

線虫DNA分析における 染色剤の影響について

石黒 健太郎・濱治 良彬

1. はじめに

線形動物門（以下、線虫とする）とは、水域のみならず、土壌中や動植物に寄生するものまで、地球上のほぼ全ての環境に見いだされる、きわめてよく繁栄している動物群の一つである（吉村，1995）。海域のメイオベントスとして一般的に優占する海産自由生活性線虫は、現在までに約 5500 種が知られ、ミクロな底質環境の多様度および現存量に大きく寄与している。体サイズは通常 0.2-2 mm と小さく、基本構造が似通っているため分類同定が非常に困難であり、生態的な研究が進んでいない（Smol *et al.*, 2020）。そのため、迅速に種の同定が可能な DNA 分析を用いた研究が進められている（辻野，2013; 辻野ら，2014; 辻野ら，2022）。

線虫を含むメイオベントス（一般的に 1 mm のふるいをすり抜け、32 ~ 63 μm のふるいに留まる小型底生生物を指す）はその大きさから、検鏡以前に砂粒やゴミと生物をより分けることができないため、ローズベンガルにて有機物を染色してからソーティングする手法が伝統的に用いられてきた。当社のメイオベントス分析もこれに倣い、ローズベンガル染色したサンプルを用いて分析している。一方で、DNA 分析において、ローズベンガル染色がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を阻害することが報告されている（Fonseca & Fehlaue-Ale, 2012; Srivastava & Modak, 1983）。このため当社では、DNA 分析に供する線虫などの検体をソーティングする際には染色せずに抽出しており、検体を染色した場合に比べてより多くの抽出時間を要している。

そこで本研究では、DNA 分析に供する線虫の抽出時間の短縮を目的に、Srivastava & Modak (1983) の実験で PCR 反応を阻害したローズベンガル添加量 (0.0101764 g/L) よりも低濃度のローズベンガルを用いるのに加え、底生生物の染色・PCR 反応に影響がないと報告されているエオシン Y とメチルグリーンも用いて（Williams, 1974; Murase *et al.*, 2000）、線虫に対する PCR 反応を阻害しない染色剤の使用条件を検討した。

2. 調査方法

2.1 試料採取

調査は 2023 年 4 月 20 日、愛知県知多半島師崎沖において実施した（図 1: 緯度 34°44′05.8″、経度 136°59′26.5″）。試料はスミス・マッキンタイヤ型採泥器を用いて採取した。採取した底泥は船上にて 5%DESS 保存液（Melissa *et al.*, 2006）で満たされた 100 ml 軟膏ビンに入れ、ふるい処理まで 1 週間冷蔵保存した。冷蔵した試料はふるい目 500 μm と 32 μm でふるい分けた。32 μm メッシュ上の残留物を LUDOX®HS-40 コロイドシリカ（Sigma-Aldrich）による密度勾配遠心に供し、生物を主体として微細な砂粒子や懸濁物が混在する上澄みと重い砂粒などの沈殿物に分離させた。



図 1 調査場所（愛知県知多半島師崎沖）

2.2 染色および PCR

遠心濃縮した上澄みの中から、実体顕微鏡下で針を用いて線虫を無作為に 8 検体ずつ各染色剤に分取し、冷蔵で 24 時間静置した。使用した染色剤と濃度の検体を表 1 に示す。

静置後の試料は蒸留水で十分に洗浄し、10 倍希釈した 10 × Ex Taq Buffer (Takara Bio) を 10 μL ずつ分注した PCR チューブに 1 検体ずつ浸漬した。その後、Proteinase K (Takara Bio) を加えてタンパク質を溶解し、GeneReleaser (BioVentures) を用いて DNA を抽出した。

抽出したDNAを用いて、安定的にDNAを増幅すると評価されている核DNAの18S rRNA領域の一部（約650bp）をPCR反応により増幅した。プライマーはMN18F（5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3'）およびNem_18S_R（5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3'）を用いた（Bhadury *et al.*, 2006）。

表1 使用した染色剤とその濃度の検体

染色剤	濃度(g/L)	検体数	検体名
無染色	-	8	NC.1~8
ローズベンガル	0.0005	8	R.0005.1~8
エオシンY	5	8	E.5.1~8
	0.5	8	E.05.1~8
	0.05	8	E.005.1~8
メチルグリーン	5	8	M.5.1~8
	0.5	8	M.05.1~8
	0.05	8	M.005.1~8

反応酵素にはPremix Ex Taq Hot Start Version（Takara Bio）を用い、PCR反応溶液として、Premix ExTaq Hot Start Version（5 units/μL, Takara Bio）12.5 μL、プライマー組（10 pmol/μL）各0.25 μL、テンプレートDNA 4.0 μL、DW 8.0 μLの総量25 μLを調整した。PCR条件は、94℃で2分の初期熱変性の後、94℃30秒の熱変性→57℃30秒のアニーリング→72℃60秒の伸長反応のサイクルを37回繰り返し、最後に72℃で10分間の伸長反応を行い、これをPCR産物とした。

PCR産物はExoSAP-IT（Thermo Fisher Scientific）を用いて、酵素反応処理による精製を行った。Dye Terminator反応はフォワードプライマーを鋳型にBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。残留蛍光色素の除去はBigDye XTerminator Purification Kit（Thermo Fisher Scientific）で行った後、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer（Thermo Fisher Scientific）を用いてシーケンスを行った。シーケンスにて得られた塩基配列は、米国の国立生物工学情報センター（NCBI）が運営する相同性検索プログラム（NCBIが蓄積するDNAデータベース「GenBank」から、相同性が見られる生物種の既知配列を検索できるプログラム）であるNCBI Nucleotide BLAST

（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）を用いて相同性検索を実施した。

3. 結果

染色した線虫は無染色時よりも視認性が向上した（図2）。ローズベンガルの染色条件は0.0005 g/Lと従来の分析で用いる濃度（0.01 g/L以上）と比べて低濃度であったが、視認性は良好であった。また、メチルグリーンの3条件で染色した線虫は他の染色剤よりも濃く、青色に染色された。

塩基配列は、無染色では6/8検体、ローズベンガルでは7/8検体、エオシンYでは5/8～8/8検体、メチルグリーンでは5/8検体の割合で、全64検体のうち49検体から取得することができた（表2）。なお、49検体のうち種まで同定できたのは9検体、属まで同定できたのは22検体、科まで同定できたのは17検体、門まで同定できたのは1検体だった（付表1）。

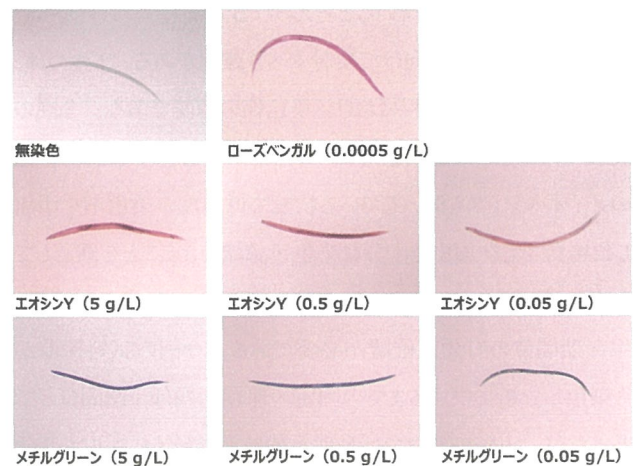


図2 各条件で染色した線虫の検鏡写真

表2 線虫から塩基配列を取得できた検体数

染色剤	濃度(g/L)	塩基配列取得検体数	検体名
無染色	-	6/8	NC.1~8
ローズベンガル	0.0005	7/8	R.0005.1~8
エオシンY	5	8/8	E.5.1~8
	0.5	5/8	E.05.1~8
	0.05	8/8	E.005.1~8
メチルグリーン	5	5/8	M.5.1~8
	0.5	5/8	M.05.1~8
	0.05	5/8	M.005.1~8

4. 考察

本実験の結果から、ソーティング時の視認性について、いずれの染色剤、濃度で染色した検体でも容易に線虫を認識することができた。但し、濃青色に染色されるメチルグリーンは、光を透過せず黒く見える非生物が混在する場合には識別が困難になる可能性がある。また、どの染色条件においても5/8以上の検体から塩基配列を取得でき、無染色の場合と比べて明瞭な差はみられなかったことから、DNA分析への染色の影響はなかったと判断した。価格面では、ローズベンガルは6,600円、エオシンYは5,000円、メチルグリーンは80,800円（いずれも25 gあたりの価格、富士フィルム和光純薬株式会社製）であり、メチルグリーンを使用した分析では費用が高額になるため、分析には不向きである。危険性においては、エオシンYは強い眼刺激を有するため、取り扱いに注意が必要である。このため本実験の条件では、視認性が良く、DNA分析時に阻害影響が少ない、なおかつ価格が抑えられ人体への安全性がより高い、低濃度ローズベンガルが線虫DNA分析に用いる染色剤として最も適していると考えられる。

しかし、実用化に向けて検討すべき課題がある。1つめは、通常分析と同様の過程における染色性の確認である。今回の実験では線虫のみを染色剤に分取したが、砂粒や懸濁物、他のメイオセントスも混入している状態で低濃度の染色剤を添加した場合でも、線虫を十分に染色・認識できることを確認しておく必要がある。2つめに、実際の調査で想定できる固定・保存期間での有効性確認が必要である。今回の試料採取から染色し分析に供するまでの固定・保存期間は1週間ほどであったが、実際の調査では長期乗船航海など試料採取から分析まで1～2ヵ月間固定・保存した後に染色し、DNA分析を行うことが想定されるため、固定・保存期間が長期化しても染色剤の視認性やDNA分析結果に影響がないことを確認したい。3つめに、今回の実験での塩基配列取得率は5/8～8/8であったが、貴重な試料から確実にDNA情報を取得し質の良い分析データを提供するためには、DNA抽出法やPCRに用いる試薬を検討し、塩基配列取得率を向上させる必要がある。

また、相同性検索結果から種まで同定できたのは9検体に留まり、40検体が属以上の上位分類群と推定された。この理

由として、分析によって取得された塩基配列と相同性が高い（塩基配列が近い）種がデータベースに登録されていないため、上位分類群までの推定となったことが考えられる。今後、DNA分析による線虫の種同定の精度を高めるためには、データベースの整備が望まれる。

参考文献

- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D. T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D. and Smerdon, G. R. 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*, 320: 1-9.
- Fonseca, G. and Fehlaue-Ale, K. H. 2012. Three in one: fixing marine nematodes for ecological, molecular, and morphological studies. *Limnology and Oceanography*, 10(7): 516-523.
- Murase, T., Inagaki, H. and Eimoto, T. 2000. Influence of histochemical and immunohistochemical stains on polymerase chain reaction. *Modern Pathology*. 13: 147-151.
- Smol, N., Bezerra, T. N. and Decraemer, W. 2020. Nematoda. In: Schmidt-Rhaesa, A. (ed.), *Guide to the Identification of Marine Meiofauna*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil. 331.
- Srivastava, S. K., and M. J. Modak. 1983. Rose Bengal mediated inhibition of DNA polymerases: mechanism of inhibition of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase under photooxidative conditions. *Biochemistry* 22: 2283-2288.
- 辻野 陸. 2013. メイオベントスを用いた多様性評価手法の開発. 独立行政法人水産総合研究センター. 91-97.
- 辻野 陸・三好達夫・内田基晴. 2014. 18SrRNA 遺伝子による広島湾潮間帯における海産自由生活性線虫類の遺伝的解析. *日本水産学会*. 80: 16-20.
- 辻野 陸・内田基晴・手塚尚明・高田宜武. 2022. 全国のアサリ漁場干潟における線虫類の科組成の特徴. *日本水産学会*. 84: 284-293.
- Williams, G. E. III. 1974. New technique to facilitate handpicking macrobenthos. *Transections of American Microscopical Society*. 93: 220-226.
- 吉村克生. 1995. 線形動物門. In: 西村三郎 (編). *原色検索 日本海岸動物図鑑 [I]*. 保育社. 212.

付表 相同性検索結果①

染色剤	濃度	検体名	遺伝子解析による結果					遺伝子解析から可能性が高いと考えられる種
			候補種	学名	Accession No.	クエリー (%)	塩基配列の一致率 (%)	学名
無染色	-	NC.2	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250053.1	100	99.51	<i>Sabatieria</i> sp. 5
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250136.1	100	99.67	
		NC.3	候補種1	<i>Daptonema oxyerca</i>	MG669720.1	100	94.94	<i>Daptonema</i> sp.
			候補種2	<i>Daptonema oxyerca</i>	AY854225.1	99	92.14	
			候補種3	<i>Daptonema</i> sp.	KX944133.1	99	92.31	
		NC.4	候補種1	<i>Mesacanthion</i> sp.	MG599064.1	100	96.58	<i>Mesacanthion</i> sp.
			候補種2	<i>Mesacanthion</i> sp.	MG599063.1	100	96.58	
		NC.5	候補種1	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388484.1	98	92.43	<i>Rhabdodemanina</i> sp.
			候補種2	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388485.1	98	92.27	
		NC.7	候補種1	<i>Paracomesoma</i> sp.	MK626827.1	98	95.85	<i>Paracomesoma</i> sp.
			候補種2	<i>Paracomesoma</i> cf. <i>elegans</i>	MK626821.1	98	95.85	
			候補種3	<i>Paracomesoma</i> cf. <i>elegans</i>	MK626782.1	98	95.85	
		NC.8	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 2	LT577968.1	100	98.20	<i>Sabatieria</i> sp.
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp.	OR381575.1	100	98.20	
ローズベンガル	0.0005 g/L	R.0005.1	候補種1	<i>Dichromadora major</i>	OR479911.1	100	99.67	<i>Chromadoridae</i>
			候補種2	<i>Chromadoridae</i> sp. 6	MN250134.1	100	99.51	
		R.0005.2	候補種1	<i>Microlaimus honestus</i>	MG669885.1	100	96.24	<i>Microlaimus</i> sp.
			候補種2	<i>Microlaimus</i> sp.	OL388479.1	100	95.43	
			候補種3	<i>Microlaimus</i> sp.	OL388481.1	100	95.59	
			候補種4	<i>Microlaimus korari</i>	OK317206.1	100	91.12	
		R.0005.3	候補種1	<i>Robbea hypermnestra</i>	Y16921.1	99	94.47	<i>Desmodoridae</i>
			候補種2	<i>Spirinia</i> sp.	KX944162.1	100	94.93	
		R.0005.5	候補種1	<i>Spirinia elongata</i>	EF527426.1	98	92.78	<i>Desmodoridae</i>
			候補種2	<i>Robbea hypermnestra</i>	Y16921.1	100	93.75	
		R.0005.6	候補種1	<i>Parodontophora fluviatilis</i>	MK626776.1	100	99.01	<i>Parodontophora fluviatilis</i>
			候補種2	<i>Parodontophora fluviatilis</i>	MK626774.1	100	99.01	
		R.0005.7	候補種1	<i>Xyalidae</i> sp. 2	MN250076.1	99	97.88	<i>Xyalidae</i> sp. 2
		R.0005.8	候補種1	<i>Southerniella</i> sp.	OL388447.1	100	98.19	<i>Southerniella</i> sp.

※Accession No. はデータベースに登録されている塩基配列の世界共通の登録番号である

付表 相同性検索結果②

染色剤	濃度	検体名	遺伝子解析による結果					遺伝子解析から可能性が高いと考えられる種
			候補種	学名	Accession No.	クエリー (%)	塩基配列の一致率 (%)	学名
エオシンY	5 g/L	E.5.1	候補種1	<i>Dichromadora major</i>	OR479911.1	100	99.67	Chromadoridae
			候補種2	<i>Chromadoridae</i> sp. 6	MN250134.1	100	99.51	
		E.5.2	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 2	LT577968.1	100	98.20	<i>Sabatieria</i> sp.
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp.	OR381575.1	100	98.20	
		E.5.3	候補種1	<i>Robbea hypermnestra</i>	Y16921.1	100	94.63	Desmodoridae
			候補種2	<i>Spirinia</i> sp.	KX944162.1	100	95.10	
		E.5.4	候補種1	<i>Daptonema oxycerca</i>	MG669720.1	100	94.94	Xyalidae
			候補種2	<i>Daptonema procerum</i>	OR591015.1	100	94.94	
			候補種3	<i>Zygonemella striata</i>	KC920423.1	98	94.71	
			候補種4	<i>Daptonema</i> sp.	EF436228.1	98	94.55	
		E.5.5	候補種1	<i>Prochaetosoma</i> sp.	KX944156.1	99	98.02	<i>Prochaetosoma</i> sp.
		E.5.6	候補種1	<i>Daptonema oxycerca</i>	MG669720.1	100	94.94	Xyalidae
			候補種2	<i>Daptonema procerum</i>	OR591015.1	100	94.94	
			候補種3	<i>Daptonema procerum</i>	OR591014.1	100	94.94	
			候補種4	<i>Zygonemella striata</i>	KC920423.1	98	94.71	
		E.5.7	候補種1	<i>Daptonema</i> sp.	EF436228.1	98	94.55	
			候補種2	<i>Actinonema celtica</i>	MG669665.1	97	97.05	
		E.5.8	候補種1	<i>Paracanthochus macrodon</i>	OQ396718.1	100	98.69	<i>Paracanthochus macrodon</i>
	0.5 g/L	E.05.1	候補種1	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388484.1	98	92.59	<i>Rhabdodemanina</i> sp.
			候補種2	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388485.1	98	92.42	
		E.05.2	候補種1	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388484.1	98	92.59	<i>Rhabdodemanina</i> sp.
			候補種2	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388485.1	98	92.42	
		E.05.3	候補種1	<i>Paracanthochus macrodon</i>	OQ396718.1	100	98.69	<i>Paracanthochus macrodon</i>
		E.05.5	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250053.1	100	99.67	Comesomatidae
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250136.1	100	99.84	
			候補種3	<i>Dorylaimopsis</i> sp.	MN250135.1	100	99.84	
		E.05.6	候補種1	<i>Axonolaimus arcuatus</i>	OQ396725.1	100	99.34	<i>Axonolaimus arcuatus</i>
	0.05 g/L	E.005.1	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250053.1	100	99.67	Comesomatidae
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250136.1	100	99.84	
			候補種3	<i>Dorylaimopsis</i> sp.	MN250135.1	100	99.84	
			候補種4	<i>Dorylaimopsis</i> sp.	MN250135.1	100	99.84	
		E.005.2	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 2	LT577968.1	100	98.20	<i>Sabatieria</i> sp.
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp.	OR381575.1	100	98.20	
		E.005.3	候補種1	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388484.1	98	92.59	<i>Rhabdodemanina</i> sp.
			候補種2	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388485.1	98	92.42	
		E.005.4	候補種1	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388484.1	98	92.42	<i>Rhabdodemanina</i> sp.
			候補種2	<i>Rhabdodemanina</i> sp.	OL388485.1	98	92.26	
		E.005.5	候補種1	<i>Daptonema oxycerca</i>	MG669720.1	100	94.94	Xyalidae
			候補種2	<i>Daptonema procerum</i>	OR591015.1	100	94.94	
			候補種3	<i>Zygonemella striata</i>	KC920423.1	98	94.71	
			候補種4	<i>Daptonema</i> sp.	EF436228.1	98	94.55	
		E.005.6	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250053.1	100	99.67	Comesomatidae
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250136.1	100	99.84	
			候補種3	<i>Dorylaimopsis</i> sp.	MN250135.1	100	99.84	
		E.005.7	候補種1	<i>Sphaerolaimus hirsutus</i>	MG670014.1	99	95.79	<i>Sphaerolaimus</i> sp.
			候補種2	<i>Sphaerolaimus hirsutus</i>	MG670015.1	99	95.79	
			候補種3	<i>Sphaerolaimus</i> sp.	KX944161.1	99	95.46	
		E.005.8	候補種1	<i>Daptonema oxycerca</i>	MG669720.1	100	94.94	Xyalidae
			候補種2	<i>Daptonema procerum</i>	OR591015.1	100	94.94	
			候補種3	<i>Zygonemella striata</i>	KC920423.1	98	94.71	
			候補種4	<i>Daptonema</i> sp.	EF436228.1	98	94.55	

※Accession No. はデータベースに登録されている塩基配列の世界共通の登録番号である

付表 相同性検索結果③

染色剤	濃度	検体名	遺伝子解析による結果					遺伝子解析から可能性が高いと考えられる種
			候補種	学名	Accession No.	クエリー(%)	塩基配列の一致率(%)	学名
メチルグリーン	5g/L	M.5.1	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250053.1	100	99.67	Comesomatidae
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp. 5	MN250136.1	100	99.84	
			候補種3	<i>Dorylaimopsis</i> sp.	MN250135.1	100	99.84	
		M.5.2	候補種1	<i>Synonchus</i> sp.	MG670036.1	99	97.86	Enoplida
			候補種2	<i>Oncholaimus</i> aff.	MG669902.1	99	97.86	
			候補種3	<i>Oncholaimus</i> aff.	MG669901.1	99	97.86	
		M.5.4	候補種1	<i>Sabatieria</i> sp. 2	LT577968.1	100	98.20	<i>Sabatieria</i> sp.
			候補種2	<i>Sabatieria</i> sp.	OR381575.1	100	98.20	
		M.5.6	候補種1	<i>Axonolaimus arcuatus</i>	OQ396725.1	100	99.34	<i>Axonolaimus arcuatus</i>
		M.5.7	候補種1	<i>Daptonema oxycerca</i>	MG669720.1	100	94.94	Xyalidae
			候補種2	<i>Daptonema procerum</i>	OR591015.1	100	94.94	
			候補種3	<i>Zygonemella striata</i>	KC920423.1	98	94.71	
			候補種4	<i>Daptonema</i> sp.	EF436228.1	98	94.55	
	0.5g/L	M.05.1	候補種1	<i>Southerniella</i> sp.	OL388447.1	100	97.86	<i>Southerniella</i> sp.
		M.05.2	候補種1	<i>Daptonema alternum</i>	OQ396726.1	100	99.84	<i>Daptonema alternum</i>
		M.05.6	候補種1	<i>Actinonema pachydermatum</i>	OR590910.1	100	96.74	<i>Actinonema pachydermatum</i>
			候補種2	<i>Actinonema pachydermatum</i>	OR590911.1	100	96.73	
		M.05.7	候補種1	<i>Nematoda</i> sp.	MK626831.1	100	94.44	Nematoda
			候補種2	<i>Gomphonema</i> sp.	MK626810.1	100	94.44	
		M.05.8	候補種1	<i>Neochromadora</i> sp.	OR590932.1	98	94.36	<i>Neochromadora</i> sp.
			候補種2	<i>Neochromadora</i> sp.	OR590931.1	98	94.36	
	0.05g/L	M.005.1	候補種1	<i>Parodontophora fluviatilis</i>	MK626776.1	100	99.01	<i>Parodontophora fluviatilis</i>
			候補種2	<i>Parodontophora fluviatilis</i>	MK626774.1	100	99.01	
		M.005.2	候補種1	<i>Halalaimus</i> sp.	HM564490.1	100	97.55	<i>Halalaimus</i> sp.
		M.005.4	候補種1	<i>Dichromadora</i> sp.	OR590923.1	100	94.27	Chromadoridae
			候補種2	<i>Prochromadorella obtusidens</i>	OR590937.1	100	94.90	
			候補種3	<i>Prochromadorella obtusidens</i>	OR590936.1	100	94.90	
			候補種4	<i>Chromadorella filiformis</i>	OR590912.1	100	94.25	
			候補種5	<i>Chromadorita</i> sp.	OR590915.1	100	94.90	
			候補種6	<i>Chromadorita</i> sp.	OR590914.1	100	94.90	
		M.005.5	候補種1	<i>Cyartonea</i> sp.	OR590943.1	99	90.44	<i>Cyartonea</i> sp.
			候補種2	<i>Cyartonea</i> sp.	OL388474.1	99	90.44	
		M.005.8	候補種1	<i>Rhyps paraornata</i>	MG669994.1	99	93.58	Chromadoridae
			候補種2	<i>Actinonema celtica</i>	MG669665.1	99	93.05	
			候補種3	<i>Actinonema pachydermatum</i>	OR590911.1	99	93.05	
			候補種4	<i>Chromadoridae</i> sp.	OR590913.1	99	92.78	
			候補種5	<i>Neochromadora</i> sp.	MN250121.1	99	92.51	
			候補種6	<i>Dichromadora</i> sp.	MN250085.1	99	92.25	

※Accession No. はデータベースに登録されている塩基配列の世界共通の登録番号である

