

rDNA ITS 領域の塩基配列による *Salacia chinensis* の鑑別

中村恭子^a, 赤木淳二^{a,b}, 石伏史明^a, 谷 恭輔^a, 森川敏生^{a,c},
 Pongpiriyadacha Yutana^d, 村岡 修^{a,b,c}, 早川堯夫^a, 角谷晃司^{a,c,*}
 近畿大学^a 薬学総合研究所,^b 薬学部,^c アンチエイジングセンター,^d Rajamangala 工科大学

Discrimination of *Salacia chinensis* Based on the DNA Sequence of the rDNA ITS Region

Kyoko Nakamura^a, Junji Akaki^{a,b}, Fumiaki Ishibushi^a, Kyosuke Tani^a, Toshio Morikawa^{a,c},
 Yutana Pongpiriyadacha^d, Osamu Muraoka^{a,b,c},
 Takao Hayakawa^a and Koji Kakutani^{a,c,*}

^a Pharmaceutical Research and Technology Institute, ^b School of Pharmacy, ^c Antiaging Centre, Kinki University,
 3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka, Osaka 577-8502, Japan

^d Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungyai,
 Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand

(Received December 18, 2014)

Genus *Salacia* (Hippocrateaceae) contains woody climbing plants widely distributed in India, Sri Lanka, China, and Southeast Asian countries. The stems and roots of some species of the plant have traditionally been used as a specific remedy for early-stage diabetes in Ayurvedic medicine. Recently, a variety of health foods and beverages made from the extracts of *Salacia* genus plants claiming the prevention and/or control of diabetes has been developed in Japan and North America. In order to distinguish and identify the species of the genus *Salacia* plants genetically, DNA sequences in the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal RNA gene (nrDNA) with respect to three species of the plant, *i.e.*, *S. reticulata*, *S. oblonga*, and *S. chinensis*, collected in Sri Lanka, India and Thailand were analyzed and compared with each other. Among them a characteristic feature discriminable from the other two species was observed with respect to the DNA sequence of the samples identified as *S. chinensis*. On the other hand, no distinct difference or character which led to the identification of *S. reticulata* or *S. oblonga* was observed in the present study.

Keywords: internal transcribed spacer region; nuclear ribosomal RNA gene; *Salacia chinensis*; *Salacia reticulata*; *Salacia oblonga*

緒 言

デチンムル科 (Hippocrateaceae) *Salacia* 属植物は、インドやスリランカをはじめ、タイやインドネシアなどの東南アジアおよびブラジル、オーストラリアなどの熱帯地域に広く分布しているつる性の多年性木本であり、120 種以上が知られている¹⁾。なかでもインドやスリランカ、タイに多く自生する *Salacia reticulata*, *S. oblonga* および *S.*

chinensis は、南インドを発祥とするアーユルヴェーダや東南アジア諸国の伝承医学において、その根および幹部が糖尿病の予防や糖尿病の初期段階における治療に有用であるとされている¹⁻³⁾。我々はこれまでに、これらの *Salacia* 属植物の抽出エキスに顕著な α -グルコシダーゼ阻害活性を見いだすと同時に、ラット糖負荷試験における血糖上昇抑制効果を報告している^{1,4)}。さらに、その活

Table 1. Data of Authentic *Salacia* sp. Samples

<i>Salacia</i> species	Sample No.	Acc. No.	Collection		
			Date	Area	Part
<i>Salacia reticulata</i>	SR-1	LC010118	2011	Sri Lanka	Leaf
	SR-2	LC010119	2007	Sri Lanka	Leaf
	SR-3	LC010120	2007	Sri Lanka	Leaf
<i>Salacia oblonga</i>	SO-1	LC010117	2007	India	Leaf
<i>Salacia chinensis</i>	SC-1	LC010227	2011.3	Trang, Thailand	Stem
	SC-2	LC010228	2011.3	NST, ^{a)} Thailand	Stem
	SC-3	LC010229	2011.3	NST, ^{a)} Thailand	Stem
	SC-4	LC010230	2011.3	Trang, Thailand	Stem
	SC-5	LC010231	2011.3	Krabi, Thailand	Stem
	SC-6	LC010232	2011.3	Krabi, Thailand	Stem
	SC-7	LC010233	2011.3	NST, ^{a)} Thailand	Stem

^{a)}Nakhon Si Thammarat

性寄与成分として 8 種のチオ糖スルホニウム類を明らかにしている⁵⁻¹³⁾。

近年これらの *Salacia* 属植物は、主に食後血糖値の上昇を抑える健康食品素材としての利用が高まり、飲料や顆粒剤、錠剤などのさまざまな食品形態で広く流通している。種の異なる幾つかのエキスについて、ヒトを対象にした評価も行われており、その食後過血糖抑制作用に関する有効性と安全性が報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。一方、昨今の消費者の食の安全への関心の高まりを背景に、食品の品質を一定に保つことが安全性のみならず有効性の観点からも重要視されており、特に天然物を原材料とする場合、種や使用部位といった基原情報の正しい原材料を使用することは品質保証における前提条件となっている。*Salacia* 属植物においては、従来より活性成分を指標とした品質評価¹⁷⁻¹⁹⁾や外部形態や内部組織形態といった形態学的特徴による基原種の鑑別^{20,21)}が行われている。一方、薬用部位である根や幹部は断片化された木片や粉末の状態市場に流通していることが多く、形態学的特徴を失っている時の基原種の同定は困難である。これに対して近年では、形態学的特徴を必要としない基原種の同定法として、遺伝子情報を利用した検討が盛んに行われている²²⁻²⁵⁾。そこで我々は、*Salacia* 属植物の形態学的特徴による同定法を支援する目的で、系統学的解析で広く用いられている核リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子 (nrDNA) のスペーサー (internal transcribed spacer: ITS) 領域^{26,27)}に着目し、*S. reticulata*, *S. oblonga*, および *S. chinensis* について、その塩基配列を解析するとともに、インドやスリランカ、タイの市場に流通する *Salacia* 植物の基原鑑別を行った。

実験材料および方法

1. 実験材料

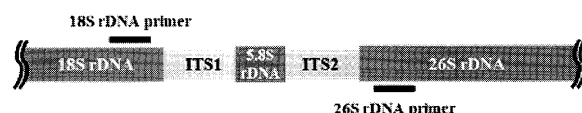


Fig. 1. Schematic representation of rDNA, ITS and primer locations.

Table 2. List of Accession Numbers Applied in Primer Design

rDNA	Species	Acc. No.
18S rDNA	<i>Panax japonicus</i>	D84100
	<i>P. pseudoginseng</i> var. <i>angustifolius</i>	AB088019
	<i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	AB044901
	<i>Tapiscia sinensis</i>	AF207034
	<i>Anisophyllea fallax</i>	AF534775
	<i>Conopholis alpina</i>	AF039068
	<i>Corallocarpus bainesii</i>	AF008955
	<i>Flacourtia jangomas</i>	AF206912
	<i>Luffa quinquefida</i>	AF008957
	<i>Marah macrocarpus</i>	AF008956
	<i>Plagiopteron suaveolens</i>	AF206993
	<i>Quiina pteridophylla</i>	AF207003
	26S rDNA	<i>Citrus limon</i>
<i>Disanthus cercidifolius</i>		AF479218
<i>Geranium sanguineum</i>		AF479129
<i>Pleurostylia leucocarpa</i>		AF222405
<i>Siphonodon australis</i>		AF222346
<i>Mortonia greggii</i>		AF222380
<i>Salacia impressifolia</i>		AF222431
<i>Salacia nitida</i>		AF222428
<i>Kokoona</i> sp.		AF222409
<i>Licania heteromorpha</i>		AF222370
<i>Putterlickia verrucosa</i>		DQ217434

標準植物として、それぞれの自主地域より採取し、著者の一人である Dr. P. Yutana によって基原種が同定された *S. reticulata* 3 株 (SR-1-3), *S. oblonga* 1 株 (SO-1) および *S. chinensis* 7 株 (SC-1-7) を使用した (Table 1)。また、市場品として、インドやスリランカ、およびタイで *Salacia* 属植物として流通する 15 種 (M-01-15) を使用した。なお、これらの植物サンプルは、近畿大学薬学総合研究所に保管されている。

2. プライマーの設計

植物などの真核生物の nrDNA には 3 つの rRNA (18S,

5.8S, 26S) をコードしている遺伝子領域 (18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA) があり, 18S と 5.8S および 5.8S と 26S の各 rDNA の間には, RNA を転写しない ITS1 および ITS2 領域が存在し, 系統解析マーカーとして有用とされている²⁸⁾ (Fig.1). そこで *Salacia* 属植物の ITS 領域の塩基配列を明らかにする目的で, 植物間で塩基配列が高度に保存されている 18S rDNA および 26S rDNA にプライマーを設計し, 設計したプライマーセットを用いて, 両 rDNA に挟まれた ITS 領域を PCR 増幅させることとした. GenBank の登録情報より Table 2 に示した植物の 18S および 26S rDNA の塩基配列を選択し, これらに共通する塩基配列のうちできるだけ ITS 領域に近い部分にプライマー (18S rDNA primer : 5'-GATTGAATGGTCCGGTGAAGT-3', 26S rDNA primer : 5'-CGCTTCTCCAGACTACAATTCG-3') を設計した (Fig. 1). 設計したプライマーの *Salacia* 属植物への適応性を評価するため, 標準植物である *S. reticulata* (SR-1-3), *S. oblonga* (SO-1), および *S. chinensis* (SC-1-7) から鋳型となる DNA を抽出し, PCR 増幅を検討したところ, すべての検体から予測サイズと一致する 970 bp 付近の DNA 断片が増幅し, 本プライマーが *Salacia* 属植物の ITS 領域を含む DNA 断片の増幅に適応可能であることが確認できた.

3. DNA 抽出と PCR

全 DNA は Cheng らの改変 CTAB 法²⁹⁾ により, 破碎した葉組織, 根または幹組織から抽出した. ITS 領域を含む DNA 断片を増幅するため, 抽出した DNA を鋳型として PCR を行った. PCR 反応液の組成は, 設計したプライマーを各 0.5 μ l, 鋳型 DNA 100 ng, AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社製) を 12.5 μ l, 滅菌水を加えて全量 25 μ l とした. PCR の条件は, 初期ステップ 95°C 5 分後, 変性を 95°C で 30 秒, アニーリングを 58°C で 30 秒, 伸長を 72°C で 1 分間行い, これを 40 回反復し, 最終伸長を 72°C で 5 分間行った.

4. 塩基配列の解析

PCR により得られた DNA 断片の塩基配列を解析するため, DNA 断片をクローニングベクター (pGEM-T Easy Vector: Promega 社製) に挿入し, 得られたプラスミド DNA を BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いてシーケンス反応を行った. プライマーは, M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') および M13 reverse

(5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') を使用した. シーケンス反応後, 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies 社製) で解析し, 塩基配列を決定した. さらに遺伝情報処理ソフトウェア ClustalX v. 2.1 を用いて alignment 解析を行い, また, 系統解析ソフトウェア MEGA v. 6.0 を用いて, 系統樹 (Neighbor-Joining 法, ブートストラップ 1000 回) を作成した.

結果および考察

1. *Salacia* 属植物の塩基配列解析

標準植物から得られた DNA 断片について塩基配列を決定し, 日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) の登録番号 (Accession number, Acc. No.) を得た (Table 3). 得られた配列から他の *Salacia* 属植物との遺伝的な距離を調べる目的で, GenBank に登録されている *Salacia* 属植物の ITS 配列情報 (*S. alwynii* : FJ705520, *S. cordata* : FJ705521, *S. crassifolia* : FJ705522, *S. disepala* : FJ705523, *S. elliptica* : FJ705524, *S. erythrocarpa* : FJ705525, *S. gerrardii* : FJ705526, *S. madagascariensis* : FJ705527, *S. nitida* : FJ705528, *S. owabiensis* : FJ705529, *Salacia* sp. : FJ705530, *S. arborea* : FJ705531, *S. chinensis* : HM230110, *S. grandifolia* : HM230111, *S. krigsneri* : HM230112) をもとに系統樹の作成を行ったところ, *S. reticulata*, *S. oblonga*, および *S. chinensis* は *S. erythrocarpa* から分岐したグルー

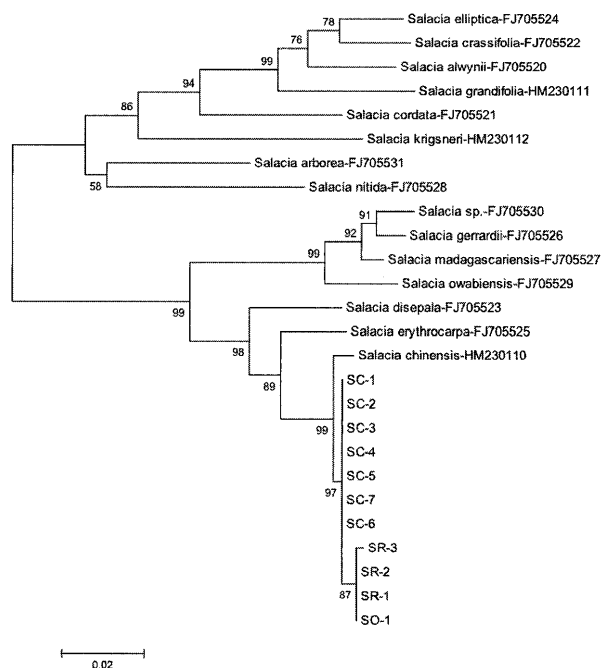


Fig. 2. Phylogenetic Tree of DNA Sequences of the ITS Region^{d)}
^{d)} Numbers and branch length represent sequence divergence.

Table 3. Sequence Alignment of ITS Region of Authentic *Salacia* Species

<i>Salacia</i> Species	Sample No.	Acc. No.	ITS1										
			168	183	200	201	226	229	260	261	262	271	376
<i>S. reticulata</i>	SR-1	LC010118	G	A	T	C	A	C	T	C	G	T	C
	SR-2	LC010119
	SR-3	LC010120	A
<i>S. oblonga</i>	SO-1	LC010117	.	A/C
<i>S. chinensis</i>	SC-1	LC010227	.	C	C	G	A	.	.
	SC-2	LC010228	.	C	C	G	A	.	.
	SC-3	LC010229	.	C	C	G	A	.	.
	SC-4	LC010230	.	C	C	G	A	.	.
	SC-5	LC010231	.	C	C	G	A	.	.
	SC-6	LC010232	.	C	C	G	A	.	.
	SC-7	LC010233	.	C	C	G	A	.	.
	Ref. ³⁰⁾	HM230110	.	C	C	G	G	—	C	G	A	A	A

<i>Salacia</i> Species	Sample No.	ITS2					Genotype
		609	760	761	762	763	
<i>S. reticulata</i>	SR-1	—	—	—	—	—	Type 1
	SR-2	—	—	—	—	—	Type 1
	SR-3	—	—	—	—	—	Type 2
<i>S. oblonga</i>	SO-1	—	—	—	—	—	Type 3
<i>S. chinensis</i>	SC-1	G	—	—	—	—	Type 4
	SC-2	G	—	—	—	—	Type 4
	SC-3	G	C	A	G	G	Type 5
	SC-4	—	C	A	G	G	Type 6
	SC-5	G	C	A	G	G	Type 5
	SC-6	G	C	A	G	G	Type 5
	SC-7	—	T	A	G	G	Type 7
	Ref. ³⁰⁾	G	—	—	—	—	Type 8

プであり、これらの 3 種は、進化距離の非常に短い遺伝的な近縁種であると考えられた (Fig. 2).

次にこれらの 3 種の識別に利用可能な配列を検討するため、それぞれの配列について alignment 解析を行った (Table 3). その結果、*S. reticulata* (SR-1-3) については、SR-1 と SR-2 で同一配列を示すのに対し、SR-3 では ITS1 領域 168 位に「G→A」の塩基置換が認められ、*S. reticulata* には 2 つの遺伝子タイプ (Type 1, Type 2) が認められた。また *S. reticulata* (SR-1-3) と *S. oblonga* (SO-1) について比較したところ、SO-1 の ITS1 領域 183 位は A もしくは C のヘテロ (Type 3) が認められた。しかし、それ以外では両種を区別できるような配列は見いだせず、*S. reticulata* および *S. oblonga* の間では ITS 領域の塩基配列が高度に保存されているものと考えられた。これに対し、*S. chinensis* (SC-1—7) では、ITS1 領域 183 位において「A→C」の塩基置換、ITS1 領域 260—262 位において「TCG→CGA」の塩基置換が共通して認められ、さらに ITS2 領域については一部の検体で 609 位に「G」、760—763 位に「CAGG もしくは TAGG」の挿入が確認された。これらの特徴はオーストラリア産 *S. chinensis* : HM230110³⁰⁾ においても認められ、*S. chinensis* には 5 種

類の遺伝子タイプ (Type 4—8) が確認された。

以上のことから、*S. reticulata* と *S. oblonga* では ITS 領域の配列が類似しているため、鑑別困難であるのに対し、*S. chinensis* については *S. reticulata* および *S. oblonga* と区別可能な特徴的な遺伝子タイプを示すことから、これらの特徴が *S. chinensis* の識別に利用可能であると考えられた。

2. ITS 領域の配列による市場品 *Salacia* 属植物の鑑別

S. reticulata, *S. oblonga* および *S. chinensis* として流通する市場品 (根もしくは幹部) をそれぞれ 5 種類ずつ、合計 15 種を入手した (Table 4). いずれも木片もしくは粉末の状態で流通していたため、形態的特徴から基原種を鑑別するのは困難であった。これらの市場品について DNA を抽出した後、設計したプライマーにて PCR 増幅させ、ITS 領域の塩基配列を決定した。その結果、Table 4 に示すようにスリランカで入手した 3 検体 (M-01—03) およびインドで入手した 2 検体 (M-09, M-10) については、いずれも Type 1 と共通する遺伝子タイプが認められ、ITS 領域の塩基配列からは製品の表示名称のとおり *S. reticulata* もしくは *S. oblonga* であると推定された。また、タイから入手した 5 検体 (M-11—15) については、Type 4

Table 4. Discrimination of *Salacia* Samples Obtained in Markets by DNA Sequencing Data of PCR Products

Sample No.	Representation in Market		Collection		ITS1										
	Origin	Part	Date	Area	168	183	200	201	226	229	260	261	262	271	376
M-01	<i>S. reticulata</i>	root	2011	Sri Lanka	G	A	T	C	A	C	T	C	G	T	C
M-02	<i>S. reticulata</i>	stem	2010	Sri Lanka	.	A	T	C	G	.	.
M-03	<i>S. reticulata</i>	root	2011	Sri Lanka	.	A	T	C	G	.	.
M-04	<i>S. reticulata</i>	stem	2010	India	.	C	C	G	A	.	.
M-05	<i>S. reticulata</i>	root	2010	India	.	C	C	G	A	.	.
M-06	<i>S. oblonga</i>	root	2006	India	.	C	C	G	A	.	.
M-07	<i>S. oblonga</i>	root	2010	India	.	C	C	G	A	.	.
M-08	<i>S. oblonga</i>	root	2010	India	.	C	C	G	A	.	.
M-09	<i>S. oblonga</i>	root	2010	India	.	A	T	C	G	.	.
M-10	<i>S. oblonga</i>	root	2010	India	.	A	T	C	G	.	.
M-11	<i>S. chinensis</i>	stem	2008	Thailand	.	C	C	G	A	.	.
M-12	<i>S. chinensis</i>	stem	2008	Thailand	.	C	C	G	A	.	.
M-13	<i>S. chinensis</i>	stem	2007	Thailand	.	C	C	G	A	.	.
M-14	<i>S. chinensis</i>	stem	2008	Thailand	.	C	C	G	A	.	.
M-15	<i>S. chinensis</i>	stem	2009	Thailand	.	C	C	G	A	.	.

Sample No.	ITS2					Genotype	Distinguished <i>Salacia</i> Species
	609	760	761	762	763		
M-01	—	—	—	—	—	Type 1	<i>S. reticulata</i>
M-02	—	—	—	—	—	Type 1	<i>S. reticulata</i>
M-03	—	—	—	—	—	Type 1	<i>S. reticulata</i>
M-04	—	C	A	G	G	Type 6	<i>S. chinensis</i>
M-05	—	C	A	G	G	Type 6	<i>S. chinensis</i>
M-06	—	C	A	G	G	Type 6	<i>S. chinensis</i>
M-07	—	C	A	G	G	Type 6	<i>S. chinensis</i>
M-08	—	C	A	G	G	Type 6	<i>S. chinensis</i>
M-09	—	—	—	—	—	Type 1	<i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i>
M-10	—	—	—	—	—	Type 1	<i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i>
M-11	—	C	A	G	G	Type 6	<i>S. chinensis</i>
M-12	G	C	A	G	G	Type 5	<i>S. chinensis</i>
M-13	G	—	—	—	—	Type 4	<i>S. chinensis</i>
M-14	G	C	A	G	G	Type 5	<i>S. chinensis</i>
M-15	—	T	A	G	G	Type 7	<i>S. chinensis</i>

—7 のいずれかの遺伝子タイプが認められ、これらについても製品の表示名称のとおり、*S. chinensis* であると推定された。一方、インドから *S. reticulata* として入手した M-04 および M-05, また *S. oblonga* として入手した M-06—08 については、いずれも Type 6 の遺伝子タイプが認められ、ITS 領域の塩基配列からは *S. chinensis* と推定された。インドでは、*S. reticulata* や *S. oblonga* と同様に *S. chinensis* が多く自生していることから、これらの種間で交雑が起こっている可能性や、流通時点で種が混在している可能性が考えられたが、現時点ではその原因は不明である。以上本方法は、少なくとも *S. chinensis* の鑑別には適用可能と考えられる。Zhu らは、*Salacia* 属植物において ITS 領域以外に葉緑体 DNA の *trnK-rps16* spacer 領域の塩基配列にも多様性が認められることを報告していることから³¹⁾、今後、葉緑体 DNA などについても解析を行い、それぞれの検体の遺伝情報について、詳細に検討する必要があると考えている。

謝 辞

本研究は科研費 (24590037) および一般財団法人 鷹野学術振興財団の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) Matsuda H., Yoshikawa M., Morikawa T., Tanabe G., Muraoka O., *J. Trad. Med.*, **22** (Supple. 1), 145–153 (2005).
- 2) Jayaweera D.M.A., *Medicinal Plants Used in Ceylon-Part 1*, National Science Council of Sri Lanka, Colombo, 1981, p 77.
- 3) Vaidyartanam P.S., in *Indian Medical Plants: A Compendium of 500 Species*, eds. by Warriar P.K., Nambiar V.P.K., Ramankutty C., Orient Longman, Madras, India, 1993, pp. 47–48.
- 4) Yoshikawa M., Pongpiriyadacha Y., Kishi A., Kageura T., Wang T., Morikawa T., Matsuda H., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 871–880 (2003).

- 5) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8367–8370 (1997).
- 6) Yoshikawa M., Morikawa T., Matsuda H., Tanabe G., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 1547–1554 (2002).
- 7) Tanabe G., Yoshikai K., Hatanaka T., Yamamoto M., Shao Y., Minematsu T., Muraoka O., Wang T., Matsuda H., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 3926–3937 (2007).
- 8) Tanabe G., Xie W., Ogawa A., Cao C., Minematsu T., Yoshikawa M., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2195–2198 (2009).
- 9) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1339–1340 (1998).
- 10) Muraoka O., Xie W., Osaki S., Kagawa A., Tanabe G., Amer M. F. A., Minematsu T., Morikawa T., Yoshikawa M., *Tetrahedron*, **66**, 3717–3722 (2010).
- 11) Yoshikawa M., Xu F., Nakamura S., Wang T., Matsuda H., Tanabe G., Muraoka O., *Heterocycles*, **75**, 1397–1405 (2008).
- 12) Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., *J. Nat. Med.*, **65**, 142–148 (2011).
- 13) Xie W., Tanabe G., Akaki J., Morikawa T., Ninomiya K., Minematsu T., Yoshikawa M., Wu X., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2015–2022 (2011).
- 14) Kajimoto O., Kawamori S., Shimoda H., Kawahara Y., Hirata H., Takahashi T., *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **53**, 199–205 (2000).
- 15) Williams J.A., Choe Y.S., Noss M.J., Baumgartner C.J., Mustad V.A., *Am. J. Clin. Nutr.*, **86**, 124–130 (2007).
- 16) Kobayashi M., Akaki J., Yamashita K., Morikawa T., Ninomiya K., Yoshikawa M., Muraoka O., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **38**, 545–550 (2010).
- 17) Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Yoshikawa M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 770–773 (2010).
- 18) Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., *J. Nat. Med.*, **65**, 142–148 (2011).
- 19) Akaki J., Morikawa T., Miyake S., Ninomiya K., Okada M., Tanabe G., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., Muraoka O., *Phytochem. Anal.*, **25**, 544–550 (2014).
- 20) Flora Malesiana, Ser. I, Vol. 6, part 3, ed by Steenis C.G.G.J. van, Noordhoff-Kolff, Djakarta, 1964, pp. 404–421.
- 21) A Revised Handbook to the Flora of Ceylon, Vol. X, ed by Dassanayake M.D., Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 1996, pp. 242–248.
- 22) Maruyama T., Shirota O., Kawahara N., Yokoyama K., Makino Y., Goda Y., *Shokuin Eiseigaku Zasshi*, **44**, 44–48 (2006).
- 23) Maruyama T., Miyai M., Kamakura H., Nkajima I., Kawasaki T., Komatsu K., Fujita M., Yamamoto Y., Shibata T., Goda Y., *Shoyakugaku Zasshi*, **64**, 1520 (2010).
- 24) Maruyama T., Kondo K., Yotsuyanagi Y., Yamamoto Y., Kawasaki T., Shiba M., Terasaka K., Yamane M., Zhu S., Sakata K., Fujita M., Akiyama H., Nishimura N., Komatsu K., Mizukami H., Goda Y., *Shoyakugaku Zasshi*, **64**, 96–101 (2010).
- 25) Masamura N., Kikuchi R., Nagatomi Y., *Bunseki Kagaku*, **63**, 245–253 (2014).
- 26) Dixon M.T., Hillis D.H., *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 256–267 (1993).
- 27) Linder C.R., Moore L.A., Jackson R.B., *Mol. Ecol.*, **9**, 1549–1559 (2000).
- 28) Poczar P., Hyvonen J., *Mol. Biol. Rep.*, **37**, 1897–1912 (2010).
- 29) Cheng F.S., Brown S.K., Weeden N.F., *HortScience*, **32**, 921–922 (1997).
- 30) Coughenour J.M., Simmons M.P., Lombardi J.A., Yakobson K., Archer R.H., *Mol. Phylogenet. Evol.*, **59**, 320–330 (2011).
- 31) Zhu S., Wu Y., Komatsu K., Samarakoon S.P., Abstract of Papers, The 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy, Kyoto, **October 2009**, p. 28