
Review

原生生物における種レベルの多系統性と種の問題

月井 雄二

法政大学自然科学センター 〒102-8160 東京都千代田区富士見 2-17-1

Species-level polyphyly and species problem in protists

Yuuji TSUKII

Science Research Center, Hosei University, Tokyo 102-8160, Japan

SUMMARY

Monophyly is essential prerequisite for species delimitation. In protists, molecular phylogenetic studies revealed, in recent years, many polyphyletic groups at all taxonomic levels, which afterwards led to their revisions for getting closer to natural classification. Above all, species-level polyphyly not only causes revisions of species, but also forces taxonomists to face species problems, especially species delimitation.

Technological advancement in molecular biology represented by next-generation sequencing enables to develop various new methods for species delimitation, which open up a new way of taxonomy. Morphologically indistinct groups such as small flagellates or amoebas have been out of search for intraspecific polyphyly because of inability of delimiting their species boundaries. However, a new approach called "reverse taxonomy" including increased taxon sampling shed light on their species delimitation.

Key words: Species concept, Species delimitation, DNA barcoding, Reverse taxonomy, Increased taxon sampling

はじめに

Sonneborn (1937) による mating type (接合型, または, 交配型) の発見以後, ゾウリムシ (*Paramecium*) を始めとした繊毛虫では, 相補的な接合型のグループ (mating group) が生物学的種に相当すると長い間, 考えられてきた (Sonneborn, 1957). しかし, *P. caudatum* では, mating group と mtDNA, および, 大核 DNA の系統が一致しなかった (Tsukii, 1994, 1996; 月井, 1999). それまで「種」と考えられてきた各 mating group が, 実際は異なる系統のあつまり, すなわち多系統 (polyphyly) だったのである. 一方, 同属の *P. aurelia* に比べると, *P. caudatum* における株間, ないし, mating group 間の遺伝的差異はごくわずかった (Stoeck et al., 2000; Hori et al., 2006; Barth et al., 2006; Strüder-Kypke and Lynn, 2010). このことから, *P. caudatum* の mating group は種ではないとする主張もある (Stoeck et al., 2000).

それでは *P. caudatum* における種とはいったい何だろう? Mating group が種でなければ *P. caudatum* 全体を一つの種ととらえるべきなのだろうか? 株間の遺伝的差異が少ないことから, *P. caudatum* の進化的起源が *P. aurelia* に比べてより新しい可能性がある. あるいは, *P. caudatum* 内では遺伝子交流が活発で, 遺伝的差異が生まれにくいのかも知れない. なぜなら, *P. caudatum* では接合型の多型が知られていて, その中には他の mating group とも交配可能な変異 (樋渡・月井, 1986; Tsukii, 1988a; 堀ら, 1988) もあるからだ. しかし, それなら何故, *P. aurelia* よりも多い 16 もの mating groups (Gilman, 1954) が *P. caudatum* に存在するのだろうか (*P. aurelia* の mating groups は 14; Sonneborn 1975)? また, グループ間雑種に妊性があるとはいえ (Tsukii and Hiwatashi, 1983), 雑種子孫では染色体不分離が起こる (Tsukii and Hiwatashi, 1985; Tsukii, 1988b). このことから, mating group 間では, ある程度隔離が進行していると推察できるので, *P. caudatum* 全体をひとつの種だと単純にとらえることはできない. このような「種レベルの多系統」と「種の問題」は他の原生生物ではどうなのか, 研究の現状について調べてみた.

ただし, 他の原生生物では有性生殖が知られていないか, あるいは, 知られていてもゾウリムシのように mating group の系統解析が行われている種類は限られている. そのため, ほとんどの事例は, 形態的特徴で識別された形態種 (morphospecies) を分子マーカーで調べると多系統だった, という内容になる.

また, 分子マーカーが多系統を示したからといって, かならずしも従来の分類が誤りで, 既存の種を

複数の種に分割するなど種の再編を迫られるとは限らない. 分子マーカーが多系統を示す原因は, 種そのものが多系統だから, というだけでなく, 種間交雑によって起こる遺伝子浸透や, 種分化以前に存在していた多型遺伝子によって起こる incomplete lineage sorting など考えられるからだ (Funk and Omland, 2003). 種そのものが多系統であると認められれば, 種の再編が行われ種の多系統性は解消することになる.

後述するように, 多細胞動物ではすでに数多くの多系統を示す種 (多系統種) が発見されているが (Funk and Omland, 2003), 原生生物は, 近年, 界・門レベルの大分類の再編がおおよそ終わり (e.g., Cavalier-Smith, 1998, 2002), 現在は, 下位の綱・目・科・属レベルの再編がさかんに行われている段階にある. 種内の系統解析はまだまだこれからという状況なので, 原生生物の多系統種に関する報告は限られている. なお, ここでは Funk and Omland (2003) に従い, 側系統 (paraphyly) も広義の多系統 (polyphyly) の一部として扱う (Fig. 1).

本調査は, 当初, 「species, polyphyly」など関連する用語をキーワードにして論文を検索したが, やがて論文中にそれらのキーワードが使われていないにも関わらず, 系統樹を見ると多系統を示す種が含まれているものもあつたことに気づいた. そのため, 途中から検索対象を広げて調査を行った. すべてを網羅できたとは言いがたいが, ある程度の傾向はつかめたはずである.

1. 各グループごとの紹介

以下では, 多系統種について, 新しくなった大分類ではなく, 旧来の伝統的な大分類ごとに紹介する. 各グループ名の後に続く括弧内に現在の分類学的位置 (または系統群名) を示した.

1-1. 鞭毛虫

現在の分類体系では, 鞭毛虫は系統的には 1 つにまとまったグループ (単系統, monophyly) ではなく, 複数の界, または界に相当する系統群に分かれて配置される (Adl et al., 2005, 2012).

ミドリムシ類 (バイコンタ/エクスカバータ/Discoba/ユーグレナ動物門/ユーグレナ藻綱)

後出する他の生物群と同様, ミドリムシ類では, 2000 年以前は分子系統樹を作成する際に, 1 属 1 サンプルで行っていた場合が多い (Preisfeld et al., 2000). そのため, 属レベルでの多系統には気づけなかった. しかし, 2000 年頃からは系統樹を作成する際, 同じ属の複数の種 (ただし 1 種 1 サンプル)

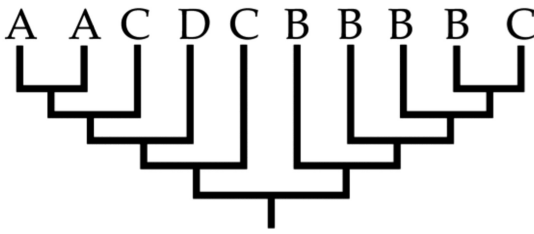


Fig. 1. About monophyly, paraphyly and polyphyly. This figure illustrates patterns of gene-tree topology for defining terms; monophyly, paraphyly and polyphyly (modified from Funk and Omland, 2003). Capital letters represent nominal species. Species A, B and C are monophyletic, paraphyletic, and polyphyletic, respectively. In this review, "polyphyly" is used as a general term for both paraphyletic and polyphyletic patterns according to Funk and Omland (2003).

を用いるようになった。これにより科・属レベルの多系統が次第に明らかになった (Linton et al., 1999; Müller et al., 2001; Preisfeld et al., 2001; Kim and Shin, 2008)。そして、それらの結果に基づいて、これまでに科・属の再編がさかんに行われている (Busse and Preisfeld, 2003; Brosnan et al., 2003; Karnkowska-Ishikawa et al., 2012)。

今のところ、種レベルの多系統は発見されていないようである。後述するように、多系統種を発見するには、網羅的なサンプリングを数多く行う必要があるが、まだそのような研究は認められない。とはいえ、今後、多数の同種サンプルを扱う研究が増えれば、多系統種が発見される可能性は十分にある。

ミドリムシ類に近いキネトプラスト類 (ユグレナ動物門/キネトプラスト綱) では、トリパノゾマ類 (Merzlyak et al., 2001; Podlipaev et al., 2004)、ボド (*Bodo*)、クリプトビア (*Cryptobia*) (Simpson et al., 2002) で属レベルの多系統が報告され、その再編が行われている (Moreira et al., 2004; von der Heyden et al., 2004)。多系統種に関しては、キネトプラスト類 100 以上のサンプル (10 属 10 種以上、属名または種名が不明のものも含む) からなる系統樹で、複数の同種サンプルを用いた 8 種のうち、*Bodo saltans* 以外の 7 種が多系統性を示した (Scheckenbach et al., 2006)。

渦鞭毛虫 (バイコンタ/SAR/アルベオラータ/渦鞭毛動物門)

渦鞭毛藻とも呼ばれるが、このグループの大分類はいまだに不確定な部分がある。これには、細胞内共生や、遺伝子の水平伝播・塩基置換速度のばらつきなどが影響していると思われる (Gottschling et al.,

2012)。目レベルでは、いくつかのグループは単系統だが、代表的なペリディニウム目やギムノディニウム目は著しい多系統を示すことが知られている (Kremp et al., 2005; Saldarriaga et al., 2004; Zhang et al., 2007, 2008)。属レベルの系統解析で、複数の同種サンプルを用いている論文もあるが、いずれも多系統種は検出されていない (e.g., Gottschling et al., 2012)。*Scrippsiella trochoidea* (ペリディニウム目) では、同種サンプル 15 株を含む系統樹で、一部が他から離れていたために新たに 2 種を分離したが、他種と入り交じる形の多系統種は検出されなかった (Montresor et al., 2003)。他に多系統種に関する報告は見当たらない。

クリプト藻 (バイコンタ/クリプト植物門)

このグループは二次共生が最初に発見された事例 (Greenwood, 1974; Ludwig and Gibbs, 1985) として広く知られている。属レベルの多系統が知られ (Marin et al., 1998; Deane et al., 2002)、Hoef-Emden and Melkonian (2003) によって属の再編が行われた。すなわち、それまで別属とされてきたカンピロモナス属 (*Camphylomonas*) が、クリプトモナス属 (*Cryptomonas*) が示す二型性によるものであることがわかり、クリプトモナス属に編入された。また、キロモナス属 (*Chilomonas*) もクリプトモナス属に編入された。多系統種の報告は見当たらない。

パラバサリア (バイコンタ/エクスカバータ/メタモナダ門/パラバサリア)

このグループには、昆虫に共生する超鞭毛虫類やヒトなどに寄生するトリコモナス類などが含まれる。属レベルで多系統だったため綱→属の再編 (新属・新種の提案を含む) が行われた (Cepicka et al., 2010)。また、シロアリの後腸に生息するマクロトリコモナス属 (*Macrotrichomonas*) で多系統が発見され、新属が提案された (Gile et al., 2015)。多系統種の報告はまだない。

ジャコバ類 (バイコンタ/エクスカバータ/Discoba/ジャコバ類)

いくつかの種で複数株を用いて系統樹を作成している (Edgcomb et al., 2001)。しかし、使用したサンプル数はわずか (各種 1 ~ 数サンプル) で、多系統種は認められない。

1-2. 肉質虫

従来の分類では、肉質虫は根足虫と有軸仮足虫に二大別されていた。このうち *Amoeba proteus* などが含まれる根足虫は、分子系統解析以前からグループ全体が多系統であることが示唆されていたが

(Mikrjukov et al., 2000; Nikolaev et al., 2004) , 大分類の見直しは、他のグループに比べて大幅に遅れた。これは、肉質虫では分子系統の研究が乏しかったのが主な理由とされる (Pawlowski, 2008) 。根足虫とされてきた生物は、近年になってアメーボゾア (Cavalier-Smith, 1998) , リザリア (Cavalier-Smith, 2002; Cavalier-Smith and Chao, 2003; Nikolaev et al., 2004) , および、ヘテロロボサ (Simpson et al., 2006; Pánek and Čepička, 2012) に分かれることが確定した。現在は下位分類群の見直しが続いている (e.g., Lahr et al., 2011, 2013; Smirnov et al., 2011; Pánek and Čepička, 2012) 。

アメーボゾア (アメーバ動物/アメーバ動物門)

属レベルで見つかった多系統により、他と同様、属の再編が行われている (e.g., Kudryavtsev et al., 2005; Smirnov et al., 2007; Gomaa et al., 2012; Watson et al., 2014) 。ハルトマンネラ属 (アメーバ動物門/ツブリナ綱) では属レベルの多系統が示唆されている。その系統樹には *Hartmannella vermiformis* 15 サンプルも含まれるが、多系統種は検出されなかった (Dyková et al., 2005) 。この他に多系統種に関する報告例はない。

リザリア (バイコンタ/SAR/リザリア)

このグループは、かつての根足虫の一部 (糸状根足虫, 顆粒状根足虫) , 鞭毛虫の一部 (ケルコモナスなど) , クロララクニオン藻, ネコプカビ類, 放散虫など様々なグループによって構成される。多系統種が見つかったのは、リザリア/ケルコゾア門に属する *Euglypha filifera* (Wylezich et al., 2002; Schlegel and Meisterfeld, 2003) , および, *Cyphoderia ampulla* (Heger et al., 2010) 程度である。

ヘテロロボサ (バイコンタ/エクスカバータ/Discoba/ヘテロロボサ)

ヘテロロボサは、アメーバ鞭毛虫とも呼ばれていたネグレリア類 (*Vahlkampfia*, *Naegleria* など) に細胞性粘菌の一部 (アクラシス類) を加えて作られた比較的新しいグループである (Page and Blanton, 1985) 。そのため「従来の分類」には名前がない場合がある。分子系統的にはジャコバ類やユグレナ動物門に近い。分類群の見直しが科 (De Jonckheere and Brown, 2005) や、属 (Brown and De Jonckheere, 1999; Corsaro and Venditti, 2010) レベルで行われている。種内系統に関しては、病原性のある *Naegleria fowleri* 22 サンプルと自由生活をする他の *Naegleria* 4 種 (1 種 1 サンプル) からなる系統樹では、*N. fowleri* は単系統を示した (Zhou et al., 2003) 。これ以外にも複数の同種サンプルを用いた事例はある

が、多系統種は見つかっていない。

一方、根足虫と同様、有軸仮足虫も多系統で、放散虫は上記のようにリザリアへ、太陽虫はストラメノパイル (無殻太陽虫類, キリオフリス類) , リザリア/ケルコゾア門 (ディモルファ類, 有殻太陽虫類) , および、所属不明の独立した系統群 (有中心粒類) などに分散した (Mikrjukov et al., 2000) 。有中心粒類の *Heterophrys* で属内多系統が発見されているが (Cavalier-Smith and von der Heyden, 2007) , 種内の系統調査は行われていない。

1-3. 織毛虫

肉質虫や鞭毛虫と異なり、織毛虫 (バイコンタ/SAR/アルベオラータ/織毛虫門) は、後出する「狭義の緑藻」とともに、早くから単系統であることが確定していた。しかし、下位の綱・目レベルでは、何度も再編が起きている (Lynn, 2008) 。科・属のレベルでも多系統が数多く見つかっており、現在もさかんに各分類群の再編が行われている。例えば、科以上では、シュードケロノプシス科 (Chen et al., 2011) , 少毛類 (Snoeyenbos-West et al., 2002) , その中のチンチヌス類 (Santoferrara et al., 2012; Bachy et al., 2012; Kazama et al., 2012) , 海産のウロスティラ類 (Yi et al., 2010b; Shao et al., 2011) , リトストマ綱 (Vd'ačný et al., 2011) , 梁口綱と前口綱 (Zhang et al., 2014) など、属レベルでは、*Balantidium* (Li et al., 2014; Chistyakova et al., 2014) , *Metaurostylosis* (Song et al., 2011) , *Holosticha* (Gao et al., 2010) , *Euplotes* (Yi et al., 2009) , *Cyclidium* (Zhang et al., 2011) などである。チンチヌス類では 4 種で多系統種が見つまっている (Kazama et al., 2012) 。

棘毛類は、もともと形態レベルでたくさんの種が知られていたが (Lynn, 2008) , 分子系統解析によりさらに複雑になりつつある (Hu et al., 2011) 。なかでもとくに形態種の多いオキシトリカ類 (オキシトリカ科 32 属 169 種, オキシトリカ属 *Oxytricha* 54 種) (Berger, 1999) は分子系統的に多系統で他の様々なグループに分散している (Schmidt et al., 2007; Hu et al., 2011; Singh and Kamra, 2014) 。しかし、棘毛類では種レベルの系統解析は進んでおらず、多系統種が見つかった事例はないようである。

前出の *Paramecium aurelia* は、*P. caudatum* と異なり各 mating group を分子的に識別できることから各々に固有の種名がつけられた (Sonneborn, 1975) 。後に分子系統的にも各グループは別種であることが確認されたが、最近になって、2 つの種 (*P. decaurelia*, *P. dodecaurelia*) で多系統が発見された (Tarcz et al., 2013) 。ただし、Tarcz らは、これはあ

くまで用いた分子マーカーが多系統なだけで、その原因は、incomplete lineage sorting (種が分岐する前からあった遺伝子の多型現象の影響) か、あるいは、種間雑種か遺伝子浸透によるものであり、2 種は、種としては各々ひとつにまとまっていると推測している。

1-4. 不等毛類

不等毛類 (バイコンタ/SAR/ストラメノパイル、これを不等毛類ともいう) のうち、光合成をするグループを不等毛植物門と呼ぶが、これには褐藻、黄金色藻、黄緑藻、珪藻など多様な藻類が含まれる。中でももっとも種数が多いのが珪藻である。記載種は 2 万 5,000 種を越えるという (Alverson, 2008)。

かつて珪藻は綱レベルの扱だったが、現在は門として扱われることもある。珪藻綱の場合は 2 つの目 (中心目、羽状目) で構成されるが、珪藻植物門とする場合は、大きく 2 つの亜門 (コアミケイソウ亜門、クサリケイソウ亜門) に分かれる (Medlin and Kaczmarska, 2004)。他の原生生物と同様、珪藻も下位の分類群で様々な再編が起きつつある。たとえばクチビルケイソウ目 (Nakov et al., 2014)、ハナラビケイソウ属 (*Denticula*; Hamsher et al., 2014) などである。

珪藻は被殻が成長せずその内側に新たな殻が形成されるため、分裂ごとにサイズが小さくなる。ある程度サイズが小さくなると有性生殖 (卵生殖または同型配偶子による接合) を行ない接合子 (受精卵) が発達した増大胞子を経て元のサイズに戻る。この際、多くはクローン内で有性生殖を行う (homothallic) が、一部の種は他クローンと有性生殖をする (heterothallic)。後者のタイプである海産の珪藻、*Pseudo-nitzschia delicatissima* には生殖的に隔離された mating group が 5 つ以上ある (Amato et al., 2007)。しかし、グループ内の系統調査は行われていない。他の珪藻に関しても、同種サンプルを複数用いた研究はあるが、多系統種に関する報告はない。

珪藻以外では、黄金色藻のスピメラ属 (*Spumella*) やオクロモナス属 (*Ochromonas*) などが多系統である (Boenigk et al., 2005; Cavalier-Smith and Chao, 2006)。黄緑色藻の多くも多系統である (Negrisolo et al., 2004)。黄緑色藻のトリボネマ属 (*Tribonema*) では、10 種 70 株弱と近縁の 8 属 12 種で系統樹を作成したところ、2 種 2 株は他の属と混在していたが、他の大部分は属としてまとまっていた。しかし、同種サンプルを複数用いた 7 種のうち、6 種が多系統性を示した (Zuccarello and Lohkorst, 2005)。また、褐藻綱のヒバマタ属

(*Fucus*) でも、16 種 275 株について調べたところ、多くの多系統種が確認された (Coyer et al., 2006)。いずれも、今後、種の再編が行われると予想される。ハプト藻のうち、円石藻の一種 *Emiliania huxleyi* についても多系統性が指摘されている (Bendif et al., 2015)。

1-5. 緑藻

このグループは狭義の緑藻の仲間 (緑藻植物門) と陸上植物により近縁な緑藻 (広義の車軸藻植物門; ただし側系統) からなる。後者には車軸藻や接合藻などが含まれる (Leliaert et al., 2012)。

緑藻植物門 (バイコンタ/アーケプラスチダ/緑色植物亜界/緑藻植物門)

このグループは緑藻綱、ブラシノ藻綱、トレボウクシア藻綱、アオサ藻綱などに区分される。

オオヒゲマワリ目 (緑藻植物門/緑藻綱)

代表的な属であるクラミドモナス属 (*Chlamydomonas*) は、形態種だけで 600 種以上が知られていたが (Ettl, 1983; Pröschold et al., 2001)、分子系統解析の結果、近縁のクロロモナス属 (*Chloromonas*) などに対して多系統 (Pröschold et al., 2001) だけでなく、他の目 (クロロコックム目など) と入り交じるという著しい多系統を示すことがわかった (Buchheim et al., 1990, 1996; Nakayama et al., 1996; Hepperle et al., 1998; Pröschold et al., 2001)。この他にも様々な分類群で多系統が認められたため、目レベル、および、それ以下のレベルで大幅な再編が行われた。現在は、かつてのクラミドモナス目、クロロコックム目、ヨツメモ目などがひとまとめにされ、再定義されたオオヒゲマワリ目 (Volvocales) とされることが多い (Nakada et al., 2008; Friedl and Rybalka, 2012)。

クロレラ類 (緑藻植物門/緑藻綱&トレボウクシア藻綱)

クロレラ属 (*Chlorella*) にはかつては形態種が 100 種以上知られ、緑藻綱/クロロコックム目に配置されていたが、その後大幅に見直されて 9 ないし 11 種まで減った (Neustupa et al., 2009; Champenois et al., 2014)。そして、1990 年代から始まった分子系統解析より、6 属に分割され 2 つの綱 (緑藻綱 2 属、トレボウクシア藻綱 4 属) に分けて配置された (Huss et al., 1999; Luo et al., 2010)。現在のクロレラ属は緑藻綱ではなく、トレボウクシア藻綱に属し 14 種からなる (Bock et al., 2011a; Champenois et al., 2014)。また、トレボウクシア藻綱に移ったものの一部は、ミクラクチニウム属 (*Micractinium*; 以前は緑藻綱/ク

ロコック目)に編入された。一方の緑藻綱に残ったものの一部はイカダモ属 (*Scenedesmus*) に編入された (イカダモ属自体も近年では 2 属以上に分割されている ; e.g., Hegewald, 2000) 。

変異の飽和

ミクラクチニウムは球形細胞が凝集した群体を形成し、各細胞の表層から剛毛様の突起を出す。一方、イカダモは紡錘形、ないし、楕円体の細胞が 4 ないし 8 個、横に並んだ群体を作る。本来は単細胞のクロレラ類とは異なる形のものだが、あるものは剛毛を失い、あるものは群体にならずにバラバラ、かつ球形化してクロレラに似た形になったと推測される。これはいわゆる収斂進化だが、同じようなことが他にも起きている。

クロレラを含むグループでは、剛毛をもつ種類はミクラクチニウム以外にも 3 属 (*Diacanthos*, *Didymogenes*, *Hegewaldia*) が知られているが、系統解析の結果、これらの剛毛はそれぞれ独立に進化したと推定された (Pröschold et al., 2010) 。これは剛毛という形質が平行進化したことを意味する。原生生物は細胞形が単純なので、様々な形質が複雑化・発達したり、逆に単純化・退化することで他の種・属と似てしまう可能性が高い。

既述したように、*P. caudatum* のいくつかの mating group には接合型の多型があり、ある接合型の変異は他グループの接合型との相補性を示す。これは接合型の特異性を決める部分の構造が単純で、生じ得る変異数が限られているので、接合型が変異すると既存の他の接合型に似てしまうと考えられる。著者はこれを接合型の変異が飽和している、と捉えている。進化速度の速い mtDNA などでは以前から塩基置換の飽和が起こることが知られているが (Felsenstein, 1978; Ho et al., 2005) , 形が単純な原生生物では、同様なことが形態レベルでも起きている可能性が高い。

この他、緑藻植物門 (狭義の緑藻) では、以下の属で多系統が認められている : *Botryococcus* (Senousy et al., 2004) , *Coelastrum* (Hegewald et al., 2010) , *Pediastrum* (Jena et al., 2014) , *Dictyosphaerium* (Krienitz et al., 2010; Bock et al., 2011b) , *Selenastrum*, *Monoraphidium*, *Ankistrodesmus*

(Bittencourt-Oliverra and Monteiro, 2002; Fawley et al., 2005) , 地衣類の共生藻である *Dictyochloropsis* (Dal Grande et al., 2014) , シオグサ属 (*Cladophora*) (Gestinari et al., 2009) など。

多系統種に関して

緑藻は多数の培養株が保存されていることもあ

り、早い時期から同種の複数株を用いて系統樹が作成されてきた (e.g., Hepperle et al., 1998) 。そのため、発見された多系統種も多いのではと予想したが、実際は違っていた。上記のように、属以上では数多く多系統が知られ、結果として分類群の再編が起きているが、調べたかぎりでは、意外にも種レベルの多系統の報告はなかった。この理由は、形態種が 600 以上も知られているクラミドモナス属の例でわかるように、緑藻類 (とくに再定義されたオオヒゲマワリ目) では、分子系統解析が始まる以前に、形態学的に詳しく調べ尽くされ、細分化されていたためではないかと思われる。

一方、同じ緑藻でも形態種レベルで十分に細分化されていない (ないし、細分化できない) グループでは、多系統種の報告がある。クレブソルミディウム属 (*Klebsormidium*; 車軸藻植物門) では、野外採取した 6 種 18 株 (内 4 株は種名不明) に、DNA データベースに登録されている他のクレブソルミディウム属のデータを足した計 84 サンプルで系統樹を作成したところ、6 種すべてが多系統を示した (Škaloud et al., 2014) 。すなわち、系統樹は大きく 16 系統に分かれ、そこに採取した 18 株は、形態種ごとではなく、サンプルごとにバラバラに配置された。これは *P. caudatum* で、mtDNA、および、大核 DNA の系統樹上で、調査した 74 株が mating group (クレブソルミディウムの形態種に相当) ごとにまとまらずバラバラに配置されたのとよく似ていて興味深い。

同様の結果が海藻の一種、アオモグサ (アオサ藻綱/シオグサ目) でも得られている。アオモグサは形態的に似た種類が多いため *Boodlea complex* と呼ばれるが、Leliaert et al. (2009) が、アオモグサ 175 株 (5 属 13 種) から得た rDNA-ITS 配列を Yule-coalescent model (後述) という手法で調べたところ、13 の系統種が推定された。しかし、それらと形態種とはまったく一致しなかった。すなわち、これも *P. caudatum* と同様、同じ形態種 (*P. caudatum* の場合は mating group) が複数の系統に散らばっていた。あまりに複雑なため、Leliaert らはこれらに固有の属名や種名をつけるのを止めて、各系統 (正確には clade) に番号をつけて、その番号で区別することを提案している。

接合藻 (バイコンタ/アーケプラスチダ/緑色植物界/接合藻植物門または広義の車軸藻植物門)

接合藻自体は単系統である (Gontcharov et al., 2003) 。そのサブグループも多くは単系統だが (Denboh et al., 2001; Gontcharov, 2008; Chen et al., 2012) , ツツミモやチリモの仲間では属レベルで多系統が確認されている。すなわち、ツツミモ属

(*Cosmarium*) と近縁の属 (Gontcharov, 2008; Gontcharov and Melkonian, 2008), ハタヒモ属 (*Netrium*) (Gontcharov and Melkonian, 2010), アワセオオギ属 (*Micrasterias*) (Neustupa et al., 2010; Nemjová et al., 2011) などである。その後, ツヅミモと近縁の属 (Gontcharov and Melkonian, 2010), および, コウガイチリモ属の 2 種 (*Pleurotaenium ehrenbergii* と *P. trabecula*) で多系統種が検出されている (Škaloud et al., 2012)。

一方, Chen et al. (2012) が, アオミドロ属 (*Spirogyra*) 130 サンプルと他の接合藻 10 数種を用いて系統解析を行ったところ, 遺伝的変異幅は大きかったものの, 属としては単系統が保たれていた (Drummond et al., 2005)。ただし, サンプルの多くは種が未同定のため, 多系統種の有無は不明である。

緑藻における mating group

接合藻は名前の通り接合により有性生殖を行う。ミカヅキモ属には, ゴウリムシと同様, 各形態種内に複数の mating groups が存在する。すなわち, *Closterium moniliferum-ehrenbergii* complex で 7 つ (Ichimura, 1981), *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex で 3 つ (Watanabe and Ichimura, 1978) の mating group が知られている。また, 前出の緑藻綱オオヒゲマワリ目でも, *Gonium pectorale* で 5 つ (Fabry et al., 1999), *Pandorina morum* では 30 以上の mating group が知られている (Coleman 1959, 1977, 2001)。グループ間の系統関係は調べられているが (Fabry et al., 1999; Coleman, 2000, 2001), グループ内の系統解析は行われていない。

1-6. その他の原生生物

紅藻 (バイコンタ/アーケプラスチダ/紅藻植物門)

カワモズク属 (*Batrachospermum*) では 2000 年以前に 100~150 種の形態種が知られていたが, 分子系統解析により無数の多系統種が検出された。その後, 現在に至る 20 年もの間, 新属・新種の設置を含めた属の再編作業が続いている。旧カワモズク属から分離した新属, *Sheathia* の 8 種について同種サンプルを複数用いて系統樹を作成したが多系統種は検出されなかった (Salomaki et al., 2014)。

以上をまとめると, 原生生物における多系統種については, 以下のような傾向がみられる。比較的大型で形態的特徴がはっきりしているグループは, 従来から形態分類がさかんでたくさんの形態種が知られている。これらは多細胞動物と同様, 種内の分子系統が調査され, 多系統種が発見されれば, それに

応じて種の分割など分類群が見直される, という流れが今後も続くと予想される。一方, 小型の鞭毛虫やアメーバ類では, 形態的に種を識別するのが困難なものが多い。これらの生物は形態種が不明のまま分子系統解析による種の推定が先に進みつつある。まずは分子系統解析から種の存在が推定され, その後, 各種について形態・生態・生理学的な裏付け調査が行われることになる (これを reverse taxonomy という; Markmann and Tautz, 2005)。結果として多系統種という問題は起こりにくいだろう。

現在, 原生生物では属より上の分類群の見直しがかんに行われているが, 種内の系統解析は藻類以外ではあまり進んでいない。しかし, 今後は増えるはずである。それは以下のような理由による。

2. DNA Barcoding 時代の種とは?

先に紹介した Funk and Omland (2003) は, 多細胞動物で多系統種がどれほど知られているか, 過去 13 年間 (1990-2002) に動物学関連の主要な 14 の雑誌に掲載された論文を調査し, その結果を報告している。それによると, これらの雑誌に掲載された論文のうち, 種内の系統を扱った研究は 584 件あり, 調べられた 523 属 2,319 種のうち, 多系統種は 535 種 (23%) あったという (Funk and Omland, 2003)。

中でも節足動物を除く無脊椎動物は多系統種の割合が 38.6% と, 哺乳動物 (17.0%) の 2 倍以上という高い値を示した。これは脊椎動物に比べて, 節足動物を除く無脊椎動物では形態レベルでの種の分類が十分に進んでいない (もしくは隠蔽種が多い) ためと考えられる。このような多系統種の存在に気づかないまま研究を行うと, 誤った結論が導かれる恐れがある。多系統種の有無を知るには, サンプリングを数多く, かつ, 網羅的に行う必要がある, と Funk and Omland は指摘している。

このような種レベルの多系統性への関心の高まりと, 次世代シーケンサーなど系統解析技術の急速な進歩もあって, 近年は分子系統樹を作成する際, 同種サンプルを多数含めて系統解析を行う事例が増えつつある。たとえば, *Paramecium aurelia* (Strüder-Kypke and Lynn, 2010), *Tetrahymena* (Kher et al., 2011), *Euplotes aediculatus* (Kusch et al., 2000), *Vannella* 6 形態種 (Nassonova et al., 2010), 貧膜口綱 (Strüder-Kypke and Lynn, 2010), リーシュマニア科 (Kostygov et al., 2014) などである。

また, 種内の系統解析が増えつつある背景には, DNA barcoding system への関心の高まりも影響しているようだ。DNA barcoding とは, 特定の DNA 領域を商品のバーコードのように用いて, 採集サンプルの種を特定できるようにしようというものである。

(Hebert et al., 2003) . これにより、骨片や肉片など同定の難しいサンプルからでもその生物種名を知ることができるし、分類の専門家でなくても利用できる。多くの研究に役立つことが期待されている。Hebert らの提案に基づき、2004 年に The Consortium of the Barcode of Life (CBOL) が設立された。日本国内でもこれに呼応する組織として日本バーコード オブ ライフ・イニシアティブ (<http://www.jboli.org/>) が 2007 年に設立された。2010 年には、International Barcode of Life (iBOL) project (<http://ibol.org/>) が立ち上がり、そこで収集されたデータは、BOLD systems (BOLD=Barcode of Life Data system) (<http://www.boldsystems.org/>) として公開されている。2015 年 3 月 23 日現在 barcode が付与されているのは 235,918 種だが、多くは昆虫 (157,980 種) である。原生物は Plants/Chlorophyta (1,749 種) と Protists (1,137 種) に分かれて登録されている。

この DNA barcodes を作成する際にも、当然ながら、対象となる種は単系統でなければならない。そのため、barcodes を登録する際には幅広くサンプリングを行い、多系統でないことを十分に確認する必要がある。

さらに、別な意味でサンプリングの重要性を指摘する研究もある。それは、系統樹を作成する上では、サンプル数が多い (increased taxon sampling) ほど系統樹の信頼性が増すというものだ (Zwickl and Hillis, 2002; Pollock et al., 2002; Heath et al., 2008) . これを受けた形でサンプルを多くした系統樹を作成する事例も増えている (e.g., Dunthorn et al., 2008; Gómez et al., 2011; Yi et al., 2010a) . 現在は属レベルの解析が主で、多数の種 (1 種 1 サンプル) を使って系統樹を作成しているものが多いが、今後は多数の同種サンプルを含んだ系統樹も増えると予想される。結果として多系統種の発見につながるだろう。

ただし、種レベルの多系統性を調査する上で、原生物には高いハードルがある。それは、形態種の多くが cosmopolitan, すなわち、世界中に広く分布していることだ (Fenchel and Finlay, 2004; Finlay and Fenchel, 2004) . そのような形態種を網羅的に、かつ、数多くサンプリングするには膨大な時間と労力を要する。多くの原生物は培養が難しいことや、研究者不足も考慮すると、このハードルを越えるのは容易ではない。これに対する解決策としては、いわゆる環境 DNA を利用した方法や、培養を必要としない 1 細胞からのゲノムシーケンス法などが提案されている (Yi et al., 2009; Bennett and Triemer, 2012) .

原生物の種は、本当に cosmopolitan なのか、それとも、それらは形が似ているだけで、実際には地理的・生態的に複数の固有種に分かれているのか、

という「Everything is everywhere 論争」 (Katz et al., 2005; Foissner, 2006, 2007; Fontaneto, 2011) が続いているが、今後、種内の分子系統解析が進めば、この論争に対する答えが出るはずである。

種概念と species delimitation

発見された多系統種が属・科を越えている、すなわち、形態的に同種とされていた系統の一部が、分子系統解析の結果、系統的に離れた他の属や科により近かった場合、それはあきらかに別種とみなしてよいだろう。しかし、同属内の他種により近いなど系統的な距離がさほどない場合、それを別種とすべきか否か、種の再編を行うべきか否か判断に迷うところである。このため、何をもって同種とするか、普遍的、かつ、具体的な種の判定法が求められる。ここで問題になるのは種をどう定義するか (種概念, species concept) ではなく、種の境界をどうやって定めるか (species delimitation) である。

これに関して、de Queiroz (2007) は、従来は種概念の中に species delimitation を含めていたために、様々な種概念が生まれ様々な論争が起きたが、両者を分けてしまえば種概念を統一できると主張している。これまで出された種概念は、生物学的種、進化学的種、形態的種、生態学的種、系統学的種等々、20 以上あるといわれるが (Mayden, 1997) , これらに唯一共通している特徴がある。それは、種を evolving metapopulation or lineage と捉えている点だ。そこで種の定義を唯一これのみとし、他の概念ごとに異なっている部分は species delimitation の違いとすれば種概念を統一できる、というのが de Queiroz の考えである。Evolving metapopulation か否かを決めている要因は生物ごとに異なるので、それぞれにもっともふさわしい species delimitation を行えばよいという。たとえば有性生殖をする生物と、しない生物とでは、それらを evolving metapopulation としている要因は異なるので species delimitation の内容もおおのずと違って来る、という具合だ。

この species delimitation の手法として、前述の DNA barcoding system では、グループ内とグループ間の変異幅の差 (barcode gap) が 10 倍以上がある場合に各グループを種とする提案 (Hebert et al., 2004) がされたが、10 倍という値に客観的な根拠がないことや、実際には、これにあてはまらない生物がたくさんいるなどの問題がある (Hoef-Emden, 2012) .

近年はより洗練された species delimitation 法が開発され、実際に利用されている。中でも広く採用されているのが ITS2 二次構造の違いによる種の推定法である (Coleman, 2009) . ITS2 配列は rDNA の一部だが、従来、系統樹を作成する際の分子マーカーの 1 つとして利用されてきた。ITS2 配列が転写され 1 本

鎖の RNA になると独特な形の二次構造をとることが知られている。Müller et al. (2007) が、ITS2 配列が知られている 1,373 種について調べたところ、ITS2 二次構造は種内では違いがないが、種が異なると、近縁種間であってもかなり高い確率でなんらかの違いがあったという。これを経験則として、ITS2 二次構造が同じなら同種、違っていれば別種であると推定する手法だ。近年は、分子系統樹とともに ITS2 二次構造を掲載した論文が増えつつある（この手法への批判もある；Caisová et al., 2011）。

また、収集した配列データから種数を推定する方法も開発されている。GMYP モデル（general mixed Yule-coalescent model）（Fujita et al., 2012）や ABGD 法（automatic barcode gap discovery method）（Puillandre et al., 2012）などである。生物多様性分野（生物系統地理学）では、これらを利用して調査地域に生息する種数の推定等を行っている（Pons et al., 2006; Leliaert et al., 2009; Payo et al., 2012）。分類学でも先述の reverse taxonomy で特定の生物群がどれくらいの種で構成されているかを推定するために利用されている（Leliaert et al., 2014）。Heger et al. (2013) は、有殻アメーバの一種 *Hyalosphenia papilio*（形態種）について、世界中（北米、欧州、アジアの 42 カ所）から採取した 301 サンプルで single-cell PCR を行い、得られた塩基配列を GMYP モデル、および、ABGD 法で調べると、12 の隠蔽種が検出されたと報告している。アメーバや小型の鞭毛虫など形態的に種を判別しにくいグループでは、今後はこのような形の研究がさかんになると予想される。

Paramecium caudatum における種とは？

P. caudatum は当初は 1 つの種と考えられていたが、生物学的種概念（Mayr, 1942）の普及を背景に、接合型の発見以後は、*P. caudatum* 内にある複数の mating group が種（生物学的種）だとみなされるようになった。しかし、既述したように、現在 mating group は分子系統学的には種とは認められない。それでは種はどこにあるのだろうか？

輪状種（ring species）は、北極圏に生息するカモメ属で最初に見つかったもので、隣接する亜種の間では交雑が可能だが、その両端では交雑が起らず生殖的に隔離されているという。生物学的種概念では輪状種をどう捉えるべきか悩ましい対象となっているが（注：カモメ属の例は輪状種ではないとする意見もある；Liebers et al., 2004）、もしかすると、*P. caudatum* も同じようなものと捉えればよいかも知れない。これも既述したが、グループ間雑種（すべての組み合わせを調べた訳ではないので、正確には異なる mating group に属する特定の系統間の雑種）では染色体不分離が起こるので、*P. caudatum* の場合

は、一部の系統間では生殖的隔離が成立しているが、他はそうでもない、中間段階もある、という複雑な状態なのかも知れない。Carstens et al. (2013) は進化の実態を反映しない誤った species delimitation を行うよりは、種の境界がわからないままの方がよほどましだと主張している。*P. caudatum* においてもしかり、ということだろう（Boenigk et al., 2012）。

謝辞

本論文の執筆に際し、同僚の島野智之博士に貴重な助言をいただきました。ここに謝意を表します。

引用文献

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Andersen, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S. et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52, 399–451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V. et al. (2012) The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59, 429–493.
- Alverson, A. J. (2008) Molecular Systematics and the diatom species. *Protist*, 159, 339–353.
- Amato, A., Kooisra, W. H., Ghiron, J. H., Mann, D. G., Pröschold, T. and Montresor, M. (2007) Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*, 158, 193–207.
- Bachy, C., Gómez, F., López-García, P., Dolan, J. R. and Moreira, D. (2012) Molecular phylogeny of tintinnid ciliate (Tintinnida, Ciliophora). *Protist*, 163, 873–887.
- Barth, D., Krenek, S., Fokin, S. I. and Berendonk, T. U. (2006) Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome *c* oxidase I sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53, 20–25.
- Bendif, E. M., Probert, I., Young, J. R. and von Dassow, P. (2015) Morphological and phylogenetic characterization of new *Gephyrocapsa* isolates suggests introgressive hybridization in the *Emiliania/Gephyrocapsa* Complex (Haptophyta). *Protist*, 66, 323–336.
- Bennett, M. S. and Triemer, R. E. (2012) A new method for obtaining nuclear gene sequences from field samples and taxonomic revision of the photosyn-

- thetic euglenoids *Lepocinlis* (*Euglena*) *helicoideus* and *Lepocinlis* (*Phacus*) *horridus* (Euglenophyta). *J. Phycol.*, 48, 254–260.
- Berger, H. (1999) Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). *Monographiae Biologicae* Vol. 78, Springer, Dordrecht.
- Bittencourt-Oliveira, M. and Monteiro, R. (2002) Genetic variability of species of *Monoraphidium* (Chlorococcales, Chlorophyta) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Algol. Stud.*, 107, 81–95.
- Bock, C., Krienitz, L. and Pröschold, T. (2011a) Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11, 293–312.
- Bock, C., Pröschold, T. and Krientz, L. (2011b) Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data. *J. Phycol.*, 47, 638–652.
- Boenigk, J., Ereshefsky, M., Hoef-Emden, K., Mallet, J. and Bass, D. (2012) Concept in protistology: species definitions and boundaries. *Eur. J. Protistol.*, 48, 96–102.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Stadler, P. and Chatzinotas, A. (2005) High diversity of the 'Spumella-like' flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ. Microbiol.*, 7, 685–697.
- Brosnan, S., Shin, W., Kjer, K. M. and Triemer, R. E. (2003) Phylogeny of the photosynthetic euglenophytes inferred from the nuclear SSU and partial LSU rDNA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1175–1186.
- Brown, S. and De Jonckheere J. F. (1999) A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSU rDNA sequences. *Eur. J. Protistol.*, 35, 49–54.
- Buchheim, M. A., Lemieux, C., Otis, C., Gutell, R. R., Chapman, R. L. and Turmel, M. (1996) Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): a comparison of ribosomal RNA gene sequences from the nucleus and the chloroplast. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5, 391–402.
- Buchheim, M. A., Turmel, M., Zimmer, E. A. and Chapman, R. L. (1990) Phylogeny of *Chlamydomonas* (Chlorophyta) based on cladistic analysis of nuclear 18S rRNA sequence data. *J. Phycol.*, 26, 689–699.
- Busse, I. and Preisfeld, A. (2003) Systematics of primary osmotrophic euglenoids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 617–624.
- Caisová, L., Marin, B. and Melkonian, M. (2011) A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae). *BMC Evol. Biol.*, 11, 262. doi:10.1186/1471-2148-11-262.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M. and Satler, J. D. (2013) How to fail at species delimitation. *Mol. Ecol.*, 22, 4369–4383.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 73, 203–266.
- Cavalier-Smith, T. (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 297–354.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E. E.-Y. (2003) Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*, 154, 341–358.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E. E.-Y. (2006) Phylogeny and megasystematics of phagotrophic Heterokonts (kingdom Chromista). *J. Mol. Evol.*, 62, 388–420.
- Cavalier-Smith, T. and von der Heyden, S. (2007) Molecular phylogeny, scale evolution and taxonomy of centrohelid heliozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44, 1186–1203.
- Cepicka, I., Hampl, V. and Kulda, J. (2010) Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist*, 161, 400–433.
- Champenois, J., Marfaing, H. and Pierre, R. (2014) Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *J. Appl. Phycol.*, 27, 1845–1851.
- Chen, C., Barfuss, M. H., Pröschold, T. and Schagrel, M. (2012) Hidden genetic diversity in the green alga *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *BMC Evol. Biol.*, 12, 77.
- Chen, X., Clamp, J. C. and Song, W. (2011) Phylogeny and systematic revision of the family Pseudokeronopsidae (Protista, Ciliophora, Hypotricha), with description of a new estuarine species of *Pseudokeronopsis*. *Zool. Scr.*, 40, 659–671.
- Chistyakova, L. V., Kostygov, A. Y., Kornilova, O. A. and Yorchenko, V. (2014) Reisolation and redescription of *Balantidium duodeni* Stein, 1867 (Litostomatea, Trichostomatia). *Parasitol. Res.*, 113, 4207–4215.
- Coleman, A. W. (1959) Sexual isolation in *Pandorina morum*. *J. Protozool.*, 6, 249–264.
- Coleman, A. W. (1977) Sexual and genetic isolation in the

- cosmopolitan algal species *Pandorina morum*. Am. J. Bot., 64, 361–368.
- Coleman, A. W. (2000) The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. Protist, 151, 1–9.
- Coleman, A. W. (2001) Biogeography and speciation in the *Pandorina/Volvulina* (Chlorophyta) superclade. J. Phycol., 37, 836–851.
- Coleman, A. W. (2009) Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. Mol. Phylogenet. Evol., 50, 197–203.
- Corsaro, D. and Venditti, D. (2010) Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). Parasitol. Res. 107, 233–238.
- Coyer, J. A., Hoarau, G., Oudot-Le Secq, M.-P., Stam, W. T. and Olsen, J. L. (2006) A mtDNA-based phylogeny of the brown algal genus *Fucus* (Heterokontophyta; Phaeophyta). Mol. Phylogenet. Evol., 39, 209–222.
- Dal Grande, F., Beck, A., Cornejo, C., Singh, G., Cheenacharoen, S., Nelsen, M. P. and Scheidegger, C. (2014) Molecular phylogeny and symbiotic selectivity of the green algal genus *Dictyochloropsis* s.l. (Trebouxiophyceae): a polyphyletic and widespread group forming photobiont-mediated guilds in the lichen family Lobariaceae. New Phytol., 202, 455–470.
- De Jonckheere, J. F. and Brown, S. (2005) The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. Protist, 156, 89–96.
- de Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. Syst. Biol., 56, 879–886.
- Deane, J. A., Strachan, I. M., Saunders, G. W., Hill, D. R. A. and McFadden, G. I. (2002) Cryptomonad evolution: nuclear 18S rDNA phylogeny versus cell morphology and pigmentation. J. Phycol., 38, 1236–1244.
- Denboh, T., Hendrayanti, D. and Ichimura, T. (2001) Monophyly of the genus *Closterium* and the order Desmidiiales (Charophyceae, Chlorophyta) inferred from nuclear small subunit rDNA data. J. Phycol., 37, 1063–1072.
- Drummond, C. S., Hall, J., Karol, K. G. and Delwiche, C. F. and McCourt, R. M. (2005) Phylogeny of *Spirogyra* and *Spirogonium* (Zygnematophyceae) based on *rbcL* sequence data. J. Phycol., 41, 1055–1064.
- Dunthorn, M., Foissner, W. and Katz, L. A. (2008) Molecular phylogenetic analysis of class Colpodea (phylum Ciliophora) using broad taxon sampling. Mol. Phylogenet. Evol., 46, 316–327.
- Dyková, I., Pindová, Z., Fiala, I., Dvořáková, H., and Macháčková, B. (2005) Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lesions. Folia Parasitol., 52, 295–303.
- Edgcomb, V. P., Roger, A. J., Simpson, A. G., Kysela, D. T. and Sogin, M. L. (2001) Evolutionary relationships among "Jakobid" flagellates as indicated by alpha- and beta-tubulin phylogenies. Mol. Biol. Evol., 18, 514–522.
- Ettl, H. (1983) Chlorophyta I, Phytomonadina. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 9, Springer, Stuttgart.
- Fabry, S., Köhler, A. and Coleman, A. W. (1999) Intraspecific analysis: comparison of ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*. J. Mol. Evol., 48, 94–101.
- Fawley, M. W., Dean, M. L., Dimmer, S. K. and Fawley, K. P. (2005) Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). J. Phycol., 42, 142–154.
- Felsenstein, J. (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. Syst. Biol., 27, 401–410.
- Fenchel, T. and Finlay, B. J. (2004) The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. BioScience, 54, 777–784.
- Finlay, B. J. and Fenchel, T. (2004) Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. Protist, 155, 237–244.
- Foissner, W. (2006) Biogeography and dispersal of microorganisms: a review emphasizing protist. Acta Protozool., 45, 111–136.
- Foissner, W. (2007) Dispersal and biogeography of protists: recent advances. Jpn. J. Protozool., 40, 1–16.
- Fontaneto, D. (ed.). (2011) Biogeography of microscopic organisms. Is everything small everywhere? Systematic Association Special, Vol. 79. Cambridge University Press, Cambridge.
- Friedl, T. and Rybalka, N. (2012) Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status. In: Progress in Botany 73. Lüttge, U., Beyschlag, W., Büdel, B. and Francis, D. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 263–273.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A. and Moritz, C. (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. Trends Ecol. Evol., 27, 480–488.
- Funk, D. J. and Omland, K. E. (2003) Species-level pa-

- raphy and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Evol. Syst.*, 34, 397–423.
- Gao, F., Yi, Z., Gong, J., Al-Rasheid, K. A. S. and Song, W. (2010) Molecular phylogeny and species separation of five morphologically similar *Holosticha*-complex ciliates (Protozoa, Ciliophora) using AR-DRA riboprinting and multigene sequence data. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 28, 542–548.
- Gestinari, L. M. S., Oliveira, M. C., Milstein, D., Yoneshige-Valentin, Y. and Pereira, S. M. B. (2009) Phylogenetic analyses of *Cladophora vagabunda* (L.) C. Hoek (Cladophorales, Chlorophyta) from Brazil based on SSU rDNA sequences. *Rev. Bras. Bot.*, 32, 531–538.
- Gile, G. H., James, E. R., Okamoto, N., Carpenter, K. J., Scheffrahn, R. H. and Keeling, P. J. (2015) Molecular evidence for the polyphyly of *Macrotrichomonas* (Parabasalia: Cristamonadea) and a proposal for *Macrotrichomonoides* n. gen., *J. Eukaryot. Microbiol.*, 62, 494–504.
- Gilman, L. C. (1954) Occurrence of the variety of *Paramaecium caudatum*. *J. Protozool.* 3(Suppl.), 6.
- Gomaa, F., Todorov, M., Heger, T. J., Mitchell, E. A. D. and Lara, E. (2012) SSU rRNA phylogeny of Arcellinida (Amoebozoa) reveals that the largest arcellinid genus, *Diffugia* Leclerc 1815, is not monophyletic. *Protist*, 163, 389–399.
- Gómez, F., López-García, P. and Moreira, D. (2011) Molecular phylogeny of dinophysoid dinoflagellates: the systematic position of *Oxyphysis oxytoxoides* and the *Dinophysis hastata* group (Dinophysales, Dinophyceae). *J. Phycol.*, 47, 393–406.
- Gontcharov, A. A. (2008) Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea*, 8, 87–104.
- Gontcharov, A. A., Marin, B. A. and Melkonian, M. A. (2003) Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparison. *J. Mol. Evol.*, 56, 89–104.
- Gontcharov, A. A. and Melkonian, M. (2008) In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematophyceae, Viridiplantae): the genus *Cosmarium*. *Am. J. Bot.*, 95, 1079–1095.
- Gontcharov, A. A. and Melkonian, M. (2010) Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (Zygnematophyceae, Streptophyta): *Nucleotaenium* gen. nov. *J. Phycol.*, 46, 346–362.
- Gottschling, M., Soehner, S., Zinssmeister, C., John, U., Plötner, J., Schweikert, M., Aligizaki, K. and Elbrächter, M. (2012) Delimitation of the Thoracosphaeraceae (Dinophyceae), including the calcareous dinoflagellates, based on large amounts of ribosomal RNA sequence data. *Protist*, 163, 15–24.
- Greenwood, A. D. (1974) The Cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. *In: Electron Microscopy 1974*. Sanders, J. V. and Goodchild, D. J. (eds.). Australian Academy of Sciences, Canberra, pp. 566–567.
- Hamsher, S. E., Graeff, C. L., Stepanek J. G. and Kociolek, J. P. (2014) Frustular morphology and polyphyly in freshwater *Denticula* (Bacillariophyceae) species, and the description of *Tetrahnata* gen. nov. (Epithemiaceae, Rhopalodilales). *Plant Ecol. Evol.*, 147, 346–365.
- Heath, T. A., Hedtke, S. M. and Hillis, D. M. (2008) Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses. *J. Syst. Evol.*, 46, 239–257.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270, 313–321.
- Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. and Francis, C. M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biol.*, 2, e312.
- Heger, T. J., Mitchell, E. A. and Leander, B. S. (2013) Holarctic phylogeography of the testate amoeba *Hyalosphenia papilio* (Amoebozoa: Arcellinida) reveals extensive genetic diversity explained more by environment than dispersal limitation. *Mol. Ecol.*, 22, 5172–5184.
- Heger, T. J., Mitchell, E. A., Todorov, M., Golemansky, V., Lara, E., Leander B. S. and Pawlowski, J. (2010) Molecular phylogeny of euglypid testate amoeba (Cercozoa: Euglyphida) suggests transitions between marine supralittoral and freshwater/terrestrial environments are infrequent. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 55, 113–122.
- Hegewald, E. (2000) New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). *Algol. Stud.*, 96, 1–18.
- Hegewald, E., Wolf, M., Keller, A., Friedl, T. and Krienitz, L. (2010) ITS2 sequences-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycologia*, 49, 325–335.
- Hepperle, D., Nozaki, H., Hohenberger, S., Huss, V. A., Morita, E. and Krienitz, L. (1998) Phylogenetic position of the Phacotaceae within the Chlamydo-

- phyceae as revealed by analysis of 18S rDNA and *rbc* L sequences. *J. Mol. Evol.*, 47, 420–430.
- 樋渡宏一, 月井雄二 (1986) 原生動物の性と種の分化. 微生物の生態 14 (進化をめぐって). 日本微生物生態学会 (編), 学会出版センター, 東京, pp. 85–98.
- Ho, S. Y., Phillips, M. J., Cooper, A. and Drummond, A. J. (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol. Biol. Evol.*, 22, 1561–1568.
- Hoef-Emden, K. (2012) Pitfalls of establishing DNA barcoding systems in Protists: The Cryptophyceae as a test case. *PLOS ONE*, 7, e43652.
- Hoef-Emden, K. and Melkonian, M. (2003) Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist*, 154, 371–409.
- 堀学, 木村素子, 藤島政博 (1988) *Paramecium caudatum* の syngen の整理. 原生動物学雑誌, 21, 29–30.
- Hori, M., Tomioka, I., Przyboś, E. and Fujishima, M. (2006) Comparison of the evolutionary distances among syngens and sibling species of *Paramecium*. *Mol. Phylogent. Evol.*, 38, 697–704.
- Hu, X., Hu, X., Al-Rasheid, K. A. S., Al-Farraj, S. A. and Song, W. (2011) Insights into the phylogeny of sporadotrichid ciliates (Protozoa, Ciliophora: Hypotricha) based on genealogical analyses of multiple molecular markers. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 29, 96–102.
- Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P. and Kessler, E. (1999) Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 35, 587–598.
- Ichimura, T. (1981) Mating types and reproductive isolation in *Closterium ehrenbergii* Meneghini. *Botanical magazine Tokyo*, 94, 325–334.
- Jena, M., Bock, C., Behera, C., Adhikary, S. P. and Krienitz, L. (2014) Strain survey on three continents confirms the polyphyly of the genus *Pediastrum* (Hydrodictyaceae, Chlorophyceae). *Fottea*, 14, 63–76.
- Karnkowska-Ishikawa, A., Milanowski, R., Triemer, R. E. and Zakryś, B. (2012) Taxonomic revisions of morphologically similar species from two euglenoid genera: *Euglena* (*E. granulata* and *E. velata*) and *Euglenaria* (*Eu. anabaena*, *Eu. caudata* and *Eu. clavata*). *J. Phycol.*, 48, 729–739.
- Katz, L. A., McManus, G. B., Snoeyenbos-West, O. L., Griffin, A., Pirog, K., Costas, B. and Foissner, W. (2005) Reframing the 'Everything is everywhere' debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. *Aquat. Microb. Ecol.*, 41, 55–65.
- Kazama, T., Ishida, S., Shimano, S. and Urabe, J. (2012) Discrepancy between conventional morphological systematics and nuclear phylogeny of tintinnids (Ciliophora: Choreotrichia). *Plankton Benthos Res.*, 7, 111–125.
- Kher, C. P., Doerder, F. P., Cooper, J., Ikonomi, P., Achilles-Day, U., Küpper, F. C. and Lynn, D. H. (2011) Barcoding *Tetrahymena*: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox-1*) barcode. *Protist*, 162, 2–13.
- Kim, J. I. and Shin, W. (2008) Phylogeny of the Euglenales inferred from plastid LSU rDNA sequences. *J. Phycol.*, 44, 994–1000.
- Kostygov, A. Y., Grybchuk-Ieremenko, A., Malysheva, M. N., Frolov, A. O. and Yurchenko, V. (2014) Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist*, 165, 594–604.
- Kremp, A., Elbrächter, M., Schweikert, M., Wolny, J. L. and Gottschling, M. (2005) *Woloszynskia halophila* (Biecheler) comb. nov.: a blood-forming cold-water dinoflagellate co-occurrence with *Scrippsiella hangoei* (Diophyceae) in the Baltic sea. *J. Phycol.*, 41, 629–642.
- Krienitz, L., Bock, C., Luo, W. and Pröschold, T. (2010) Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae). *J. Phycol.*, 46, 559–563.
- Kudryavtsev, A., Bernhard, D., Schlegel, M., Chao, E. E.-Y. and Cavalier-Smith, T. (2005) 18S ribosomal RNA gene sequences of *Cochliopodium* (Himatismenida) and the phylogeny of Amoebozoa. *Protist*, 156, 215–224.
- Kusch, J., Welter, H., Stremmel, M. and Schmidt, H. J. (2000) Genetic diversity in populations of a freshwater ciliate. *Hydrobiologia*, 431, 185–192.
- Lahr, D. J., Grant, J. R. and Katz, L. A. (2013) Multigene phylogenetic reconstruction of the Tubulinea (Amoebozoa) corroborates four of the six major lineages, while additionally revealing that shell composition does not predict phylogeny in the Arcellinida. *Protist*, 164, 323–339.
- Lahr, D. J., Grant, J., Nguyen, T., Lin, J. H. and Katz, L. A. (2011) Comprehensive phylogenetic reconstruction of amoebozoa based on concatenated analyses

- of SSU-rDNA and actin genes. PLOS ONE, 6, e22780. doi:10.1371/journal.pone.0022780.
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F. and de Clerck, O. (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. CRC Crit. Rev. Plant Sci., 31, 1–46.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J. M., Zuccarello, G. C. and de Clerck, O. (2014) DNA-based species delimitation in algae. Eur. J. Phycol., 49, 179–196.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Wysor, B. and de Clerck, O. (2009) DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: algorithmic species delimitation in the *Boodlea* complex (Chlorophyta: Cladophorales). Mol. Phylogenet. Evol., 53, 122–133.
- Li, M., Ponce-Gordo, F., Grim, J. N., Wang, C. and Nilssen, F. (2014) New insights into the molecular phylogeny of *Balantidium* (Ciliophora, Vestibuliferida) based on the analysis of new sequences of species from fish hosts. Parasitol. Res., 113, 4327–4333.
- Liebers, D., de Kniff, P., and Helbig, A. J. (2004) The herring gull complex is not a ring species. Proc. Biol. Sci., 271, 893–901.
- Linton, E. W., Hittner, D., Lewandowski, C., Auld, T. and Triemer, R. E. (1999) A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. J. Eukaryot. Microbiol., 46, 217–223.
- Ludwig, M. and Gibbs, S. P. (1985) DNA is present in the nucleomorph of cryptomonads: further evidence that the chloroplast evolved from a eukaryotic endosymbiont. Protoplasta, 127, 9–20.
- Luo, W., Pröschold, T., Bock, C. and Krienitz, L. (2010) Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Plant Biol., 12, 545–553.
- Lynn, D. H. (2008) The ciliated protozoa: characterization, classification and guide to the literature. 3rd ed., Springer, New York.
- Marin, B., Klingberg, M. and Melkonian, M. (1998) Phylogenetic relationships among the Cryptophyta; analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. Protist, 149, 265–276.
- Markmann, M. and Tautz, D. (2005) Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 360, 1917–1924.
- Mayden, R. L. (1997) A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: Species: The units of biodiversity. Claridge, M. F., Dawah, H. A. and Wilson, M. R. (eds.). Chapman and Hall, London, pp. 381–424.
- Mayr, E. (1942) Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Harvard University Press, Cambridge.
- Medlin, L. K. and Kaczmarska, I. (2004) Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for major clades and a taxonomic revision. Phycologia, 43, 245–270.
- Merzlyak, E., Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., Alexandrov, K., Podlipaev, S. A. and Maslov, D. A. (2001) Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. J. Eukaryot. Microbiol., 48, 161–169.
- Mikrjukov, K. A., Siemensma, F. J. and Patterson, D. J. (2000) Phylum Heliozoa, In: The Illustrated Guide to the Protozoa (2nd ed.). Lee, J. J., Leedale, G. F. and Bradbury, P. (eds.), Society of Protozoologists, Lawrence, pp. 860–871.
- Montresor, M., Sgrosso, S., Procaccini, G. and Kooistra, W. H. (2003) Intraspecific diversity in *Scripsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species. Phycologia, 42, 56–70.
- Moreira, D., López-García, P. and Vickerman, K. (2004) An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1861–1875.
- Müller, A. N., Angeler, D. G., Samuel, R., Linton, E. W. and Triemer, R. E. (2001) Phylogenetic analysis of phagotrophic, phototrophic and osmotrophic euglenoids by using the nuclear 18S rDNA sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 783–791.
- Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J. and Wolf, M. (2007) Distinguishing species. RNA, 13, 1469–1472.
- Nakada, T., Misawa, K. and Nozaki, H. (2008) Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. Mol. Phylogenet. Evol., 48, 281–291.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. and Inouye, I. (1996) The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rRNA sequence data. Phycol. Res., 44, 47–55.
- Nakov, T., Ruck, E. C., Galachyants, Y., Spaulding, S. A. and Theriot, E. C. (2014) Molecular phylogeny of

- the Cymbellales (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) with a comparison of models for accommodating rate variation across sites. *Phycologia*, 53, 359–373.
- Nassonova, E., Smirnov, A., Fahrni, J. and Pawlowski, J. (2010) Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobosea amoebae. *Protist*, 161, 102–115.
- Negrisol, E., Maistro, S., Invarbone, M., Moro, I., Dalla Valle, L., Broady, P. A. and Andreoli, C. (2004) Morphological convergence characterizes the evolution of Xanthophyceae (Heterokontophyta): evidence from nuclear SSU rDNA and plastidial *rbcL* gene. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 33, 156–170.
- Nemjová, K., Neustupa, J., Št'astný, J., Škaloud, P. and Veselá, J. (2011) Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycol. Res.*, 59, 208–220.
- Neustupa, J., Němcová, Y., Eliáš, M. and Škaloud, P. (2009) *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycol. Res.*, 57, 159–169.
- Neustupa, J., Škaloud, P. and Št'astný, J. (2010) The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. *J. Phycol.*, 46, 703–714.
- Nikolaev, S. I., Berney, C., Fahrni, J. F., Bolivar, I., Polet, S., Mylnikov, A. P., Aleshin, V. V., Petrov, N. B. and Pawlowski, J. (2004) The twilight of Heliozoa and rise of Rhizaria, an emerging supergroup of amoeboid eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 8066–8071.
- Page, F. C. and Blanton, R. L. (1985) The Heterolobosea (Sarcodina: Rhizopoda), a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistologica*, 21, 121–132.
- Pánek, T. and Čepička, I. (2012) Diversity of Heterolobosea. In: Genetic diversity in microorganisms. Caliskan, M. (ed.). InTech, Rijeka, pp. 3–26.
- Pawlowski, J. (2008) The twilight of Sarcodina: a molecular perspective on the polyphyletic origin of amoeboid protists. *Protistology*, 5, 281–302.
- Payo, D. A., Leliaert, F., Verbruggen, H., D'hondt, S., Calumpong, H. P. and de Clerck, O. (2012) Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. *Proc. Biol. Sci.*, 280, 20122660.
- Podlipaev, S. A., Sturm, N. R., Fiala, I., Fernandes, O., Westenberger, S. J., Dollet, M., Campbell, D. A. and Lukes, J. (2004) Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51, 283–290.
- Pollock, D. D., Zwickl, D. J., McGuire, J. A. and Hillis, D. M. (2002) Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst. Biol.*, 51, 664–671.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D. and Vogler, A. P. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol.*, 55, 595–609.
- Preisfeld, A., Berger, S., Busse, I., Liller, S. and Ruppel, H. G. (2000) Phylogenetic analyses of various euglenoid taxa (Euglenozoa) based on 18S rDNA sequence data. *J. Phycol.*, 36, 220–226.
- Preisfeld, A., Busse, I., Klingberg, M., Talke, S. and Ruppel, H. G. (2001) Phylogenetic position and interrelationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 751–758.
- Pröschold, T., Bock, C., Luo, W. and Krienitz, L. (2010) Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.*, 58, 1–8.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U. G. and Melkonian, M. (2001) Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. n. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, 152, 265–300.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G. (2012) ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.*, 21, 1864–1877.
- Saldarriaga, J. F., "Max" Taylor, F. J. R., Cavalier-Smith, T., Menden-Deuer, S. and Keeling, P. J. (2004) Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates. *Eur. J. Protistol.*, 40, 85–111.
- Salomaki, E. D., Kwadrans, J., Eloranta, P. and Vis, M. L. (2014) Molecular and morphological evidence for *Sheathia* gen. nov. (Batrachospermales, Rhodophyta) and three new species. *J. Phycol.*, 50, 526–542.

- Santoferrara, L. F., McManus, G. B. and Alder, V. A. (2012) Phylogeny of the order Tintinnida (Ciliophora, Spirotrichea) inferred from small- and large subunit rRNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59, 423–426.
- Scheckenbach, F., Wylezich, C., Mylnikov, A. P., Weitere, M. and Arndt, H. (2006) Molecular comparisons of freshwater and marine isolates of the same morphospecies of heterotrophic flagellates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6638–6643.
- Schlegel, M. and Meisterfeld, R. (2003) The species problem in protozoa revisited. *Eur. J. Protistol.*, 39, 349–355.
- Schmidt, S. L., Bernhard, D., Schlegel, M. and Foissner, W. (2007) Phylogeny of the Stichotrichia (Ciliophora; Spirotrichea) reconstructed with nuclear small subunit rRNA gene sequences: Discrepancies and accordances with morphological data. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 54, 201–209.
- Senousy, H. H., Beakes, G. W. and Hack, E. (2004) Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 40, 412–423.
- Shao, C., Gao, F., Hu, X., Al-Rasheid, K. A. S. and Warren, A. (2011) Ontogenesis and molecular phylogeny of a new marine urostyleid ciliate, *Anteholosticha petzi* n. sp. (Ciliophora, Urostylelida). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 58, 254–265.
- Simpson, A. G., Inagaki, Y. and Roger, A. J. (2006) Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of "primitive" eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 23, 615–625.
- Simpson, A. G., Lukes, J. and Roger, A. J. (2002) The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 2071–2083.
- Singh, J. and Kamra, K. (2014) Molecular phylogeny of an Indian population of *Kleinstyla dorsicirrata* (Foissner, 1982) Foissner et al., 2002. comb. nov. (Hypotrichia, Oxytrichidae): an oxytrichid with incomplete dorsal kinyte fragmentation. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 61, 630–636.
- Škaloud, P., Lukešová, A., Malavasi, V., Ryšánek, D., Hřčková, K. and Rindi, F. (2014) Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Plant Ecol. Evol.*, 147, 333–345.
- Škaloud, P., Št'astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Pouličková, A. and Neustupa, J. (2012) Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnemataphyceae). *Plant Syst. Evol.*, 298, 1281–1292.
- Smirnov, A. V., Chao, E., Nassonova, E. S. and Cavalier-Smith, T. (2011) A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist*, 162, 545–570.
- Smirnov, A. V., Nassonova, E. S., Chao, E. and Cavalier-Smith, T. (2007) Phylogeny, evolution, and taxonomy of vannellid amoebae. *Protist*, 158, 295–324.
- Snoeyenbos-West, O. L., Salcedo, T., McManus, G. B. and Katz, L. A. (2002) Insight into the diversity of choreotrich and oligotrich ciliates (Class: Spirotrichea) based on genealogical analyses of multiple loci. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 52, 1901–1913.
- Song, W., Wilbert, N., Li, L. and Zhang, Q. (2011) Re-evaluation of the diversity of the polyphyletic genus *Metaurostylopsis* (Ciliophora, Hypotricha): ontogenetic, morphologic, and molecular data suggest the establishment of a new genus *Apourostylopsis* n. g. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 58, 11–21.
- Sonneborn, T. M. (1937) Sex, sex inheritance and sex determination in *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 23, 378–385.
- Sonneborn, T. M. (1957) Breeding systems, reproductive methods, and species problems in Protozoa. *In: The Species Problem*. Mayr, E. (ed.). American Association for the Advancement of Science, Washington, D. C., pp. 155–324.
- Sonneborn, T. M. (1975) The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 94, 155–178.
- Stoeck, T., Welter, H., Seitz-Bender, D., Kusch, J. and Schmidt, H. J. (2000) ARDRA and RAPD-fingerprinting reject the sibling species concept for the ciliate *Paramecium caudatum* (Ciliophora, Protoctista). *Zool. Scr.*, 29, 75–82.
- Strüder-Kypke, M. C. and Lynn, D. H. (2010) Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliate (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Systematics and Biodiversity*, 8, 131–148.
- Tarcz, S., Przyboś, E. and Surmacz, M. (2013) An assessment of haplotype variation in ribosomal and mitochondrial DNA fragments suggests incomplete lineage sorting in some species of the *Paramecium aurelia* complex (Ciliophora, Protozoa). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 67, 255–265.
- Tsukii, Y. (1988a) Mating-type inheritance. *In: Parame-*

- cium*. Görtz, H.-D. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 59–69.
- Tsukii, Y. (1988b) Genetic and chromosomal instability and induction of aneuploidy in *Paramecium*. In: Aneuploidy, Part B: Induction and test system. Vig, B. K. and Sandberg, A. A. (eds.). Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 209–225.
- Tsukii, Y. (1994) Evolution of mitochondrial DNA in *Paramecium caudatum*. Jpn. J. Genet., 69, 307–319.
- Tsukii, Y. (1996) Genetic diversity among natural stocks of *Paramecium caudatum* revealed by RAPD markers. Eur. J. Protistol., 32(Suppl.), 162–169.
- 月井雄二 (1999) 接合型の遺伝とシンジェン. ゾウリムシの遺伝学. 樋渡宏一 (編), 東北大学出版会, 仙台, pp. 1–13.
- Tsukii, Y. and Hiwatashi, K. (1983) Genes controlling mating-type specificity in *Paramecium caudatum*: three loci revealed by interspecific crosses. Genetics, 104, 41–62.
- Tsukii, Y. and Hiwatashi, K. (1985) Meiotic nondisjunction and aneuploids in interspecific hybrids of *Paramecium caudatum*. Genetics, 111, 779–794.
- Vd'ačný, P., Bourland, W. A., Orsi, W., Epstein, S. S. and Foissner, W. (2011) Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. Mol. Phylogenet. Evol., 59, 510–522.
- von der Heyden, S., Chao, E. E., Vickerman, K. and Cavalier-Smith, T. (2004) Ribosomal RNA phylogeny of bodinid and diplomid flagellates and the evolution of Euglenozoa. J. Eukaryot. Microbiol., 51, 402–416.
- Watanabe, M. M. and Ichimura, T. (1978) Biosystematic studies of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. II. Reproductive isolation and morphological variation among the several populations from the northern Kanto area in Japan. Botanical magazine Tokyo, 91, 1–10.
- Watson, P. M., Sorrell, S. C. and Brown, M. W. (2014) *Ptolemeba* n. gen., a novel genus of Hartmannellid amoebae (Tubulinea, Amoebozoa); with an emphasis on the taxonomy of *Saccamoeba*. J. Eukaryot. Microbiol., 61, 611–619.
- Wylezich, C., Meisterfeld, R., Meisterfeld, S. and Schlegel, M. (2002) Phylogenetic analyses of small subunit ribosomal RNA coding regions reveal a monophyletic lineage of euglyphid tested amoeba (order Euglyphida). J. Eukaryot. Microbiol., 49, 108–118.
- Yi, Z., Dunthorn, M., Song, W. and Stoeck, T. (2010a) Increasing taxon sampling using both unidentified environmental sequences and identified cultures improves phylogenetic inference in the Prorodontida (Ciliophora, Prostomatea). Mol. Phylogenet. Evol., 57, 937–941.
- Yi, Z., Lin, X., Warren, A., Al-Rasheid, K. A. S. and Song, W. (2010b) Molecular phylogeny of *Nothoholosticha* (Protozoa, Ciliophora, Urostylelida) and systematic relationships of the *Holosticha*-complex. Systematics and Biodiversity, 8, 149–155.
- Yi, Z., Song, W., Clamp, J. C., Chen, Z., Gao, S. and Zhang, Q. (2009) Reconsideration of systematic relationships within the order Euplotida (Protista, Ciliophora) using new sequences of the gene coding for small-subunit rRNA and testing the use of combined data sets to construct phylogenies of the *Diophrys*-complex. Mol. Phylogenet. Evol., 50, 599–607.
- Zhang, H., Bhattacharya, D. and Lin, S. (2007) A three-gene dinoflagellate phylogeny suggests monophyly of Prorocentrales and a basal position for *Amphidinium* and *Heterocapsa*. J. Mol. Evol., 65, 463–474.
- Zhang, H., Bhattacharya, D., Marahda, L. and Lin, S. (2008) Mitochondrial *cob* and *cox1* genes and editing of the corresponding mRNAs in *Dinophysis acuminata* from Narragansett Bay, with special reference to the phylogenetic position of the genus *Dinophysis*. Appl. Environ. Microbiol., 74, 1546–1554.
- Zhang, Q., Miao, M., Strüder-Kypke, M. C., Al-Rasheid, K. A. S., Al-Farraj, S. A. and Song, W. (2011) Molecular evolution of *Cinetochilum* and *Sathrophilus* (Protozoa, Ciliophora, Oligohymenophorea), two genera of ciliates with morphological affinities to scuticociliates. Zool. Scr., 40, 317–325.
- Zhang, Q., Yi, Z., Fan, X., Warren, A., Gong, J. and Song, W. (2014) Further insights into the phylogeny of two ciliate classes Nassophorea and Prostomatea (Protista, Ciliophora). Mol. Phylogenet. Evol., 70, 162–170.
- Zhou, L., Sriram, R., Visvesvara, G. S. and Xiao, L. (2003) Genetic variations in the internal transcribed spacer and mitochondrial small subunit rRNA gene of *Naegleria* spp. J. Eukaryot. Microbiol., 50, 522–526.
- Zuccarello, G. C. and Lokhorst, G. M. (2005) Molecular phylogeny of the genus *Tribonema* (Xanthophyceae) using *rbcL* gene sequence data: monophyly of morphologically simple algal species. Phycologia, 44, 384–392.

Zwickl, D. J. and Hillis, D. M. (2002) Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Syst. Biol.*, 51, 588–598.