

広島県宮島近海で見つかったヤマトウミヒルモ *Halophila nipponica* J.Kuoについて

坪田博美¹・久保晴盛²・向井誠二¹

TSUBOTA, H., KUBO, H. & MUKAI, S. 2009. A new finding of seagrass *Halophila nipponica* J.Kuo (Hydrocharitaceae) from Miyajima Island in Hiroshima Prefecture, SW Japan. *Hikobia* 15: 339–347.

The marine aquatic herb *Halophila nipponica* J.Kuo (Hydrocharitaceae, Monocotyledonae) is reported from an area near the SW part of Miyajima Island, Hiroshima Prefecture, Honshu, SW Japan (Aki-nada, W part of Seto Inland Sea). The genus *Halophila* has a wide distribution range in the tropical and subtropical regions and extends to the temperate region around the Pacific, Atlantic and Indian Oceans, with its northern limit in the N part of Honshu, Japan, in the Pacific Ocean. *H. nipponica* was described recently, and its known distribution includes Japan (Honshu, Shikoku and Kyushu) and Korea. Morphological examination of field collections and molecular analysis of the internal transcribed spacer (ITS) sequence data of nuclear ribosomal DNA demonstrated that the specimens represent *H. nipponica*, not *H. ovalis* which has long been recognised in Hiroshima Pref. The vegetation of the habitat near Miyajima Island is a pure community of *H. nipponica* or mixed communities together with *Zostera japonica* Asch. & Graebn. and/or *Z. marina* L. The habitat of this species is the lower part of the intertidal zone and upper part of the infralittoral zone, corresponding to the *Z. japonica* zone and *Z. marina* zone in the vertical distribution of seagrass communities. Because of the distance from other known localities, its environment being subject to minimal human disturbance, the differences in ITS sequence data when compared to that from other localities in Japan, and an old record of *H. ovalis* near Miyajima Is., the inclusion of *H. ovalis* from Hiroshima Pref. is a result of misidentification, and does not represent a recent introduction to the area.

Hiromi Tsubota & Seiji Mukai, Miyajima Natural Botanical Garden, Graduate School of Science, Hiroshima University, Mitsumaruko-yama 1156-2, Miyajima-cho, Hatsukaichi-shi, Hiroshima 739-0543, Japan.

Harumori Kubo, Department of Biological Science, Faculty of Science, Hiroshima University, Kagamiyama 1-3-1, Higashi-hiroshima-shi, Hiroshima 739-8526, Japan.

はじめに

ウミヒルモ属 *Halophila* Thouars は、単子葉植物のトチカガミ科 Hydrocharitaceae の多年草で、海産顯

花植物(海草)である。ジュゴンの食草として知られ、温かい地域の比較的浅い海底に繁茂する。本属は熱帯域の海を中心に温帯域まで広く分布し、日本はその北限に近い。日本近海は暖流と寒流が交わることから、世界でもっとも海草相の豊かな海域として知られているが、最近の研究によりウミヒルモ属植物も多く確認されている。本属はこれまでに世界から約 10 種 (den Hartog 1970; Kuo & McComb 1989; Short et al. 2007)，日本からはウミヒルモ *Halophila ovalis* (R.Br.) Hook.f. とヒメウミヒルモ *Halophila decipiens* Ostenfeld (den Hartog (1970) は *Halophili-*

¹ 739-0543 広島県廿日市市宮島町三ツ丸小山1156-2外、
広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所。

² 739-8526 広島県東広島市鏡山 1-3-1, 広島大学理学部
生物科学科。

la ovata Gaudich. として報告) の 2 種が報告されていた (Kuo 1995; 内村ほか 2005)。日本産のウミヒルモ属については松村 (1895) が *H. ovalis* を、Makino (1912) が *H. euphlebia* Makino を報告している。その後、Miki (1934) が分類学的な再検討を行い、ウミヒルモ *H. ovalis* 一種のみを認めている。また、田中ほか (1962) でもウミヒルモ *H. ovalis* だけが報告されている。一方、Uchimura et al. (2006a) は *H. ovalis*, *H. decipiens*, *H. euphlebia* の 3 種を認めている。ウミヒルモ類については、多くの研究者が指摘しているように分類学的に問題のある種群として認識されてきた (Miki 1934; den Hartog 1970; Waycott et al. 2002; Green & Short 2003)。最近、分類学的な再検討により、新種も含め日本産として 8 種が報告されている (Kuo et al. 2006)。また、本属について分子系統学的な研究も行われ、新種も含め日本産として 6 種が報告されている (Uchimura et al. 2006b)。一方、「日本海草図譜」(大場・宮田 2007) では、日本産として 6 種 1 変種と 1 雜種を認めている。

ウミヒルモについては最近分類学的な再検討が行われ、Kuo et al. (2006) および Kim et al. (2009) によればこれまでウミヒルモ *H. ovalis* と同定されてきたもののうち本州や朝鮮半島に産するものは *H. nipponica* J.Kuo に相当するとしている。一方、Uchimura et al. (2006b) も Kuo et al. (2006) の報告にわずかに遅れてヤマトウミヒルモ *H. japonica* Uchimura & Faye を新種として記載し、系統解析の結果からも本州産のものはウミヒルモとは異なるという結果を示している。Uchimura et al. (2006b) で報告されたヤマトウミヒルモ *H. japonica* は *H. nipponica* のシノニムに相当すること、また大場・宮田 (2007) がすでに *H. nipponica* に対してヤマトウミヒルモの和名を用いていることから、本報告でも *Halophila nipponica* J.Kuo に対してヤマトウミヒルモの和名を用いる。

ウミヒルモは、2000 年版レッドデータブック (環境省自然保護局野生生物課 2000) および平成 19 年公表の環境省のレッドリスト (環境省 2007) に準絶滅危惧 (NT) として掲載されている。広島県からは過去にウミヒルモとされるものが報告されている (土井 1983; 中國新聞 2001) が、「広島県植物誌」(広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997) ではウミヒルモは未確認種として掲載されている。また、1995 年版広島県版 RDB (広島県野生生物保護対策検討会 1995) にはウミヒルモは掲載されていないが、2003 年版の県 RDB (広島県版レッドデータブック見直し検討会 2004, *H. ovalis* として)

では絶滅危惧 II 類 (VU) に指定されている。一方、ヤマトウミヒルモについては比較的最近記載された種であるため情報が少ないが、Kuo et al. (2006) や Uchimura et al. (2006b) によれば、中国地方からは広島県、山口県、島根県、愛媛県、高知県、徳島県、香川県から報告がある。

今回、広島県廿日市市の宮島南西部の海域でウミヒルモ属植物の生育が確認された。本研究では、宮島近海で見つかった新産地のサンプルについて、生育地の環境や生育状況とともに、形態および核 ITS 領域の DNA ハプロタイプについて検討を行ったので報告する。

調査地概要

本研究の調査は、広島県廿日市市宮島町宮島の南西海域 (北緯 34 度 14 分、東経 132 度 16 分; 環境省メッシュコード 5132-22-81) およびその周辺で行った (Fig. 1)。調査範囲はあてのき浦から江ノ尻浦、長浦、須屋浦の岸辺から沖合に 30 m あたりまでの海域である。この海域では、これまでにアマモやコアマモなどの海草が多く生育することが知られている。

材料と方法

2009 年 8 月および 9 月の比較的最干潮時の潮位が低い日に調査を行った。植生調査は、Braun-Blanquet (1964) の植物社会学的方法に従った。約 1 m × 1 m の方形区に出現するすべての維管束植物について優先度・群度の評価を行った。あわせて、今回得られたサンプルのうち 1 標本について、核 ITS (internal transcribed spacer) 領域の DNA ハプロタイプを決定した。野外から採集した植物体の葉の一部から DNA を抽出し、実験に用いた。DNA 抽出は、坪田ほか (2002) や Tsubota et al. (2005) などを改変した方法を用いた (Appendix)。2 mm 四方程度の植物体を凍結破碎後、TE バッファー 250 µl に溶かし、クロロホルム 100 µl で処理したものを遠心し、上澄みを直接 PCR に用いた。PCR およびシーケンスの条件は Tsubota et al. (1999, 2000) および Handa et al. (2003) に従った。PCR およびシーケンス用のプライマーは Table 1 に示した。ITS 領域の増幅にはネスティッド PCR を行った。1 回目の増幅では 18S1659B と 26S166BR のプライマーセットを用いて増幅を行い、PCR 産物を 100 倍希釈したものに対して 2 回目の増幅を行った。2 回目の増幅ではプライマーセットに 18S1764B と 26S102BR を用い

た。得られた塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース (International Nucleotide Sequence Database Collaboration; INSDC) に登録した。今回得られた配列を既存のデータとアライメントを行い比較した。

結果と考察

宮島におけるヤマトウミヒルモの生育地の環境と生育状況および植生 (Fig. 2A–C)

調査の結果、調査地の宮島南西部の海域付近で生育が確認された。ヤマトウミヒルモの生育場所は、海水の透明度が比較的高い海域の砂地の海底で、やや泥質の混ざる場所に生育する場合が多かった。生育地は面積にして合計 100 m² 以上の範囲で、最満潮時では水深 3–5 m 程度、最低潮位の際に海面から現れる場所（潮間帯下部）からそれよりもやや深い低潮線より深い場所（潮下帯の最上部、最干潮時の水位が 0.5 m 程度）であった。これは、大場・宮田 (2007) のコアマモ帶 *Zostera japonica* subsp. *japonica* zone の下部からアマモ帶 *Z. marina* zone の上部に相当し、

田中ほか (1962) が報告しているウミヒルモの垂直分布のうち、分布からヤマトウミヒルモと考えられる九州南部や東京湾口のものとほぼ一致する。また、田中ほか (1962) はウミヒルモについて海産植物の中では比較的内湾性の強い種であると述べているが、今回見つかった環境は内湾というよりは比較的開けた環境であった。

生育状況は、植物体がそれほど密生せずヤマトウミヒルモが単独で群落を作るか、あるいはコアマモ *Zostera japonica* Asch. & Graebn. やアマモ *Z. marina* L. と混生することが確認できた。いずれの場合も褐藻や紅藻が混生する場所もあったが、調査時には海水温が高いためか枯死し、種名が不明である。一方、コアマモやアマモが密生する場所や深度が深い場所ではほとんど見られないか、あってもわずかな個体数に限られた。玉置ほか (2004) は、アマモ類とウミヒルモの間の種間競合が存在することを報告しているが、今回の場所でもその傾向が確認された。また開花については、一般的には 7–8 月とされているが、今回の生育場所では花の時期に観察できなかつたため今後継続調査を行う予定である。

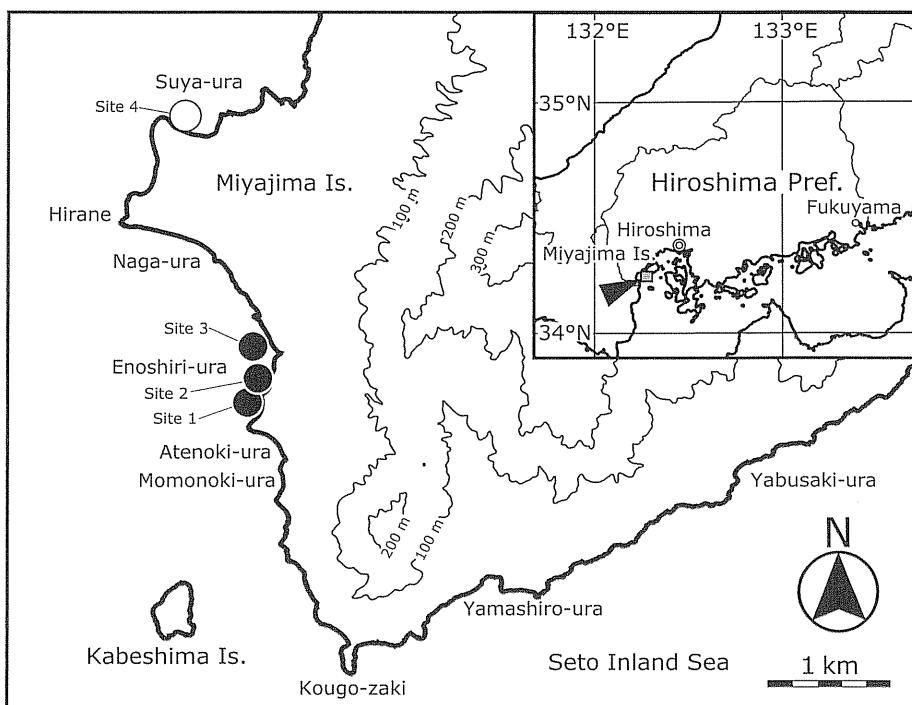


Fig. 1. Map of SW part of Miyajima Island, Hiroshima Prefecture, SW Japan, showing the study site and location of sampling sites of *Halophila nipponica* J.Kuo. Numerals on the map correspond to the sites in Table 2. Shade circles (●) represent sites where *H. nipponica* was recorded, and open circle (○) not recorded.

Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing of the ITS regions of *Halophila nipponica* J.Kuo. in the present study.

Primers	Sequence (5'-3')	References	Note
Forward			
18S1659B	CGTCGCTCCT ACCGATTG	Oguri et al. (2003) ¹	1st PCR
18S1764B	AGAGGAAGGA GAAGTCGTAA C	Oguri et al. (2003) ¹	2nd PCR, sequencing
18srRNA	TCCGTAGGTG AACCTGCGG	Oguri et al. (2003) ²	Sequencing
5.8S10B	CTCAGCAACG GATATCTTGG	Oguri et al. (2003) ¹	Sequencing
5srRNA	ACGATGAAGA ACGCAGCG	Oguri et al. (2003) ²	Sequencing
5.8S43H	GAAGAACGTA GCGAAATGCG A	Present study	Sequencing
Reverse			
5srRNAR	CGCTGCGTTC TTCATCGT	Handa et al. (2003) ² ; Oguri et al. (2003)	Sequencing
5.8S102BR	ACTCGATGAT TCGCGGA	Oguri et al. (2003) ¹	Sequencing
5.8S124HR	CGGGCGCAAC TTGCGTTCA	Present study	Sequencing
25srRNA	TCCCTCGCTT AGTGATATGC	Oguri et al. (2003) ²	Sequencing
26S102BR	CCGGTTCGCT CGCCG	Oguri et al. (2003) ¹	2nd PCR, sequencing
26S166BR	GAGGACGCTT CTCCAGACTA C	Oguri et al. (2003) ¹	1st PCR

The positions correspond to ones in the 18S rRNA gene of *Chlorella vulgaris* (X13688) and the 5.8S rRNA gene of *Chlamydomonas tetragama* (AB004866). ¹Designed by K. Bekku, M. Itouga & H. Tsubota; ²designed by H. Tsubota.

ヤマトウミヒルモの生育する植生は、大場・宮田（2007）が提案したヤマトウミヒルモ群集 *Halophilum nipponicae* Ohba & Miyata に相当するが、宮島の生育地ではコアマモが多く出現するスタンドが多く確認された（Table 2）。

ヤマトウミヒルモの形態的特徴と区別点（Fig. 2D–G）
砂地の海底に生育する常緑で沈水性の多年生草本。葉が海中に直立し、茎は砂地に潜り横にはう。茎は細長く白い横走茎になり、軟らかい。茎には節があり、節間は 20–35 mm。節から 1 本のひげ根を出し、透明な鱗片葉を 2 枚つける。さらに鱗片葉の腋に非常に短い枝を出し、そこから葉を 2 枚出す。葉は有柄で全縁、黄緑色から緑色。葉柄は細長く白色。葉身の質は薄く、細胞層は 1–数層、橢円形で長さ 18–25 mm、幅 10 mm 程度。葉脈は網状にならず、中肋と両縁に脈があり、8–12 対の側脈でつながる。側脈はほとんど二叉分枝しない。葉の縁の縁帶は 1 mm 程度。葉縁の透明細胞は 4 列程度で細長く、長さ 200–350 μm。葉身には気孔はなく、葉身細胞はジグソーパズル状で 35–60 μm。雌雄異株で開花は 7–8 月とされるが、宮島の集団では花および果実は未確認。今回得られたヤマトウミヒルモの標本は、Kuo et al. (2006) や Uchimura et al. (2006b)，大場・宮田（2007）の記載とほぼ一致した。ヤマトウミヒルモは葉の縦横比や葉形、葉柄が紫紅色を帯びないこと、葉縁の透

明細胞が 4 層程度、側脈の数が少ないとなどでウミヒルモと区別できる。また、ヤマトウミヒルモは鹿児島県以北に分布するのに対して、ウミヒルモはそれ以南に分布する（Kuo et al. 2006; Uchimura et al. 2006b）。

次に標本を引用する。

Halophila nipponica J.Kuo, Acta Phytotax. Geobot. 57: 141, 2006.

Syn. *H. japonica* Uchimura & Faye, Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B, 32: 131, 2006.

JAPAN. 1:25,000「Atatajima」, Honshu, Hiroshima-ken, Hatsukaichi-shi, Miyajima-cho, Miyajima Island, near Atenoki-ura. August 26, 2009, *H. Tsubota & S. Mukai*, 26001, DNA voucher for accession number AB523410, (HIRO-MY); ibid., Miyajima Island, near Enoshiri-ura. September 4, 2009, *S. Mukai, H. Kubo & H. Tsubota*, 26421–26427, (HIRO-MY).

ヤマトウミヒルモの核 ITS 領域の種内変異

核 ITS 領域について塩基配列を決定し、DNA データベースに登録されている塩基配列と比較した。得られた配列の長さは 753 bp で、アクセシション番号は AB523410 である。既存の配列とのアライメントの結果、1 か所のインデル（挿入および欠失）を含む 622 bp について比較を行った。比較の結果、宮島南部で確認された植物体の ITS 領域 (ITS1–5.8S

Table 2. *Halophiletum nipponicae* Ohba & Miyata (2007).

Stand no.	M06	M09	M01	M02	M03	M10	M04	M11	M05	M12	M13	M07	M08	調査番号
Year	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	年
Month	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	月
Day	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	日
Site no.	2	2	1	1	1	2	2	3	2	4	4	2	2	調査地
Water level at lowest tide (m)	0	0	0	0.2	0.5	0.4	0.3	0.3	0	0.1	0.9	0.2	0.7	最干潮時の水位(m)
Area (m ²)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	調査面積(m ²)
(%) Cover of vegetation	35	10	70	25	15	45	80	85	75	70	70	40	0	植被率(%)
Number of species	1	1	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1	0	種数
Character species of ass.														
<i>Halophila nipponica</i> J.Kuo	3.3	1.2	2.2	2.2	1.2	1.2	3.3	+.2						ヤマトウミヒルモ
Other species														
<i>Zostera japonica</i> Asch. & Graebn.	3.3	2.2	1.2	3.3	2.3	4.4	4.4	4.4	4.4					コアマモ
<i>Z. marina</i> L.						2.2	1.2				3.3			アマモ

Sites 1–3: Japan. Honshu, Hiroshima-ken, Hatsukaichi-shi, Miyajima-cho, Miyajima Is., Enoshiri-ura; and site 4: near Suya-ura. Leg.: H. Tsubota, H. Kubo & S. Mukai.

rDNA-ITS2) の配列は、本州産のヤマトウミヒルモのもつ配列 (AB436931–AB436935) とは同じ長さで、0–2 塩基の違いしか認められず、100–99.7% の相同性を示した。とくに、山口（周防大島）や島根（知夫里島古海）、神奈川（小田和湾）とは同一の ITS ハプロタイプを持つことが明らかになった。これらの結果から、今回見つかった宮島近海のウミヒルモ属植物は過去に報告のあるウミヒルモ *H. ovalis* ではなくヤマトウミヒルモ *H. nipponica* であることが遺伝的にも確認されるとともに、宮島の集団は本州の他地域の集団と遺伝的にあまり分化していない可能性が示唆された。今後、非コード領域など他の領域の配列の比較や集団遺伝学的な方法を用いて、集団の遺伝的構造の詳細を明らかにする必要がある。

宮島におけるヤマトウミヒルモの分布の意義と今後

ウミヒルモ類は昔から日本各地で報告があり、一般的な植物であったと考えられる。しかしながら、高度成長期以降の埋め立てや海洋汚染により分布域が狭まっており、環境省の2000年版レッドデータブック（環境庁自然保護局野生生物課2000）やレッドリスト（環境省2007）、各県のレッドデータブックで何らかのランクに指定されている。広島県では過去に数か所で生育が報告されている（土井1983、広島湾および竹原市忠海など）が、普段目につかない海底に生育する植物であり、また広島県内での分

布や生育状況については詳細な情報がなかったため、最近まで環境悪化に伴いほとんどの場所で絶滅したものと考えられていた（中國新聞2001；広島県版レッドデータブック見直し検討会2004）。最近になって断片的な報告がいくつかなされており、竹原市（土井1983；Kuo et al. 2006, Takahara Shiと記載 [MAK 296963, as *H. ovalis*]；Uchimura et al. 2006b, *H. japonica* として [MAK 296963, as *H. ovalis*]；環境省生物多様性センター2008a, ウミヒルモ *H. ovalis* として）や豊田郡大崎上島町生野島（環境省生物多様性センター2008b, 2009, ウミヒルモ *H. ovalis* として）、能美島（中國新聞2001；三上2002；大柿町海辺の生き物調査団2002；広島県版レッドデータブック見直し検討会2004），大竹市阿多々島（寺脇ほか2001, ウミヒルモ *H. ovalis* として），近隣では山口県屋代島（周防大島）（Uchimura et al. 2006b, *H. japonica* として）や愛媛県（松山市興居島・中島町・御荘町）（愛媛県貴重野生動植物検討委員会2003, ウミヒルモとして）からの報告がある。宮島周辺では上記以外に、Miki (1934) が分布図の中で宮島近海から山口県屋代島付近が含まれる範囲を産地としてプロットしている。一方、乾 (1918) や加藤 (1939), 堀川 (1942a, b), 関ほか (1975) は宮島の植物について報告しているが、ウミヒルモについてはふれていない。しかしながら、今回生育が明らかになった宮島の集団は、その生育場所や状況から考えて自生していたものと

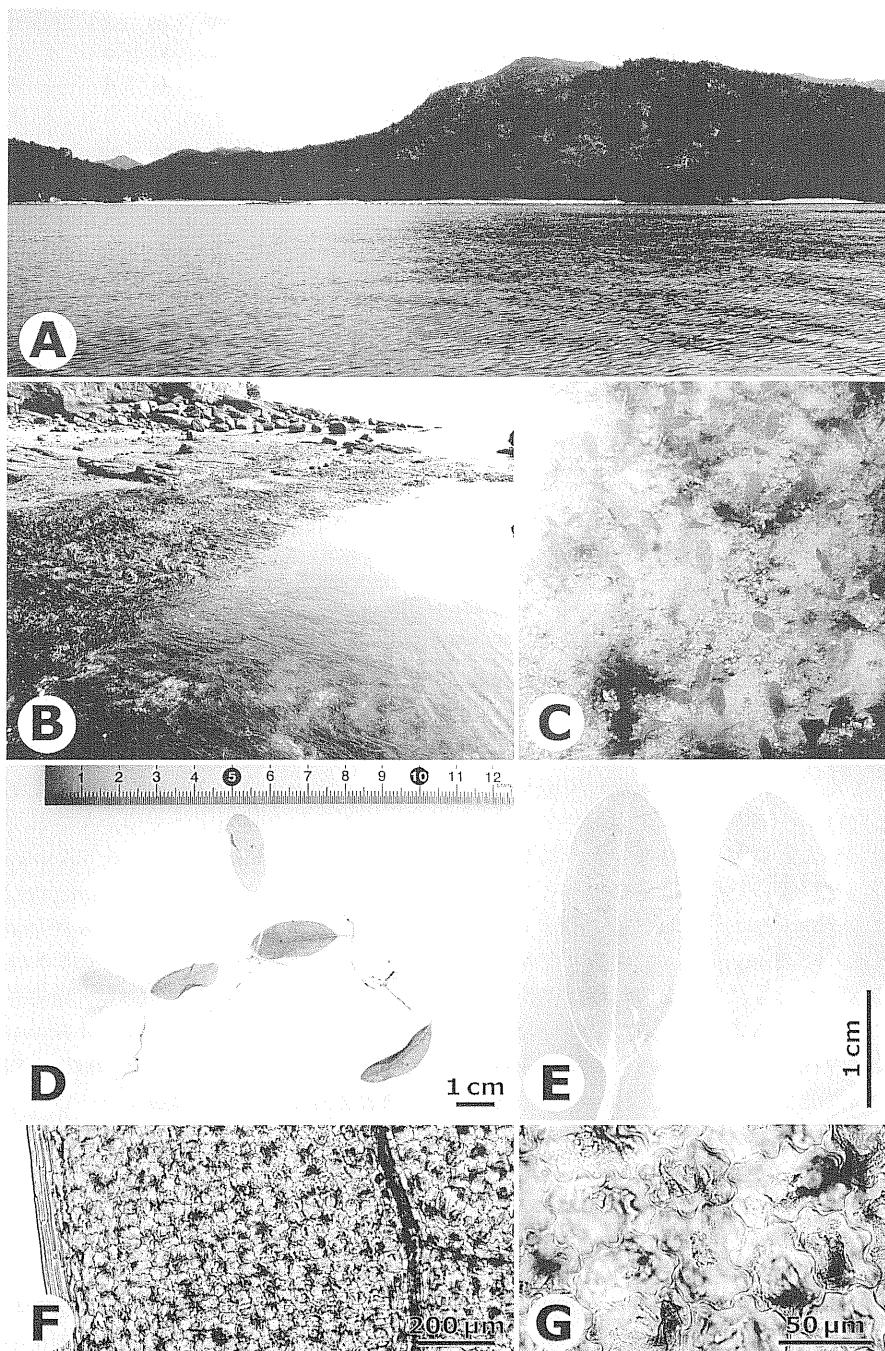


Fig. 2. *Halophila nipponica* J.Kuo and its habitat near Miyajima Island, Hiroshima Prefecture, SW Japan. A. The study site (September 4, 2009). B. Habitat of *H. nipponica* (September 4, 2009). C. *H. nipponica* growing on sandy bottom at a depth of 0.5 m in the study site (September 4, 2009). D. Sterile plant (August 26, 2009). E. Leaves (August 26, 2009). F & G. Laminar cells of leaf-margin (linear pellucid-cells) and leaf-blade (jigsaw puzzle-shaped epidermal cells) from middle part of leaf (August 26, 2009).

考えられる。最も近い確実なヤマトウミヒルモの既知の産地として山口県屋代島があげられるが、今回発見された宮島近海から約30 km離れていることや、ヤマトウミヒルモと考えられるウミヒルモの報告が宮島周辺のいくつかの海域でもあること、宮島周辺は人為的な攪乱がなされていないことからも自生である可能性が極めて高い。今回ヤマトウミヒルモの生育が確認されたことは、宮島周辺海域が比較的自然に近い状態で保持されていることを示すものと考えられる。また、今回宮島のウミヒルモ属植物がヤマトウミヒルモであったことから、広島県内の他の場所や近隣の山口県、愛媛県の産地でウミヒルモと報告されているものもヤマトウミヒルモである可能性が高いことが示唆され、今後標本調査および現地調査、DNAハプロタイプ調査などにより確認を行いたい。

暖かい海域では非常に濃密で大きな群落を形成し、ウミヒルモ類は高い生産力を持っているとされる (Hillman et al. 1995; Hammerstrom et al. 2006; 坂西ほか 2008)。宮島の個体群については、その全貌はまだ明らかになっていないが、その密度などから考えて暖かい海域ほどの生産力は持たないと考えられる。しかしながら、過去に大きな護岸改修が行われていない場所であるため、比較的自然状態で個体群が残されており、広島県内では貴重な生育地であると言える。また、魚類の産卵や稚魚の生活の場、海水の浄化作用などの海草群落の有用性 (Hemminga & Duarte 2000) を含めて総合的に判断すると、広島県レッドデータブックに掲載し保護すべき対象と言える。既知の産地では護岸改修などに伴う海底の搅乱などにより生育地の減少が懸念されている。今回の海域ではその可能性は低いが、今後、底引き網や近年の大型台風による生育地の搅乱は考えられる。一方、流れ着いた個体が定着して増えた、あるいは近年ウミヒルモ類の分布が広がっているという報告もある (藤田・高山 1999; Virnstein & Hall 2009)。このため、その分布状況や生育状態、個体群の消長について長期的かつ定期的に継続調査する必要がある。また、広島県内の他の既知の産地や他県の産地では、今回よりもより深い最干潮時の水位が4 mの場所 (大場・宮田 2007) や水深基準 (略最低低潮面) -2.0から-3.0 mの範囲 (環境省生物多様性センター 2008b, ウミヒルモとして)でも生育が確認されている。一方、田中ほか (1962) や野沢 (1974), 桐原ほか (2005) は、ウミヒルモ (ヤマトウミヒルモを含むと考えられる) の分布の限界と生育深度の変化について述べているが、現在の知見 (Kuo et al. 2006; Uchimura et

al. 2006b; 大場・宮田 2007 など) では琉球列島のウミヒルモとして報告されているものと、九州以北のウミヒルモとして報告されているものは異なる種であると考えられる。これらの報告などから考えて、宮島周辺でも今回確認された海域よりもより深い場所で生育する可能性と、ヤマトウミヒルモ以外のウミヒルモ類が分布する可能性もある。今後より範囲を広げた詳細な調査が必要である。

謝 辞

本報をまとめるにあたって、英文校閲をして頂いたオーストラリア国立極地研究所の R. D. セッペルト博士と、過去の報告について有益なご助言を頂いた広島大学名誉教授の関太郎博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Braun-Blanquet, J. 1964. Pflanzensoziologie: Grundzüge der Vegetationskunde, 3 Aufl. -xiv + 865 pp. Springer-Verlag, Wien.
- 中国新聞. 2001. ウミヒルモ浅瀬に自生、大柿 (コメント 関太郎). 中国新聞 2001年10月12日朝刊, 34面記事. 中国新聞社, 広島.
- 土井美夫. 1983. 広島県植物目録. 148 pp. 博新館, 広島.
- 愛媛県貴重野生動植物検討委員会(編). 2003. 愛媛県レッドデータブック—愛媛県の絶滅のおそれのある野生生物. 447 pp. 愛媛県県民環境部環境局自然保護課, 松山.
- 藤田大介・高山茂樹. 1999. 富山県魚津市地先における海草ウミヒルモとコアマモの生育記録(短報). 富山県水産試験場研究報告 11: 67-70.
- Green, E. P. & Short, F. T. (eds.) 2003. World Atlas of Seagrasses. 310 pp. University of California Press, Berkeley.
- Hammerstrom, K. K., Kenworthy, W. J., Fonseca, M. S. & Whitfield P. E. 2006. Seed bank, biomass, and productivity of *Halophila decipiens*, a deep water seagrass on the west Florida continental shelf. Aquat. Bot. 84: 110-120.
- Handa, S., Nakahara, M., Tsubota, H., Deguchi, H. & Nakano, T. 2003. A new aerial alga, *Stichococcus amphibolliformis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from Japan. Phycol. Res. 51: 203-210.
- den Hartog, C. 1970. Seagrasses of the world. Verh. Kon. Ned. Akad. Wetens. Afd. Naturk, Ser. 2, 59: 1-275 + 31 pls.
- Hemminga, M. A. & Duarte, C. M. 2000. Seagrass ecology. 312 pp. Cambridge University Press, London.

- Hillman, K., McComb, A. J. & Walker, D. I. 1995. The distribution, biomass and primary production of the seagrass *Halophila ovalis* in the Swan/Canning Estuary, Western Australia. *Aquat. Bot.* 51: 1–54.
- 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会(編). 1997. 広島県植物誌. 832 pp. 中国新聞社, 広島.
- 広島県版レッドデータブック見直し検討会(編). 2004. 改訂・広島県の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブックひろしま 2003—. 515 pp. 広島県, 広島.
- 広島県野生生物保護対策検討会(編). 1995. 広島県の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブックひろしま—. 437 pp. 財団法人広島県環境保健協会, 広島.
- 堀川芳雄. 1942a. 植物生態学上から見た厳島. 生態学研究 8: 101–120.
- . 1942b. 厳島の自然. 広島県史蹟名勝天然記念物調査報告 5: 157–212, pls. 44–52. 広島県, 広島.
- 乾環. 1918. 厳島植物目録. 10 pp. 山肩活版印刷所, 廣島.
- 環境省自然保護局野生生物課(編). 2000. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—8 植物 I (維管束植物). 660 pp. 財団法人自然環境研究センター, 東京.
- 環境省(編). 2007. 絶滅危惧種情報, 植物レッドリスト(平成 19 年 8 月 3 日公表). 環境省, 生物多様性情報システム J-IBIS. http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html. (2009 年 8 月 26 日閲覧)
- 環境省生物多様性センター. 2008a. モニタリングサイト 1000, 沿岸域調査, 調査サイト特徴一覧, 資料 4–4. 平成 20 年度検討会. http://www.biodic.go.jp/moni1000/meeting/pdf/h20_7_haihu5.pdf (2009 年 9 月 17 日閲覧).
- . 2008b. モニタリングサイト 1000, 沿岸域調査, アマモ場調査結果速報, 2008 年 6 月 30 日. http://www.biodic.go.jp/moni1000/newsflash/coast/data/SB_AKN2008.pdf (2009 年 9 月 17 日閲覧).
- . 2009. モニタリングサイト 1000, 沿岸域調査, アマモ場調査結果速報, 2009 年 6 月 22–23 日. http://www.biodic.go.jp/moni1000/newsflash/coast/data/SB_IKN2009.pdf (2009 年 9 月 17 日閲覧).
- 加藤弥栄. 1939. 宮島植物誌. 植物趣味 8: 173–193, 256–274.
- Kim, J. B., Park, J.-I., Jung, C.-S., Lee P.-Y. & Lee, K.-S. 2009. Distributional range extension of the seagrass *Halophila nipponica* into coastal waters off the Korean peninsula. *Aquat. Bot.* 90: 269–272.
- 桐原慎二・藤田大介・能登谷正浩. 2005. 陸奥湾におけるウミヒルモノの生育記録. 藻類 53: 237–239.
- Kuo, J. 1995. Occurrence of *Halophila decipiens* Ostenfeld (Hydrocharitaceae) in Okinawa Island, Japan. *Aquat. Bot.* 51: 329–334.
- & McComb, A. J. 1989. Seagrasses taxonomy, structure and development. In Larkum, A. W. D., McComb, A. J. & Shepherd, S. A. (eds.), *Biology of Seagrasses: a Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*, pp. 6–73. Elsevier, Amsterdam.
- , Kanamoto, Z., Iizumi, H. & Mukai, H. 2006. Geagrasses of the genus *Halophila* Thouars (Hydrocharitaceae) from Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 57: 129–154.
- Makino, T. 1912. Observations on the flora of Japan (cont. from vol. 26, no. 306, p. 184). *Bot. Mag. Tokyo* 26 (no. 307): 208–222.
- 松村任三. 1895. 植物雑俎. 植物学雑誌 9 (no. 96): 67–70.
- 三上幸三. 2002. 植物に寄生して 50 年. 246 pp. 博新館, 広島.
- Miki, S. 1934. On the sea-grasses in Japan II, Cymodoceaceae and marine Hydrocaritaceae. *Bot. Mag. Tokyo* 48: 131–142.
- 野沢治治. 1974. 海の水草. 遺伝 28(8): 43–49.
- 大柿町海辺の生き物調査団(編). 2002. 大柿町の海辺の生き物. 町制 45 周年記念誌. 216 pp. 大柿町, 大柿町.
- Oguri, E., Yamaguchi, T., Tsubota, H. & Deguchi, H. 2003. A preliminary phylogenetic study of the genus *Leucobryum* (Leucobryaceae, Musci) in Asia and the Pacific based on ITS and rbcL sequences. *Hikobia* 14: 45–53.
- 大場達之・宮田昌彦. 2007. 日本海草図譜. -ix + 114 pp. 北海道大学出版会, 札幌. [Ohba, T. & Miyata, M. 2007. *Seagrasses of Japan*. 115 pp. Hokkaido University Press, Sapporo. (In Japanese with English abstract and keys for species)]
- 坂西芳彦・井上千鶴・川俣茂・田中次郎・南雲保. 2008. 海産種子植物ウミヒルモノ (*Halophila ovalis*) の夏季の光合成—光特性と光合成—温度特性. 日本歯科大学紀要 37: 47–50.
- 関太郎・中西弘樹・鈴木兵二・堀川芳雄. 1975. 厳島(宮島)の維管束植物. 天然記念物弥山原始林・特別名勝厳島緊急調査委員会(編), 厳島の自然. 221–332 pp., 42–43 pls. 宮島町, 広島.
- Short, F., Carruthers, T., Dennison, W. & Waycott, M. 2007. Global seagrass distribution and diversity: a bioregional model. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 350: 3–20.
- 玉置仁・斎賀守勝・吉田吾郎・村瀬昇・寺脇利信・新井章吾. 2004. アマモ, スゲアマモ場の種間競合がウミヒルモノ入植の光条件に及ぼす影響. 水産工学 40: 191–194.
- 田中剛・野沢治治・野沢ユリ子. 1962. 本邦産海藻類花植物の分布について. 植物分類地理. 20: 180–183.
- 寺脇利信・吉川浩二・吉田吾郎・内村真之・新井章吾. 2001. 広島湾における大型海藻類の水平・垂直分布様式. 濱戸内水研報 3: 73–81.
- 坪田博美・有川智己. 2003. 分子系統解析法. In 日本蘚

苔類学会記念出版物編集委員会(編), コケ類研究の手引き, 79–88 pp. 日本苔類学会, 岡山県真庭郡川上村.

———・松田秀隆・Haji Mohamed・出口博則. 2002. 小型苔類からのDNA抽出法. 蘚苔類研究 8: 118–122.

Tsubota, H., Nakao, N., Arikawa, T., Yamaguchi, T., Higuchi, M., Deguchi, H. & Seki, T. 1999. A preliminary phylogeny of Hypnales (Musci) as inferred from chloroplast *rbcL* sequence data. Bryol. Res. 7: 233–248.

———, ———, Yamaguchi, T., Seki, T. & Deguchi, H. 2000. Preliminary phylogenetic relationships of the genus *Brotherella* and its allied genera (Hypnales, Musci) based on chloroplast *rbcL* sequence data. J. Hattori Bot. Lab. 88: 79–99.

———, Takahashi, K., Nakahara, M., Mohamed, H. & Deguchi, H. 2005. A simple procedure for DNA isolation using small quantities of lichen thallus. Lichenology 4: 25–28.

内村真之・新井章吾・宮崎勤・横山奈央子・井上徹教・中村由行・鳴田智. 2005. 日本におけるウミヒルモ属の分類に関する新知見. 藻類 53: 98.

Uchimura, M., Faye, E. J., Shimada, S., Arai, S., Inoue, T. & Nakamura, Y. 2006a. A re-evaluation of the taxonomic status of *Halophila euphlebia* Makino (Hydrocharitaceae) based on morphological features and ITS sequence data. Bot. Mar. 49: 111–121.

———, ———, ———, Ogura, G., Inoue, T. & Nakamura, Y. 2006b. A taxonomic study of the seagrass genus *Halophila* (Hydrocharitaceae) from Japan: description of a new species *Halophila japonica* sp. nov. and characterization of *H. ovalis* using morphological and molecular data. Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, Ser. B 32: 129–150.

Virnstein, R. W. & Hall, L. M. 2009. Northern range extension of the seagrasses *Halophila johnsonii* and *Halophila decipiens* along the east coast of Florida, USA. Aquat. Bot. 90: 89–92.

Waycott, M. Freshwater, D. W., York, R. A., Calladine, A. & Kenworthy W. J. 2002. Evolutionary trends in the seagrass genus *Halophila* (Thouars): insights from molecular phylogeny. Bull. Mar. Sci. 71: 1299–1308.

2009年9月30日受理

Appendix. A simple protocol for DNA extraction used in the present study.

Reagents and solutions

1. Extraction buffer: TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) or TE20 buffer (50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0) [Note 1]
2. Chloroform (100%) or chloroform : isoamyl alcohol (CIA; 24 : 1 v/v) [Note 2]

Protocol

This protocol is for DNA isolation using small quantities of materials, and a modification of the phenol-chloroform method devised by Tsubota and others (1999, 2000, 2002, 2005) and Tsubota & Arikawa (2003). The method consists of the following steps:

1. Pick up a small amount of leaf (ca. 2×2 mm²) under a dissecting microscope [Note 3].
2. Grind the thallus with 30 μ l extraction buffer (TE or TE20 buffer; see recipe, above) using a polypropylene pestle in a 1.5 ml microcentrifuge tube.
3. Add ca. 200 μ l of extraction buffer (TE not TE20) and mix gently [Note 4, 5].
4. Add a half volume (ca. 100 μ l) of CIA and mix gently by brief shaking for 5–10 min.
5. Centrifuge the tubes at 20,000 \times g for 5 min at 4°C.
6. Transfer the aqueous upper phase to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.

Notes

1. TE20 buffer has some advantages in buffering capacity.
2. No preference.
3. Samples larger than 2×2 mm² are not suitable for this procedure.
4. A total amount of the solution should add up to 200–250 μ l.
5. At this stage the procedure may be stopped and the solution may be stored frozen (at -20°C) for extended periods.