(2010 年 1 月 4 日受付；2012 年 1 月 19 日受理)

## はじめに

コアマモ (*Zostera japonica* Aschers. et Graebn.) は汽水域に生育する多年生の海草の一種で、アジアではサハリンからベトナムまで、日本では北海道から沖縄までの河口域や汽水湖に広く分布している (大滝・石戸, 1980)。汽水域における藻場の主要構成種であり、鳥取県では、斐伊川水系の中海に複数の局所個体群があることが確認されているもの (國井, 2001)、それ以外の水系における本種の記載は無い。中海では 1950 年代まで、湖内に連続的かつ広大なコアマモとアマモ (*Zostera marina* L.) の分布が確認されていた (島根県水産試験場, 1920, 1934; 鳥取県, 1957)。しかし、1960 年代から行われた淡水化事業に伴う干拓や築堤、護岸工事による沿岸域の人為的環境改変により、現在では小規模な個体群がパッチ状に見られるにすぎない (宮本・國井, 2006; 国土交通省中国地方整備局, 2008)。そのため、中海ではこれまでに行われてきたアマモの植栽とともに、コアマモ場の再生や修復も新たに検討されている (宮本ら, 2008)。

一方、海草藻場の再生に際しては、対象とする地域個体群の遺伝的多様性と地域固有性の保全への配慮が強く求められている (松田ら, 2005; 水産庁・マリノフォーラム 21, 2007)。そのため、海草藻場の再生事業では適切な遺伝マーカーを用いた遺伝的多様性の評価や個体群間の遺伝子流動の頻度の評価に基づき自然再生や保全計画の検討、移植に用いる種苗の選定が行われる必要があるが、この様な事例は国際的にも少ないといわれている (Williams, 2001; Procaccini et al., 2007; van Katwijk et al., 2009)。また、コアマモを含め多くの海草は、種子繁殖とともに地下茎の伸長と分枝による栄養繁殖を行うため、個体群の規模と遺伝的多様性に一定した傾向は見ら

れない (Coyer et al., 2004a; Diekmann, 2005)。そのため、遺伝的多様性の保全という観点では、大規模な個体群を優先的に保全するという方法が必ずしも効果的でない。また、これまでに行われた海草の移植の成功度は低いと言われているが (Fonseca et al., 1998)、移植や植栽に際し、遺伝マーカーを用いた適切な種苗選定が行われなかったことが原因の一つとして挙げられている (Williams, 2001)。

そこで本研究では、今後取り組まれるコアマモ場の再生に向け、本種の遺伝的多様性と集団遺伝学的特性についての基礎情報を得ることを目的とし、鳥取県西部斐伊川水系中海の弓ヶ浜半島沿いに点在する個体群とともに、鳥取県中部の橋津川の個体群を対象とし、マイクロサテライトマーカーを用い遺伝的多様性の評価を行った。得られた遺伝的多様性と遺伝子型の情報を基に、対象としたコアマモ個体群の現状の評価とともに、今後の保全および再生のために必要な研究と方策について考察を行った。

## 材料と方法

### 調査地点およびサンプルの採取

調査対象は、斐伊川水系の中海および橋津川水系橋津川 (鳥取県東伯郡湯梨浜町) に分布する 3 個体群とした (Fig. 1)。斐伊川水系には大橋川 (島根県松江市) と中海にコアマモが広く分布しており、弓ヶ浜半島沿にも複数の個体群が点在している (國井, 2001; 宮本ら, 2008; 国土交通省中国地方整備局, 2008)。中海では 2008 年 10 月, 11 月, 2009 年 5 月, 6 月に、2 地点で生育を確認した。地点 NA (Fig. 1A) では岸沿いに幅 1 m, 長さ 10 m の帯状にほぼ連続して分布しており、地点 NB で

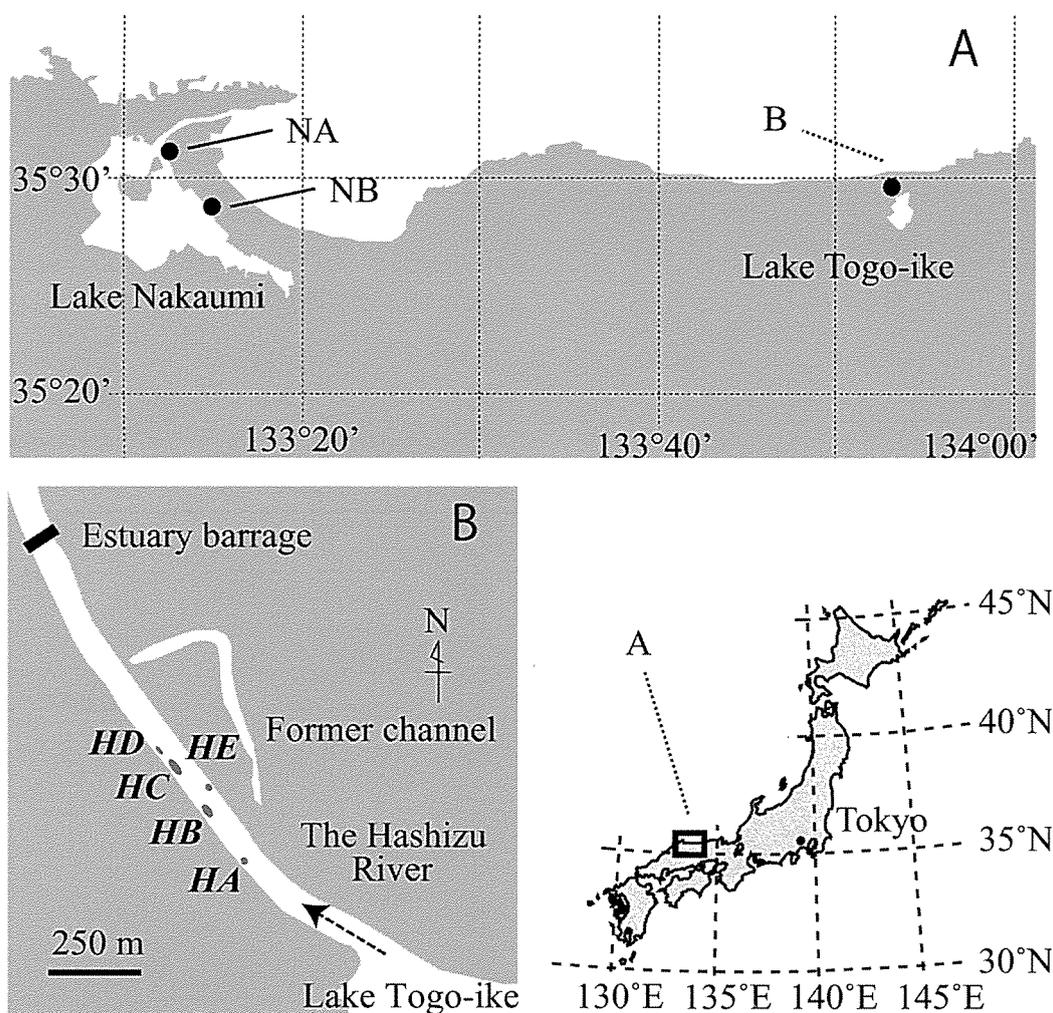


図 1. 調査対象とした中海 (A) と橋津川 (B) の個体群. 図中の HA から HE は、橋津川における局所個体群を示す.

Fig. 1. Locations of populations studied in Lake Nakaumi (A) and the Hashizu River (B). HA, HB, HC, HD and HE indicate local populations in the Hashizu River.

は弓ヶ浜半島と埋立地の間に造られた水路約 100 m の区間に約 0.05 m<sup>2</sup> から 1 m<sup>2</sup> 程度のパッチがまばらにみられた。

橋津川水系については、これまで、橋津川および東郷池ともにコアモモの生育についての正式な記載が無く、本調査により、東郷池からの流出口と橋津川河口の中間付近の約 500 m の区間に数 m<sup>2</sup> から 25 m<sup>2</sup> 以上の局所個体群を少なくとも 5 つ確認した (HA, HB, HC, HD および HE, Fig. 1B)。橋津川では 1987 年から 1991 年に蛇行区間を直線化および川幅を拡幅する大規模な改修工事が行なわれており、現在のコアモモ個体群はこの工事で新たに作られた新河道内で見られる (Fig. 1)。漁業者からの聞き取りにより、この工事以前には東郷池から橋津川

への流出口付近に大規模なコアモモ群落が確認されていたこと、旧河道で本種の生育が確認されていなかったことから、新河道における現在の個体群は造成後に移入した個体によって成立したと考えられる。

解析のための個体は、踏査により個体群の規模をおおむね把握した後、端から等間隔に地点 NA では 19 個体、地点 NB では 20 個体から葉部を採取した。また、橋津川個体群については、2009 年 5 月に視覚的に独立した 5 つの局所個体群 (HA, HB, HC, HD および HE) よりそれぞれから 8 個体 (合計 40 個体) を採取した。採取した個体は、葉茎部表面を 100% エタノールおよび蒸留水で洗浄後、- 20°C で凍結保存した。

Table 1. Characteristics of polymorphic microsatellite markers and genetic diversities of three populations.

表 1. 多型が確認されたマイクロサテライトマーカーの特性と 3 個体群の遺伝的多様性。

Locus <sup>a</sup>	Core sequences <sup>a</sup>	No. of alleles	Size range (bp)	Sample locations (No. of alleles ( $H_o/H_e$ ) <sup>b</sup> )		
				NA	NB	Hashizu R.
Zn B1	(GA) <sub>4</sub> G(GA) <sub>20</sub>	4	108 - 118	3 ( 0.385 / 0.563)	3 (0.750 / 0.607)	1 (0.000 / 0.000)
Zn B8	(GA) <sub>14</sub>	9	139 - 171	6 (*1.000 / 0.797)	6 (0.750 / 0.929)	2 (1.000 / 0.500)
Zn D6	(CT) <sub>3</sub> TT(CT) <sub>2</sub> TT(CT) <sub>13</sub> (GTCT) <sub>2</sub> GT(CT) <sub>10</sub>	7	232 - 250	4 ( 0.692 / 0.652)	5 (0.750 / 0.893)	1 (0.000 / 0.000)
Zn E7	(GA) <sub>18</sub>	7	155 - 165	5 (*1.000 / 0.772)	4 (0.750 / 0.750)	2 (1.000 / 0.500)
Zn F8	(CT) <sub>17</sub>	8	211 - 231	4 ( 0.769 / 0.735)	5 (1.000 / 0.893)	1 (0.000 / 0.000)
Mean				4.4 (*0.769 / 0.704)	4.6 (0.800 / 0.814)	1.4 (0.400 / 0.200)
Genotypes / Samples				13 / 19	4 / 20	1 / 40

a : Data from Coyer et al. (2004b).

b : Observed heterozygosity ( $H_o$ ) / expected heterozygosity ( $H_e$ )\*Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (excess or deficit of observed heterozygosity,  $P < 0.05$ )

## マイクロサテライトマーカーを用いた多型解析

DNA の抽出は CTAB 法によって行った (Doyle and Doyle, 1987)。1 本のシュートから採取したコアマモの葉茎部約 50 mg を液体窒素により凍結破砕したのち DNA を抽出し、TE バッファーで  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  に調整し PCR の鋳型サンプルとした。

遺伝的多様性の評価に用いたマイクロサテライトマーカーは、Coyer et al. (2004b) によりコアマモと同属の *Zostera noltii* Hornem. で開発されている 9 遺伝子座のマイクロサテライト領域のうち、コアマモでも利用可能なことが確認されている Zn B1, B8, D6, E7, F8 および H8 の 6 遺伝子座を用いた (Table 1)。なお、Zn H8 については全てのサンプルで PCR による DNA の増幅は確認できたもののフラグメント解析では多型が見られなかった。そのため、Zn H8 のデータは遺伝的多様性の比較などの解析に用いなかった。

PCR による DNA の増幅は、GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems 製) により行った。10  $\mu\text{L}$  に調整した PCR 溶液 (10 ng 鋳型 DNA, 0.2 mM dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol, 0.25 U EX Taq DNA polymerase (TaKaRa 製)) に 5' 末端を蛍光標識でラベルした Forward プライマー (6-FAM, TET または HEX, 0.04  $\mu\text{M}$ ; Applied Biosystems 製) および Reverse プライマー (0.04  $\mu\text{M}$ ) を加え、94  $^{\circ}\text{C}$  3 分ののち、94  $^{\circ}\text{C}$  40 秒, 57.5  $^{\circ}\text{C}$  40 秒, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 分を 35 サイクル行い、最終伸長を 72  $^{\circ}\text{C}$  10 分

行い増幅した。5 遺伝子座の PCR 産物は、サイズスタンダード (GeneScan 350 TAMRA Size Standard, Applied Biosystems 製) とともに 12  $\mu\text{L}$  の脱塩ホルムアミド (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems 製) に加え、95  $^{\circ}\text{C}$  2 分で DNA の変性処理を行った後、多型解析用のサンプルとして用いた。PCR 産物のフラグメントサイズの特長は、ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems 製) を用いて行い、Peak Scanner (Applied Biosystems 製) により遺伝子型の判読を行った。

データ整理および遺伝子型評価、ヘテロ接合度、平均アリル数の計算、の推定を CERVUS version 3.0 を用いて行った (Kalinowski et al., 2007)。ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱の有無については GENEPOP version 4.0 を用い検定を行った (Rousset, 2008)。また、個体群内での種子繁殖の有無についての知見を得るため、各遺伝子型の 5 遺伝子座の多型から、推定される両親遺伝子型のペアの推定を行った。

## 結 果

地中海の 2 個体群では、解析個体の中で繰り返し出現する遺伝子型が複数みられ、識別できた遺伝子型は地点 NA では 19 個体中 13, 地点 NB では 20 個体中 4 であった (Tables 1-2)。一方、橋津川の 5 局所個体群は、解析を行った 40 個体すべてが同じ遺伝子型を示した (Tables 1-2)。また、出現した遺伝子型をもとに求めたアリル多様度およびヘテロ接合度の観察値は、地中海の 2 個体群で

鳥取県のコアマモ (*Zostera japonica* Aschers. et Graebn.) 個体群の遺伝的多様性

Table 2. The genotypes, number of individuals, and possible parents of the samples from multi locus genotypes.

表 2. 各個体群で確認された遺伝子型とその個体数, 5 遺伝子座の多型から推定される当個体の両親となりうる組み合わせ.

Collection site	Genotype	No. of individuals	Possible pairs of parents	Size of alleles for five microsatellite markers (bp)									
				Zn B1	Zn B8	Zn D6	Zn E7	Zn F8					
NA	A1	4	-	112	118	165	171	232	248	176	180	215	221
	A2	1	-	108	108	139	169	242	242	183	185	229	229
	A3	1	A8 × A13, A12 × A13	108	108	165	167	248	248	176	180	215	221
	A4	1	-	112	112	153	165	242	248	180	185	215	221
	A5	1	A3 × A7, A3 × A10, A7 × A13, A10 × A13	108	108	139	167	242	248	176	180	221	229
	A6	1	-	108	108	139	165	242	242	183	185	221	231
	A7	1	A2 × A10	108	108	139	165	242	248	176	185	229	229
	A8	3	-	108	108	153	165	248	248	180	185	221	231
	A9	1	-	112	112	165	167	238	248	176	185	221	229
	A10	2	A2 × A9, A5 × A9, A7 × A9	108	112	139	165	242	248	176	185	229	229
	A11	1	-	112	118	165	171	238	242	178	185	215	221
	A12	1	-	108	112	165	169	242	248	176	183	221	231
	A13	1	A1 × A5	108	112	167	171	232	248	176	180	215	221
NB	B1	8	-	108	108	163	165	242	244	180	185	217	231
	B2	8	-	108	112	161	167	238	246	180	180	213	231
	B3	1	-	108	116	153	153	238	242	173	178	213	227
	B4	3	-	108	112	159	161	232	232	173	180	211	227
Hashizu R.	H1	40	-	112	112	139	165	250	250	176	178	217	217

は同程度であったが, 地点 NA のヘテロ接合度の観察値はハーディ・ワインベルグ平衡からの有意な差が検出され, ヘテロ接合過剰であった (Table 1)。なお, 解析を行った 3 個体群全体の平均アレル数およびヘテロ接合度は, それぞれ 3.5 および 0.656 であった。

各遺伝子座の解析結果から, 親個体として可能性のある遺伝子型の組み合わせを求めた (Table 2)。個体群内に親個体の可能性がある遺伝子型のペアが 1 組以上存在する遺伝子型は地点 NA では 5 つ確認できたが, 地点 NB では全ての遺伝子型で確認できなかった。また, 個体群に存在する遺伝子型の自殖に由来した遺伝子型は確認できなかった。

## 考 察

### 遺伝的多様性の現状

コアマモについては, これまで, マイクロサテライト

マーカーを用いた遺伝的多様性や遺伝子型の多様性の評価が行われた研究事例が無く, 本研究の結果と直接比較が可能な他の個体群の情報は今のところ無い。近縁種の *Z. noltii* では, ヨーロッパ沿岸に点在する 33 個体群の平均アレル数の平均値は 5.5 (最小 1.6, 最大 8.7), 検出されたジェネット数の平均値は 33.9 (最小 1, 最大 49) であり, 本研究の値と比べ高い (Coyer et al., 2004a)。また, *Z. noltii* の場合, ジェネット数が 15 以下の個体群は, これまでに研究報告がある 41 個体群のうち 3 個体群のみであり, 本研究で確認されたコアマモ個体群のように少数のジェネットで構成されている個体群はまれにしか存在しない (Coyer et al., 2004a; Diekmann et al., 2005)。同様に, 同属のアマモを対象としている研究でも, 本研究のコアマモよりも高い平均アレル数 (6 - 15) やジェネット数 (16 - 54) が報告されている (Reusch, 2002; 吉田ら, 2006)。なお, アマモや *Z. noltii* を対象とした先行研究では, 各個体群より 30 サンプル以上を採取し解析を行っ

ていたが (e.g., Coyer et al., 2004a; Reusch, 2002), 本研究で対象とした個体群は, 既にコアマモの現存量が少なくパッチ状に分布しているのみであったので, 先行研究と同等のサンプル数を確保することが出来なかった。

コアマモの生育地である河川感潮域や汽水湖は, 干拓や防災のための築堤などによる人為的改変が著しい環境であり, 本研究で対象とした橋津川のコアマモ個体群も 20 年前に造成された捷水路に見られる。また, 地中海の 2 個体群も人工護岸の前面や干拓地の人工水路内に形成されていることから, この数十年の間に人為的な個体群の分断化や縮小の影響があったか, または, 少数の遺伝子型の移入によって近年に成立した個体群の可能性がある。コアマモのように栄養繁殖を行う海草はジェネットの寿命が長く, 攪乱の小さい環境下では 20 年以上は生存するため (Coyer et al., 2004a), 少数の遺伝子型で長期間存続していると考えられている個体群も報告されている (Hammerli and Reusch, 2003; Coyer et al., 2004a; Ruggiero et al., 2005)。そのため, 橋津川のように遺伝子型の多様性が極めて低下した状態でも, 個体群が栄養繁殖で存続していると考えられる。

#### コアマモの繁殖様式と種子繁殖

コアマモの繁殖様式や遺伝子流動についての研究事例が少なく, 自家和合性の有無や実測値に基づいた種子繁殖の頻度などについての情報は無い。斐伊川水系の大橋川と中海西岸のコアマモ個体群を対象としてアロザイム解析を行った研究によると, これらの個体群は花粉流動または種子繁殖が制限されており主に栄養繁殖で維持されている可能性を示唆している (Araki and Kunii, 2006)。また, 種子繁殖が制限されている理由として, 種子の発芽や実生の定着に必要な環境条件がまれにしかそろわない可能性を指摘している (Araki and Kunii, 2006)。小規模で分断化された植物個体群では, 花粉供給量の低下やエッジ効果により種子繁殖の頻度が低下することも指摘されており (富松, 2005), 個体群の分断化や縮小の影響が著しい斐伊川水系のコアマモ個体群でもこの様な影響を受けている可能性がある。

本研究では, 地点 NA の個体群内で他殖に由来する遺伝子型とその両親のペアが確認されたため, 少なくとも本地点では種子繁殖が行われている可能性が示唆された。一方, 3 個体群全てで自殖に由来する遺伝子型は確認できず, ヘテロ接合度の観測値も期待値からの有意な低下は検出されなかった。自殖が可能であるアマモや *Z. noltii* では, 少数の遺伝子型で成り立つ個体群でもヘテ

ロ接合度がハーディ・ワインベルグ平衡から逸脱していないものが多く, 自殖や近親交配に由来する個体に強い選択圧がかかっていることが示唆されている (Reusch, 2001; Hammerli and Reusch, 2003; Procaccini et al. 2007)。そのため, コアマモ個体群についても, 自家不和合性や近交弱勢など, 環境条件とともに種子繁殖の低下をもたらしている要因について更なる解明が必要と考えられる。

#### まとめと保全の課題

本研究で対象とした鳥取県の 3 個体群は, 先行研究のある同属の *Z. noltii* やアマモと比べ, 遺伝子型および遺伝的多様性が低く, 主に栄養繁殖により個体群が維持されていることが示唆された。そのため, 現存する個体群と遺伝子型の保全とともに, 今回対象としなかった個体群の遺伝的多様性や個体群間の遺伝子流動と集団構造の評価を行い, 水系全体での保全策を検討し実施する必要がある。また, アマモを対象とした研究では, 種子繁殖の制限は, 環境条件の影響とともに, 繁殖様式や近交弱勢などの集団遺伝学的問題の関与も指摘されているので, 今後これらの詳細な解明が必要と考えられる。

#### 謝 辞

本研究の一部は「文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (A)「ラムサール条約登録後の中海における汽水域生態系の再生と長期生態学研究」(代表者, 國井秀伸; 課題番号 19201017)」を使用し行った。

#### 文 献

- Araki, S. and H. Kunii (2006): Allozymic implications of the propagation of eelgrass *Zostera japonica* within a river system. *Limnology*, 7: 15-21.
- Coyer, J. A., O. E. Diekmann, E. A. Serrão, G. Procaccini, M. Milchakova, G. Pearson, W. T. Stam and J. L. Olsen (2004a): Population genetics of dwarf eelgrass *Zostera noltii* throughout its biogeographic range. *Marine Ecology Progress Series*, 281: 51-62.
- Coyer, J. A., T. B. H. Reusch, W. T. Stam, E. A. Serrão, G. Pearson, G. Procaccini and J. L. Olsen (2004b): Characterization of microsatellite loci in the dwarf eelgrass *Zostera noltii* (Zosteraceae) and cross-reactivity with *Z. japonica*. *Molecular Ecology Notes*, 4: 497-499.

- Diekmann, O., J. A. Coyer, J. Ferreira, J. L. Olsen, W. T. Stam, G. A. Pearson and E. A. Serrao (2005): Population genetics of *Zostera noltii* along the west Iberian coast: consequence of small population size, habitat discontinuity and near-shore current. *Marine Ecology Progress Series*, 290: 89-96.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Fonseca, M. S., W. J. Kenworthy and G. W. Thayer (1998): Guidelines for the conservation and restoration of seagrasses in the United States and adjacent waters NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis, 12. National Oceanic and Atmospheric Administration Coastal Ocean Office, Silver Spring (MD).
- Hämmerli, A. and T. B. H. Reusch (2003): Inbreeding depression influences genet size distribution in a marine angiosperm. *Molecular Ecology*, 12: 619-629.
- Kalinowski, S.T., M. L. Taper and T. C. Marshall (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.
- 国土交通省中国地方整備局 (2008): 大橋川改修事業環境調査一次とりまとめ. 国土交通省中国地方整備局出雲河川事務所.
- 國井秀伸 (2001): 宍道湖・中海における水生絶滅危惧植物の分布. *汽水域研究*, 8: 95-100.
- 松田裕之・矢原徹一・竹門康弘・波田善夫・長谷川真理子・日高一雅・ホーテス シュテファン・角野康郎・鎌田磨人・神田房行・加藤真・國井秀伸・向井宏・村上興正・中越信和・中村太士・中根周歩・西廣 (安島) 美穂・西廣淳・佐藤利幸・嶋田正和・塩坂比奈子・高村典子・田村典子・立川賢一・椿宜高・津田智・鷺谷いづみ (2005): 自然再生事業指針, 日本生態学会生態系管理専門委員会. *保全生態学研究*, 10: 63-75.
- 宮本康・國井秀伸 (2006): 汽水湖中海における塩分変動に応じた水質と沿岸藻場の変化. *応用生態工学*, 9: 179-189.
- 宮本康・九鬼貴弘・初田亜希子・國井秀伸 (2008): 中海におけるコマモ (*Zostera japonica*) の移植技術の検討 (予報). *汽水域研究*, 15: 83-89.
- 大滝末男・石戸忠 (1980): 日本水生植物図鑑. 北隆館, 東京.
- Procaccini, G., J. L. Olsen and T. B. H. Reusch (2007): Contribution of genetics and genomics to seagrass biology and conservation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350: 234-259.
- Reusch, T. B. H. (2001): Fitness-consequences of geitonogamous selfing in a clonal marine angiosperm (*Zostera marina*). *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 129-138.
- Reusch, T. B. H. (2002): Microsatellites reveal high population connectivity in eelgrass (*Zostera marina*) in two contrasting coastal areas. *Limnology and Oceanography*, 47: 78-85.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-110.
- Ruggiero, M. V., S. Capone, P. Pirozzi, T. B. H. Reusch and G. Procaccini (2005): Mating system and clonal architecture: a comparative study in two marine angiosperms. *Evolutionary Ecology*, 19: 487-499.
- 島根県水産試験場 (1920): 中海調査. 大正9年度島根水試事業報告, 71-108.
- 島根県水産試験場 (1934): 中海赤潮調査. 昭和7年度島根県水産試験場事業報告, 68-83.
- 水産庁・マリノフォーラム 21 (2007): アマモ類の自然再生ガイドライン: 豊かな海辺と暮らしの再生のために. 水産庁・マリノフォーラム 21.
- 鳥取県 (1957): 中海干拓調査報告書.
- 富松裕 (2005): 生育場所の分断化は植物個体群にどのような影響を与えるか?. *保全生態学研究*, 10: 163-171.
- van Katwijk, M. M., A. R. Bos, V. N. de Jonge, L. S. A. M. Hassen, D. C. R. Hermus and D. J. de Jong (2009): Guidelines for seagrass restoration: Importance of habitat selection and donor population, spreading of risks, and ecosystem engineering effects. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 179-188.
- Williams, S. L. (2001): Reduced genetic diversity in eelgrass transplantations affects both population growth and individual fitness. *Ecological Applications*, 11: 1472-1488.
- 吉田司・C. Tian・岡本英明・田中義人・芝修一・鈴木輝明・高倍昭洋 (2006): アマモ群落の再生産維持機構の解析のためのマイクロサテライトマーカーを用いた個体識別法. *水産工学*, 42: 253-258.