

りも小型で、長さ3–5 cm、太さ0.5–0.8 mm、その和名にあるように、果柄が長角果より細く、長さ5–15 mmと長い点、果実はやや内側に湾曲し、成長した植物体では1本の花茎に15–25本が、1–10 mmの間隔で付く点などで区別できる。種子は米粒のような長橢円形で、長さ0.8–1.0 mm (Fig. 11)。

広島県で確認されたキバナハタザオ属帰化種の検索表

以下に、広島県産キバナハタザオ属植物の帰化種の検索表を示す。ただし、本研究ではハタザオガラシが確認できなかったので除く。

1. 若い果実は先端の花を越えて伸びない。長角果は先端がやや細くなり、茎に密着し、長さが2 cm以下。果柄は1–3 mm。茎の毛が二型あり、下向きの粗毛と細毛からなる。 カキネガラシ *S. officinale*
1. 若い果実は先端の花よりも上部に達することが多い。長角果は細長い円柱形で、斜上し、長さ3 cm以上。果柄は4 mm以上。 2
2. 茎の毛は少ないかほとんど見られない。花が幅3 mm程度。長角果は成熟しても長さ5 cm以下。果柄の太さは長角果より明らかに細く、長さ5–15 mm。長角果は1本の花茎に15–25本、1–10 mmの間隔で付く。 ホソエガラシ *S. irio*
2. 茎の毛は長い。花は幅8–10 mm。長角果は成熟すると長さ3–10(–12) cm。果柄の太さは長角果と同程度で、長さ4–5 mm。長角果は1本の花茎に10–15本、5–30 mmの間隔で付く。 イヌカキネガラシ *S. orientale*

塩基配列の比較と核ITS領域による分子系統的位置

今回、核ITS領域について、イヌカキネガラシとカキネガラシ、ホソエガラシの3種の塩基配列が得られた。得られた塩基配列のアクセション番号はAB856328–AB856333である。今回得られた配列を用いて、既存のデータとアライメントを行い比較するとともに、系統解析を行った。

核ITS領域の塩基配列を比較したところ、3種間でITS1領域で最大32塩基、ITS2領域で最大18塩基の差異が認められた。BLAST検索の結果、イヌカキネガラシの核18S rRNA遺伝子および葉緑体 $rbcL$ 遺伝子のデータはアブラナ科Brassicaceaeの種のデータと類似性が高かった。また、3種のITS領域のデータは、それぞれの種については同種のデータで登録されているものとの類似性が高く、種

内で最大で数塩基の置換や挿入欠失があるものの、99–100%の値で一致した。

核ITS領域の塩基配列にもとづく系統解析の結果、RAxMLとGarliで得られた最尤系統樹の樹形が一致した。最尤系統樹をFig. 14に示した。キバナハタザオ属に置かれる場合もある *Schoenocrambe linifolia* (AF183088, AF183089) と、*Ochthodium aegyptiacum* (GQ497870), *Raphanus raphanistrum* (GQ268068、ただし標本の再検討が必要) を含むが、キバナハタザオ属 *Sisymbrium* は単系統性を示した。イヌカキネガラシはカキネガラシと姉妹関係にあり、さらに *S. volgense* (AF531608–AF531610) がこれら2種と一つのクレードにまとまることが明らかになった。一方、ホソエガラシは *S. erysimoides* (AF531584) と一つのクレードにまとまった。

侵入の時期と今後の消長について

イヌカキネガラシは、広島県植物誌では触れられていないが、標本として残っているものでは、前出の1934年採集の標本がこれまでに見つかった広島県産の標本としては一番古いものになる。それからしばらく標本が確認されていないが、その次に古い標本は1974年採集のものとなる。三上(2002)で1977年4月に広島市西区で撮影された生態写真が掲載されている。その他にも、関(1980)により1978年6月25日のヒコビア植物観察会において広島市南区で本種が記録されている。また、太刀掛(1982)により呉市広町の黒瀬川下流左岸で1978年頃から繁殖・定着しているとの報告もある。これらのことから考えて、広島県には遅くとも1970年代前半には都市部を中心に定着していたものと推定される。吉野ほか(2007)では、アブラナ科の多くの種とともに、イヌカキネガラシを自然生態系に多少の影響を与えると思われる種のランクで掲載している。オーストラリアでは、イヌカキネガラシに農薬に対する薬剤耐性があるため、農地の雑草として問題になっている(Cheam et al. 2008)。また、結実率が良く、種子数が多く、輸入品に混入して種子が国内に持ち込まれた例も報告されている(植村2012)。さらに、北米大陸では海拔0 mから約1000 m位までの環境で生育が確認されており、広島県でも今後さらに分布を広げる可能性がある。

カキネガラシとホソエガラシ、ハタザオガラシは、情報が少なく継続調査が必要であるが、広島県の他地域で分布が確認されたり、今後分布を広げる可能性が高い。また、これまで広島県から未報告であるが近隣県で報告されているその他のキバナハタザオ

属の帰化種についても、今後広島県で発見される可能性がある。キバナハタザオ属の帰化種について、今後の消長を注意深く観察していく必要がある。

謝辞

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。本報をまとめるにあたって、標本調査については、独立行政法人農業環境技術研究所農業環境インベントリーセンターおよび同研究所の小板橋基夫博士にお世話になった。また、故藤井茂美氏の標本については、篠崎夫妻にお世話になった。作図については、国土交通省が公開している国土数値情報(行政区画および海岸線データ)を利用した。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、University of Tasmania(UTAS)のPatrick J. Dalton氏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る。

引用文献

- Al-Shehbaz, A., Arai, K. & Ohba, H. 2006. Cruciferae. In Iwatsuki, K., Boufford, D. E. & Ohba, H. (eds.), Flora of Japan, Volume IIa, Angiospermae, Dicotyledoneae, Archichlamydeae (a), pp. 454–511. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Cheam, A. H., Storrie, A. M., Koetz, E. A., Holding, D. J., Bowcher, A. J. & Barker, J. A. 2008. Managing wild radish and other brassicaceous weeds in Australian cropping systems. –x + 86 pp. CRC for Australian Weed Management, Adelaide.
- 土井美夫. 1983. 広島県植物目録. 148 pp. 博新館, 広島.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. (in press). DOI: 10.1093/molbev/mss075.
- 江塚昭典. 1994. 農業環境技術研究所所蔵植物標本目録, 1993年現在. 農環研資 15:1–153.
- 江塚昭典・松本和夫. 1985. 福山市周辺の植物相. 中國農事試験場報告 E 23: 1–107.
- 福岡県帰化植物研究会(長田武正他). 1967. 帰化植物図譜. iv + 292 + 8 pp. 第一学習社, 広島.
- Handa, S., Nakahara, M., Tsubota, H., Deguchi, H. & Nakano, T. 2003. A new aerial alga, *Stichococcus amphulliformis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from Japan. Phycol. Res. 51: 203–210.
- 広島大学理学部附属宮島自然植物実験所・比婆科学教育振興会(編). 1997. 広島県植物誌. 832 pp. 中国新聞社, 広島.
- 広島県. 1992. 広島県の動植物, 自然環境基本情報I, 植物編, 平成3年版. 328 pp. 広島県県民生活部環境保全課, 広島.
- 広島市. 2006. 安佐南工場建替事業に係る環境影響評価準備書. <http://www.city.hiroshima.lg.jp/www/contents/000000000000/1119261622541/files/junbi8.pdf> (2013年9月30日閲覧).
- 久内清孝. 1941. 採摭餘錄(其十三). 植物研究雑誌 17: 541–555.
- 北海道. 2004. 北海道の外来種リスト, 北海道のブルーリスト 2004. <http://bluelist.ies.hro.or.jp/uploadfiles/hokkaido-bluelist2004.pdf> (2013年9月27日閲覧)
- . 2010. 北海道の外来種リスト, 北海道のブルーリスト 2010. <http://bluelist.ies.hro.or.jp/uploadfiles/hokkaido-bluelist2010.pdf> (2013年9月27日閲覧)
- 五十嵐博. 2001. 北海道帰化植物便覧, 2000年版. 15 pls. + 195 pp. 北海道野生植物研究所, 札幌.
- Inoue, Y., Tsubota, H., Kubo, H., Uchida, S., Mukai, S., Shimamura, M. & Deguchi, H. 2011. A note on *Pottia intermedia* (Turner) Fürnr. (Pottiaceae, Bryopsida) with special reference to its phylogeny and new localities in SW Japan. Hikobia 16: 67–78.
- Katoh, K. & Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30: 772–780.
- 建設省福山工事事務所. 1978. 芦田川の植生. 187 pp. 建設省福山工事事務所, 福山.
- Kocher, T. D. & White, T. J. 1992. Evolutionary analysis via PCR. In Erlich, H. A. (ed.), PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, pp. 137–147. Oxford University Press, New York.
- 国土交通省. 2007. 河川環境データベース. <http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/index.html> (2013年9月30日閲覧).
- 久保晴盛・長谷信二・武内一恵・坪田博美. 2010. 広島県の帰化植物 1. セイタカハハコグサ. 宮島自然植物実験所ニュースレター 15: 11–12.
- ・坪田博美・武内一恵・上村恭子・山下容富子・吉野由紀夫. 2011. 広島県の帰化植物 2. シャグマハギ. 宮島自然植物実験所ニュースレター 19: 3–4.
- Manhart, J. R. 1994. Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences. Mol. Biol. Evol. 3: 114–127.
- Masuzaki, H., Shimamura, M., Furuki, T., Tsubota, H., Yamaguchi, T., Haji Mohamed Abdul Majid & Deguchi, H. 2010. Systematic position of the enigmatic liverwort

- Mizutania* (Mizutaniaceae, Marchantiophyta) inferred from molecular phylogenetic analyses. *Taxon* 59: 448–458.
- 三上幸三. 2002. 植物に寄生して50年. 246 pp. 博新館, 広島.
- Nakahara, M., Handa, S., Watanabe, S. & Deguchi, H. 2004. *Choricystis minor* as a new symbiont of simultaneous two-species association with *Paramecium bursaria* and implications for its phylogeny. *Symbiosis* 36: 127–151.
- 中井秀樹. 2003. アブラナ科 Cruciferae (Brassicaceae). 清水建美 (編), 日本の帰化植物, pp. 80–96. 平凡社, 東京.
- 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.
- 長田武正. 1972. 日本帰化植物圖鑑. v + 254 pp. 北隆館, 東京.
- 関太郎. 1980. ヒコビア植物採集会の近況. *Hikobia* 8: 449–463.
- ・中西弘樹・鈴木兵二・堀川芳雄. 1975. 嶺島(宮島)の維管束植物. 天然記念物弥山原始林・特別名勝嶺島緊急調査委員会 (編), 嶺島の自然, pp. 221–332, pls. 42–43. 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.
- 清水建美・濱崎恭美. 2006. 都道府県別帰化植物分布表. 近田文弘・清水建美・濱崎恭美 (編), 帰化植物を楽しむ, pp. 165–237. トンボ出版, 大阪.
- 清水矩宏・森田弘彦・廣田伸七. 2001. 日本帰化植物写真図鑑. 554 pp. 全国農村教育協会, 東京.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinform.* 22: 2688–2690.
- Suzuki, T., Inoue, Y., Tsubota, H. & Iwatsuki, Z. 2013. Notes on *Aptychella* (Sematophyllaceae, Bryopsida): *Yakushimabryum longissimum*, syn. nov. *Hattoria* 4: 107–118.
- 太刀掛優. 1982. 広島県の帰化植物. 日本生物教育会広島大会「広島の生物」編集委員会, 広島の生物, pp. 113–126. 第一法規出版中国支社, 広島.
- . 1999. 広島県呉市植物誌. xix + 334 pp. 比婆科学教育振興会, 庄原.
- . 2010. 広島県呉市維管束植物目録. 238 pp. 比婆科学教育振興会, 庄原.
- ・中村慎吾 (編). 2007. 改訂増補帰化植物便覧. 676 pp. 比婆科学教育振興会, 庄原.
- 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.
- 坪田博美・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. [Tsubota, H. & Arikawa, T. 2011. Molecular phylogenetic inference. In The 40th Anniversary Commemorative Publication Committee (ed.), Methods in Bryological Research, newly revised edition. The Bryological Society of Japan, Higashi-hiroshima (in Japanese).]
- ・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. [Tsubota, H., Kubo, H. & Mukai, S. 2009. A new finding of seagrass *Halophila nipponica* J.Kuo (Hydrocharitaceae) from Miyajima Island in Hiroshima Prefecture, SW Japan. *Hikobia* 15: 339–347 (in Japanese with English abstract).]
- ・———・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. トゲデシシャとマルバトゲデシシャ. *Hikobia* 16: 197–202. [Tsubota, H., Kubo, H., Takeuchi, K., Nakahara-Tsubota, M., Inoue, Y., Uchida, S. & Mukai, S. 2012. Notes on naturalized plants in Hiroshima Prefecture: 3. New locality and nrITS variation of *Lactuca serriola* L. (Asteraceae). *Hikobia* 16: 197–202 (in Japanese with English abstract).]
- Tsubota, H., Nakao, N., Arikawa, T., Yamaguchi, T., Higuchi, M., Deguchi, H. & Seki, T. 1999. A preliminary phylogeny of Hypnales (Musci) as inferred from chloroplast rbcL sequence data. *Bryol. Res.* 7: 233–248.
- , ———, Yamaguchi, T., Seki, T. & Deguchi, H. 2000. Preliminary phylogenetic relationships of the genus *Brotherella* and its allied genera (Hypnales, Musci) based on chloroplast rbcL sequence data. *J. Hattori Bot. Lab.* 88: 79–99.
- , Akiyama, H., Yamaguchi, T., & Deguchi, H. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Trismegistia* and related genera (Sematophyllaceae, Musci) based on chloroplast rbcL sequences. *Hikobia* 13: 529–549.
- 植村修二. 2012. 帰化植物とつきあうにはなにが大事なのか—特に近畿地方における帰化植物の分布の動態、現状と関連して—. *雑草研究* 57: 36–45.

- ・勝山輝男・清水矩宏・水田光雄・森田弘彦・廣田伸七・池原直樹. 2010. 日本帰化植物写真図鑑, 第2巻. 579 pp. 全国農村教育協会, 東京.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninskey, J. J. & White, T. J. (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pp. 315–322. Academic Press, Inc., San Diego.
- 吉田多美枝・城川四郎. 2001. アブラナ科 Brassicaceae (Cruciferae) 神奈川県植物誌調査会, 神奈川県植物誌 2001, pp. 747–778. 神奈川県立生命の星・地球博物館, 小田原.
- 吉野由紀夫・太刀掛優・関太郎. 2007. 広島県における外来植物の現状とその問題点. 比婆科学 224: 1–18.
- Zwickl, D. J. 2011. GARLI download page project Web site at https://www.nescent.org/wg_garli/ (2013年10月2日閲覧).

2013年10月17日受理

Appendix A. Specimens examined.

Sisymbrium orientale L., Sp. Pl.: 666, 1753; Figs. 1–6 & 9.

Japanese name: Inu-kakine-garashi.

JAPAN, Honshu, Hiroshima Pref.: Onomichi-shi, Higashikubo: *Y. Kameda sf-5946* in hb. HIRO-MY 79553 (19 March 1996, HIRO-MY), DNA voucher for accession number AB856332 for nr ITS region; **Mihara-shi, Itozaki:** *H. Kubo s.n.* in hb. HIRO-MY 44043–44046 (17 April 2011, HIRO-MY); **Higashi-hiroshima-shi, Saijo:** *H. Kubo s.n.* in hb. HIRO-MY 33798–33805 (29 May 2010, HIRO-MY); **Hiroshima-shi, Aki-ku, Kamiseno:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 24119–24121 (9 May 2008, HIRO-MY); **ibid., Minami-ku, Shinonome:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 24008, 24009 (18 April 2008, HIRO-MY), *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 24117 (14 May 2008, HIRO-MY); **ibid., Higashikasumi:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 24330, 24331, 48719 (18 April 2008, HIRO-MY), *H. Kubo s.n.* in hb. HIRO-MY 44848 (6 July 2010, HIRO-MY); **ibid., Honura:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 44711 (25 March 2011, HIRO-MY); **ibid., Ujina-kaigan:** *K. Mikami s.n.* in hb. HIRO-MY 67554, 67555 (8 May 1991, HIRO-MY), *K. Mikami s.n.* in hb. HIRO-MY 31572 (17 April 1994, HIRO-MY); **ibid., Ujina:** *K. Mikami s.n.* in hb. HIRO-MY 33735 (May 1974, HIRO-MY), *T. Seki s.n.* in hb. HIRO-MY 63324, 63326, 63327 (11 April 1987, HIRO-MY); **ibid., Naka-ku, Kokutaiji:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 24124 (14 May 2008,

HIRO-MY); **ibid., Higashisenda:** *T. Takagi tt-5579* in hb. HIRO-MY 40137 (as *S. officinale*, 7 May 1934, HIRO-MY); **ibid., Nishi-ku, Minamikanon:** *H. Kubo s.n.* in hb. HIRO-MY 33736, 33737 (8 May 2010, HIRO-MY); **ibid., Shokosenta:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 33391–33393 (27 April 2010, HIRO-MY); **ibid., Saeki-ku, Itsukaichi:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 77611 (25 June 2013, HIRO-MY), DNA voucher for accession numbers AB856328 for cp *rbcL* gene and AB856329 for nr 18S rRNA gene and ITS region; **ibid., Sendo:** *K. Takeuchi s.n.* in hb. HIRO-MY 34447 (26 April 2010, HIRO-MY); **ibid., Ishiuchi:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 25684 (25 June 2009, HIRO-MY), *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 33456, 33457 (11 May 2010, HIRO-MY); **Hatsukaichi-shi, Sagata:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 24125 (14 May 2008, HIRO-MY); **ibid., Shimohera:** *H. Kubo s.n.* in hb. HIRO-MY 33738 (8 May 2010, HIRO-MY); **ibid., Jigozen-kita:** *H. Kubo s.n.* in hb. HIRO-MY 33740 (8 May 2010, HIRO-MY); **ibid., Miyajima-guchi:** *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 25527 (13 June 2009, HIRO-MY).

Sisymbrium officinale (L.) Scop., Fl. Carniol. (ed. 2) 2: 26, 1772; Figs. 7 & 10.

Japanese name: Kakine-garashi.

JAPAN, Honshu, Hiroshima Pref.: Fukuyama-shi: *T. Someya s.n.* in hb. HIRO-MY 76880, 77097 (30 June 1993, HIRO-MY), *A. Ezuka 1730* (as *S. orientale*, 29 April 1981, Herbarium in National Institute for Agro-Environmental Sciences [NIAES], Tsukuba, Japan), DNA voucher for accession number AB856333 for nr ITS region; **ibid., Kusado:** *S. Fuji sf-84* in hb. HIRO-MY 79552 (30 April 1954, HIRO-MY); **ibid., Gobun:** *T. Seki s.n.* in hb. HIRO-MY 64825 (as *S. orientale*, 12 May 1985, HIRO-MY); **ibid., Kusagi:** *T. Seki s.n.* in hb. HIRO-MY 65077 (10 July 1987, HIRO-MY); **Hiroshima-shi, Higashi-ku, Fukuda:** *K. Matsui 10936* in hb. HIRO-MY 57403 (15 May 2005, HIRO-MY), DNA voucher for accession number AB856330 for nr ITS region; **ibid., Nishi-ku, Misasakita:** *Y. Nakamura Otagawa-10* in hb. HIRO-MY 34683 (23 April 2002, HIRO-MY).

Sisymbrium irio L., Sp. Pl. 2: 659, 1753; Figs. 8 & 11.

Japanese name: Hosoe-garashi.

Japan, Honshu, Hiroshima Pref.: Hiroshima-shi, Saeki-ku, Itsukaichi: *H. Tsubota s.n.* in hb. HIRO-MY 77612 (26 June 2013, HIRO-MY), DNA voucher for accession number AB856331 for nr ITS region.

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

Reagents and solutions

- Extraction buffer: TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

Protocol

This protocol is for DNA isolation using small quantities of materials, and a modification of the simple chloroform method devised by Tsubota *et al.* (2009), Tsubota and Arikawa (2011) and Suzuki *et al.* (2013). The method consists of the following steps:

- Pick up a small amount of leaf (ca. 2–2 mm²) under a dissecting microscope [Note 1].

- Grind the lamina with 30 µl extraction buffer (TE or TE20 buffer; see recipe, above) using a polypropylene pestle in a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add 200–400 µl of extraction buffer (TE not TE20) and mix gently [Note 2].
- Centrifuge the tubes at 10,000 g for 30 sec at 4°C.
- Transfer the aqueous upper phase to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.

Notes

- Samples larger than 2–2 mm² are not suitable for this procedure.
- A total amount of the solution should add up to 200–450 µl.

Appendix C. Sequences (5'-3') of synthetic primers used for PCR amplification and sequencing of the nr 18S rRNA gene and ITS regions in the present study.

Primers	Sequence (5'-3')	References	Target	Note
Forward				
18S1Fh	AACCTGGTT ATCCTGCC	Nakahara <i>et al.</i> (2004)	18S rDNA	PCR
18S410	CCACATCCAA GGAAGGCAGC	Handa <i>et al.</i> (2003)	18S rDNA	Sequencing
18S921	GAAAGACGAA CTACTGCAG	Handa <i>et al.</i> (2003)	18S rDNA	Sequencing
18S1421	CAGGTCCTGTG ATGCCCTTAG A	Nakahara <i>et al.</i> (2004)	18S rDNA	Sequencing
18S1659B	CGTCGCTCT ACCGATTG	Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	PCR
18S1764B	AGAGGAAGGA GAAGTCGTA C	Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	Sequencing
18SrDNAHTF1	AAAGTTTCCG TAGGTGAACC TGC	Tsubota <i>et al.</i> (2012)	ITSs	PCR, sequencing
18srRNA	TCCGTAGTG AACCTGCGG	Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	Sequencing
5.8S43H	GAAGAACGTA CGCAATGCG A	Tsubota <i>et al.</i> (2009)	ITSs	PCR, sequencing
5.8S51HV	TAGGGAAATG CGATACTTGG	Present study ¹	ITSs	Sequencing
5.8S114HV	AGTTGCGCCC GAAGC	Present study ¹	ITSs	Sequencing
Reverse				
26S166BR	GAGGACGCC TTCCAGACTA C	Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	PCR
26S102BR	CCGGTTCGCT CGCCG	Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	Sequencing
25srRNA	TCCCTCCCTT AGTGATATGC	Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	Sequencing
26SrDNAHTR1	AAGGGAATCC TTGTAAGTTT CT	Tsubota <i>et al.</i> (2012)	ITSs	PCR, sequencing
26SrDNAHTR2	AAGTTCTTT TCCTCCGCTT A	Tsubota <i>et al.</i> (2012)	ITSs	PCR, sequencing
5.8S124HR	CGGGCGAAC TTGGTTCA	Tsubota <i>et al.</i> (2009)	ITSs	PCR, sequencing
5srRNAR	CGCTGCGTTC TTCATCGT	Handa <i>et al.</i> (2003); Oguri <i>et al.</i> (2003)	ITSs	Sequencing
18S3Rh	TGATCCTCT GCAGGTT	Nakahara <i>et al.</i> (2004)	18S rDNA	PCR
18S1442R	TCTAAGGGCA TCACAGAC	Handa <i>et al.</i> (2003)	18S rDNA	Sequencing
18S909R	CCAAGAATT CACCTCTGAC	Handa <i>et al.</i> (2003)	18S rDNA	Sequencing
18SNS2	GGCTGCTGG ACCAGACTT C	White <i>et al.</i> (1990); Kocher & White (1992)	18S rDNA	Sequencing

The numbers within the primer name correspond to rough positions from 5' end in the 18S rRNA gene of *Chlorella vulgaris* (X13688) and the 5.8S rRNA gene of *Chlamydomonas tetragama* (AB004866). ¹Designed by H. Tsubota for bryophytes.

Appendix D. Sequences (5'-3') of synthetic primers used for PCR amplification and sequencing of the cp *rbcL* gene in the present study.

Forward primers	Sequence	References	Note
rbcL-130	ACAATGATAC TGTTTGTAT AG	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	PCR
HrL1	ATGTCACCA AAACGGAGAC TAAAGCAGG	Masuzaki <i>et al.</i> (2010)	PCR, sequencing
rbcL7	TGGATTAAA GCTGGTGTAA AAG	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
rbcL549	TGTCTTCGTG GTGGAC	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
rbcL862	CAATGCATGC AGTTATTGAC	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
rbcL921G	GGTATGCATT TCCGTGTATT AGC	Tsubota <i>et al.</i> (2001)	Sequencing
rbcL1117	GGTATTGATG TTTGGC	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
Reverse primers			
HrL260R	ATATCATAGC ATCGACCTTT GTAACGATC	Inoue <i>et al.</i> (2011) ¹	Sequencing
rbcL600R	GTGAAATCAA GTCCACCACG	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
rbcL650Rmas	CGATCTCTCC AACCCA	Masuzaki <i>et al.</i> (2010)	Sequencing
rbcL804hR	TGCAGTAAAAA CCACCTG	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
rbcL1145R	TTAATGCTGG CATATGCCAA AC	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	Sequencing
rbcL1301RL	CTTCATTACG TGCTTGAC CAAGCTTCTA	Inoue <i>et al.</i> (2011)	PCR, sequencing
trnRn	GGGTTAGAAC GGATTCGAAC CCTTGAC	Manhart (1994); Tsubota <i>et al.</i> (1999)	PCR
zfpA546R	ATGATATCCA CATTCTTCAC A	Tsubota <i>et al.</i> (1999)	PCR

The numbers within the primer name correspond to rough positions from 5' end in the *rbcL* gene of *Marchantia polymorpha* (X04465). ¹The first appearance of this primer was in Table 1 of Inoue *et al.* (2011), and the footnote in Inoue *et al.* (2011) should be requested to make the corrections as the following: correct: “(published here)” and incorrect: “published by Masuzaki *et al.* (2010)”.