

## MiFishによる種の識別に注意を要する淡水魚類の判定基準

その種名がついた配列（対象種の配列）を含む樹形図が①または②に該当する種は「MiFish で識別困難な種」とし、③に該当する種は「MiFish で識別できる場合もあるが、識別の信頼性が低い種」として整理する。

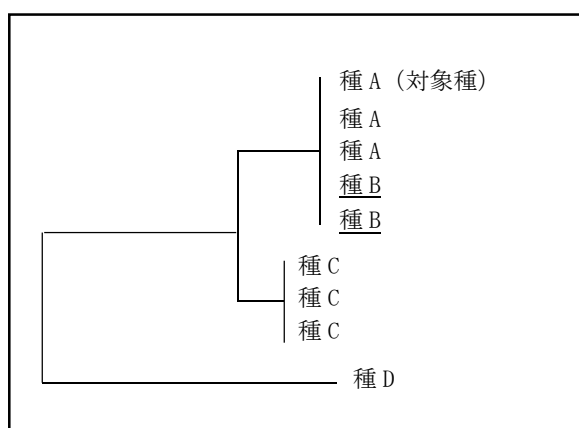
ただし、この判定基準には次の前提条件が含まれていることに留意しておくこと。

- ・公共データベースを使用しているため、誤ったリファレンス情報（同定ミス、実験ミス、種名変更など）が含まれている可能性があること。
- ・データベースにリファレンス情報が登録されていない種があること。

樹形図が①または②のいずれかにあてはまる場合、「MiFish で識別困難な種」と判定する。

①対象種の配列と、一致率 100%の別種の配列がある

ただし、「別種」には、同種の別名・旧名（シノニム）、未同定種（属名+sp.）、交雑種や飼育品種、および明らかな誤同定は含まないものとする。

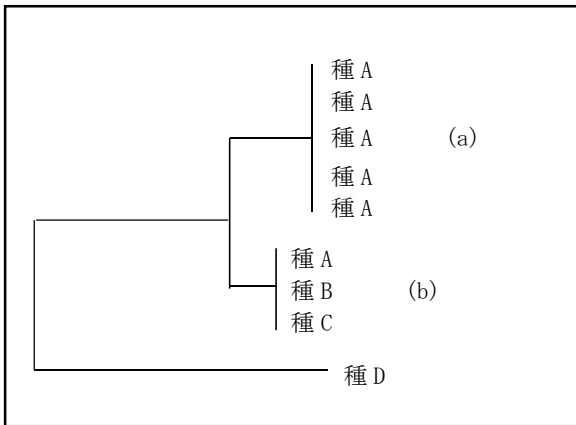


この樹形図では、横向きの長さが塩基配列の違いの大きさ（距離）を示しており、塩基配列が同一のデータは枝の末端に縦一列に並ぶ。

① 種 A と種 B は識別困難

②対象種の配列が、樹形図上の複数の枝に出てきており、かつ、そのいずれかの枝の末端に別種の配列がある

- ※1) 1 種類の中に、塩基配列の変異がある場合があり（種内変異）、判定が難しくなっている。
- ※2) ただし、判定対象配列に 100%一致する種が 1 種だけの場合は、その種と判定することが可能。



②種 A と種 B と種 C は識別困難

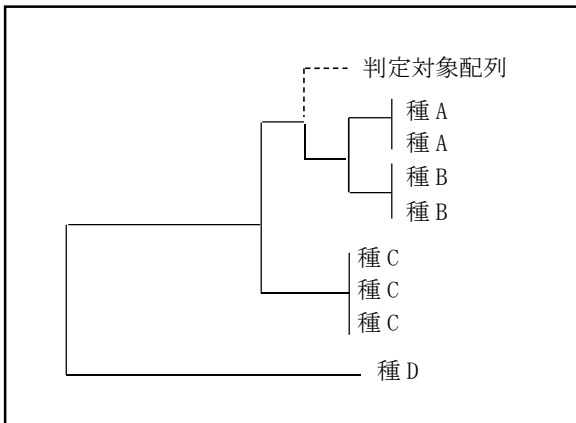
解析結果が「種 A」だった場合、塩基配列をチェックする必要がある。  
 最も一致度の高い塩基配列が(a)だった場合は種 A としてよいが、(b)だった場合は「種 A、種 B、種 C のいずれか」

③の場合、「MiFish で識別できる場合もあるが、識別の信頼性が低い種」とする。

③判定対象種と 97%以上一致する別種の塩基配列がデータベースに登録されている

MiFish では解析で得られた塩基配列がデータベースの塩基配列と 97%以上一致していれば、最も一致率の高い配列を用いて種名判定を行う。データベース上の種 A と種 B の配列が 97%以上一致している場合、解析で得られた塩基配列によっては種 A、種 B と同率の一致率になる可能性がある。このように、得られた塩基配列が種 A または種 B と 100%一致すれば識別できるが、100%一致する配列がない場合には識別できないことがあるので、識別の信頼性が低いと判定する。

※解析結果で得られた種名が「識別の信頼性が低い種」に入っている場合、解析結果の塩基配列と最も一致度が高い塩基配列が 1 種だけか、配列検索および系統樹作成により確認する必要がある。



③種 A と種 B は識別の信頼性が低い

解析結果が「種 A」または「種 B」だった場合、塩基配列をチェックする必要がある。  
 図の場合、種 A と種 B の両方と一致率は同じであるため、どちらの種か識別できない。

MiFish 分析 (NGS によるアンプリコン分析) では、分析の仕組み上、本来ある塩基配列とわずかに異なる塩基配列が分析結果に出現することを避けることができません。

仮にある種に対応する配列が 10,000 リード得られたとすると、そのうち本来の配列は約 7,000 リードで、残りの 3,000 リードは本来の配列と 1~3 塩基程度異なる配列になります。このような塩基配列の違いは、PCR 反応時の複製間違いや NGS の塩基の読み間違いによるものです。このように機械的な配列の変異はランダムに起こるので、リード数が少ない場合は、たとえ近縁の別種と対応する配列が 1 塩基違いであったとしても、その配列にぴったり一致する配列ができる可能性は低いです。しかし、リード数が多い場合には、97%以上一致する別種の配列がある場合は、偶然別種の配列に一致する配列ができてしまい、出現種リストに現れてしまう可能性があります。

「識別の信頼性が低い種」のリストで同じ組に含まれる種が複数出た場合は、リード数の多い種だけは本来の出現種である可能性を検討する必要があります。

また、一つの種名に対応する複数の塩基配列の間で一致率が 97%未満の場合、遺伝的に分かれる地域個体群や隠蔽種が存在している可能性があります。この場合は、種名で整理した結果、せっかく MiFish で識別した遺伝子型情報を捨ててしまうことになるので注意が必要です。

なお、一部の種では MiFish プライマー付着部分のミスマッチが報告されていますが、本リストはバーコーディング領域の塩基配列のみを比較し、整理したものです。