

標本同定のツールとしての DNA バーコーディングと分子系統解析 – 広島県宮島で採集された標本の例 –

坪田博美^{1,2}・井上侑哉^{1,2}・中原–坪田美保³・島本俊樹^{1,4}・松田伊代^{1,2}・内田慎治^{1,5}・向井誠二^{1,5}

TSUBOTA, H., INOUE, Y., NAKAHARA-TSUBOTA, M., SHIMAMOTO, T., MATSUDA, I., UCHIDA, S. & MUKAI, S. 2014. Combination of DNA barcoding and molecular phylogenetic analysis as an identification tool for plant species: a case study using imperfect herbarium specimens. *Hikobia* 16: 475–490.

Some imperfect specimens deposited in the herbarium HIRO, which were difficult to identify to species level based on morphology, were identified using DNA barcoding combined with molecular phylogenetic analyses. Based on sequences of the chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (cp *rbcL*) gene and the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nr ITS) region, *Ludwigia ovalis* Miq. (Onagraceae) and *Juncus wallichianus* Laharpe (Juncaceae) were identified from herbarium specimens collected in Miyajima Island, Hiroshima Prefecture, Honshu, southwestern Japan. *L. ovalis* was formerly regarded as extinct on the island. According to locality information on the specimens, these species grew in a small artificial pond in a small valley in forest dominated by *Abies firma* Siebold & Zucc. and *Symplocos glauca* (Thunb.) Koidz. The results demonstrate that DNA barcoding combined with molecular phylogenetic analyses are useful tools for species level identification of imperfect specimens.

Hiromi Tsubota, Yuya Inoue, Toshiki Shimamoto, Iyo Matsuda, Shinji Uchida & Seiji Mukai, Miyajima Natural Botanical Garden, Graduate School of Science, Hiroshima University, Mitsumaruko-yama 1156–2, Miyajima-cho, Hatsukaichi-shi, Hiroshima 739–0543, Japan.

Miho Nakahara-Tsubota, Cooperative Research Fellow of Natural History Museum and Institute, Chiba, Japan, Saeki-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 731–5126, Japan.

はじめに

標本庫に収蔵されている標本は、すべてが完全標本とは限らず、さまざまな状態のものが存在する。例えば、花や果実がないものや、時期や成長段階の

違いにより同定に必要な形態が確認できないものがある。また、標本によっては破損や虫害などによる劣化で状態が悪く、断片的な情報しか得られない場合もある。これらの標本について同定を行う必要がある場合に、有効な手法のひとつとして DNA バーコーディングがあげられる。DNA バーコーディングは、同定したい生物の形態情報ではなく DNA の塩基配列情報を使って同定する手法である (Hebert *et al.* 2003a)。DNA バーコーディングは、専門家の同定した証拠標本から得られた配列情報 (バーコード) のデータベース (DNA バーコードライブラリ) や検索システムからなる生物種同定支援システムを利用して、もっとも類似する配列情報を同定結果とする (Hebert *et al.* 2003a; 神保ほか 2008; Krishnamurthy & Francis 2012)。実際に、これまで同定が困難であった標本や外来種に対する DNA バーコーディングの

¹739–0543 広島県廿日市市宮島町三ツ丸子山 1156–2 外, 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所

²739–8526 広島県東広島市鏡山 1–3–1, 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻

³731–5126 広島県広島市佐伯区, 千葉県立中央博物館・共同研究員

⁴739–8526 広島県東広島市鏡山 1–3–1, 広島大学大学院理学研究科・研究生

⁵739–8524 広島県東広島市鏡山 1–1–1, 広島大学技術センター

適用で、種や属レベルでの同定が可能になっている(坪田ほか 2009, 2012b, 2013, 2014b, c など)。

広島大学植物標本庫 HIRO ではこれまでに収蔵されている標本のデータベース化を現在進めている。その過程で、広島県廿日市市宮島産の植物標本の中から、形態的特徴が明確でない標本に対して、DNA バーコーディングによる種の同定の可否について検討を行った。その結果、広島県宮島で絶滅とされていたアカバナ科 Onagraceae のミズユキノシタ *Ludwigia ovalis* Miq. と、近年確実な生育場所が不明であったイグサ科 Juncaceae のハリコウガイゼキショウ *Juncus wallichianus* Laharpe の存在が確認されたので報告する。また、本研究は標本に対する DNA バーコーディングの有効性を確認するための実証実験の一例として行った。

材料と方法

本研究では DNA バーコーディングに、標準マーカーの一つである葉緑体 *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit; リブロースカルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ大サブユニット) 遺伝子と、データベース上で登録数が比較的多く、既存のプライマーでの増幅の結果が良好であった核 ITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列を用いた。

植物標本からの DNA 抽出は坪田ほか (2013) に従い、抽出液を直接 PCR に用いた。本研究に用いた標本の詳細については、Appendix A に示した。PCR 反応には KOD FX Neo (東洋紡, 大阪) を用い、反応条件は坪田ほか (2013) を改変した Inoue & Tsubota (2014) の条件に従った。PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (マッハライ・ナーゲル社, デューレン) で精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。PCR 反応およびシーケンスに用いたプライマーは過去の文献で発表されているものを用いた [Tsubota *et al.* 1999, 2001; Oguri *et al.* 2003; Masuzaki *et al.* 2010; Inoue *et al.* 2011; 坪田ほか 2009, 2012b, 2013; 配列については坪田ほか (2013) の Appendices C & D または広島大学デジタル自然史博物館を参照]。得られた塩基配列は、BioEdit 7.1.11 (Hall 1999) や MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011)、自作のプログラムなどを用いて 1 つの配列として合成した。本研究で得られた配列は DDBJ を通じて国際塩基配列データベース (INSDC) に登録した。

本研究で決定したマーカーの塩基配列を用いて、DNA データベースを対象に、BLAST (Altschul *et al.*

1990) を用いて配列相同性 (配列類似性) 検索を行った。また、BLAST 検索の結果のスコアだけではどの配列がもっとも系統的に近いのか判断が難しいものが含まれていた。そこで本研究でも、坪田ほか (2009, 2013, 2014b, c) などの先行研究同様に BLAST 検索の結果だけでなく、塩基配列にもとづく分子系統解析の情報にもとづいて最近隣の配列データを求め、同定を行った。検索の結果得られた上位 100 または 250 配列を FASTA 形式で保存し、対象とした塩基配列およびその近縁種を含んだデータセットを作成した。オンラインバージョンの MAFFT version 7.187 (Katoh & Standley 2013) を用いてアライメントを行った。アライメントの際に必要なに応じて Adjust direction オプションを指定した。今回得られたデータセットでは比較的短い配列が多く含まれたため、アライメント後のデータはギャップも含めて計算に用い、ギャップは形質状態不明として扱った。予備的な系統解析として、MEGA を用いて近隣結合系統樹を求めた後、外群にあたる配列を必要十分な数に絞った。その後、再度アライメントを行ったデータセットについて最尤法で系統解析を行い、もっとも近縁になる配列の情報を得た。解析は、Kakusan4 version 4.0.2012.12.14 (Tanabe 2011) により塩基置換モデルを選択後、RAxML version 8.0.8 (Stamatakis 2014) を用いて系統解析を行った。*rbcL* については、モデル選択の際にコドンポジションによるパーティションの有無も比較し、系統解析の際に最適モデルを用いた。また、RAxML を用いて 10,000 回ブートストラップ確率を、BEAST version 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012) を用いてベイズ法により事後確率を求め、最尤系統樹上に示した。

結果と考察

確認された植物とその意義

本研究では、広島大学植物標本庫に収蔵されている植物標本のうち、データベース化の過程で確認された、花が無いまたは未成熟のため形態だけでは同定できない 2 点の標本 (標本番号 HIRO-MY 94771 および HIRO-MY 94768) について、DNA バーコーディングを行い、その所属について検討を行った。今回決定した塩基配列のアクセッション番号は AB985730-AB985733 である。本研究の結果、宮島産の標本から、過去の報告で宮島では絶滅とされていたミズユキノシタ *Ludwigia ovalis* Miq. と過去に報告があるハリコウガイゼキショウ *Juncus wallichianus* Laharpe が確認された。確認された植物の詳細は以下の通りである。

標本 HIRO-MY 94771: ミズユキノシタ *Ludwigia ovalis* Miq.

この標本は、2014年4月8日に広島県廿日市市宮島町の水辺で採集されたものであり、植物体が未成熟で非常に小型であったが、葉が互生である点などから、アカバナ科 Onagraceae のミズユキノシタ *Ludwigia ovalis* Miq. であると推定された。しかしながら、植物体が未成熟で形態が十分に確認できないだけでなく、近年類似種として同属のアメリカミズユキノシタ *L. repens* J.R.Forst. やセイヨウミズユキノシタ *L. palustris* (L.) Ell. が世界中に分布を広げており、日本でも外来種として確認されている(角野 1994, 2014; Armitage *et al.* 2013)。また、関ほか(1975)は標本にもとづいて宮島から本種の生育を報告したが、「広島県植物誌」(広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997)の中では宮島では絶滅とされている。DNA バーコーディングについては、葉緑体 *rbcL* 遺伝子(前半部分の部分配列 597 bp)と核 ITS 領域(5.8S rRNA 遺伝子を含む 911 bp)の塩基配列を得ることができたので、両者でバーコーディングを行った。今回決定した塩基配列のアクセッション番号は AB985732 (*rbcL*) および AB985733 (ITS) である。*rbcL* の塩基配列を用いた DNA バーコーディングでは、一致する配列は登録されておらず、系統樹上では支持する値は小さいが、JX100738 (*L. repens* 括弧内の学名は配列とともにデータベースに登録されているもの、以下同様)や KC996782 (*L. palustris*) などが位置するクレードと姉妹群になった(Fig. 1)。一方、ITS の塩基配列を用いたバーコーディングでは、*L. ovalis* (FN263219-FN263221) の配列と比較した結果、一致するか、塩基置換が1か所と1塩基からなるギャップが最大で2か所みられるだけであり、系統樹上でも同じクレードに包含され、高い値で支持された(Fig. 2)。この結果から、この収蔵標本は過去の報告で宮島では絶滅とされていたミズユキノシタ *L. ovalis* であることが確認できた。また、角野(2014)によれば、アメリカミズユキノシタやセイヨウミズユキノシタでは葉が対生である点で異なり、確認できた形態について矛盾はなかった。

標本 HIRO-MY 94768: ハリコウガイゼキショウ *Juncus wallichianus* Laharpe

この標本は、2014年4月8日に広島県廿日市市宮島町で採集されたもので、外部形態や生育立地からイグサ科 Juncaceae の草本と推定された。イグサ科のうち、イグサ類は茎が明瞭で、茎の基部が葉身の

ない葉鞘に包まれるという特徴があるが、この標本では葉が明瞭で、葉の基部に膜質透明で明瞭な葉耳が存在したため、コウガイゼキショウの類であると考えられた。この標本は水辺で採集されたものであり、該当するものとして、コウガイゼキショウ *Juncus prismatocarpus* R.Br. subsp. *leschenaultii* (J.Gay ex Laharpe) Kirschner やハリコウガイゼキショウ *J. wallichianus* Laharpe, アオコウガイゼキショウ *J. papillosus* Franch. & Sav., タチコウガイゼキショウ *J. krameri* Franch. & Sav. が考えられる。また、いづれの種も関ほか(1975)で報告されている。本研究で用いた標本は小型で花茎はなく、越冬した植物体であると考えられた。コウガイゼキショウは葉耳が小さく、半透明である傾向があるが、本標本ではその特徴が明瞭でなかった。また、アオコウガイゼキショウは冬期に地上部が枯死し、地中に休眠芽を形成する点で異なった。タチコウガイゼキショウについては、関ほか(1975)によると過去の報告は文献のみにもとづいたものであり、ハリコウガイゼキショウであろうと指摘している。しかしながら、この標本はシカの採食痕があり、近似種内での形態変異も考慮すると形態だけでもとづく同定の確定は困難であった。DNA バーコーディングについては、葉緑体 *rbcL* 遺伝子(部分配列の 1233 bp)と核 ITS 領域(5.8S rRNA 遺伝子を含む 890 bp)の塩基配列を得ることができたので、両者でバーコーディングを行った。今回決定した塩基配列のアクセッション番号は AB985730 (*rbcL*) および AB985731 (ITS) である。一般的に変異が少ない *rbcL* の塩基配列を用いたバーコーディングでは、データベースに登録されている JX644708 (*J. diastrophanthus*) と JX644709 (*J. wallichianus*) の配列と一致し、系統樹上でも同じクレードに包含された(Fig. 3)。この属では *rbcL* の配列の変異が少ないため、この結果では種のレベルでの同定は困難であった。続いて、ITS の塩基配列を用いたバーコーディングでは、完全に一致する配列は認められなかった。系統樹上で同じクレードに含まれたものとして AY727816 (*J. prismatocarpus* var. *leschenaultii*) や AB540127 (*J. wallichianus*), JQ811760 (*J. prismatocarpus* subsp. *leschenaultii*), JQ811763 (*J. wallichianus*), JQ811764 (*J. papillosus*), JQ811765 (*J. krameri*) が確認でき、それぞれの間で塩基置換が1-3か所認められた(Fig. 4)。上記にあげた形態的特徴と DNA バーコーディングの結果から、関ほか(1975)で報告されているハリコウガイゼキショウ *J. wallichianus* であることが確認できた。また、本標本については今回観察できた

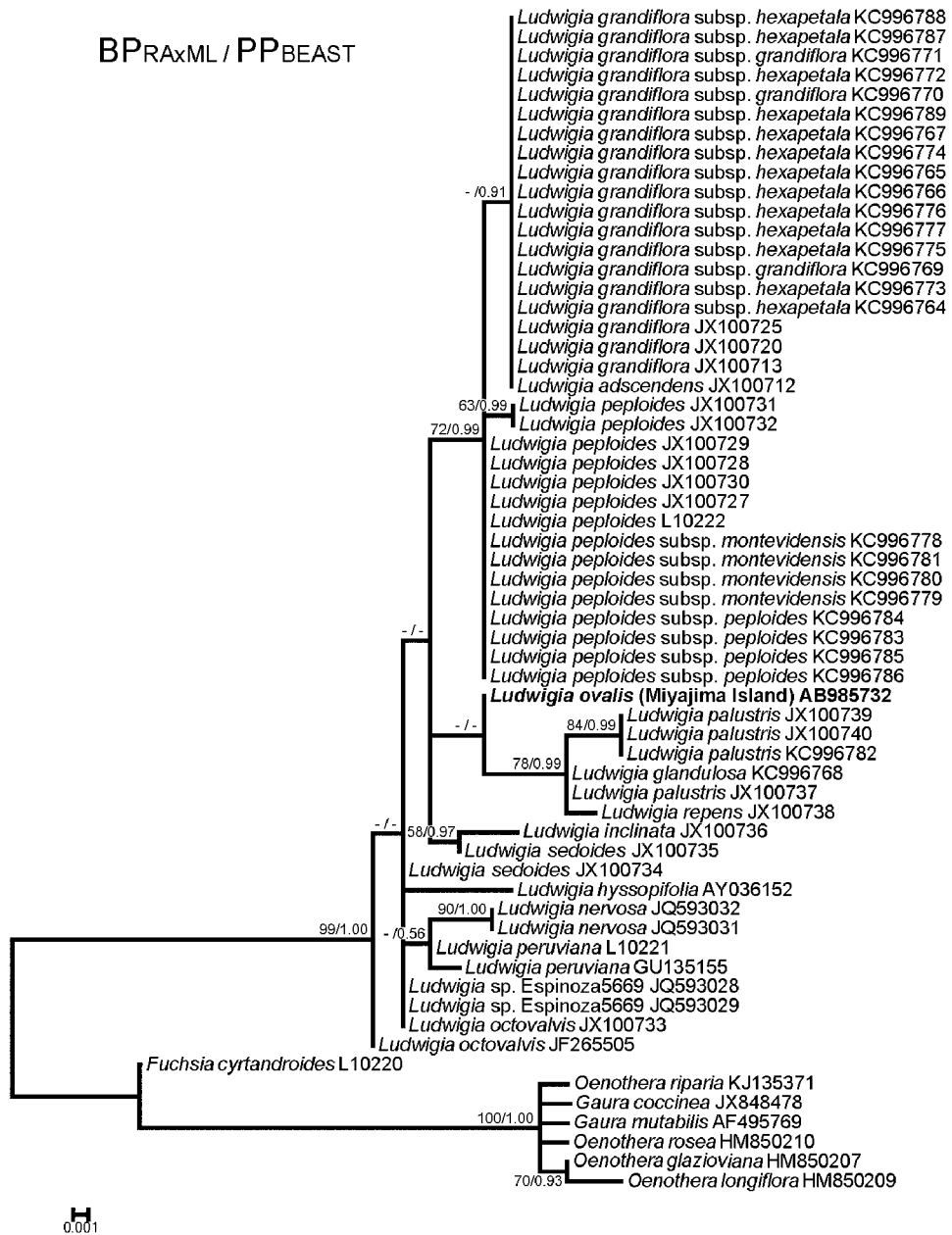


Fig. 1. Phylogenetic tree based on analysis of the chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit (cp *rbcL*) gene sequence, depicted by the program RAXML version 8.0.8 (Stamatakis 2014). Supporting values more than 50% obtained for bootstrap probabilities (BP) with 10,000 replicates and BEAST version 1.8 (Drummond *et al.* 2012) for Bayesian posterior probabilities (PP) are shown on or near each branch (BP/PP; in %). The root is arbitrarily placed on the branch leading to *Fuchsia cyrtandroides* (L10220), *Gaura coccinea* (JX848478), *G. mutabilis* (AF495769), *Oenothera riparia* (KJ135371), *O. rosea* (HM850210), *O. glazioviana* (HM850207) and *O. longiflora* (HM850209) following another phylogenetic tree based on the neighbor-joining (NJ) method by MEGA version 5.2 (Tamura *et al.* 2011) with ca. 100-sequence dataset for the Onagraceae and their allies (not shown).

形態について矛盾はなかったものの、系統樹上で同じクレード内に同じ種とされる配列が散在した。さらに、Yamaguchi *et al.* (2010) で示されているようにコウガイゼキショウ *J. prismatocarpus* subsp. *le-*

schenaultii とハリコウガイゼキショウの間で雑種が形成される。両種は日本全域を含むアジア東部からインドにかけて分布する (角野 2014) が、今後集団構造を明らかにすることで両種の関係がより明確に

BP_{RAXML} / PP_{BEAST}

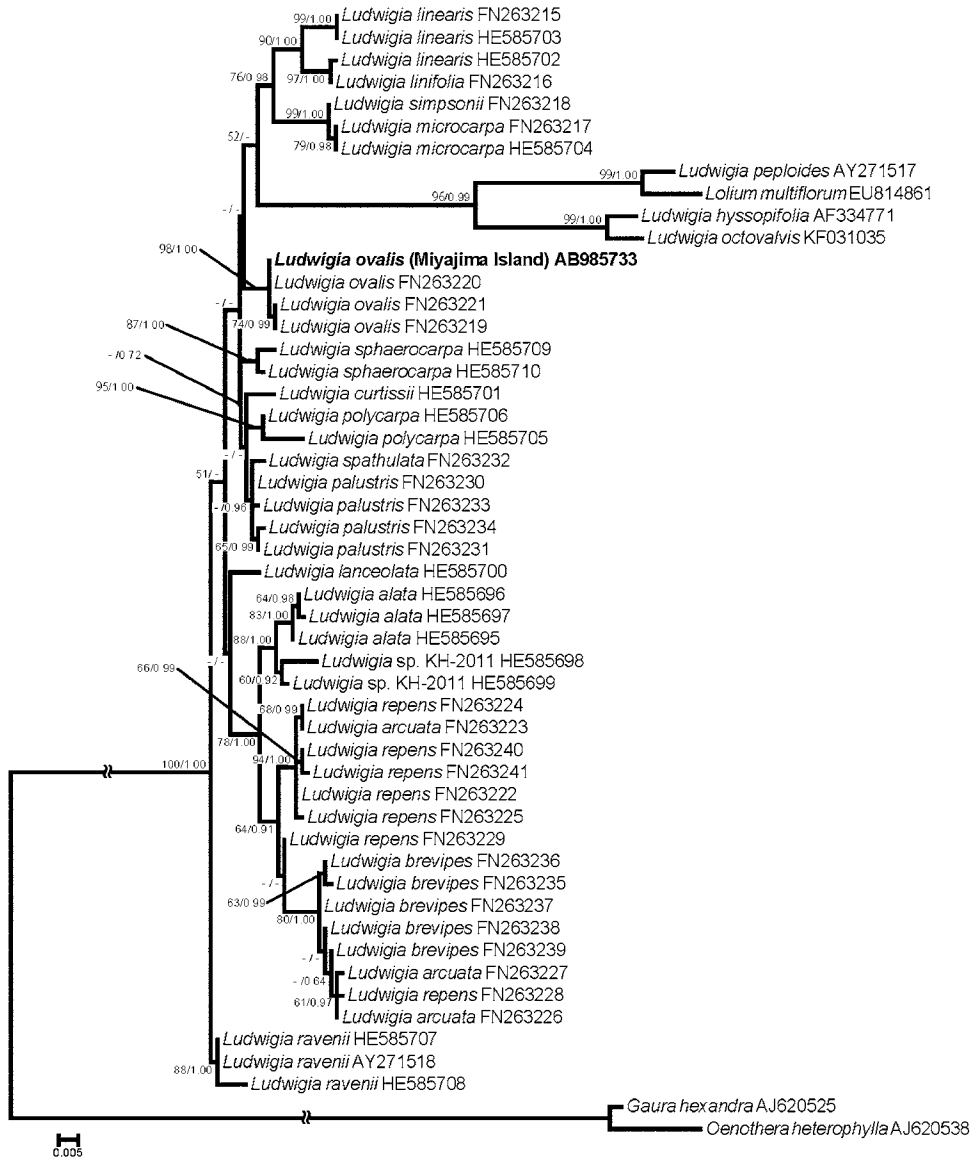


Fig. 2. Phylogenetic tree based on analysis of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nr ITS) region, depicted by the program RAXML version 8.0.8 (Stamatakis 2014). Supporting values more than 50% obtained for bootstrap probabilities (BP) with 10,000 replicates and BEAST version 1.8 (Drummond *et al.* 2012) for Bayesian posterior probabilities (PP) are shown on or near each branch (BP/PP; in %). The root is arbitrarily placed on the branch leading to *Gaura hexandra* (AJ620525) and *Oenothera heterophylla* (AJ620538) following another phylogenetic tree based on the neighbor-joining (NJ) method by MEGA version 5.2 (Tamura *et al.* 2011) with ca. 250-sequence dataset for the Onagraceae and their allies (not shown).

なると考えられる。これらのことから、今後近縁種を区別するため別の領域を用いた研究の必要性も示唆された。

今回、標本で確認されたミズユキノシタとハリコウガイゼキショウの2種が採集された場所は、ミズユキノシタが過去に記録された場所とは異なる場所

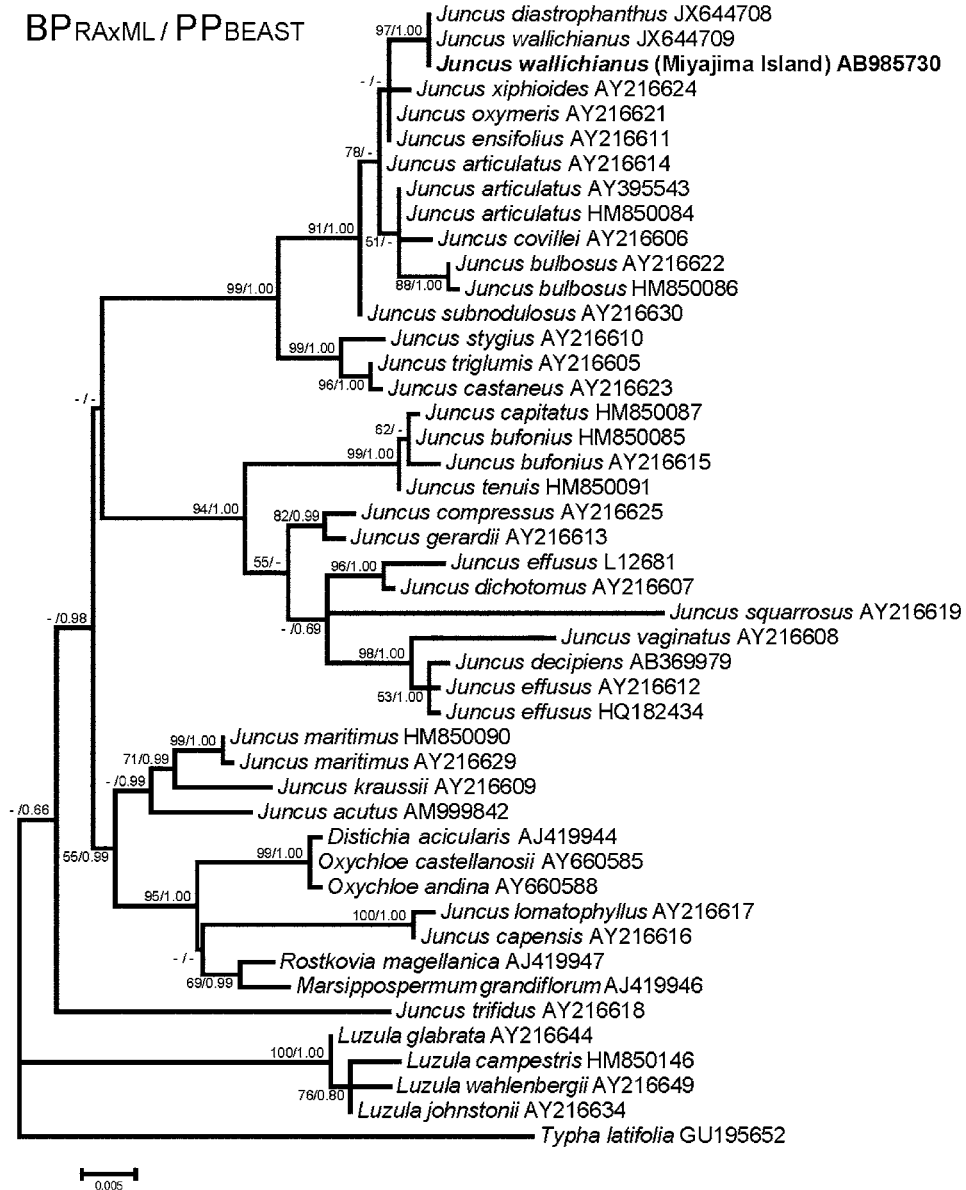


Fig. 3. Phylogenetic tree based on analysis of the chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit (cp *rbcL*) gene sequence, depicted by the program RaxML version 8.0.8 (Stamatakis 2014). Supporting values more than 50% obtained for bootstrap probabilities (BP) with 10,000 replicates and BEAST version 1.8 (Drummond *et al.* 2012) for Bayesian posterior probabilities (PP) are shown on or near each branch (BP/PP; in %). The root is arbitrarily placed on the branch leading to *Typha latifolia* (GU195652) following another phylogenetic tree based on the neighbor-joining (NJ) method by MEGA version 5.2 (Tamura *et al.* 2011) with ca. 100-sequence dataset for the Juncaceae and their allies (not shown).

BPRAxML / PPBEAST

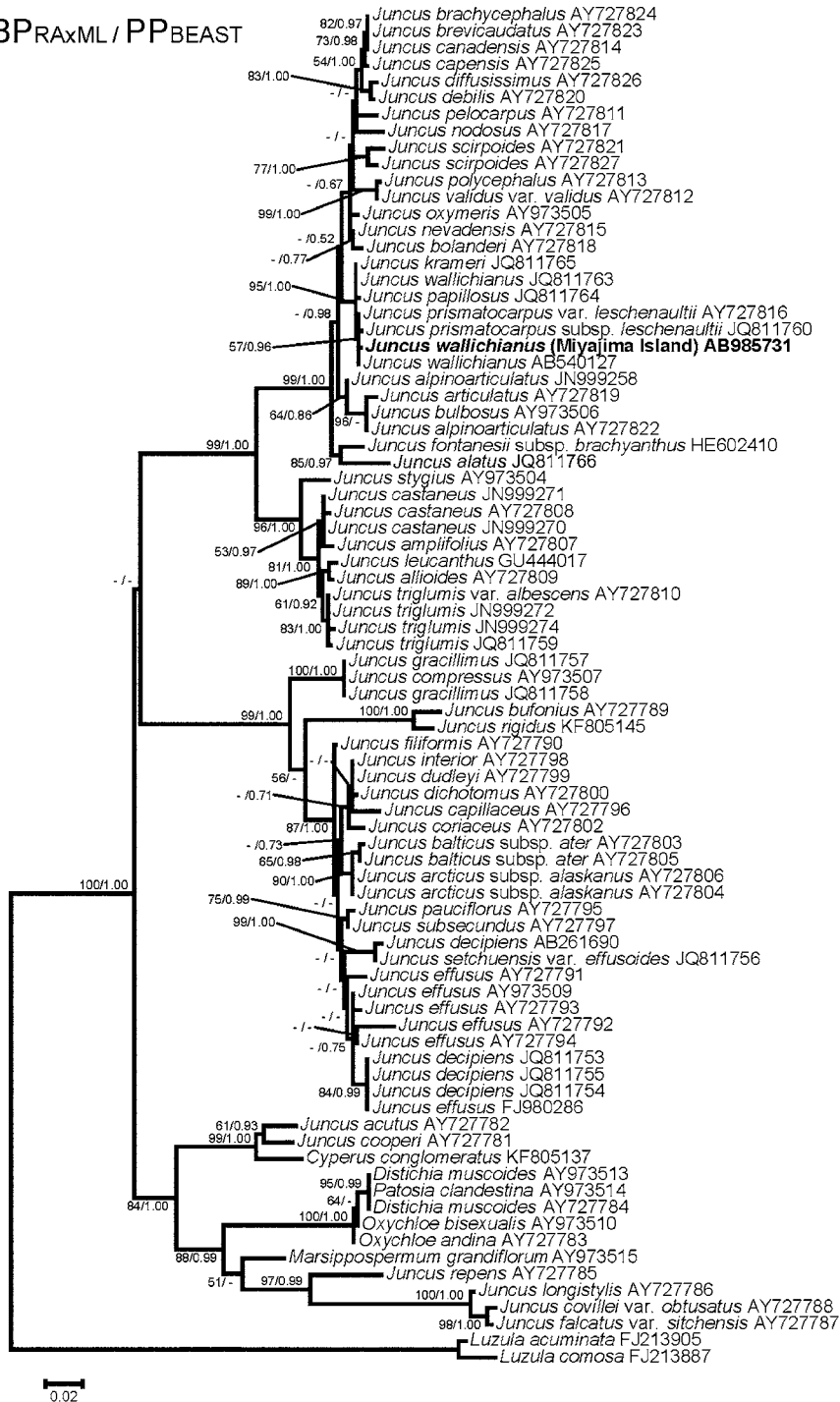


Fig. 4. Phylogenetic tree based on analysis of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nr ITS) region, depicted by the program RAxML version 8.0.8 (Stamatakis 2014). Supporting values more than 50% obtained for bootstrap probabilities (BP) with 10,000 replicates and BEAST version 1.8 (Drummond *et al.* 2012) for Bayesian posterior probabilities (PP) are shown on or near each branch (BP/PP; in %). The root is arbitrarily placed on the branch leading to *Luzula acuminata* (FJ213905) and *L. comosa* (FJ213887) following another phylogenetic tree based on the neighbor-joining (NJ) method by MEGA version 5.2 (Tamura *et al.* 2011) with ca. 250-sequence dataset for the Juncaceae and their allies (not shown).

で、2012年にラムサール条約で登録された場所には含まれていないが、谷筋の水が堰堤でせき止められた環境である。標本の情報をもとに生育場所を確認したところ、周囲はモミ *Abies firma* Siebold & Zucc. やミズバイ *Symplocos glauca* (Thunb.) Koidz. が優占する植生であった。この場所は比較的人為的な環境であるため、継続して生育していた可能性だけでなく鳥散布などにより比較的最近侵入・定着した可能性もある。また、今回標本で確認されたことから、宮島島内で生育に適した類似の環境があれば、今後も見つかる可能性がある。ミズユキノシタの確認は、宮島の環境がある程度保たれている証拠のひとつと考えることもできる。ニホンジカの影響もある環境であるため、今後は採集場所およびその周辺の継続調査を行い、両種の定着の状態を明らかにする必要がある。

DNA バーコーディングと分子情報利用の有効性

DNA バーコーディングは、生物多様性の保全と活用のため、種多様性に関する知識のライブラリ構築とその共有を目的としている (JBLI のパンフレットを参照)。この手法は Hebert *et al.* (2003a) によって提唱されて以降、広く行われるようになっていく (Meier 2008)。実際、以前は無かった DNA バーコーディングに関する研究発表が、最近の国際学会では多く行われている (坪田・西山 2005; 定光ほか 2012, いずれも報告として)。DNA バーコーディングによる同定支援システムが利用できる生物種はまだ限られているものの、このような同定支援システムの構築と利用は世界中で現在進んでいる (Hebert *et al.* 2004; Ward *et al.* 2009; Jinbo *et al.* 2011; Schoch *et al.* 2012; Saitoh *et al.* 2014 など)。また、GBIF を中心に標本や文献のデータベースの構築が現在行われている (Speers & Edwards 2008)。日本国内では JBIF (Japan Node of Global Biodiversity Information Facility, 地球規模生物多様性情報機構日本ノード) や JBOLI (Japanese Barcode of Life Initiative, 日本バーコードオブライフ・イニシアチブ) を中心に DNA バーコーディングに関するプロジェクトが進行している [神保ほか 2008; DNA バーコードデータベース (JBOL-DB) のサイトも参照]。また、DNA バーコーディングの手法が用いられるよりも前から、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database Collaboration; INSDC) を代表とする DNA データベースに大量の塩基配列情報が蓄積されている。このような形で蓄積された配列情報には、精度や正確

性に問題がある配列も含まれているが、専門家が研究に用いたものやモノグラフなどで使われているもの、証拠標本の情報が登録されているものなど分類学的な研究に使用された標本からのデータが含まれており、網羅的で同定の信頼性が高いものも少なくない。このような点に注意し、配列長に違いがある点を考慮すれば、DNA バーコーディングの際に利用可能である。さらに、分子系統解析を組み合わせることで精度の高い同定が可能であることも示されている (坪田ほか 2013, 2014b, c)。本研究でも、形態情報が不完全な標本について同様の方法を用いたところ、既存の DNA データベースのデータを使った DNA バーコーディングにより種レベルで同定することができ、その有効性が示された。

DNA バーコーディングでは、標準化された領域の DNA の塩基配列 (マーカー) を用いて生物種を特定する。マーカーとして利用される領域は、種内変異が少ない一方で種間変異の大きい領域が理想的であり、そのような性質をもつ多くの領域が DNA バーコーディング領域としていくつか提案されている。また、DNA バーコーディングに用いられる塩基配列は、PCR を使った増幅の際に、種特異的なプライマーではなく、多くの分類群で共通して利用できるユニバーサルプライマーが利用でき、かつ比較的短い領域が好ましい。このような性質をもった標準マーカーとして、動物ではミトコンドリアのチトクロム C 酸化酵素サブユニット I (cytochrome c oxidase subunit I, *COI*) 遺伝子が、菌類では核 ITS 領域が利用される (Hebert *et al.* 2003b; Schoch *et al.* 2012)。植物では *COI* 遺伝子の進化速度が非常に遅いため、陸上植物とくに被子植物では DNA バーコーディングのマーカーとして葉緑体の *rbcL* や *matK* 遺伝子が利用されることが多い (Kress *et al.* 2005; Chase *et al.* 2007; Fazekas *et al.* 2008)。また、2009年に開催された第3回国際バーコードオブライフカンファレンス (DNA Barcode of Life Conference) でこれらの領域が植物の標準的バーコード領域として決定されている (CBOL Plant Working Group 2009)。ただし、*rbcL* 遺伝子は種より上位の属や科のレベルであれば十分にバーコード領域として利用できるが、他の領域にくらべると進化速度が遅いため、より進化速度の速い葉緑体 *trnH-psbA* 遺伝子間領域や核 ITS 領域などが利用される場合もある (Hollingsworth *et al.* 2011)。実際、日本産樹木については、*rbcL* や *matK* 遺伝子に加えて、*trnH-psbA* 領域の塩基配列を利用して、約 75% の樹種の同定が可能になっている (吉村ほか 2011, 吉丸ほか 2012)。樹木以外の植物でも、

モデル植物が含まれるアブラナ科 Brassicaceae やナス科 Solanaceae、形態レベルでの同定が困難とされるスゲ属 *Carex* やハイノキ属 *Symplocos* などの植物では核 ITS 領域の DNA 配列を用いた研究が行われている (Soejima & Nagamasu 2004; Yano *et al.* 2004, 2014; Wang *et al.* 2004; Spooner 2009; Kiefer *et al.* 2013)。本研究では DNA データベース上での登録数や既存のプライマーでの増幅の可否を考慮して葉緑体 *rbcL* 遺伝子と核 ITS 領域の塩基配列を用いたが、両者を併用することでより精度よく DNA バーコーディングを行うことができた。

本研究では対象とした標本が比較的新しいものであったため DNA 抽出の段階で大きな問題は生じなかったが、古い標本や状態の悪い標本については PCR 可能な DNA が得られない場合も想定される。このような場合、比較に用いる配列情報が得られないため DNA バーコーディングが利用できない。また、本研究のミズユキノシタの葉緑体 *rbcL* の例のようにデータが登録されていなかったり、コウガイゼキショウ類のように種の同定には解像度が十分でなかったりする場合もある。さらに、DNA データベースに登録されている情報が正確でなかったり、不十分である場合も想定され、データベースに登録された配列情報に含まれるエラーも DNA バーコーディングの際に問題となる (Shen *et al.* 2013; 坪田ほか 2014b)。本研究でも、ミズユキノシタの ITS の検索でヒットした EU814861 (*Lolium multiflorum*, イネ科 Poaceae) やハリコウガイゼキショウの ITS の検索でヒットした KF805137 (*Cyperus conglomeratus*, カヤツリグサ科 Cyperaceae) のように、分類学的にみて明らかに正確ではなく、誤同定あるいは登録ミスであると考えられる例が見つかった。このような事例に注意すれば、DNA データベースなどに登録されている配列情報を用いれば、植物でも多くの場合、属レベルの同定は現時点で可能なレベルであると言える。

DNA バーコーディングの際の検索結果と系統解析の利用

BLAST はバイオインフォマティクスで一般的に用いられるシークエンスデータベースの検索用プログラムのひとつで、NCBI や DDBJ などの Web サイトで利用可能である (Durbin *et al.* 1998; Korf *et al.* 2003; Baxevanis & Ouellette 2005; Zvelebil & Baum 2008; Agostino 2013)。ただし、Web サイト毎にバージョンの違いなどが存在し、評価の項目や値、出力結果の順番が異なる場合がある。今回、

DDBJ の BLAST は BLASTN 2.2.26 (Altschul *et al.* 1997)、NCBI は BLASTN 2.2.30+ (Zhang *et al.* 2000; Morgulis *et al.* 2008) であった。実際の出力を比較した結果、E 値 (E-value) については違いはなかったが、ビットスコア (Bit-score) については、前者は標準的なビットスコアで評価されたが、後者はビットスコアの最大値 (Max score) とビットスコアの総計 (Total score) と評価の項目が異なった。今回用いた塩基配列については、いずれの配列でも上位のスコアの配列に順番の入れ替わりは存在したが、評価項目は異なるものの上位に列挙される配列には大きな違いがなかった。このため、NCBI の BLASTN により BLAST 検索を行い、DNA バーコーディング用の情報を得るとともに、出力結果の中から上位の配列を得て解析を行った。

BLAST 検索の結果のスコアだけではどの配列がもっとも系統的に近いのか判断が難しい。また、BLAST のアルゴリズムは速度重視であるため正確さが多少犠牲になる。例えば、登録されている配列の長さが極端に異なる場合や、登録されているデータとの領域が近い場合、過度に評価される場合がある。反対に、局地的に配列類似性が高い配列同士であっても、相同な部分にギャップが入ると、過小評価される場合がある。さらに、種内変異や雑種なども存在するため、塩基配列の類似性だけでは DNA バーコーディングの結果としては正しい判定ができない場合がある。このため、本研究ではそれを補足する工夫として、候補となり得るものの取りこぼしがないように検索結果の上位の配列を比較に用いるとともに、系統解析を行うことでこの欠点を補うこととした。実際、坪田ほか (2014b, c) は収蔵標本や外来植物に対する DNA バーコーディングを行った際に分子系統解析を併用し、たとえ短い塩基配列であっても、BLAST 検索の結果だけで得られる情報よりもより詳細な系統情報が得られることを示しその有効性を認めている。これらの研究では、スコアの値が高いものを結果とするのではなく、BLAST 検索の結果で上位になった配列に対してアライメントを行い、アライメント後のデータセットについて系統解析を行うことで最近隣の配列を決定し、近隣 OTU とくに姉妹群になるかどうかとも判断の際の指標としている。

本研究では、完全に一致する配列がデータベースに登録されていなくても、系統解析を併用することで BLAST 検索だけでは得られない系統情報が得られ、同定に非常に有効であることが明らかになった。Sonet *et al.* (2013) や Tanabe & Toju (2013) は

DNA バーコーディングを使った同定について理論的枠組みを示しているが、実際の DNA データベースのデータに適應するのは現時点では難しい。また、Gravendeel *et al.* (2009) は DNA の塩基配列の違いの割合を用いて比較を行い、もっとも近い距離にある配列を得ている。この論文では方法の詳細は明記されていないが、系統解析の p-distance を使ったものと同様のものと理解できる。この距離ではさまざまなバイアスが生じるため、本研究で用いたより現実の塩基置換モデルにもとづいた系統解析を利用する方法が、現時点で有用であると考えられる。

地域フロラの理解の深化と分子情報の活用

広島県廿日市市宮島は、古くから研究対象とされており、西日本でもっとも維管束植物や蘚苔類のフロラが明らかになっている地域のひとつである (Makino 1906; 乾 1918, 1925; 乾・本田 1930; 堀川 1942; 関ほか 1975; 安藤ほか 1975; 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997; 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所 2009; 平原ほか 2010)。宮島は古くからの信仰や法律による規制の結果、他の地域に比べると開発や埋め立てなどの人為的な影響による環境の変化が小さく、研究対象としてだけでなく遺伝子資源のリソースとして重要な場所である (坪田 2014a, b)。しかしながら、森林植生の遷移や自然災害に伴った変化、大型哺乳類の影響、とくにニホンジカの餌付けとそれに伴う行動範囲の変化、ニホンザル導入に伴う植生への影響、外来生物の侵入と定着、とくにマツノザイセンチュウの侵入による松枯れ病の影響、大気汚染と海洋汚染、地球温暖化や暖冬、台風や豪雨、山火事、一部では埋め立てや工事などの影響も存在する (関ほか 1970; 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997; 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所 2009; 坪田 2014a, b)。例えば、2005 年 9 月には豪雨により土石流が発生し、白糸川や大砂利の谷筋を中心に植生が大きく変化している (海堀ほか 2008)。変化が小さいとされる宮島でも、これらの影響により絶滅とされる種や近年生育が確認されていない種、生育場所が減少した種なども少なくない。本研究で報告するミズユキノシタ *Ludwigia ovalis* Miq. は埋め立てにより生育場所が失われ、絶滅とされた例である (広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997)。一方で、宮島の維管束植物フロラについてまとめた関ほか (1975) や宮島も含めた広島県のフロラをまとめた広島県植物誌 (広島大学理学部附

属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997) 以降も、新たに生育が確認あるいは再確認された種が多く存在する。新たに生育が確認種としては、ヒナノシャクジョウ *Burmanna championii* Thwaites やシロシャクジョウ *B. cryptopetala* Makino, チャボイ *Eleocharis parvula* (Roem. & Schult.) Link ex Bluff, Nees & Schauer, ヤマトウミヒルモ *Halophila nipponica* J.Kuo, ホンゴウソウ *Sciaphila nana* Blume, ウエマツソウ *S. secundiflora* Thwaites ex Benth. などがあげられる (向井ほか 1999, 2001, 2007; 坪田ほか 2009, 2010; 久保ほか 2010; 平原ほか 2010; 内田ほか 2012; Aoyama & Tsubota 2014)。外来植物についてもイワヨモギ *Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm. やシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. の生育が確認されている (坪田・向井 2010; 坪田ほか 2014a)。長い間生育状況が確認されておらず、最近になってその生育が再確認された植物としては、モロコシソウ *Lysimachia sikokiana* Miq. やスズフリイカリソウ (オオバイカイカリソウ) *Epimedium × setosum* Koidz. [syn. *E. × sasakii* F.Maek.], シロバナタンポポ *Taraxacum albidum* Dahlst. (向井ほか 1999; 半田ほか 2008; 坪田ほか 2012a) があげられる。維管束植物以外では、コケ植物のミヤコノツチゴケ *Archidium ohioense* Schimp. ex Müll.Hal. やウロコゼニゴケ *Fossombronia japonica* Schiffn., センボンウリゴケ *Timmiella anomala* (Bruch & Schimp.) Limpr., 気生藻類の一種であるミルイロスミレモ *Trentepohlia bosseae* De Wildeman var. *samoensis* Wille などとも確認されている (出口 2005; 坪田ほか 2008; 井上ほか 2014; 半田ほか 2014; Inoue & Tsubota 2014)。また、コバンモチ *Elaeocarpus japonicus* Siebold & Zucc. やオオミゴケ *Drummondia sinensis* Müll.Hal., ヤマモガシ *Helicia cochinchinensis* Lour., ゲンカイツツジ *Rhododendron mucronulatum* Turcz. var. *ciliatum* Nakai のように最近になって生育状況に関する新たな情報や分類学的知見が得られた種や、新種として記載された *Odontoschisma pseudogrosseverrucosum* Gradst., S.G.Aranda & Vanderp. もある (向井ほか 2004; 豊原 2006; Aranda *et al.* 2014; Inoue & Tsubota 2014; 山内ほか 2014)。このようなフロラの変化を把握するためには継続的な調査とデータベース化を含む標本の収集・管理が必要である。例えば、広島県のフロラの例では、「広島県植物誌」(広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会 1997) 編集の際に、過去に採集されながら同定やデータベース化が進まず、十分に活用されていなかった標本が存在した。その後、標本の同定とデータベース化が進

んだことで研究が進展した(平原ほか 2010; 世羅ほか 2010 など)。標本の同定が進んでいなかった原因のひとつに、標本の不完全性があげられる。DNA バーコーディングを利用することで、より迅速で正確な同定が可能となり、これを補うことができる。本研究でも、広島県宮島から過去に報告があるもののその後の報告で絶滅したとされていたミズユキノシタを再確認することができ、DNA バーコーディングによる研究の進展により、地域フロラの理解の深化や情報提供の可能性が示された。

DNA の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列などの分子情報を使った研究は、分子系統学を代表として近年発達してきており、分類学や生態学の分野で大きな成果が得られている(出口 2001; 坪田・有川 2011; 坪田 2012b など)を参照)。例えば、シダの前葉体として保管されていた標本が所属不明の植物として認識され、後の分子系統解析によりその分類学的位置が明らかになった苔類ヌエゴケ属 *Mizutania* の例や、採取された回数が少なく所属不明であった *Vandiemena ratkowskiana* Hewson の例、分子系統学的研究の結果シッポゴケ目 Dicranales からギボウシゴケ目 Grimmeriales に移されたキヌシッポゴケ科 Seligeriaceae の例、他の科に置かれていたが系統的に異なることから独立した科 Timmiellaceae とされた蘚類センボンウリゴケ属 *Timmiella* や分類学的な扱いが変更された蘚類 *Pseudotrismegistia* やイトハイゴケ *Pylaisiadelphina tristoviridis* (Broth.) O.M.Afonina, Ignatova & H.Tsubota の例、形態だけでなく分子情報でも別種であることが確認されたイボイボムククゴケ *Trichocolea japonica* T.Katag. など(Furuki & Iwatsuki 1989; Akiyama & Tsubota 2001; Tsubota *et al.* 2002, 2003, 2004; Afonina *et al.* 2007; Furuki & Dalton 2008; Masuzaki *et al.* 2010, 2011; Katagiri *et al.* 2011, 2013; 井上ほか 2012; Inoue & Tsubota 2014)。また、正体不明の球形の単細胞性の藻類の系統的位置が DNA の配列情報にもとづいた系統解析により明らかになった *Pseudomarvania ampullaeformis* (S.Handa) Eliás & Neustupa [syn. *Stichococcus ampulliformis* S. Handa] の例や、ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* の共生藻の実体が系統解析で明らかになったり、*Choricystis minor* (Skuja) Fott が始めて共生藻として報告された例、形態の異なる地衣菌同士が同種であることが DNA の配列を利用して明らかになったりした例もある(Handa *et al.* 2003; Nakahara *et al.* 2004a, b; Takahashi *et al.* 2006; Eliás & Neustupa 2009)。形態変異が大きく分類学的な扱いが困難なもの、とくに

水草や水辺に生育する植物には形態的可塑性が大きいものが多く、水環境の差によって形態が大きく異なることが知られており、これらの植物でも分子情報が有効である。また、稀産種のように実態が十分に分かっていないものや、国内での情報が少ない帰化植物などについてもその有効性が示されている。例えば、ウミヒルモ属 *Halophila* の分類学的再検討や分布確認、宮島近海でのヤマトウミヒルモ *Halophila nipponica* J.Kuo の生育の確認、イギリスで帰化植物として知られるチョウジタデ属 *Ludwigia* などの例があげられる(Uchimura *et al.* 2006a, b; 坪田ほか 2009; Short *et al.* 2010; Shimada *et al.* 2012; Armitage *et al.* 2013)。帰化植物の例では、トゲヂシャ *Lactuca serriola* L. の例や、イヌカキネガラシ *Sisymbrium orientale* L. やホソエガラシ *S. irio* L.、ヒメムラサキハナナ *Ionopsidium acaule* Rchb. が DNA の情報により確認された例があげられる(坪田ほか 2012b, 2013, 2014c)。とくに、イヌカキネガラシの例では、寄贈された標本の状態が悪く一部の形態的特徴しか確認できなかったが、残った断片から DNA バーコーディングを行ったところ正確な同定を行うことができた。また帰化植物の場合、国内では情報が少ないものでも海外での情報がすでに蓄積されている場合が少なくなく、このような種では、形態だけでなく分子情報による裏付けを行うことができる。坪田ほか(2014b)などでも述べられているように、従来からの形態レベルでの研究が重要であり、配列データだけに頼った判断には注意が必要である。また本研究であげた例のように登録データの信憑性に疑問がある場合も存在する。しかしながら、本研究で示されたように分子情報の活用は有効であり、今後地域フロラの解明のためにも積極的に利用されることを期待したい。

謝辞

本報をまとめるにあたり以下の方々にお世話になったので、厚く御礼申し上げます。関 太郎、武内一恵、長谷信二、松村雅文、若木小夜子、和田秀次(アイウエオ順、敬称略)。本研究の一部は、科研費 MEXT/JSPS (23770089) の助成を受けたものである。また、シークエンスは広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学実験部門生命科学機器分析部で行われた。シークエンス配列の登録については日本 DNA データバンク(DDBJ)にお世話になった。また、Tasmanian Museum and Art Gallery の R. D. Seppelt 博士には、英文校閲いただくとともに、内容について

てご教示頂いた。心より感謝申し上げます。

引用文献

- Afonina, O. M., Tsubota, H. & Ignatova, E. A. 2007 (2008). The genus *Pylaisiadelpha* (Pylaisiadelphaceae, Musci) in Russia. *Arctoa* 16: 127–132.
- Agostino, M. 2013 (2012). *Practical Bioinformatics*. xi + 367 pp. + 11 color pls. Garland Science, New York.
- Akiyama, H. & Tsubota, H. 2001. *Pseudotrismegistia* H. Akiy. & Tsubota, a new genus of the Sematophyllaceae (Musci). *Acta Phytotax. Geobot.* 52: 85–95.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- , Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.* 25: 3389–3402.
- 安藤久次・関太郎・神田啓史・出口博則・松本こずえ. 1975. 巖島(宮島)の蘚苔類. 天然記念物瀨山原始林・特別名勝巖島緊急調査委員会(編). 巖島の自然. 総合学術調査研究報告. pp. 333–375. pls. XLIV–XLV. 宮島町, 広島.
- Aoyama, M. & Tsubota, H. 2014. Karyotype analysis of Japanese *Burmannia* (Burmanniaceae). *Acta Phytotax. Geobot.* 65: 37–42.
- Aranda, S. C., Gradstein, S. R., Patiño, J., Laenen, B., Désamoré, A. & Vanderpoorten, A. 2014. Phylogeny, classification and species delimitation in the liverwort genus *Odontoschisma* (Cephaloziaceae). *Taxon* 63: 1008–1025.
- Armitage, J. D., Könyves, K., Bailey, J. P., David, J. C. & Culham, A. 2013. A molecular, morphological and cytological investigation of the identity of non-native *Ludwigia* (Onagraceae) populations in Britain. *New J. Bot.* 3: 88–95.
- Baxevanis, A. D. & Ouellette, B. F. F. 2005. *Bioinformatics: a Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, 3rd ed. xviii + 540 pp. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12794–12797.
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T. A. J., Conrad, F., Salazar, G. A., Richardson, J. E., Hollingsworth, M. L., Barraclough, T. G., Kelly, L. & Wilkinson, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295–299.
- 出口博則. 2001. コケ学の現状, 分類と形態の研究. *プランタ* 78: 9–16.
- . 2005. 宮島のこけ 1. ミヤコノツチゴケ. 宮島自然植物実験所ニュースレター 6: 1–3.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29: 1969–1973.
- Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A. & Mitchison, G. 1998. *Biological Sequence Analysis*. xi + 357 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Eliás, M. & Neustupa, J. 2009. *Pseudomarvania*, gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), a new genus for “budding” subaerial green algae *Marvania aerophytica* Neustupa et Šejnohová and *Stichococcus ampulliformis* Handa. *Fottea* 9: 169–177.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M. & Barrett, S. C. H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802.
- Furuki, T. & Dalton, P. J. 2008. *Vandiemena ratkowskiana* Hewson (Marchantiophyta): a revised description and reassessment of its taxonomic status. *J. Bryol.* 30: 48–54.
- & Iwatsuki, Z. 1989. *Mizutania riccardioides*, gen. et sp. nov. (Mizutaniaceae, fam. nov.), a unique liverwort from tropical Asia. *J. Hattori Bot. Lab.* 67: 291–296.
- Gravendeel, B., Eurlings, M. & Heijerman, T. 2009. Use of DNA barcoding for host plant identification. *Entomol. Ber.* 69: 30–35.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Handa, S., Nakahara, M., Tsubota, H., Deguchi, H. & Nakano, T. 2003. A new aerial alga, *Stichococcus ampulliformis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from Japan. *Phycol. Res.* 51: 203–210.
- 半田信司・関太郎・向井誠二・坪田博美. 2008. 宮島におけるイカリソウ属の一種 *Epimedium* sp. の再確認. *Hikobia* 15: 225–230.
- ・正田いずみ・溝渕綾・中原・坪田美保・坪田博美. 2014. 日本新産の気生藻類ミルイロスミレモ *Trentepohlia bosseae* var. *samoensis* (スミレモ科, アオサ藻綱). *植物研究雑誌* 89: 59–64.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313–

321.
——, Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.* 270 (Suppl 1): S96–99.
- Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* 2: e312.
- 平原友紀・久保晴盛・木村茉莉南・向井誠二・坪田博美. 2010. 広島県植物誌(1997)以降に広島県廿日市市宮島から報告された種子植物. 広島大学総合博物館研究報告 2: 57–63.
- 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所(坪田博美・向井誠二)(編). 2009. 宮島の植物と自然, 改訂版(8版). 160 pp. 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所, 廿日市.
- 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会(編). 1997. 広島県植物誌. 832 pp. 中国新聞社, 広島.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. & Little, D. P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6: e19254.
- 堀川芳雄. 1942. 厳島の植物. 広島県史跡名勝天然記念物調査報告 5: 157–212. pls. 44–52.
- 乾 環. 1918. 厳島植物目録. *In* 厳島植物目録及び広島県の地形地質, (後半) 1–10 pp. 広島県山林會, 広島.
- . 1925. 厳島の植物. 広島県山林會報 15: 23–26.
- ・本田正次. 1930. 厳島瀨山原始林調査報告. 天然記念物調査報告植物之部 10: 25–28. pls. 19–27; 付厳島産植物目録 36 pp.
- Inoue, Y. & Tsubota, H. 2014. On the systematic position of the genus *Timmiella* (Dicranidae, Bryopsida) and its allied genera, with the description of a new family Timmiellaceae. *Phytotaxa* 181: 151–162.
- , Tsubota, H., Kubo, H., Uchida, S., Mukai, S., Shimamura, M. & Deguchi, H. 2011. A note on *Pottia intermedia* (Turner) Fűrnr. (Pottiaceae, Bryopsida) with special reference to its phylogeny and new localities in SW Japan. *Hikobia* 16: 67–78.
- 井上侑哉・立石幸敏・片桐知之・坪田博美. 2012. *Trichocolea japonica* (新称: イボイボムクムクゴケ) の新産地. 蘚苔類研究 10: 291–292.
- ・長谷信二・坪田博美. 2014. センボンウリゴケ(センボンゴケ科, 蘚類) の新産地と日本国内での分布. 植物研究雑誌 89: 189–192.
- 神保宇嗣・吉武啓・伊藤元己. 2008. DNA バーコーディングによる同定支援システムとJBOLI構想. 日本生態学会誌 58: 123–130.
- Jinbo, U., Kato, T. & Ito, M. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomol. Sci.* 14: 107–124.
- 角野康郎. 1994. 日本水草図鑑. 178 pp. 文一総合出版, 東京.
- . 2014. 日本の水草. 326 pp. 文一総合出版, 東京.
- 海堀正博・関 太郎・鈴木盛久・北川隆司・奥田敏統・出口博則・坪田博美. 2008. 保護されたエリアでの山腹崩壊発生地における自然環境の再生に関する研究. 砂防・地すべり技術センター(編), 平成20年度砂防地すべり技術研究成果報告会講演論文集, 29–51 pp. 砂防・地すべり技術センター, 東京.
- Katagiri, T., Miyauchi, H. & Deguchi, H. 2011. *Trichocolea japonica* (Trichocoleaceae), a new species from Japan. *Bryologist* 114: 744–748.
- , Sadamitsu, A., Miyauchi, H., Tsubota, H. & Deguchi, H. 2013. Taxonomic studies of the Trichocoleaceae in Southeast Asia. III. The genus *Trichocolea* Dumort. *Hattoria* 4: 1–42.
- Katoh, K. & Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780.
- Kiefer, K., Schmickl, R., German, D., Mandáková, T., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Franzke, A., Mummenhoff, K., Stamatakis, A. & Koch, M. A. 2013. BrassiBase: Introduction to a novel knowledge database on Brassicaceae evolution. *Plant Cell Physiol.* doi: 10.1093/pcp/pct158.
- Korf, I., Yandell, M. & Bedell, J. 2003. BLAST. xviii + 339 pp. O'Reilly & Associates, Inc., Sebastopol.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. & Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8369–8374.
- Krishnamurthy, P. K. & Francis R. A. 2012. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers. Conserv.* 21: 1901–1919.
- 久保晴盛・武内一恵・向井誠二・坪田博美. 2010. チャボイが広島県宮島に産する. 宮島自然植物実験所ニュースレター 15: 10–11.
- Makino, T. 1906. Observations on the flora of Japan (Continued from vol. XIX, p. 156). *Bot. Mag. Tokyo* 20: 1–12.
- Masuzaki, H., Shimamura, M., Furuki, T., Tsubota, H., Yamaguchi, T., Mohamed, A. M. H. & Deguchi, H. 2010. Systematic position of the enigmatic liverwort *Mizutania* (Mizutaniaceae, Marchantiophyta) inferred from molecular phylogenetic analyses. *Taxon* 59: 448–458.
- , Furuki, T., Dalton, P. J., Tsubota, H., Seppelt, R. D. & Deguchi, H. 2011. The phylogenetic position of *Vandiemenia ratkowskiana* (Metzgeriales, Marchantiophyta). *Hikobia* 16: 51–57.

- Meier, R. 2008. DNA sequences in taxonomy: Opportunities and challenges. In Wheeler, Q. D. (ed.), *The New Taxonomy*, pp. 95–127. CRC Press, Boca Raton.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. & Schäffer, A. A. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinform.* 24: 1757–1764.
- 向井誠二・坪田博美・中原美保・関 太郎・豊原源太郎・出口博則. 1999. 広島県におけるモロコシソウ (*Lysimachia sikokiana* Miq.) の現状とその保護について. *Hikobia* 13: 31–34.
- ・原紺勇一・関 太郎・豊原源太郎. 2001. 広島県におけるヒナノシヤクジョウ (*Burmanna championii* Thwaites) の発見とその生態的意義. *Hikobia* 13: 605–609.
- ・横山忠司・黒田有寿茂・豊原源太郎. 2004. 広島県宮島におけるニホンジカによるコバンモチの樹皮剥離とその保全対策について. *植生情報* 8: 1–4.
- ・坪田博美・澤田つや子・北本照子・吉野由紀夫・関 太郎. 2007. 宮島におけるシロシヤクジョウ *Burmanna cryptopetala* Makino の発見. *Hikobia* 15: 61–66.
- Nakahara, M., Handa, S., Watanabe, S. & Deguchi, H. 2004a. *Choricystis minor* as a new symbiont of simultaneous two-species association with *Paramecium bursaria* and implications for its phylogeny. *Symbiosis* 36: 127–151.
- , Tsubota, H., Handa, S., Watanabe, S. & Deguchi, H. 2004b. Molecular phylogeny of *Chlorella*-like symbiotic algae in *Paramecium bursaria* based on 18S rRNA gene sequences. *Hikobia* 14: 129–142.
- Oguri, E., Yamaguchi, T., Tsubota, H. & Deguchi, H. 2003. A preliminary phylogenetic study of the genus *Leucobryum* (Leucobryaceae, Musci) in Asia and the Pacific based on ITS and *rbcL* sequences. *Hikobia* 14: 45–53.
- 定光 淳・嶋村正樹・坪田博美. 2012. 第18回国際植物科学会議メルボルン大会 IBC2011 に参加して. *蘚苔類研究* 10: 217–220.
- Saitoh, T., Sugita, N., Someya, S., Iwami, Y., Kobayashi, S., Kamigaichi, H., Higuchi, A., Asai, S., Yamamoto, Y. & Nishiumi, I. 2014. DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. *Mol. Ecol. Res.* published online 11 Jun. 2014. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.12282/pdf> (2014年7月9日閲覧)
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6241–6246.
- 関 太郎・生塩正義・豊原源太郎. 1970. 宮島ニホンザル放飼群は植物にどのような影響を及ぼしたか. *野猿* 32: 42–46.
- ・中西弘樹・鈴木兵二・堀川芳雄. 1975. 厳島(宮島)の維管束植物. 天然記念物瀨山原始林・特別名勝厳島緊急調査委員会(編), 厳島の自然, 総合学術調査研究報告, pp. 221–332, pls. XLII–XLIII. 宮島町, 広島.
- 世羅徹哉・坪田博美・松井健一・浜田展也・吉野由紀夫. 2010. 広島県植物誌補遺. 広島市植物公園紀要 28: 1–74.
- Shen, Y.-Y., Chen, X. & Murphy, R. W. 2013. Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control. *PLoS ONE* 8: e57125.
- Shimada, S., Watanabe, M., Ichihara, K. & Uchimura, M. 2012. Morphological variations of the seagrass species, *Halophila nipponica* (Hydrocharitaceae, Alismatales). *Coast. Mar. Sci.* 35: 85–90.
- Short, F. T., Moore, G. E. & Peyton, K. A. 2010. *Halophila ovalis* in the Tropical Atlantic Ocean. *Aquat. Bot.* 93: 141–146.
- Soejima, A. & Nagamasu, H. 2004. Phylogenetic analysis of Asian *Symplocos* (Symplocaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *J. Plant Res.* 117: 199–207.
- Sonet, G., Jordaens, K., Nagy, Z. T., Breman, F. C., De Meyer, M., Backeljau, T. & Virgilio, M. 2013. Adhoc: an R package to calculate ad hoc distance thresholds for DNA barcoding identification. *ZooKeys* 365: 329–336.
- Speers, L. & Edwards, J. L. 2008. International infrastructure for enabling the new taxonomy: the role of the Global Biodiversity Information Facility (GBIF). In Wheeler, Q. D. (ed.), *The New Taxonomy*, pp. 87–94. CRC Press, Boca Raton.
- Spooner, D. M. 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: an example in wild potatoes. *Am. J. Bot.* 96: 1177–1189.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinform.* 30: 1312–1313.
- Takahashi, K., Wang, L.-S., Tsubota, H. & Deguchi, H. 2006. Photosymbiodemes *Sticta wrightii* and *Dendrisocaulon* sp. (lichenized ascomycota) from Yunnan, China. *J. Hattori Bot. Lab.* 100: 783–796.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tanabe, A. S. 2011. Kakusan4 and Aminosan: two

- programs for comparing nonpartitioned, proportional, and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 914–921.
- & Toju, H. 2013. Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLoS ONE* 8: e76910.
- 豊原源太郎. 2006. ゲンカイツツジ. 宮島自然植物実験所ニュースレター 8: 1.
- 坪田博美. 2012. コケ植物の分子系統. In 日本植物分類学会 (監修), 戸部博・田村実 (編著), 新しい植物分類学 II, pp. 22–33. 講談社, 東京.
- . 2014a. 宮島の自然—その現状と課題—. 巖島研究 10: 1–18.
- . 2014b. 宮島の自然—地形と地質および植生と動植物について—. 宮島自然植物実験所ニュースレター 22: 2–5.
- ・有川智己. 2011. 新・分子系統解析法. 日本蘚苔類学会創立 40 周年記念出版委員会 (編), 改訂新版・コケ類研究の手引き, pp. 69–82. 日本蘚苔類学会, 東広島.
- ・向井誠二. 2010. 宮島のイワヨモギについて. 宮島自然植物実験所ニュースレター 15: 1, 16.
- ・西山智明. 2005. ミズーリ植物園で開催されたコケ植物の分子情報を用いた系統分類・体系学に関するシンポジウムについて. 蘚苔類研究 9: 32–34.
- Tsubota, H., Nakao, N., Arikawa, T., Yamaguchi, T., Higuchi, M., Deguchi, H. & Seki, T. 1999. A preliminary phylogeny of Hypnales (Musci) as inferred from chloroplast *rbcL* sequence data. *Bryol. Res.* 7: 233–248.
- , Akiyama, H., Yamaguchi, T. & Deguchi, H. 2001. Molecular phylogeny of the Sematophyllaceae (Hypnales, Musci) based on chloroplast *rbcL* sequences. *J. Hattori Bot. Lab.* 90: 221–240.
- , Arikawa, T., Akiyama, H., De Luna, E., Gonzalez, D., Higuchi, M. & Deguchi, H. 2002. Molecular phylogeny of hypnobryalean mosses as inferred from a large-scale dataset of chloroplast *rbcL*, with special reference to the Hypnaceae and possibly related families. *Hikobia* 13: 645–665.
- , Ageno, Y., Estebanez, B., Yamaguchi, T. & Deguchi, H. 2003. Molecular phylogeny of the Grimmiaceae (Musci) based on chloroplast *rbcL* sequences. *Hikobia* 14: 55–70.
- , De Luna, E., Gonzalez, D., Ignatov, M. S. & Deguchi, H. 2004. Molecular phylogenetic and ordinal relationships based on analyses of a large-scale data set of 600 *rbcL* sequences of mosses. *Hikobia* 14: 149–169.
- 坪田博美・長谷信二・向井誠二・出口博則. 2008. 宮島のこけ 2. ウロコゼニゴケ. 宮島自然植物実験所ニュースレター 13: 10–12.
- ・久保晴盛・向井誠二. 2009. 広島県宮島近海で見つかったヤマトウミヒルモ *Halophila nipponica* J.Kuo について. *Hikobia* 15: 339–347.
- ・——・——. 2010. ヤマトウミヒルモ *Halophila nipponica* J.Kuo (トチカガミ科 Hydrocharitaceae). 宮島自然植物実験所ニュースレター 17: 1.
- ・内田慎治・向井誠二. 2012a. シロバナタンポポ *Taraxacum albidum* Dahlst. (キク科 Asteraceae). 宮島自然植物実験所ニュースレター 20: 1.
- ・久保晴盛・武内一恵・中原・坪田美保・井上侑哉・内田慎治・向井誠二. 2012b. 広島の帰化植物 3. トゲヂシャとマルバトゲヂシャ. *Hikobia* 16: 197–202.
- ・——・大野彰洋・井上侑哉・中原・坪田美保・武内一恵・松井健一・内田慎治・向井誠二. 2013. 広島の帰化植物 4. イヌカキネガラシおよびその近縁種. *Hikobia* 16: 321–334.
- ・井上侑哉・内田慎治・向井誠二. 2014a. 宮島でシロイヌナズナが見つかる. 宮島自然植物実験所ニュースレター 21: 3–4.
- ・——・中原・坪田美保・内田慎治・向井誠二. 2014b. 標本同定のツールとしての DNA バーコーディング—植物標本の例—. 広島大学総合博物館研究報告 6 (印刷中).
- ・中原・坪田美保・井上侑哉・内田慎治・向井誠二. 2014c. 広島の帰化植物 5. ヒメムラサキハナナ. *Hikobia* 16: 491–497.
- 内田慎治・井上侑哉・向井誠二・坪田博美. 2012. 広島県宮島におけるウエマツソウ *Sciaphila secundiflora* Thwaites ex Benth. (ホンゴウソウ科 Triuridaceae) の発見. *Hikobia* 16: 193–196.
- Uchimura, M., Faye, E. J., Shimada, S., Arai, S., Inoue, T. & Nakamura, Y. 2006a. A re-evaluation of the taxonomic status of *Halophila euphlebia* Makino (Hydrocharitaceae) based on morphological features and ITS sequence data. *Bot. Mar.* 49: 111–121.
- , ——, ——, Ogura, G., Inoue, T. & Nakamura, Y. 2006b. A taxonomic study of the seagrass genus *Halophila* (Hydrocharitaceae) from Japan: description of a new species *Halophila japonica* sp. nov. and characterization of *H. ovalis* using morphological and molecular data. *Bull. Natl. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B* 32: 129–150.
- Wang, Y., Fritsch, P. W., Shi, S., Almeda, F., Cruz, B. C. & Kelly, L. M. 2004. Phylogeny and infrageneric classification of *Symplocos* (Symplocaceae) inferred from DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 91: 1901–1914.
- Ward, R. D., Hanner, R. & Hebert, P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J.*

- Fish Biol. 74: 329–356.
- Yamaguchi, T., Yano, S. & Tsukaya, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *Plant Cell* 22: 2141–2155.
- 山内大輝・丸山隼人・内田慎治・向井誠二・坪田博美・和崎 淳. 2014. 日本産ヤマモガシ (*Helicia cochinchinensis* Lour., ヤマモガシ科) のクラスター根の発見. 植物研究雑誌 (印刷中).
- Yano, O., Katsuyama, T., Tsubota, H. & Hoshino, T. 2004. Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. *J. Plant Res.* 117: 409–419.
- , Ikeda, H., Jin, X.-F. & Hoshino, T. 2014. Phylogeny and chromosomal variations in East Asian *Carex*, *Siderostictae* group (Cyperaceae), based on DNA sequences and cytological data. *J. Plant Res.* 127: 99–107.
- 吉丸博志・吉村研介・鈴木節子・津村義彦・能城修一・勝木俊雄・大谷雅人・河原孝行・藤井智之. 2012. 日本産樹木における DNA バーコード分類システムの開発 <http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/seikasenshu/2012/documents/p56-57.pdf> (2014年7月7日閲覧)
- 吉村研介・鈴木節子・田中孝尚・鈴木三男・神保宇嗣・伊藤元己・笹田英典・大谷雅人・勝木俊雄・津村義彦・藤井智之・能城修一・河原孝行・吉丸博志. 2011. 日本産樹木 DNA バーコーディングの現状 (2009). 関東森林研究 62: 171–174.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7: 203–214.
- Zvelebil, M. & Baum, J. O. 2008. *Understanding Bioinformatics*. xxiii + 772 pp. Garland Science, New York.
- インターネットリソース
DNA バーコードデータベース (JBOL-DB). <http://db.jboli.org/> (2014年7月7日閲覧)
広島大学デジタル自然史博物館. プライマリー一覧. https://www.digital-museum.hiroshima-u.ac.jp/~main/index.php/PCR_primers (2014年7月7日閲覧)
JBLI (日本バーコードオブライフ・イニシアチブ, Japanese Barcode of Life Initiative) のパンフレット. DNA バーコーディング, 生物の同定と種の多様性管理のための新しいツール. http://www.jboli.org/wp/wp-content/uploads/2011/01/DNAbarcoding_JP.pdf (2014年7月7日閲覧)
- 2014年11月25日受理

Appendix A. Specimens examined.

Juncus wallichianus Laharpe, Mém. Soc. Hist. Nat. Paris 3: 139, 1827.

Japanese name: Hari-kogai-zekisho.

JAPAN, Honshu, Hiroshima Pref.: Hatsukaichi-shi, Miyajima-cho: *H. Tsubota & I. Matsuda* s.n. in hb. HIRO-MY 94768 (8 April 2014, HIRO-MY), DNA voucher for accession numbers AB985731 for nr ITS region and AB985730 for cp *rbcL* gene.

Ludwigia ovalis Miq., Ann. Mus. Bot. Lugduno-Bata-vi 3: 95, 1867.

Japanese name: Mizu-yukinoshita.

JAPAN, Honshu, Hiroshima Pref.: Hatsukaichi-shi, Miyajima-cho: *H. Tsubota & I. Matsuda* s.n. in hb. HIRO-MY 94771 (8 April 2014, HIRO-MY), DNA voucher for accession numbers AB985733 for nr ITS region and AB985732 for cp *rbcL* gene.