

東海大学大学院令和3年度博士論文

東南アジアにおけるクラゲ類の分類, 集団遺伝
および初期生活史に関する研究

指導 西川 淳 教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

飯田 茜

目次

第1章. 東南アジアで漁獲されている根口クラゲ類, ヒゼンクラゲ *Rhopilema hispidum* およびミノクラゲ *Lobonemoides robustus* の遺伝的多様性

1-1 序論	1
1-2 材料・方法	3
1-2-1 試料採集	3
1-2-2 DNA抽出	3
1-2-3 ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析	4
1-2-4 核 DNA (nDNA) の解析	5
1-2-5 データ解析	6
1-2-6 形態観察	8
1-3 結果	8
1-3-1 ヒゼンクラゲ <i>Rhopilema hispidum</i>	8
1-3-2 ミノクラゲ <i>Lobonemoides robustus</i>	10
1-4 考察	12
1-4-1 ミトコンドリア DNA と核 DNA の遺伝的多様性	12
1-4-2 2種の個体群の歴史の推定	13
1-4-3 2種の集団遺伝構造パターンの形成メカニズム	14

第2章. ヒゼンクラゲとミノクラゲの初期生活史における好適環境の推定

2-1 序論	18
2-2 材料・方法	20
2-2-1 試料の採取およびポリプのバッチ飼育	20
2-2-2 実験	20
2-2-3 データ解析	22
2-3 結果	23
2-3-1 ヒゼンクラゲ <i>Rhopilema hispidum</i>	23
2-3-2 ミノクラゲ <i>Lobonemoides robustus</i>	25
2-4 考察	27
2-4-1 ポリプ期の無性生殖様式	27
2-4-2 両種の好適環境	30
2-4-2-1 塩分	30
2-4-2-2 水温	31
2-4-3 ポリプにおける好適環境範囲から推定される両種の生息域	32

第3章. ベトナムで新たに発見された <i>Blackfordia</i> sp. (ヒドロ虫綱, 軟クラゲ目) の形態学的観察と分子生物学的手法を用いた分類学的検討	
3-1 序論	34
3-2 材料・方法	35
3-2-1 試料採集	35
3-2-2 形態学的観察	36
3-2-3 遺伝子解析	36
3-3 結果	38
3-3-1 形態学的観察	38
3-3-2 遺伝子解析	39
3-4 考察	40
3-4-1 <i>Blackfordia</i> の分類学的歴史	40
3-4-2 形態学的検討	41
3-4-3 分子生物学的手法を用いた検討	43
3-4-4 ベトナム産 <i>Blackfordia</i> sp. の分類学的検討	43
3-4-5 ベトナム産 <i>Blackfordia</i> sp. の原産地の推定	44
第4章. 総合考察	
4-1 東南アジアにおける大型クラゲ類 2 種のブルーム形成メカニズム	46
4-2 ヒゼンクラゲとミノクラゲの持続的な利用のための提言	48
要旨	51
謝辞	55
引用文献	56
図表	

第 1 章. 東南アジアで漁獲されている根口クラゲ類, ヒゼンクラゲ *Rhopilema hispidum* および ミノクラゲ *Lobonemoides robustus* の遺伝的多様性

1-1. 序論

クラゲ類の大量発生(ブルーム)は世界中の様々な海域で報告されている(Brotz et al. 2012, Condon et al. 2013 など). これらクラゲ類のブルームは, しばしば観光, 漁業, 養殖, 発電といった人間活動に悪影響を及ぼしている(Purcell et al. 2007). その一方で, ブルームを起こす一部の種は商業的に漁獲され, 食料, 薬品, 化粧品に利用されている(Kingsford et al. 2000, Omori & Nakano 2001, Omori & Kitamura 2004, Nishikawa et al. 2008, 西川ら 2009, Richardson et al. 2009, Nishida & Nishikawa 2011, López-Martínez & Álvarez-Tello 2013, 藤井ら 2014, Gul et al. 2015, Nishikawa et al. 2015, Brotz & Pauly 2017, 西川ら 2019, Behera et al. 2020).

根口クラゲ類のヒゼンクラゲ *Rhopilema hispidum* (Vanhöffen, 1888) とミノクラゲ *Lobonemoides robustus* Stiasny, 1920 は, 東南アジアにおいて重要な漁獲対象種として知られている(Nishikawa et al. 2008, 西川ら 2019, Kitamura & Omori 2010). ヒゼンクラゲは, インド, 中国, 日本, 東南アジアからパキスタン, 紅海といった熱帯から亜熱帯域の海域で確認されており, ベトナム, タイ, マレーシア, パキスタンで漁獲されている(Fig. 1-1A. Omori & Nakano 2001, Nishikawa et al. 2008, 西川ら 2009, 2019, Kitamura & Omori 2010, Gul &

Morandini 2015). 一方、ミノクラゲは、ベンガル湾から東南アジア地域に分布し、マレーシア、タイ、フィリピンで漁獲されている (Fig. 1-1B. Kramp 1961, Kitamura & Omori 2010, Nishida & Nishikawa 2011, Kondo et al. 2014, 西川ら 2019). 両種は、東南アジア地域の様々な海域でブルームを起こし、漁獲を通して地域経済にも大きく貢献している (例えば、Nishikawa et al. 2008). しかしながら、これらの種に関する生物学的研究は極めて限られており、各地域でブルームを起こしている個体群が遺伝的にどのような構造やつながり (連結性) をもつかについては明らかにされていない. 東南アジア一帯でブルームするこれら漁獲対象種の遺伝的多様性に関する情報は、ブルームを起こすメカニズムの解明につながるだけでなく、遺伝的多様性の保全という側面においても重要な示唆を与えると考えられる.

東南アジア地域は、世界で最も生物の多様性が高い地域のひとつであり (Hoeksema 2007, Bellwood et al. 2012), これには地域の複雑な地形や地史が関係している (Hall 2002). 特に、更新世紀の氷期、間氷期サイクルにおいて、海水面が下降した時期にスンダランドと呼ばれる大陸が東南アジア一帯に形成された結果 (Voris 2000), インド-太平洋間における海洋生物の移動は大きく制限され、隠蔽種レベルだけでなく種分化レベルの変異を引き起こしたことが明らかになっている (例えば、Gaither & Rocha 2013). また、氷期終了後、海水面の上昇に伴い個体群の分散が生じ、その結果としてインド洋と太平洋の個体群の分布が重複したことが、本地域が高い多様性を示す一因といわれている (Hoeksema 2007, Gaither & Rocha 2013).

本研究では、東南アジアの広範囲でブルームを起こすヒゼンクラゲ、ミノクラゲ両種の地域個

体群の遺伝構造を解析し、これらの種の遺伝的多様性を明らかにするとともに、個体群間の遺伝的な繋がりを推定することを目的とした。さらに、遺伝的多様性の空間的パターンを形成したと考えられる要因について考察した。加えて、遺伝構造解析の結果に基づき、一部地域個体群間で形態比較を行った。

1-2. 材料・方法

1-2-1. 試料採集

クラゲの組織は、2010年から2018年にかけて東南アジア地域の4か国11地点で採集した(Fig. 1-2, Table 1-1)。各地域の場所・時間において、成熟したクラゲを漁船から網ですくって採集するか、クラゲ漁船が帰港した際に港にて採集した。採集後、傘または口腕の組織を99%エタノールで保存し、DNA抽出を行うまで -30°C で保存した。クラゲ組織は水分量が多くDNAの保存状態に影響を及ぼす場合があるため、エタノールの交換を複数回行った。

1-2-2. DNA抽出

DNA抽出は、Puregene Core Kit A (QIAGEN社製)を用いて行った。東海大学海洋学部の研究室においてエタノール固定した組織の一部を切り取り、Cell Lysis Solution 300 μL とProteinase-K 5 μL に浸し、 37°C で一晩または 55°C で2時間インキュベートした。さらに、Protein Precipitation Solution 100 μL を加えてタンパク質を凝集させた後、遠心分離機を用い

て 15000 G, 15 分間遠心して沈殿させ, 上澄みとして DNA 溶液を分離した. 分離して得た DNA 溶液に 100%プロパノール 300 μ L を添加し, -20°C で 30 分以上冷却した. 遠心分離機で DNA を沈殿させ, 上澄みを捨て 70%エタノール 600 μ L で洗浄した. 再び遠心分離機で DNA を沈殿させ 70%エタノールを除去し, 乾燥させたのち TE-buffer 100 μ L で溶解して冷蔵保存した.

1-2-3. ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 解析は, cytochrome oxidase *c* subunit I (COI) 領域を対象とした. プライマーは, ヒゼンクラゲでは既知の LCOjif (Dawson 2005) と HCO2198 (Folmer et al. 1994) を使用した. ミノクラゲについては, 上記プライマーでは安定して増幅できなかったため, 新たに設計したプライマーを用いた (LorCOL: 5'-TTTGGCGCCTTCTCGGCCATG-3', LorCOH: 5'-TCCTGCAGGGTCAAAGAAAG-3'). ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は, T100 Thermal Cycler (Bio Rad 社) を使用し, 反応サイクルは 95°C 2 分で行った後, 95°C 30 秒, $50\text{--}55^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72°C 1.5 分を 30–35 サイクル, 最終伸長反応として 72°C 5 分で行った. PCR 反応液は, 1 試料あたり蒸留水 8.925 μ L, 10 \times EX buffer 1.5 μ L, dNTP 1.5 μ L, 各プライマー 1.5 μ L, Ex Taq HS 0.075 μ L の組成で作製した. 得られた PCR 産物 3 μ L と蛍光標識ミドリグリーン (日本ジェネティクス社製) 1 μ L を混合したものを, 2%アガロースゲル上で 100 V, 15 分間電気泳動を行い, 増幅されたことを目視で確認した.

PCR 産物の精製は、Exo-Sap-IT (USB 社製) を用いて行った。サイクルシーケンスの反応液は、蒸留水 7 μL , 5 \times Sequencing buffer 1.5 μL , フォワード側プライマー 0.5 μL , BigDye (ABI 社製) 1 μL , PCR 産物 0.5 μL で作製した。サーマルサイクラーの条件は、96 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒, 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ 2 分 30 秒で 40 サイクル行った。サイクルシーケンス済みの PCR 産物は 125 mM EDTA を含む 99% エタノールにより沈殿し, 70% エタノールでリンスした後, 風乾 (95 $^{\circ}\text{C}$, 5 分) した。その後, 乾燥した配列試料に Hi-Di TM Formamide (ABI 社製) を 15 μL 加え, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分で熱変性させた後, 直ちに氷冷し遮光した。精製した PCR 産物試料は, 東海大学生命科学統合支援センターにおいて DNA シークエンサー (ABI 3500xl, ABI 社製) を用いて塩基配列の解読を行った。本研究で得られた両種の塩基配列は, DNA Data Bank of Japan (DDBJ) を通して, National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank に登録した (アクセッション番号: LC517112–LC517159, LC519498–LC519552)。

1-2-4. 核 DNA (nDNA) の解析

核 DNA (nDNA) は ITS1 領域を対象とし, プライマーセット jfITS1-5f と jfITS1-3r (Dawson & Jacobs 2001) を使用した。PCR は, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 分を行った後, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 分を 35 サイクル, 最終伸長を 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 分で行った。ヒゼンクラゲとミノクラゲの塩基配列は, Gene Bank にそれぞれアクセッション番号 LC520246–LC520250 と LC520240–LC520245 で登録した。

ミノクラゲの ITS1 は、変異が多かったため、TOPO TA クローニングキットを使用して 5 試料をクローニングした。しかしながら、ITS1 フラグメントは、挿入/欠失を 2 か所含んでおり、安定した配列を得るのが困難だった。そこで、挿入/欠失 1 か所ずつ挟むように新たなプライマーセット、LorITS1F1 (5'-CGGAAGGATCATTACCGAAC-3') と LorITS1R1 (5'-CAGTCCTCGGTCAGTAAGTCAG-3'), LorITS1F2 (5'-GCCACTGTGAACTTGTACCC-3') と LorITS1R2 (5'-CGCACACTCGTACACAGCTA-3') を作成し、試料が 30 以上あるマレーシアの MB, タイの TA, フィリピン PL でフラグメント解析を行った (Fig. 1-3 参照)。フォワードプライマーには、FAM (5'-GCCTCCCTCGCGCCA-3') または PET (5'-CGGAGAGCCGAGAGGTG-3', Blacket et al. 2012) を、リバースプライマーには、pig-tail (5'-GTTTCTT-3', Brownstein et al. 1996) の配列を加えた。フラグメント解析の PCR は、1 試料あたり総量 10 μ L とし、蒸留水 5.35 μ L, 10 \times EX buffer 1 μ L, dNTP 1 μ L, 各フォワードプライマー (5 mM) 0.2 μ Ls, 各リバースプライマー (5 mM) 0.4 μ L, FAM, PET プライマー 0.2 μ L, Ex Taq HS 0.05 μ L, テンプレート DNA 1 μ L で作成した。PCR サイクルは、95 $^{\circ}$ C 3 分の後、95 $^{\circ}$ C 30 秒, 59 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒を 45 サイクル, 最終伸長反応 72 $^{\circ}$ C 5 分で行った。フラグメントサイズは、500 LIZ size standards を基準にし、Peak Scanner ver. 3.0.2 を使用して確認した。

1-2-5. データ解析

得られた塩基配列は、ソフトウェア MEGA ver. 6 (Tamura et al. 2013) を用いて目視で確認し

た. ハプロタイプ数の確認とハプロタイプネットワーク解析用のファイル変換をオンラインツール FaBOX (Villesen 2007) で確認し, ハプロタイプネットワーク図をソフトウェア TCS ver. 1.21 (Clement et al. 2000) を用いて作成した. ハプロタイプ多様度 (h) および塩基多様度 ($\pi\%$) は, ソフトウェア Arlequin ver.3.5 (Excoffier & Lischer 2010) で算出した. 地域間の遺伝的差異は, 1000 置換による遺伝的分化指数 (Φ_{ST}) を算出し (Arlequin 使用), ボンフェローニ補正を行った上で検討した. さらに, Tajima's D とミスマッチ分布分析から, 個体群の拡大の有無についての推定 (Rogers & Harpending 1992) を行った (Arlequin 使用). ヒゼンクラゲの COI については, 地理的距離 (沿岸距離) と遺伝的距離 (Φ_{ST}) の関係を Mantel テストによって検討した. また, ミノクラゲの試料が 30 以上ある地域間 (MB, TA, PL) の遺伝的距離を木村 2 パラメータモデル (K2P, Kimura 1980) を用いて算出した (MEGA 使用). なお, ヒゼンクラゲの VT は, 試料数が不十分であったことから, 解析から除外した.

ヒゼンクラゲの ITS1 対立遺伝子ネットワーク図は, TCS によって作成した. ミノクラゲの ITS1 フラグメントは, Peak Scanner ver. 3.0.2 (ABI) によって確認した. 得られたデータから, Structure Ver.2.3.4 (Pritchard et al. 2000) を用いて, 祖先集団数 (K) の推定と各地域個体群の遺伝的構造解析を行った. K の推定は, $K = 1$ から $K = 11$ で行い, 分析は 3 回繰り返し, 平均した. マルコフ連鎖・モンテカルロ法 (MCMC) および burn-in は, それぞれ 10000 回繰り返して行った. 得られた結果は, Structure Harvester Web ver.0.6.93 (Earl & von Holdt 2012) にインプットし, 対数尤度 [LnP(D)] が最大となる K が最もあてはまりがよい個体群数であるとみな

した.

1-2-6. 形態観察

遺伝的構造解析結果に基づき、タイとフィリピンで採集されたミノクラゲの標本を用いて形態の比較を行い、形態的差異の有無を検討した。クラゲ試料は、2017年8月25日にフィリピン、Lagen Island (PL, Fig. 1-2)と、2018年7月27日にタイ、Phetchaburi (TP2, Fig. 1-2)で採取した。採集したクラゲは、現地で傘を約1/2または1/4に切断した後、5%中性ホルマリン海水で固定した。ホルマリン試料は、研究室にて Dawson (2005) および Scorrano et al. (2017) を参考に21の項目について、各部位の計測を行った (Fig. 1-4)。なお、PLの試料全で縁弁と口腕が欠損していたため、測定しなかった。また、縁弁と外傘突起は、構造がもろく欠損が多かったため、できるだけ状態の良い部分を選択して測定した。各試料の体サイズが異なるため、比較は各測定値を傘径 (bell diameter, BD) に対する相対値 (% of BD) に変換したもので行った。クレード間の形態形質の差異を、ソフトウェア JMP13, SAS 社を用いて、一元配置分散分析 (One-way ANOVA) または t 検定により統計学的に検討した。

1-3. 結果

1-3-1. ヒゼンクラゲ *Rhopilema hispidum*

COI 配列解析により、東南アジア6地域の189試料 (509 bp) から、計48のハプロタイプが

確認された。ネットワーク図による解析では、2つのクレードが確認された(Fig. 1-5A)。メインクレード(クレード Ra)は、全ての地域の個体群を含み、祖先型ハプロタイプを中心とした星形のネットワーク図を示した。もう一方のクレード(クレード Rb)は、主にマレーシア(MK)の個体群から構成され、ベトナム(VD, VD2, VT)の個体群は含まれなかった。各地域のハプロタイプ多様度(h)は、0.749(TSA)から0.879(VD)、塩基多様度(π)は、0.259(VD2)から0.506(MK)の値を示した(Table 1-1)。

ヒゼンクラゲの地域個体群間の遺伝的分化指数 Φ_{ST} は、-0.005(VD vs. VD2)から0.145(MK vs. VD2)の範囲を示した(Table 1-2A)。それらは、近接地域間では有意差はなかったが、ベトナム個体群(VD, VD2)と、地理的に離れたマレーシア(MK)あるいはタイ南部(TS)の個体群との間には有意差が認められた($p < 0.05$)。また、地域間の遺伝的距離と地理的距離の間には有意な正の相関関係が認められた(スピアマンの順位相関, $\rho = 0.718$, $p < 0.01$ 。

Fig. 1-6)。Tajima's D は、有意に負の値を示した($D = -2.291$, $p < 0.001$)。全個体群におけるミスマッチ分布分析の実測値は、急速に個体群が拡大した時の予測値と有意差はなかった(Fig. 1-7, Sum of Squared deviation $S = 0.005$, $p = 0.051$, Harpending's Raggedness index $hr = 0.039$, $p = 0.404$)。各地域個体群ごとに解析を行ったところ、タイの3つの個体群(TS, TP, TSA)では、有意差は認められなかった($S > 0.002$, $p > 0.570$, $hr > 0.021$, $p > 0.928$)。また、マレーシア(MK)では有意差は認められなかったが($S = 0.034$, $p = 0.274$, $hr = 0.066$, $p = 0.634$)、二峰型を示した。一方、ベトナム(VD および VD2)には有意差が認められなかった

(Fig. 1-7A, $VD:S = 0.016$, $p = 0.010$, $hr = 0.115$, $p = 0.010$. $VD2:S = 0.012$, $p = 0.006$, $hr = 0.116$, $p = 0.006$).

ITS1 領域の解析は、59 試料で行い、1 試料あたり 349 bp が得られた。対立遺伝子は、5 タイプ確認されたが (Fig. 1-8)、地域ごとまたは COI で得られたクレードごとに分化することはなかった。

1-3-2. ミノクラゲ *Lobonemoides robustus*

ミノクラゲの採集地域は、ヒゼンクラゲの採集地域(生息域)とは異なっており、タイ Phetchaburi (TP, TP2) のみで重なった (Fig. 1-2, Table 1-1)。ミノクラゲの COI 配列の解析は、5 地域 144 試料、568 bp について行い、57 のハプロタイプを検出した (Fig. 1-5B)。ハプロタイプネットワーク図解析では、マレーシア (MB) を主としたクレード La、タイ Suk Samran (TA) を主としたクレード Lb、フィリピン Legan Island (PL) を主としたクレード Lc の 3 つのクレードに分けられた。クレード La と Lb は、星形のネットワーク図を示した。ハプロタイプ多様度 (h)、塩基多様度 ($\pi\%$) は、それぞれ 0.600 (PC) から 0.824 (PL)、0.147 (TA) から 1.174 (TP2) の範囲を示した (Table 1-1)。各地域間の Φ_{ST} は、-0.036 (TP vs. TP2) から 0.882 (TA vs. PC) の範囲を示し、TP vs. TP2 を除いて有意差が認められた (Table 1-2B, $p < 0.001$)。Tajima's D は、MB と TA では有意な負の値を示した ($p < 0.05$)。ミスマッチ分布分析は、MB, TA, TP2, PL で行い、全ての地域で実測値と予測値の間に有意差は無かった ($p > 0.16$) が、PL と TP2 は、異なる

る個体群の二次的接触を示唆する三峰形を示した(Fig. 1-7B). K2Pによる各地域間の COI の遺伝距離は, MB-PL 間で $3.26 \pm 0.69\%$, TA-PL 間で $3.09 \pm 0.65\%$, MB-TA 間で $0.828 \pm 0.30\%$ であった.

3 地域(MB, TA, PL)における ITS1 領域の構造解析では, LnP(D)は $K = 3$ で最大となった. K の最大値前後の値も示すと, PL は $K = 2-4$ の全てで異なる構造であることが示された(Fig. 1-9). 一方, MB と TA は, $K = 2$ の時は同一の構造となったが, $K = 3$, $K = 4$ の場合は一部の個体を除いて異なる構造を示した.

ミノクラゲは地域ごとに遺伝的な独自性を示したので, 試料が得られたクレードごとに形態解析を行った. 形態を解析したミノクラゲ試料は, クレード La に属するタイ(TP)5 個体, クレード Lb に属するタイ(TP)10 個体, フィリピン(PL)のクレード Lc に属する 5 個体, である. 各クレードの平均傘径は, La が 265.1 ± 51.5 mm, Lb が 237.6 ± 37.3 mm, Lc が 271.0 ± 62.2 mm であった(Table 1-3). 外傘(固定標本)は, 半透明もしくは白色で, 外傘突起は, La および Lb で細長く伸長した膜状のものが多く, La および Lc の各 1 個体のみで円錐形のものが観察された(Fig. 1-10A, B). また, 放射水管数, 縁弁突起数は, 全てのクレード内で個体により大きくばらついた. 特に PL(クレード Lc)の 1 試料では明らかに平衡胞の間隔が異なる奇形が観察され, 平衡胞間の縁弁突起数が少なかった. 複数のミノクラゲでは, 固定後でも傘に紫色の点が存在する試料が見られた. 色素は, 放射水管上以外の筋肉部分に存在する場合は 2 個体(Clade La:1 個体, Lc:1 個体, Fig. 1-10D), 縁弁にのみ存在する場合は 3 個体(Lb:2 個

体, Lc:1 個体, Fig. 1-10E), 平衡胞周辺にのみ存在する場合は 4 個体 (La:1 個体, Lb:2 個体, Lc:1 個体, Fig. 1-10F), 筋肉と縁弁に存在する場合は 1 個体 (La) 確認できた.

傘径以外の形態についてクレード間で比較をおこなったところ, 傘の厚さ(筋肉部分, f4), 傘上突起の幅(f8)と長さ(f9), 口腕羽状部分(f18)で有意差が認められたが(Table 1-3, One-way ANOVA, $p \leq 0.012$), それ以外の項目についてはクレード間で有意差は認められなかった.

1-4. 考察

1-4-1. ミトコンドリア DNA と核 DNA の遺伝的多様性

本研究では, ミトコンドリア DNA の COI 領域と核 DNA の ITS1 領域を使用して解析を行った. これらの遺伝マーカーは鉢虫類の集団遺伝的研究によく使用されているが, ITS1 領域の塩基置換数は COI 領域の報告と比較して少ない傾向にあった(Stopar et al. 2010, Ramšak et al. 2012, Dong et al. 2016). この傾向は, 本研究で対象としたヒゼンクラゲの結果でも認められた. また, ヒゼンクラゲとミノクラゲのハプロタイプ多様度は, これまで報告されている他の根口クラゲ目の範囲から大きく外れることは無かった(Table 1-4, Dawson & Hamner 2005, Ramšak et al. 2012, Lee et al. 2013, Glynn et al. 2015, Dong et al. 2016, Gotoh et al. 2017). 一方, ミノクラゲの塩基多様度は, 他の鉢虫類の報告と比較して高い値を示した. これは, タイ(TP2)のように複数クレードで出現した地域があるためと考えられた(Fig. 1-5B).

1-4-2. 2種の個体群の歴史の推定

ヒゼンクラゲでは、全ての地域の個体群が含まれるクレード **Ra** が検出され、近接地域間で遺伝的な繋がりがあることが示唆された。一方、クレード **Rb** は、マレーシア (**MB**) とタイ (**TS**, **TP**, **TA**) の個体群のみで構成されており、**MB** のミスマッチ分布分析では二峰形を示した。これらのことから、クレード **Ra** とは遺伝的に異なる個体群 (クレード **Rb**) との二次的接触が示唆された。クレード **Rb** の起源は不明だが、本種はインド洋などでも分布が確認されていることから (Gul & Morandini 2015)、本研究の対象地域外から移入してきた可能性が考えられた。タイの個体群におけるミスマッチ分布分析では、実測値と急激な個体群の拡大を経験した場合の予測値との間に有意差は認められず、過去に急激な個体群の拡大を経験したことが示唆された。一方、ITS1 では、COI でみられたような地域間、クレード間で遺伝的構造の差異は認められなかった。鉢虫類ではミトコンドリア DNA より核 DNA の変異が遅いことが知られているため (Stopar et al. 2010, Ramšak et al. 2012, Dong et al. 2016)、ITS1 領域では、地域個体群間で遺伝的分化が進んでいなかった可能性が考えられた。

ヒゼンクラゲの遺伝的構造とは対照的に、ミノクラゲの COI 領域における Φ_{ST} は、TP vs. TP2 以外の全ての地域で有意差が認められ、核 DNA でも同様の傾向が認められた。COI 領域におけるクレード **La** とクレード **Lb** 間の塩基置換数は比較的少なく、各クレードの主要である **MB** と **TA** 間の **K2P** は約 1% だった。一方、クレード **Lc** は、比較的高い塩基置換数を示し、

主要地域である PL とその他の地域 (MB, TA) との K2P は共に約 3% を示した. Ortman et al. (2010) によると, 木村 2 パラメータ (K2P) による鉢虫綱, ヒドロ虫綱, 箱虫綱の種内の遺伝距離は, 5.7% 以下であると報告されており, ミノクラゲのクレード間の K2P は種内変異の範囲内であった. また, ミノクラゲのクレード間での形態比較を行ったところ, 外傘突起の長さや幅, 傘の筋肉部分の厚さ, 口腕羽状部分では有意差が認められたが (Fig. 1-4, Table 1-3), その他の全ての形態的特徴では有意差は認められなかった (Table 1-3). 有意差の認められた外傘突起と口腕羽状部分は, 破損が多く完全な状態のものが少なかった. また, 輸送時に圧力がかかったことにより外傘突起と傘の厚さが変形した可能性があり, 厳密な比較には不適當であると考えられた. これら形態的特徴と K2P による遺伝距離の結果から, 本研究で認められたミノクラゲの地域個体群間の遺伝的構造の違いは, 種間変異というよりは種内変異であると考えられた.

1-4-3. 2 種の集団遺伝構造パターンの形成メカニズム

本研究では, ヒゼンクラゲは採集地域全体で距離による遺伝的隔離 (isolation-by-distance, IBD) を示し, 近接地域間で遺伝的連続性をもつことが示唆された. 一方, ミノクラゲは各地域間での遺伝的隔離が示され, 2 種で異なる遺伝的多様性を示した. 海洋環境は, 更新世紀 (1 万から 250 万年前) における氷期, 間氷期サイクルによって変化し, 海洋生物の遺伝構造にも影響を与えてきた (Janko et al. 2007, Bowen et al. 2016, Choo et al. 2021). 特に, 東南アジア

海域では、氷期に発生した海水面の低下により、スンダランドと呼ばれる大陸が形成された (Fig. 1-2B, Voris 2000). スンダランドが存在していた期間には、海洋生物のインドー太平洋間の交流は制限され、南シナ海沿岸は大型河川からの淡水流入の影響を受けていた (Voris 2000, Sathiamurthy & Voris 2006). これらの環境変化はクラゲ類のメデューサ期(浮遊生活期)だけでなく、海底などに付着して生活するポリプ期の分布にも大きく影響を与えたと推測される。海水面下降期の間、ヒゼンクラゲの各地域の個体群の多くは共に南シナ海に分布域を移動したと考えられた (Fig. 1-2B, 青矢印)。一方、ミノクラゲは、それぞれアンダマン海、南シナ海、スールー海の3つの地域にわかれて移動したと推定される (Fig. 1-2B, 青矢印)。このことから、本研究の採集地域は限定的ではあるが、更新世の海水面変動にともなう2種の分布域の移動パターンの違いが、遺伝子構造の違いの要因のひとつである可能性が示唆された。また、スンダランドは、インド洋と太平洋を分断することによって、両種の分断を促進し、アンダマン海にクレード Rb および Lb が形成されたと考えられた。氷期が終了し海水面が現在と同程度になるにつれ、両種が現在の分布域に分散し、アンダマン海と南シナ海の個体群がマレー半島周辺で混合したのかもしれない。スンダランドによるインドー太平洋の分断にともなう遺伝的分断や姉妹種の報告は、チョウチョウオやカイアシ類でも報告されている (例えば, Fleminger 1986, Benzie 1998, Gaither & Rocha 2013)。

ミノクラゲのフィリピンの個体群で構成されたクレード Lc は、他のクレードから比較的離れたハプロタイプ群を示した (Fig. 1-5B)。また、PL の mismatch 分布分析は、異なる個体群との2

次の接触が示唆された (Fig. 1-7B). フィリピン, パラワン島東部には Wallace's Line と呼ばれる生物学的境界がある (Fig. 1-2B, Huxley 1868, Whitmore 1981). この海域には広大な大陸棚は無く, 境界線の東側には大型河川が存在しなかったため, Wallace's Line 東側の環境変化は, 南シナ海と比べて限定的であったと考えられている (Kakioka et al. 2018). 本研究で Wallace's Line 付近で確認されたクレード Lc は, フィリピン周辺にあったリフュージアから広がった可能性がある. 類似した傾向を示す海洋生物として, タカクラタツ *Hippocampus trimaculatus* (トゲウオ目, ヨウジウオ科) はフィリピン-オーストラリア系統が他地域と高い遺伝的分化を示し, 小さな孤立した個体群に分かれていることが示唆されている (Lourie & Vincent 2004).

本研究で明らかになった根口クラゲ類 2 種の対照的な遺伝的構造パターンは, 完新世の海洋環境と両種の分散能力の違いによっても補強された可能性がある. 東南アジア地域は, モンスーン気候のため季節的に流向が変わる大きい流速の海流が存在する (Fig. 1-2A, Wyrski 1961). ヒゼンクラゲの漁場, すなわち本種がブルームを形成する地域の多くは, この強い逆転する流れが存在する地域である. また, タイランド湾内のヒゼンクラゲ個体群 (TS, TSA, TP) は互いに類似した遺伝構造をもち (Table 1-2A), 湾内で個体群の混合が起こっていることが示唆された. 各地域の漁師の経験によれば, タイランド湾にクラゲが出現するのは, モンスーン風が関係しており, 特に南西モンスーンの時期にタイランド湾東部および北部で多くみられるといわれている (西川ら 2019). また, タイランド湾以外の漁場では, 各地域の漁業時期が異

なり、マレーシア Kukup では 1 年中ミノクラゲの漁業がおこなわれている。これらのことから、ヒゼンクラゲは海流によって輸送されている可能性が考えられ (Table 1-4, Omori & Kitamura 2004, 西川ら 2008, 2019, Nishida & Nishikawa 2011), このことが近接地域間の遺伝的接続性に繋がっているのかもしれない。一方、ミノクラゲの採集地域は、海流が比較的弱く、輸送による分散が起こりにくい可能性がある。また、両種の遊泳速度には、有意差は認められなかったが、ヒゼンクラゲでより高いという予備結果が得られている (ヒゼンクラゲ: $4.05 \pm 2.13 \text{ m min.}^{-1}$, ミノクラゲ: $2.45 \pm 2.00 \text{ m min.}^{-1}$, 近藤ら 未発表)。このような両種の生物学的特性の違いも分散能力および遺伝構造に影響を与えている可能性が考えられた。

第2章. ヒゼンクラゲとミノクラゲの初期生活史における好適環境の推定

2-1. 序論

鉢虫綱根口クラゲ目に属するクラゲ類は、真正世代交代をおこなう (Fig. 2-1). まず、浮遊世代のクラゲ成体(メデューサ)がおこなう有性生殖により受精卵が生じ、それらはプラヌラ幼生となる。プラヌラ幼生は水中を遊泳したのち基質に着底し、ポリプに変態する。ポリプは底生(付着)世代であり、様々な様式の無性生殖により増殖する。また、ストロビレーションと呼ばれる横分裂により、個々のポリプからエフィラ幼生を発生させる。エフィラ幼生は水中を遊泳し、成長、メデューサとなる (Fig. 2-1). このように、有性生殖を行う浮遊世代と無性生殖を行う付着世代を交互に繰り返す生活史特性をもつことから、水中のメデューサの個体群動態は、ポリプの無性生殖によるエフィラ幼生生産能に依存する (Feng et al. 2018, Schnedler-Meyer et al. 2018).

ポリプの無性生殖様式は種によって異なる。鉢虫綱に属するクラゲ類の多くは、ポリプの根元や走根といった組織から新たなポリプが形成される出芽や、休眠能力のあるキチン質に覆われた組織の断片、ポドシストを形成し、そこから脱シストによって新たなポリプを発生させる様式が知られている。また、イボクラゲ科の多くは、遊泳能力のある組織、プラヌロイドを形成し新たなポリプを発生させる。ストロビレーションも1度に複数のエフィラ幼生を産生するポリディスクタイプと、1度に1個体のエフィラ幼生しか産生しないモノディスクタイプの大きく2つの様式が知られている。これらの無性生殖様式は、1種で1つではなく、1種が複数の無性生殖様式

をもち、環境によって変えることも知られている(Han & Uye 2010, Fuentes et al. 2011 など). しかしながら、個体群動態にとって重要なこのポリプ期に関する研究は、メデューサ期に比べて少ないのが現状である(Mills 2001, Tronolone et al. 2002, Miyake 2004).

これまで、中緯度域でブルームを形成する鉢クラゲ類については、ポリプ期における好適環境、環境変化の推定や影響に関する研究がいくつかの種で行われ、水温や摂餌量、餌の質が無性生殖の様式や生産数に関わっていることが明らかになっている(Purcell 2007, Purcell et al. 2012, Schiariti et al. 2014, Feng et al. 2015, Wang et al. 2015, Widmer et al. 2016). また、塩分や照度、溶存酸素といった環境条件も無性生殖や生存に影響することが少数の種で報告されている(Purcell et al. 2009, Holst & Jarms 2010, Conley & Uye 2015, Dong et al. 2015). 一方、熱帯域における鉢クラゲ類の生態やポリプ期の好適環境に関する研究は、ブルームを形成し漁獲対象となる種が存在するにも関わらず、非常に限られているのが現状である.

前章では、ヒゼンクラゲとミノクラゲの集団遺伝構造解析を行い、両種で個体群の遺伝構造パターンが異なることが明らかになり、生息海域の環境や生物学的特性(遊泳速度など)の違いを反映していることが示唆された. 一方、飼育が困難なこともあり、両種の生息に好適な環境に関する知見はなく、ポリプ期の無性生殖様式や成長、エフィラ放出数といった初期生活史における基礎的な情報すら限られている. そこで、本章では、飼育実験を通して、これら2種の初期生活史、特にポリプ期における生物学的特性と好適環境を解明することを目的とした.

2-2 材料・方法

2-2-1. 試料の採取およびポリプのバッチ飼育

実験に用いたヒゼンクラゲとミノクラゲのポリプは、タイ国ブラパ大学の Cha-Am Station 前の海域 (Fig. 2-2) で採取した成体から同施設でプラヌラ幼生を放出させ、それらを着底させることにより得た。得られたポリプは、丸型 V 式容器 V-2 (内径:78 mm, 高さ:24 mm, アズワン社製) に複数個体を同時に収容し、30 mL の海水でバッチ飼育した。飼育海水は、人工海水マリンアート BR (大阪薬研社製) を蒸留水で希釈したものを使用した。飼育時の水温、塩分は、成体が採取された環境にあわせ、ヒゼンクラゲでは水温 30°C, 塩分 30, ミノクラゲでは水温 30°C, 塩分 15 とした。また、飼育はインキュベーター (クールインキュベーター A1201, 生田産業社製, 精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$) で暗条件で行った。餌は、2 日に 1 回、孵化したてのアルテミア幼生 (ベトナム産) を十分な量を給餌し、給餌 3 時間後に水替えと飼育容器の掃除を行った。また、この飼育期間中にポリプの無性生殖様式の観察を行った。この条件で両種ともに安定的にポリプを飼育することに成功したことから、増殖したポリプを用いて好適環境範囲を推定するための実験を行った。

2-2-2. 実験

実験に供したポリプは、上述したバッチ飼育容器の中から無性生殖によって新たに増殖した個体を用いた。それらをプラスチック製の 6 穴プレートの 1 穴につき 1 個体ずつ収容し、水量

約 5 mL, 暗条件で, 温度計を入れた冷温庫 (VERSOS 社製, 20 L) で飼育した. 2 日に 1 回, 孵化したてのアルテミア幼生 (ベトナム産) を十分な量を給餌し, 給餌 3 時間後に水替えと飼育容器の掃除を行った. 両種のポリプは, 2-3 日毎に塩分または温度を 2.5 ずつ変化させていき, 順化させたのちに実験を行った.

体サイズおよび無性生殖における塩分, 水温の好適範囲と影響を調べるため, 異なる塩分と水温のもとで 2 種のポリプの飼育実験を行った. 好適な塩分範囲を調べる実験 (以下, 「好適塩分実験」) では, 塩分 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 の 7 段階の実験区を設け, 水温は採集時の水温である 30°C で行った. また, 水温の好適範囲を調べる飼育実験 (以下, 「好適水温実験」) では, 水温 15, 20, 25, 30, 35°C の 5 段階の実験区を設け, 塩分は採集時の塩分である 30 (ヒゼンクラゲ), または 15 (ミノクラゲ) で行った. 各実験区で 11-18 個体のポリプを用いた.

それぞれの実験において, 2 種のポリプの成長を調べるために, 2 日に 1 回, 実体顕微鏡下でマイクロメーターを用いて, 比較的計測が容易でしばしば飼育研究で用いられているポリプの口盤直径 (Mouth Disc Diameter: 以下, MDD と略す) を 0.05 mm の精度で計測した. 同時に, ポリプの無性生殖による増殖 (以下「芽体産生」) が確認された場合は, それを計数した. 計数後, 新たな芽体は移動させ, それらによる環境変化が起こらないようにした. 実験期間中, ヒゼンクラゲではストロビレーションが観察されたため, 放出エフィラ数, ストロビレーション期間 (ストロビラ初期からエフィラ幼生完全放出まで) を記録した. 実験は, 途中で死亡した個

体を除き, 35 日間継続した. 以後, 初日を 1 日目, 最終日を 35 日目と呼ぶ.

2-2-3. データ解析

各実験系における実験開始時のポリブの MDD は, 両種ともばらつきがみられた. この MDD のばらつきを補正するため, 計測した MDD を実験開始時の MDD を 1 とした相対 MDD に変換し, 実験区間の比較を行った. 各環境条件における体成長, 無性生殖の影響を調べるため, 各実験区での平均成長速度 (mm d^{-1}) を以下の式で算出した.

$$\text{平均成長速度} = \frac{(\text{35 日目の平均 MDD} - \text{1 日目の平均 MDD})}{35}$$

また, 最終的な死亡率は以下の式で算出した.

$$\text{死亡率} = \frac{\text{実験期間中の累積死亡数}}{\text{実験に供したポリブ数}}$$

「体成長, 無性生殖は塩分および水温の影響を受けない」という帰無仮説を設定し, 各実験区における第 35 日目の平均相対 MDD と平均積算芽体産生数について, 統計学的検定を行った. 検定には, 一元配置分散分析 (One-way ANOVA) とそのポストホックテストである Tukey-Kramer test を用いた.

ヒゼンクラゲについては, ストロビレーション数と期間を実験区間で比較するため, ストロビラ 1

個体あたり 1 日あたりの回数 ($\text{times day}^{-1} \text{strobilla}^{-1}$) に変換した。また、相対 MDD とポリプ 1

個体あたりの遊離エフィラ数の関係を Spearman の順位相関を用いて検討した。

すべての統計学的検定には、ソフトウェア JMP13 (SAS 社) を用いた。

2-3 結果

2-3-1. ヒゼンクラゲ *Rhopilema hispidum*

ヒゼンクラゲの芽体産生は、基本的にポドシストと呼ばれる、キチン質に覆われたシストの産生によって行われた (Fig. 2-3A)。ポドシストは、ポリプが体側面から伸ばした走根で移動した後に残された。伸ばした走根は 1 回につき 1 本であり、1 個体で複数回産生を行っていた。ポドシストの脱シストは、飼育環境によって異なり、低塩分 (15–25) の環境下ではポドシスト産生の 2 日後には脱シストしているのが確認された。

好適環境推定実験前のバッチ飼育中のポリプで、ポリプ上部 (口部) が横に分裂して脱落し、エフィラ幼生にならず数日浮遊した後、別の場所に着底、新たなポリプとなった事例が 3 例観察された (Fig. 2-3C, D, E)。また、残ったポリプ下部 (茎部) は、3 日後には触手や口が再生し、元の形態のポリプに戻った。

好適塩分実験では、実験期間を通して全ての実験区で供試個体は少なくとも 3 個体は生存したが、塩分 5, 10 の実験区では高い死亡率 (0.75 と 0.67) を示した (Table 2-1)。一方、塩分 15–35 の実験区では、死亡率は比較的 low (0–0.17)、塩分 15 では全ての供試個体が生存し

た。体サイズ(平均相対 MDD)は、塩分 10–35 では飼育日数とともに増加がみられ、平均成長速度は $0.001\text{--}0.014\text{ mm d}^{-1}$ を示した (Fig. 2-4A, Table 2-1)。一方、塩分 5 では飼育時間とともに体サイズは減少し、平均成長速度も負の値 (-0.004 mm d^{-1}) を示した。各塩分の実験区における実験開始 35 日後の平均相対 MDD は、0.68 (塩分 5) から 2.60 (塩分 15) の範囲を示し、塩分 10–30 の実験区で有意に高い成長を示した (Fig. 2-5A, One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。各実験区の 35 日間の平均積算芽体産生数は、塩分 5 で最低値 ($0\text{ podocysts polyp}^{-1}$)、塩分 20 で最大値 ($5.73\text{ podocysts polyp}^{-1}$) を示し、塩分 10–30 で有意に高い産生数を示した (Fig. 2-6A, One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。

一方、好適水温実験では、実験期間中全ての水温条件で本種のポリプ個体の多くが生存し、死亡率は $0\text{--}0.08$ と低かった (Table 2-2)。体サイズは、実験初期には全ての実験区で増加したが、21 日目以降に 35°C の体長は減少傾向に変化し、平均成長速度も 0.002 mm d^{-1} と低かった (Table 2-2, Fig. 2-7A)。その他の実験区では、体サイズは、実験期間を通して概ね増加傾向を示し、平均成長速度も 0.006 mm d^{-1} (15°C) から 0.009 mm d^{-1} ($20, 25^{\circ}\text{C}$) と比較的高い値を示した。各水温実験区における 35 日後の平均相対 MDD は、1.20 (35°C) から 2.60 (30°C) の範囲にあり、 $15\text{--}30^{\circ}\text{C}$ で有意に高い値を示した (Fig. 2-8A, One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。水温実験区における平均積算芽体産生数は、 15°C で最低値 ($0\text{ podocysts polyp}^{-1}$)、 30°C で最大値 ($4.75\text{ podocysts polyp}^{-1}$) を示し、 $25, 30^{\circ}\text{C}$ の実験区で高い生産数を示した (Fig. 2-9A)。

実験期間中、ストロビレーションが確認された (Fig. 2-2B)。ストロビレーションは、1 度に複数のエフィラ幼生を発生させるポリディスクタイプであり、走根を伸ばしてポドシストを生産している途中でストロビレーションを起こした個体も確認された。また、実験期間中に複数回ストロビレーションを行う個体も確認された。ストロビレーションは、塩分 10–30 および水温 20–30°C の実験区で確認され、それぞれ塩分 25 と水温 20°C の実験区で最大回数を示した (Fig. 2-10)。また、ストロビレーション個体の MDD とエフィラ放出数の間には有意な正の相関が認められた (Fig. 2-11, Spearman の順位相関, $\rho = 0.507, p < 0.001$)。

2-3-2. ミノクラゲ *Lobonemoides robustus*

ミノクラゲの芽体放出は、出芽によって行われ、側方出芽と走根出芽が観察された (Fig. 2-3F, G)。側方出芽は多くの場合で観察され、親ポリプの根元から直接ポリプが出芽した。この出芽方法では、親のポリプが移動しないため、その周辺に高密度のポリプコロニーが形成された。走根出芽では、走根によって親ポリプが移動し、移動した後に新たなポリプが形成されるため、側方出芽ほど高密度にならなかった。本種の 2 つの出芽様式のどちらが行われるか、何によって決まるのかについては明確にできなかった。また、ヒゼンクラゲでみられたようなポドシストの形成は、本種では確認されなかった。ストロビレーションは、バッチ飼育中に 4 回確認された。2 回は塩分低下時、2 回は実験終了後、ポリプを維持していた期間中に起こった (塩分 15, 水温 30°C, 週 1 回の給餌)。ストロビレーションが起こった条件に明確な共通点はみら

れなかった。

塩分実験区において、本種は全ての塩分条件で生存した(Table 2-1)。死亡率は、塩分 5 で最大を示し(0.25)、塩分 10, 15, 35 では 0 であった。体サイズ(平均相対 MDD)は、塩分 5 を除き飼育日数とともに増加がみられた(Fig. 2-4B)。また、平均成長速度は、塩分 5 で負の値(-0.004 mm d^{-1})をとり、塩分 30 で最大値(0.008 mm d^{-1})を示した(Table 2-1)。実験 35 日目の平均相対 MDD は、0.73(塩分 5)から 1.90(塩分 10)の値を示した(Fig. 2-5B)。また、塩分 10–30 の実験区で有意に高い値を示し、塩分 35 でも比較的高い値を示した(One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。

ポリプあたりの平均積算芽体産生数は、塩分 15 で最大値($12.67 \text{ buds polyp}^{-1}$)、塩分 5 で最低値($0 \text{ buds polyp}^{-1}$)を示し、塩分 15 と 20 の実験区で有意に高い生産数を示した(Fig. 2-6B, One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。

好適水温実験において、本種は 20–35°C の実験区で生存個体がみられたが、15°C では 21 日目に全ての供試個体が死亡した(Fig. 2-7B, Table 2-2)。平均成長速度は、20°C で最低値(0.001 mm d^{-1})をとり、30°C で最大値(0.008 mm d^{-1})を示した(Table 2-2)。実験 35 日目の平均相対 MDD は、1.14(20°C)から 1.55(30°C)の値を示し、水温の上昇と共に増加する傾向を示したが、20–35°C の実験区間で体サイズに有意な差は認められなかった(Fig. 2-8B)。平均積算芽体産生数は、30°C の実験区で最も多く、20 および 25°C の実験区では有意に産生数が低かった。また、35°C では芽体産生は確認されなかった(Fig. 2-9B, One-way ANOVA with

Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

2-4. 考察

2-4-1. ポリプ期の無性生殖様式

本章で対象としたヒゼンクラゲおよびミノクラゲについては、これまで東南アジアにおいて浮遊世代(メデューサ)の分布域や出現時期(漁期) (Omori & Nakano 2001, Nishida & Nishikawa 2011 西川ら 2019 など), 形態 (Kitamura & Omori 2010), 共生生物 (Kondo et al. 2014) などの研究はあるが, 飼育による成長, 生態に関する生物学的特性を調べた研究は極めて限られている. 特に, ミノクラゲについては同科の他種も含め初期生活史についての知見は得られておらず, 本研究で本種の安定的な飼育に成功したことにより, 初めて主要な無性生殖方法が明らかになった.

ヒゼンクラゲの主要な無性生殖方法はポドシストによるものであり, ポドシストの形成はエチゼンクラゲ (*Nemopilrma nomurai*), ビゼンクラゲ (*Rhopilema esculentum*), アカクラゲ (*Chrysaora pacifica*) やユウレイクラゲ (*Cyanea nozakii*) など鉢クラゲ類の複数種で報告されている (Ding & Chen 1981, Kawahara et al. 2006, Dong et al. 2008). ポドシストは, クチクラの外皮に覆われているため不適な環境に対し耐性が高いことが報告されており (Arai 2008, Kawahara et al. 2013, Thein et al. 2013), ヒゼンクラゲのポリプも不適な環境をポドシストで過ごし, 好適な環境になると脱シストする戦略をもつと考えられる. ヒゼンクラゲのポドシストの脱シストは塩分 15-

25 で比較的多く観察され、ポドシスト生産後 2 日以内に脱シストが起こったこともあった。低塩分下における脱シストは、同じ *Rhopilema* 属のヒゼンクラゲでも確認されており (Lu et al. 1997), 低塩分環境が本種のポドシストの脱シスト条件の 1 つである可能性が高い。なお、実験に使用していないバッチ飼育のポリプにおいて、ポリプ上部(口部)が横に分裂し、浮遊したのち着底し新たなポリプとなった。残ったポリプ下部(茎部)にも触手や口が再生し、元の形態のポリプに戻った (Fig. 2-3C, D, E)。このような増殖様式は、これまで鉢クラゲ類で報告例が無く、今回初めて明らかになった。この現象が観察されたのは、バッチ飼育中の水温、塩分の変化が無い期間であった。飼育期間中 3 回しか確認されておらず、観察例は限られるが、ポリプの移動や再生力に重要である可能性がある。

ヒゼンクラゲのストロビレーションは、ポリディスクタイプであり (Fig. 2-3B), ストロビレーションと同時にポドシスト生産をすることも観察された。ポリディスクタイプのストロビレーションは、同じ根口クラゲ目のヒゼンクラゲやエチゼンクラゲ、*Rhopilema nomadica*, *Rhizostoma pulmo* など多くの種で確認されている (Ding & Chen 1981a, Lotan et al. 1992, Kawahara et al. 2006, Fuentes et al. 2011)。亜熱帯、亜寒帯に生息する鉢クラゲ類のストロビレーションの誘発条件は、多くの場合水温変化であり、その種が生息する海域の冬期または初春の水温低下を経験すると起こることが多いとされる (Han & Uye 2010, Wang et al. 2014, Feng et al. 2015)。一方、本研究におけるヒゼンクラゲのストロビレーションは、20–30°C で確認され、バッチ飼育中の水温、塩分が不変の環境下でも観察された。また、予備実験として給餌を行わないで飼育した場

合(35日間)はストロビレーション, ポドシスト生産のどちらも観察されなかった. 同様の傾向は, カラージェリーフィッシュ (*Catostylus mosaicus*), *Rhopilema nomadica* でも確認されている (Lotan et al. 1992, Pitt 2000). これに関して, ストロビレーションと芽体産生の間には, エネルギー分配の問題があり, 芽体産生よりストロビレーションの方が必要なエネルギー量が多いことが示唆されており (Treible & Condon 2019), ヒゼンクラゲでも同様に得られるエネルギー量によって行う無性生殖様式を変化させている可能性が示唆される. また, 本研究では, ヒゼンクラゲにおいてポドシスト生産とストロビレーションが同時に確認された. 芽体産生とストロビレーションを同時に行うことは, *Rhizostoma pulmo* (水温 21°C, 塩分 37–38, 週 2 回給餌) でも確認されている (Fuentes et al. 2011).

ミノクラゲは 2 種類の出芽による無性増殖を行うことが明らかになった. また, 本種では, ポドシストの形成は確認出来なかった. 出芽による増殖は鉢クラゲ類では一般的であり, ミズクラゲなど多くの種で報告されている. 本種もヒゼンクラゲ同様, 塩分 15, 水温 30°C, で給餌を約半年間止めると出芽が確認されなかったことから, 餌が乏しいときには芽体産生は行わないと考えられた.

ミノクラゲのストロビレーションは, 実験期間外に 4 回のみ確認された. 1 回は塩分順化中, 残り 3 回は実験後の個体維持のために水温・塩分一定, 週 1 回給餌の低餌量環境下で発生した. そのため, どのような環境条件・環境変化がストロビレーション条件であるかについては明確にすることはできなかったが, 水温や塩分の変化以外の環境変化が大きく関わっている

可能性がある。また、観察されたストロビレーションのうち 1 回は十分に成長していないポリプで発生し、ストロビレーション後にポリプは死亡した。3 回のストロビレーションでは、ポリプが十分に成長しており、エフィラ幼生遊離後もポリプは生存した。ストロビレーションは、1 回につき 1 個体のエフィラを放出するモノディスクタイプであり、この様式はイボクラゲ科で多く観察されているが(Holst et al. 2007, Dawson & Hamner 2009, Helm 2018)、今回ミノクラゲでみられた出芽とモノディスクタイプのストロビレーションという無性生殖の組み合わせは、他の根口クラゲでは確認されておらず、本種がユニークな無性生殖様式をもつことが明らかになった。

2-4-2. 両種の好適環境

2-4-2-1. 塩分

本研究では、ヒゼンクラゲのポリプは塩分 10–30 の実験区で比較的高い体成長を示し、特に低塩分の 15 で最も高い成長を示した(Fig. 2-12)。また、ポドシスト生産数も塩分 10–20 で高く(塩分 20 で最大)、体成長と同様に低塩分で好適であった。一方、ミノクラゲでは、体成長は塩分 10–30 で比較的高く、低塩分(10)で最も高い値を示した。無性生殖が好適であった塩分範囲はヒゼンクラゲと比べて狭く、平均積算出芽数は、塩分 15 で最も高かった。鉢クラゲ類は、初期生活史であるポリプ期に河口域や沿岸域といった場所の基質に付着して底生生活を送るため、低塩分への耐性が比較的高いことが知られている(Purcell et al. 1999, Purcell 2007, Holst & Jarms 2010, Dong et al. 2015)。例えば、バルト海で確認される *Aurelia aurita* s. l., ア

オクラゲ (*Cyanea lamarckii*), キタユウレイクラゲ (*Cy. capillata*) は, 塩分 15 以上でプラヌラの着底が確認されている (Holst & Jarms 2010). また, 日本海のエチゼンクラゲのポリプ期では, 塩分 10 でも高い生存率を示し, 塩分 30 と大差ない成長を示した (Dong et al. 2015). 高塩分への耐性については報告が少ないが, エチゼンクラゲのポリプ期は, 塩分 30 以上で生存率が有意に低くなる (Dong et al. 2015). また, バルト海における鉢クラゲのポリプ期は, 塩分 36 でも増殖することがわかっている (Holst & Jarms 2010). 本研究で得られたヒゼンクラゲとミノクラゲのポリプ期の体成長, 無性生殖における好適塩分範囲は, 他の鉢クラゲ類と類似し, 低塩分 (ただし, 塩分 10 以上) で好適であり, これら 2 種は沿岸域の環境に適応していることが示唆された.

2-4-2-2. 水温

ヒゼンクラゲの好適水温実験では, 体成長は 20–30°C の範囲で好適で, 特に 30°C で最も高かった. また, 15°C でも成長する個体がみられた. 一方, ミノクラゲでは 20–35°C で高い体成長を示し, 15°C では全て死亡した. 無性生殖に関しては, 両種とも 30°C で最も好適であり, 顕著な違いはみられなかった. 鉢クラゲ類の水温耐性については, 分布域によって異なることが知られている (Widmer et al. 2016, Höhn et al. 2017). また, これらクラゲ類は, 生息環境の水温より高温側に耐性をもつ傾向があり, 冬期の低水温によって分布範囲が制限されていることがいくつかの種で示唆されている (Purcell et al. 2012). 例えば, アメリカ大陸沿岸に生息

する *A. aurita* s.l., アトランティックシーネットル (*Chrysaora quinquecirrha*), アメリカヤナギクラゲ (*Ch. fuscescens*) の 3 種は, 自然界と同じ水温変化範囲で飼育すると, 高温であるほど無性生殖数が増加, 低温になるほど低下した (Thein et al. 2013). また, Purcell et al. (2012) は, 世界各地の *Aurelia aurita* の温度耐性比較し, バルト海産の個体では 14, 21°C で生存率が高いのに対し, 台湾産では 14°C で生存率が低くなり, 紅海産では 20, 25°C で高くなる傾向にあったことを報告し, 地域によって個体群の温度耐性が異なることを示唆している. なお, これら各地域の *Aurelia aurita* は, Dawson & Jacobs (2001) や Scorrano et al. (2017) などの遺伝解析をはじめとした研究により, 現在では別種(もしくは隠蔽種)とされている. 本研究のヒゼンクラゲとミノクラゲは, 中緯度域に生息する鉢クラゲ類より高い水温 (30°C) で成長, 無性生殖ともに最も好適であり, 熱帯・亜熱帯域に適応した種であることが示唆される. ただし, ヒゼンクラゲのポリプは, ミノクラゲのポリプと比較して低温 (15°C) でも成長できたことから, 中緯度域でも本種のポリプは生息可能であることが推測される. 実際, 中国や日本の有明海でヒゼンクラゲのメデューサは出現し漁獲されており (Omori & Kitamura 2004, Kitamura & Omori 2010), 周辺海域にポリプが生息していると考えられる (ポリプの自然環境での分布域は現在のところ不明である).

2-4-3. ポリプにおける好適環境範囲から推定される両種の生息域

本研究で得られたヒゼンクラゲのポリプの好適環境の結果から, 本種は低塩分で幅広い温

度帯で成長し、無性生殖をおこなうことが明らかになり、本種は熱帯、亜熱帯の沿岸域に生息できることが示唆された。また、ミノクラゲは、低塩分、高水温で好適であることから、熱帯域の沿岸域に適応して生息できることが示唆された。これまでに判明しているヒゼンクラゲの浮遊世代(メデューサ)の分布域は、東南アジアやアラビア海といった熱帯域から、日本の有明海といった亜熱帯域まで幅広い水温帯で確認されている。一方、ミノクラゲの浮遊世代(メデューサ)は、東南アジアを中心とする熱帯域のみで確認されており(Omori & Nakano 2001, Omori & Kitamura 2004, Kanagaraj et al. 2008, Nishikawa et al. 2008, Kondo et al. 2014, Gul & Morandini 2015)、本研究で示されたポリプ期の好適環境は、これまでに報告されているメデューサの分布域とおおむね一致していることが明らかになった。

第3章. ベトナムで新たに発見された *Blackfordia* sp. (ヒドロ虫綱, 軟クラゲ目) の形態学的観察と分子生物学的手法を用いた分類学的検討

3-1. 序論

Blackfordia 属 (ヒドロ虫綱, 軟クラゲ目) は, Mayer (1910) によって記載された. 本属の主な形態的特徴としては, 4本の放射水管をもち, それらは生殖腺により完全に包まれていること, 傘縁に多数の触手が存在すること, 触手の中は空洞であり触手基部には傘縁から指状の突起が貫入することが挙げられる. 現在, この属は *Blackfordia virginica* Mayer, 1910 と *Blackfordia polytentaculata* Hsu & Chin, 1962 の2種が認められている (World Register of Marine Species, Schuchert 2020). 一方, 属の模式種であり World Register of Marine Species では *B. virginica* のシノニムとされている *B. manhattensis* Mayer, 1910 も記載されているが, 形態的なあいまいさから, 本種を *B. virginica* のシノニムと断定はできないとする研究もあり (Bouillon et al. 1988), 分類的な不確実性を含んでいる.

Blackfordia virginica (マメヨドクラゲ) は, 熱帯から亜寒帯域各地の汽水域で発見されており (例えば, Genzano et al. 2006, Bardi & Marques 2009, Chícharo et al. 2009, Freire et al. 2013, Faasse & Melchers 2014, Toyokawa & Fujii 2015, Jaspers et al. 2018), 世界中へ移入された歴史などからしばしば科学的注目を集めてきた種である (Zaitsev & Öztürk 2001, Graham & Bayha 2008). しかしながら, 本種の原因国は未だ不明であり (Leppäkoski et al. 2009), 米国

で行われた集団遺伝解析では米国沿岸以外の場所、黒海またはその他の地域から移入したと示唆されるにとどまっている (Harrison et al. 2013)。

東南アジアにおけるクラゲ類調査の際に、ベトナムにおいて本属のクラゲ類の出現が初めて確認された。本章では、ベトナム産 *Blackfordia* sp. の形態学的、分子生物学的解析を行い、従来報告されている *Blackfordia* 属の形態、遺伝配列のデータと比較することにより、分類学的位置を検討した。

3-2 材料・方法

3-2-1 試料採集

試料の採集は、2017年12月5日、2018年6月9日にベトナム国ニャチャン付近の Thuy Trieu Lagoon、2019年7月30日にハイフオンの Lach Huyen River 河口で行った (Fig. 3-1, Table 3-1)。両地点での採集は、陸または傭船からプランクトンネット (口径: 0.6 m, 目合: 上部 1 mm, 下部 0.33 mm) を用いた表層水平曳により行った。採集された試料は、デジタルカメラで撮影し、*B. virginica* と *B. manhattensis* の同定形質のひとつとされている傘縁の黒点の有無を確認した後、触手の一部を切り取り 99.5% エタノールで保存した。残りの試料は、5% 中性ホルマリン海水で固定した。なお、ニャチャンの 5 試料とハイフオンの 1 試料は、破損が激しかったため、遺伝子解析にのみ使用した。

3-2-2 形態学的観察

採集された個体について、傘径、触手数、触手間の黒点の有無、口柄(唇)の形状、放射水管数、生殖腺の長さと形状を観察、測定した。観察および測定は、実体顕微鏡(Nikon SMZ1270)を使用し、暗視野、明視野の両方で行った。また、各部位の長さの測定は、接眼ミクロメータを用いて行った。なお、ゼラチン質動物プランクトンは、ホルマリン固定によって体が収縮することが知られているが(Nishikawa & Terazaki 1996, Jaspers & Carstensen 2009)、本種の収縮率に関する情報は無いため、過去の研究(例えば Bardi & Marques 2009, Harrison et al. 2013)と同様に収縮率の補正は行わなかった。

3-2-3 遺伝子解析

DNA 抽出は、第 1 章と同様の方法で行った(1-2-2 参照)。PCR は、対象領域をミトコンドリア DNA, cytochrome *c* oxidase subunit I(COI) 領域と 16S 領域とし、それぞれ既存のプライマーセット dgLCO149 と dgHCO2198(COI), 16s. Cunningham. F. 1mod と 16s. Cunningham. R. 2(16S) (Harrison et al. 2013)を使用した。反応液は、1 試料あたり蒸留水 8.925 μ L, 10 \times EX buffer 1.5 μ L, dNTP 1.5 μ L, 各プライマー 1.5 μ L, Ex Taq HS 0.075 μ L で作製した。PCR サイクルは Harrison et al. (2013) と同じ条件で、サーマルサイクラー-BIO RAD T100 Thermal Cycler(BIO RAD 社製)を使用して、PCR をおこなった。PCR 後、PCR 産物 3 μ L と蛍光標識ミドリグリーン(日本ジェネティクス社製)1 μ L を混合したものを、2%アガロースゲル上で 100

V, 15 分間電気泳動し, 増幅の確認を行った. PCR 産物の精製は, Exo-Sap-IT (USB 社製) を用いて行った. サイクルシーケンスの反応液は, 蒸留水 7 μ L, 5 \times Sequencing buffer 1.5 μ L, フォワード側プライマー 0.5 μ L, BigDye (ABI 社製) 1 μ L, PCR 産物 0.5 μ L で作製した. サーマルサイクラーの条件は, 96 $^{\circ}$ C 10 秒, 50 $^{\circ}$ C 5 秒, 60 $^{\circ}$ C 2 分 30 秒で 40 サイクル行った. サイクルシーケンス済みの PCR 産物は 125 mM EDTA を含む 99%エタノールにより沈殿し, 70%エタノールでリンスした後, 風乾 (95 $^{\circ}$ C 5 分) した. 乾燥試料に Hi-Di TM Formamide (ABI 社製) を 15 μ L 加えて 95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性させた後, 直ちに氷冷し遮光した. 精製した PCR 産物試料は, 東海大学生命科学統合支援センターにおいて DNA シークエンサー (ABI 3500xl, ABI 社製) を用いて塩基配列の解読を行った.

得られた COI 配列は, ソフトウェア MEGA7 (Kumar et al. 2016) 上で目視により確認した. 確認後, ハプロタイプ数の確認とハプロタイプネットワーク解析用のファイル変換をオンラインツール FaBOX (Villesen 2007) を用いて行い, ハプロタイプネットワーク解析をソフトウェア TCS ver.1.21 (Clement et al. 2000) で行った. また, 本研究で得られた配列と National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank に登録されている *Blackfordia* 属各種の配列を合わせて系統解析を行った (MEGA7 使用). 系統解析における塩基置換モデルは, MEGA7 によって検討し, 16S は T92+G, COI は GTR+I と推定された. 両系統解析のブートストラップ値は 1000 に設定し, NCBI に登録されている, ヒドロ虫綱の *Plumularia hyalina* (Bale, 1882) および *Nemertesia antennina* (Linnaeus, 1758) を外群として用い, 最尤法 (ML 法) と最節約

法 (NJ 法) で行なった。また、各地域間の *B. virginica* の遺伝距離を木村 2 パラメータモデル (K2P, Kimura 1980) によって算出した。本研究の解析によって得られたベトナム産 *Blackfordia* sp. の 16S および COI 配列は、NCBI Gene Bank に登録した (アクセッション番号 16S;LC576399–LC576403, COI;LC576404–LC576410)。

3-3 結果

3-3-1 形態学的観察

観察した 10 個体のうち、4 個体が成体 (雄 1 個体, 雌 3 個体), 6 個体が未成熟個体であった (Table 3-1)。成体の傘径は 6.7–11.2 mm, 傘縁触手数 は 104–113 の範囲を示した。一方, 未成熟個体の傘径 (2.8–4.5 mm) および触手数 (48–60) は, 成熟個体と比べて明確に低かった。未成熟個体, 成熟個体ともに, 4 本の簡素な放射水管 (Fig. 3-2A), 触手間に 1 個稀に 0 の平衡胞 (Table 3-1, Fig. 3-2B, D), 傘縁の黒点の欠落 (Fig. 3-2D), 溝があり反り返った 4 枚の唇弁 (Fig. 3-2C), 放射水管の 2/3 の長さの生殖腺 (Fig. 3-2A) をもつといった特徴を有していた。成体の生殖腺は, 直線または波状を示し, 雌は粒状の卵が確認できた (Fig. 3-2E, F)。また, 未成熟個体の生殖腺は, 線状で薄く放射水管の半分から 2/3 の長さであった (Fig. 3-2G)。

3-3-2 遺伝子解析

遺伝子解析は、16S では 14 個体、COI では 13 個体について行った (Table 3-1)。16S では 5 つのハプロタイプ、COI では 7 つのハプロタイプが検出され、両領域ともにニャチャンとハイフォンで異なる配列を示した (Fig. 3-3)。また、ニャチャンの試料から検出されたハプロタイプは、大きく 2 つのグループに分かれたが、採集年による明らかな違いはなかった。

16S 配列に基づく系統解析の結果、ベトナム産 *Blackfordia* sp. を含むブラジル産 *B. virginica* および残りの地域 (米国, 中国, バルト海など) の *B. virginica* によって構成されるクレードと、*B. polytentaculata* のみから構成されるクレードの 2 つに分かれた (Fig. 3-4)。さらに、前者の *B. virginica* クレードでは、ベトナム両地域の *Blackfordia* sp. とブラジル産 *B. virginica* のみからなるサブクレードが認められた。木村 2 パラメータモデルによる 16S 配列に基づくベトナムとその他各地域間の平均遺伝距離は、米国, 中国, バルト海に対しては 0.131 以上と高い値を示した (Table 3-2A)。一方、ベトナムとブラジル間では、0.015 と低かった。

COI に基づく系統解析では、16S と同様に *B. virginica* と *B. polytentaculata* の 2 つのクレードに分かれ、*B. virginica* のクレード内ではベトナム産 *Blackfordia* とその他の地域の *B. virginica* の 2 つのサブクレードに分かれた。しかしながら、現在のところ、ブラジル産の *B. virginica* の COI 配列が NCBI に登録されていないため、ベトナムとブラジル間の系統関係は確認できなかった。COI 配列に基づく K2P による平均遺伝距離は、ベトナムとその他の地域 (米国, 中国, バルト海, インド) では 0.133 以上であった (Table 3-2B)。

3-4 考察

3-4-1 *Blackfordia* の分類学的歴史

Blackfordia manhattensis (属の模式種, 原記載地: 米国, ニュージャージー州)と

Blackfordia virginica (原記載地: 米国, バージニア州, Hampton Roads と Norfolk Harbor)

は, 米国で記載された (Mayer 1910). これら 2 種は, 平衡胞の黒い色素顆粒の有無, 触手間の平衡胞数, 生殖腺の位置によって区別できるとされた (Mayer 1910). その後, *Blackfordia polytentaculata* が中国, 福建沿岸で発見された (Hsu & Chin 1962). この種は, *B. virginica*, *B. manhattensis* と比べて, より多数の触手をもっている点で区別される (Hsu & Chin 1962).

Kramp (1958, 1961) は, タイプ産地である米国 Norfolk Harbor (2 試料), ブルガリアの黒海 (複数試料), インド (9 試料) の *B. virginica* 試料について, 本種の特徴である色素顆粒がみられず, *B. manhattensis* は *B. virginica* のシノニムであると示唆した. Moore (1987) も, ポルトガル, River Mira の汽水域で 1984 年に採集した *B. virginica* 試料には, いくつかの平衡胞のみ黒点がみられたと報告している. また, 触手間の平衡胞数が多様であり, *B. virginica* と *B. manhattensis* で重複することから, Kramp (1958, 1959) と同じく, *B. manhattensis* は *B.*

virginica のシノニムであると示唆している. 一方, Bouillon et al. (1988) は, Kramp (1958,

1959) と Moore (1987) が観察したのは固定試料であり, 固定液内では色素が急速に分解されることにより色素の有無が不明確になるため, *B. manhattensis* と *B. virginica* がシノニムであ

ると決めるにはより多くの情報が必要であると主張している。Denayer (1973) もまた、固定液内での急速な色素の分解について記述している。一方で, Jaspers et al. (2018) は, バルト海の *B. virginica* について, 生存個体から傘縁の灰色の色素の存在を報告している。Bardi & Marques (2009) は, 文献調査に基づいて, 現在では3つの *Blackfordia* 種を区別するのに有用な特徴は傘縁触手数であり, これまで使用されてきた種判別の特徴(触手間の平衡胞数, 生殖腺の形態, 黒点の有無)は, 多型または個体差であり, 分類学的差異を示す形質ではないと結論付けた。現在, *B. manhattensis* より *B. virginica* の方がより多く使用, 認知されていることから, データベース World Register of Marine Species において, *B. manhattensis* は *B. virginica* のシノニムとして扱われている (Schuchert 2020)。

3-4-2 形態学的検討

本研究で発見されたベトナム産の個体は, 放射水管, 平衡胞, 触手基部から傘縁への指状突起の貫入などの形態的特徴から, *Blackfordia* 属であることが確認された。また, 成体の傘径は 6.7–11.2 mm, 傘縁触手数は 104–113 の範囲を示した。現在, *B. virginica* (+ *B. manhattensis*) と *B. polytentaculata* は, 傘縁触手数の違いによって明確に区別でき (Mayer 1910, Kramp 1961, Hsu & Chin 1962, Bardi & Marques 2009), *B. virginica* は触手数が約 80 なのに対し, *B. polytentaculata* は 200–250 である。すなわち, 本研究で得られた個体の触手数 (104–113) は *B. virginica* と *B. polytentaculata* の触手数の中間の値を示した (Table 3-3)。

過去に報告されている *B. virginica* の触手数調べた結果、ブラジルで見つかった *B. virginica* とされる種 2 個体は、それぞれ 88, 96 であった(傘径;7.5 と 8.8 mm, Bardi & Marques (2009) の Fig. 3-2 参照). この触手数は、今回ベトナムで得られた *Blackfordia* sp. の触手数に近い(Table 3-3). また、同様にメキシコとインドから *B. virginica* として報告されている個体も、それぞれ 86–125(傘径 6.5–9.9 mm, Álvarez Silva et al. 2003), 92(傘径 11 mm, Kramp 1958)と、ベトナムで発見された個体の触手数と類似することが明らかになった(Table 3-3). ただし、ブラジルと地理的に近いアルゼンチンの大西洋沿岸から報告されている *B. virginica* については、触手数が 76 以上(傘径 2–10 mm)と報告されており(Genzano et al. 2006), これは原記載を含む多くの地域で報告されている *B. virginica* と近く、ベトナムの *Blackfordia* sp. やブラジル、メキシコ、インドで *B. virginica* として報告されている種より少なかった.

以上のことから、ベトナムで発見された *Blackfordia* sp. は傘縁触手数が *B. virginica* と *B. polytentaculata* の中間の値(約 100–140)を示し、原記載や多くの地域で報告されている *B. virginica* とは形態的に異なることが明らかになった. また、同様の特徴(触手数)をもつ *B. virginica* は、ベトナム(2 か所)以外ではブラジル(3 か所, Nogueira Jr. & Oliveira 2006, Bardi & Marques 2009), メキシコ(1 か所, Álvarez-Silva et al. 2003), インド(1 か所, Kramp 1958)でのみ報告されていることが文献調査により明らかになった(Table 3-3).

3-4-3 分子生物学的検討

ベトナム産 *Blackfordia* sp. と他地域の *Blackfordia* 属各種を含めた系統解析では、ベトナム産 *Blackfordia* sp. と他地域の *B. virginica* 間における K2P 遺伝距離が 16S, COI 共に高く (> 0.13), ベトナム産 *Blackfordia* sp. とブラジル産 *B. virginica* (*B. virginica sensu Bardi & Marques, 2009*) 間の 16S では K2P が低い (0.015) ことが明らかとなった。鉢虫綱, ヒドロ虫綱, 箱虫綱において, COI の K2P は種内で平均 0.013, 属内の種間で平均 0.176 と報告されている (Ortman et al. 2010). このことから, ベトナム産 *Blackfordia* sp. と *B. virginica* (ブラジルを除く) は, 種内関係というよりは種間関係であることが示唆される。現在, 鉢虫綱, ヒドロ虫綱, 箱虫綱における 16S の K2P についての報告は無いが, Lindsay et al. (2015) によると, ヒドロ虫綱の *Diphyes* 属 3 種における 16S の K2P は, 種内で 0.02, 種間で 0.18–0.23 であった。また, ブラジルの *B. virginica* の 16S 配列は NCBI データベースでは 1 配列しか報告されていないが (アクセッション番号 KT266605, Table 3-S1), ベトナム産 *Blackfordia* sp. と *B. virginica sensu Bardi & Marques, 2009* 間の遺伝距離は, 他地域との遺伝距離よりも明らかに低く, これらについては種内変異であると推測される。

3-4-4 ベトナム産 *Blackfordia* sp. の分類学的検討

本研究における形態学および遺伝学的解析の結果, ベトナムで初めて発見された *Blackfordia* sp. は *B. virginica* とは形態的にも遺伝的にも異なる種であると考えられた。また,

ブラジル、メキシコ、インドの *B. virginica* として報告されている種は、成体の触手数や遺伝子情報(ブラジルのみ)から同種である可能性が示唆された。しかしながら、試料数が限られていること、本種に特有の形態的特徴(特に未成熟な段階のもの)が限られていること、遺伝子情報(特にブラジル、インド、メキシコ産の“*B. virginica*”)が限られていることなどから、現時点ではベトナム産 *Blackfordia* sp. が新種とは断定できない。上述した情報が得られれば、ベトナム産 *Blackfordia* sp. の分類学上の位置づけがより明確になるだけでなく、このクラゲの原産地または侵入のメカニズムをより詳しく推定することが可能となる。

3-4-5 ベトナム産 *Blackfordia* sp. の原産地の推定

前節で述べたように、ベトナムの *Blackfordia* はブラジル、メキシコ、インドの *B. virginica* と同種もしくは近縁種であること示唆される。しかしながら、これらの地域は互いに地理的距離が離れており、従来 *B. virginica* で指摘されているように(Mills & Sommer 1995, Graham & Bayha 2008), 人為的な移入が起きた可能性も考えられる。他地域の遺伝情報や試料の不足などから、明確な結論は出せないが、移入の可能性について以下に考察した。

本研究において、ベトナム、ニャチャンにおける *Blackfordia* sp. のハプロタイプ数は、16S で4つ、COI で6つ検出された。これは、米国の複数地域で *B. virginica* の遺伝解析を行った Harrison et al. (2013) によるハプロタイプ数よりも多く、塩基置換数も本研究の方が多い。また、ニャチャンの試料で検出されたハプロタイプは大きく2つのグループに分かれた。これら

のことから、ベトナムが *Blackfordia* sp. の原産地である可能性と他所から移入してきた可能性の両方が考えられる。

ベトナムが *Blackfordia* sp. の原産地であった場合、今後の調査においてニャチャンの2つの離れたハプロタイプグループをつなぐ別のハプロタイプが見つかる可能性がある。また、ニャチャンと大きく離れたハイフオンのハプロタイプは、異なる遺伝的集団構造をもった複数の地域個体群が存在する可能性を示唆し、ミノクラゲ同様にベトナム周辺で地域により異なる遺伝的集団構造をもつことを示しているのかもしれない(P 11 参照)。

一方、他所から移入してきた種であった場合、ニャチャンとハイフオンのハプロタイプの違いから、異なる時期・場所から複数回の移入があったことが推測される。ハイフオン港は、ベトナム第2の国際貿易港であり、1873年以降多くの船舶が往来する。そのため、他地域から生物が移入してくる可能性も高い。また、1915–1943年にニャチャンで採集されたクラゲ類をまとめた Kramp (1962) では、*Blackfordia* 属のクラゲは報告されていない。このことから、ハイフオンには1873年以降、ニャチャンには1943年以降に移入したと考えられる。

第4章. 総合考察

4-1. 東南アジアにおける大型根口クラゲ類 2 種のブルーム形成メカニズム

本研究では、従来知見のほとんどなかった東南アジアにおける大型根口クラゲ類 2 種を対象とし、集団遺伝的解析と飼育実験によるポリプ期における好適環境について知見を得た。

それらをもとに、これら 2 種のブルームの形成メカニズムについて考察する。

これまで大量発生形成メカニズムについては、(1) 好適な環境と生活史特性によるブルーム(真のブルーム)、(2) 海流などによる物理的要因(見かけ上のブルーム)、の 2 つの要因が示唆されている(Graham et al. 2001, Hamner & Dawson 2009)。(1)については、主としてポリプ期の無性生殖による大量のメデューサの産生が要因であり、集団内の遺伝的多様性は低く、集団間の独自性は高い。一方、(2)については、広範囲に分布するメデューサが海流などの物理的輸送などによって集積しておこるものであり、遺伝的多様性は比較的高く、近隣の海域間では連結性をもつことが想定される。

本研究において、ヒゼンクラゲは連結性のある遺伝的集団構造を示し、近接地域間では遺伝的に繋がりのある個体群がブルームしていることが示された。また、好適環境推定実験から、比較的低水温でも成長や無性生殖が可能であり、幅広い水温帯の沿岸域で生息可能であることから、広範囲の温度帯に分散が可能であることが示唆された。これらに加えて、本種の比較的高いメデューサの遊泳速度などから、ヒゼンクラゲは高い分散力を持ち、それらのブル

ームは物理的な集積によって起こる“見かけ上のブルーム”の傾向が強いと考えられた。一方、ミノクラゲは、地域ごとに遺伝的に独立した遺伝的集団構造を示し、地域間で別々の個体群がブルームを起こしていることが示唆された。好適環境推定の実験では、本種は比較的高温でのみ好適であったことから、熱帯域の沿岸でのみ増殖可能あることが示唆された。このような結果から、ミノクラゲは、分散能力は比較的低く、各地域の個体群が生活史特性によって別個にブルームしている“真のブルーム”の傾向が強いと考えられた。

1章で述べたように、2種がブルームを形成している東南アジア海域では、海流が季節的に逆転することが知られている。ヒゼンクラゲは比較的海流が強い地域でブルームを形成しており(Fig. 1-2 参照)、個体群が海流に乗って移動・拡散しやすい状況にあると考えられる。一方、ミノクラゲがブルームしている地域は、ヒゼンクラゲがブルームしている地域より比較的海流が弱い。このような、ブルームしている地域の海流も両種の分散力の違いを補強しており、集団遺伝解析や好適環境推定実験の結果と矛盾せず、両者のブルーム形成メカニズムの違いを支持すると考えられる。ただし、実際のブルームは物理的集積と生活史特性のどちらかのみで起こるわけではなく、両方の要因が関与して起こると考えられ、真のブルームか見かけ上のブルームかを明瞭に切り離して考えることは難しい。本研究の両種の異なる結果から、これら2種は東南アジアで少なくとも異なるメカニズムでブルームを形成していることが示唆された。

4-2. ヒゼンクラゲとミノクラゲの持続的な利用のための提言

クラゲ漁業は、中国、東南アジアを中心に多くの地域で行われており、少なくとも 30 種が食用クラゲとして利用されている (Brotz 2016)。また、1997 年以降、全世界で漁獲されているクラゲの量は 50 万トンに達している (Brotz et al. 2017)。食用クラゲの需要は高まっているが、国連食糧農業機関 (FAO) は、すべてのクラゲの漁獲量を“*Rhopilema spp.*”として報告しており、どのクラゲを捕獲しているのかの判断は困難である (Brotz & Pauly 2017, なお、現在では“Jellyfishes nei”と表記)。また、東南アジア地域では、white や sand のように、食用クラゲに商品名 (流通名) を付けているが、ひとつの商品名に複数種が含まれている可能性があり、種の特定が困難な場合もある (Omori & Nakano 2001, 西川ら 2009)。

クラゲの漁獲量が最も多い中国では、漁獲対象種のヒゼンクラゲ (*Rhopilema esculentum*) で 1975 年以降、乱獲によると思われる資源量の減少が報告されている (Dong et al. 2014)。また、日本の瀬戸内海、児島湾 (備前) では、746 年にはすでにクラゲを漁獲していた記録があり、和名の由来となったが (岸上 1890)、個体群は消滅し、現在は行われていない (河原 2008, 西川 2021)。さらに、東南アジア地域においても、ある年以降からクラゲが獲れなくなり、漁業を継続するのが困難になった地域 (例えばマレーシア、ペナン) がいくつか存在する (西川 2017)。しかしながら、これらクラゲ類の生物学的・生態学的知見は限られており、ポリプの生息場所さえ不明な種がほとんどである。そのため、クラゲ類個体群の資源量の推定や管理をおこなうことが困難である (Kingsford et al. 2000)。これらクラゲ漁業を持続させるにあた

っての問題を解決するために、(1)漁獲対象種の正確な資源量や個体群動態に関する知見、(2)ポリプ世代の生物学的知見、(3)クラゲ漁場の形成に好適な物理・生物的環境に関する知見の蓄積が重要であることが、示唆されてきた(西川ら 2009)。

本研究で対象としたヒゼンクラゲとミノクラゲは、東南アジアの様々な地域で漁獲されているが、これまで生物学的知見はほとんど無かった。本研究により、2種の地域間の連結性や生物学的特徴の一端が初めて明らかとなり、2種で対照的な遺伝的な連結性や生物学的特徴をもつことが明らかとなった。仮に1地域のクラゲを獲りつくした場合、ヒゼンクラゲは他地域からの流入を見込め、遺伝的多様性への影響も比較的少ないのに対し、ミノクラゲは他地域からの流入による個体群の回復は見込めず、遺伝的多様性への影響も大きい。また、ポリプの生息場所が不敵な環境に置かれた場合、ヒゼンクラゲではポドシストの休眠によって不敵な環境をやり過ごせる可能性があるが、ミノクラゲはポドシストを生産できないため、その地域のポリプ全てが死亡すると推測される。このような遺伝学的、生物学的特徴の違いから、漁獲対象であるクラゲ類の資源管理において、特にミノクラゲは各地域ごとに、より細かな管理が必要であると考えられる。加えて、本研究で明らかにできたのは生物学的特徴の一部であり、実際にポリプはどこに生息しているのか、ストロビレーションの条件や時期はいつなのかなど、まだ不明な点が多く、さらなる研究が必要である。

東南アジア地域は、生物多様性の最も高い地域のひとつであり、海洋生物の多様性について多くの形態学的、分子生物学的調査がおこなわれてきた。しかしながら、この地域へのアク

セスのしづらさや研究者不足から、近年でも大型クラゲ類の新種が報告されるなど(例えば Nishikawa et al. 2015), クラゲ類に関する研究は限られている。今後、この東南アジア地域の生物多様性の評価や、クラゲ漁業といった地域に利益をもたらす産業を持続させるためにも、各国と共同しつつクラゲ類に関する基礎的な調査、研究が益々重要になると考えられる。

要旨

クラゲ類の大量発生(ブルーム)は世界中の様々な海域で報告されており,しばしば人間社会に悪影響を及ぼしている.一方で,一部の種は漁獲され人間の食料や化粧品として利用されている.これらクラゲ類の生物,生態学的研究はこれまで主として亜熱帯・亜寒帯域に生息する種でなされてきており,熱帯域におけるそれらの研究は限られている.本研究は東南アジアの広範囲の地域においてブルームを起こし,漁獲されている大型根口クラゲ類のヒゼンクラゲ *Rhopilema hispidum* とミノクラゲ *Lobonemoides robustus* を対象とし,集団遺伝学的解析により遺伝的構造を明らかにするとともに,地域個体群間の遺伝的連結性を明らかにした(第1章).また,無性生殖を通してブルームの発生に重要な役割をもつ初期生活史のポリプ期について,飼育実験により体成長および無性生殖における水温,塩分の好適環境の推定を行った(第2章).

ヒゼンクラゲとミノクラゲの遺伝的多様性を調べた研究(第1章)では,2010年から2018年にかけて東南アジア地域の4か国11地点において採集した試料に基づき,ミトコンドリアDNAのCOI領域と核DNAのITS1領域をPCR増幅し,得られた配列からハプロタイプネットワーク図を作成し,遺伝的分化指数(Φ_{ST})によって地域個体群間の遺伝的距離を算出した.ミノクラゲのITS1配列については,フラグメント解析によって各地域の祖先集団数から遺伝構造の差異を検出した.その結果,ヒゼンクラゲは主要ハプロタイプを中心とした全採集地域が含まれるクレードと,半数をマレーシアの個体が占めるクレードの2群が確認された. Φ_{ST} はほ

ほとんどの地域間で有意差がなかったが、最も地理的距離が離れているマレーシアとベトナム間、タイ南部とベトナム間では有意差が認められた($p < 0.05$)。 Φ_{ST} と地理的距離の間には有意な正の相関が認められ(Spearman 順位相関, $\rho = 0.718$, $p < 0.01$)、距離による隔離が示唆された。一方、ミノクラゲの COI 解析では、各地域ごとにまとまった 3 つのクレードが確認された。また、 Φ_{ST} は全ての調査地域間で有意差が認められ($p < 0.001$)、本種は地域個体群の遺伝的独立性が高いと考えられた。ITS1 配列のフラグメント解析でも、COI の解析と同様に地域ごとのクレードに分かれ、本種は地域間で遺伝的交流がほぼ無いことが示唆された。タイとフィリピンで採集された本種の成体(メデューサ)について、クレード間で詳細な形態比較を行った。その結果、ほとんどの計測部位で有意差は認められず、別種として識別できる明確な形態的差異は認められなかった。以上、東南アジアでブルームするこれら大型クラゲ類は、2 種で異なる遺伝構造パターンを示すことが初めて明らかになった。この要因について、更新世紀における氷期、間氷期サイクルによる海水面変動にともなう分布域の拡大・縮小、現在の分布域における海流の強さ、2 種の生物学的特徴における差異から議論した。

ヒゼンクラゲとミノクラゲのポリプ世代における体成長および無性生殖におよぼす水温、塩分の影響を調べることにより、それらの好適環境を推定した研究(第 2 章)では、両種ともにプラヌラ幼生から変態したポリプを用いて、飼育実験を実施した。飼育塩分は 5–35 まで 5 間隔で 7 段階、水温は 15–35°C まで 5°C 間隔で 5 段階に設定し、各実験区で口盤直径の経時変化(体成長)と芽体産生数(無性生殖)を 35 日間記録した。「体サイズおよび無性生殖について、水温・塩分による差はない」という帰無仮説を設定し、統計学的検定を行った。本研究によ

り、両種ともに初めて実験室内で安定的なポリプの飼育に成功し、この過程で根口クラゲ類におけるポリプの新たな無性生殖方法(ヒゼンクラゲ:口盤部分離後に着底・再生, ミノクラゲ:出芽とモノディスクタイプ・ストロビレーションの組み合わせ)が発見された。飼育実験の結果、ヒゼンクラゲは体成長、芽体産生数が低塩分(15, 20)で有意に高かった(ANOVA + Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。一方、ミノクラゲは、体成長は塩分 10–30 で有意に高く($p < 0.05$)、塩分 10 で最も高かった。また、芽体産生数は、塩分 15 で最も高かった。すなわち、2種の体成長および無性生殖は、どちらも低塩分で好適であることが示された。一方、水温の実験区では、ヒゼンクラゲ、ミノクラゲともに 30°C で最も体成長、芽体産生数が高かった。しかしながら、ヒゼンクラゲは低水温(15°C)でも生存したのに対し、ミノクラゲは低水温では全て死亡した。また、ヒゼンクラゲでは成長の低かった 35°C でもミノクラゲは高い成長を示した。以上のことから、2種でポリプの好適生息環境は異なり、ヒゼンクラゲは熱帯から亜熱帯域の沿岸域に、ミノクラゲは熱帯域の沿岸域に適応した生物学的特性をもつと考えられた。

上記 2 つの研究により、近接地域間で遺伝的連続性を示し、ポリプが広温性であったヒゼンクラゲは比較的高い分散力をもつと考えられ、物理的な集積によりブルームを起こしている可能性が示唆された。一方、ミノクラゲは各地域で独立した遺伝構造をもち、高水温に適応していることから、分散範囲は比較的狭いと考えられ、各地域個体群が生物学的特性により独立してブルームを起こす傾向があることが示唆された。

東南アジアで行った調査により、ベトナムで初報告となる *Blackfordia* sp.(ヒドロ虫綱)が 2 か所で採集された。それらの形態学的、遺伝学的解析を実施し、分類学的な検討を行った(第 3

章). その結果, ベトナム産 *Blackfordia* sp. は触手数が最大 113 あり, これは *B. polytentaculata* の 200–250 より少なく, これまで原記載を含め多くの地域で報告されている *B. virginica* の約 80 より多かった. また, 触手数はブラジルなど 3 地域で *B. virginica* として報告された種と類似していた. 遺伝子解析では, COI, 16S ともに *Blackfordia* sp. はこれまでに多くの地域で報告されている *B. virginica* とは異なる遺伝構造をもち, ブラジル産 *B. virginica* と近縁であることが明らかになった. 以上のことから, ベトナム初報告の *Blackfordia* sp. は, 形態的にも遺伝的にも同属他種と異なり, 未記載種の可能性が高いことが示唆された.

以上, 本研究により, これまで知見が限られている東南アジア地域に生息するクラゲ類について, 遺伝的多様性や初期生活史, 初報告種の分類学的位置などが明らかになった.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導を賜り、数多くのアイデアやご指摘をいただきました東海大学大学院生物科学研究科 西川 淳 教授に深く感謝いたします。論文作成にあたり多くの有益なコメントをいただきました東海大学大学院生物科学研究科 福井 篤教授, 村山 司教授, 吉川 尚教授, ならびに広島大学大学院統合生命科学研究科(生物生産学部) 大塚 攻教授に厚くお礼申し上げます。遺伝子解析において多くのご協力, 助言をいただきました東海大学海洋学部 野原健司 准教授に感謝いたします。

東南アジア各地での試料採集や調査にあたり、ご協力いただいた以下の方々にお礼申し上げます。Fatimah Md. Yusoff 教授(プトラ・マレーシア大学), Khwanruan Srinui 博士(ブラパ大学), Tran Manh Ha 博士, Pham The Thu 博士(ベトナム海洋環境資源研究所), Ephrime B. Metillo 教授(ミンダナオ州立大学), Honorio B. Pagliawan 博士(西フィリピン大学), Dhugal J. Lindsay 博士(海洋研究開発機構), 大塚 攻 教授(広島大学), 近藤裕介 博士(広島大学), 戸篠 祥 博士(公益財団法人黒潮生物研究所), 三宅裕志 准教授(北里大学), 足立 文氏(新江ノ島水族館), 奥泉 和也氏, 池田 周平氏(加茂水族館)。試料採集にご協力いただきました東南アジア各地域の現地漁業従事者の方々。

研究生活において暖かいご支援, ご協力を頂いた西川研究室の学生一同に深く感謝いたします。

引用文献

- Álvarez Silva C, Gómez Aguirre S, Miranda Arce M (2003) Guadalupe. Variaciones morfológicas en *Blackfordia virginica* (Hydroidomedusae: Blackfordiidae) en lagunas costeras de Chiapas, México. *Rev Biol Trop* 409–412.
- Arai MN (2008) The potential importance of podocysts to the formation of scyphozoan blooms: a review. In: *Jellyfish blooms* (eds Pitt KA, Lucas CH). Springer, Netherlands, pp. 241–246.
- Bardi J, Marques AC (2009) The invasive hydromedusae *Blackfordia virginica* Mayer, 1910 (Cnidaria: Blackfordiidae) in southern Brazil, with comments on taxonomy and distribution of the genus *Blackfordia*. *Zootaxa* 2198: 41–50.
- Behera PR, Raju S, Jishnudev M, Ghosh S, Saravanan R (2020) Emerging jellyfish fisheries along Central South East coast of India. *Ocean Coas Manage* 191: 105183.
- Bellwood DR, Renema W, Rosen BR (2012) Biodiversity hotspots, evolution and coral reef biogeography : a review. In: *The Systematics Association Special Volume 82 Biotic evolution and environmental change in Southeast Asia* (eds Gower DJ, Johnson KG, Richardson JE, Rosen BR, Rüber L, Williams ST). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 216–245.

- Benzie J (1998) Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography. In:
Biogeography and geological evolution of SE Asia (eds Hall R, Holloway JD).
Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands, pp. 197–209.
- Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD (2012) Universal primers for fluorescent
labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by
fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12: 456–463.
- Bouillon J, Seghers G, Boero F, (1988) Notes additionnelles sur les méduses de Papouasie
Nouvelle-Guinée (Hydrozoa, Cnidaria) III. *Indo-Malayan Zool* 5: 225–253. (in French)
- Bowen BW, Gaither MR, DiBattista JD, Iacchei M, Andrews KR, Grant WS, Toonen RJ,
Briggs JC (2016) Comparative phylogeography of the ocean planet. *Proc Natl Acad Sci
USA* 113: 7962–7969.
- Brotz L (2016) Jellyfish fisheries—a global assessment. In: So long, and thanks for all the fish:
The Sea Around Us, 1999–2014 A Fifteen-Year Retrospective (eds Pauly D, Zeller D).
Sea Around Us, Fisheries Centre. Canada, pp. 77–82.
- Brotz L, Cheung WW, Kleisner K, Pakhomov E, Pauly D (2012) Increasing jellyfish
populations: trends in large marine ecosystems. *Hydrobiologia* 690: 3–20.
- Brotz L, Pauly D (2017) Studying jellyfish fisheries: toward accurate national catch reports and
appropriate methods for stock assessments. In: *Jellyfish: Ecology, Distribution Patterns*

- and Human Interactions (ed Mariottini GL). Nova Science Publishers, New York, pp. 313–329.
- Brotz L, Schiariti A, López-Martínez J, Álvarez-Tello J, Hsieh Y-HP, Jones RP, Quiñones J, Dong Z, Morandini AC, Preciado M (2017) Jellyfish fisheries in the Americas: origin, state of the art, and perspectives on new fishing grounds. *Rev Fish Biol Fisheries* 27: 1–29.
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20: 1004–1006, 1008–1010.
- Buecher E, Goy J, Gibbons MJ (2005) Hydromedusae of the Agulhas current. *Afr Invertebr* 46: 27–69.
- Chícharo MA, Leitão T, Range P, Gutierrez C, Morales J, Morais P, Chícharo L (2009) Alien species in the Guadiana Estuary (SE-Portugal/SW-Spain): *Blackfordia virginica* (Cnidaria, Hydrozoa) and *Palaemon macrodactylus* (Crustacea, Decapoda): potential impacts and mitigation measures. *Aquat Invasions* 4: 501–506.
- Choo LQ, Bal TM, Goetze E, Peijnenburg KT (2021) Oceanic dispersal barriers in a holoplanktonic gastropod. *J Evol Biol* 34: 224–240.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene

- genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657–1659.
- Collins AG, Winkelmann S, Hadrys H, Schierwater B (2005) Phylogeny of Capitata and Corynidae (Cnidaria, Hydrozoa) in light of mitochondrial 16S rDNA data. *Zool Scr* 34: 91–99.
- Condon RH, Duarte CM, Pitt KA, Robinson KL, Lucas CH, Sutherland KR, Mianzan HW, Bogeberg M, Purcell JE, Decker MB, Uye S, Madin LP, Brodeur RD, Haddock SH, Malej A, Parry GD, Eriksen E, Quinones J, Acha M, Harvey M, Arthur JM, Graham WM (2013) Recurrent jellyfish blooms are a consequence of global oscillations. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 1000–1005.
- Conley K, Uye S (2015) Effects of hyposalinity on survival and settlement of moon jellyfish (*Aurelia aurita*) planulae. *J Exp Mar Biol Ecol* 462: 14–19.
- Dawson MN (2005) Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *J Biogeogr* 32: 515–533.
- Dawson MN, Hamner WM (2005) Rapid evolutionary radiation of marine zooplankton in peripheral environments. *Proc Nat Acad Sci USA* 102: 9235–9240.
- Dawson MN, Hamner WM (2009) A character-based analysis of the evolution of jellyfish blooms: adaptation and exaptation. *Hydrobiologia* 616: 193–215.

- Dawson MN, Jacobs DK (2001) Molecular evidence for cryptic species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biol Bull* 200: 92–96.
- Denayer JC, (1973) Trois méduses nouvelles ou peu connues des côtes françaises: *Maeotis inexpectata* Ostromouv, 1896, *Blackfordia virginica* Mayer, 1910, *Nemopsis bachei* Agassiz, 1849. *Cah Biol Mar* 14: 285–294. (in French)
- Ding G, Chen J (1981) The life history of *Rhopilema esculenta* Kishinouye. *J Fish China* 5: 93–102.
- Dong J, Sun M, Purcell JE, Chai Y, Zhao Y, Wang A (2015) Effect of salinity and light intensity on somatic growth and podocyst production in polyps of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Hydrobiologia* 754: 75–83.
- Dong J, Sun M, Wang B, Liu H (2008) Comparison of life cycles and morphology of *Cyanea nozakii* and other scyphozoans. *Plankton Benthos Res* 3(Supplement): 118–124.
- Dong Z, Liu D, Keesing JK (2014) Contrasting trends in populations of *Rhopilema esculentum* and *Aurelia aurita* in Chinese waters. In: *Jellyfish blooms* (eds Pitt KA, Lucas CH). Springer, Netherlands, pp. 207–218.
- Dong Z, Liu Z, Liu D, Liu Q, Sun T (2016) Low genetic diversity and lack of genetic structure in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* in Chinese coastal waters. *Mar Biol Res* 12: 769–775.

- Earl DA, von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359–361.
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564–567.
- Faasse M, Melchers M (2014) The exotic jellyfish *Blackfordia virginica* introduced into the Netherlands (Cnidaria: Hydrozoa). *Ned Faun Meded* 43: 103–10.
- Feng S, Wang S-W, Sun S, Zhang F, Zhang G-T, Liu M-T, Uye S (2018) Strobilation of three scyphozoans (*Aurelia coelurea*, *Nemopilema nomurai*, and *Rhopilema esculentum*) in the field at Jiaozhou Bay, China. *Mar Ecol Prog Ser* 591: 141–153.
- Feng S, Zhang F, Sun S, Wang S, Li C (2015) Effects of duration at low temperature on asexual reproduction in polyps of the scyphozoan *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Hydrobiologia* 754: 97–111.
- Fleminger A (1986) The Pleistocene equatorial barrier between the Indian and Pacific Oceans and a likely cause for Wallace's line. In: *Pelagic Biogeography* (eds Pierrot-Bults AC, van der Spoel S, Zahuranec BJ, Johnson RK). UNESCO Technical Paper in Marine Science 49, pp. 84–97.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of

mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 294–299.

Freire M, Genzano GN, Neumann-Leitão S, Pérez CD (2013) The non-indigenous medusa *Blackfordia virginica* (Hydrozoa, Leptothecata) in tropical Brazil: 50 years of unnoticed presence. *Biol Invasions* 16: 1–5.

Fuentes V, Straehler-Pohl I, Atienza D, Franco I, Tilves U, Gentile M, Acevedo M, Olariaga A, Gili J-M (2011) Life cycle of the jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean). *Mar Biol* 158: 2247–2266.

藤井直紀, 近藤裕介, 岡田昇馬, 大塚 攻, 浦田 慎, 足立 文, 加藤幹雄, 山口修平, 中口和光, 中村志保, 吉野健児, 堤 裕昭 (2014) 2012 年夏期~秋期における有明海産ビゼンクラゲ *Rhopilema esculentum* Kishinouye の現存量推定. *日本プランクトン学会報* 61: 23–31.

Gaither MR, Rocha LA (2013) Origins of species richness in the Indo-Malay-Philippine biodiversity hotspot: evidence for the centre of overlap hypothesis. *J Biogeogr* 40: 1638–1648.

Genzano G, Mianzan H, Acha EM, Gaitan E (2006) First record of the invasive medusa

- Blackfordia virginica* (Hydrozoa: Leptomedusae) in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. *Rev Chil Hist Nat* 79: 257–261.
- Glynn F, Houghton JD, Provan J (2015) Population genetic analyses reveal distinct geographical blooms of the jellyfish *Rhizostoma octopus* (Scyphozoa). *Biol J Linn Soc* 116: 582–592.
- Gotoh R, Chang SJ, Qu X, Ito C, Okuizumi K, Yoon WD, Iizumi H, Hanzawa N (2017) Distribution and dispersal of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa, Cnidaria) inferred from its genetic population structure. *Biogeography* 19: 93–100.
- Graham WM, Bayha KM (2008) Biological invasions by marine jellyfish. In: *Biological Invasions* vol 193 (ed Nentwig W). Springer, Berlin Heidelberg, pp. 239–255.
- Graham WM, Pagès F, Hamner WM (2001) A physical context for gelatinous zooplankton aggregations: a review. *Hydrobiologia* 451: 199–212.
- Gul S, Jahangir S, Schiariti A (2015) Jellyfish fishery in Pakistan. *Plankton Benthos Res* 10: 220–224.
- Gul S, Morandini AC (2015) First record of the jellyfish *Rhopilema hispidum* (Cnidaria: Scyphozoa) from the coast of Pakistan. *Mar Biodivers Rec* 8: 1–4.
- Hall R (2002) Cenozoic geological and plate tectonic evolution of SE Asia and the SW Pacific: computer-based reconstructions, model and animations. *J Asian Earth Sci* 20: 353–431.

- Hamner WM, Dawson MN (2009) A review and synthesis on the systematics and evolution of jellyfish blooms: advantageous aggregations and adaptive assemblages. *Hydrobiologia* 616: 161–191.
- Han C-H, Uye S (2010) Combined effects of food supply and temperature on asexual reproduction and somatic growth of polyps of the common jellyfish *Aurelia aurita* sl. *Plankton Benthos Res* 5: 98–105.
- Harrison GF, Kim K, Collins AG (2013) Low genetic diversity of the putatively introduced, brackish water hydrozoan, *Blackfordia virginica* (Leptothecata: Blackfordiidae), throughout the United States, with a new record for Lake Pontchartrain, Louisiana. *Proc Biol Soc Wash* 126: 91–102.
- Helm RR (2018) Evolution and development of scyphozoan jellyfish. *Biological reviews* 93: 1228–1250.
- Hoeksema BW (2007) Delineation of the Indo-Malayan centre of maximum marine biodiversity: the Coral Triangle. In: *Biogeography, time, and place: distributions, barriers, and islands* (ed Renema W). Springer, Netherlands, pp. 117–178.
- Höhn DP, Lucas CH, Thatje S (2017) Respiratory response to temperature of three populations of *Aurelia aurita* polyps in northern Europe. *PLoS One* 12: e0177913.
- Holst S, Jarms G (2010) Effects of low salinity on settlement and strobilation of scyphozoa

- (Cnidaria): Is the lion's mane *Cyanea capillata* (L.) able to reproduce in the brackish Baltic Sea? *Hydrobiologia* 645: 53–68.
- Holst S, Sötje I, Tiemann H, Jarms G (2007) Life cycle of the rhizostome jellyfish *Rhizostoma octopus* (L.) (Scyphozoa, Rhizostomeae), with studies on cnidocysts and statoliths. *Mar Biol* 151: 1695–1710.
- Hsu C-t, Chin T (1962) Studies on medusae from Fukien Coast. *J Xiamen Univ Nat Sci* 9: 206–224.
- Huxley TH (1868) On the classification and distribution of the *Alectoromorphae* and *Heteromorphae*. *Proc Zool Soc Lond* 296–319.
- Janko K, Lecointre G, DeVries A, Couloux A, Cruaud C, Marshall C (2007) Did glacial advances during the Pleistocene influence differently the demographic histories of benthic and pelagic Antarctic shelf fishes?—Inferences from intraspecific mitochondrial and nuclear DNA sequence diversity. *BMC Evol Biol* 7: 220.
- Jaspers C, Carstensen J (2009) Effect of acid Lugol solution as preservative on two representative chitinous and gelatinous zooplankton groups. *Limnol Oceanogr: Methods* 7: 430–435.
- Jaspers C, Huwer B, Weiland-Bräuer N, Clemmesen C (2018) First record of the non-indigenous jellyfish *Blackfordia virginica* (Mayer, 1910) in the Baltic Sea. *Helgol Mar*

Res 72: 1–9.

Kakioka R, Muto N, Takeshima H, Gaje AC, Cruz RS, Alama UB, Guzman AMT, Traifalgar

RFM, Babaran RP, Muda O (2018) Cryptic genetic divergence in *Scolopsis taenioptera*

(Perciformes: Nemipteridae) in the western Pacific Ocean. Ichthyol Res 65: 92–100.

Kanagaraj G, Kumar PS, Morandini AC (2008) The occurrence of *Ophiocnemis marmorata*

(Echinodermata: Ophiuroidea) associated with the rhizostome medusa *Rhopilema*

hispidum (Cnidaria: Scyphozoa). J Ocean University of China 7: 421–424.

川原正人 (2008) 瀬戸内海産のビゼンクラゲは絶滅したのか? 山陽放送学術文化財団リポ

ート. 52: 35–38.

Kawahara M, Ohtsu K, Uye S (2013) Bloom or non-bloom in the giant jellyfish *Nemopilema*

nomurai (Scyphozoa: Rhizostomeae): roles of dormant podocysts. J Plankton Res 35:

213–217.

Kawahara M, Uye S, Ohtsu K, Iizumi H (2006) Unusual population explosion of the giant

jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in East Asian waters. Mar

Ecol Prog Ser 307: 161–173.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions

through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16: 111–120.

Kingsford M, Pitt K, Gillanders B (2000) Management of jellyfish fisheries, with special

reference to the order Rhizostomeae. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 38: 85–156.

岸上鎌吉 (1890) 備前くらげ. *動物学雑誌* 2: 47–54.

Kitamura M, Omori M (2010) Synopsis of edible jellyfishes collected from Southeast Asia, with notes on jellyfish fisheries. *Plankton Benthos Res* 5: 106–118.

Kondo Y, Ohtsuka S, Nishikawa J, Metillo E, Pagliawan H, Sawamoto S, Moriya M, Nishida S, Urata M (2014) Associations of fish juveniles with rhizostome jellyfishes in the Philippines, with taxonomic remarks on a commercially harvested species in Carigara Bay, Leyte Island. *Plankton Benthos Res* 9: 51–56.

Kramp PL (1958) Hydromedusae in the Indian museum. *Records of the Indian Museum* 53: 343–345.

Kramp PL (1959) The hydromedusae of the Atlantic Ocean and adjacent waters. *Dana Rep* 339–376.

Kramp PL (1961) Synopsis of the medusa of the world. *J Mar Biol Ass UK* 40: 1–469.

Kramp PL (1962) Medusae of Vietnam. *Vidensk Meddel Natuirist Foren Kjobenhavn* 124: 305–366.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874.

Lee PL, Dawson MN, Neill SP, Robins PE, Houghton JD, Doyle TK, Hays GC (2013)

- Identification of genetically and oceanographically distinct blooms of jellyfish. *J R Soc Interface* 10: 20120920.
- Leppäkoski E, Shiganova T, Alexandrov B (2009) European enclosed and semi-enclosed seas. In: *Biological invasions in marine ecosystems* (eds Rilov G, Crooks JA). Springer, Berlin Heidelberg, pp. 529–547.
- Lindsay DJ, Grossmann MM, Nishikawa J, Bentlage B, Collins AG (2015) DNA barcoding of pelagic cnidarians: current status and future prospects. *Bull Plankton Soc Jpn* 62: 39–43.
- López-Martínez J, Álvarez-Tello J (2013) The jellyfish fishery in Mexico. *Agric Sci* 4: 57–61.
- Lotan A, Ben-Hillel R, Loya Y (1992) Life cycle of *Rhopilema nomadica*: a new immigrant scyphomedusan in the Mediterranean. *Mar Biol* 112: 237–242.
- Lourie SA, Vincent AC (2004) A marine fish follows Wallace's Line: the phylogeography of the three-spot seahorse (*Hippocampus trimaculatus*, Syngnathidae, Teleostei) in Southeast Asia. *J Biogeogr* 31: 1975–1985.
- Lu N, Jiang S, Chen J (1997) Effect of temperature, salinity and light on the podocyst generation of *Rhopilema esculenta* Kishinouye. *Fish Sci* 16: 3–8.
- Maronna MM, Miranda TP, Cantero ÁLP, Barbeitos MS, Marques AC (2016) Towards a phylogenetic classification of Leptothecata (Cnidaria, Hydrozoa). *Sci Rep* 6: 1–23.

Mayer AG (1910) Medusae of the world: volume II The Hydromedusae. In: Carnegie institution of Washington, Washington, 735 pp.

Mills C, Sommer F (1995) Invertebrate introductions in marine habitats: two species of hydromedusae (Cnidaria) native to the Black Sea, *Maeotias inexpectata* and *Blackfordia virginica*, invade San Francisco Bay. Mar Biol 122: 279–288.

Mills CE (2001) Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? Hydrobiologia 451: 55–68.

Miyake H (2004) Scyphopolyps of *Sanderia malayensis* and *Aurelia aurita* attached to tubes of vestimentiferan tubeworm (*Lamellibrachia satsuma*) at submarine fumaroles in Kagoshima. Bay Mar Biotechnol 6: S174–S178.

Moore S (1987) Redescription of the leptomedusan *Blackfordia virginica*. J Mar Biol Ass UK 67: 287–291.

Nishida S, Nishikawa J (2011) Biodiversity of marine zooplankton in Southeast Asia (Project-3: plankton group). In: Coastal Marine Science in Southeast Asia—Synthesis Report of the Core University Program of the Japan Society for the Promotion of Science. Coastal Marine Science (eds Nishida S, Fortes MD, Miyazaki N). Terrapub, Tokyo, pp. 59–71.

西川 淳 (2017)クラゲ漁業の実態 インドネシア, ジャワ島における大型鉢虫類の新種発見とそれらに対する漁業について. クラゲ類の生態学的研究(豊川雅哉, 西川 淳, 三宅

裕志, 編). 生物研究社, 東京. pp. 112–122.

西川 淳 (2021)ヒトの食料としてのクラゲ. 自然と科学の情報誌 *milsil* 5: 16–17.

Nishikawa J, Ohtsuka S, Mujiono N, Lindsay DJ, Miyamoto H, Nishida S (2015) A new species of the commercially harvested jellyfish *Crambionella* (Scyphozoa) from central Java, Indonesia with remarks on the fisheries. *J Mar Biol Ass UK* 95: 471–481.

西川 淳, Srinui K, 大塚 攻, 近藤裕介, 三宅裕志, Lindsay DJ, 飯田 茜 (2019)タイにおけるクラゲ漁業. *海洋と生物* 40: 13–18.

Nishikawa J, Terazaki M (1996) Tissue shrinkage of two gelatinous zooplankton, *Thalia democratica* and *Dolioletta gegenbauri* (Tunicata: Thaliacea) in preservative. *Bull Plankton Soc Jpn* 43: 1–7.

Nishikawa J, Thu NT, Ha TM (2008) Jellyfish fisheries in northern Vietnam. *Plankton Benthos Res* 3: 227–234.

西川 淳, Thu NT, Yusoff FM, Lindsay DJ, Mulyadi, Mujiono N, 大塚 攻, 西田周平 (2009) 東南アジア, 特にベトナム, インドネシア, マレーシアにおけるクラゲ漁業. *月間海洋* 41: 401–411.

Nogueira Jr. M, Oliveira JS (2006) *Moerisia inkermanica* Paltschikowa-Ostroumova (Hydrozoa; Moerisiidae) e *Blackfordia virginica* Mayer (Hydrozoa; Blackfordiidae) na Baía de Antonina, Paraná, Brasil. *Panama J Aquat Sci* 1: 35–42. (in Portuguese with

English abstract)

Omori M, Kitamura M (2004) Taxonomic review of three Japanese species of edible jellyfish

(Scyphozoa: Rhizostomeae). *Plankton Biol Ecol* 51: 36–51.

Omori M, Nakano E (2001) Jellyfish fisheries in southeast Asia. *Hydrobiologia* 451: 19–26.

Ortman BD, Bucklin A, Pagès F, Youngbluth M (2010) DNA barcoding the medusozoa using

mtCOI. *Deep-Sea Res Part II* 57: 2148–2156.

Pitt K (2000) Life history and settlement preferences of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus*

(Scyphozoa: Rhizostomeae). *Mar Biol* 136: 269–279.

Rodriguez CS (2012) Hidromedusas del Atlántico sudoccidental: Biodiversidad y patrones de

distribución. PhD thesis. Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, pp. 92.

(in Spanish with English abstract)

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus

genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Purcell JE, Atienza D, Fuentes V, Olariaga A, Tilves U, Colahan C, Gili J-M (2012)

Temperature effects on asexual reproduction rates of scyphozoan species from the

northwest Mediterranean Sea. *Hydrobiologia* 690: 169–180.

Purcell JE, Hoover RA, Schwarck NT (2009) Interannual variation of strobilation by the

scyphozoan *Aurelia labiata* in relation to polyp density, temperature, salinity, and light

- conditions in situ. *Mar Ecol Prog Ser* 375: 139–149.
- Purcell JE, White JR, Nemazie DA, Wright DA (1999) Temperature, salinity and food effects on asexual reproduction and abundance of the scyphozoan *Chrysaora quinquecirrha*. *Mar Ecol Prog Ser* 180: 187–196.
- Ramšak A, Stopar K, Malej A (2012) Comparative phylogeography of meroplanktonic species, *Aurelia* spp. and *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa) in European Seas. *Hydrobiologia* 690: 69–80.
- Richardson AJ, Bakun A, Hays GC, Gibbons MJ (2009) The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends Ecol Evol* 24: 312–322.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569.
- Sathiamurthy E, Voris HK (2006) Maps of Holocene sea level transgression and submerged lakes on the Sunda Shelf. *Nat Hist J Chulalongkorn Univ Suppl* 2: 1–44.
- Schiariti A, Morandini AC, Jarms G, von Glehn Paes R, Franke S, Mianzan H (2014) Asexual reproduction strategies and blooming potential in Scyphozoa. *Mar Ecol Prog Ser* 510: 241–253.
- Schnedler-Meyer NA, Kiørboe T, Mariani P (2018) Boom and bust: life history, environmental

- noise, and the (un) predictability of jellyfish blooms. *Front in Mar Sci* 5: 257.
- Schuchert P (2020) World Hydrozoa Database. *Blackfordia* Mayer, 1910. Available at:
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=117008> (accessed on 15 August 2020)
- Scorrano S, Aglieri G, Boero F, Dawson MN, Piraino S (2017) Unmasking *Aurelia* species in the Mediterranean Sea: an integrative morphometric and molecular approach. *Zool J Linn Soc* 180: 243–267.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264–279.
- Stopar K, Ramsak A, Trontelj P, Malej A (2010) Lack of genetic structure in the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European seas. *Mol Phylogenet Evol* 57: 417–428.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.
- Thein H, Ikeda H, Uye S (2013) Ecophysiological characteristics of podocysts in *Chrysaora pacifica* (Goette) and *Cyanea nozakii* Kishinouye (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae): Effects of environmental factors on their production, dormancy and excystment. *J Exp Mar Biol Ecol* 446: 151–158.

- Toyokawa M, Fujii N (2015) First record of two invasive hydromedusae *Maeotias marginata* (Modeer, 1791) (Hydrozoa: Limnomedusae) and *Blackfordia virginica* Mayer, 1910 (Hydrozoa: Leptomedusae) in Japan. *Plankton Benthos Res* 10: 215–219.
- Treible LM, Condon RH (2019) Temperature-driven asexual reproduction and strobilation in three scyphozoan jellyfish polyps. *J Exp Mar Biol Ecol* 520: 151204.
- Tronolone VB, Morandini AC, Migotto AE (2002) On the occurrence of scyphozoan ephyrae (Cnidaria, Scyphozoa, Semaestomeae and Rhizostomeae) in the southeastern Brazilian coast. *Biota Neotropica* 2: 1–18.
- Villesen P (2007) FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Mol Ecol Notes* 7: 965–968.
- Voris HK (2000) Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *J Biogeogr* 27: 1153–1167.
- Wang N, Li C, Liang Y, Shi Y, Lu J (2014) Prey concentration and temperature effect on budding and strobilation of *Aurelia* sp. 1 polyps. *Hydrobiologia* 754: 125–134.
- Wang Y-T, Zheng S, Sun S, Zhang F (2015) Effect of temperature and food type on asexual reproduction in *Aurelia* sp. 1 polyps. *Hydrobiologia* 754: 169–178.
- Whitmore TG (1981) *Wallace's Line and Plate Tectonics*. Oxford University Press, Oxford.
- Widmer CL, Fox CJ, Brierley AS (2016) Effects of temperature and salinity on four species of northeastern Atlantic scyphistomae (Cnidaria: Scyphozoa). *Mar Ecol Prog Ser* 559: 73–

88.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138.

Wyrski K (1961) Scientific results of marine investigations of the South China Sea and the Gulf of Thailand. Physical oceanography of the Southeast Asian waters. NAGA Rep 2: 1–195.

Zaitsev Y, Öztürk B (2001) Exotic species in the Aegean, Marmara, Black, Azov and Caspian Seas. Turkish Marine Research Foundation, Istanbul, Turkey, pp. 101–103.

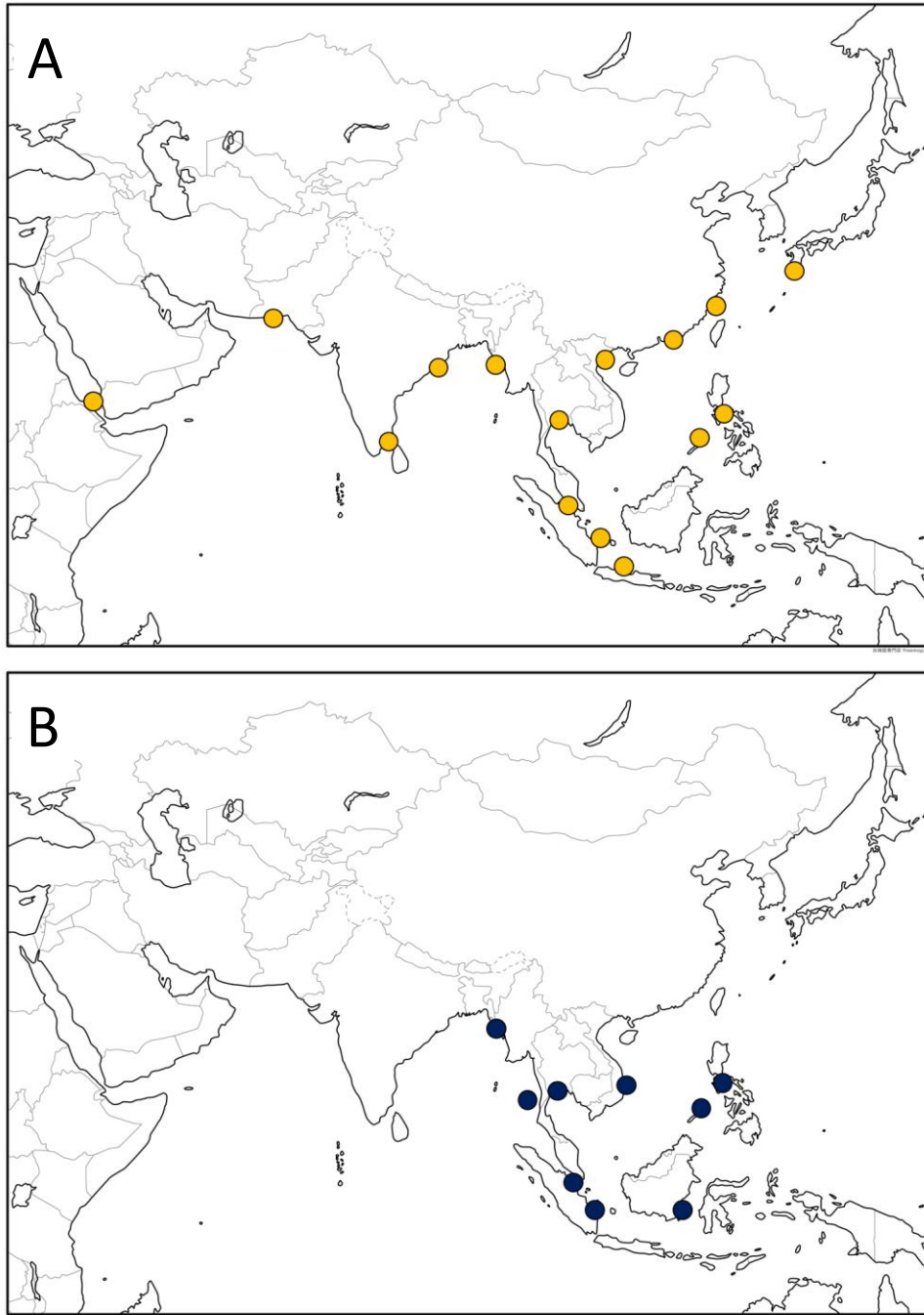


Fig. 1-1. Distribution maps of *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B). Positions are based on those reported in Kramp (1954), Omori & Nakano (2001), Omori & Kitamura (2004), Nishikawa et al. (2008, 2019), Gul & Morandini (2015).

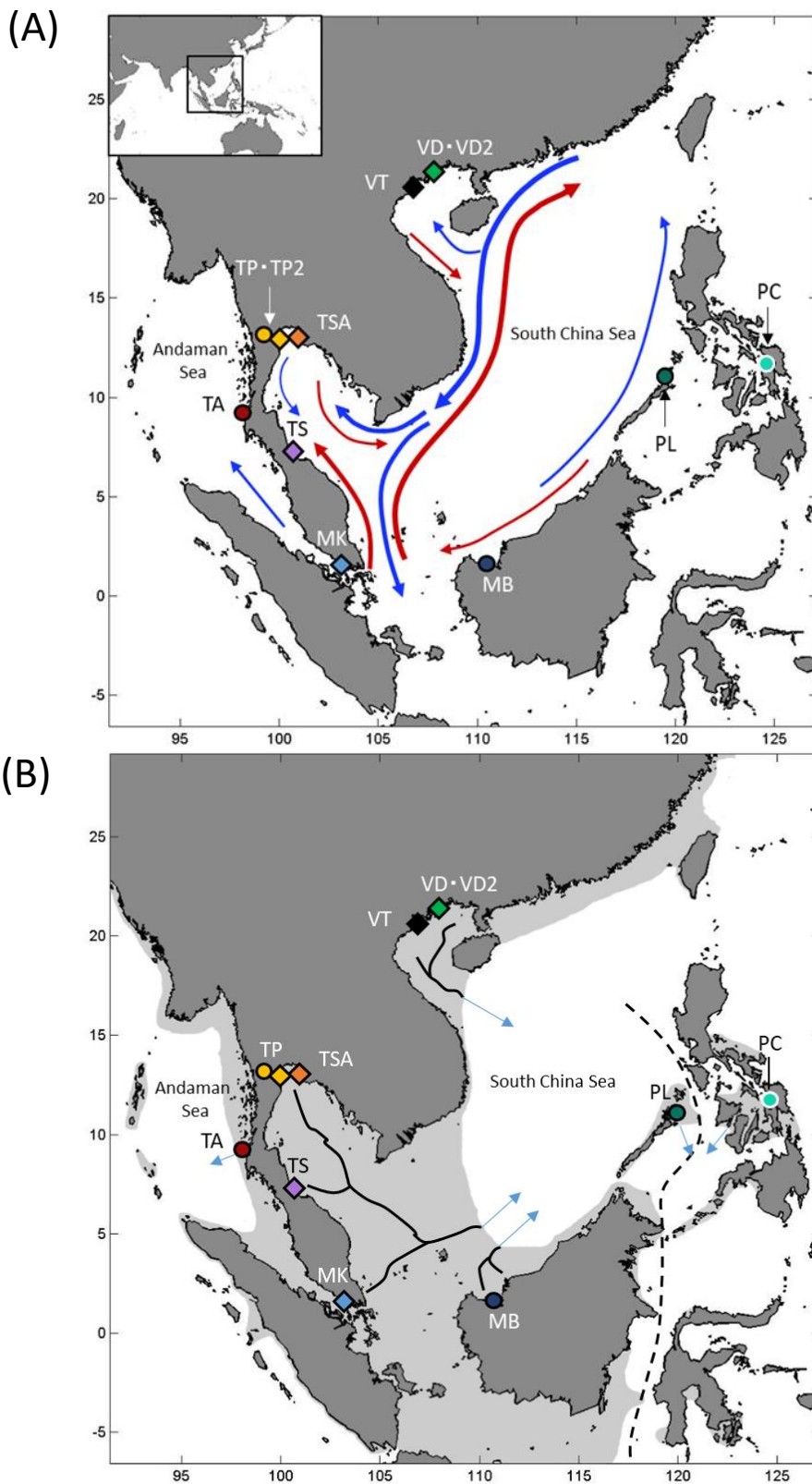


Fig. 1-2. (A) Sampling locations of *Rhopilema hispidum* (rhombs) and *Lobonemoides robustus* (circles). See also Table 1-1 for detailed information. Blue and red arrows indicate major ocean currents during the December–May and June–November seasons, respectively. Thick and thin arrows indicate current speeds of 50–100 cm sec^{-1} and 12–25 cm sec^{-1} , respectively (redrawn from Wyrki 1961), (B) Map of Southeast Asia when sea levels dropped by 120 m, creating Sundaland (shown as a shaded area. Redrawn from Voris 2000). Solid lines indicate estimated river systems near sampling locations in Sundaland (Voris 2000). Blue arrows indicate possible distributions of jellyfish populations during the low sea-level period. Wallace’s Line is shown as a dashed line (Huxley 1868, Whitmore 1981).

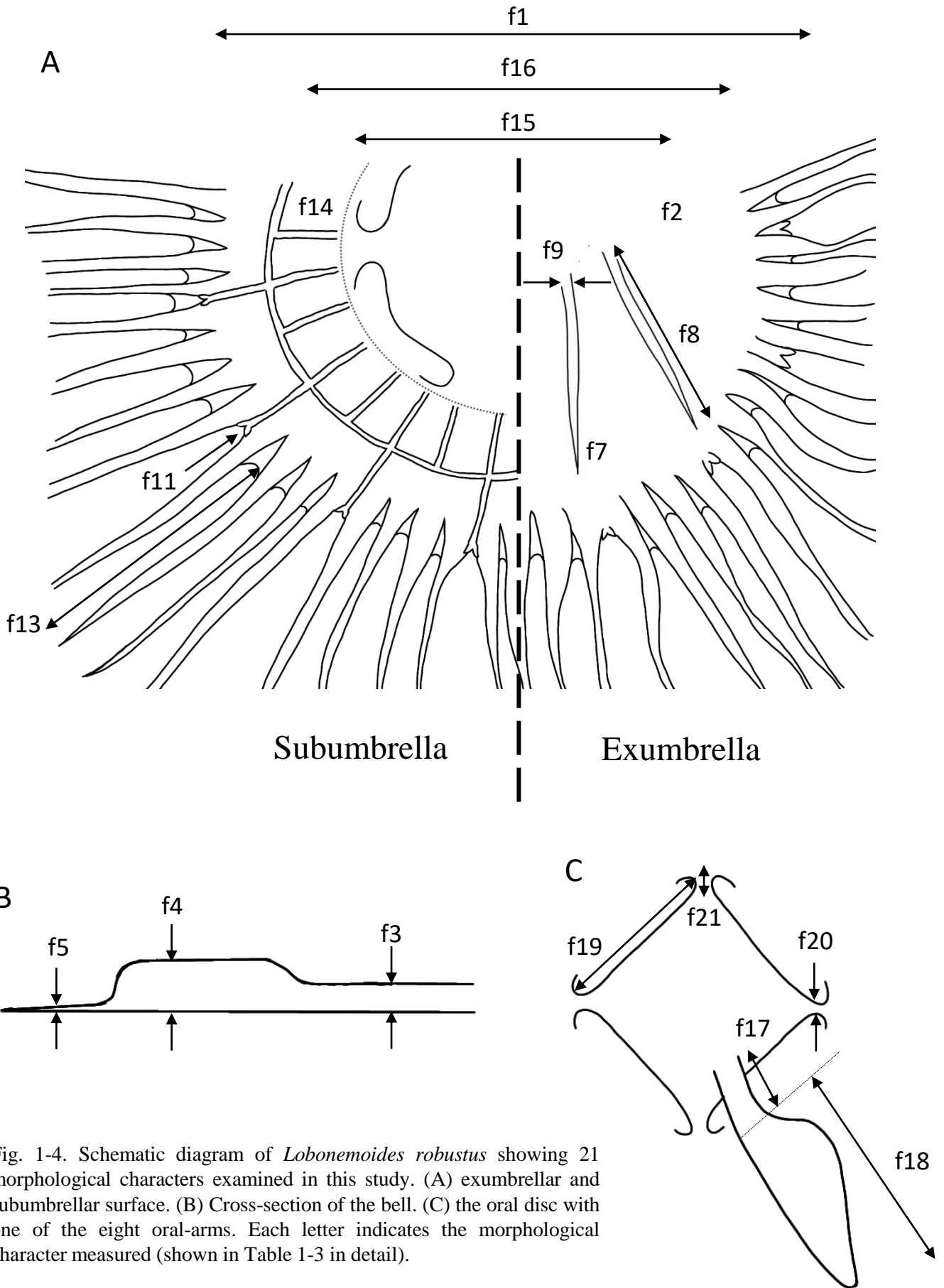


Fig. 1-4. Schematic diagram of *Lobonemoides robustus* showing 21 morphological characters examined in this study. (A) exumbrellar and subumbrellar surface. (B) Cross-section of the bell. (C) the oral disc with one of the eight oral-arms. Each letter indicates the morphological character measured (shown in Table 1-3 in detail).

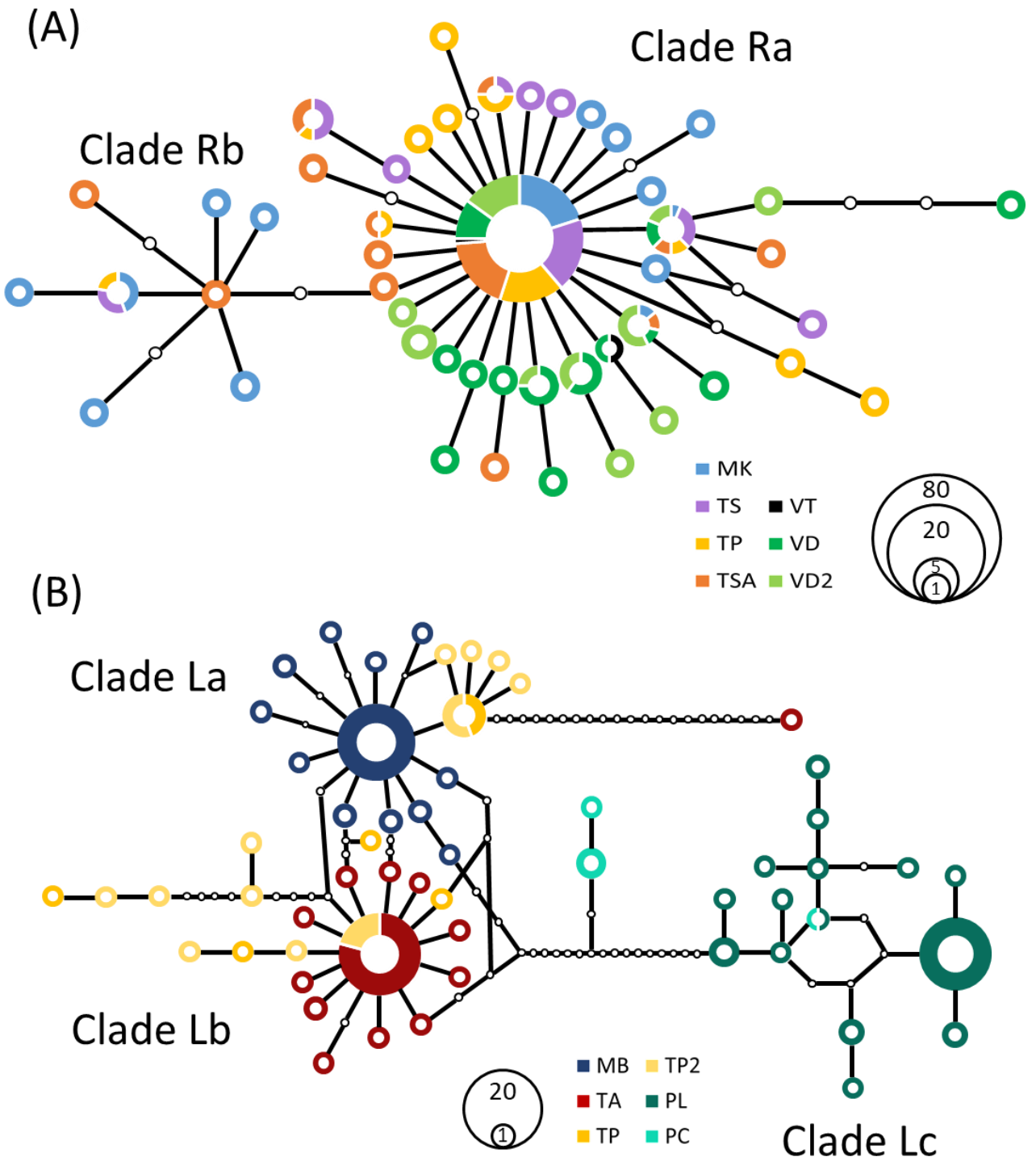


Fig. 1-5. Parsimony COI haplotype networks of (A) *Rhopilema hispidum* and (B) *Lobonemoides robustus*. Sizes of circles are proportional to haplotype frequencies and circle colors indicate their geographic origins. Each branch represents a one-nucleotide mutation. Small, empty circles symbolize hypothetical haplotypes. Site abbreviations correspond to Fig. 1-2 and Table 1-1.

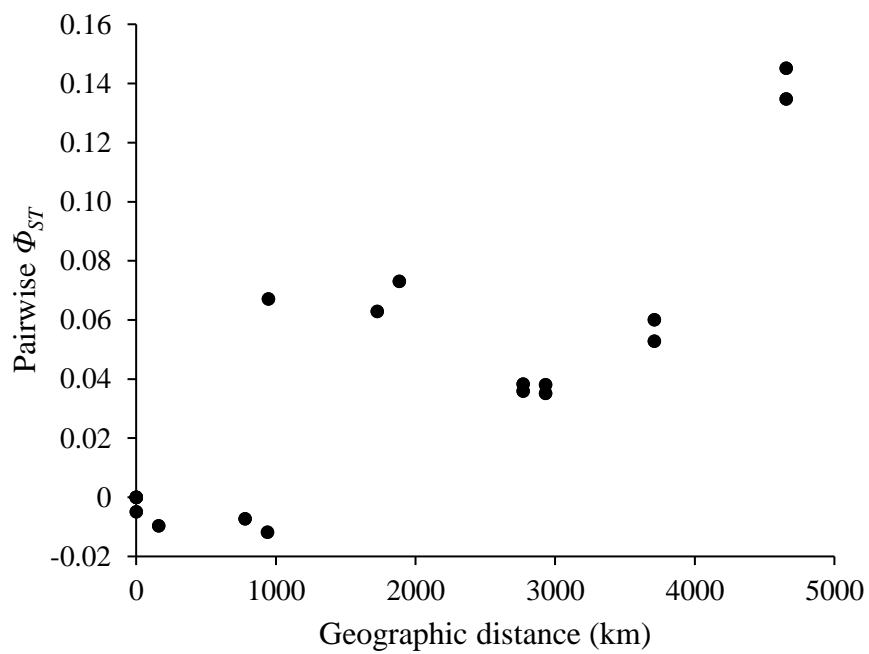


Fig. 1-6. Mantel test of relationships between pairwise Φ_{ST} values and geographic distances (coastal line) for *Rhopilema hispidum* COI. Significant correlation was obtained (Spearman's rank coefficient test, $\rho = 0.718$, $p < 0.01$).

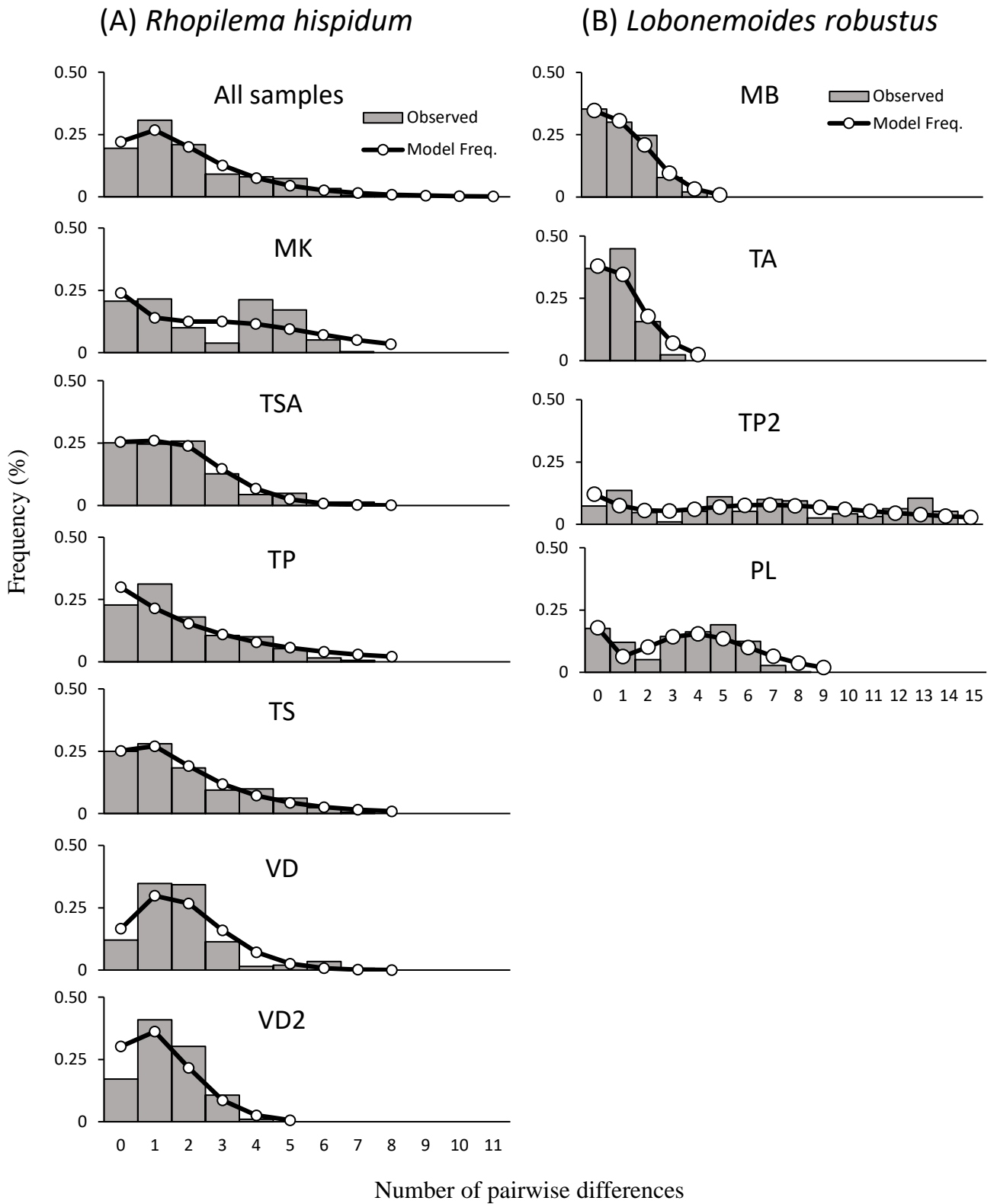


Fig. 1-7. (A) *Rhopilema hispidum* and (B) *Lobonemoides robustus*. COI mismatch distributions. Histograms show the observed distribution; lines show the expected distribution under a model of sudden population expansion.

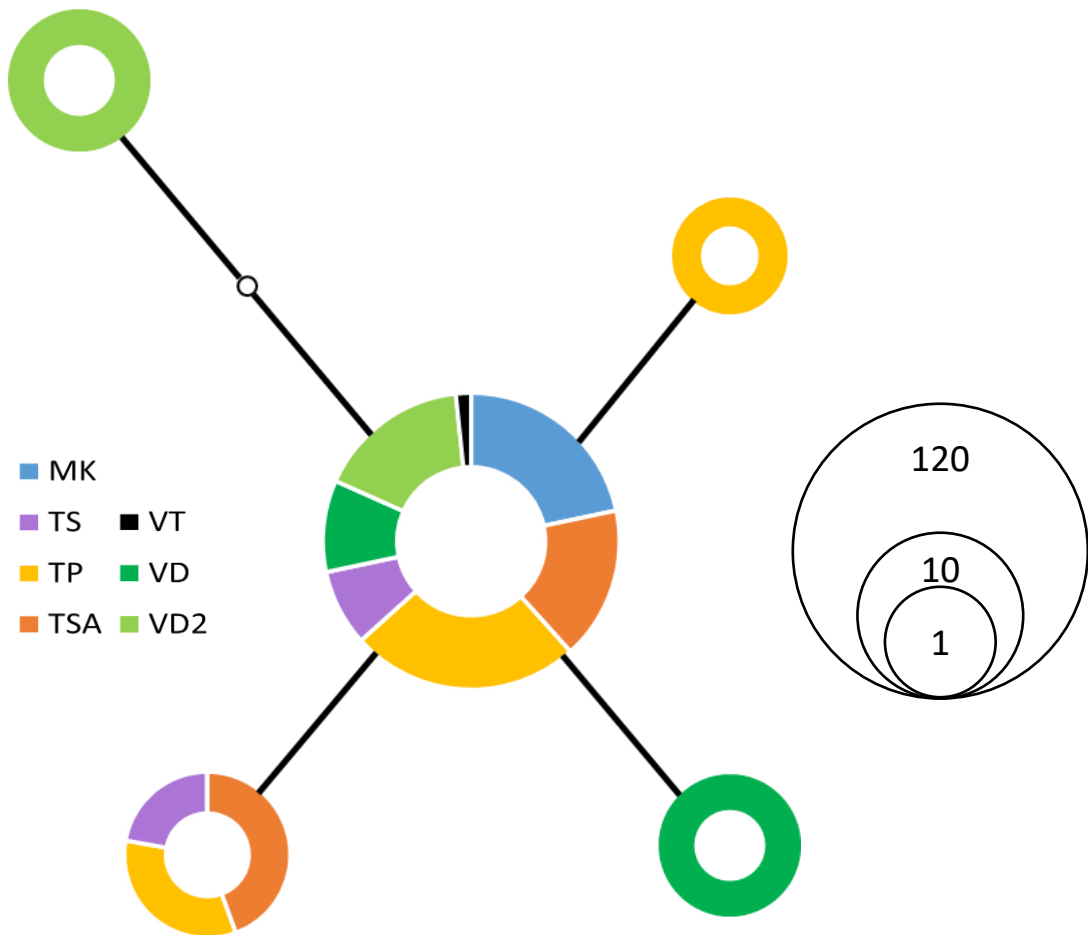
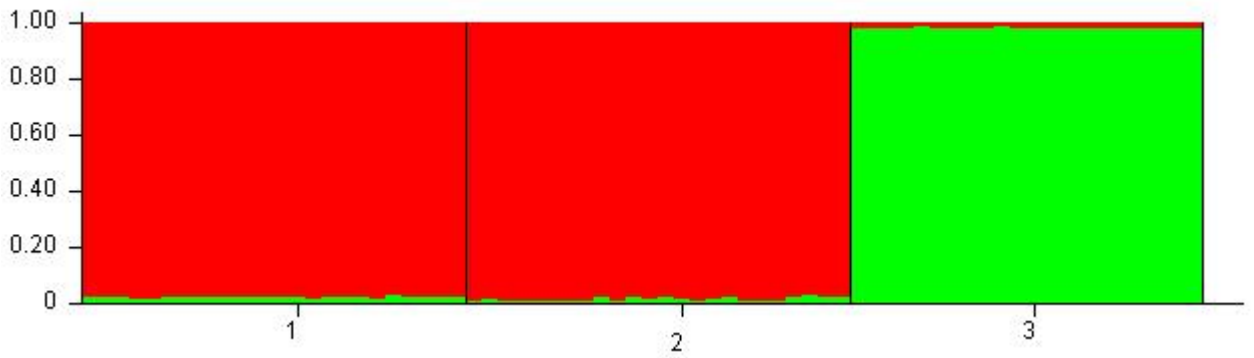
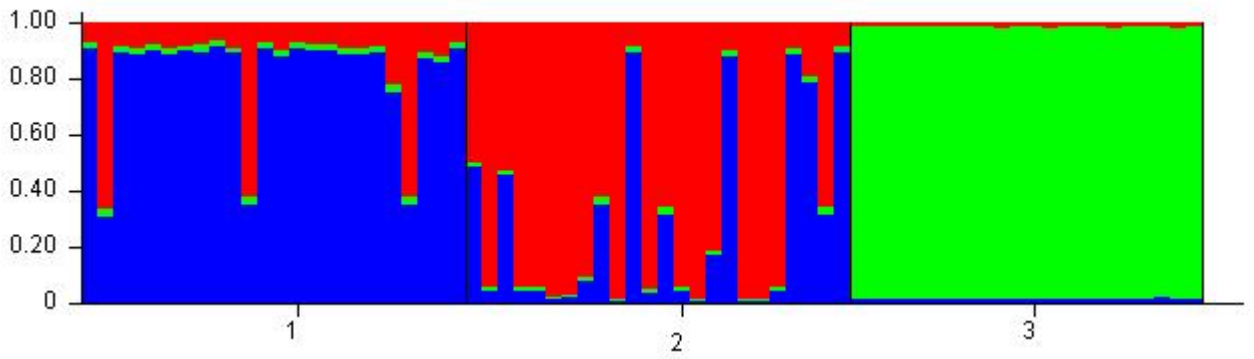


Fig. 1-8. Parsimony ITS1 allele network of *Rhopilema hispidum*. Circle size is proportional to the haplotype frequency and circle colors indicate geographic origins. Each branch represents a one-nucleotide mutation. Small, empty circles symbolize hypothetical haplotypes. Site abbreviations correspond to Fig. 1-2 and Table 1-1.

$K = 2$



$K = 3$



$K = 4$

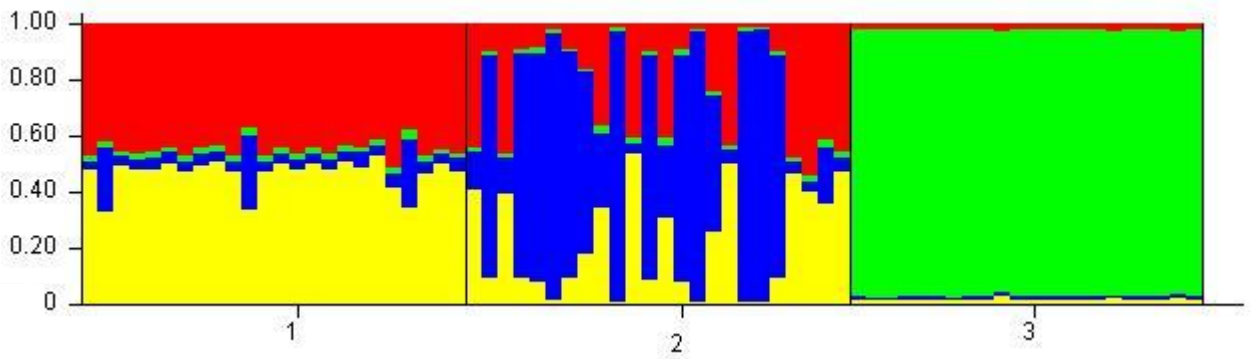


Fig. 1-9. Bayesian STRUCTURE bar plot based on probabilities for 81 individuals of three populations of *Lobonemoides robustus* ITS1 fragments. Black lines separate populations. Locations: 1. MB, 2. TA, 3. PL.

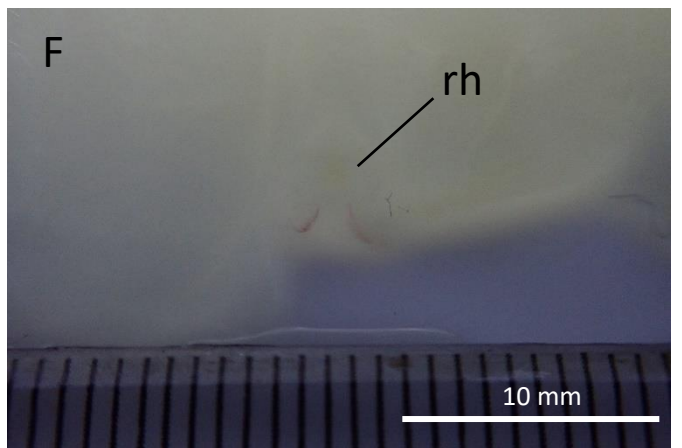
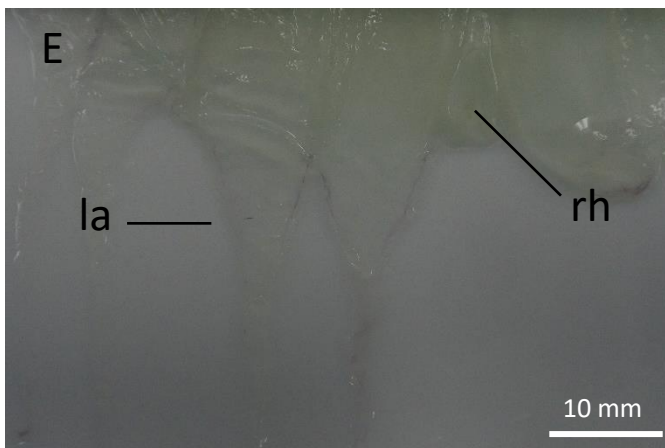
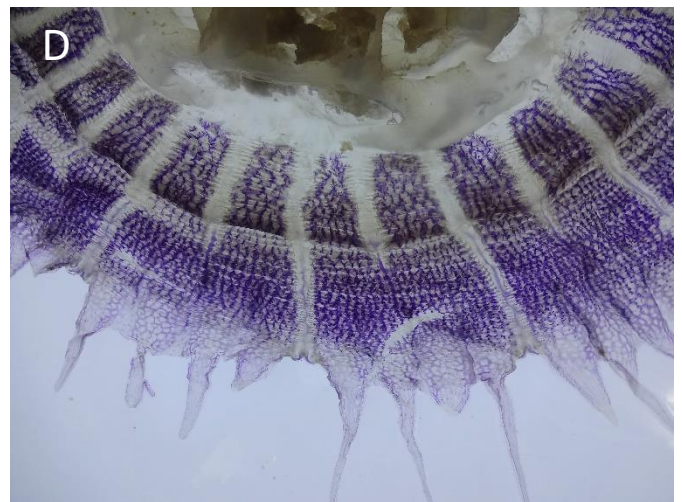
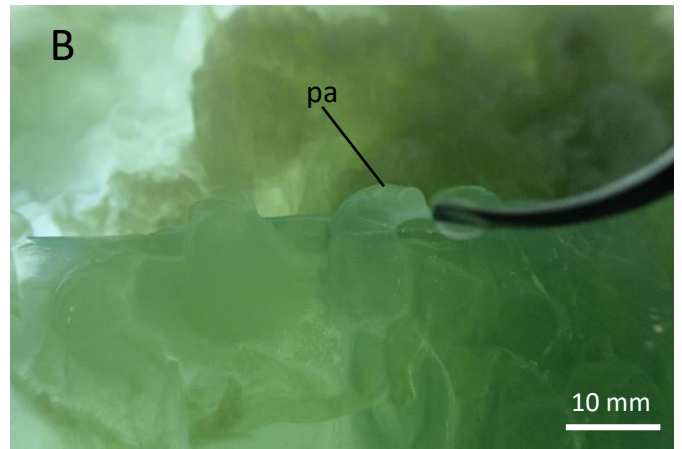
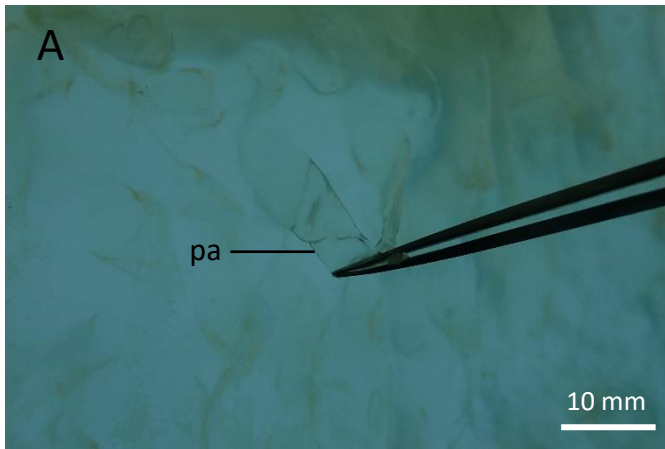


Fig. 1-10. Morphology of *Lobonemoides robustus* A: papillae (pa) conical type, B: papillae (pa) membranous type, C: most common types of bell, D: bell with purple pigments, E: lappets (la) with purple pigment, F: rhopalium (rh) with purple pigment.

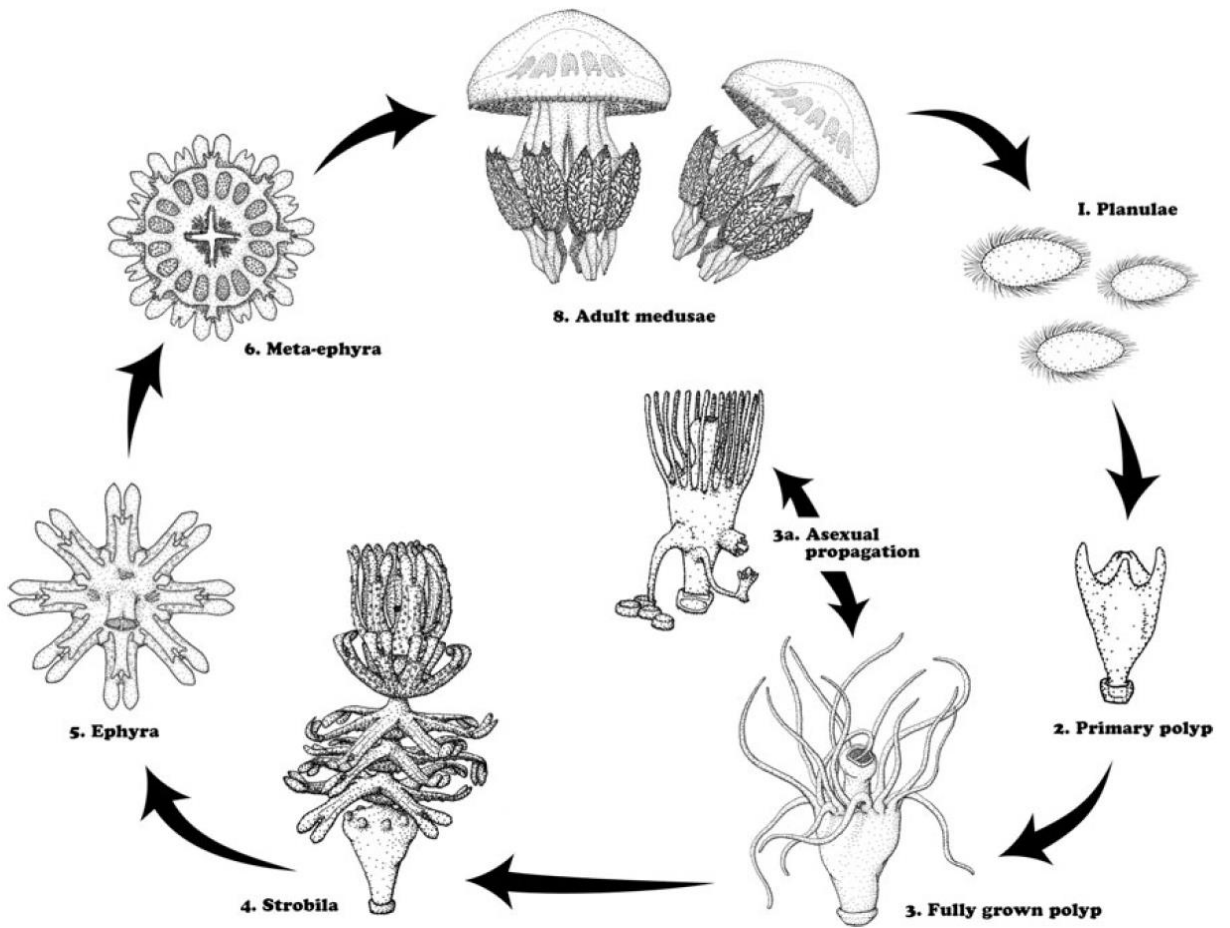


Fig. 2-1. Schematic representation of the life cycle of the order Rhizostomeae (from Fuentes et al. 2011).

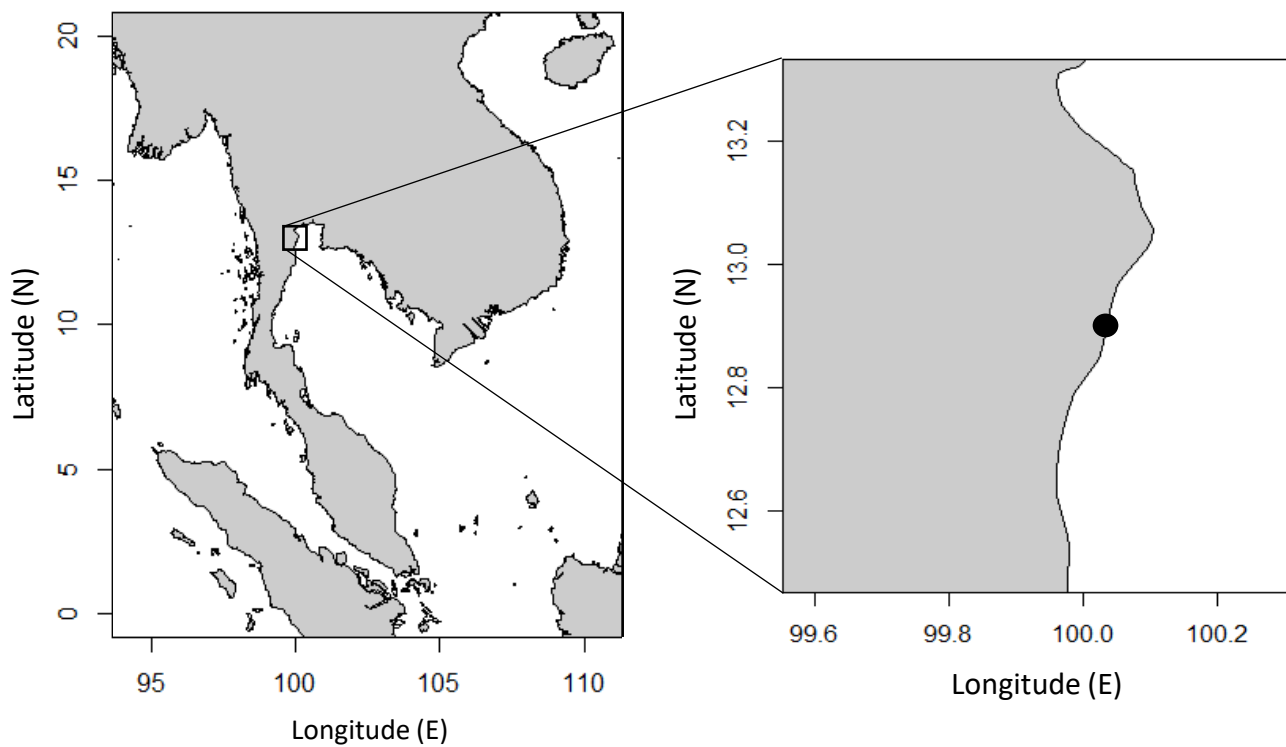


Fig. 2-2. Locations of Cha Am station, Burapha University.

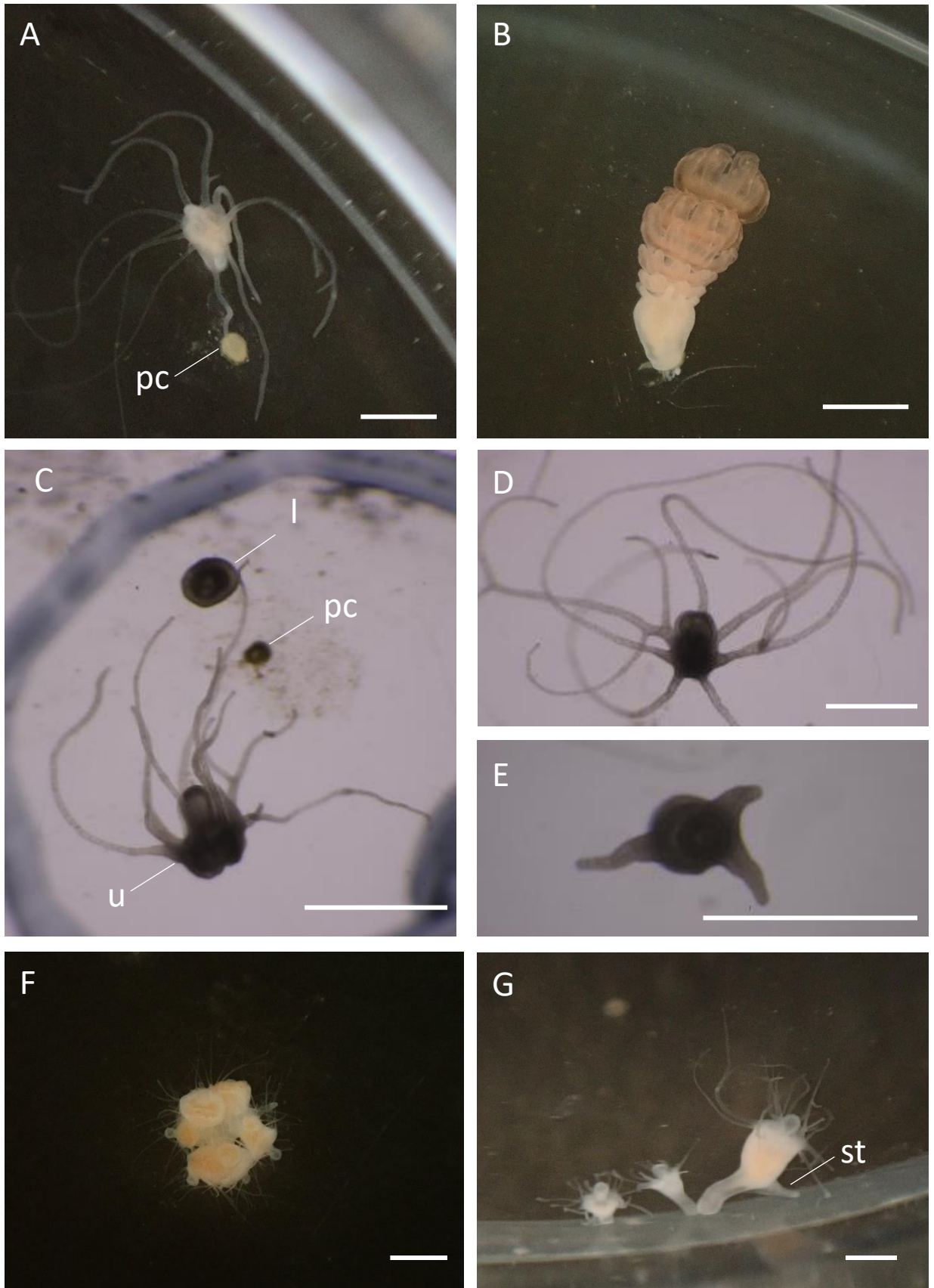
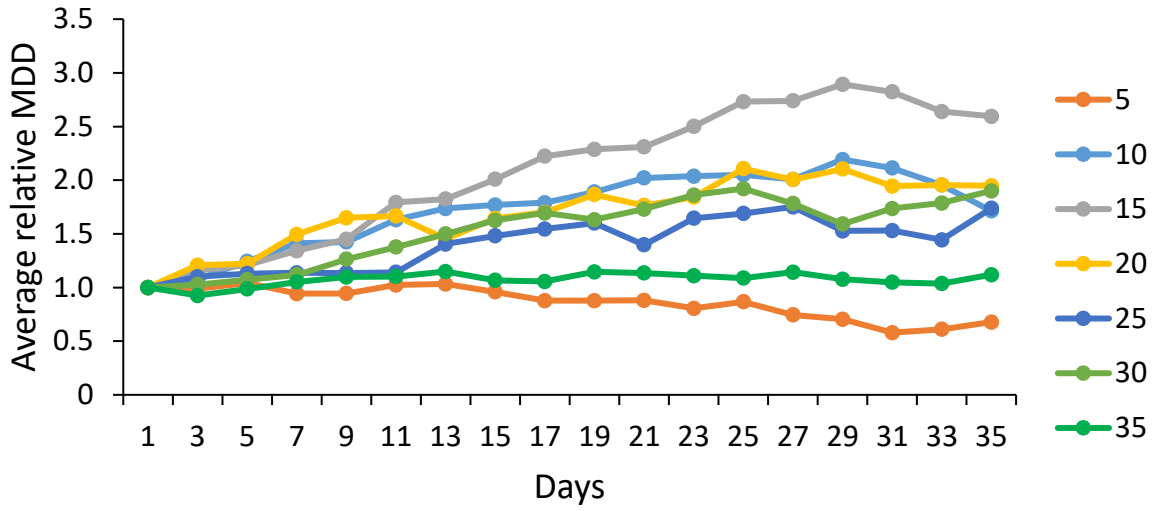


Fig. 2-3. *Rhopilema hispidum* (A–E) and *Lobonemoides robustus* (F, G). A: polyp and podocyst (pc), B: strobilation in progress, C: upper (u) and lower (l) parts polyp separated, D: settlement of upper part of polyp (after three days), E: lower part of polyp regenerating upper part (after three days), F: polyp with lateral budding, G: polyp showing stolon (st). Scale bar; 1 mm.

(A) *Rhopilema hispidum*



(B) *Lobonemoides robustus*

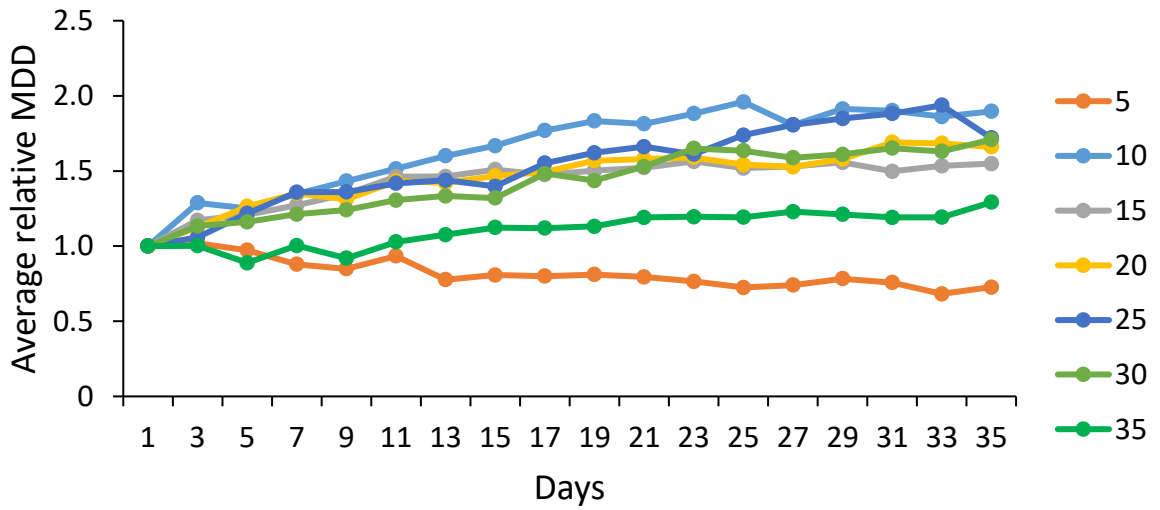
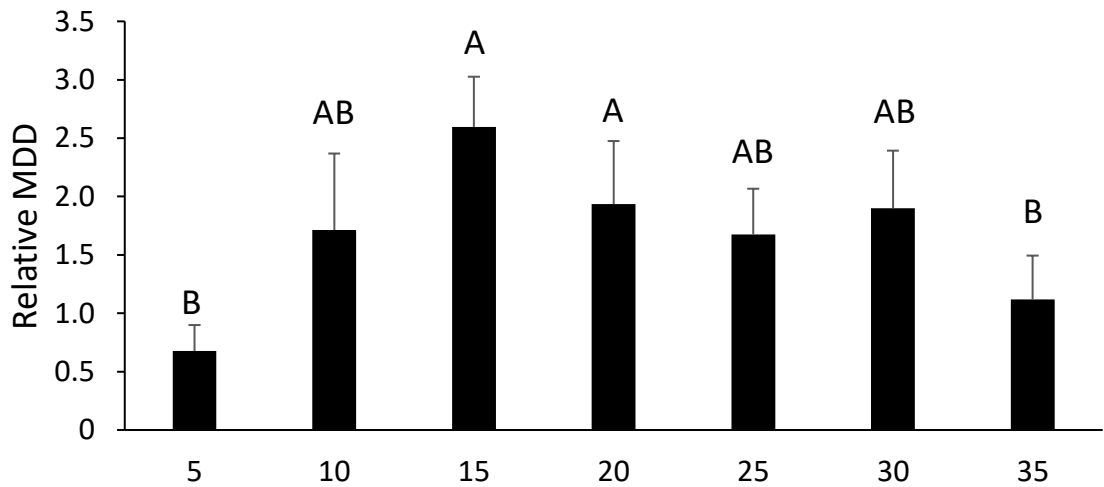


Fig. 2-4. *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B). Daily changes in average relative MDD at each salinity experiment during the 35 days.

(A) *Rhopilema hispidum*



(B) *Lobonemoides robustus*

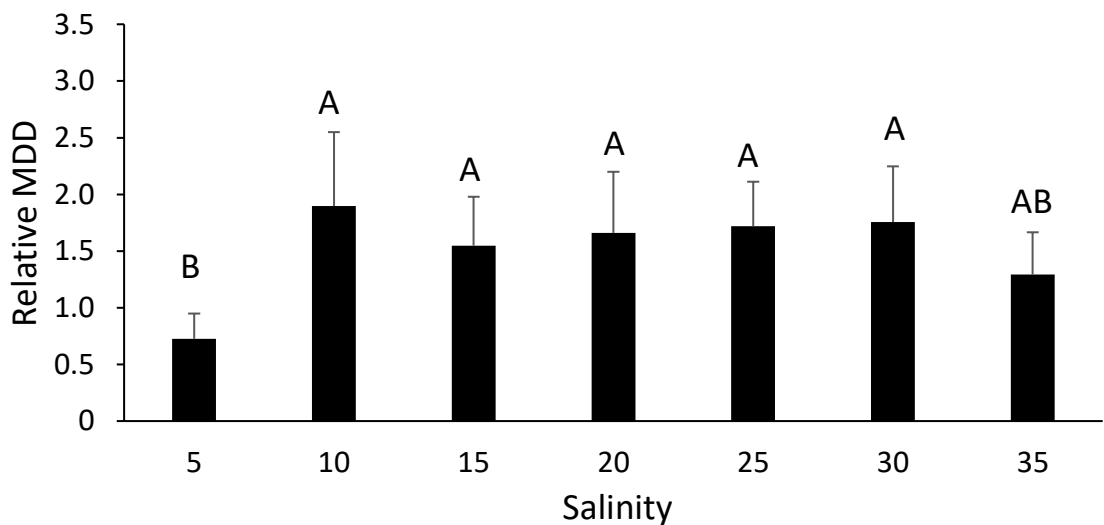
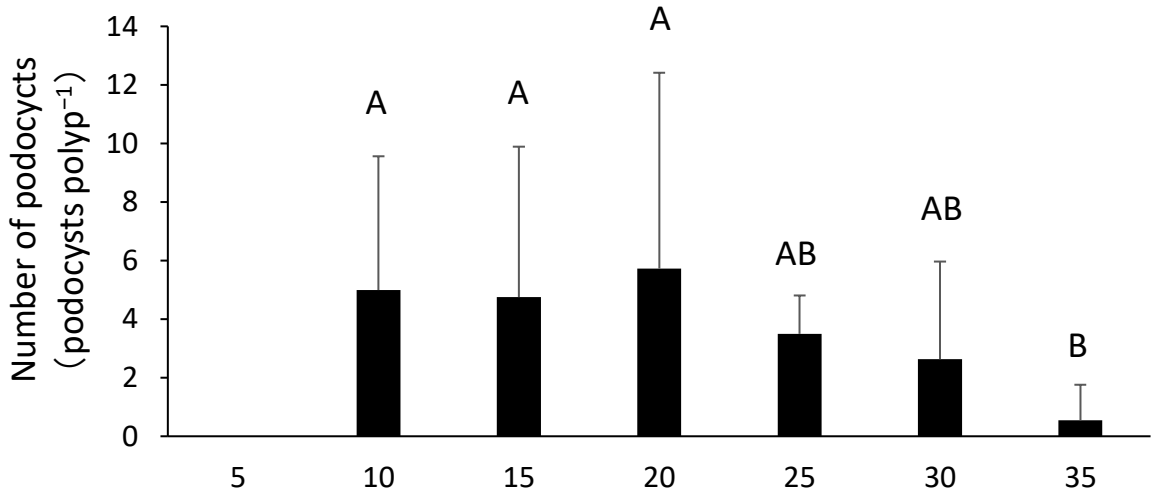


Fig. 2-5. Mean relative MDD of *Rhopilema hispidum* (A) & *Lobonemoides robustus* (B) at different salinities after 35 days. Different letters above the bars indicate statistical difference by means of pair-wise comparison (One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

(A) *Rhopilema hispidum*



(B) *Lobonemoides robustus*

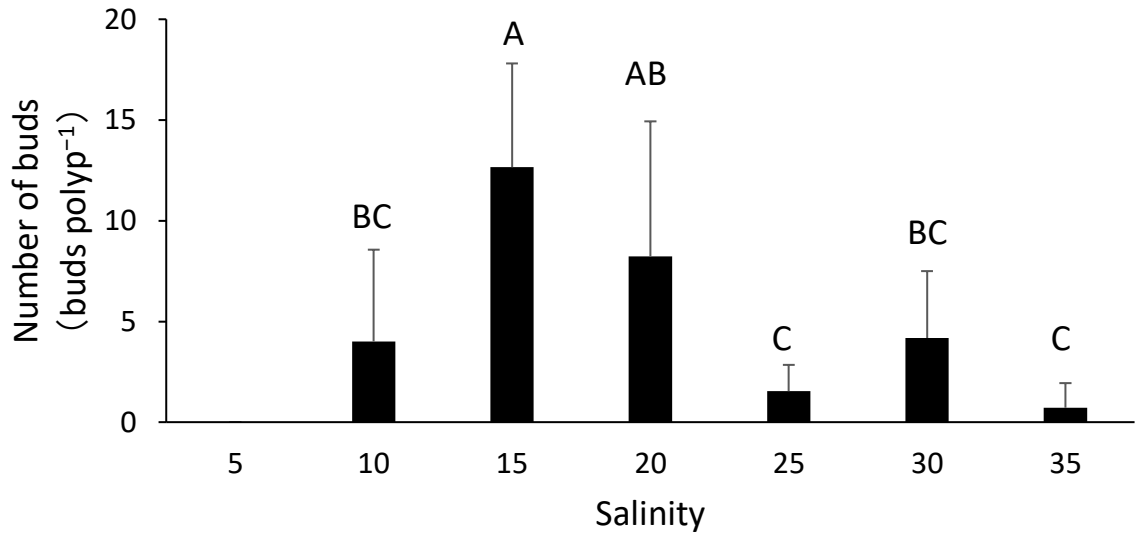
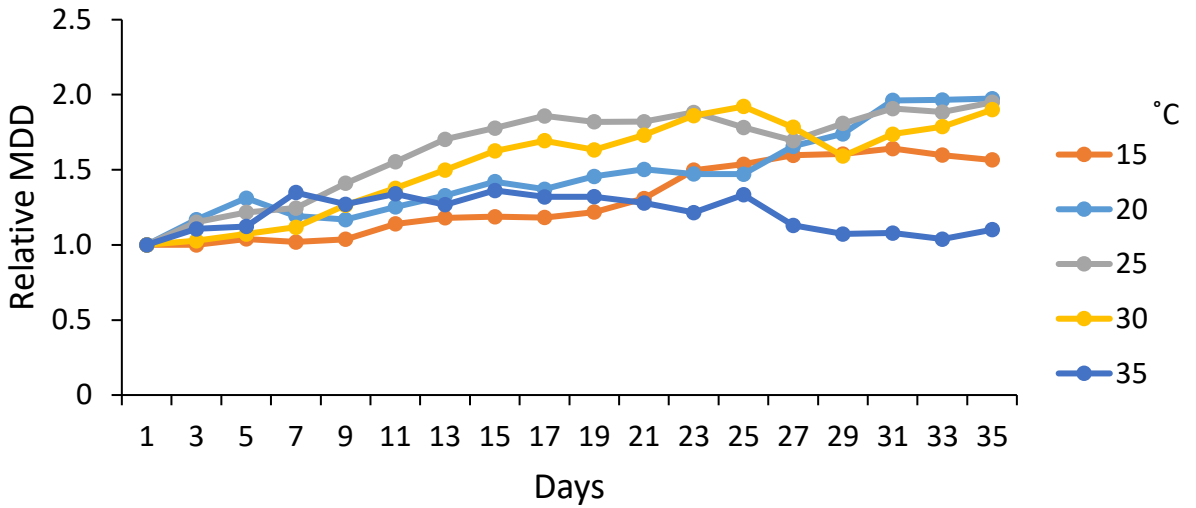


Fig. 2-6. Mean accumulated number of podocysts and buds in *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B) at different salinities after 35 days. Different letters above the bars indicate statistical difference by means of pair-wise comparison (One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

(A) *Rhopilema hispidum*



(B) *Lobonemoides robustus*

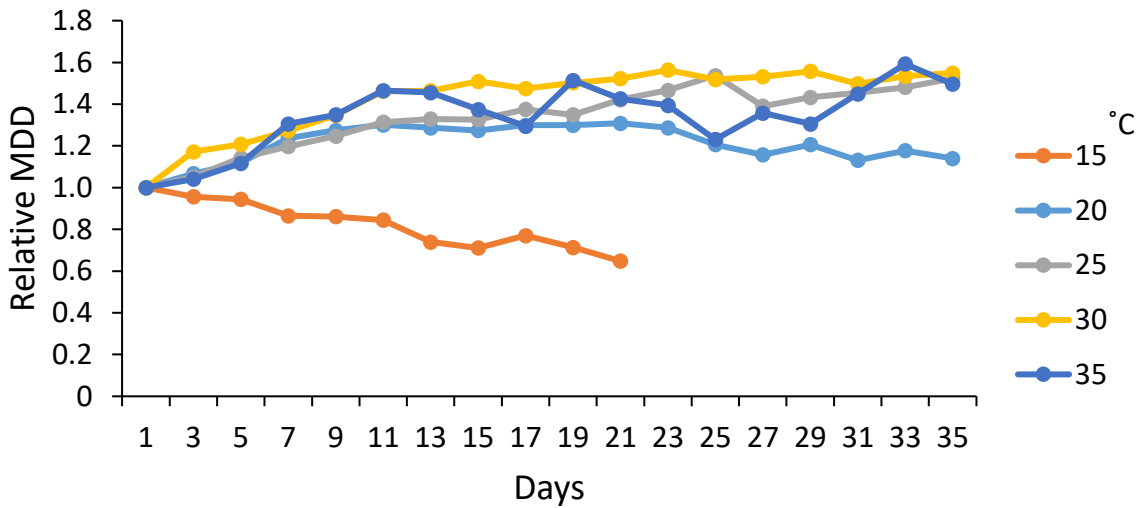
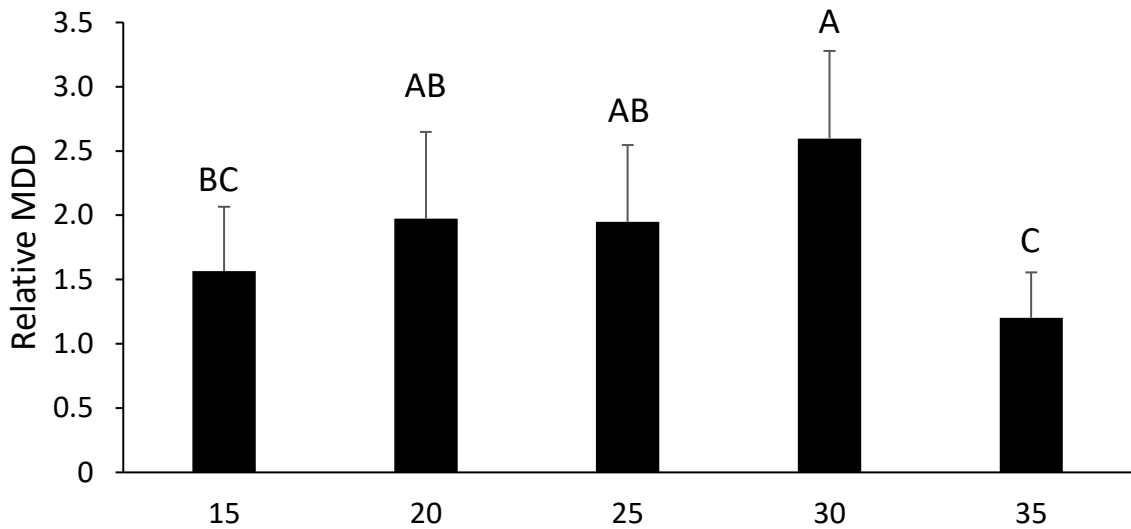


Fig. 2-7. *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B). Daily changes in average relative MDD at each temperature experiment during the 35 days.

(A) *Rhopilema hispidum*



(B) *Lobonemoides robustus*

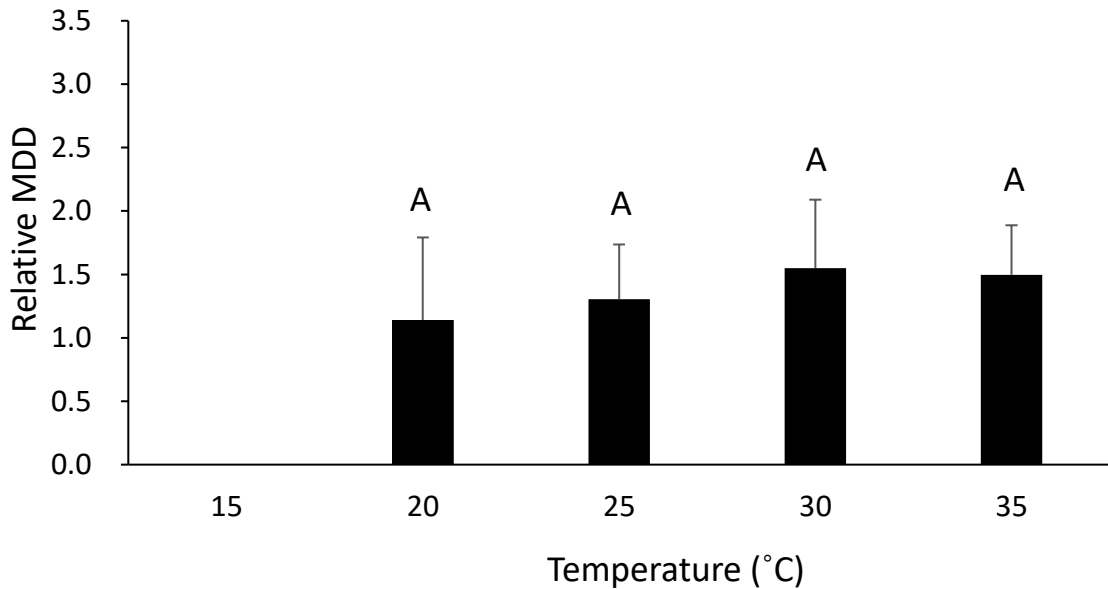
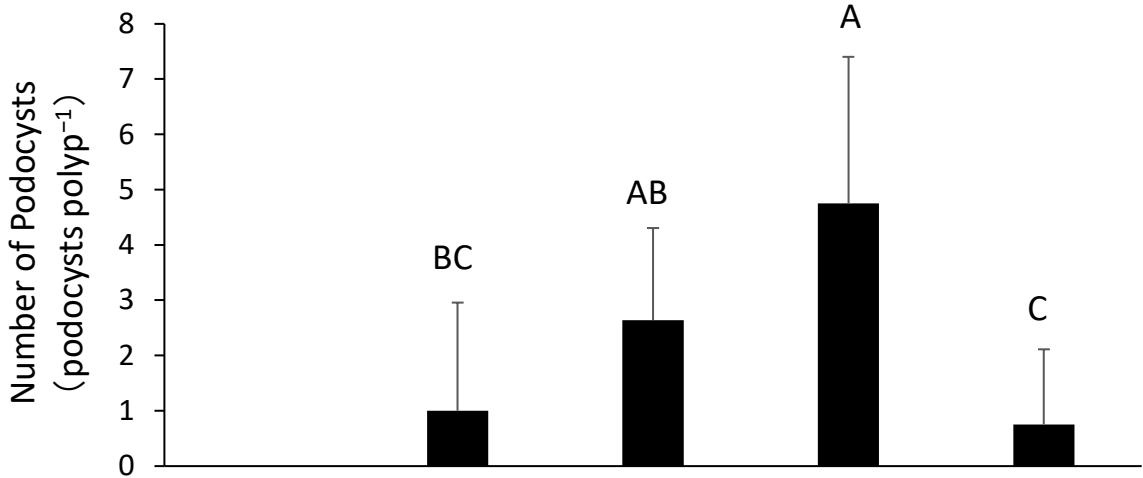


Fig. 2-8. Mean relative MDD of *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B) at different temperatures after 35 days. Different letters above the bars indicate statistical difference by means of pair-wise comparison (One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

(A) *Rhopilema hispidum*



(B) *Lobonemoides robustus*

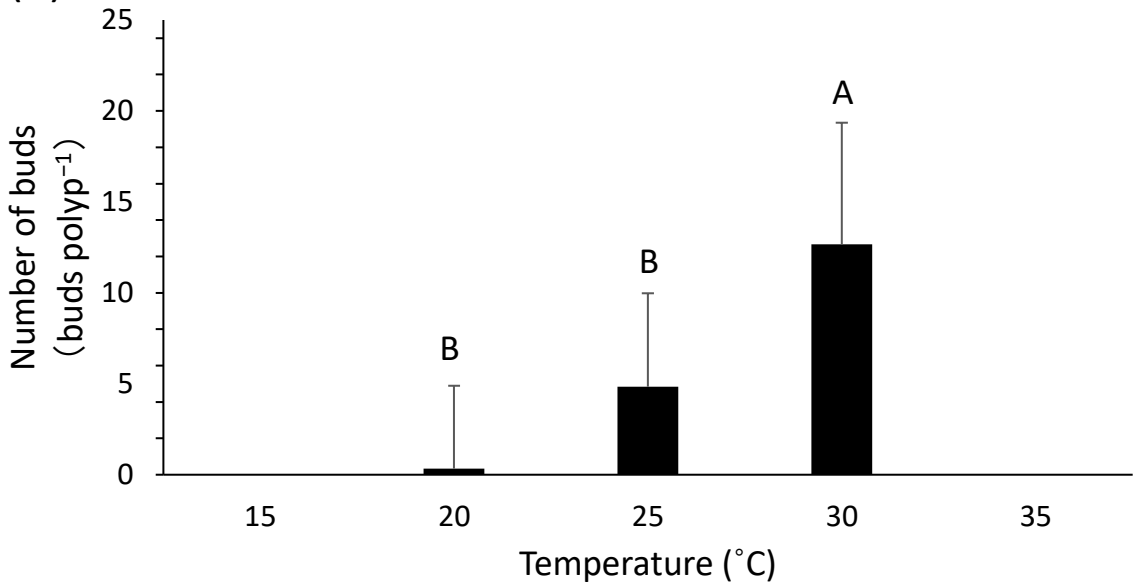


Fig. 2-9. Mean accumulated number of podocysts and buds in *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B) at different temperatures after 35 days. Different letters above the bars indicate statistical difference by means of pair-wise comparison (One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, $p < 0.05$).

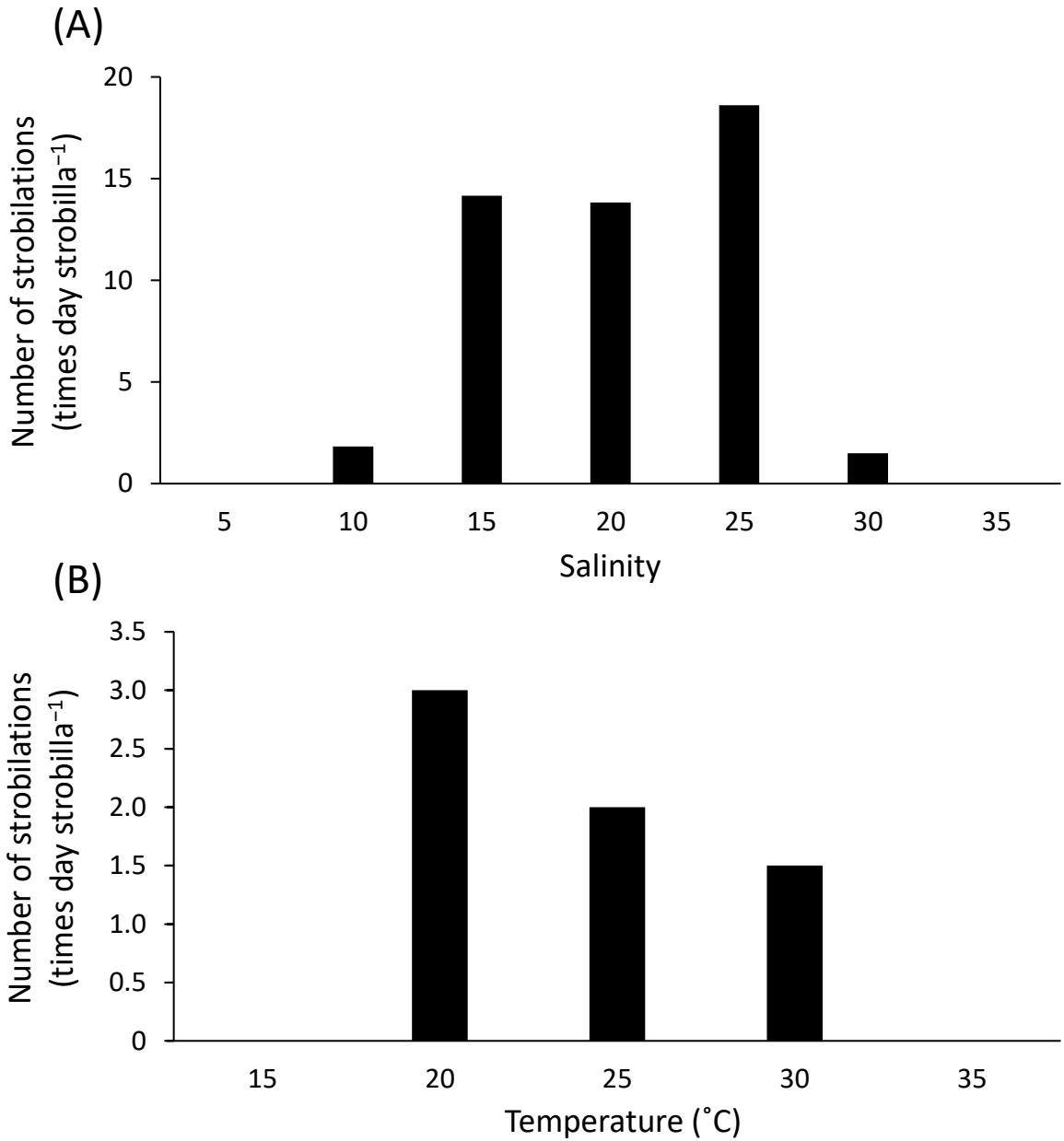


Fig. 2-10. Number of strobilation in *Rhopilema hispidum* observed in different salinities (A) and temperatures (B).

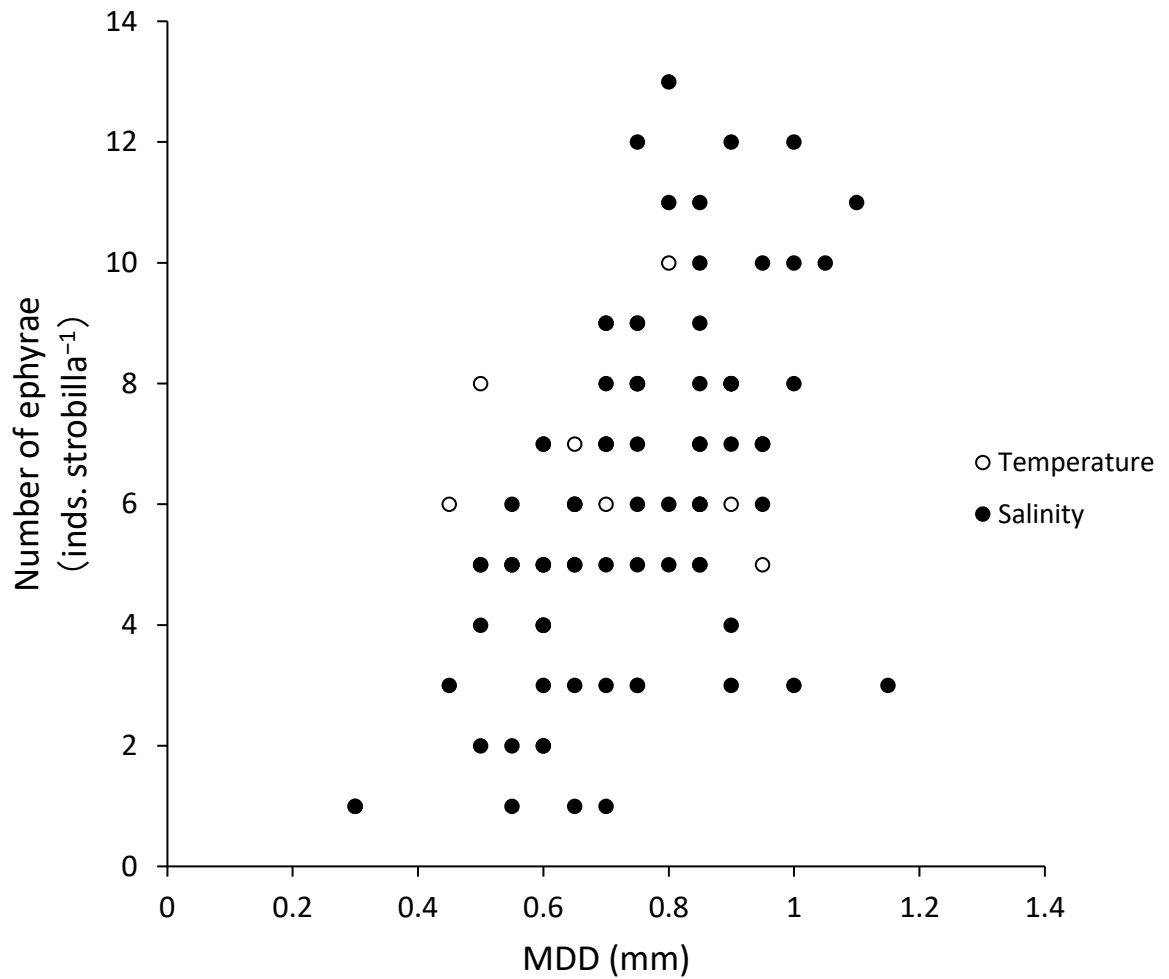


Fig. 2-11. Relationship between mouth disc diameter (MDD) of polyps and number of ephyrae per strobila in *Rhopilema hispidum*. Open circle and black circle indicate the data in temperature and salinity experiments, respectively.

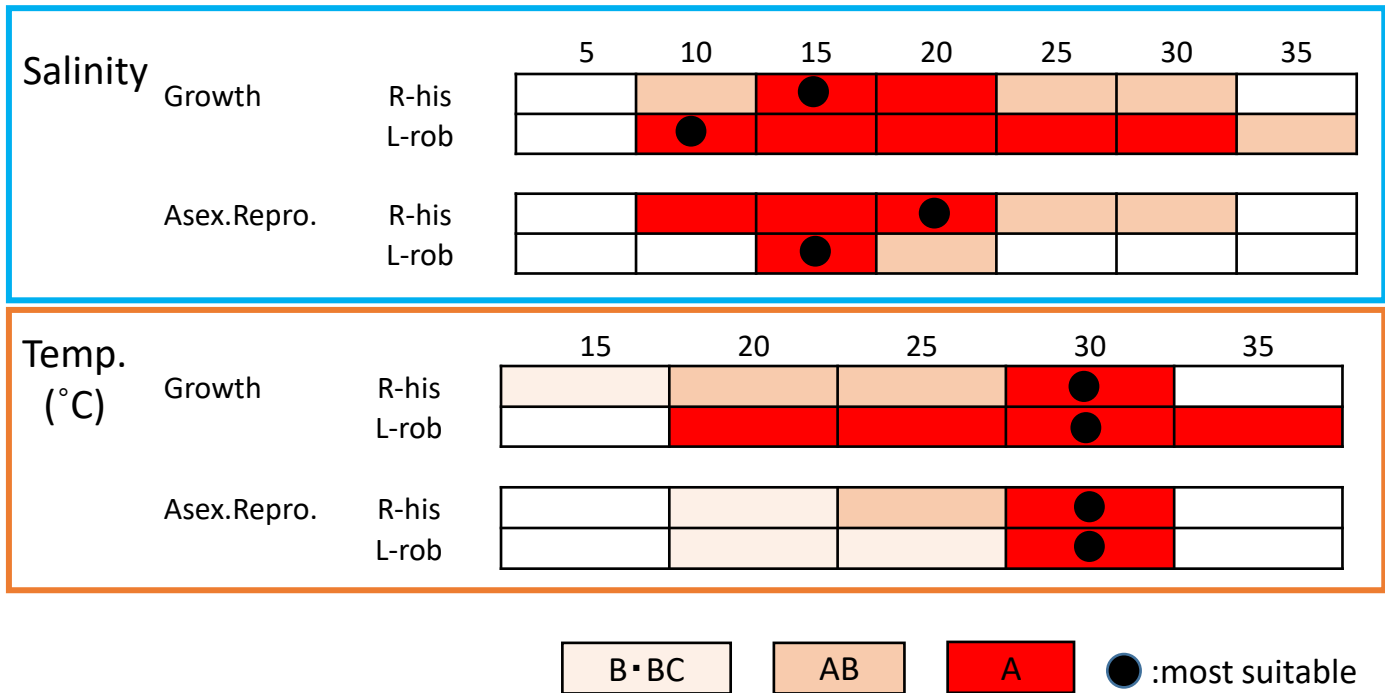


Fig. 2-12. Summary of the experiments in the polyps of two jellyfish, *Rhopilema hispidum* (R-his) and *Lobonemoides robustus* (L-rob). Upper; effect of salinity on somatic growth (as of relative MDD) and asexual reproduction. Lower; effect of temperature. Colors in the bar indicate statistical relationship (same letter indicates no significant differences). See, figs. 2-4, 5, 7, 8 for further information.

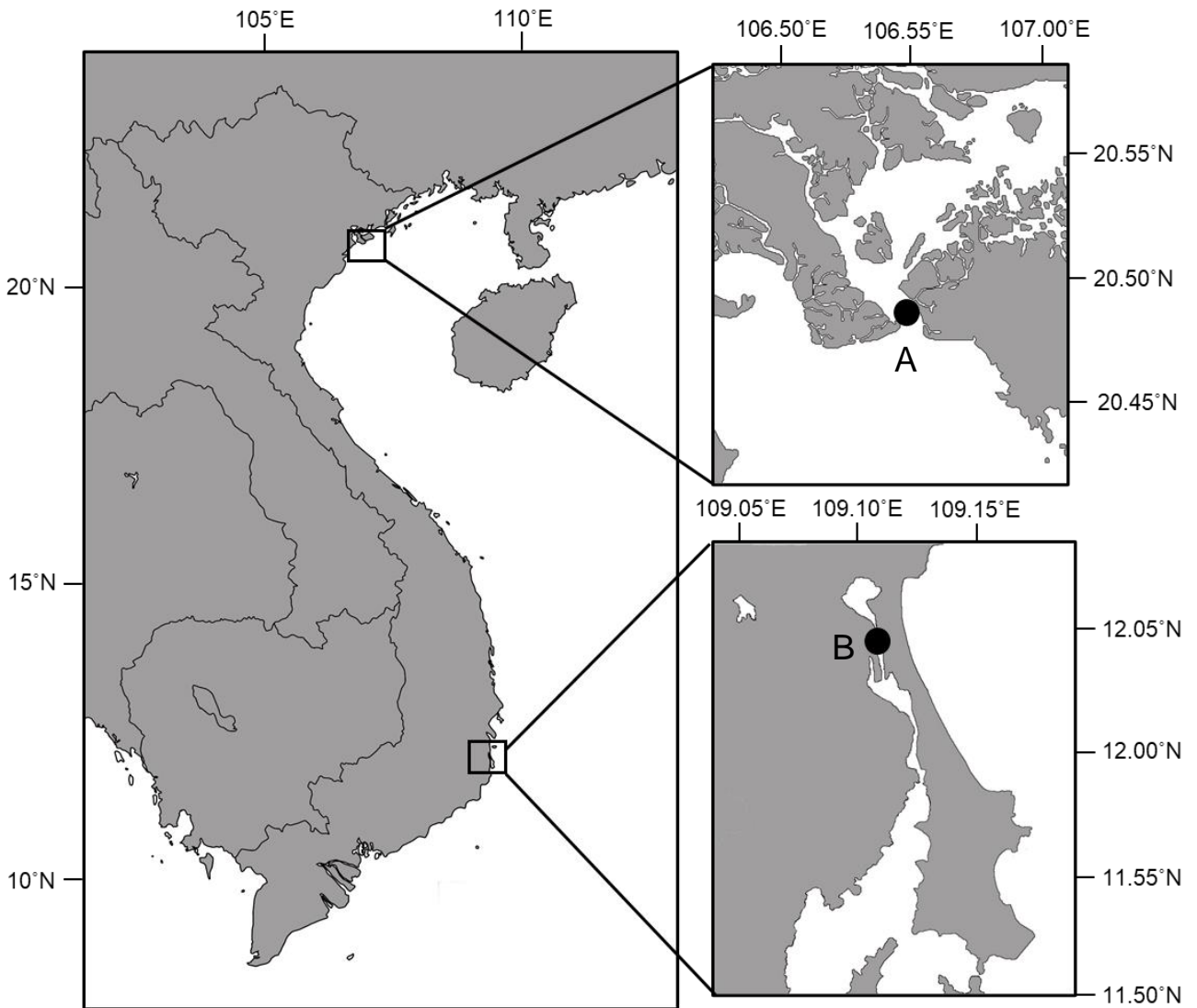


Fig. 3-1. Sampling locations of hydromedusa *Blackfordia* sp. in Vietnam. A, Lach Huyen River mouth, Hai Phong; B, Thuy Trieu Lagoon, Nha Trang.

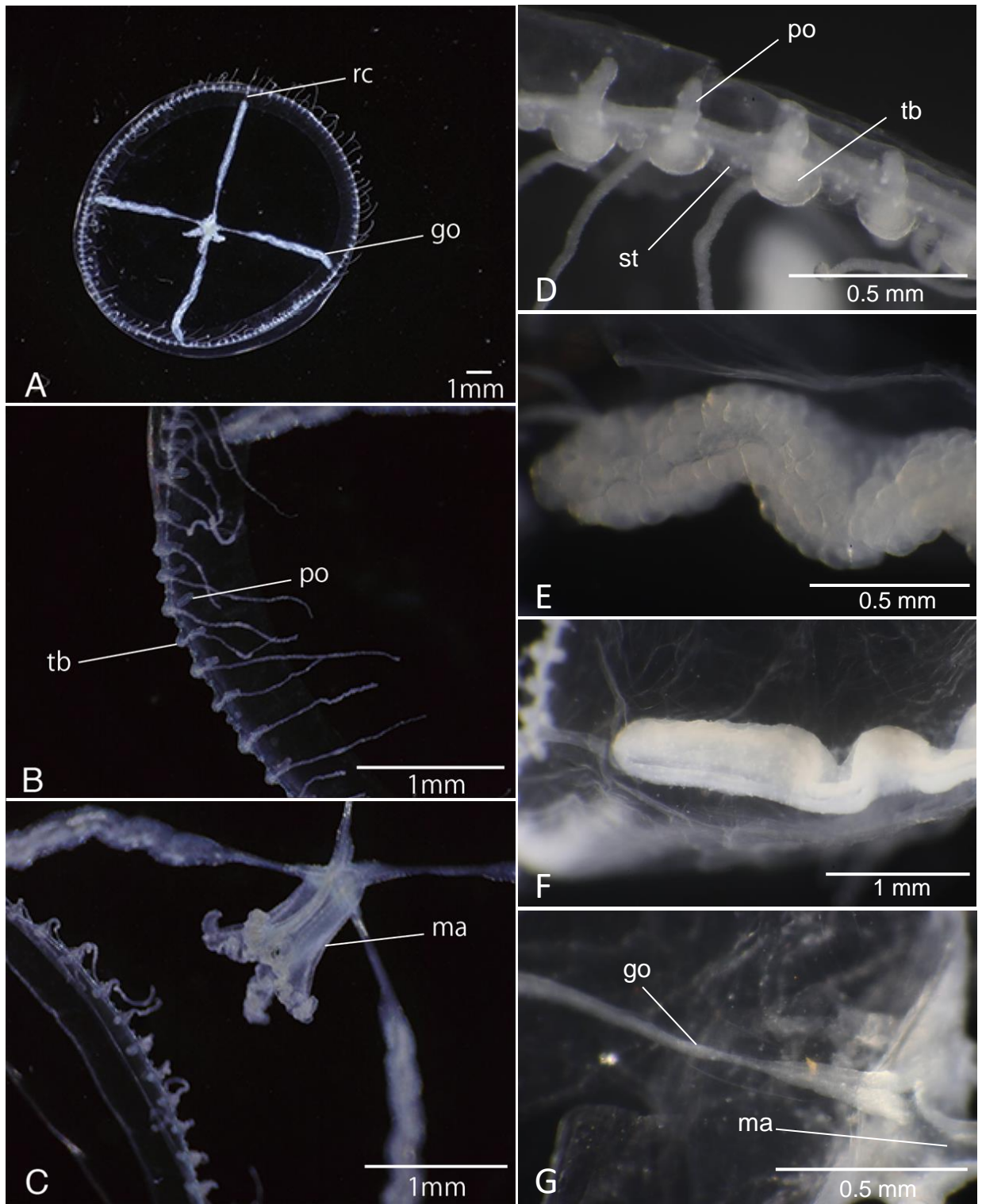
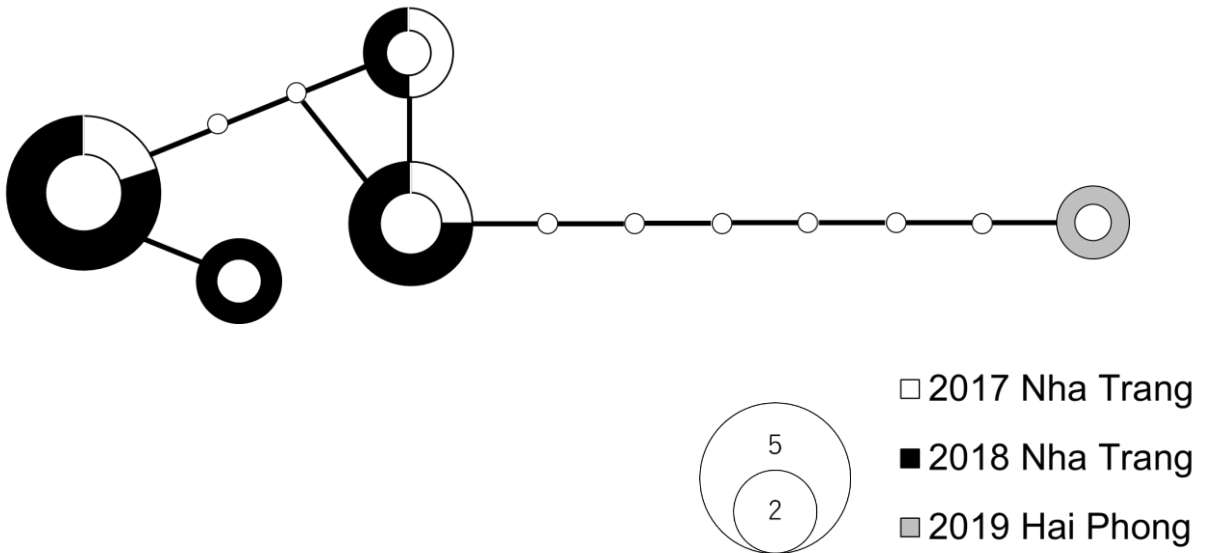


Fig. 3-2. *Blackfordia* sp. collected in Nha Trang, Vietnam. A: subumbrellar view showing radial canal (rc) and gonad (go), B: tentacular bulb (tb) and tentacular bulb projection (po), C: manubrium (ma), D: close-up view of umbrellar margin showing tentacular bulb (tb), tentacular bulb projection (po), and statocysts (st), E: matured gonad of female, F: matured gonad of male, G: immature gonad (go). A–C: a female, bell diameter 11.2 mm, D, E: a female, bell diameter 6.7 mm, F: a male, bell diameter unknown, G: an immature specimen, 4.2 mm.

(A) 16S



(B) COI

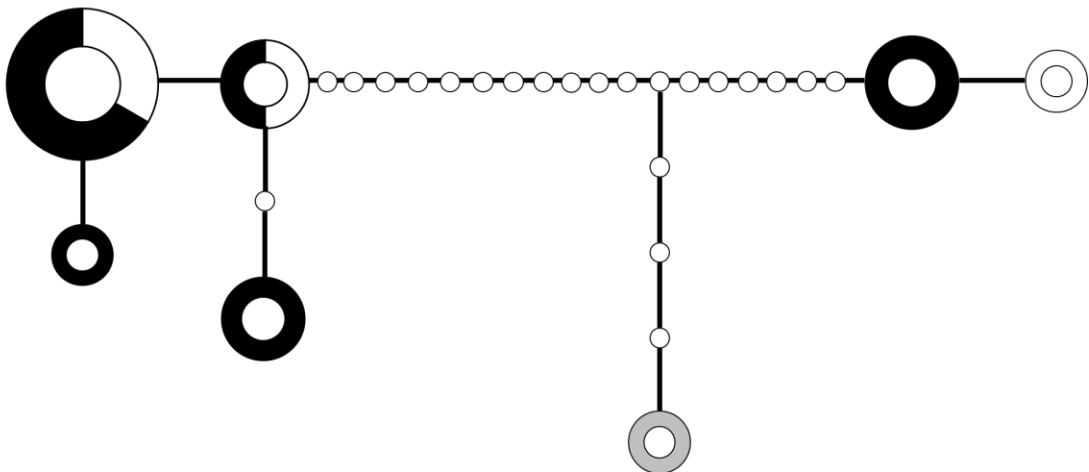


Fig. 3-3. Parsimony haplotype network of (A) 16S and (B) COI of *Blackfordia* sp. in Vietnam. The size of circles is proportional to the haplotype frequency and the color of circles indicates the sampling locations and collection years. Each branch represents a one-nucleotide mutation. Small empty circles symbolize hypothetical haplotypes.

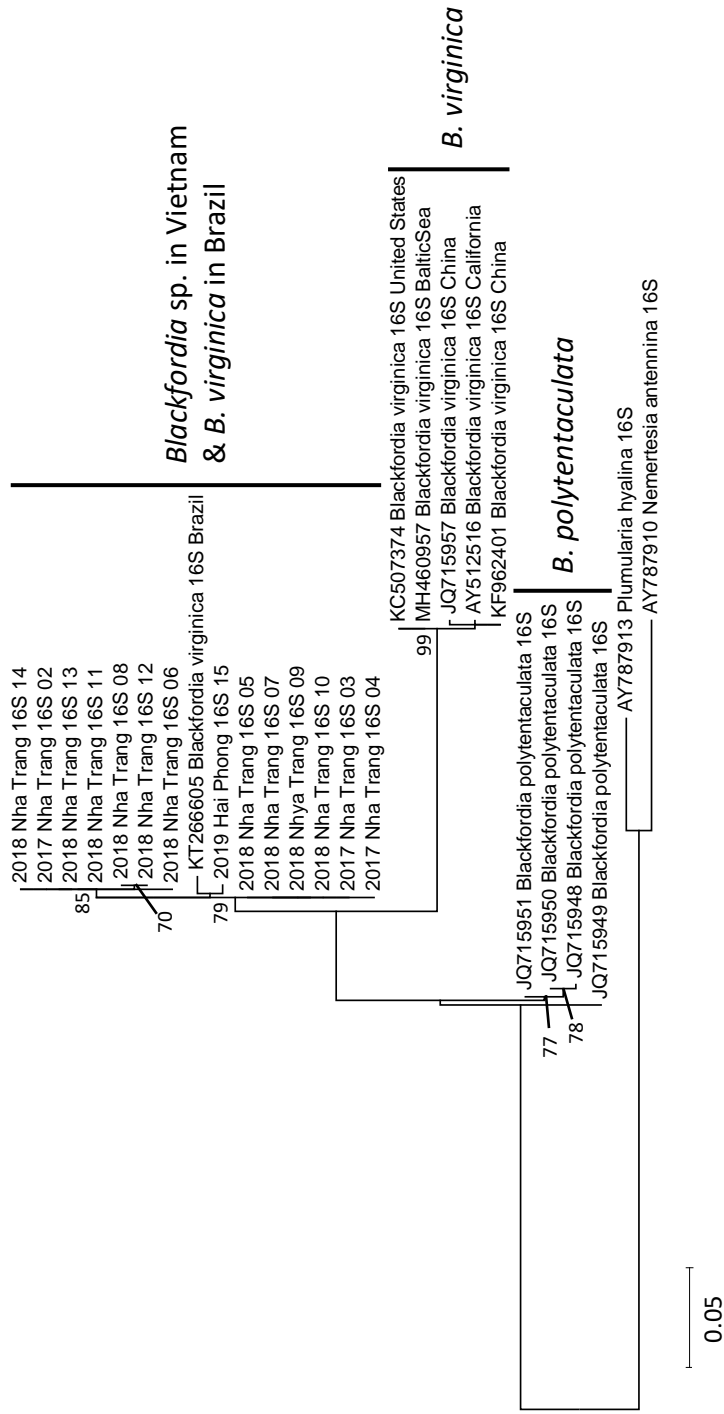


Fig. 3-4. Maximum likelihood tree based on mtDNA 16S of *Blackfordia* based on our data and those of *Blackfordia* spp. from other regions reported in the NCBI Gene Bank (see Table 3-S1). Bootstrap values over 70 are indicated above nodes. Number attached to each datum indicates the sample number listed in Table 3-1.

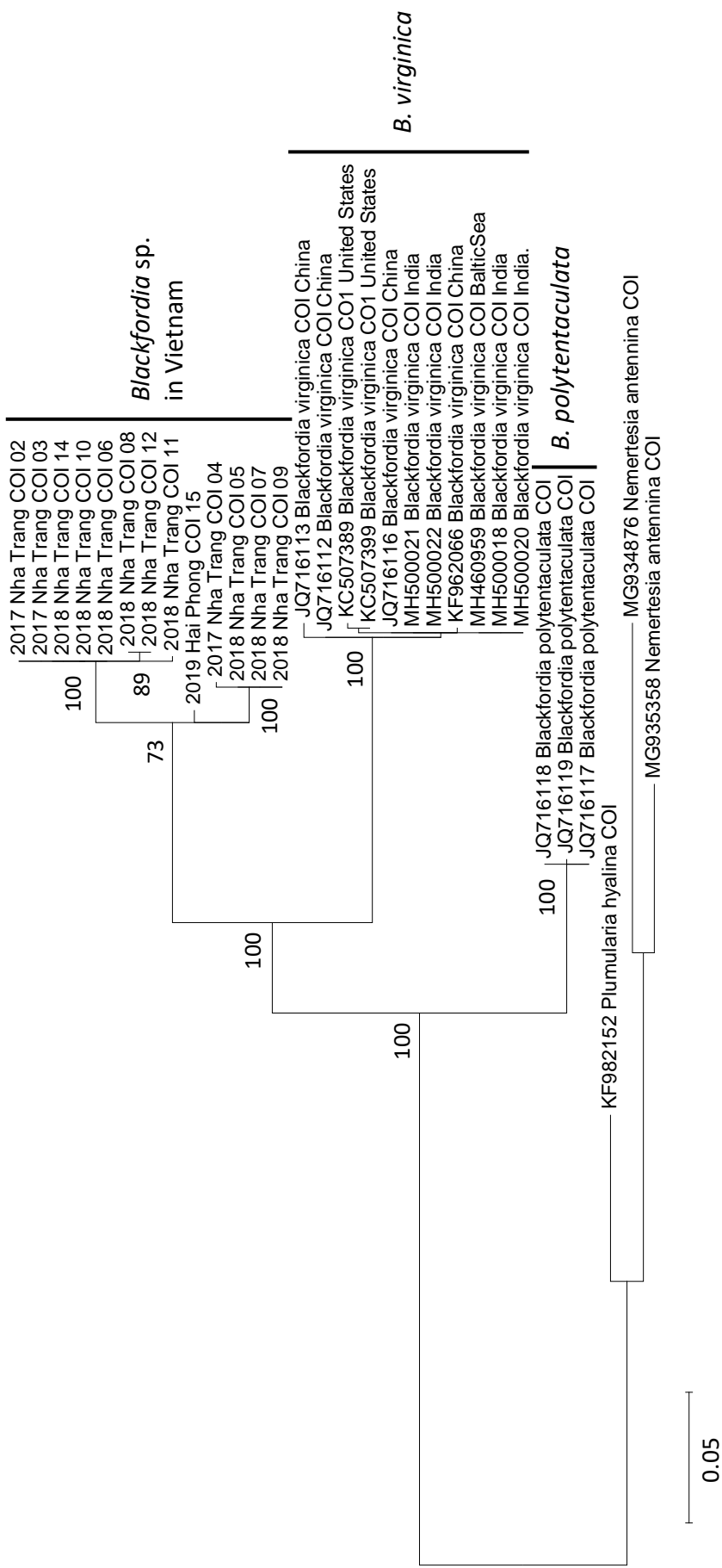


Fig. 3-5. Maximum likelihood tree based on mtDNA COI of *Blackfordia* based on our data and those of *Blackfordia* spp. from other regions reported in the NCBI Gene Bank (see Table 3-S1). Bootstrap values over 70 are indicated above nodes. Number attached to each datum indicates the sample number listed in Table 3-1.

Table 1-1. List of sample information and mitochondrial molecular indices for two species. locations, site abbreviation, year, map coordinates, sample size of mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA), and indices diversity. Site abbreviation is corresponding to Fig. 1-2.

	Location	Site abbreviation	Year	Latitude(N)	Longitude(E)	Sample size		Indices diversity of mtDNA		
						mtDNA	nDNA	(<i>h</i>)	($\pi\%$)	
<i>Rhopilema hispidum</i>	Malaysia	Kukup	MK	2011	1°19'32.94"	103°26'36.42"	36	13	0.794 ± 0.066	0.506 ± 0.309
	Thailand	Songkhla	TS	2013	7°13'17.97"	100°37'19.22"	32	5	0.750 ± 0.068	0.359 ± 0.236
		Phetchaburi	TP	2010, 2016	13°1'23.35"	100°5'5.17"	28	15	0.783 ± 0.079	0.351 ± 0.233
		Si Racha & Ang Sila	TSA	2010, 2016	13°9'28.92"	100°54'13.14"	30	12	0.749 ± 0.084	0.341 ± 0.227
	Vietnam	Do Son	VD	2011	20°43'14.04"	106°47'35.58"	29	7	0.879 ± 0.040	0.351 ± 0.233
		Do Son	VD2	2016			32	8	0.829 ± 0.052	0.259 ± 0.183
		Thanh Hoa	VT	2011	19°43'14.82"	105°53'18.18"	2	1	1.000 ± 0.500	0.197 ± 0.278
<i>Lobonemoides robustus</i>	Malaysia	Bako	MB	2015	1°39'52.91"	110°25'51.97"	37	27	0.647 ± 0.090	0.196 ± 0.146
	Thailand	Phetchaburi	TP	2016	13°1'21.7"	100°04'44.1"	8		0.786 ± 0.151	1.063 ± 0.645
		Phetchaburi	TP2	2018			20		0.926 ± 0.041	1.174 ± 0.646
		Suk Samran	TA	2011	9°22'56.47"	98°23'29.17"	31	27	0.630 ± 0.102	0.147 ± 0.120
	Philippines	Lagen Island	PL	2015, 2017	11°4'33.54"	119°24'34.72"	42	25	0.824 ± 0.055	0.566 ± 0.331
		Carigara Bay	PC	2013	11°22'53.06"	124°39'48.71"	6		0.600 ± 0.215	0.880 ± 0.575

h = Haplotype diversity
 $\pi\%$ = Nucleotide diversity

Table 1-2. Population-pairwise Φ_{ST} values of COI from *Rhopilema hispidum* (A) and *Lobonemoides robustus* (B).

(A)

	MK	TS	TP	TSA	VD
MK					
TS	0.067				
TP	0.063	-0.007			
TSA	0.073	-0.012	-0.010		
VD	0.135*	0.053*	0.035	0.036	
VD2	0.145*	0.060*	0.038	0.038	-0.005

(B)

	MB	TP	TP2	TA	PL
MB					
TP	0.302**				
TP2	0.329**	-0.036			
TA	0.753**	0.467**	0.377**		
PL	0.876**	0.794**	0.767**	0.869**	
PC	0.879**	0.633**	0.609**	0.882**	0.717**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Following Bonferroni corrections for Type I errors.

Table 1-3. Comparison of morphological features in *Lobonemoides robustus* in each clade.

Clade	La	Lb	Lc	Test statics (<i>F</i> or <i>t</i>)	P value
No. of sample (<i>n</i>)	5	10	5		
f1 Bell diameter (BD: mm)	265.1 ± 51.5	237.6 ± 37.3	271.0 ± 62.2		
f2 Colour of bell	White (one specimen has purple dots at lappets)	White (some specimen have purple dots at muscle or lappets)	White (some specimen have purple dots at muscle or lappets)		
f3 Bell depth (center; % of BD)	2.5 ± 1.0	2.8 ± 1.1	3.0 ± 1.0	0.839	0.45
f4 Bell depth (muscle; % of BD)	2.7 ± 1.1	3.3 ± 1.1	5.3 ± 1.6	5.76	0.012
f5 Bell depth (egde; % of BD)	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.439	0.651
f6 Colour of papillae	White	White	White		
f7 Shape of papillae	Membranous, tapering (sometime conical)	Membranous, tapering (sometime conical)	Membranous, tapering (sometime conical)		
f8 Lengths of papillae (% of BD)	13.4 ± 3.9	15.2 ± 3.3	27.6 ± 3.4	72.6	< 0.001
f9 Widgh of papillae (% of BD)	2.3 ± 0.3	2.7 ± 0.8	1.8 ± 0.5	19.4	< 0.001
f10 No. of papillae (1/8)	23–87	10–83	50–73		
f11 No. of rhopalia	16 (one specimen 14)	14–18	12–20		
f12 No. of lappets between rhopalia	4	2–4	1–7		
f13 Length of lappet (% of BD)	32.9 ± 11.9	30.6 ± 9.8	ND	2.02	0.188
f14 No. of radial canal	28 – 30	30 – 36	26 – 40		
f15 Diameter of the oral disk (% of BD)	56.2 ± 7.6	53.2 ± 11.6	53.7 ± 11.6	0.774	0.479
f16 Diameter of the ring canal (% of BD)	78.0 ± 8.4	79.2 ± 6.8	73.2 ± 5.5	3.15	0.068
f17 Length of the unwinged portion of the oral arms (% of BD)	11.8 ± 2.7	11.8 ± 3.1	ND	1.99	0.974
f18 Length oh the winged portion of the oral arms (% of BD)	26.3 ± 4.6	26.1 ± 4.4	ND	1.99	0.036
f19 Widgh of subgenetial ostia (% of BD)	20.2 ± 3.3	20.6 ± 3.4	ND	2.05	0.463
f20 Width of oral pillars (% of BD)	8.1 ± 0.8	8.5 ± 1.5	ND	2.09	0.797
f21 Length of oral pillars (% of BD)	10.9 ± 1.2	10.2 ± 1.8	ND	2.06	0.261

Table 1-4. Comparison of COI haplotype (h) and nucleotide ($\pi\%$) diversity of rhizostome jellyfish.

Species	Number of locations N	Sample size n	Haplotype diversity h	Nucleotide diversity ($\pi\%$)	Reference
<i>Rhopilema hispidum</i>	4	28–36	0.749–0.879	0.259–0.506	This study
<i>Lobonemoides robustus</i>	5	6–37	0.600–0.786	0.147–1.063	This study
<i>Nemopilema nomurai</i>	11	15–145	0.542–0.874	0.128–0.261	Gotoh et al. (2017)
<i>Nemopilema nomurai</i>	5	22–29	0.654–0.818	0.157–0.248	Dong et al. (2016)
<i>Rhizostoma octopus</i>	5	7–14	0.396–0.879	0.144–0.666	Lee et al. (2013)
<i>Rhizostoma octopus</i>	4	14–24	0.178–0.920	0.100–0.600	Glynn et al. (2015)
<i>Mastigias</i> sp.	3	8–18	0.00–0.71	0.00–3.55	Dawson & Hamner (2005)
<i>Rhizostoma pulmo</i>	2	5–8	0.600–0.893	0.270–0.370	Ramšak et al. (2012)

Table 1-5. Fishing season and sampling month of jellyfish in Southeast Asia.

	Locations	Species	Sampling month	Main fishing season	Reference
Vietnam	Thanh Hoa	<i>Rhopilema hispidum</i>	April	Apr-May	Nishikawa et al. (2008)
	Do Son	<i>Rhopilema hispidum</i>	April	Apr-June	Nishikawa unpublished
Thailand	Songkhla	<i>Rhopilema hispidum</i>	July	June-Aug	Nishikawa et al. (2019)
	Phetchaburi	<i>Rhopilema hispidum</i>	September, October	Apr-Oct	Nishikawa unpublished
	Sri Racha & Ang Sila	<i>Rhopilema hispidum</i>	September, October	June-Aug, at the latest Oct	Nishikawa unpublished
Malaysia	Kukup	<i>Rhopilema hispidum</i>	February	Whole year	Nishida & Nishikawa (2011)
Thailand	Andaman Sea	<i>Lobonemoides robustus</i>	October	June-Aug	Nishikawa et al. (2019)
Malaysia	Bako	<i>Lobonemoides robustus</i>	May	Apr-May	Nishikawa unpublished
Philippines	Carigara Bay	<i>Lobonemoides robustus</i>	August*	Feb-May	Omori & Nakano (2001)
	Palawan	<i>Lobonemoides robustus</i>	June	Middle Mar-Early June	Nishikawa unpublished

*Large difference between sampling month and fishing season.

Table 2-1. Polyps of *Rhopilema hispidum* and *Lobonemoides robustus*. Number of samples, mean growth rate, mortality, mean relative mouth disc diameter at the day 35, mean accumulated number of podocysts and buds at each salinity.

Species		Salinity						
		5	10	15	20	25	30	35
<i>Rhopilema hispidum</i>	No. of sample, <i>n</i>	12	12	12	12	13	12	12
	Mean growth rate (mm d ⁻¹)	-0.005	0.006	0.014	0.011	0.008	0.007	0.001
	Mortality	0.75	0.67	0	0.17	0.08	0.08	0.08
	Mean relative MDD	0.68 ± 0.087	1.71 ± 0.65	2.60 ± 0.68	1.93 ± 0.82	1.68 ± 0.55	1.90 ± 1.14	1.12 ± 0.24
	Mean accumulated number of podocysts (podocysts polyp ⁻¹)	0	5.00 ± 3.46	4.75 ± 2.65	5.73 ± 3.19	3.50 ± 3.69	2.64 ± 2.10	0.55 ± 0.50
<i>Lobonemoides robustus</i>	No. of sample, <i>n</i>	12	12	18	18	12	12	11
	Mean growth rate (mm d ⁻¹)	-0.004	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.002
	Mortality	0.25	0	0	0.06	0.08	0.09	0
	Mean relative MDD	0.73 ± 0.22	1.90 ± 0.65	1.55 ± 0.43	1.66 ± 0.54	1.72 ± 0.39	1.78 ± 0.46	1.29 ± 0.37
	Mean accumulated number of buds (buds polyp ⁻¹)	0	4.00 ± 4.56	12.67 ± 5.14	8.24 ± 6.69	1.55 ± 1.30	4.18 ± 3.33	0.73 ± 1.21

Table 2-2. Polyps of *Rhopilema hispidum* and *Lobonemoides robustus*. Number of samples, mean growth rate, mortality, mean relative mouth disc diameter at the day 35, mean accumulated number of podocysts and buds at each temperature.

Species		Temperature (°C)				
		15	20	25	30	35
<i>Rhopilema hispidum</i>	No. of sample, <i>n</i>	12	12	12	12	12
	Mean growth rate (mm d ⁻¹)	0.006	0.009	0.009	0.007	0.002
	Mortality	0	0	0.08	0.08	0.08
	Mean relative MDD	1.57 ± 0.50	1.97 ± 0.67	1.95 ± 0.60	2.60 ± 0.68	1.20 ± 0.35
	Mean accumulated number of podocysts (podocysts polyp ⁻¹)	0	1.00 ± 1.95	2.64 ± 1.67	4.75 ± 2.65	0.75 ± 1.36
<i>Lobonemoides robustus</i>	No. of sample, <i>n</i>	12	12	14	18	12
	Mean growth rate (mm d ⁻¹)		0.001	0.006	0.008	0.006
	Mortality	1	0.42	0.14	0	0.67
	Mean relative MDD		1.14 ± 0.53	1.31 ± 0.69	1.55 ± 0.43	1.50 ± 0.46
	Mean accumulated number of buds (buds polyp ⁻¹)		0.33 ± 0.75	4.83 ± 3.58	12.66 ± 5.14	0

Table 3-1. Sample information of *Blackfordia* sp. newly found in Vietnam examined in this study. Sample numbers, sampling years and locations, morphological information, and the samples used for morphological (Morph) and molecular (Mol) examinations are shown.

Sample No.	Year	Location	Sex	Bell diameter (mm)	No. of tentacles	No. of statocysts between tentacles	Morph	Mol	
								16S	COI
01	2017	Nha Trang	Female	11.2	113	1 (rarely 0)	●		
02	2017	Nha Trang	NA	NA	NA	NA		●	●
03	2017	Nha Trang	NA	NA	NA	NA		●	●
04	2017	Nha Trang	NA	NA	NA	NA		●	●
05	2018	Nha Trang	Female	6.7	108	1 (rarely 0)	●	●	●
06	2018	Nha Trang	Female	9.2	104	1 (rarely 0)	●	●	●
07	2018	Nha Trang	Male	NA	112	1 (rarely 0)	●	●	●
08	2018	Nha Trang	Immature	3.8	48	1 (rarely 0)	●	●	●
09	2018	Nha Trang	Immature	4.2	60	1 (rarely 0)	●	●	●
10	2018	Nha Trang	Immature	4.5	48	1 (rarely 0)	●	●	●
11	2018	Nha Trang	Immature	4.5	60	1 (rarely 0)	●	●	●
12	2018	Nha Trang	Immature	3.5	60	1 (rarely 0)	●	●	●
13	2018	Nha Trang	Immature	2.8	52	1 (rarely 0)	●	●	
14	2018	Nha Trang	NA	NA	NA	NA		●	●
15	2019	Hai Phong	NA	NA	NA	NA		●	●
Total							10	14	13

NA: Not Available.

Table 3-2. Mean K2P values in 16S and COI between *Blackfordia* sp. found in Vietnam and *B. virginica* in each area. Sequence data used for the countries except Vietnam were from NCBI. See Figs 4 and 5, and materials and methods for detailed information.

(A) 16S

	Vietnam	USA*	China	Brazil
Vietnam				
USA*	0.132			
China	0.131	0.001		
Brazil	0.015	0.133	0.132	
Baltic Sea	0.132	0	0.001	0.133

(B) COI

	Vietnam	USA*	China	Baltic Sea
Vietnam				
USA*	0.135			
China	0.134	0.006		
Baltic Sea	0.133	0.003	0.003	
India	0.134	0.003	0.003	0

*Both Pacific and Atlantic

Table 3-3. Morphological comparisons of the *Blackfordia* species in this study and previous studies. Brackets indicate measured and counted values estimated from photographs or drawings.

	<i>Blackfordia</i> sp.	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>
Reference	This study	Mayer (1910)	Kramp (1958)	Hsu & Chin (1962)	Denayer (1973)	Moore (1987)	Álvarez-Silva et al. (2003)	Buecher et al. (2005)	Nogueira Jr. & Oliveira (2006)
Location	Nha Trang, Vietnam	Virginia, United States	Salt Lake, near Calcutta, India	Fukien, China	Pinard, France	Mira Estuary, Portugal	Chantuto-Panzacola lagoon, Mexico	Agulhas current, South Africa	Paraná, Brazil
<i>n</i>	Mature: 4 Immature: 6	ND	9	ND	1	550	503	1	ND
Bell diameter (mm)	Mature: 6.2–11.2 Immature: 2.8–4.5	14	4, 6, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 11	6–13	4	Up to 22.2 [11.4]	6.5–9.9	4	1–10 [9.3]
No. of tentacles	Mature: 104–113 Immature: 48–60	80	72, 72, 84, 84, 92, 84, 88, 84, 92	60–100	29	Up to 80 [96?]	86–125	ca. 100? (this information may be not oligin)	68–128 [101]
No. of statocysts between tentacles	1 (rarely 0)	1 (rarely 2)	1 (very rarely 2)	1–2	many statocysts, evenly distributed between these tentacle buds	[0–3]	ND	1	1 (some time 2)
Shape and length of gonads	About 2/3 of length of radial canals. Matured gonads from straight to sinuous. ♀: granulated ♂: smooth	Linear, more than half the length of radial-canals	Surround the radial canals completely and not divided by a median line on their subumbrellar side	On the radial canals, over half length of radial canals	ND	Linear, extending from base of stomach to just over half length of radial canals	ND	Half length of radial canals	Liner, from the base of the manubrium, leaving its most distal third free
Black pigment on the bell rim	Absent	Present	Present (but preserved material)	Present	Precent	Absent or present	ND	ND	Present

Table 3-3. Continued.

	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. virginica</i>	<i>B. polytentaculata</i>	<i>B. manhattensis</i>	<i>Blackfordia</i> sp.
Reference	Genzano et al. (2006)	Bardi & Marques (2009)	Chícharo et al. (2009)	Rodríguez (2012)	Harrison et al. (2013)	Faasse & Melchers (2014)	Toyokawa & Fujii (2015)	Jaspers et al. (2018)	Hsu & Chin (1962)	Mayer (1910)	Bouillon et al. (1988)
Location	Río de la Plata, Argentina	Cananéia, Paranaguá Bay, Guaratuba Bay, and Babitonga Bay, Brazil	Guadiana Estuary, SE-Portugal/ SW-Spain	Recife, São Paulo, Paraná and Río de la Plata, Argentina	Lake Pontchartrain, USA	Amsterdam, Netherlands	Ariake Bay, Japan	Southwest Baltic Sea	Fukien, China	New Jersey, United States	Wuvulu Island, Papua New Guinea
<i>n</i>	157	264	ND	7	1	1	6	1122	ND	ND	4
Diameter (mm)	2–10	4.1–14 [7.5, 8.8]	6–19	6–14	ND	ND	7.8–14.2 [9.4]	2–17 [4.5, 10.2]	12–16	10	3.0, 3.5, 4.0, 5.0
No. of tentacles	Up to 76 [64]	50–142 [88, 96]	[76 (one specimen in foto)]	52–76	84 [77]	44	61–82 [66]	[28, 62]	200–250	70–80	Max 51
No. of statocysts between tentacles	1	1	ND	1 (rarely 2)	1–2	0–1	0–4	1–3	1	2–3	Irregularly distributed
Shape and length of gonads	Linear, more than half length of radial canals (bell diameter over 6mm)	Extending ca. 2/3 of length of radial canals. ♀ : linear, granulate. ♂ : proximal portion of the gonad linear, the medial and distal portion sinuous	[Loner, over half length of radial canals?]	Linear, extending from base of stomach to over half length of radial canals.	ND	ND	Straight to sinuous [middle part of the radial canals]	ND	Linear, from the corner of stomach extending along radial canals near the umbrella margin	Middle part of the radial canals, irregularly flexed, sinusoidally, from one side to the other of the canal	In the form of small globular masses located in the distal third of the radial canals.
Black pigment on the bell rim	ND	Absent	ND	ND	Present	Absent	Absent	Present	Absent	Absent	Absent

Table 3-S1. Information on 16S and COI sequences of *Blackfordia* spp. used in this study for phylogenetic analysis. Data are from National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank.

Species	Location	Accession No.		Reference
		16S	COI	
<i>Blackfordia virginica</i>	San Francisco Bay, CA, United States	AY512516	-	Collins et al. (2005)
<i>B. virginica</i>	Zhujiang River Estuary, China	JQ715952–JQ715954	JQ716112–JQ716114	Zheng et al. (2014)
<i>B. virginica</i>	Xiamen Bay, China	JQ715955–JQ715957	JQ716115, JQ716116	Zheng et al. (2014)
<i>B. virginica</i>	"VA", United States	KC507368, KC507381	KC507394, KC507398–KC507400	Harrison et al. (2013)
<i>B. virginica</i>	"LA", United States	KC507369–KC507378	KC507385–KC507393, KC507395	Harrison et al. (2013)
<i>B. virginica</i>	"CA", United States	KC507379, KC507380	KC507396, KC507397	Harrison et al. (2013)
<i>B. virginica</i>	"DE", United States	KC507382–KC507384	KC507401–KC507403	Harrison et al. (2013)
<i>B. virginica</i>	China Seas	KF962401–KF962405	KF962066–KF962070	He et al. unpublished
<i>B. virginica</i>	Baltic Sea (Germany to Poland)	MH460957	MH460959	Jasper et al. (2018)
<i>B. virginica</i>	Brazil	KT266605	-	Maronna et al. (2016)
<i>B. virginica</i>	Backwaters of Cochin, Kerala, India	-	MH500018–MH500022	Peter et al. unpublished
<i>B. polytentaculata</i>	Changjiang River Estuary, China	JQ715948, JQ715949	JQ716117, JQ716118	Zheng et al. (2014)
<i>B. polytentaculata</i>	Xiamen Bay, China	JQ715950, JQ715951	JQ716119	Zheng et al. (2014)