

課題名 RFd-1102 絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発:車軸藻類を例に

課題代表者名 坂山 英俊 (神戸大学大学院理学研究科生物学専攻生物多様性講座・講師)

研究実施期間 平成23~24年度

累計予算額 21,839千円(うち24年度9,706千円)
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキー 生物多様性、分類、DNAバーコーディング、凍結保存、域外保全

研究体制

(1)絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発:車軸藻類を例に(神戸大学大学院理学研究科)

研究概要

1. はじめに

近年、多くの野生生物が環境破壊の結果、海洋・森林・淡水の各生態系から急速に失われている。その中でも特に、淡水生態系は最も多くの種が減少した生態系だといわれている。淡水生態系はおもに植物プランクトン、水生昆虫、淡水魚類、水生植物、車軸藻類などによって構成されている。特に車軸藻類は、淡水生態系中で「シャジクモ帯」を形成することによって底泥を覆い、淡水域の透明度維持の「かなめ」となる役割を果たしている。しかしながら、1960年代以降の淡水生態系破壊の結果、急速に車軸藻類の衰退が進行している。平成19年に公表された環境省版レッドリストによると、日本に産する車軸藻類約80種類のうち、4種類が絶滅、1種類が野生絶滅、52種類が絶滅危惧I類として掲載されている。近年、このように生態学的に極めて重要であるが絶滅の危機に瀕している車軸藻類の実体解明に向けた政策や研究が多く行われ始めている。しかしながら、車軸藻類の分類体系は、複数の種を1種として誤ってまとめてしまうlumpingや、1つの種を複数の種に細分化するsplittingなどといった分類学的問題点が多く残されている。したがって、適切な保全単位を明らかにするために、過去に記録された種の分類学的位置づけを詳細な解析によって再検討する必要がある。また、このような分類学的混乱に起因する種同定の難しさが種の保全や淡水生態系保全に向けた政策や研究の進展の大きな妨げとなっている。したがって、信頼性の高い十分な種情報の収集・蓄積と活用によって高精度かつ迅速な種の識別を行い、保護管理のための意志決定を支援する車軸藻類の多様性情報基盤が必要である。

多様性情報データベース構築に向けた研究は、我が国では、日本における遺伝子データベース関連の活動拠点として「日本バーコードオブライフ・イニシアティブ(JBOLI)」が2009年に設立されたばかりである。国際的には、Barcode of Life Data Systems(BOLD)によって主に昆虫類を用いたデータベース整備が進行中である。しかしながら、これらのシステムはまだ実用化が始まったばかりであり、ユーザーの様々な要望に対応可能なシステムが利用可能となるまでにはあと数年は必要である。このような背景の中、本研究は、取得した車軸藻類の遺伝子塩基配列データおよび種情報を独自のデータベースとして管理するとともに、これらのシステムと情報を共有して実用化を推進する基礎研究として位置づけることができる。

一方、車軸藻類の生息域は防災、水利、漁業、稲作を目的とした湖沼、河川、ため池、水田が中心である。したがって、車軸藻類の保護のためだけに人間活動を制約することは非常に困難であり、生息域外での保全技術開発は必要不可欠である。

2. 研究開発目的

・本研究では、これまでに日本での生育が報告されたことのある絶滅危惧植物車軸藻類の分類学的問題を解決し、その証拠となるサンプルの形態、遺伝子（DNAバーコード）、分布・生態、証拠標本情報から成る種情報をデータベース化し、日本産車軸藻類の多様性情報基盤を構築する。

・車軸藻類の遺伝子配列情報に基づく種および集団レベルの同定・識別支援システムを構築する。そのために、種レベルの識別用に実績のある*rbcL*遺伝子をDNAバーコードに選定し、証拠標本からDNAバーコードを取得する。さらに、集団レベルの識別に有効な遺伝子領域を探索し、新たなDNAバーコードを開発する。

・将来的に車軸藻類のバイオリソース化およびより低コスト、小スペースの域外保全を実施するために、車軸藻類を域外で長期保存するための凍結保存技術における最適な凍結と解凍手順の確立を目指す。

3. 研究開発の方法

1) 野外調査

過去の文献および研究協力者から得た車軸藻類の生育分布情報に基づき、平成23年度は、愛知県（8月、3月）、群馬県（8月）、石川県（9月）、大分県（10月）、愛媛県（10月）、広島県（10月）、平成24年度は、兵庫県（6月）、滋賀県（7月）、高知県（8月）、愛媛県（8月、10月）、栃木県（8月）、群馬県（8月）、静岡県（8月）、島根県（9月）、鳥取県（9月）、石川県（10月）、沖縄県（3月）において野外採集調査を実施した。車軸藻類は淡水域の湖底に繁茂するので、岸またはボート上から錨型の採集器具を水中に投入して、底から引き上げるようにして採集した。また、日本各地にいる研究協力者から車軸藻類サンプルの提供を受けた。採集品はさく葉標本にするとともに、その一部は-80℃で凍結保存し、さらにシリカゲルまたは70%エタノールで固定して遺伝子解析に用いた。また、各採集地点での緯度経度（GPS）情報を記録し、車軸藻類の生育状態と生育地の状態をデジタルカメラにより画像情報として記録した。

2) 分類学的解析およびDNAバーコーディング

適切な保全単位を明らかにするために過去に記録されている種を詳細な形態学的解析と分子系統学的解析によって分類学的再検討を実施した。本研究では、Sakayama et al. (2005)に準じて、種レベルの分類形質として重要な卵胞子の走査型電子顕微鏡（SEM）による詳細な観察を実施した。また、種レベルの同定結果は、2009年に国際的に標準化されたDNAバーコード領域の1つであり、これまでに最も多くの種類で調べられている葉緑体の*rbcL*遺伝子の約600bpの塩基配列の比較を行い、形態に基づく種同定結果を確認した。一部のサンプルに関しては、必要に応じて、複数の葉緑体と核のDNA塩基配列（*rbcL*遺伝子、*matK*遺伝子、*atpB-rbcL*遺伝子間領域、ITS領域等）に基づく分子系統解析によって種同定を正確に行い、従来の分類体系と照らし合わせることで、分類学的問題の解決と種の保全単位の決定を試みた。

3) 分子マーカー/DNAバーコードの新規開発

DNAバーコード領域として*rbcL*遺伝子と*matK*遺伝子が国際的に標準化されているが、*matK*遺伝子については、車軸藻類に特異的なPCRプライマーが報告されていないため、本研究で車軸藻類に特異的なPCRプライマーのデザインを行った。

種レベルのDNAバーコードで識別ができない集団を識別するため、研究代表者がこれまでの研究で構築した独自のEST（網羅的な発現遺伝子のタグ配列）データベースから新規にEST-SSRマーカー

（EST配列上に存在する単純反復配列）を開発し、集団間および集団中の個体間の遺伝的変異を検出可能なマーカーの探索を進めた。ESTデータベースは、車軸藻類の中で日本に最も多くの集団が分布するシャジクモ（*Chara braunii*）のものをを用いた。EST-SSR領域の探索には、MISAプログラム

（MicroSatellite identification tool, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>）を用いた。MISAプログラムによって抽出したEST-SSR領域をPCR増幅するために、PRIMER3プログラム

（<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>）を用いてプライマーを設計した。抽出したEST-SSR領域がシャジクモ集団間で多型的かどうかを検証するため、Kato et al. (2008, 2011)によって系統がことなることが明らかになっている複数のシャジクモ集団を用いて、集団間のEST-SSR領域の比較を行った。

EST-SSR領域の比較は、アガロースゲルを用いた電気泳動法で増幅を確認した後、Guichoux et al. (2011)等を参考にし、通常のPCR法および蛍光標識プライマーを用いたマルチプレックスPCR法によ

り増幅反応を行いオートシーケンサーでアリルの決定を行った。

4) 車軸藻類の多様性情報データベース構築とデータの管理、公開手順

日本バーコードオブライフ・イニシアティブ (JBOLI) のデータベースシステム「Ruga」とデータを共有することを前提として、DNAバーコードを取得した標本に由来する、形態、遺伝子 (DNAバーコード)、分布・生態、証拠標本情報から成る種情報を、Microsoft Excelを用いて「Ruga」と互換性のある形式でデータベース化した。データの一部は、日本バーコードオブライフ・イニシアティブの「JBOLI-DS」に登録した。この際、システムを管理している東京大学大学院総合文化研究科の伊藤元己教授から適宜助言をもらい作業を進めた。

5) 凍結保存技術の開発

車軸藻類卵胞子の最適な凍結保存法を検討するため、培養実験方法が確立されているシャジクモ (*Chara braunii*) をモデルに用いた。シャジクモ (*Chara braunii*) の単藻培養株より接合子を採用した。単藻培養株は、接合子を1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で5~10分間処理し、4週間の低温処理後、接合子を発芽させることによって作出した。凍結保存法は、Day et al. (2008)および笠井ら (2009)の方法を基に条件検討を行った。凍害防御剤は多くの生物で実績のあるDMSO (ジメチルスルホキシド)を用いた。接合子については、乾燥に耐えられる壁を持つため、室温に24時間以上置くことで乾燥処理を行ったサンプルを凍結実験に用いた。サンプルはプログラムフリーザー (Kryo 320-1.7, Planer)を用いた2段階凍結法 (プログラムフリーザーで徐々に-40°Cまで温度を下げたあと、液体窒素で-196°Cまで急速凍結させる方法)により凍結させた。冷却速度は、毎分1°Cの速度で温度を低下させた。凍結サンプルを37°Cの恒温槽 (サーマルロボ TR-1, アズワン) 中で保温し、氷結晶が完全に無くなるまで融解した。解凍した接合子サンプルは、soil-water培地にまき、発芽率を計測した。

4. 結果及び考察

1) 野外調査、分類学的解析

平成23年度から24年度に渡り、野外採集調査および提供を受けた車軸藻類を、合計411サンプル (*Nitella*属195サンプル、*Chara*属205サンプル、*Nitellopsis*属8サンプル、*Lamprothamnium*属3サンプル、総標本数1300点) 収集した。そのうち、沖縄県本島で採集した*Nitella tumulosa* (日本新産)、沖縄県石垣島で採集した*Nitella* sp. 1 (日本新産または新種)、愛媛県で採集した*Chara australis* (オーストラリアシャジクモ)、*Nitella* sp. 2 (日本新産または新種)、愛知県の休耕田で採集した*Nitella imahorii* (フラスコモダマシ) はこれまでに遺伝子塩基配列が調べられていない種類であった。また、千葉県で採集された*Chara* sp. 1、および神奈川県から採集された*Chara* sp. 2は新種である可能性が示された。他にも*rbcL*遺伝子塩基配列を用いたDNAバーコーディングにより検出した新規系統を複数検出した。また、徳島県出羽島の集団が国定天然記念物に指定されている絶滅危惧I類の*Lamprothamnium succinctum* (シラタマモ) の新産地を3地点発見した。さらに、過去の種同定結果や形態情報などが不十分であり、実体が良く理解されていなかった琵琶湖産の*Nitellopsis obtusa* (ホシツリモ) および奥日光産の*Nitella flexilis* var. *bifurcata* (チュウゼンジフラスコモ) を再調査し、詳細な形態観察とDNAバーコーディングを実施した。

2) 分子マーカー/DNAバーコードの新規開発

本研究では、種レベルを識別する分子マーカー/DNAバーコードとして、葉緑体の*rbcL*遺伝子と*matK*遺伝子の塩基配列を用いた。シャジクモ目、シャジクモ属、フラスコモ属ごとに各遺伝子 (*rbcL*、*matK*) のアライメントファイルを作成し、DNAバーコードの評価指標とされている塩基置換モデル (K2Pモデル) を用いて、PAUP4.0*で分子系統樹および距離行列データを作成し、行列データから、EXCELを用いて頻度分布を作成した。解析には、*rbcL*遺伝子222配列 (決定した配列長1380bp, DNAバーコード領域563bp)、*matK*遺伝子50配列 (決定した配列長1182bp, DNAバーコード領域744bp) を用いた。その結果、*matK*遺伝子領域は*rbcL*遺伝子領域よりも高い塩基配列多様性を持つことが明らかになった。また、*matK*遺伝子領域と*rbcL*遺伝子領域において種間での遺伝的距離が明確に認められた。これらの結果は、両遺伝子領域を組み合わせることにより種を識別することが可能であることを示している。したがって、*matK*遺伝子領域と*rbcL*遺伝子領域を組み合わせたDNAバーコーディングによる車軸藻類の種同定支援システムを確立することができた。

一方、*C. braunii* (シャジクモ) のESTデータ (合計3,285 contig) から2塩基モチーフおよび3塩基モチーフのEST-SSRの抽出を実施し、合計248のEST-SSR領域を抽出し、これらのEST-SSR領域のうち、

56領域についてPCR増幅用のプライマーを設計し、系統が大きく異なる*C. braunii* 8サンプルを用いて多型の有無を調査し、2塩基モチーフについては8領域、3塩基モチーフについては20領域において多型を観察した。さらに248領域中71領域についてPCR増幅用のプライマーを設計し、スクリーニングを行った。系統が異なる8株を用いて、72遺伝子座の有用性を調査した結果、32遺伝子座が安定的にPCR増幅とアレル決定が可能であった（平均アレル数4.0個）。集団内レベル（河口湖集団16個体）で、この13遺伝子座の多型性を確認した結果、10遺伝子座で多型性を示した（平均アレル数3.6個）。これらの結果は、本研究で開発したEST-SSRマーカーは集団/個体レベルの識別に利用可能なレベルであることを示している。

3) 車軸藻類の多様性情報データベース構築とデータの管理、公開手順

これまでに当研究室において遺伝子解析がなされている車軸藻類のさく葉標本および本研究で新たに収集したさく葉標本を用いて車軸藻類の多様性情報データベースの構築を進めた。種情報についてはMicrosoft Excel形式でデータを管理した。DNAバーコードに用いた遺伝子塩基配列情報はFasta形式でデータを管理した。現時点では、本研究で新たに収集したさく葉標本について、標本ラベル情報（標本ID、和名、学名、採集日、採集地、特記事項）の入力が完了した。形態情報と遺伝子塩基配列情報に基づいた種同定が完了したサンプルの一部は、JBOLI-DSによるデータ登録を行い、情報公開の準備を進めた。

4) 凍結保存技術の開発

*C. braunii*の卵胞子を用いて凍結保存条件の検討を実施した。検討した条件の中では、乾燥サンプル、凍結防護剤サンプルの両方で凍結保存に成功した。しかし、実験に用いたサンプルのロット間で、コントロール条件での発芽率が3～35%であり安定しない場合が観察された。発芽率を改善するため、実際に車軸藻類が生育する自生地の底土を実験に用いた結果、安定した発芽率を得ることができた。したがって、本研究で確立した卵胞子の凍結保存条件、発芽条件を用いることによって、安定した域外保全が実施できることが明らかになった。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- ・ 野外調査によって車軸藻類サンプルを合計411サンプル得たことにより、車軸藻類の現在の生育分布状況がより明確になった。また、野外調査によって得られたサンプルの中に、新規分類群と考えられるサンプルを複数見いだすことができた。これらの成果は、車軸藻類の分類学・生態学上の基礎的理解の底上げにつながる。
- ・ *matK*遺伝子領域は*rbcl*遺伝子よりも高い塩基配列多様性を持ち、種を識別するDNAバーコードとして適用可能であることが明らかになった。したがって、*matK*遺伝子領域と*rbcl*遺伝子領域を組み合わせたDNAバーコーディングシステムを確立することができた。
- ・ *C. braunii*のESTデータ（合計3,285 contig）から車軸藻類の集団を識別する32遺伝子座のマーカーを確立できた。この結果は、車軸藻類においてEST-SSRを集団レベルの血統登録用DNAバーコードとして初めて導入するものである。
- ・ これまで凍結保存技術が確立されていない絶滅危惧植物の車軸藻類の卵胞子における凍結保存法を確立した。新規凍結保存法による車軸藻類の長期保存技術が確立されることにより、種の絶滅、種内の遺伝的多様性の喪失を防ぐことができる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省の第3次絶滅のおそれのある野生生物の選定・評価検討会、植物II分科会におけるレッドリストの検討において、本研究成果の一部である車軸藻類の現在の生育分布に関するデータを提示し、レッドリストの見直しに貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- ・ 本研究で、日本に生育する車軸藻類の種および集団レベルを識別するDNAバーコーディングを用いた種同定システムが構築されたことによって、車軸藻類の種および集団レベルの同定、保全範囲の決定が、容易に、かつ高精度で可能となるので、環境保全政策の意思決定や環境研究の進展に大きく寄与するものと見込まれる。

- ・ 本研究で収集した車軸藻類の分布情報は、今後、車軸藻類の生育に適した環境条件の解析を進めることにより、対象地域の環境情報と相互利用することにより、生態ニッチモデリング（環境情報から生物分布を説明するモデルを作成し、対象種の生育に適した環境条件の分布から、ある場所での対象種の分布確率を推定する方法）等に活用することが見込まれ、対象種がどのような地域に潜在的に分布し、どの地域に定着可能か等を推定可能になると見込まれる。
- ・ 本研究で構築した車軸藻類多様性研究の方法論は、将来のレッドリストの見直しにおいて、車軸藻類サンプルの種同定を支援することによって、絶滅危惧種のランク評価に直接貢献する。
- ・ 本研究で構築された、学名、形態、生態、生理的特徴、分子情報、文献、分布情報、環境情報等の車軸藻類の多様性情報基盤は、地球規模生物多様性情報機構（GBIF）、日本バーコードオブライフ・イニシアティブ（JBOLI）、Barcode of Life Data Systems (BOLD)、および世界分類学イニシアティブ（GTI）と情報を共有することにより、だれもが情報にアクセス可能になるため、環境政策を進める上で、様々な行政機関、自治体で活用されることが見込まれる。
- ・ 車軸藻類の接合子の凍結保存技術が確立されたことによって、車軸藻類の域外保全に活用されることが期待される。また、本技術は、車軸藻類を1.5mLチューブ程度のサイズで半永久的に保存できるため、低コスト、小スペースの域外保全が行える。また、得られた保存試料は、環境資料のタイムカプセル化事業、バイオリソースプロジェクト、里地里山の保全などに直接的に貢献できる。

6. 研究成果の主な発表状況

（１）主な誌上発表

<査読付き論文>

特に記載すべき事項はない

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

（２）主な口頭発表（学会等）

- 1) 柴田葵、加藤将、川井浩史、坂山英俊：第36回日本藻類学会（2012）
「車軸藻類 *Chara fibrosa* 群の分子系統学的解析」
- 2) 加藤将、川井浩史、坂山英俊：第36回日本藻類学会（2012）
「シャジクモの保全遺伝学に向けたSSRマーカーの新規開発」
- 3) 坂山英俊：第34回水草研究会（2012）
「日本産車軸藻類の分類と生育分布の現状」
- 4) 加藤将：第34回水草研究会（2012）
「最も絶滅が危機される車軸藻類ホシツリモの歴史と現在」

7. 研究者略歴

課題代表者：坂山 英俊

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻博士課程修了、博士（理学）、
現在神戸大学大学院理学研究科・講師

RFd-1102 絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発：車軸藻類を例に

(1) 絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発：車軸藻類を例に

神戸大学

大学院理学研究科 生物学専攻

坂山 英俊

平成23～24年度累計予算額：21,839千円

(うち、平成24年度予算額：9,706千円)

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

車軸藻類は淡水域の透明度維持の「かなめ」となる役割を果たしている。しかし近年、急速に車軸藻類の衰退が進行している。一方、車軸藻類の種同定の難しさが種の保全や淡水生態系保全に向けた政策や研究の進展の大きな妨げとなっている。また、車軸藻類の生息域は人間活動の影響を受けやすい環境であり、生息域外での保全技術開発は必要不可欠である。

本研究では、車軸藻類の信頼性の高い十分な種情報・遺伝子情報の収集・蓄積を行い車軸藻類の多様性情報基盤を構築するため、野外調査により車軸藻類を、合計 411 サンプル (*Chara*属 205 サンプル、*Lamprothamnium*属 3 サンプル、*Nitella*属 195 サンプル、*Nitellopsis*属 8 サンプル、総標本数 1300 点) 収集し、データベース化した。収集したサンプルからDNAバーコードを取得し、種レベルの同定支援システムを構築した。さらに、集団/個体レベルの識別を行うため、EST-SSR マーカーを新規に開発し、車軸藻類の集団/個体レベルの識別を行った。また、車軸藻類の域外保全に必要な凍結保存技術を新規に開発した。

本研究で確立した車軸藻類の多様性情報基盤とバイオリソースは淡水生態系保全の環境政策へ貢献することが期待される。

〔キーワード〕

生物多様性、分類、DNAバーコーディング、凍結保存、域外保全

1. はじめに

近年、多くの野生生物が環境破壊の結果、海洋・森林・淡水の各生態系から急速に失われている。その中でも特に、淡水生態系は最も多くの種が減少した生態系だといわれている。淡水生態系はおもに植物プランクトン、水生昆虫、淡水魚類、水生植物、車軸藻類などによって構成されている。特に車軸藻類は、淡水生態系中で「シャジクモ帯」を形成することによって底泥を覆い、淡水域の透明度維持の「かなめ」となる役割を果たしている。しかしながら、1960年代以降の淡水生態系破壊の結果、急速に車軸藻類の衰退が進行している。平成19年に公表された環境省版レッドリストによると、日本に産する車軸藻類約80種類のうち、4種類が絶滅、1種類が野生絶滅、52種類が絶滅危惧I類として掲載されている。近年、このように生態学的に極めて重要であるが絶滅の危機に瀕している車軸藻類の実体解明に向けた政策や研究が多く行われ始めている。しかし

ながら、車軸藻類の分類体系¹⁻³⁾は、複数の種を1種として誤ってまとめてしまうlumpingや、1つの種を複数の種に細分化するsplittingなどといった分類学的問題点が多く残されている⁴⁻⁶⁾。したがって、適切な保全単位を明らかにするために、過去に記録された種の分類学的位置づけを詳細な解析によって再検討する必要がある。また、このような分類学的混乱に起因する種同定の難しさが種の保全や淡水生態系保全に向けた政策や研究の進展の大きな妨げとなっている。したがって、信頼性の高い十分な種情報の収集・蓄積と活用によって高精度かつ迅速な種の識別を行い、保護管理のための意志決定を支援する車軸藻類の多様性情報基盤が必要である。

多様性情報データベース構築に向けた研究は、我が国では、日本における遺伝子データベース関連の活動拠点として「日本バーコードオブライフ・イニシアティブ(JBOLI)」が2009年に設立されたばかりである。国際的には、Barcode of Life Data Systems(BOLD)によって主に昆虫類を用いたデータベース整備が進行中である。しかしながら、これらのシステムはまだ実用化が始まったばかりであり、ユーザーの様々な要望に対応可能なシステムが利用可能となるまでにはあと数年は必要である。このような背景の中、本研究は、取得した車軸藻類の遺伝子塩基配列データおよび種情報を独自のデータベースとして管理するとともに、これらのシステムと情報を共有して実用化を推進する基礎研究として位置づけることができる。

一方、車軸藻類の生息域は防災、水利、漁業、稲作を目的とした湖沼、河川、ため池、水田が中心である。したがって、車軸藻類の保護のためだけに人間活動を制約することは非常に困難であり、生息域外での保全技術開発は必要不可欠である。

2. 研究開発目的

- ・本研究では、これまでに日本での生育が報告されたことのある絶滅危惧植物車軸藻類の分類学的問題を解決し、その証拠となるサンプルの形態、遺伝子（DNAバーコード）、分布・生態、証拠標本情報から成る種情報をデータベース化し、日本産車軸藻類の多様性情報基盤を構築する。
- ・車軸藻類の遺伝子配列情報に基づく種および集団レベルの同定・識別支援システムを構築する。そのために、種レベルの識別用に実績のある*rbcL*遺伝子をDNAバーコードに選定し、証拠標本からDNAバーコードを取得する。さらに、集団レベルの識別に有効な遺伝子領域を探索し、新たなDNAバーコードを開発する。
- ・将来的に車軸藻類のバイオリソース化およびより低コスト、小スペースの域外保全を実施するために、車軸藻類を域外で長期保存するための凍結保存技術における最適な凍結と解凍手順の確立を目指す。

3. 研究開発方法

1) 野外調査

過去の文献¹⁻²⁾および研究協力者から得た車軸藻類の生育分布情報に基づき、平成23年度は、愛知県（8月、3月）、群馬県（8月）、石川県（9月）、大分県（10月）、愛媛県（10月）、広島県（10月）、平成24年度は、兵庫県（6月）、滋賀県（7月）、高知県（8月）、愛媛県（8月、10月）、栃木県（8月）、群馬県（8月）、静岡県（8月）、島根県（9月）、鳥取県（9月）、石川県（10月）、沖縄県（3月）において野外採集調査を実施した（巻末資料、表（1）-6）。車軸藻類は淡水域の湖底に繁茂するので、岸またはボート上から錨型の採集器具を水中に投入して、底から引き上げ

るようにして採集した。また、日本各地にいる研究協力者から車軸藻類サンプルの提供を受けた。採集品はさく葉標本にするとともに、その一部は-80℃で凍結保存し、さらにシリカゲルまたは70%エタノールで固定して遺伝子解析に用いた。また、各採集地点での緯度経度 (GPS) 情報を記録し、車軸藻類の生育状態と生育地の状態をデジタルカメラにより画像情報として記録した。

2) 分類学的解析およびDNAバーコーディング

車軸藻類の分類体系¹⁻³⁾は、複数の種を1種として誤ってまとめてしまう *lumping* や、1つの種を複数の種に細分化する *splitting* などといった分類学的問題点が多く残されている⁴⁻¹⁰⁾。したがって、適切な保全単位を明らかにするために過去に記録されている種を詳細な形態学的解析と分子系統学的解析によって再検討する必要がある。本研究では、Sakayama et al. (2005)⁵⁾に準じて、種レベルの分類形質として重要な卵胞子の走査型電子顕微鏡 (SEM) による詳細な観察を実施した。また、種レベルの同定結果は、2009年に国際的に標準化されたDNAバーコード領域¹¹⁾の1つであり、これまでに最も多くの種類で調べられている葉緑体の *rbcL* 遺伝子の約600bpの塩基配列の比較に基づいて、形態に基づく種同定結果を確認した。一部のサンプルに関しては、必要に応じて、複数の葉緑体と核のDNA塩基配列 (*rbcL* 遺伝子、*matK* 遺伝子、*atpB-rbcL* 遺伝子間領域、ITS領域等) に基づく分子系統解析によって種同定を正確に行い、従来の分類体系と照らし合わせることで、分類学的問題の解決と種の保全単位の決定を試みた。

3) 分子マーカー/DNAバーコードの新規開発

DNAバーコード領域として *rbcL* 遺伝子と *matK* 遺伝子が国際的に標準化されているが¹¹⁾、*matK* 遺伝子については、車軸藻類に特異的なPCRプライマーが報告されていないため、本研究で車軸藻類に特異的なPCRプライマーのデザインを行った。

種レベルのDNAバーコードで識別ができない集団を識別するため、研究代表者がこれまでの研究で構築した独自のEST (網羅的な発現遺伝子のタグ配列) データベースから新規にEST-SSRマーカー (EST配列上に存在する単純反復配列) を開発し、集団間および集団中の個体間の遺伝的変異を検出可能なマーカーの探索を進めた。ESTデータベースは、車軸藻類の中で日本に最も多くの集団が分布するシャジクモ (*Chara braunii*) のものを用いた。EST-SSR領域の探索には、MISAプログラム (MicroSAteellite identification tool, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) を用いた。MISAプログラムによって抽出したEST-SSR領域をPCR増幅するために、PRIMER3プログラム

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) を用いてプライマーを設計した。抽出したEST-SSR領域がシャジクモ集団間で多型的かどうかを検証するため、Kato et al. (2008, 2011)^{12, 13)}によって系統が異なることが明らかになっている複数のシャジクモ集団を用いて、集団間のEST-SSR領域の比較を行った。EST-SSR領域の比較は、アガロースゲルを用いた電気泳動法で増幅を確認した後、Guichoux et al. (2011)¹⁴⁾等を参考にし、通常のPCR法および蛍光標識プライマーを用いたマルチプレックスPCR法により増幅反応を行いオートシーケンサーでアリルの決定を行った。

4) 車軸藻類の多様性情報データベース構築とデータの管理、公開手順

日本バーコードオブライフ・イニシアティブ (JBOLI) のデータベースシステム「Ruga」とデータを共有することを前提として、DNAバーコードを取得した標本に由来する、形態、遺伝子 (DNA

バーコード)、分布・生態、証拠標本情報から成る種情報を、Microsoft Excelを用いて「Ruga」と互換性のある形式でデータベース化した。データの一部は、日本バーコードオブライフ・イニシアティブの「JBOLI-DS」に登録した。この際、システムを管理している東京大学大学院総合文化研究科の伊藤元己教授から適宜助言をもらい作業を進めた。

5) 凍結保存技術の開発

車軸藻類卵胞子の最適な凍結保存法を検討するため、培養実験方法が確立されているシャジクモ (*Chara braunii*) をモデルに用いた。

・凍結手順

シャジクモ (*Chara braunii*) の単藻培養株より接合子を採取した。単藻培養株は、接合子を1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で5~10分間処理し、4週間の低温処理後、接合子を発芽させることによって作出した。

凍結保存法は、Day et al. (2008)¹⁵⁾および笠井ら (2009)¹⁶⁾の方法を基に条件検討を行った。凍害防御剤は多くの生物で実績のあるDMSO (ジメチルスルホキシド) を用いた。接合子については、乾燥に耐えられる壁を持つため、室温に24時間以上置くことで乾燥処理を行ったサンプルを凍結実験に用いた。サンプルはプログラムフリーザー (Kryo 320-1.7, Planer) を用いた2段階凍結法 (プログラムフリーザーで徐々に-40°Cまで温度を下げたあと、液体窒素で-196°Cまで急速凍結させる方法) により凍結させた。冷却速度は、毎分1°Cの速度で温度を低下させた。

・解凍手順

凍結サンプルを37°Cの恒温槽 (サーマルロボ TR-1, アズワン) 中で保温し、氷結晶が完全に無くなるまで融解した。解凍した接合子サンプルは、soil-water培地にまき、発芽率を計測した。

4. 結果及び考察

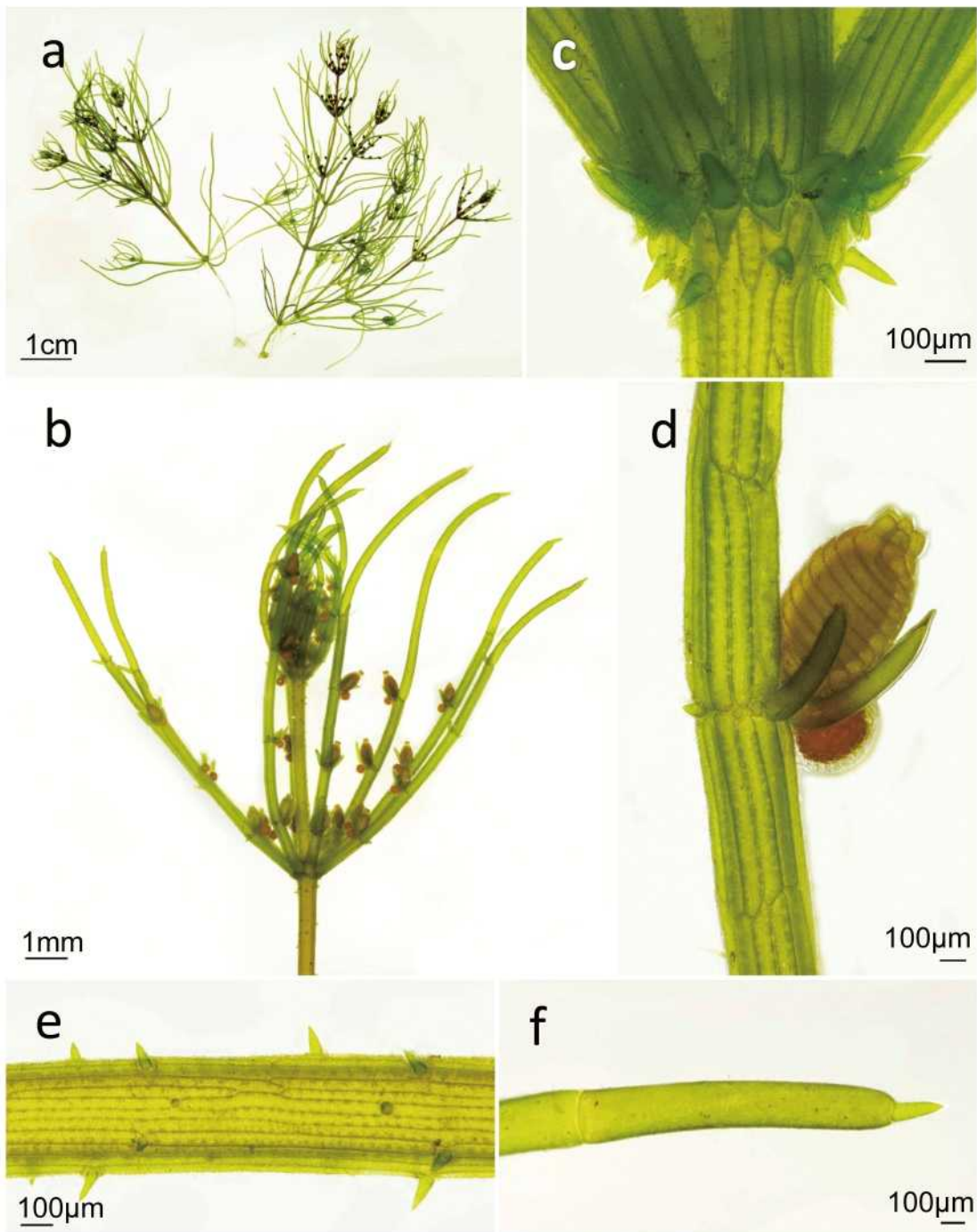
1) 野外調査

平成23年度から24年度に渡り、野外採集調査および提供を受けた車軸藻類を、合計 411 サンプル (*Chara*属 205 サンプル、*Lamprothamnium*属 3 サンプル、*Nitella*属 195 サンプル、*Nitellopsis*属 8 サンプル、総標本数 1300 点) 収集した (巻末資料、表 (1) -6)。そのうち、沖縄県本島で採集した*Nitella tumulosa* (日本新産)、沖縄県石垣島で採集した*Nitella* sp. 1 (日本新産または新種)、愛媛県で採集した*Chara australis* (オーストラリアシャジクモ)、*Nitella* sp. 2 (日本新産または新種)、愛知県の休耕田で採集した*Nitella imahorii* (フラスコモダマシ) はこれまでに遺伝子塩基配列が調べられていない種類であった。また、千葉県で採集された*Chara* sp.1、および神奈川県から採集された*Chara* sp. 2 は新種である可能性が示された。他にも*rbcL*遺伝子塩基配列を用いたDNAバーコーディングにより検出した新規系統 (*Nitella* sp. 3~9)を検出した (巻末資料、表 (1) -6)。また、徳島県出羽島の集団が国定天然記念物に指定されている絶滅危惧I類の*Lamprothamnium succinctum* (シラタマモ) の新産地を3地点発見した。さらに、過去の種同定結果や形態情報などが不十分であり、実体が良く理解されていなかった琵琶湖産の*Nitellopsis obtusa* (ホシツリモ) および奥日光産の*Nitella flexilis* var. *bifurcata* (チュウゼンジフラスコモ) を再調査し、詳細な形態観察とDNAバーコーディングを実施した (後述)。

2) 分類学的解析

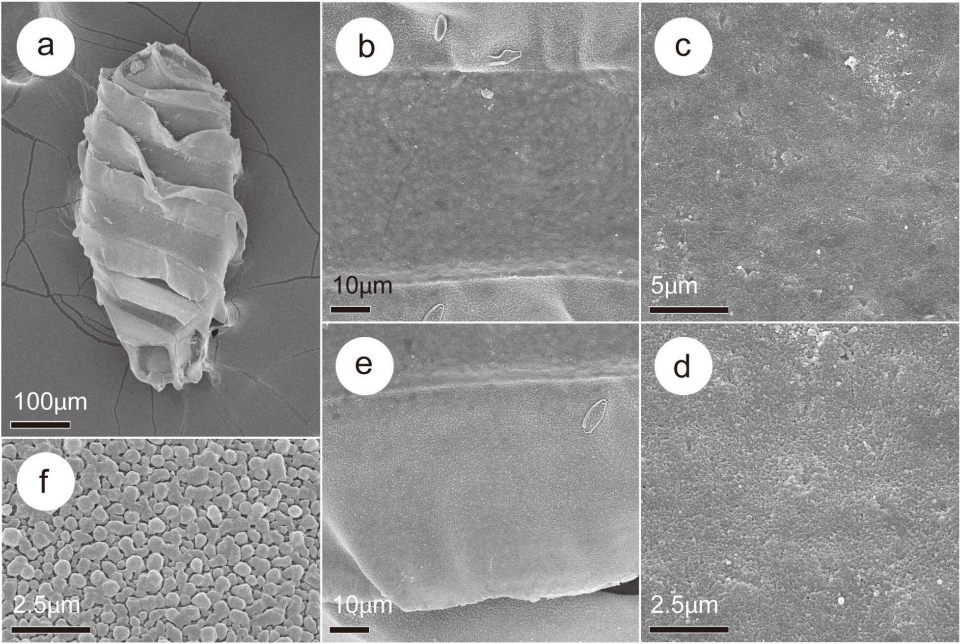
車軸藻類シャジクモ (*Chara*) 属は、南極大陸を除く世界中の淡水・汽水域に生育し、約200分類群が報告されている。シャジクモ属は輪生枝の皮層細胞、托葉冠 (輪生枝の基部から生じるトゲ状の細胞)、主軸の皮層細胞と棘細胞、生殖器官および卵胞子等の特徴によって分類されている。本研究により千葉県および神奈川県からシャジクモ属未記載種 (*C. sp.* 1および*C. sp.* 2) と考えられる材料を収集した。

千葉県から見つかった未記載種は部分的に皮層細胞を欠く輪生枝、良く伸長した上下2段の托葉冠、3列性の皮層細胞と良く伸長した棘細胞を持つ主軸を持つことから、*Chara globularis* (カタシャジクモ) の近縁種と考えられた (図 (1) -1, 2)。しかし、分子系統解析の結果、本未記載種は*C. globularis*およびその近縁種とは系統的に分離しており、*C. vulgaris* (クサシャジクモ) およびその近縁種に近縁であった (図 (1) -3)。本未記載種は、以前に長野県から採集された絶滅危惧種*C. vulgaris* var. *nitelloides* (レイセンジシャジクモ) と同一の*rbcL*遺伝子塩基配列を持っていた。したがって、本未記載種と*C. vulgaris* var. *nitelloides*と同定されていた長野県のサンプルおよびその近縁種の詳細な外部形態比較を行った (表 (1) -1)。その結果、本未記載種は、以前に*C. vulgaris* var. *nitelloides*と同定されていた長野県産のサンプルと同一種であり、本未記載種と長野県産のサンプルは「*C. vulgaris* var. *nitelloides*」と形態的に異なることが判明した (表 (1) -1)。したがって、長野県産のサンプルが「*C. vulgaris* var. *nitelloides*」と分類されていることは誤同定と考えられ、本未記載種と長野県産のサンプルは、新種として記載するのが妥当と考えられた。



図（１）-1. 未記載種（*C. sp. 1*）の栄養形態.

a, 葉状体の全体像；b, 葉状体先端部の拡大；c, トゲ状の托葉冠；d, 生殖器官（上が生卵器、下が造精器）；e, 主軸の皮層細胞（３列性）；f, 輪生枝の終端細胞.

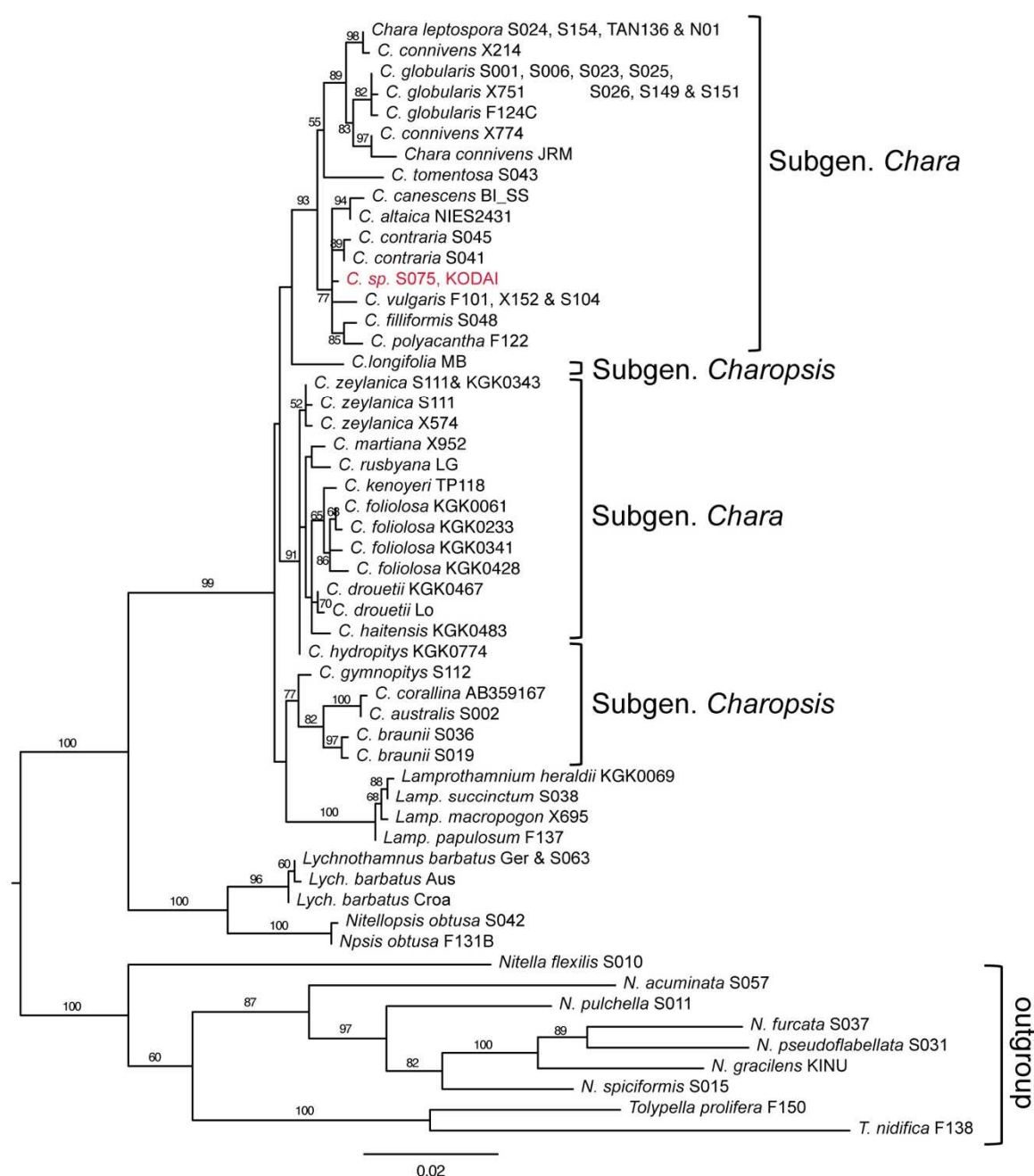


図（１）-2. 未記載種（*C. sp.1*）の卵胞子形態（SEM）．
a, 卵胞子の全体像；b-d, 卵胞子壁．表面は微細な孔が散在する平滑な構造；e, らせん縁から生じるリボン状構造；f, リボン状構造の表面構造．

表（１）-1. 未記載種（*C. sp.1*）とその近縁種との形態比較

学名	主軸の皮層	棘細胞の長さ	托葉冠	輪生枝の皮層	生殖器官の形成様式	卵胞子の長さ	卵胞子のリボン状構造	卵胞子壁構造
<i>C. vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i>	規則的、2列性	～120µm	よく発達する	あり	同節性	～675µm	欠くまたは退化的	顆粒状または乳頭状
<i>C. vulgaris</i> var. <i>inconnexa</i> (T.F.Allen) R.D.Wood	不規則、1-2列性	退化的	～130µm	不完全、まれにすべてを欠く	同節性	～600µm	欠くまたは退化的	平滑または顆粒状
<i>C. vulgaris</i> var. <i>nitelloides</i> (A. Braun) R.D.Wood	不規則、2-3列性	～120µm	～135µm	不完全、まれにすべてを欠く	同節性	～570µm	欠くまたは退化的	平滑または顆粒状
<i>C. brevibracteata</i> Han, Fu et Zhao	規則的、3列性	～60µm	～235µm	不完全、まれにすべてを欠く	異節性	² -	² -	² -
<i>C. sp. 1</i>	規則的、3列性	～135µm	～200µm	不完全、まれにすべてを欠く	同節性	～580µm	よく発達する	微細な孔が散在

¹Cáceres (1978)¹⁷⁾によるSEM観察結果に基づく；2タイプ標本が卵胞子を欠く



図（１）-3. *Chara*属の*rbcL*遺伝子塩基配列（1194bp）に基づく分子系統樹.

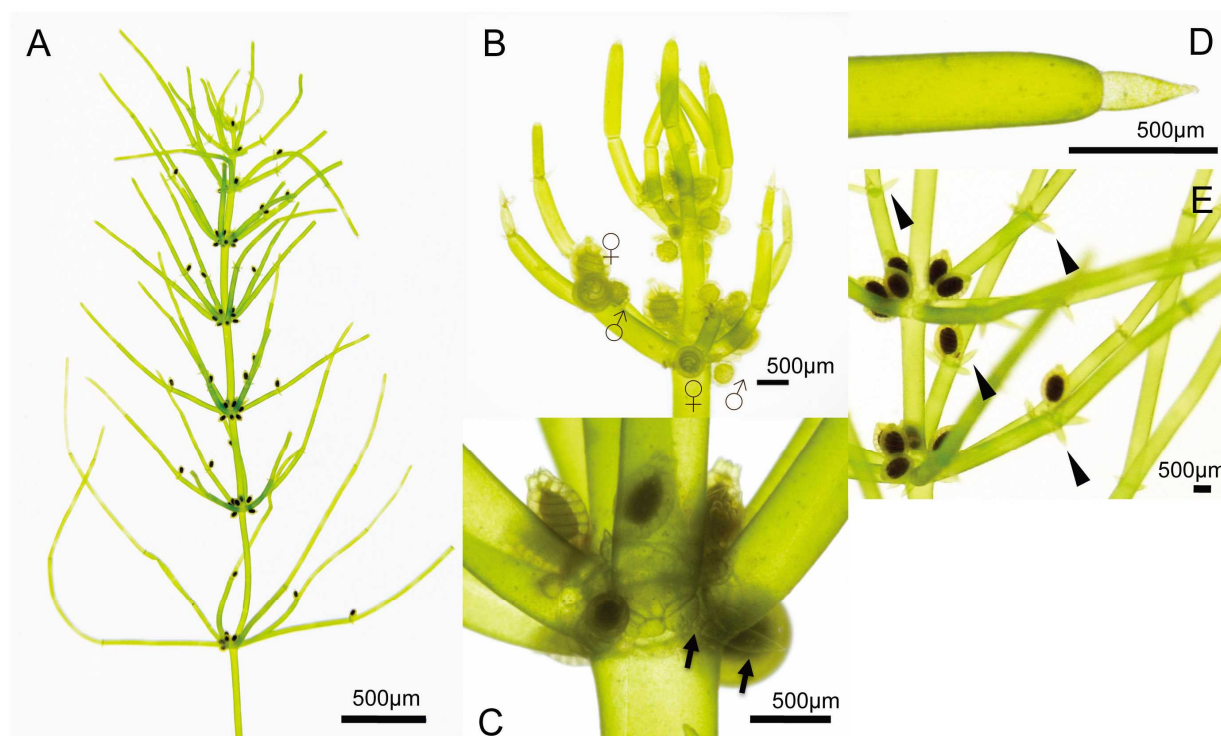
PhyML（GTRモデル）により最尤系統樹を構築し、枝にブーツ・ストラップ値（1000回試行）を示した.

さらに本研究により神奈川県から発見されたサンプルは、輪生枝と主軸の皮層細胞を欠き、托葉冠が１段であり、雌雄同株であることから、*C. corallina*（オオシャジクモ）と考えられた（図（１）-4）。*C. corallina*は、生殖器形成位置に加えて苞細胞（輪生枝節部に形成される細胞片）が退化的（～500 μm）であることが特徴として知られている。しかしながら、神奈川県産のサンプル

には顕著な苞細胞（500~1000 μm ）が見られた（図（1）-4E）。さらに、通常は輪生枝と交互に一つずつ形成される托葉冠（輪生枝基部に形成される細胞片）が不完全であることが確認された（図（1）-4C）。これらの形質はこれまでのいずれの報告とも一致しないものであった。

本種は雌雄同株の種であり、一方で雌雄異株のものは近縁な別種 *C. australis*（オーストラリアシヤジクモ）として広く認められているが¹⁸⁻²⁰⁾、これらを同一の種内分類群として扱う見解もある³⁾。しかし、これまでに分子系統解析による分類学的調査はなされていない。そこで本研究では、神奈川県産の *C. corallina* サンプルの分類学的位置づけを明らかにするために、日本産の *C. corallina* 計10サンプルと、その近縁種の *C. australis* 計2サンプルを用いて、詳細な形態比較と分子系統解析 (*rbcL* 遺伝子: 1194 bp, 18S-rRNA 遺伝子: 1566 bp, ITS 領域: 747 bp) を実施した（図（1）-5）。

その結果、*C. corallina*（雌雄同株）または *C. australis*（雌雄異株）は高い信頼性でそれぞれが単系統群を構築し、両種における雌雄同株／異株性の分類形質としての妥当性が支持された。*C. corallina* の系統内において、今回発見された神奈川県産の系統とその他の系統群は、高い信頼性で支持される姉妹群を構築した。したがって形態観察・系統解析の両結果から、神奈川県産の系統は新規分類群（種または種以下）として扱うことが妥当であると考えられた。



図（1）-4. *C. corallina* 新規系統の栄養形態。A. 全体像、輪生枝節部と基部に成熟した卵胞子が形成されている；B. 藻体頂端部、♀は雌性生殖器、♂は雄性生殖器；C. 輪生枝基部、矢印は不完全な托葉冠；D. 輪生枝末端細胞；E. 顕著な苞細胞（矢尻）。

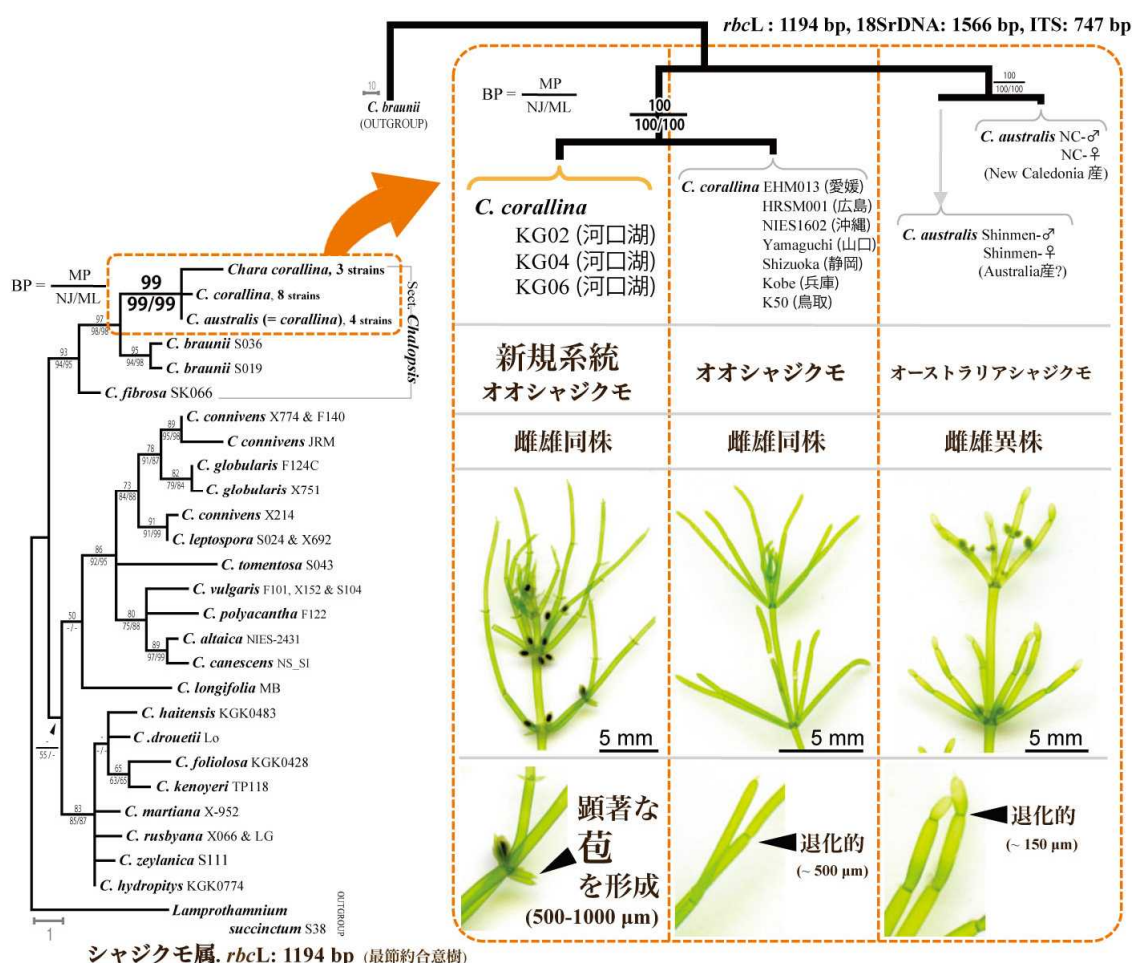
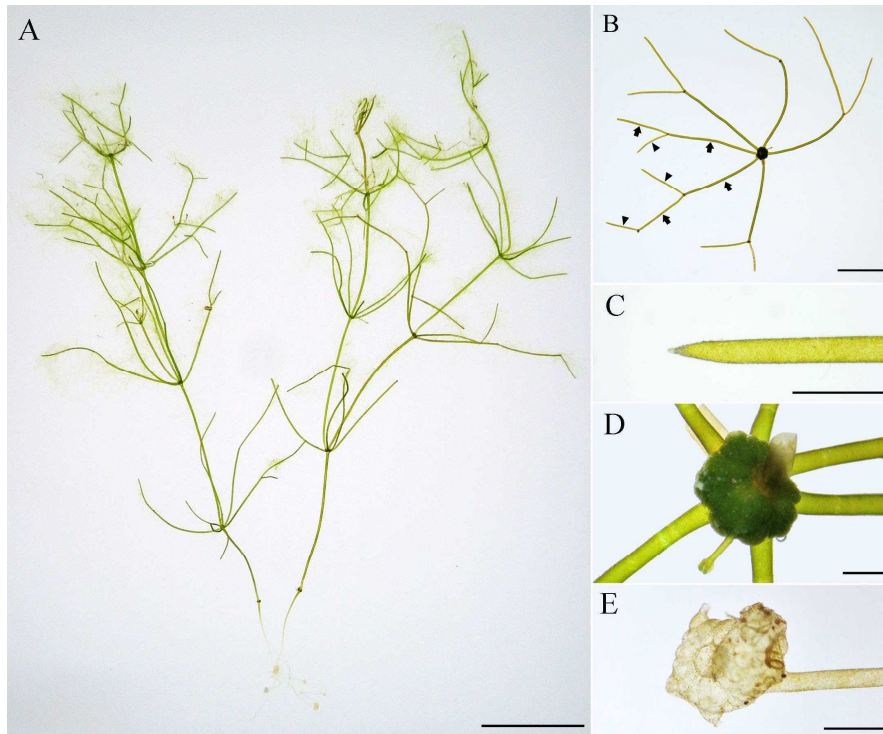


図 (1) -5. *C. corallina* 新規系統の分子系統解析結果と形態的特徴の対応関係。

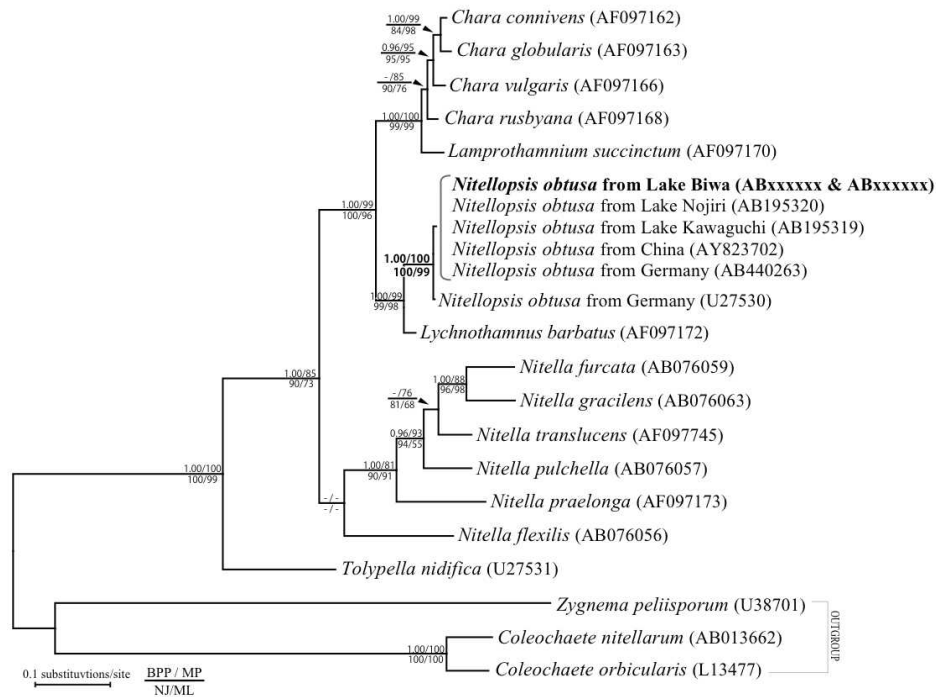
また、本研究により、分布が希なホシツリモ (*Nitellopsis obtusa*)の新産地を発見した。日本におけるホシツリモは、4つの湖沼のみ(野尻湖、河口湖、芦ノ湖、山中湖)に分布が報告されていた希少種であり、現在では河口湖でしか野生集団は見られない。ソウギョの放流等の影響により絶滅した野尻湖では、野尻湖産の培養株が室内で保存され、野生集団復活に向けた保全活動が地域レベルで行われている。昨年度、琵琶湖において沈水植物の植生調査を行ったところ、北湖西岸水深2m付近の沈水植物帯からホシツリモと思われる未成熟藻体の細胞断片が発見された。本研究で琵琶湖において再調査を実施し、高島沖に小規模のホシツリモ集団が存在することを確認した。今回採集した藻体はホシツリモの識別に最も重要な星状体(無性生殖器官)を欠いていたが、本種に特徴的な肥大した節部と長大な苞細胞が確認でき、その他の形質も基本的にホシツリモの原記載と一致した(図(1)-6)。また、琵琶湖産藻体の*rbcL*遺伝子塩基配列(DNAバーコード領域)は既知のホシツリモの配列と完全に一致し、本藻体がホシツリモであることにより確かな確証を得た(図(1)-7)。さらに、より進化速度が速いDNA領域の*atpB-rbcL*遺伝子間領域の塩基配列を既報のホシツリモの配列と比較した結果、琵琶湖産ホシツリモは既報のホシツリモと識別することができた(図(1)-8)。このことは、琵琶湖産ホシツリモは、他の日本産ホシツリモとは独立に日本に定着した可能性が示唆された。



図（１）-6. 琵琶湖産ホシツリモの栄養形態.

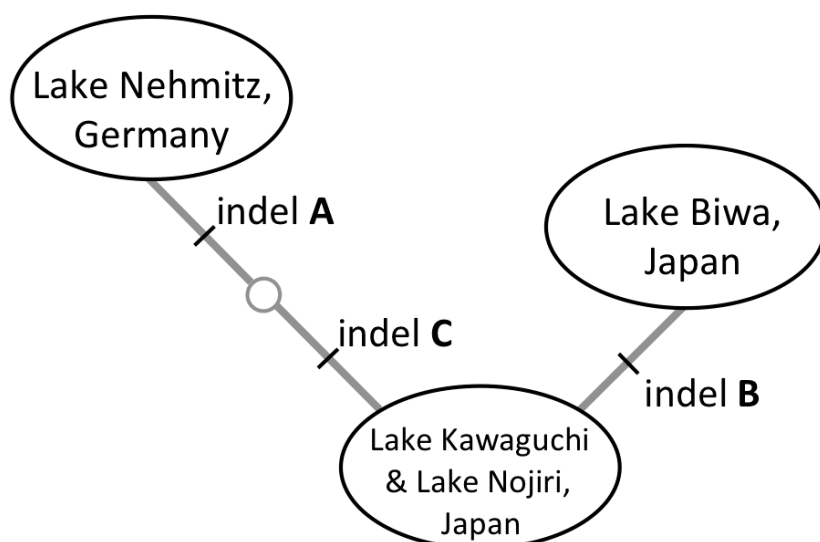
A, 葉状体の全体像；B, 主軸および輪生枝；C, 最終枝先端部分；D, 肥厚した節部；E, 栄養性欲器官.

矢印は輪生枝の主軸、矢尻は苞細胞を示す.



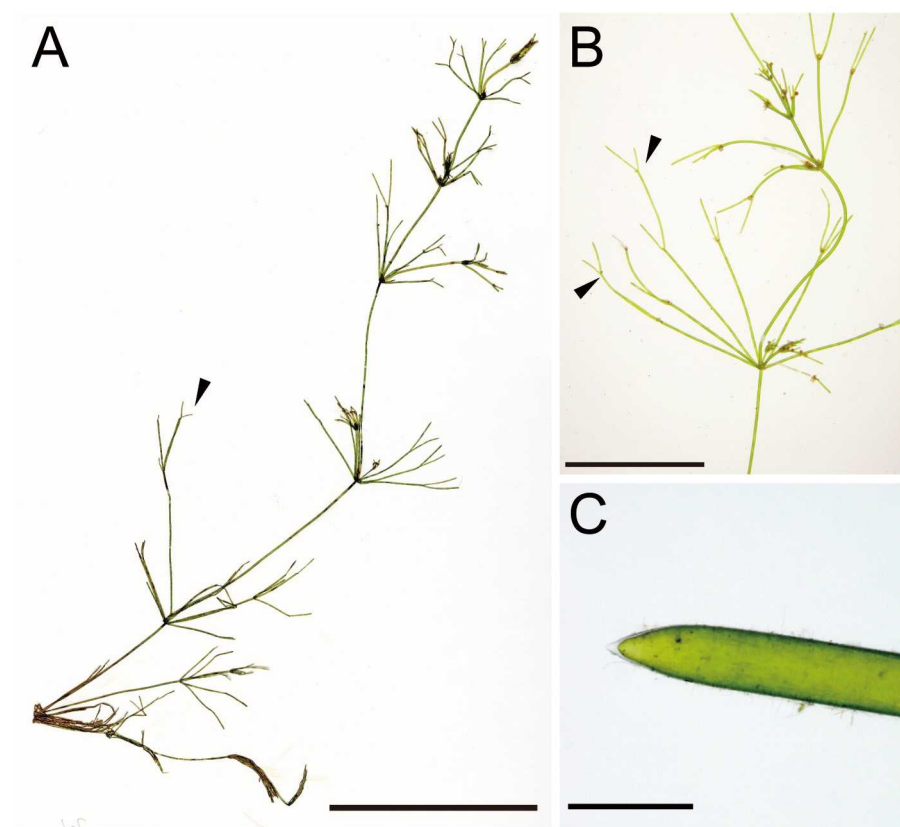
図（１）-7. *rbcL*遺伝子塩基配列（1194bp）に基づく分子系統樹.

枝に事後確率/ブーツ・ストラップ値（1000回試行）を示した（左上段：ベイズ法、右上段：最節約法、左下段：近隣結合法、右下段：最尤法）。



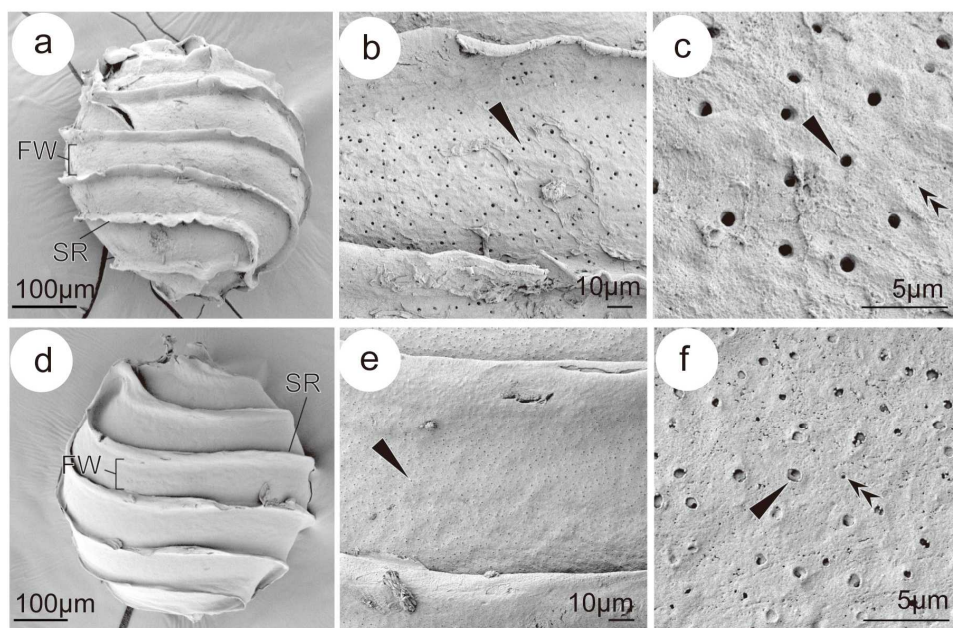
図（１）-8. *atpB-rbcL*遺伝子間領域の塩基配列に基づくハプロタイプネットワーク樹。枝にインデルを示した。

また、本研究により絶滅種とされていたチュウゼンジフラスコモ (*Nitella flexilis* var. *bifurcata*) を再発見した。チュウゼンジフラスコモは平成19年に環境省により公表されたレッドリストには、絶滅種として掲載されていた。しかし、その後、奥日光にある湯ノ湖および菅沼から、形態的にチュウゼンジフラスコモと考えられる藻体が採集されたことから、平成24年に環境省により公表された最新のレッドリストには、絶滅危惧I種としてランク変更がなされた。しかし、過去の種同定結果や形態情報などが不十分であり、奥日光産のサンプルの実体が良く理解されていなかった。本研究では、湯ノ湖および菅沼における再調査を実施し、チュウゼンジフラスコモの成熟個体を採集した。本藻体は輪生枝が1～2回分枝し、典型的なチュウゼンジフラスコモの特徴を持っていた（図（１）-9）。さらにチュウゼンジフラスコモの卵胞子形態を初めて走査型電子顕微鏡を用いて詳細に観察した（図（１）-10）。その結果、チュウゼンジフラスコモの卵胞子形態は、近縁なヒメフラスコモと類似するが、卵胞子壁表面構造によって区別できることが明らかになった（図（１）-10）。また、過去の標本および本研究で得たチュウゼンジフラスコモとヒメフラスコモの標本の*atpB-rbcL*遺伝子間領域の塩基配列に基づくDNAバーコーディングを実施した結果、チュウゼンジフラスコモは遺伝的に分化した系統群であることが示唆された（図（１）-11）。



図（１）-9. 菅沼産チュウゼンジフラスコモの栄養形態.

A, 葉状体の全体像（スケールバーは5cm）；B, 葉状体先端部の拡大（スケールバーは5cm）；C, 最終枝先端部分（スケールバーは2mm）．矢尻は分枝部分を示す．



図（１）-10. チュウゼンジフラスコモおよびヒメフラスコモの卵胞子形態（SEM）．

(1) -13)。したがって、*matK*遺伝子領域と*rbcL*遺伝子領域を組み合わせたDNAバーコーディングによる車軸藻類の種同定支援システムを確立することができた。

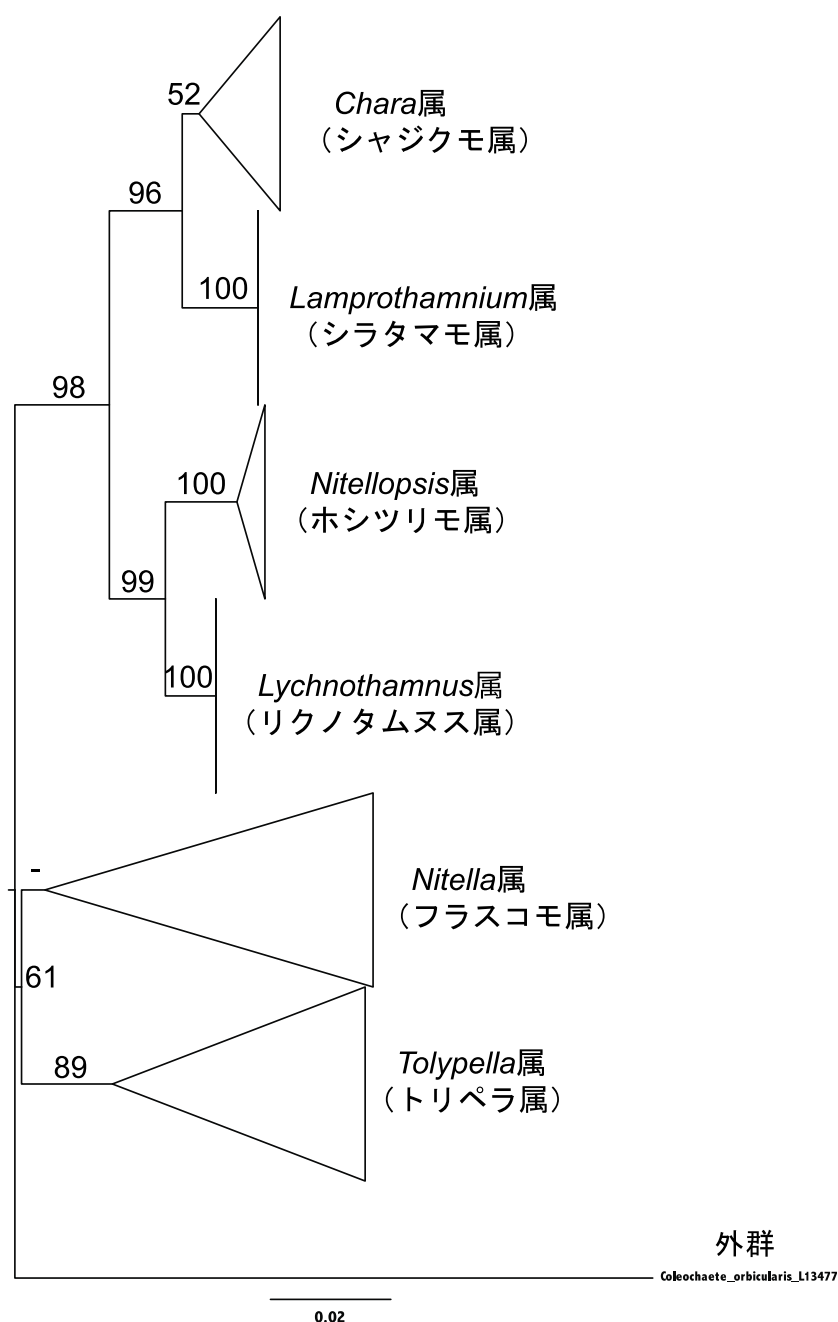
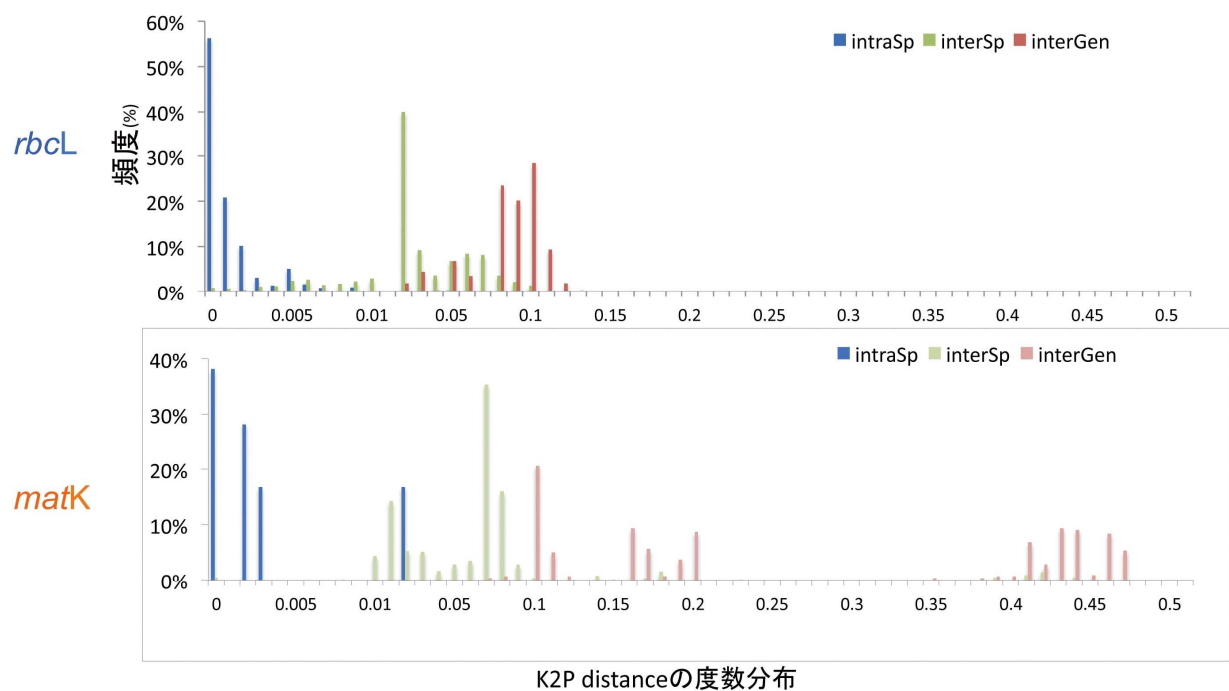


図 (1) -12. 車軸藻類の*rbcL*遺伝子塩基配列 (548塩基対) を用いた分子系統樹 (近隣結合法) . 枝に示した数字は統計的信頼度 (ブーツ・ストラップ確立) を示している. 枝の長さはスケールバーで示された塩基置換率に比例する.



図（１）-13. 車軸藻類内での種内、種間、属間における*rbcL*遺伝子と*matK*遺伝子領域の多様度の比較.

一方、*C. braunii*（シャジクモ）のESTデータ（合計3,285 contig）から2塩基モチーフおよび3塩基モチーフのEST-SSRの抽出を実施し、合計248のEST-SSR領域を抽出し、これらのEST-SSR領域のうち、56領域についてPCR増幅用のプライマーを設計し、系統が大きく異なる*C. braunii* 8サンプルを用いて多型の有無を調査し、2塩基モチーフについては8領域、3塩基モチーフについては20領域において多型を観察した。さらに 248領域中71 領域についてPCR増幅用のプライマーを設計し、スクリーニングを完了させた（表（１）-2）。系統が異なる8株を用いて、72遺伝子座の有用性を調査した結果、32遺伝子座が安定的にPCR増幅とアレル決定が可能であった（平均アレル数 4.0個）（表（１）-3）。集団内レベル（河口湖集団16個体）で、この13遺伝子座の多型性を確認した結果、10遺伝子座で多型性を示した（平均アレル数 3.6個）（表（１）-4）。これらの結果は、本研究で開発したEST-SSRマーカーは集団/個体レベルの識別に利用可能なレベルであることを示している。

表（１）-2. 本研究で作成したEST-SSR領域のPCR増幅用プライマー.

Priemr set	contig in EST data	Forward Primer	Reverse primer
Di001	CharaCL1Contig183	M13-GCGACGTAGTGTGTGCATTT	GAGGAAGCCTTTCACGATTG
Di002	CharaCL824Contig1	M13-TGTTTAGCTATCGGCAGCCT	CAACGAGCTCCTTCACCTTC
Di003	CharaCL188Contig1	M13-TGTGTCTTCCCTTGCTCTT	CGAAATGGAGAGAGAGAGCG
Di004	CharaCL917Contig1	M13-TCTTCTTCTCCCTGTCCCCT	CGAATGCGCACAAAGAGATAA
Di005	CharaCL796Contig2	M13-CTTCTTCTACAGCCATCGCC	CAGAATACGCTCCTTCCACC
Di006	CharaCL1Contig14	M13-TTTGGAGGCGAAACTTATGG	CCTCGAAATCTTCTCCATCC
Di007	CharaCL428Contig4	M13-GCAAGTGGACGAGAGGAGAG	GTTAAGCCGAGCCACTTCTG
Di008	CharaCL700Contig1	M13-GCAAGTGGACGAGAGGAGAG	GTTAAGCCGAGCCACTTCTG

Di009	CharaCL377Contig1	M13-AATGTGAAAGGTCCAGTCCG	CCCAACTCTTCATCCGTCC
Di010	CharaCL1Contig327	M13-CACAAGGCAACACATCGTCT	CGACAACGAGTGGGGTTACT
Di011	CharaCL804Contig1	M13-TTCCAAAGGCAAGCAATACC	ATGCCCATGAGTGTTCCTCC
Di012	CharaCL1612Contig1	M13-ACTTTGAGAAATGGCGATGG	TCGTTCTTCCTCAACATCC
Di013	CharaCL2177Contig1	M13-ATGACTGCTCGATAATGCCC	GTAGCCGCTCTTCCGTAGTG
Di014	CharaCL1568Contig1	M13-ATCAACTCCTCGAATGTGGC	GGGGCAATTTTCAGCTTACTG
Di015	CharaCL1Contig19	M13-AAGTAGACGGCCGTAGCAAA	GAATTCAACTGCAACGCTGA
Di016	CharaCL1036Contig1	M13-CTCTGAAGGTCAAACGGAGC	TGTTGTAGGCACTCCAGACG
Di017	CharaCL1Contig72	M13-ACGTGTATTCCAAGCCCAAG	GGGTAGACGGAGAGGGAGAC
Di018	CharaCL1680Contig1	M13-GAGAAAACGCTTGTGCTTCC	ATTACAGATCGGGACGGGTT
Di019	CharaCL1Contig370	M13-TCTTTCCAAACCACTCCACC	CTCTGGAGAACCTCGCAAAAC
Di020	CharaCL141Contig8	M13-GCCACGAAAAGTATACTCGGC	GGGAAAGGGGAAACATGACT
Di021	CharaCL1Contig207	M13-GCTACCTGGTCGAGCTTTTG	TTCCATCCACTTCACCCCTTC
Di022	CharaCL1Contig354	M13-GAGGAAGCCTTTCACGATTG	GCGACGTAGTGTGTGCATTT
Di023	CharaCL1073Contig1	M13-TTCGTGCAAGTCTCTTCGTG	TTTACAATTGCGCAAAGCAG
Di024	CharaCL1474Contig1	M13-ACCTTGTAGTGCCTCCCT	TTGGATGTCAGTGCCTTCGTC
Di025	CharaCL1Contig203	M13-GGGTAGACGGAGAGGGAGAC	ACGTGTATTCCAAGCCCAAG
Di026	CharaCL1Contig392	M13-CCAGTCCGACGACAGGTAAT	GCACAAGCCATAGACGATTG
Di027	CharaCL2386Contig1	M13-AACTTCAGAACCCAGGAGCA	GAGGTGTAGCTCGCGTTCTT
Di028	CharaCL62Contig2	M13-AAAAGATTGGTTGGTTGGGG	TTCTGTGCAACTCCTTGGTG
Di029	CharaCL1090Contig1	M13-TCACTGTTCTCTATCAGGCAA	GCTTTCTCTGTCAGGGGTTG
Di030	CharaCL1762Contig1	GA	CTCTTCCCCTGTCTTCTTTG
Di031	CharaCL164Contig1	M13-GACCAATCTGCTGCTCACAA	ACCAAGTCGGTGAAGGTGTC
Di032	CharaCL15Contig8	M13-AGTAAGCGCGTAGCGAACAT	AGTGCCATTCTAGTGCCTTCT
Di033	CharaCL969Contig1	M13-ACTCCCCCTGTTTCAAGACCT	CTATGCTGGATAACTGGGGC
Di034	CharaCL188Contig2	M13-ACCTTGCCTAAACTGGCCCT	TTTCTGTGCTTCCCCTTGC
Di035	CharaCL112Contig3	M13-CGAATGGAAGAGAGCGAG	GGCCTACTGGAAGCAGCTCAC
Di036	CharaCL486Contig4	M13-AGAGAGCAGCAGAGAGGCAC	TAGTGGTAGCTCTCGGCCT
Tri001	CharaCL593Contig1	M13-CTGAGAAAGTCAAGTGGGAG	CATTACCTGCAGCAAAAGCA
Tri002	CharaCL1Contig375	M13-TTGTGGAACAGGTGAGGTGA	TGTGAAGGCTGCATTGTACC
Tri003	CharaCL1Contig56	M13-ACTGCCGCTTCATCTTGCT	TTCTTTCCAGCATGAAGAC
Tri004	CharaCL1633Contig1	M13-GTGAGGGCGTACTTGTGGT	TGAGATCCTTAGCTCCGCTT
Tri005	CharaCL1Contig128	M13-GCTTACTCTTCAGGAGACGG	TGTGAAGGCTGCATTGTACC
Tri006	CharaCL1Contig341	M13-ACTGCCGCTTCATCTTGCT	TGTGAAGGCTGCATTGTACC
Tri007	CharaCL2113Contig1	M13-ACTGCCGCTTCATCTTGCT	ACCTACCACCTGCCAATCAG
Tri008	CharaCL2245Contig1	M13-TTGCGGGAAGTACCAATCAT	CTTTGCGTGATGATGATGCT
Tri009	CharaCL534Contig1	M13-GTCCTATGCACCACCTTCGT	GTTCCAATTGCTTCAGGCAGC
Tri010	CharaCL1784Contig1	M13-TTTGACAAAGACGCTTGTC	AAGAGAGGGAGTTTCTCGGC
Tri011	CharaCL25Contig1	M13-CCGTCCCAATAGCACATCTT	ATCTACAGTCGAGCGGCACT
Tri012	CharaCL1268Contig1	M13-CTGCGTCTCCTTGAAAAAG	GTTGGTTGGTTTCGCTTGATT
Tri013	CharaCL2170Contig1	M13-TTTGACAAAGACGCTTGTC	TAAGCATCAGCAGCATAGTG
Tri014	CharaCL91Contig1	M13-CACGCCATAGCACAACTAA	AAAGCAAAGCAGAACTGGC
Tri015	CharaCL1Contig104	M13-TGTGAAGGCTGCATTGTACC	ACTGCCGCTTCATCTTGCT
Tri016	CharaCL1744Contig1	M13-GCTGCTTACATGTTGCCTGA	CTGCTGCAGTGTCCACGTAT
Tri017	CharaCL1049Contig1	M13-CCAAATGCTGAGCCATCTCT	TGGTATCTTGCTTCGCTCTT
Tri018	CharaCL406Contig1	M13-TCATCTTTGCCCTCTCCGAGT	TCACTCGATCAGTCGACCAG
Tri019	CharaCL276Contig4	M13-CAGCAATATCTATTTGGTAATT	GGCCGATATGTTCAGGAGAA
Tri020	CharaCL1208Contig1	GTTGT	CATCTGTCCTTTCCTCCAA
Tri021	CharaCL432Contig1	M13-GCTTCCAGCATCATCGAACT	CATCATTCGTTTCGCTGATTG
Tri022	CharaCL1061Contig1	M13-ATAATTCTTCGACGGCCAG	CCCTTTTCTCTCCCTTCC
Tri023	CharaCL2194Contig1	M13-GCAGCGACAGACAGCAGTAG	GTTTCTGGCAGAGGACGAAG
Tri024	CharaCL22Contig3	M13-TCGGATATGGTAGGAGCAGC	ATATGCCCTTGGCAGAAATG
Tri025	CharaCL61Contig1	M13-TGGAACCAAGGAAAGGATTG	TGCTGACAGGACTAGATG
Tri026	CharaCL2380Contig1	M13-TCGTTGTGCTCCTCTCACAC	CTGCCGACTCCTCGTCTATC
Tri027	CharaCL2139Contig1	M13-ATTTTTGCAATCGAAGGTCTG	GCTGGAGTTATCTGGCTTGC
Tri028	CharaCL683Contig1	M13-GTGCTTTGAAAAGACCGGAG	GCCATGGTCTTGGAGGATAA
Tri029	CharaCL71Contig1	M13-TAGACCAATCGAAAAACGGC	TGAAGAATCGGTGGCAGTAA
Tri030	CharaCL2308Contig1	M13-AAGTCGGCAGTCCTTTCTGA	TTGTAATCAAAGCCTTGGGC
Tri031	CharaCL2017Contig1	M13-ATGCAGCCAAAATAAGGGTG	GAGAGGAAAGACGATGAGCG
Tri032	CharaCL2362Contig1	M13-AAAGTCGTCTCCACCCCTCTT	GAAAGGTGTCTTCTGCGG
Tri033	CharaCL295Contig2	M13-CTGTGTGACATCAACGGGTC	CCATGAATTGCAAGAACGAA
Tri034	CharaCL1350Contig1	M13-CTCTCTCCAGTGAGCTTCCG	ACAGTCCAATGGAATCCTGC
Tri035	CharaCL1Contig322	M13-CCTCTTCCTCTCTCCAAG	TAAGGAAAGAGGACAACCGC
Tri036	CharaCL1Contig73	M13-GGCAGTTCTCACACGACAGA	AGGGCAAACTCATCTCCT

表（１）-3. 系統が異なる8株（異なる地域集団）を用いてスクリーニングしたSSRマーカーと多型性.

2塩基モチーフのSSR (12遺伝子座)				3塩基モチーフのSSR (20遺伝子座)			
Locus	Repeat motif	Allele size range (bp)	<i>Na</i>	Locus	Repeat motif	Allele size range (bp)	<i>Na</i>
Di002	(GA)n	194-216	3	Tri002	(TCT)n	155-176	5
Di003	(CT)n	260-278	3	Tri003	(GAG)n	199-211	2
Di011	(TC)n	294-298	3	Tri004	(TGC)n	270-297	5
Di015	(CT)n	204-224	3	Tri006	(TCT)n	155-188	6
Di017	(CT)n	265-342	5	Tri007	(GAG)n	199-211	4
Di021	(AG)n	187-269	7	Tri008	(TCA)n	209-218	3
Di022	(TC)n	250-380	8	Tri009	(AGG)n	261-270	4
Di023	(CT)n	203-217	4	Tri010	(CTC)n	266-272	2
Di027	(TC)n	267-340	4	Tri012	(GGA)n	289-298	4
Di029	(GA)n	171-197	3	Tri013	(GAG)n	262-271	2
Di031	(GA)n	161-171	5	Tri014	(TCT)n	143-156	5
Di033	(CA)n	268-284	5	Tri015	(AAG)n	146-166	5
mean			4.42	Tri016	(CTT)n	188-217	5
SD			1.68	Tri017	(GAA)n	193-198	2
<i>Na</i> : number of observed allele (観測アリル数; 個)				Tri018	(AGA)n	259-264	3
系統が異なる8株を用いて、72遺伝子座の有用性を調査した結果、32遺伝子座が安定的にPCR増幅とアリル決定が可能であった(平均アリル数 4.0個)				Tri020	(GAA)n	290-300	4
				Tri027	(ATG)n	203-219	4
				Tri031	(CTT)n	219-235	4
				Tri033	(TCA)n	250-259	4
				Tri036	(AGG)n	285-288	2
				mean			3.75
				SD			1.25

表（１）-4. 河口湖集団16個体を用いた13遺伝子座の多型性.

Locus	Repeat motif	Allele size range (bp)	<i>Na</i>
Di002	(GA)n	194-216	8
Di003	(CT)n	260-278	5
Di011	(TC)n	294-298	2
Di015	(CT)n	204-224	5
Tri002	(TCT)n	155-176	6
Tri003	(GAG)n	199-211	1
Tri004	(TGC)n	270-297	1
Tri006	(TCT)n	155-188	6
Tri007	(GAG)n	199-211	3
Tri008	(TCA)n	209-218	2
Tri009	(AGG)n	261-270	1
Tri010	(CTC)n	266-272	2
Tri012	(GGA)n	289-298	3
mean			3.46
SD			2.30

集団内レベル(河口湖集団16個体)で、この13遺伝子座の多型性を確認した結果、10遺伝子座で多型性を示した(平均アリル数 3.6個)。

集団/個体レベルの識別に利用可能なレベル

4) 車軸藻類の多様性情報データベース構築とデータの管理、公開手順

これまでに当研究室において遺伝子解析がなされている車軸藻類のさく葉標本および本研究で新たに収集したさく葉標本を用いて車軸藻類の多様性情報データベースの構築を進めた。種情報についてはMicrosoft Excel形式でデータを管理した。DNAバーコードに用いた遺伝子塩基配列情報はFasta形式でデータを管理した。現時点では、本研究で新たに収集したさく葉標本について、標本ラベル情報（標本ID、和名、学名、採集日、採集地、特記事項）の入力が完了した。形態情報と遺伝子塩基配列情報に基づいた種同定が完了したサンプルの一部は、JBOLI-DSによるデータ登録を行い、情報公開の準備を進めた（図（1）-14）。

The figure displays two screenshots of the JBOLI-DS (Japanese Barcode of Life Initiative Data System) website. The left screenshot shows the 'Specimen Data - SHA:STAR' page, which includes a navigation bar with links like 'トップ', 'DBについて', '分類群', 'ユーザ登録', and 'サインイン'. Below the navigation bar is the JBOLI-DS logo and a section for 'Specimen Data - SHA:STAR'. This section contains a table with specimen information, including '機内コード', 'コレクションコード', 'カタログ番号', 'レコード番号', 'アクセス番号', '記録日', and '情報更新日時'. The right screenshot shows the 'Species List - Family Characeae シャジクモ科' page. It features a table with columns for '学名' (Scientific Name), '和名' (Japanese Name), and '画像' (Image). The table lists various species, including *Lamprothamnium succinctum*, *Nitellopsis obtusa*, *Nitella flexilis*, *Nitella furcata*, *Nitella mirabilis*, *Nitella pulchella*, *Nitella gracilis*, *Chara corallina*, *Chara gymnopitys*, *Chara braunii*, *Chara leptospora*, and *Chara globularis*. Each entry has a corresponding '詳細' (Details) link.

図（1）-14. JBOLI-DSによる車軸藻類のデータ公開ページ．左が標本データ用ページ、右が種名リストページ．

5) 凍結保存技術の開発

*C. braunii*の卵胞子を用いて凍結保存条件の検討を実施した（表（1）-5）。本研究で検討した条件の中では、乾燥サンプル、凍結防護剤サンプルの両方で凍結保存に成功した。しかし、実験に用いたサンプルのロット間で、コントロール条件での発芽率が3～35%であり安定しない場合が観察された。発芽率を改善するため、実際に車軸藻類が生育する自生地底土を実験に用いた結果、安定した発芽率を得ることができた（図（1）-15）。したがって、本研究で確立した卵胞子

の凍結保存条件、発芽条件を用いることによって、安定した域外保全が実施できることが明らかになった。

表（１）-5. 検討した車軸藻類卵胞子の凍結保存条件.

予備実験

	乾燥(常温)	滅菌処理	凍結	凍結防護剤 10%DMSO	ヒートショック処理	発芽率
条件A(control)	-	-	-	-	+	3% (n=600)
条件B	+	-	-	-	+	1.5% (n=600)
条件C	+	-	+	-	+	1% (n=600)
条件D	-	-	+	+	+	0% (n=600)
条件E	-	+	-	-	+	0% (n=300)
条件F	+	+	-	-	+	1.3% (n=300)
条件G	+	+	+	-	+	0.7% (n=300)
条件H	-	+	+	+	+	0.3% (n=300)



発芽条件を再検討(生育地の土を使用)

	乾燥(常温)	滅菌処理	凍結	凍結防護剤 10%DMSO	ヒートショック処理	発芽率
条件B (control)	+	-	-	-	+	25-52.5% (n=600)
条件C	+	-	+	-	+	21.5-23.5% (n=600)

+ は処理を行ったこと、- は未処理を示す。



図（１）-15. 発芽した車軸藻類の卵胞子（条件C）。

5. 本研究により得られた成果

（１）科学的意義

・ 野外調査によって車軸藻類サンプルを合計244サンプル得たことにより、車軸藻類の現在の生育分布状況がより明確になった。また、野外調査によって得られたサンプルの中に、新規分類群と考えられるサンプルを複数見いだすことができた。これらの成果は、車軸藻類の分類学・生態学上の基礎的理解の底上げにつながる。

・ *matK* 遺伝子領域は *rbcL* 遺伝子よりも高い塩基配列多様性を持ち、種を識別する DNA バーコードとして適用可能であることが明らかになった。したがって、*matK* 遺伝子領域と *rbcL* 遺伝子領域を組み合わせた DNA バーコーディングシステムを確立することができた。従来の先行研究において、網羅性の高い情報基盤の構築、種および集団を明確に識別する同定支援システム、遺伝的多様性を反映した域外保全を十分に実現できていなかった。その原因は、種類数の多さや利用する遺伝子領域の選定の難しさによる影響が大きい。本研究の対象である車軸藻類は種類数が非常に少ないグループ（全 86 種類）であり、また本グループの起原が古いため変異に富む遺伝子領域を多くもつ。したがって、網羅性の高い DNA バーコーディングを、高精度で、かつ短期間で構築することが容易なので、多様性情報基盤と域外保全技術研究を結合させた保全システムの実用化に向けた有意義なモデルとして有望である。また、車軸藻類は、絶滅の危険度が極めて高い分類群であり、かつ、分類・識別に熟練した知識と経験が必要である種同定が非常に困難なグループである。したがって、多様性情報基盤と域外保全技術研究を結合させた保全システムを構築する意義が非常に大きい。さらに、本研究をモデルケースに用いて、より種数の多い複雑な分類群への応用、発展が期待される。

・ *C. braunii* の EST データ（合計 3,285 contig）から 2 塩基モチーフおよび 3 塩基モチーフの EST-SSR の抽出および系統が大きく異なる *C. braunii* サンプルを用いて多型の有無を調査し、248 領域中 71 領域について PCR 増幅用のプライマーを設計し、系統が異なる 8 株を用いて、72 遺伝子座の有用性を調査した結果、32 遺伝子座の安定的に PCR 増幅とアレル決定が可能なマーカーを確立できた。この結果は、EST-SSR を集団レベルの血統登録用 DNA バーコードとして初めて導入するモデル研究になり得る。さらに、国内集団を DNA バーコードによって血統登録することによって、新規に侵入してくる外来集団を容易に識別し、迅速に排除するための対策を講じることが可能となる。また、海外での多様性情報基盤の充実、情報の共有化が進めば、DNA バーコード塩基配列を用いた分子系統解析を実施することにより、集団間の系統関係と遺伝的距離から、外来種の由来と侵入経路を特定することが出来ると期待される。

・ これまで凍結保存技術が確立されていない絶滅危惧植物の車軸藻類の卵胞子における凍結保存法を確立した。新規凍結保存法による車軸藻類の長期保存技術が確立されることにより、種の絶滅、種内の遺伝的多様性の喪失を防ぐことができる。

（２）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

環境省の第 3 次絶滅のおそれのある野生生物の選定・評価検討会、植物 II 分科会におけるレッドリストの検討において、本研究成果の一部である車軸藻類の現在の生育分布に関するデータを提示し、レッドリストの見直しに貢献した。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

- ・ 本研究で、日本に生育する車軸藻類の種および集団レベルを識別する DNA バーコーディングを用いた種同定システムが構築されたことによって、車軸藻類の種および集団レベルの同定、保全範囲の決定が、容易に、かつ高精度で可能となるので、環境保全政策の意思決定や環境研究の進展に大きく寄与するものと見込まれる。

- ・ 本研究で収集した車軸藻類の分布情報は、今後、車軸藻類の生育に適した環境条件の解析を進めることにより、対象地域の環境情報と相互利用することにより、生態ニッチモデリング（環境情報から生物分布を説明するモデルを作成し、対象種の生育に適した環境条件の分布から、ある場所での対象種の分布確率を推定する方法）等に活用することが見込まれ、対象種がどのような地域に潜在的に分布し、どの地域に定着可能か等を推定可能になると見込まれる。
- ・ 本研究で構築した車軸藻類多様性研究の方法論は、将来のレッドリストの見直しにおいて、車軸藻類サンプルの種同定を支援することによって、絶滅危惧種のランク評価に直接貢献すると見込まれる。
- ・ 本研究で構築された、学名、形態、生態、生理的特徴、分子情報、文献、分布情報、環境情報等の車軸藻類の多様性情報基盤は、地球規模生物多様性情報機構（GBIF）、日本バーコードオブライフ・イニシアティブ（JBOLI）、Barcode of Life Data Systems (BOLD)、および世界分類学イニシアティブ（GTI）と情報を共有することにより、だれもが情報にアクセス可能になるため、環境政策を進める上で、様々な行政機関、自治体で活用されることが見込まれる。
- ・ 車軸藻類の接合子の凍結保存技術が確立されたことによって、車軸藻類の域外保全に活用されることが期待される。また、本技術は、車軸藻類を1.5mLチューブ程度のサイズで半永久的に保存できるため、低コスト、小スペースの域外保全が行える。また、得られた保存試料は、環境資料のタイムカプセル化事業、バイオリソースプロジェクト、里地里山の保全などに直接的に貢献できる。
- ・ 本研究の多様性情報基盤と域外保全技術に基づく成果は、生物多様性国家戦略および生物多様性基本法の目的達成に大きく貢献できる。
- ・ また、多様性情報基盤は、自然環境保全基礎調査（緑の国勢調査）およびレッドリスト改訂のための基礎データになる他、絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律の運用をサポートすることにも繋がる。
- ・ さらに本研究の成果は、将来的に野生生物の絶滅リスク評価、保全管理のための意思決定支援へと発展することが期待される。

6. 国際共同研究等の状況

1) 日本・オーストラリアにおける車軸藻類の分類学的研究

将来的に、本研究の成果を生かし、環太平洋地域の車軸藻類の多様性に関する研究を実施するための準備段階として、日本とオーストラリアに生育する車軸藻類の関係性に関する共同研究を進めている。(Adriana García博士, University of Wollongong, Australia)

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 柴田葵、加藤将、川井浩史、坂山英俊：第36回日本藻類学会（2012）
「車軸藻類*Chara fibrosa*群の分子系統学的解析」
- 2) 加藤将、川井浩史、坂山英俊：第36回日本藻類学会（2012）
「シャジクモの保全遺伝学に向けたSSRマーカーの新規開発」
- 3) 坂山英俊：第34回水草研究会（2012）
「日本産車軸藻類の分類と生育分布の現状」
- 4) 加藤将：第34回水草研究会（2012）
「最も絶滅が危機される車軸藻類ホシツリモの歴史と現在」

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない

（４）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

（５）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 京都新聞（2012年7月6日、朝刊、滋賀県版、1面、「ホシツリモ琵琶湖で発見」）
- 2) 中日新聞（2012年7月6日、朝刊、滋賀県版、22面、「「ホシツリモ」琵琶湖で発見」）
- 3) 読売新聞（2012年7月6日、朝刊、滋賀県版、「希少水草を西日本初確認」）
- 4) 朝日新聞（2012年7月6日、朝刊、全国版、35面、「絶滅危惧の藻 琵琶湖で発見」）
- 5) 成果の記者発表（2012年7月6日、於水資源機構琵琶湖開発総合管理所、「西日本初 琵琶湖でホシツリモを発見-学術上の貴重な発見として植物学会で発表-」
- 6) NHKニュース（2012年7月6日、琵琶湖でホシツリモを発見した成果について1分ほど紹介）
- 7) 中日新聞（2012年8月17日、朝刊、滋賀県版、32面、「琵琶湖に「清湖」の藻」）
- 8) 毎日新聞（2012年8月21日、朝刊、社会26面、「琵琶湖に「幻の藻類」」）
- 9) 毎日新聞（2012年8月27日、夕刊、社会10面、「琵琶湖に幻のホシツリモ」）

（６）その他

<ポスター発表（学会等）>

- 1) 加藤将、坂山英俊：第33回水草研究会全国集会（2011）
「シャジクモ（*Chara braunii*）に見られる生態的2型の進化生物学的解析」
- 2) 加藤将、柴田葵、坂山英俊：第33回水草研究会全国集会（2011）
「絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発に向けて～シャジクモ類を例に～」

- 3) 坂山英俊、加藤将、樋口澄男、佐野郷美、野崎久義、川井浩史：第11回日本植物分類学会（2012）
「長野県および千葉県に生育するシャジクモ属（シャジクモ目、シャジクモ科）の未記載種について」
- 4) 加藤将、川井浩史、柴田葵、坂山英俊：第11回日本植物分類学会（2012）
「オオシャジクモ種内(シャジクモ目シャジクモ科)の新規系統に関する分類学的研究」
- 5) 比嘉敦、坂山英俊、加藤将、香村眞徳、熊野茂：第36回日本藻類学会（2012）
「沖縄本島における車軸藻類と淡水産大型紅藻類の産地報告」
- 6) 加藤将、須賀瑛文、養田勝則、堀家健司、滝本雅之、川井浩史、坂山英俊：第76回日本植物学会（2012）
「絶滅危惧車軸藻類ホシツリモの新産地発見」
- 7) 加藤将、永野萌、畠田智、川井浩史、坂山 英俊：第37回日本藻類学会（2013）
「シャジクモ (*Chara braunii*) におけるEST-SSRマーカーの開発」

<本研究による受賞等>

- 1) ポスター発表賞：
加藤将、川井浩史、柴田葵、坂山英俊：第11回日本植物分類学会（2012）
「オオシャジクモ種内(シャジクモ目シャジクモ科)の新規系統に関する分類学的研究」

8. 引用文献

- 1) Imahori, K. 1954. Ecology, phytogeography and taxonomy of the Japanese Charophyta. Kanazawa University Press, Kanazawa, Japan, 234 pp.
- 2) Kasaki, H. 1964. The Charophyta from the lakes of Japan. J. Hattori Bot. Lab. 27: 215–314.
- 3) Wood R.D. 1965. Monograph of the Characeae. In: A revision of the Characeae (Ed. by R.D. Wood & K. Imahori), vol. 1. J. Cramer, Weinheim. 904 pp.
- 4) Sakayama, H., Nozaki, H., Kasaki, H. and Hara, Y. 2002. Taxonomic re-examination of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Japan, based on microscopical studies of oospore wall ornamentation and *rbcL* gene sequences. Phycologia 41: 397–408.
- 5) Sakayama, H., Miyaji, K., Nagumo, T., Kato, M., Hara, Y. and Nozaki, H. 2005. Taxonomic re-examination of 17 species of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) based on internal morphology of the oospore wall and multiple DNA marker sequences. J. Phycol. 41: 195–211.
- 6) Sakayama, H., Kasai, F., Kawachi, M., Watanabe, M. M., Nozaki, H., Nishihiro, J., Washitani, I., Shigyo, M., Krienitz, L. and Ito, M. 2009. Taxonomic reexamination of *Chara globularis* (Charales, Charophyceae) from Japan based on oospore morphology and *rbcL* gene sequences, and the description of *C. leptospora* sp. nov. J. Phycol. 45: 917–927.
- 7) Sakayama, H., Hara, Y., Arai, S., Sato, H. and Nozaki, H. 2004a. Phylogenetic analyses of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Phycologia 43: 672–81.
- 8) Sakayama, H., Hara, Y. and Nozaki, H. 2004b. Taxonomic re-examination of six species of *Nitella*

- (Charales, Charophyceae) from Asia, and phylogenetic relationships within the genus based on *rbcL* and *atpB* gene sequences. *Phycologia* 43: 91–104.
- 9) Sakayama, H., Arai, S., Nozaki, H., Kasai, F. and Watanabe, M. M. 2006. Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of *Nitella comptonii* (Charales, Characeae). *Phycologia* 45: 417–21.
 - 10) Sakayama, H. 2008. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material. *Phycol. Res.* 56: 202–15.
 - 11) CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:12794–97.
 - 12) Kato, S., Sakayama, H., Sano, S., Kasai, F., Watanabe, M. M., Tanaka, J. and Nozaki, H. 2008. Morphological variation and intraspecific phylogeny of the ubiquitous species *Chara braunii* (Charales, Charophyceae) in Japan. *Phycologia* 47: 191–202.
 - 13) Kato, S., Misawa, K., Takahashi, F., Sakayama, H., Sano, S., Kosuge, K., Kasai, F., Watanabe, M. M., Tanaka, J. and Nozaki, H. 2011. Aquatic plant speciation affected by diversifying selection of organelle DNA regions. *J. Phycol.* 47: 999–1008.
 - 14) Guichoux, E., Lagache, L., and Wagner, S. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591–611.
 - 15) Day, J. G., Harding K., Nadarajan, J. and Benson E. E. 2008. Cryopreservation: conservation of bioresources at ultra low temperatures. In Walker J. M. and Rapley R. [Ed.] *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd Edition. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 915–945.
 - 16) 笠井文絵・河地正伸・恵良田眞由美 [他] 2009. NIESコレクション保存株リスト第8版. 国立環境研究所微生物系統保存株評価委員会 (The Japanese journal of phycology 57: 1–350).
 - 17) Cáceres, E. J. 1978. Contribucion al conocimiento de los Carofitos del Centro de Argentina. *Bol. Acad. Nac. Cienc. Cordoba* 52: 315–372.
 - 18) Zaneveld, J. S. 1940. The Charophyta of Malaysia and adjacent countries. *Blumea* 4: 1–224.
 - 19) Imahori, K. and Kasaki, H. 1977. Class Charophyceae. In Hirose, H. and Yamagishi, T. [Ed.] *Illustrations of the Japanese fresh-water algae*. Uchida Rokakuho Publishing, Tokyo, pp. 761–829 (in Japanese).
 - 20) Proctor, V. W. 1980. Historical biogeography of *Chara* (Charophyta): An appraisal of the Braun-Wood classification plus a falsifiable alternative for future consideration. *J. Phycol.* 16: 218–233.

巻末資料. 表 (1) - 6

和名, 学名	サンプル名	採集地 (生育環境)	採集日	標 本 枚 数
[環境省版レッドリストランク]		[緯度経度]		
アメリカシヤジクモ, <i>Chara sejuncta</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	KGW002-3	香川県東かがわ市川東 原間池近くの池 (ため池) N34° 13' 46.84" E134° 19' 53.83"	2012.10.18	5
イトシヤジクモ, <i>C. gymnopitys</i> (= <i>C. fibrosa</i> subsp. <i>gymnopitys</i>) [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	MRMT002	兵庫県たつの市揖西町龍子 (ため池)	2011.08.27	2
	KDN002	岡山県高梁市龍王池 (ため池)	2011.09.02	2
	ISKW004-1	石川県珠洲市三崎町伏見 (ため池) N37° 27' 14.30" E137° 20' 57.35"	2011.09.21	3
	OITA-001-2	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (ため池) N33° 15' 18.15" E131° 27' 54.13"	2011.10.07	3
	OITA-002-1	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (近接の湿地) N33° 15' 22.39" E131° 27' 48.56"	2011.10.07	3
	EHM019-1	愛媛県今治市朝倉南 (ため池) N33° 59' 30.85" E133° 02' 02.36"	2011.10.19	2
	EHM020-1	愛媛県今治市朝倉南 (ため池) N33° 59' 30.98" E133° 01' 59.75"	2011.10.19	3
	HRSM001-2	広島県東広島市鏡山 鏡山公園 奥田大池 (ため池) N34° 24' 23.36" E132° 43' 43.05"	2011.10.25	3
	HRSM012	広島県三原市久井町坂井原 (ため池) N34° 28' 49.10" E133° 01' 39.88"	2011.10.26	1
	HRSM016-1	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 19.54" E132° 53' 18.82"	2011.10.27	3
	HRSM020	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 19.34" E132° 53' 43.06"	2011.10.27	5
	EHM109-1a	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (ため池) N33° 35' 10.88" E132° 31' 59.76"	2012.08.27	7
	EHM109-5b	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (ため池) N33° 35' 11.93" E132° 31' 58.17"	2012.08.27	3
	TTR012-2	鳥取県鳥取市大塚 (ため池) N35° 28' 57.86" E134° 09' 40.20"	2012.09.19	5
	MRMT008	愛知県日進市藤島町長塚 岩藤新池 (近接の湿地)	2012.10.08	1
	EHM305-3	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池)	2012.10.16	3

オオシヤジクモ, <i>C. corallina</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	EHM013	愛媛県今治市長沢 (ため池) N34° 00' 17.18" E133° 02' 03.79"	2011.10.19	5
	HRSM001-1	広島県東広島市鏡山 鏡山公園 奥田大池 (ため池) N34° 24' 23.36" E132° 43' 43.05"	2011.10.25	5
	HRSM011	広島県三原市久井町坂井原 (ため池) N34° 28' 46.09" E133° 01' 36.26"	2011.10.26	4
	HIGA002	沖縄県国頭郡国頭村奥川 (砂防ダム直上) N26° 49' 19.09" E128° 16' 58.98"	2012.03.25	5
	HIGA301-2	沖縄県うるま市石川嘉手苅 (用水路) N26° 25' 28.09" E127° 48' 30.67"	2012.05.03	0
	HIGA302-2	沖縄県国頭郡恩納村富着 (用水路) N26° 27' 10.91" E127° 49' 25.14"	2012.05.03	5
	HIGA601	沖縄県国頭郡国頭村奥川 (砂防ダム直上) N26° 49' 19.09" E128° 16' 58.98"	2012.09.14	5
	TTR011	鳥取県鳥取市滝山 (ため池) N35° 30' 05.34" E134° 17' 08.38"	2012.09.19	10
	EHM317	愛媛県今治市長沢 (ため池) N34° 00' 17.29" E133° 02' 04.02"	2012.10.18	9
オーストラリアシヤジクモ, <i>C. australis</i> [情報不足 (DD)]	EHM201	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池) N32° 58' 58.22" E132° 38' 44.38"	2012.09.01	4
	EHM202	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池) N32° 58' 44.40" E132° 38' 51.58"	2012.09.01	1
	EHM304-1	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池) N32° 58' 58.22" E132° 38' 44.38"	2012.10.16	5
	EHM305-1	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池) N32° 58' 46.46" E132° 38' 49.71"	2012.10.16	7
カタシヤジクモ, <i>C. globularis</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	HGCH007	長野県上水内郡飯綱町浅川大池 (ため池)	2011.08.25	1
	KDN003	兵庫県加東市山国王子が池 (ため池)	2011.09.13	1
	KDN004	兵庫県加東市山国王子が池 (ため池)	2011.09.13	2
	HGCH006	長野県北安曇郡小谷村鉾池 (ため池)	2011.09.18	3
	HGCH003	長野県信濃町御鹿池 (ため池)	2011.09.25	3
	HGCH004	長野県信濃町御鹿池 (ため池)	2011.09.25	3
	KG001	山梨県南都留郡富士河口湖町 河口湖 (湖沼) N35° 30' 25.28" E138° 44' 06.37"	2011.10.16	3
	KG009-4	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 36.64" E138° 44' 23.89"	2011.10.17	1
	EHM024	愛媛県今治市宅間 (ため池) N34° 04' 38.54" E132° 56' 50.15"	2011.10.19	5

	EHM026-1	愛媛県今治市波方町波方 (ため池) N34° 07' 04.07" E132° 56' 56.71"	2011.10.19	5
	SPR011	北海道千歳市幌美内 支笏湖 (湖沼) N42° 46' 55.77" E141° 18' 47.55"	2012.07.17	8
	SPR012-1	北海道千歳市幌美内 支笏湖 (湖沼) N42° 48' 02.29" E141° 19' 37.62"	2012.07.17	7
	SPR013	北海道白老郡白老町虎杖浜 倶多楽湖 (湖沼) N42° 29' 37.94" E141° 10' 12.19"	2012.07.17	8
	MYG001_5	宮城県亘理郡山元町坂元磯沼下 水神沼 (ため池) N37° 54' 05.27" E140° 55' 04.55"	2012.07.27	1
	KG114-2	山梨県南都留郡富士河口湖町勝山河口湖 (湖沼) N35° 30' 25.48" E138° 44' 06.39"	2012.08.04	1
	YNK001-1	栃木県日光市湯元 湯ノ湖 (湖沼) N36° 48' 09.15" E139° 25' 17.76"	2012.08.16	1
	YNK004-1	栃木県日光市湯元 湯ノ湖 (湖沼) N36° 47' 48.73" E139° 25' 33.83"	2012.08.16	6
	YNK007-1	栃木県日光市湯元 湯ノ湖 (湖沼) N36° 48' 02.87" E139° 25' 32.84"	2012.08.16	5
クサシヤジクモ, <i>C. vulgaris</i> [情報不足 (DD)]	HIGA001-2	沖縄県国頭郡宜野座村漢那 (用水路) N26° 28' 47.06" E127° 57' 29.88"	2012.03.24	5
	HIGA201	沖縄県名護市田井等 (水田) N26° 36' 59.26" E128° 00' 42.30"	2012.04.07	5
	HIGA301-3	沖縄県うるま市石川嘉手苅 (用水路) N26° 25' 28.09" E127° 48' 30.67"	2012.05.03	0
	HIGA302-3	沖縄県国頭郡恩納村富着 (用水路) N26° 27' 10.91" E127° 49' 25.14"	2012.05.03	5
	HIGA303	沖縄県国頭郡恩納村富着 (用水路) N26° 27' 16.24" E127° 49' 21.29"	2012.05.03	5
	HIGA305	沖縄県宜野湾市大山 (タイモ畑水溜まり) N26° 16' 41.77" E127° 44' 30.55"	2012.05.06	5
	KIN005	沖縄県国頭郡金武町屋嘉 水田横の水路 (水田側溝) N26° 27' 21.42" E127° 51' 04.32"	2012.10.07	5
	HS-130306-02	沖縄県国頭郡恩納村富着 N26° 27' 11.30" E127° 49' 25.30"	2013.03.06	液*
	HS-130309-02	沖縄県国頭郡恩納村 N26° 26' 58.40" E127° 49' 13.00"	2013.03.09	液
	HS-130309-03	沖縄県国頭郡恩納村 N26° 26' 58.70" E127° 49' 12.10"	2013.03.09	液
	HS-130309-04	沖縄県国頭郡恩納村富着 N26° 27' 07.20" E127° 49' 25.10"	2013.03.09	液
	HS-130309-05	沖縄県国頭郡恩納村富着 N26° 27' 14.90" E127° 49' 22.30"	2013.03.09	液
コイトシヤジクモ, <i>C. fibrosa</i> (= <i>C. fibrosa</i> subsp. <i>gymnopitys</i> var. <i>flaccida</i>)	HIGA003-2	沖縄県国頭郡東村平良 (用水路) N26° 38' 08.09" E128° 09' 01.01"	2012.03.25	5

[絶滅危惧I類 (CR+EN)]

HS-120606-01-105-1	沖縄県石垣市登野城 N24° 23' 46.90" E124° 10' 11.20"	2012.06.06	5
HS-120606-01-105-2b	沖縄県石垣市登野城 N24° 23' 46.90" E124° 10' 11.20"	2012.06.06	5
KGW002-2	香川県東かがわ市川東 原間池近くの池 (ため池) N34° 13' 46.84" E134° 19' 53.83"	2012.10.18	5
HS-130307-01	沖縄県国頭郡東村平良 N26° 38' 09.20" E128° 08' 59.40"	2013.03.07	1

シヤジクモ,
C. braunii

[絶滅危惧II類 (VU)]

TNGS001	鹿児島県西之表市西之表 種子島 (放置水槽) N30° 44' 06.10" E130° 59' 59.69"	2011.04.15	1
TNGS002	鹿児島県西之表市西之表 種子島 (放置水槽) N30° 44' 06.10" E130° 59' 59.69"	2011.04.15	1
AICH051	三重県松阪市大河内町 (水田) N34° 31' 51.12" E136° 28' 38.49"	2011.08.01	1
AICH056	三重県松阪市嬉野森本町 (水田) N34° 36' 05.25" E136° 25' 57.28"	2011.08.02	1
AICH057	三重県松阪市嬉野森本町 (水田) N34° 36' 06.39" E136° 26' 01.45"	2011.08.02	1
AICH062	三重県松阪市小野町 (水田) N34° 36' 22.27" E136° 27' 40.68"	2011.08.02	1
AICH063	三重県津市産品 (水田) N34° 43' 07.86" E136° 26' 39.49"	2011.08.02	2
AICH069	三重県津市一身田上津部田 (水田側溝) N34° 44' 58.34" E136° 29' 35.79"	2011.08.02	1
AICH066n-1	岐阜県諏訪町天ヶ峰 (水田) N35° 18' 14.65" E137° 05' 27.37"	2011.08.03	1
AICH068	愛知県春日井市細野町 (水田側溝) N35° 17' 49.28" E137° 03' 48.69"	2011.08.03	1
TKDO005-1	兵庫県宝塚市武田尾 (水田側溝) N34° 53' 09.56" E135° 18' 07.64"	2011.08.16	2
GNM027	群馬県邑楽郡邑楽町中野 (水田側溝) N36° 16' 17.05" E139° 28' 55.30"	2011.08.21	1
GNM031	群馬県邑楽郡邑楽町鶉新田 (水田側溝) N36° 15' 15.02" E139° 29' 17.72"	2011.08.21	1
GNM032	群馬県高崎市浜川町 (水田) N36° 21' 42.34" E138° 58' 52.73"	2011.08.22	1
GNM033	群馬県高崎市浜川町 (水田) N36° 21' 41.73" E138° 58' 53.02"	2011.08.22	1
NSHR004	鹿児島県薩摩川内市祁答院町藺牟田池 (近接の湿地)	2011.09.04	2
ISKW002-1	石川県珠洲市正院町川尻 (水田) N37° 26' 50.09" E137° 18' 23.11"	2011.09.21	3
ISKW003	石川県珠洲市正院町川尻 (水田) N37° 26' 50.26" E137° 18' 22.46"	2011.09.21	3
NSHR001-2	兵庫県豊岡市田結 (湿地) N35° 38' 19.79" E134° 51' 38.63"	2011.09.23	3

NSHR002-1	兵庫県豊岡市田結 (放棄水田) N35° 38' 54.96" E134° 51' 32.54"	2011.09.23	2
SGMT001	静岡県裾野市深良 (ため池) N35° 13' 32.37" E138° 58' 08.80"	2011.10.03	3
SGMT002	静岡県裾野市茶畑 (水田) N35° 10' 35.37" E138° 55' 35.38"	2011.10.03	1
OITA-001-1	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (ため池) N33° 15' 18.15" E131° 27' 54.13"	2011.10.07	3
HYOG001	兵庫県養父市八鹿町 (ため池) N35° 24' 21.83" E134° 44' 42.97"	2011.10.08	6
IZN004	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	1
IZN006	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	3
IZN007	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	1
IZN008	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	3
KG002-3	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 50.16" E138° 44' 06.75"	2011.10.16	3
KG009-1	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 36.64" E138° 44' 23.89"	2011.10.17	3
EHM001	愛媛県四国中央市土居町蕪崎 (水田側溝) N33° 58' 50.49" E133° 26' 20.05"	2011.10.18	5
EHM004	愛媛県西条市飯岡 (水田) N33° 55' 07.61" E133° 14' 26.23"	2011.10.18	4
EHM005-1	愛媛県西条市飯岡 (水田) N33° 55' 10.18" E133° 14' 10.28"	2011.10.18	5
EHM008-1	愛媛県西条市氷見丙 (ため池) N33° 53' 23.29" E133° 08' 06.01"	2011.10.18	3
EHM011-2	愛媛県西条市小松町安井 (ため池) N33° 51' 54.70" E133° 03' 14.77"	2011.10.18	5
EHM012	愛媛県西条市丹原町高知 (水田側溝) N33° 55' 29.81" E133° 03' 11.36"	2011.10.18	5
EHM017	愛媛県今治市朝倉南 (水田側溝) N33° 59' 35.45" E133° 01' 40.89"	2011.10.19	3
EHM023-1	愛媛県今治市矢田 (ため池) N34° 02' 25.02" E132° 57' 14.56"	2011.10.19	1
EHM025-1	愛媛県今治市宅間 (ため池) N34° 05' 10.61" E132° 56' 55.06"	2011.10.19	4
EHM027	愛媛県今治市波方町波方 (水田側溝) N34° 06' 55.30" E132° 57' 01.65"	2011.10.19	1
EHM031	愛媛県松山市浅海本谷 (ため池) N34° 00' 22.56" E132° 48' 23.17"	2011.10.20	5
HRSM004	広島県東広島市鏡山八本松町原 (ため池) N34° 25' 28.94" E132° 41' 09.26"	2011.10.25	5
HRSM022	広島県三次市十日市町 (水田) N34° 47' 33.23" E132° 50' 50.48"	2011.10.27	2
HRSM023	広島県三次市十日市町 (ため池) N34° 47' 27.45" E132° 50' 53.51"	2011.10.27	5

HRSM-AM219	広島県呉市安浦町下垣内 (ため池)	2011.11.09	3
HIGA001-1	沖縄県国頭郡宜野座村漢那 (用水路)	2012.03.24	3
HIGA003-1	N26° 28' 47.06" E127° 57' 29.88" 沖縄県国頭郡東村平良 (用水路)	2012.03.25	5
HIGA101	N26° 38' 08.09" E128° 09' 01.01" 沖縄県国頭郡恩納村谷茶畑 (用水路)	2012.04.01	5
HIGA102	N26° 28' 06.13" E127° 50' 02.26" 沖縄県国頭郡恩納村谷茶畑 (用水路)	2012.04.01	5
HIGA103	N26° 28' 06.60" E127° 50' 02.36" 沖縄県国頭郡恩納村谷茶名無川 (湿地)	2012.04.01	5
HIGA301-1	N26° 28' 12.47" E127° 49' 55.38" 沖縄県うるま市石川嘉手苅 (用水路)	2012.05.03	3
HIGA302-1	N26° 25' 28.09" E127° 48' 30.67" 沖縄県国頭郡恩納村富着 (用水路)	2012.05.03	3
HIGA401	N26° 27' 10.91" E127° 49' 25.14" 沖縄県国頭郡恩納村安富祖 (水田)	2012.05.19	5
HIGA402	N26° 29' 52.98" E127° 53' 05.50" 沖縄県国頭郡恩納村安富祖 (水田)	2012.05.19	5
HIGA403	N26° 29' 50.96" E127° 53' 12.77" 沖縄県国頭郡恩納村安富祖 (水田)	2012.05.19	5
HIGA404	N26° 29' 49.20" E127° 53' 14.68" 沖縄県国頭郡恩納村安富祖 (水田)	2012.05.19	5
HS-120604-02-103-1	N26° 30' 04.25" E127° 53' 24.43" 沖縄県八重山郡竹富町西表	2012.06.04	5
HS-120605-01-104	N24° 22' 21.70" E123° 45' 11.60" 沖縄県石垣市梓海	2012.06.06	5
HS-120606-01-105-2a	N24° 27' 14.20" E124° 11' 18.30" 沖縄県石垣市登野城	2012.06.06	5
HYOG002	N24° 23' 46.90" E124° 10' 11.20" 兵庫県加古郡稲美町加古 六軒屋池 (ため池)	2012.06.29	3
HYOG003	N34° 46' 11.10" E134° 53' 42.37" 兵庫県加古郡稲美町加古 六軒屋 (池すぐ下の水田)	2012.06.29	2
HYOG006	N34° 46' 08.84" E134° 53' 39.59" 兵庫県加古川市志方町高畑 水田地帯 (水田)	2012.06.29	5
HIGA501	N34° 49' 26.21" E134° 50' 15.89" 沖縄県名護市久志 (用水路)	2012.07.07	2
HIGA502	N26° 31' 00.98" E128° 00' 08.17" 沖縄県名護市久志 (用水路)	2012.07.07	3
SPR001	N26° 30' 58.93" E128° 00' 10.48" 北海道札幌市中央区 北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター植 物園 (コンクリート池)	2012.07.15	7
NIM001	N43° 03' 48.61" E141° 20' 27.75" 福井県敦賀市樫曲 中池見湿地 (水田)	2012.07.26	2
MYG001_1	N37° 54' 04.02" E140° 55' 10.19" 宮城県亘理郡山元町坂元磯沼下 水 神沼 (ため池)	2012.07.27	1

MYG002	宮城県亘理郡山元町坂元磯沼下 水 神沼 (付近の水溜まり) N37° 54' 03.35" E140° 55' 08.53"	2012.07.27	1
MYG003	宮城県亘理郡山元町坂元磯沼下 水 神沼 (付近の水路) N37° 54' 04.86" E140° 55' 11.44"	2012.07.27	1
BIWA001-1	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 58.09" E136° 02' 40.21"	2012.07.28	2
BIWA002-1	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 57.69" E136° 02' 40.33"	2012.07.28	3
BIWA003-1	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 23' 01.09" E136° 02' 45.40"	2012.07.28	3
BIWA007-1	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 20' 44.23" E136° 04' 25.61"	2012.07.28	5
BIWA009-1	滋賀県高島市新旭町饗庭 (水田) N35° 22' 30.80" E136° 02' 23.69"	2012.07.28	5
ASHI001	神奈川県足柄下郡箱根町箱根 芦ノ 湖 (湖沼) N35° 11' 22.94" E139° 00' 44.12"	2012.08.04	1
IZU001-1	神奈川県小田原市下大井 (水田) N35° 18' 56.05" E139° 09' 42.86"	2012.08.04	2
IZU004	静岡県賀茂郡東伊豆町片瀬 (ため 池) N34° 50' 45.28" E139° 00' 50.82"	2012.08.04	7
IZU005	静岡県静岡市葵区有永 (水田) N35° 01' 44.90" E138° 23' 29.31"	2012.08.04	3
KG106-1	山梨県南都留郡富士河口湖町河口 河口湖 (湖沼) N35° 30' 56.04" E138° 46' 03.58"	2012.08.04	1
KG107-1	山梨県南都留郡富士河口湖町河口 河口湖 (湖沼) N35° 30' 56.20" E138° 46' 03.68"	2012.08.04	液
KG109-1	山梨県南都留郡富士河口湖町大石 河口湖 (湖沼) N35° 31' 15.43" E138° 45' 28.37"	2012.08.04	1
KG113	山梨県南都留郡富士河口湖町河口 河口湖 (湖沼) N35° 31' 28.75" E138° 45' 45.38"	2012.08.04	2
KG114-1	山梨県南都留郡富士河口湖町勝山 河口湖 (湖沼) N35° 30' 25.48" E138° 44' 06.39"	2012.08.04	液
KG115	山梨県南都留郡富士河口湖町河口 (水田) N35° 31' 45.26" E138° 46' 09.64"	2012.08.04	2
MSM001-1	静岡県三島市谷田 (水田) N35° 07' 06.06" E138° 55' 47.50"	2012.08.04	7
YM001-1	山梨県南都留郡山中湖村平野 山中 湖 (湖沼) N35° 24' 33.75" E138° 52' 13.95"	2012.08.04	5
YM002-1a	山梨県南都留郡山中湖村山中 山中 湖 (湖沼) N35° 25' 13.01" E138° 51' 18.29"	2012.08.04	液
YM007	山梨県南都留郡忍野村内野 水田地 帯 (水田側溝) N35° 27' 10.39" E138° 52' 00.71"	2012.08.04	10

EHM100-1	愛媛県宇和島市三間町則 (ため池) N33° 18' 23.73" E132° 35' 54.94"	2012.08.13	3
EHM100-2	愛媛県宇和島市三間町則 (水田) N33° 18' 57.10" E132° 34' 36.88"	2012.08.13	1
KOFU012-1	山梨県南巨摩郡身延町熊澤 山間の 水田 (水田) N35° 29' 26.12" E138° 29' 27.31"	2012.08.15	3
KOFU012-2	山梨県南巨摩郡身延町熊澤 山間の 水田 (水田) N35° 29' 26.25" E138° 29' 28.26"	2012.08.15	5
EHM102-1	愛媛県西条市中西新開 水田地帯 (水田) N33° 54' 19.79" E133° 10' 08.53"	2012.08.26	1
EHM105-1	愛媛県西条市下島山甲EHM105ため 池の上の砂防ダム (ため池) N33° 55' 56.69" E133° 13' 58.30"	2012.08.26	5
EHM108-1	愛媛県西条市丹原町高知 水田地帯 (水田) N33° 55' 19.62" E133° 03' 08.39"	2012.08.26	4
EHM109-4	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (た め池) N33° 35' 11.62" E132° 31' 58.37"	2012.08.27	2
EHM109-5a	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (た め池) N33° 35' 11.93" E132° 31' 58.17"	2012.08.27	2
EHM109-6	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (た め池) N33° 35' 12.22" E132° 31' 58.09"	2012.08.27	2
KG304	山梨県南都留郡富士河口湖町浅川 河口湖 (湖沼) N35° 30' 40.20" E138° 46' 23.40"	2012.08.30	1
EHM205-1	愛媛県宇和島市津島町岩松 () N33° 07' 00.48" E132° 30' 55.87"	2012.09.01	2
EHM207-1	愛媛県南宇和郡愛南町広見 () N32° 58' 37.27" E132° 38' 47.94"	2012.09.01	1
EHM209	愛媛県南宇和郡愛南町城辺甲 () N32° 57' 05.00" E132° 34' 35.40"	2012.09.01	3
EHM203-1	愛媛県宇和島市三間町小沢川 (ため 池) N33° 18' 16.49" E132° 37' 19.13"	2012.09.02	1
KMJM011	沖縄県島尻郡久米島町比嘉 (サトウ キビ畑水溜まり) N26° 20' 24.24" E126° 47' 50.86"	2012.09.04	3
KMJM017-1	沖縄県島尻郡久米島町上江洲 (タイ モ畑水溜まり) N26° 21' 27.91" E126° 45' 04.80"	2012.09.05	5
TMNG406	栃木県足利市名草中町 (用水路) N36° 22' 53.90" E139° 28' 50.00"	2012.09.10	5
TTR004	鳥取県米子市彦名町 (水田側溝) N35° 27' 05.77" E133° 17' 05.90"	2012.09.18	5
TMNG405	栃木県那須烏山市大里 (用水路) N36° 38' 13.00" E140° 06' 29.50"	2012.09.18	4
TTR012-1	鳥取県鳥取市大塚 (ため池) N35° 28' 57.86" E134° 09' 40.20"	2012.09.19	1
GNM101	群馬県佐波郡玉村町 (水田)	2012.09.23	6

	KIN001	沖縄県国頭郡金武町屋嘉 (水田) N26° 27' 11.95" E127° 50' 57.80"	2012.10.07	5
	KIN002	沖縄県国頭郡金武町屋嘉 (水田) N26° 27' 11.95" E127° 50' 57.80"	2012.10.07	5
	KIN003	沖縄県国頭郡金武町屋嘉 (水田) N26° 27' 13.00" E127° 51' 01.37"	2012.10.07	3
	KIN004	沖縄県国頭郡金武町屋嘉 (水田) N26° 27' 14.83" E127° 50' 59.39"	2012.10.07	5
	EHM305-2	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池)	2012.10.16	1
	KGW002-1	香川県東かがわ市川東 原間池近くの池 (ため池) N34° 13' 46.84" E134° 19' 53.83"	2012.10.18	5
	EHM402-1	愛媛県今治市波方町波方 (ため池) N34° 06' 41.76" E132° 57' 15.12"	2012.11.02	1
	EHM404	愛媛県今治市東門町外堀川 () N34° 03' 38.09" E133° 00' 47.45"	2012.11.02	5
	EHM408	愛媛県西予市宇和町稻生 赤滝池 (ため池) N33° 21' 40.25" E132° 32' 09.74"	2012.11.03	5
	HS-130306-03	沖縄県名護市親川 N26° 36' 59.30" E128° 00' 46.50"	2013.03.06	液
	HS-130306-04	沖縄県名護市川上 N26° 36' 49.80" E128° 01' 01.80"	2013.03.06	液
	HS-130307-02	沖縄県国頭郡東村平良 N26° 38' 09.20" E128° 08' 59.40"	2013.03.07	液
	HS-130307-04	沖縄県国頭郡恩納村喜瀬武原 N26° 29' 02.70" E127° 54' 39.00"	2013.03.07	液
	HS-130307-05	沖縄県国頭郡恩納村喜瀬武原 N26° 29' 02.70" E127° 54' 39.00"	2013.03.07	液
	HS-130308-01	沖縄県国頭郡恩納村瀬良垣 N26° 30' 22.70" E127° 52' 43.20"	2013.03.08	液
	HS-130309-01	沖縄県国頭郡恩納村 N26° 26' 52.90" E127° 49' 00.90"	2013.03.09	液
ソデマクリシャジクモ, <i>C. leptospora</i> [情報不足 (DD)]	MYG005	宮城県塩竈市浦戸野々島毛無崎 (沿岸汽水池) N38° 20' 06.45" E141° 06' 32.53"	2012.10.05	8
	EHM316	愛媛県今治市古谷 門口池 (ため池) N34° 00' 22.16" E132° 59' 09.02"	2012.10.18	10
シャジクモ属の新種1, <i>Chara</i> sp. 1	JOMON	千葉県市川市北方町大川調整池 (ため池) N35° 44' 03.48" E139° 57' 07.03"	2011.08.11	5
シャジクモ属の新種2, <i>Chara</i> sp. 2	KG002-2	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 50.16" E138° 44' 06.75"	2011.10.16	3
	KG004-2	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 45.95" E138° 45' 59.08"	2011.10.17	3
	KG006-2	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 31' 18.47" E138° 45' 27.97"	2011.10.17	2
	KG109-2	山梨県南都留郡富士河口湖町大石河口湖 (湖沼) N35° 31' 15.43" E138° 45' 28.37"	2012.08.04	1

	KG301	山梨県南都留郡富士河口湖町小立 河口湖 (湖沼) N35° 30' 47.99" E138° 45' 23.03"	2012.08.27	1
	KG302	山梨県南都留郡富士河口湖町大石 河口湖 (湖沼) N35° 31' 14.96" E138° 45' 27.44"	2012.08.28	1
	KG303	山梨県南都留郡富士河口湖町浅川 河口湖 (湖沼) N35° 30' 40.20" E138° 46' 23.40"	2012.08.29	1
シャジクモ属の新種3, <i>Chara</i> sp. 3	TKDO001-2	兵庫県宝塚市武田尾 (水田側溝) N34° 53' 08.35" E135° 18' 07.72"	2011.08.16	1
	TKDO003	兵庫県宝塚市武田尾 (ため池) N34° 53' 08.69" E135° 18' 05.94"	2011.08.16	2
	HRSM013-1	広島県世羅郡世羅日町 (ため池) N34° 38' 34.49" E132° 55' 26.99"	2011.10.26	3
	HRSM017-1	広島県三次市島敷町 (ため池) N34° 49' 22.47" E132° 53' 24.10"	2011.10.27	5
シラタマモ, <i>Lamprothamnium succinctum</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	EHM117	高知県須崎市浦ノ内西分 汽水のため 池 (ため池) N33° 24' 54.90" E133° 21' 02.21"	2012.08.28	7
	KMJM002	沖縄県島尻郡久米島町具志川 (沿岸 汽水池) N26° 22' 38.50" E126° 44' 23.63"	2012.09.03	5
	MYG006	宮城県塩竈市浦戸野々島毛無崎 (沿 岸汽水池) N38° 20' 06.45" E141° 06' 32.53"	2012.10.05	5
オトメフラスコモ, <i>Nitella hyalina</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	KDN005	兵庫県加東市山国王子が池 (ため池)	2011.09.13	2
	YMGT001	宮城県名取市美田園 (ため池)	2011.09.14	2
	BIWA001-4	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 58.09" E136° 02' 40.21"	2012.07.28	3
	BIWA003-3	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 23' 01.09" E136° 02' 45.40"	2012.07.28	2
	YM002-2d	山梨県南都留郡山中湖村山中 山中 湖 (湖沼) N35° 25' 13.22" E138° 51' 17.00"	2012.08.04	3
	YM003	山梨県南都留郡山中湖村平野 山中 湖 (湖沼) N35° 25' 38.22" E138° 51' 56.16"	2012.08.04	1
	YM005-2	山梨県南都留郡山中湖村平野 山中 湖 (湖沼) N35° 25' 32.53" E138° 52' 29.75"	2012.08.04	1
キヌフラスコモ, <i>N. gracilens</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	HGCH005	長野県飯山市瑞穂北竜湖 (湖沼)	2011.09.01	2
	OITA-001-3	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (ため 池)	2011.10.07	5

	N33° 15' 18.15" E131° 27' 54.13"		
KG009-5	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼)	2011.10.17	1
	N35° 30' 36.64" E138° 44' 23.89"		
EHM003	愛媛県新居浜市萩生 (ため池)	2011.10.18	5
	N33° 56' 04.52" E133° 15' 45.01"		
EHM008-2	愛媛県西条市氷見丙 (ため池)	2011.10.18	4
	N33° 53' 23.29" E133° 08' 06.01"		
EHM009	愛媛県西条市小松町新屋敷 (ため池)	2011.10.18	3
	N33° 53' 03.13" E133° 06' 56.70"		
EHM010	愛媛県西条市小松町安井 (ため池)	2011.10.18	5
	N33° 52' 00.49" E133° 03' 14.60"		
EHM015-1	愛媛県今治市孫兵衛作 (ため池)	2011.10.19	5
	N33° 59' 21.85" E133° 03' 31.45"		
EHM016	愛媛県今治市旦 (ため池)	2011.10.19	5
	N33° 59' 21.89" E133° 03' 28.64"		
EHM023-4	愛媛県今治市矢田 (ため池)	2011.10.19	6
	N34° 02' 25.02" E132° 57' 14.56"		
EHM026-2	愛媛県今治市波方町波方 (ため池)	2011.10.19	1
	N34° 07' 04.07" E132° 56' 56.71"		
HRSM001-4	広島県東広島市鏡山 鏡山公園 奥田大池 (ため池)	2011.10.25	5
	N34° 24' 23.36" E132° 43' 43.05"		
HRSM010	広島県三原市久井町坂井原 (ため池)	2011.10.26	5
	N34° 28' 42.50" E133° 01' 36.86"		
HRSM011-1	広島県三原市久井町坂井原 (ため池)	2011.10.26	5
	N34° 28' 42.34" E133° 01' 39.06"		
HRSM011-3	広島県三原市久井町坂井原 (ため池)	2011.10.26	1
	N34° 28' 42.34" E133° 01' 39.06"		
HRSM017-3	広島県三次市畠敷町 (ため池)	2011.10.27	3
	N34° 49' 22.47" E132° 53' 24.10"		
HRSM017-4	広島県三次市畠敷町 (ため池)	2011.10.27	1
	N34° 49' 22.47" E132° 53' 24.10"		
EHM100-3	愛媛県今治市 高麗池 (ため池)	2012.03.28	1
KG109-4	山梨県南都留郡富士河口湖町大石河口湖 (湖沼)	2012.08.04	1
	N35° 31' 15.43" E138° 45' 28.37"		
MZMT001	東京都葛飾区水元公園 かわせみの里 施設裏の放置水槽 (放置水槽)	2012.08.18	3
	N35° 47' 40.80" E139° 51' 41.10"		
EHM105-2	愛媛県西条市下島山甲EHM105ため池の上の砂防ダム (ため池)	2012.08.26	6
	N33° 55' 56.69" E133° 13' 58.30"		
EHM104	愛媛県西条市下島山甲ため池 (ため池)	2012.08.26	5
	N33° 55' 53.47" E133° 13' 58.34"		
EHM109-1c	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (ため池)	2012.08.27	3
	N33° 35' 10.88" E132° 31' 59.76"		
EHM109-5c	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (ため池)	2012.08.27	9
	N33° 35' 11.93" E132° 31' 58.17"		

	EHM304-2	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池)	2012.10.16	1
		N32° 58' 46.46" E132° 38' 49.71"		
	EHM305-4	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池)	2012.10.16	5
	KGW002-4	香川県東かがわ市川東 原間池近くの池 (ため池)	2012.10.18	6
		N34° 13' 46.84" E134° 19' 53.83"		
	EHM402-2	愛媛県今治市波方町波方 (ため池)	2012.11.02	5
		N34° 06' 41.76" E132° 57' 15.12"		
	EHM405	愛媛県今治市矢田 (ため池)	2012.11.02	5
		N34° 02' 24.58" E132° 57' 01.51"		
	EHM407-2	愛媛県西予市宇和町田苗真土 (ため池)	2012.11.03	5
		N33° 24' 20.70" E132° 29' 36.71"		
	EHM701	愛媛県西条市小松町南川 大谷池 (ため池)	2012.11.30	3
		N33° 53' 17.41" E133° 05' 55.14"		
	EHM702	愛媛県西条市下島山 (ため池)	2012.11.30	3
		N33° 55' 33.42" E133° 14' 11.22"		
サキボソフラスコモ, <i>N. mucronata</i> [情報不足 (DD)]	HRSM015-1	広島県世羅郡世羅日町 (水溜まり)	2011.10.26	3
		N34° 38' 47.75" E132° 55' 07.17"		
	HRSM015-2	広島県世羅郡世羅日町 (水溜まり)	2011.10.26	2
		N34° 38' 47.75" E132° 55' 07.17"		
	TMNG402	栃木県那須烏山市森田 (水田)	2012.07.23	1
		N36° 38' 44.70" E140° 07' 27.40"		
	TMNG404	栃木県那須烏山市大里 (用水路)	2012.09.18	3
		N36° 38' 12.60" E140° 06' 29.60"		
ジュズフサフラスコモ, <i>N. comptonii</i> [情報不足 (DD)]	HRSM001-3	広島県東広島市鏡山 鏡山公園 奥田大池 (ため池)	2011.10.25	3
		N34° 24' 23.36" E132° 43' 43.05"		
	HRSM001-5	広島県東広島市鏡山 鏡山公園 奥田大池 (ため池)	2011.10.25	3
		N34° 24' 23.36" E132° 43' 43.05"		
	TGN001	栃木県下都賀郡壬生町助谷 天神沼 (ため池)	2012.08.17	8
		N36° 28' 41.78" E139° 48' 05.05"		
	KGW002-5	香川県東かがわ市川東 原間池近くの池 (ため池)	2012.10.18	5
		N34° 13' 46.84" E134° 19' 53.83"		
セイロンフラスコモ, <i>N. megaspora</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	TKDO006	兵庫県宝塚市武田尾 (ため池)	2011.08.16	2
		N34° 53' 06.51" E135° 18' 10.33"		
	TKDO007	兵庫県宝塚市武田尾 (ため池)	2011.08.16	2
		N34° 54' 09.60" E135° 18' 49.80"		
	OITA-002-2	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (近接の湿地)	2011.10.07	3
		N33° 15' 22.39" E131° 27' 48.56"		
	EHM020-3	愛媛県今治市朝倉南 (ため池)	2011.10.19	5
		N33° 59' 30.98" E133° 01' 59.75"		

	HRSM001-6	広島県東広島市鏡山 鏡山公園 奥田大池 (ため池) N34° 24' 23.36" E132° 43' 43.05"	2011.10.25	1
	HRSM008	広島県東広島市鏡山西条町郷曾 (ため池) N34° 22' 04.03" E132° 42' 23.62"	2011.10.25	1
	HRSM013-3	広島県世羅郡世羅日町 (ため池) N34° 38' 34.49" E132° 55' 26.99"	2011.10.26	1
	TMNG503	栃木県宇都宮市上欠町 上欠沼 (ため池)	2012.07.29	1
	TMNG401	栃木県宇都宮市上欠町 上欠沼 (ため池) N36° 33' 06.80" E139° 49' 34.50"	2012.09.12	3
	EHM306	愛媛県南宇和郡愛南町増田 (ため池) N33° 18' 03.76" E132° 36' 38.55"	2012.10.17	5
	YAS001	大阪府貝塚市舊原箱谷 (ため池)	2012.12.01	2
チュウゼンジフラスコモ, <i>N. flexilis</i> var. <i>bifurcata</i> [絶滅種 (EX)]	YNK001-2	栃木県日光市湯元 湯ノ湖 (湖沼) N36° 48' 09.15" E139° 25' 17.76"	2012.08.16	2
	YNK007-2	栃木県日光市湯元 湯ノ湖 (湖沼) N36° 48' 02.87" E139° 25' 32.84"	2012.08.16	6
	SGN002	群馬県利根郡片品村東小川 菅沼 (湖沼) N36° 49' 32.71" E139° 22' 17.63"	2012.08.17	1
	SGN003	群馬県利根郡片品村東小川 菅沼 (湖沼) N36° 49' 24.20" E139° 22' 38.68"	2012.08.17	2
トガリフラスコモ, <i>N. acuminata</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	NSHR003	鹿児島県薩摩川内市祁答院町藺牟田池 (近接の湿地)	2011.09.04	2
	IZN001	宮城県登米市迫町新田 伊豆沼 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	3
	IZN002	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	3
	IZN003	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	3
	IZN005	宮城県登米市迫町新田 (埋土孢子より発芽)	2011.10.12	3
	EHM025-3	愛媛県今治市宅間 (ため池) N34° 05' 10.61" E132° 56' 55.06"	2011.10.19	5
	HS-120604-01-102	沖縄県八重山郡竹富町西表 N24° 23' 24.80" E123° 44' 54.80"	2012.06.04	4
	HS-120604-02-103-2	沖縄県八重山郡竹富町西表 N24° 22' 21.70" E123° 45' 11.60"	2012.06.05	3
	NIM003	福井県敦賀市樫曲 中池見湿地 (水田)	2012.07.26	1
	KMJM017-2	沖縄県島尻郡久米島町上江洲 (タイモ畑水溜まり) N26° 21' 27.91" E126° 45' 04.80"	2012.09.05	5
	KMJM017-3	沖縄県島尻郡久米島町上江洲 (タイモ畑水溜まり) N26° 21' 27.91" E126° 45' 04.80"	2012.09.05	5

	EHM406	愛媛県今治市桜井旦高麗池の下 (休耕田) N34° 00' 55.80" E133° 01' 47.24"	2012.11.02	5
ナガホノフラスコモ, <i>N. spiciformis</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	EHM203-2	愛媛県宇和島市三間町小沢川 (ため池) N33° 18' 16.49" E132° 37' 19.13"	2012.09.02	1
	EHM410	愛媛県伊予市三秋 (ため池) N33° 43' 04.26" E132° 41' 23.57"	2012.11.04	5
ニッポンフラスコモ, <i>N. japonica</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	EHM028-2	愛媛県今治市波方町樋口 (ため池) N34° 06' 02.38" E132° 56' 20.95"	2011.10.20	3
	TKDO002	兵庫県宝塚市武田尾 (ため池) N34° 53' 07.47" E135° 18' 04.62"	2011.08.16	2
	ISKW002-2	石川県珠洲市正院町川尻 (水田) N37° 26' 50.09" E137° 18' 23.11"	2011.09.21	3
	NSHR001-1	兵庫県豊岡市田結 (湿地) N35° 38' 19.79" E134° 51' 38.63"	2011.09.23	2
	NSHR002-2	兵庫県豊岡市田結 (放棄水田) N35° 38' 54.96" E134° 51' 32.54"	2011.09.23	3
	NSHR002-3	兵庫県豊岡市田結 (放棄水田) N35° 38' 54.96" E134° 51' 32.54"	2011.09.23	2
	OITA-002-3	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (近接の湿地) N33° 15' 22.39" E131° 27' 48.56"	2011.10.07	2
	OITA-002-4	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (近接の湿地) N33° 15' 22.39" E131° 27' 48.56"	2011.10.07	1
	HRSM007	広島県東広島市鏡山西条東北町 (水田側溝) N34° 26' 16.94" E132° 43' 54.67"	2011.10.25	3
	HRSM017-5	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 22.47" E132° 53' 24.10"	2011.10.27	1
	NIM002	福井県敦賀市檜曲 中池見湿地 (水田)	2012.07.26	1
	TMNG403	栃木県矢板市平野 (用水路) N36° 52' 01.70" E139° 52' 59.60"	2012.08.09	1
	EHM109-1d	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (ため池) N33° 35' 10.88" E132° 31' 59.76"	2012.08.27	1
	EHM207-2	愛媛県南宇和郡愛南町広見 () N32° 58' 37.27" E132° 38' 47.94"	2012.09.01	1
ハデフラスコモ, <i>N. pulchella</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	ISKW001-1	石川県小松市東山町 (ため池) N36° 22' 34.40" E136° 29' 09.52"	2011.09.20	3
	EHM015-2	愛媛県今治市孫兵衛作 (ため池) N33° 59' 21.85" E133° 03' 31.45"	2011.10.19	5
	EHM019-3	愛媛県今治市朝倉南 (ため池) N33° 59' 30.85" E133° 02' 02.36"	2011.10.19	3
	EHM020-4	愛媛県今治市朝倉南 (ため池) N33° 59' 30.98" E133° 01' 59.75"	2011.10.19	2
	EHM021	愛媛県今治市朝倉下 (ため池) N33° 59' 51.82" E133° 00' 27.87"	2011.10.19	4

ヒナフラスコモ, <i>N. gracillima</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	HRSM006	広島県東広島市鏡山西条東北町 (ため池) N34° 26' 17.54" E132° 43' 54.47"	2011.10.25	5
	HRSM016-3	広島県三次市島敷町 (ため池) N34° 49' 19.54" E132° 53' 18.82"	2011.10.27	1
	HRSM-AM179	広島県呉市安浦町下垣内 (ため池)	2011.09.23	1
	HRSM011-2	広島県三原市久井町坂井原 (ため池) N34° 28' 42.34" E133° 01' 39.06"	2011.10.26	4
	HRSM014	広島県世羅郡世羅日町 (ため池) N34° 38' 47.01" E132° 55' 06.87"	2011.10.26	1
	HS-120606-01-105-4	沖縄県石垣市登野城 N24° 23' 46.90" E124° 10' 11.20"	2012.06.06	5
	TMNG001	栃木県市貝町市塙 (水田脇水溜まり) N36° 31' 26.90" E140° 06' 09.70"	2012.06.20	5
ヒメフラスコモ, <i>N. flexilis</i> var. <i>flexilis</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	HGCH001	長野県大町市平木崎湖 (湖沼)	2011.07.25	2
	MRMT004	兵庫県たつの市揖西町龍子 (ため池)	2011.08.27	1
	KG009-2	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 36.64" E138° 44' 23.89"	2011.10.17	3
	EHM011-1	愛媛県西条市小松町安井 (ため池) N33° 51' 54.45" E133° 03' 14.50"	2011.10.18	5
	EHM023-2	愛媛県今治市矢田 (ため池) N34° 02' 25.02" E132° 57' 14.56"	2011.10.19	3
	EHM028-1	愛媛県今治市波方町樋口 (ため池) N34° 06' 02.38" E132° 56' 20.95"	2011.10.20	3
	EHM029	愛媛県今治市菊間町佐方 (ため池) N34° 02' 50.04" E132° 53' 30.74"	2011.10.20	3
	EHM030	愛媛県今治市菊間町種 (ため池) N34° 02' 13.16" E132° 52' 19.76"	2011.10.20	4
	HRSM018-1	広島県三次市島敷町 (ため池) N34° 49' 07.37" E132° 53' 39.50"	2011.10.27	4
	HRY001	滋賀県大津市琵琶湖湖面 (湖沼)	2012.05.29	5
	HYOG014	兵庫県三木市口吉川町久次 (ため池) N34° 52' 40.68" E135° 04' 18.89"	2012.06.29	10
	SPR012-2	北海道千歳市幌美内 支笏湖 (湖沼) N42° 48' 02.29" E141° 19' 37.62"	2012.07.17	5
	BIWA001-2	滋賀県大津市琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 58.09" E136° 02' 40.21"	2012.07.28	3
	BIWA002-2	滋賀県大津市琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 57.69" E136° 02' 40.33"	2012.07.28	5
	BIWA003-2	滋賀県大津市琵琶湖 (湖沼) N35° 23' 01.09" E136° 02' 45.40"	2012.07.28	4
	BIWA007-2	滋賀県大津市琵琶湖 (湖沼) N35° 20' 44.23" E136° 04' 25.61"	2012.07.28	-
	BIWA008	滋賀県大津市琵琶湖 (湖沼) N35° 21' 53.81" E136° 03' 51.14"	2012.07.28	-

	KG107-2	山梨県南都留郡富士河口湖町河口 河口湖 (湖沼)	2012.08.04	1
	KG109-3	山梨県南都留郡富士河口湖町大石 河口湖 (湖沼)	2012.08.04	1
	YM001-2	山梨県南都留郡山中湖村平野 山中 湖 (湖沼)	2012.08.04	1
	YM002-1b	山梨県南都留郡山中湖村山中 山中 湖 (湖沼)	2012.08.04	7
	YM002-2b	山梨県南都留郡山中湖村山中 山中 湖 (湖沼)	2012.08.04	7
	AM223	山口県山口市大内御堀 (ため池)	2012.08.31	5
	EHM401	愛媛県今治市波方町西浦 (ため池)	2012.11.02	2
	EHM407-1	愛媛県西予市宇和町田苗真土 (ため 池)	2012.11.03	5
	EHM409-1	愛媛県伊予市稲荷 (ため池)	2012.11.04	4
フタマタフラスコモ種群, <i>N. furcata-inversa</i> species complex [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	E-Fuji1	愛媛県今治市 (ため池)	2011.10.20	1
	EHM204	愛媛県南宇和郡愛南町御荘長月 ()	2012.09.01	3
	EHM208	愛媛県南宇和郡愛南町御荘平城 (休 耕田)	2012.09.01	5
	HS-120930-01	石川県小松市	2012.09.30	3
	EHM302	愛媛県南宇和郡愛南町御荘平城 (水 田側溝)	2012.10.16	5
	EHM303	愛媛県南宇和郡愛南町城辺甲 (水 田)	2012.10.16	5
		N32° 57' 17.16" E132° 34' 13.31"		
フラスコモダマシ, <i>N. imahorii</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	AICH066n-2	岐阜県諏訪町天ヶ峰 (ため池)	2011.08.03	2
	ISKW001-3	石川県小松市東山町 (ため池)	2011.09.20	3
	AICH101	愛知県知多郡美浜町 (水田付近湧 水)	2012.03.03	7
	AICH102	愛知県知多郡美浜町 (水田付近湧 水)	2012.03.03	7
	AICH103	愛知県名古屋市中志段味才 井戸流 ()	2012.04.17	3

ホンフサフラスコモ, <i>N. pseudoflabellata</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	TKDO001-1	兵庫県宝塚市武田尾 (水田側溝) N34° 53' 08.35" E135° 18' 07.72"	2011.08.16	2
	MRMT001	兵庫県加東市 (ため池)	2011.08.20	2
	KDN001	岡山県高梁市龍王池 (ため池)	2011.09.02	2
	ISKW004-2	石川県珠洲市三崎町伏見 (ため池) N37° 27' 14.30" E137° 20' 57.35"	2011.09.21	3
	KYT001	京都府京都市西京区大原野灰方町 蓮池(日正寺) (ため池)	2011.09.28	1
	OITA-001-4	大分県別府市枝郷 神楽女湖 (ため池) N33° 15' 18.15" E131° 27' 54.13"	2011.10.07	3
	EHM019-2	愛媛県今治市朝倉南 (ため池) N33° 59' 30.85" E133° 02' 02.36"	2011.10.19	5
	EHM020-2	愛媛県今治市朝倉南 (ため池) N33° 59' 30.98" E133° 01' 59.75"	2011.10.19	3
	HRSM003	広島県東広島市鏡山八本松町原 (ため池) N34° 25' 36.09" E132° 41' 16.21"	2011.10.25	3
	HRSM011-4	広島県三原市久井町坂井原 (ため池) N34° 28' 42.34" E133° 01' 39.06"	2011.10.26	3
	HRSM013-2	広島県世羅郡世羅日町 (ため池) N34° 38' 34.49" E132° 55' 26.99"	2011.10.26	2
	HRSM017-2	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 22.47" E132° 53' 24.10"	2011.10.27	3
	HRSM019	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 14.81" E132° 53' 45.41"	2011.10.27	1
	HRSM021	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 30.88" E132° 53' 42.37"	2011.10.27	3
	TMNG501	栃木県宇都宮市上欠町 上欠沼 (ため池)	2012.07.29	1
	TMNG502	栃木県宇都宮市上欠町 上欠沼 (ため池)	2012.07.29	1
	MRMT005	愛知県日進市藤島町長塚 岩藤新池 の湿地 (湿地) N35° 09' 07.40" E137° 04' 41.22"	2012.08.10	3
	EHM109-1b	愛媛県大洲市戒川 戒川一番池 (ため池) N33° 35' 10.88" E132° 31' 59.76"	2012.08.27	7
	EHM110-1	愛媛県大洲市戒川 戒川二番池 (ため池) N33° 35' 06.33" E132° 31' 59.89"	2012.08.27	5
	EHM110-2	愛媛県大洲市戒川 戒川二番池 (ため池) N33° 35' 06.33" E132° 31' 59.89"	2012.08.27	7
ミノリノフラスコモ, <i>N. mirabilis</i> var. <i>mirabilis</i>	TTR012-3	鳥取県鳥取市大塚 (ため池) N35° 28' 57.86" E134° 09' 40.20"	2012.09.19	5
	MRMT006	愛知県日進市藤島町長塚 岩藤新池 (近接の湿地)	2012.10.08	1
	ISKW001-2	石川県小松市東山町 (ため池) N36° 22' 34.40" E136° 29' 09.52"	2011.09.20	3

[情報不足 (DD)]				
	HGCH002	長野県信濃町御鹿池 (ため池)	2011.09.25	3
ミルフランスコモ, <i>N. axilliformis</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	AICH054	三重県松阪市飯南町深野 (水田) N34° 29' 23.86" E136° 24' 10.94"	2011.08.01	1
	GNM028	群馬県邑楽郡邑楽町中野 (水田側溝) N36° 16' 17.05" E139° 28' 55.30"	2011.08.21	1
	GNM030	群馬県邑楽郡邑楽町鶴新田 (水田側溝) N36° 15' 15.02" E139° 29' 17.72"	2011.08.21	1
	GNM034	群馬県高崎市浜川町 (水田) N36° 21' 41.73" E138° 58' 53.02"	2011.08.22	1
	EHM005-2	愛媛県西条市飯岡 (水田) N33° 55' 10.18" E133° 14' 10.28"	2011.10.18	2
	EHM025-2	愛媛県今治市宅間 (ため池) N34° 05' 10.61" E132° 56' 55.06"	2011.10.19	3
	HRSM015-3	広島県世羅郡世羅日町 (水溜まり) N34° 38' 47.75" E132° 55' 07.17"	2011.10.26	1
	BIWA009-2	滋賀県高島市新旭町饗庭 (水田) N35° 22' 30.80" E136° 02' 23.69"	2012.07.28	5
	IZU001-2	神奈川県小田原市下大井 (水田) N35° 18' 56.05" E139° 09' 42.86"	2012.08.04	-
	MSM001-2	静岡県三島市谷田 (水田) N35° 07' 06.06" E138° 55' 47.50"	2012.08.04	1
	EHM108-2	愛媛県西条市丹原町高知 水田地帯 (水田) N33° 55' 19.62" E133° 03' 08.39"	2012.08.26	2
	EHM205-2	愛媛県宇和島市津島町岩松 () N33° 07' 00.48" E132° 30' 55.87"	2012.09.01	3
	MRMT003	兵庫県たつの市揖西町龍子 (ため池)	2011.08.27	2
モリオカフランスコモ, <i>N. moriokae</i> [情報不足 (DD)]	EHM100-4	愛媛県西条市安用 (水路) N33° 55' 21.36" E133° 03' 02.98"	2012.03.28	5
	EHM100-5	愛媛県西条市安用 (水路) N33° 55' 21.36" E133° 03' 02.98"	2012.03.28	5
	EHM108-3	愛媛県西条市丹原町高知 水田地帯 (水田側溝) N33° 55' 19.62" E133° 03' 08.39"	2012.08.26	5
	TTR008	島根県安来市伯太町安田関 (ため池) N35° 22' 37.48" E133° 18' 42.04"	2012.09.18	3
和名無し(日本新産), <i>N. tumulosa</i>	HIGA004	沖縄県沖縄市池原 () N26° 23' 28.25" E127° 48' 40.97"	2012.03.22	5
	HIGA304	沖縄県国頭郡恩納村谷茶肥前川 (湿地) N26° 27' 12.17" E127° 49' 31.87"	2012.05.04	3
	HS-130306-01	沖縄県国頭郡恩納村谷茶 肥前川	2013.03.06	3
	HS-130307-03	沖縄県沖縄市池原	2013.03.07	3

		N26° 23' 28.70" E127° 48' 41.20"		
フラスコモ属の新規系統1, <i>Nitella</i> sp. 1	HS-120606-01-105-2c	沖縄県石垣市登野城 N24° 23' 46.90" E124° 10' 11.20"	2012.06.06	1
	HS-120606-01-105-3	沖縄県石垣市登野城 N24° 23' 46.90" E124° 10' 11.20"	2012.06.06	4
フラスコモ属の新規系統2, <i>Nitella</i> sp. 2	HRSM018-2	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 07.37" E132° 53' 39.50"	2011.10.27	1
	EHM501	愛媛県四国中央市金町町半田 (ため池) N33° 59' 12.55" E132° 36' 44.68"	2012.11.12	3
フラスコモ属の新規系統3, <i>Nitella</i> sp. 3	HRSM016-2	広島県三次市畠敷町 (ため池) N34° 49' 19.54" E132° 53' 18.82"	2011.10.27	2
フラスコモ属の新規系統4, <i>Nitella</i> sp. 4	AICH070	岐阜県多治見市諏訪町北ノ洞 (ため池) N35° 18' 25.24" E137° 04' 52.59"	2011.08.03	2
フラスコモ属の新規系統5, <i>Nitella</i> sp. 5	EHM102-2	愛媛県西条市中西新開 水田地帯 (水田側溝) N33° 54' 19.79" E133° 10' 08.53"	2012.08.26	3
フラスコモ属の新規系統6, <i>Nitella</i> sp. 6	TMNG204	栃木県壬生町助谷 天神沼 (ため池) N36° 28' 42.00" E139° 48' 06.00"	2012.07.27	1
フラスコモ属の新規系統7, <i>Nitella</i> sp. 7	TMNG205	栃木県那須烏山市森田 (水田) N36° 38' 44.70" E140° 07' 27.40"	2012.07.31	1
フラスコモ属の新規系統8, <i>Nitella</i> sp. 8	BIWA001-3	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 58.09" E136° 02' 40.21"	2012.07.28	3
フラスコモ属の新規系統9, <i>Nitella</i> sp. 9	MRMT007	愛知県日進市藤島町長塚 岩藤新池 (近接の湿地)	2012.10.08	1
ホシツリモ, <i>Nitelopsis obtusa</i> [絶滅危惧I類 (CR+EN)]	KG002-1	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 50.16" E138° 44' 06.75"	2011.10.16	3
	KG003	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 43.73" E138° 46' 24.10"	2011.10.16	3
	KG004-1	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 45.95" E138° 45' 59.08"	2011.10.17	3
	KG005	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 31' 04.79" E138° 46' 11.65"	2011.10.17	3
	KG006-1	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 31' 18.47" E138° 45' 27.97"	2011.10.17	4
	KG009-3	山梨県南都留郡富士河口湖町 (湖沼) N35° 30' 36.64" E138° 44' 23.89"	2011.10.17	2
	BIWA002-3	滋賀県大津市 琵琶湖 (湖沼) N35° 22' 57.69" E136° 02' 40.33"	2012.07.28	4
	YM002-2e	山梨県南都留郡山中湖村山中 山中湖 (湖沼) N35° 25' 13.22" E138° 51' 17.00"	2012.08.04	2

Biodiversity Informatics and Development of *Ex-situ* Conservation Techniques of Endangered Species: A Case Study on Charalean Algae

Principal Investigator: Hidetoshi SAKAYAMA

Institution: Department of Biology
Graduate School of Science
Kobe University, 1-1 Rokkodai
Nada-ku, Kobe 657-8501, JAPAN
Tel: +81-78-803-5723 / Fax: +81-78-803-5723
E-mail: hsak@port.kobe-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Biodiversity, Taxonomy, DNA barcoding, Cryopreservation, *Ex-situ* conservation

The charalean algae form dense mat below macrophyte-zone in the lakes, which are referred to as a “charalean meadow”, and have an important role for the maintenance of transparency in the freshwater bodies. However, eutrophication of lake waters and exploitation and alteration of coastal zones of lakes has led to a decline in charalean vegetation in many lakes.

Species identification of charalean algae is generally difficult and only experts such as taxonomists and trained technicians can identify taxa accurately, because it requires special skills acquired through extensive experience, leading difficulties on conservation studies of freshwater ecosystems. Moreover, *ex-situ* conservation of charalean algae, especially endangered species, is important, because they grow in the habitats affected by human activities.

In this study, specimens of charalean algae were collected throughout Japan and the database of their species and gene sequence information were constructed. Moreover, the species identification system based on DNA barcoding and cryopreservation techniques of charalean algae were established. These biodiversity informations, species identification systems and cryopreservation techniques of charalean algae will contribute the conservation studies of freshwater ecosystems.

RFd-1102: 絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発: 車軸藻類を例に
神戸大学(坂山 英俊)

