

短報 Short Report

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 —

坪田博美^{1,2}・井上侑哉³・中原-坪田美保⁴・内田慎治^{1,5}・向井誠二^{1,5}

DNA Barcoding as a Supporting Tool for Identification of Undetermined Herbarium Specimens,
with Special Reference for Dried Plant Specimens

Hiromi TSUBOTA^{1,2}, Yuya INOUE³, Miho NAKAHARA-TSUBOTA⁴,
Shinji UCHIDA^{1,5} and Seiji MUKAI^{1,5}

要旨: 生物学的な研究を行う際の基礎資料として標本は必要不可欠であるが、その状態によっては形態による同定が困難な場合がある。近年 DNA バーコーディングによる種の同定が行われるようになってきている。今回、広島大学植物標本庫 HIRO に収蔵されている標本のうち、完全標本でないものを対象に DNA バーコーディングを行った。その結果、沖縄県産の標本から移入植物と考えられる *Ruellia longepetiolata* (Oerst.) Hemsl. を確認し、DNA バーコーディングが標本の管理に有効であることが示された。一方で、沖縄産の標本からハイノキ属 *Symplocos* の一種を確認したが、データベースに登録されている配列とは一致しなかった。この標本については種レベルの同定を行うためさらに検討が必要である。このような場合、形態の検討が重要であり、配列データだけに頼った判断には注意が必要である。本研究の結果、DNA バーコーディングが、完全でない標本の同定に有効であること、その際に分子系統解析を併用することでさらに効果があがること、配列情報だけを使った同定にも限界が存在することが明らかになった。
キーワード: 乾燥標本、分子情報、分子系統解析、広島県のフロラ、核 ITS 領域

Abstract: Herbarium voucher specimens are indispensable for taxonomic research and one of the most important basic materials in biological research generally. However, depending on the condition of the specimen, it may be difficult to identify or effectively exploit the material for study. The DNA barcoding technique is an important research tool for identification based on specimens or samples using standard DNA sequences, and has become much more widely used in recent years. Here, we make a case study for identification of incomplete or otherwise difficult specimens using two imperfect plant specimens deposited in the herbarium HIRO by means of the DNA barcoding technique. DNA barcoding showed that one of the subject specimens from Okinawa Prefecture, southernmost Japan, could be identical to *Ruellia longepetiolata* (Oerst.) Hemsl. (Acanthaceae). Using a BLAST search, sequences obtained from the other specimen identified only as *Symplocos* sp. (Symplocaceae), also from Okinawa Prefecture, did not match any sequences deposited in the DNA database, suggesting that further studies would be needed based on traditional taxonomic methodology. The results demonstrated that (1) DNA barcoding is a useful tool to identify specimens in poor condition in the herbarium, (2) phylogenetic analyses are helpful in to determining the identity of specimens, and (3) identification using only DNA barcoding has limitations and is dependent on the extent of the DNA library.

Keywords: dried specimens, DNA barcoding, molecular phylogeny, flora, nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nr ITS) region

1 広島大学大学院理学研究科附属宮島自然植物実験所； Miyajima Natural Botanical Garden, Graduate School of Science, Hiroshima University
2 広島大学大学院理学研究科； Graduate School of Science, Hiroshima University
3 広島大学大学院理学研究科大学院生； Graduate Student, Graduate School of Science, Hiroshima University
4 千葉県立中央博物館共同研究員； Cooperative Research Fellow of Natural History Museum and Institute, Chiba
5 広島大学技術センター； Technical Center, Hiroshima University

I. はじめに

1. DNA バーコーディングについて

DNA バーコーディング (DNA barcoding) は, Hebert et al. (2003) によって提唱された手法で, DNA の配列情報を使って生物を同定するものである。近年, DNA のシーケンスが容易になり, 様々な分野で広く行われるようになってきている (Meier, 2008)。

狭義の 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のデータベース (DNA バーコードライブラリ) を構築し, そのデータベース上でもっとも類似する配列情報を同定結果とする。この手法を用いるためには, 網羅的な配列情報のデータベースの構築やオンライン検索システムなどの同定支援システムの構築が必須である。現在, 生物種同定支援システムの整備が進んでおり, 魚類や鳥類, 昆虫, 貝類, シダ植物, 樹木, キノコ類などで利用できる (Hebert et al., 2004; Ward et al., 2009; Jinbo et al., 2011; Schoch et al., 2012; Saitoh et al., 2014 など)。しかしながら, 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はまだ限られているのが現状である。

一方で, DNA バーコーディングの計画が始まる以前から, 国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database Collaboration; INSDC) のような DNA データベースに配列情報は多く蓄積されており, 証拠標本のデータも登録されているものが含まれる。このようなデータベースには精度や正確性に問題がある配列も含まれている点に注意すれば, DNA バーコーディングの際に利用可能である。

2. DNA バーコーディングに用いられる領域

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。陸生植物とくに被子植物では, 標準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く, 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* 領域や核 ITS 領域などが利用される場合もある (Hollingsworth et al., 2011)。

3. 標本の利用と DNA バーコーディング

標本は生物学的な研究を行うため, 時間が経過しても形態ができるだけ変化しないような処理を行った上で保存されている。必要なときに利用できるように生物学とくにフィールドサイエンス分野では古くから利用されており, 生物の多様性を研究する際に基礎資料として必要不可欠である。また, 1 点の標本でも産地や形態的特徴など得られる情報は存在するが, 種内変異の幅や地域間の差など標本が多く集まらなければ得られない情報もある。これは DNA の場合も同様である。さらに, 多くの標本が適切に保管されることで, 将来の再検証が可能になり, 新たな手法の適用や発見につながる。本研究で取り上げる DNA バーコーディングもそのひとつである。また, 従来から標本を利用してきた分野だけでなく, DNA を得るためのリソースとしても活用できる。さらに, 保全生態学や考古学などの分野でも分子情報を用いた研究が行われるようになってきているが, DNA バーコーディングの利用が広がることで今後それ以外の分野にも波及する可能性が高い。例えば, DNA バーコーディングは種の保全への利用や地域フロラの解明への応用も考えられている (Rubinoff, 2006; Gonzalez et al., 2009 など)。その他にも, 将来的に DNA バーコーディングが利用され貢献できるものとして, 環境や天然資源の維持, 絶滅危惧種の保護, 移入生物のような国境を超えた種の移動の管理とくに農業害虫の管理や病原体媒介生物の同定, 農業利用, 食品の安全性や水質のモニタリングなど, より広い分野で利用されることが予想される (Hajibabaei et al., 2007; Frézal and Leblois, 2008; Wong and Hanner, 2008; Valentini et al., 2010; Jinbo et al., 2011; Krishnamurthy and Francis, 2012; Galimberti et al., 2013; JBLI のパンフレットも参照)。

標本は基礎科学を行う上で重要な基礎情報となり, その維持・管理は研究を行う上で必要不可欠であり, 研究の証拠としての植物標本は標本庫への収蔵が必須である。しかしながら, 標本が残され保管されていても, 未成熟であったり, 花が無い, 一部が欠けていたりするなど標本が完全な状態でない場合, 同定が困難な場合が少なくない。また, DNA バーコーディングを利用した研究は, 標本庫に収蔵されている古い標本を対象としたものよりも, 未調査地域のフロラの解明や生薬・食材の同定などの研究例が多く, 同定の再検討の際の利用のような標本そのものを対象とした研究例は実際にはあまり多くない。本研究では, 標本庫に収蔵されている標本を対象として, 実際に DNA バーコーディングに分子系統解析を組み合わせることで同

定が可能になった例を示しながら、DNA バーコーディングの博物館や標本庫での有用性と注意点について述べてみたい。

II. 材料と方法

今回、広島大学植物標本庫 HIRO に収蔵されている植物標本の中から、形態的特徴が明確でない標本や状態が悪い標本について DNA バーコーディングにより検討を行った。植物標本から DNA を抽出し、PCR 反応の後、シーケンスを行って塩基配列を決定し、DNA データベースを用いて塩基配列の BLAST 検索を行い、情報を得た。本研究に用いた標本の詳細については、Appendix A に示した。

1. DNA 抽出

標本から植物体の一部（葉または花弁）を実体顕微鏡下で切り取り、実験に用いた。DNA 抽出法は、坪田ほか (2013) または Tsubota et al. (2005) の方法に従った。いずれの場合も、数 mm 四方程度の植物体を 1.5 ml チューブ内で破碎し、プロトコルに従い DNA を抽出後、抽出液を直接 PCR に用いた。

2. PCR 反応とシーケンス

PCR により対象とする領域を増幅し、得られた産物に対してダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。今回、DNA バーコーディングには、核 ITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列を用いた。PCR には Takara Ex Taq (タカラバイオ, 大津) または KOD FX Neo (東洋紡, 大阪) を用いた。Takara Ex Taq を用いた PCR およびシーケンスの条件は Tsubota et al. (1999, 2000) に従った。KOD FX Neo を用いた Long PCR は、Inoue and Tsubota (2014) に従った。また、対象とした領域を増幅するための PCR およびシーケンスの際に用いたプライマーは既存のものを用いた (配列の詳細は、広島大学デジタル自然史博物館内のページを参照)。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、受託解析により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、BioEdit 7.1.11 (Hall, 1999) や MEGA 5 (Tamura et al., 2011), 塩基配列の合意配列を得るための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、国際塩基配列データベース (INSDC) に登録した。

3. DNA バーコーディングと系統解析

得られた塩基配列を用いて、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。BLAST はバイオインフォマティクスで良く用いられるプログラムで、一般に BLAST 検索の結果ではどの配列がもっとも系統的に近いのか、スコアだけでは判断が難しい。また、こ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。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 100 または 250 配列を比較に用いるとともに、系統解析を行うことで欠点を補うこととした。

NCBI で BLASTN 2.2.29+ (Zhang et al., 2000; Morgulis et al., 2008) による BLAST 検索を行い、検索結果の中から上位の配列を得た。検索の結果得られた上位 100 配列または 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。MAFFT version 7.164 (Katoh and Standley, 2013) を用いてアライメントを行った。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後に、最尤法で系統解析を行った。Kakusan4 version 4.0.2012.12.14 (Tanabe, 2011) により塩基置換モデルを算出後、RAxML version 8.1.3 または 8.0.8 (Stamatakis, 2014) を用いて系統解析を行った。

III. 結果

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、形態レベルでは種まで同定できない標本について、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。本研究で得られた配列は国際塩基配列データベース (INSDC) に登録した。

1. 標本 HIRO-MY 78106 について

この標本は南氏の寄贈標本に含まれていたものであり、沖縄県八重山郡与那国町で採集された草本である。葉が対生であるなどの外部形態から、キツネノマゴ科 Acanthaceae の帰化植物であると考えられた。本研究では、核 ITS 領域 (911 bp) の塩基配列を得ることができた。今回決定した塩基配列のアクセッション番号は AB985734 である。ITS の塩基配列を用いたバーコーディングでは、キツネノマゴ科の *Ruellia* 属の一種であった。BLAST の検索結果の上位 250 配列を用いて比較を行った。検索の結果をもとに系統解析を行った結果、EF214536 (*Ruellia maya*) と EF214596 (*R. tuxtliensis*), EF214540 (*R. menthifolia*), EF214524

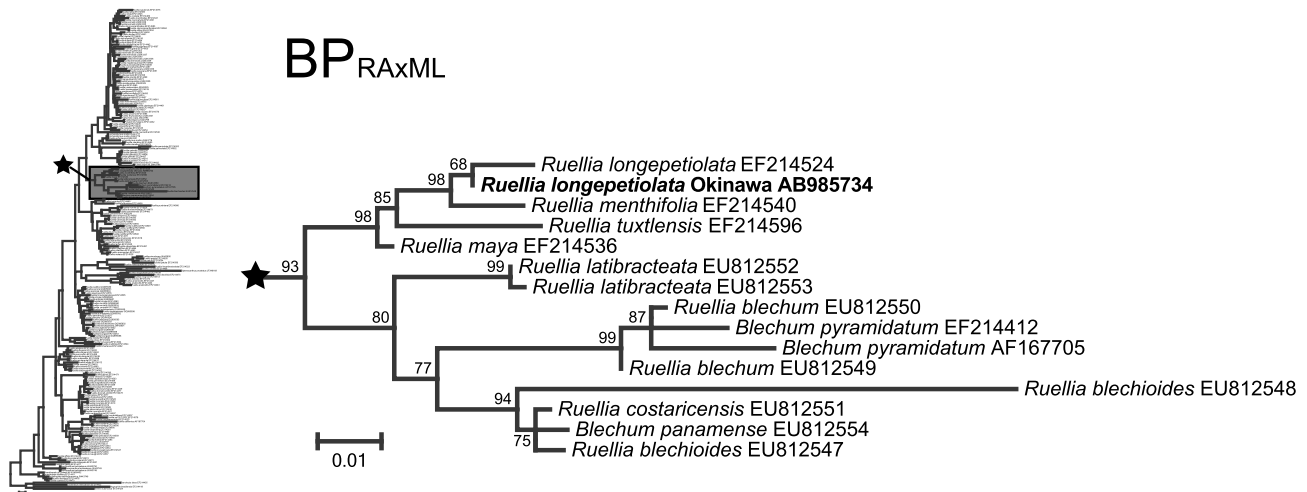


図1. 本研究で得られたアクセッション番号 AB985734 (*Ruellia longepetiolata*) の配列を含む、核 ITS 領域の塩基配列にもとづいた最尤系統樹の一部（枠で囲んだ部分）を拡大したもの。BLAST の検索結果の上位 250 配列を用いて系統解析を行った。計算には RAxML バージョン 8.0.8 (Stamatakis 2014) を使用。各枝の値は 10,000 回試行のブートストラップテストにより得られたブートストラップ確率の値で、50% 以上のものだけを表示した。

(*R. longepetiolata*) が同じクレードに含まれた(図1)。また、これらの配列に関して、MAFFT によるアライメント後の塩基配列を比較したところ、今回得られた配列とは系統樹上で姉妹群となる EF214524 がもっとも類似していた。両者の間で、配列の比較を行ったところ、塩基置換が2か所と、1塩基からなるギャップが3か所確認された。また、これらの違いは配列の末端部分に限られており、ITS 内の多型やシークエンスエラーなどの配列の質に由来するものと考えられた。この結果にもとづき、この収蔵標本は *Ruellia longepetiolata* (Oerst.) Hemsl. と同定した。本種はメキシコ原産であるので、園芸利用で持ち込まれ、逸出したものと考えられる。また、初島・天野 (1994) や太刀掛・中村 (2007) に記録がないことから、初出の可能性はある。

2. 標本 HIRO-MY 43024 について

この標本は沖縄県八重山郡竹富町で採集された木本で、在来樹種と考えられる。外部形態ではハイノキ属 *Symplocos* の一種であると考えられたが、DNA バーコーディングを用いることとした。本研究では、核 ITS 領域のうち ITS1 が含まれる領域の塩基配列 (580 bp) を得ることができた。今回決定した塩基配列のアクセッション番号は AB985735 である。ITS の塩基配列を用いたバーコーディングでは、BLAST 検索の結果をもとに上位 100 配列を用いて系統解析を行った結果、AY336305 (*Symplocos* sp. YGW-2003) と AY336306 (*Symplocos aenea*) が同じクレードに包含された。今回得られた塩基配列を両者と比較したとこ

ろ、AY336305 との間では2か所の塩基置換が認められ、AY336306 との間では塩基置換が10か所と2塩基の長さのギャップが1か所認められた。また、上位 250 配列に対象を広げて系統解析を行ったところ、上位 100 配列に含まれていなかった AB114878 (*Symplocos liukiensis*) が同じクレードに包含され、今回得られた配列の近傍に位置した(図2)。AB114878 との比較の結果、塩基置換が1か所とギャップが2か所、そのうちひとつは20塩基のギャップが認められた。両者の配列はギャップの存在や塩基置換を考慮すると同種とは判断できないものであった。データベースに登録されている配列とは一致するものが存在せず、今回の結果ではデータが未登録の種である可能性が高い。また、外部形態の再検討の結果でも、AB114878 として登録されているアオバナハイノキ *Symplocos liukiensis* Matsum. と同種と確定するには至らなかった。その他の候補種としては、ヤエヤマクロバイ *S. sumuntia* Buch.-Ham. ex D. Don (synonyms: *S. caudata* Wall. ex G. Don, *S. botryantha* Franch.) やイリオモテハイノキ *S. liukiensis* Matsum. var. *iriomotensis* Nagam. があげられる。前者については、データベースに登録されたデータが複数あるが、配列は異なり、系統樹上でも姉妹群となる。後者についてはデータが登録されていない。このため、この収蔵標本は現時点ではハイノキ属の一種 *Symplocos* sp. としておく。今回、シークエンスの際の波形で読み取ると多型が確認された所が2か所あった。さらに、ITS2 の領域についてはシークエンスの時点で波に重なりがあったため、雑種性や多型など他の要素も考慮する必要がある。今後、種レ

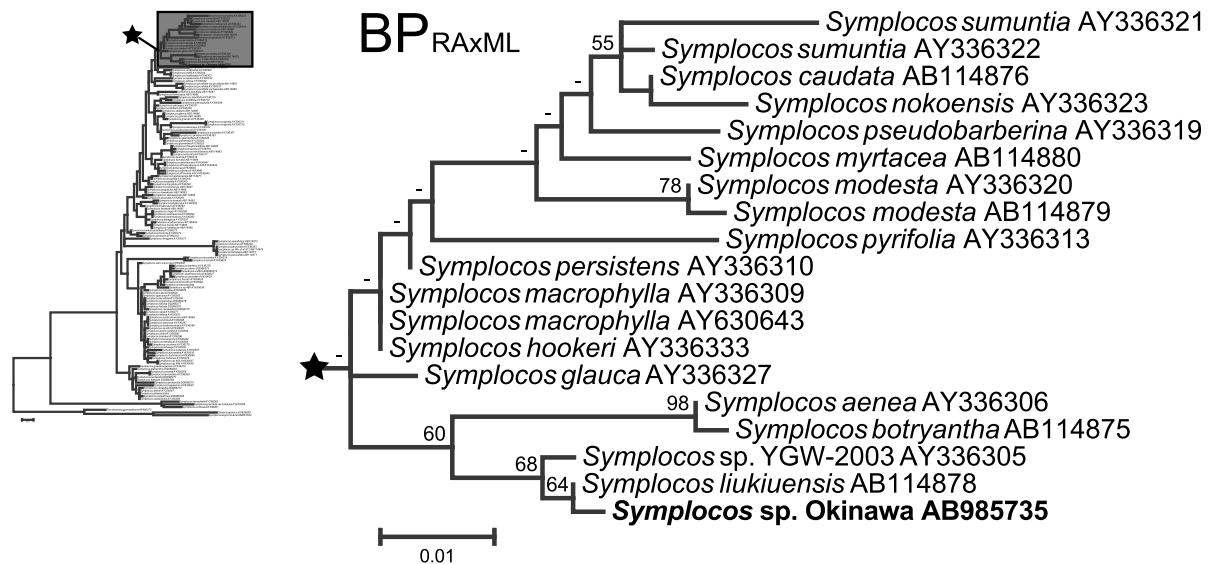


図 2. 本研究で得られたアクセッション番号 AB985735 (*Symplocos* sp.) の配列を含む、核 ITS 領域の塩基配列にもとづいた最尤系統樹の一部 (枠で囲んだ部分) を拡大したもの。BLAST の検索結果の上位 250 配列を用いて系統解析を行った。計算には RAxML バージョン 8.0.8 (Stamatakis 2014) を使用。各枝の値は 10,000 回試行のブートストラップテストにより得られたブートストラップ確率の値で、50% 以上のものだけを表示した。

ベルの同定を行うため、詳細な検討が必要である。

IV. 考察

1. DNA バーコーディングと分子情報利用の有用性

本研究では、DNA バーコーディングにより形態情報が不完全な標本について、いずれの標本についても種または属レベルで同定することができた。また、DNA バーコーディングのためのデータベースが十分でない植物種については、DDBJ などの DNA データベースを利用して、系統解析を併用することで現時点でも DNA バーコーディングが標本の同定に有効であり、標本の管理に活用できることが示された。また、完全に一致する配列がデータベースに登録されていない場合でも、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。

分子系統学のように 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用いた研究が一般的になり、現在分類学の分野では必須になり、大きな成果が得られている。形態情報に加えて、塩基配列の比較を行い、その生物の系統的な位置づけを行う際に補助的に利用する場合もある。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な位置が明らかになった苔類の例や、一度だけ標本が採取され所属不明であった苔類の例、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とされた蘚類の例など

があげられる (Masuzaki et al., 2010, 2011; Inoue & Tsubota, 2014)。また、正体不明の球形の単細胞性の藻類の系統的な位置が明らかになった例や、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例もある (Handa et al., 2003; Takahashi et al., 2006)。さらに、外来種のような国内の情報がほとんど無い標本や、稀産種でその実態があまり知られていないもの、変異が大きく分類学的な扱いが困難なものについてもその有効性が示されている (坪田ほか, 2012, 2013, 2014a)。また、水草や水辺に生育する植物は水環境によって形態変異の幅が非常に大きいものについても DNA の情報は有効である (Uchimura et al., 2006a, b; 坪田ほか, 2009, 2014b)。

2. DNA バーコーディング利用の際の注意点と今後の課題

生物の断片であっても DNA を得ることができれば、未知のサンプルの生物種の同定だけでなく、同一種であるかどうかの確認や種内変異を調べる際にも DNA バーコーディングは利用できる。しかし、DNA バーコーディングを行うことが分類を行うことそのものではない点には十分留意しなければならない (Ebach and Holdrege, 2005; Gregory, 2005)。DNA バーコーディングだけで種が決定できるわけではなく、配列データだけに頼った判断には注意が必要である。その確定には従来の標本の検討と同様に形態レベルの研究が重要であり、確認できる形態情報が限定的であって

も、DNA バーコーディングの結果との矛盾点の有無について十分に検討する必要がある。

塩基配列の種間変異が小さい場合や種内変異が大きい場合、あるいは雑種性や倍数性が存在するような場合には塩基配列の類似性だけで正確に同定するのは難しい (Meyer and Paulay, 2005; 神保ほか, 2008)。また、ITS のようにゲノム中に複数のコピーが存在する場合、倍数性や多型に注意をして利用する必要がある。データが未登録であったり、種の同定には登録されているデータで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に誤りがあったり、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)。本研究でも、*Ruellia* 属のデータで配列情報の一部にエラーに該当すると判断される部分が確認された。登録された配列以外の情報、例えば DNA バーコーディングで重要になる生物名についても、誤同定や登録の際の誤登録、コンタミネーションなどの原因により正しくない情報が登録されていることも考えられる。例えば、本研究でハイノキ属の ITS 検索でヒットした KF186454 (*Celastrus rosthornianus*) はニシキギ科 Celastraceae であるため何らかの誤りである。現在の分類学的取扱の再考が必要な場合もあるが、これについては専門家による研究の進展が必要となる。本研究では、生物学的な観点で明らかに誤りと判断され、系統解析の際に問題が生じる配列は排除して DNA バーコーディングを行ったが、証拠標本が残されていれば、その再検討や再シーケンスを行うことで情報の改善も可能となる。本研究で、植物標本を管理する際の DNA バーコーディングの有効性が示されたが、その前提として標本がきちんと保管されている必要がある。上記以外の注意点としては、たとえ生物名などの情報が正しく、配列も正しいものが登録されていても、問題となる場合があげられる。実際のデータベースに登録された配列であまりにも短いものについては BLAST 検索の段階で排除する必要がある。いずれにせよ、既存の DNA データベースを利用する場合は、データベースに登録されている配列が正しいものかどうか十分に吟味しながら、DNA バーコーディングに利用する必要がある。上記の内容に注意し、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。一方で、DNA バーコーディングのデータベースが構築されていないだけでなく、隠花植物の例のように、分類群によっては DNA デー

タベースにも配列があまり登録されていない群もある。今後、データベースの充実が必要であるが、社会的な関心の低さや専門家の数の少なさ、研究予算の差など社会的な要因の影響も考えられる。近年、DNA の塩基配列などの分子情報を使った産地特定や個体識別が現実的になっている。また、海外との生物資源のやり取りに関して生物多様性条約などの国際的な枠組みが決まっているという時代背景もある。日本はさまざまな資源を輸入している観点から、貿易を行うためにこれらの枠組みへの参画が必須である。また、枠組みに関する最大の資金拠出国でもある。これらの点を考慮すると、この分野の研究基盤の確立と利用促進のため、国家レベルでの方策も必要である。

3. DNA バーコーディングと標本の維持・管理、社会への還元

塩基配列やアミノ酸配列のような分子情報は一度決定してしまえば、情報の劣化がなく、何度でも再利用が可能である。今後、次世代シーケンサーの普及とともに、効率よく DNA バーコーディングを行うことが可能になることが期待される。しかしながら、そのもとも基礎となるのは標本であり、標本を活用するために標本庫の維持・管理は欠かせない。

地球上には 25 万種の植物が生育していると考えられているが、それを研究対象とするためには生育地を訪れ、植物を入手する必要がある。しかし、地理的・社会的な理由により現地を訪れるのが困難な場合も多い。それを補う意味で必要なのが標本であり、生物の多様性を研究するためには標本が必要不可欠である。標本の整理とくにデータベース化が進むことで標本の活用が容易になり、地域フロアの理解が進む。植物体が未成熟で形態的特徴が明瞭でない標本であっても、属レベル程度でも同定されていれば、標本の収蔵や後の研究の際に活用しやすくなる。今後、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、標本の維持・管理に役立つことが期待できる。今回、すでに収蔵された標本であっても DNA バーコーディングによって新たな知見が得られたことから明らかのように、標本は生物学とくにフィールドサイエンス分野において、分子系統学と同様に今後ますます必須のものになっていくと考えられる。

DNA バーコーディングは、基礎研究分野で利用できるだけでなく、その他の分野にも応用できる。地域毎の配列データベースの構築を行うことで種内変異に関する情報が蓄積され、産地の特定にもつながり、絶滅危惧種の保護や稀少種の盗掘の抑止などの効果も期

待できる。本研究でも、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ための情報の深化や提供の可能性が示された。このような研究を標本庫や博物館が行うことは、結果的に地域への社会貢献にもつながる。また、生物教育の分野でも分子情報の利用が必須かつ一般的になりつつあり、高等学校とくにスーパーサイエンスハイスクール (SSH) 対象校などでは DNA を使った実習が当たり前に行われている。例えば、昆虫や陸生貝類、魚類を対象にした分子系統解析が行われていたり、タンポポ類の雑種の検出で DNA の配列の違いを使った識別が行われている。このような教育現場で DNA 情報を利用する際にも、DNA データベースは活用されており、配列データベースの構築は有用なものである。筆者らが所属する宮島自然植物実験所は広島大学植物標本庫 HIRO のブランチとして維管束植物やコケ植物の標本を収蔵し、現在そのデータベース化を進めている。広島大学植物標本庫には 40 万点以上の標本の蓄積があり、これらの研究資源を活かす意味でも、DNA バーコーディングに利用できる配列データベースの構築を今後行っていきたい。

今後、分子情報を利用した DNA バーコーディングや系統関係の推定のような DNA を使った研究手法はますます一般的になることが予想され、博物館や標本庫で必須の手法になってくる。また、その有効性を高めるためデータベースの充実が望まれるとともに、標本と組にすることで正確かつ再検証可能なデータベースの構築が可能となる。

【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。上村恭子、久保晴盛、関太郎、武内一恵、南敦、山下容富子、若木小夜子 (アイウエオ順、敬称略)。本研究で用いたプライマーの一部は、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 Herbarium の R. D. Seppelt 博士には、英文校閲いただくとともに、内容についてご教示頂いた。心より感謝申し上げます。

【文献】

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.

太刀掛 優・中村慎吾 (2007) : 『改訂増補, 帰化植物便覧』比婆科学教育振興会.

坪田博美・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.

坪田博美・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 (2012) : 広島の帰化植物 3. トゲザシヤとマルバトゲザシヤ. *Hikobia*, 16, 197-202.

坪田博美・久保晴盛・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.

坪田博美・中原・坪田美保・井上侑哉・内田慎治・向井誠二 (2014a) : 広島の帰化植物 5. ヒメムラサキハナナ. *Hikobia*, 16, 491-497.

坪田博美・井上侑哉・中原・坪田美保・島本俊樹・松田伊代・内田慎治・向井誠二 (2014b) : 標本同定のツールとしての DNA バーコーディングと分子系統解析—広島県宮島で採集された標本の例—. *Hikobia*, 16, 475-490.

初島住彦・天野鉄夫 (1994) : 『増補訂正, 琉球植物目録』沖縄生物学会.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.

CBOL Plant Working Group (2009): A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12794-12797.

Ebach, M. C. and Holdrege, C. (2005): DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434, 697.

Frézal, L. and Leblois, R. (2008): Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 727-736.

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S. and Labra, M. (2013): DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res. Int.*, 50, 55-63.

Gonzalez, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S. A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C. and Chave, J. (2009): Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE*, 4, e7483.

Gregory, T. R. (2005) : DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, 434, 1067.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. and Hickey, D. A. (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.*, 23, 167-172.

- 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. and Nakano, T. (2003): A new aerial alga, *Stichococcus ampulliformis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from Japan. *Phycol. Res.*, 51, 203–210.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 270, 313–321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. and Francis, C. M. (2004): Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.*, 2, e312.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. and Little, D. P. (2011): Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6, e19254.
- Inoue, Y. and Tsubota, H. (2014): On the systematic position of the genus *Timmia* (Dicranidae, Bryopsida) and its allied genera, with the description of a new family Timmiellaceae. *Phytotaxa*, 181, 151–162.
- Jimbo, U., Kato, T. and Ito, M. (2011): Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomol. Sci.*, 14, 107–124.
- Katoh, K. & Standley, D. M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30, 772–780.
- Krishnamurthy, P. K. and Francis R. A. (2012): A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers. Conserv.*, 21, 1901–1919.
- Masuzaki, H., Shimamura, M., Furuki, T., Tsubota, H., Yamaguchi, T., Mohamed, A. M. H. and Deguchi, H. (2010): Systematic position of the enigmatic liverwort *Mizutania* (Mizutaniaceae, Marchantiophyta) inferred from molecular phylogenetic analyses. *Taxon*, 59, 448–458.
- Masuzaki, H., Furuki, T., Dalton, P. J., Tsubota, H., Seppelt, R. D. and 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. Wheeler, Q. D. ed.: *The New Taxonomy*, CRC Press, Boca Raton, 95–127.
- Meyer, C. P. and Paulay, G. (2005): DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.*, 3, e422.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. and Schäffer, A. A. (2008): Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinform.*, 24, 1757–1764.
- Rubinoff, D. (2006): Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv. Biol.*, 20, 1026–1033.
- Saitoh, T., Sugita, N., Someya, S., Iwami, Y., Kobayashi, S., Kamigaichi, H., Higuchi, A., Asai, S., Yamamoto, Y. and 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. and 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.
- Shen, Y.-Y., Chen, X. and Murphy, R. W. (2013): Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control. *PLoS ONE*, 8, e57125.
- 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. and Deguchi, H. (2006): Photosymbiodemes *Sticta wrightii* and *Dendriscoaulon* 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.
- 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.
- Tsubota, H., Nakao, N., Yamaguchi, T., Seki, T. & Deguchi, H. (2000): Preliminary phylogenetic relationships of the genus *Brotherella* and its allied genera (Hypnales, Musci) based on chloroplast *rbcL* sequence data. *J. Hattori Bot. Lab.*, 88, 79–99.
- Tsubota, H., Takahashi, K., Nakahara, M., Mohamed, H. & Deguchi, H. (2005): A simple procedure for DNA isolation using small quantities of lichen thallus. *Lichenol.*, 4, 25–28.
- Uchimura, M., Faye, E. J., Shimada, S., Arai, S., Inoue, T. and

- 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.
- Uchimura, M., Faye, E. J., Shimada, S., Ogura, G., Inoue, T. and 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.
- Valentini, A., Miquel, C. and Taberlet, P. (2010): DNA barcoding for honey biodiversity. *Diversity*, 2, 610-617.
- Ward, R. D., Hanner, R. and Hebert, P. D. N. (2009): The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.*, 74, 329-356.
- Wong, E. H.-K. and Hanner, R. H. (2008): DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Res. Int.*, 41, 828-837.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, 7, 203-214.
- 【インターネットリソース】**
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), 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)
- Appendix A. Specimens examined.**
Ruellia longepetiolata (Oerst.) Hemsl., *Biol. Cent.-Amer.*, Bot. 2: 506, 1882.
JAPAN, Ryukyu, Okinawa Pref.: Yaeyama-gun, Yonaguni-cho: A. Minami 137978 in hb. HIRO-MY 78106 (29-31 January 2013, HIRO-MY), DNA voucher for accession numbers AB985734 for nr ITS region.
Symplocos sp.
JAPAN, Ryukyu, Okinawa Pref.: Yaeyama-gun, Taketomi-cho: H. Tsubota & H. Kubo s.n. in hb. HIRO-MY 43024 (6 January 2011, HIRO-MY), DNA voucher for accession numbers AB985735 for nr ITS region.
(2014年8月29日受付)
(2014年12月20日受理)