

- Science 187: 445-447.
- Weber, M.O. 1982. Pollen diversity and identification in some Plumbaginaceae. *Pollen et Spores* 23: 321-348.
- Wilson, T.K. 1964. Comparative morphology of the Canellaceae. III. Pollen. *Bot. Gaz.* 125: 192-197.
- Wodehouse, R.P. 1935. *Pollen Grains. Their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine.* McGraw-Hill, New York.

長谷部光泰*: 葉緑体 DNA を用いた陸上植物の分子系統学

Mitsuyasu HASEBE*: Molecular Systematics
of Land Plants Using Chloroplast DNA

It is widely accepted that chloroplast DNA provides excellent information on plant phylogeny (Palmer et al. 1988). I reviewed recent progress in plant molecular systematics using rearrangement analysis, restriction fragment length polymorphisms analysis, and DNA sequence analysis of chloroplast DNA and also summarized experimental and statistical procedures. The problem about discrepancies between molecular data and phenotypic (morphological, cytological and so on) data was discussed.

Key word: chloroplast DNA, evolutionary rate, molecular systematics, RFLPs, sequence analysis.

はじめに

タンパク質のアミノ酸配列, 核酸の塩基配列を用いて系統関係を推定する分子系統学的 (molecular phylogenetical) な研究は分子生物学の発展とあいまって, 爆発的な発展を見せている。陸上植物系統分類学においても分子系統学的手法はアメリカの研究者を中心として積極的に取り入れられてきた。本稿では陸上植物の系統学に於ける分子系統学的な研究の発展および今後の展望について概説する。分子系統学では酵素多型, アミノ酸配列, 核酸の塩基配列といったタンパク質, 核酸レベルの形質 (macromolecular character, molecular data の訳語として分子レベルの形質という語が当てられることが多いが厳密にはテルペン等の化学成分を用いた研究も分子を解析していることにほかならないのでここでは用語の正確さを期すためにこの用語を用いる) を用いて系統樹を構築する。この形質は, 従来の系統分類学で用いられてきたこれら以外の形質, たとえば形態的, 生理的, 発生学的, 生態的形質あるいは二次代謝産物のような化学成分な

どの表現型レベルの形質 (Kimura 1983), から区別される。しばしばいわゆる chemotaxonomy と分子系統学が混同されていることがあるが両者は全く異なる研究分野である。前者は表現型レベルの形質を用い, 後者はタンパク, 核酸レベルの形質を用いる。

タンパク質, 核酸レベルの形質は系統関係を推定するうえで以下のような長所を持っている。(1) 形質変化のパターンが規則的でモデル化しやすいため定量的, 統計的解析がしやすい (高畑と長谷川 1987, Nei 1987)。これまで系統を論じる場合には異なった系統樹間の正当性を判断する手段が無く, 系統学が科学ではなく恣意的解釈学と呼ばれる所以であった。DNA の塩基は A, C, G, T の 4 種類しかないから, A は G, C, T のどれかにしか変わりようがないといったように, 形質変化が単純であるために変化を確率過程として表す (例えば, A が G になる確率を式で表す) ことができる。形質変化が確率として表現でき, 3 つの分類群 P, Q, R が存在したとしよう。各分類群から塩基配列のデータが得られれば P の塩基配列から Q の塩基配列, あるいは P の塩基配列から R の塩基配列が生じる確率を計算できる。そうすれば, どちらの方が起こる確率がどれだけ高いのか, その結果を否定するためにはどれだけ反証が必要なのかを統計的に明ら

* 東京大学理学部附属植物園。〒112 東京都文京区白山 3-7-1. Botanical Gardens, Faculty of Science, University of Tokyo, 3-7-1 Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo 112.

かにできるのである(長谷川 1989)。これによって、これまでまかり通っていた“私はいこう思う”式の系統学とは訣別できる。(2)形質の情報量が多い。例えば、1 kb の塩基配列を決定したとすれば1000の形質(塩基座位の情報)が得られる。生物のゲノム全体を考えた場合、DNA の持つ系統学的情報量は計り知れない。(3)全ての生物を通して比較が可能である。タンパク質や核酸を構成するアミノ酸、塩基は全生物を通して共通である。また多くの生物は基本的な機能を持つ遺伝子を共有している。従って、高次の分類群間で相同な形質を比較することが容易である。(4)進化速度(アミノ酸、塩基の各座位当たり・年当りの置換速度)が算出可能なので、分子進化時計として分類群間の分岐年代を推定することが可能である。進化速度の一定性の問題については後でふれる。(5)形質変化の遺伝的基盤が表現型レベルの形質に比べ、はっきりしているため、平行進化や収斂の確率を考慮に入れた系統推定が可能である(Sytsma 1990)。

このような利点を持つ分子系統学であるが学問としての歴史が浅いためにまだ未解決の問題も多い。しかし、分子系統学が系統を推定するうえで新たな有力な武器となりうるという点については異なる方法論的立場の研究者の間でも異論は無いであろう。なお、分子進化学一般に関する参考書は数多くの邦書があるので参考にしていただきたい(木村 1984, 木村 1986, 今堀他 1986, 長谷川 1989, 木村と大沢 1989, 根井 1990)。

進化速度

まず、進化速度の一定性をめぐる論争について紹介する。進化速度の一定性は、特定のタンパク質のアミノ酸配列を調べてみると、種の分岐した年代に比例してアミノ酸の置換数が増加していたという実験結果から提唱され(Zuckerlandl and Pouling 1962, Margoliash 1963), 分子時計(分子進化時計)と名づけられた(Wilson et al. 1977)。その後、塩基置換についても同様の現象が観察された。進化速度の絶対値は2分類群間の塩基座位当たりの塩基置換数を、化石データから求めた分類群間の分岐年代で割ると、年当たり塩基座位当たりの塩基置換数(進化速度)として計算できる。

進化速度の絶対値は分岐年代の知られていない分類群間では計算できないが、進化速度の一定性は相対速度テスト(Wilson et al. 1977)と呼ばれる方法によって検証することができる。A, B, Cの3つの分類群があるとき、CはA, Bの外群であることがわかって

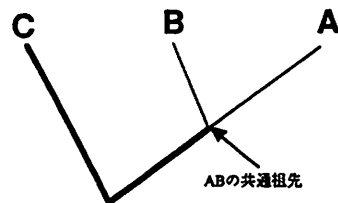


図1. 相対速度テストの説明。A, B, Cは現生の分類群を示す。

いるとすると、図1のような系統樹が書ける。CとA、CとBを結ぶ枝のうちCとABの共通祖先までは両者に共通している(図1の太線の部分)。両方の経路で異なっているのはAとABの共通祖先までの経路とBABとの共通祖先までの経路である。従って、ABの共通祖先からA, Bまでの進化速度が各々一定ならば、ABの共通祖先とA, Bとの塩基置換数が各々同じになるはずだから、CとA, Bとの塩基置換数は各々等しくなるはずである。外群であるCとA, Bとの塩基置換数の差を求めて、 χ^2 検定によって0から有意にずれているかどうかを調べることによって進化速度の一定性が検証できる。

分子進化における進化速度の一定性は経験則であるが分子進化の中立説で説明できる(Kimura 1983)。しかし、近年様々な分類群で分子進化速度の一定性からのずれが報告されている(Kikuno et al. 1985, Wu and Li 1985, Britten 1986, Catzeflis et al. 1987, Sheldon 1987, Sibley and Ahlquist 1987, Wilson et al. 1990)。この理由については分子による機能的制約の違い(Kimura 1983)、ピン首効果、創始者効果などによる遺伝的浮動(Ohta 1976, DeSalle and Templeton 1988)、世代時間の差(Laird et al. 1969, Kohne et al. 1972, Goodman 1985, Wu and Li 1985, Sibley and Ahlquist 1987)、突然変異率の違い(Britten 1986)などが考えられているが結論はでていない。また、相対速度テストはDNAやタンパク質が分類群間で平行して速度を変化させる時には進化速度のずれを検出できないことが懸念されており(Fitch 1976), Scherer (1989, 1990)はこれまで進化速度が一定であるといわれてきた多くのタンパク質のアミノ酸配列について再検討し、アミノ酸置換については進化速度の一定性がなりたないと結論している。植物の葉緑体DNAについても木本植物(ヤシ科 *Arecaceae*, Wilson et al. 1990; カエデ科 *Aceraceae*, ブナ科 *Fagaceae* 長谷部未発表)ではこれまで報告されている草本植物より進化速度が遅いことが知られて

いる。進化速度の問題は分子進化学のなかでも盛んに研究されている分野なので今後の発展が期待される。特に、植物は、動物に比べて体細胞系列と生殖細胞系列の区別が無い、木本植物では世代時間が非常に長いなど突然変異の蓄積様式が異なることが予想され、今後の研究が期待される。

長谷川 (1989) は進化速度が変動するときの分岐年代の計算方法を考案している。この方法ではまず進化速度の一定性を仮定せずに最尤法で系統樹を構築し、試料間の塩基置換数の違いから枝の長さを推定する。枝の長さの違いから各枝における進化速度 (塩基置換速度) の変動を計算する。そして、進化速度が変動している枝については他の枝とは別の進化速度を適用して分岐年代を算出する。この時、全ての枝で進化速度を変えれば最も良いが計算が煩雑となりモデルとして採用できなくなるので赤池情報統計量 (AIC; 赤池 1976) によって進化速度を変える枝の数を決めることを提案している。従って、進化速度が変動しても少なくとも分岐年代は計算できることになる。

植物における進化速度の研究は Wolfe らを中心に進められた (Wolfe et al. 1987, 1989a)。彼らはこれまで塩基配列の決定されている多くの遺伝子を解析し、同義的置換速度 (塩基/年/塩基座位) は核 DNA では $5.1 \sim 7.1 \times 10^{-9}$ 、葉緑体 DNA では $1.2 \sim 1.7 \times 10^{-9}$ 、ミトコンドリア DNA では $0.2 \sim 1.0 \times 10^{-9}$ であり、その比はミトコンドリア DNA: 葉緑体 DNA: 核 DNA = 1:3:12 であることを示した。非同義的置換速度は遺伝子によって大きく異なっていた。彼らは、植物の同義的置換速度について塩基配列の研究からは進化速度の一定性を示したが、前述したように葉緑体 DNA の制限酵素切断断片長多型のデータからは進化速度の変動を示す結果が得られている (Palmer et al. 1988)。これは制限酵素断片長多型のデータが同義的置換と非同義的置換の両方に影響されるために引き起こされているのかも知れない。

植物において塩基配列から分岐年代を推定した研究はほとんど無い。代表的な研究例は単子葉植物と双子葉植物の分岐年代を推定した研究である。これまで最古の被子植物化石は 1 億 2 千万年前 (白亜紀) からしか発掘されておらず (Thomas and Spicer 1987)、被子植物の起源を白亜紀以前とする考え方 (Axelrod 1952, 1960, 1970, Takhtajan 1969, Stebbins 1974) や中生代初期に近縁の裸子植物から分岐した (Crane 1985, Doyle and Donoghue 1987) とする見解もあったが一般には三疊紀やジュラ紀には被子植物は多様化してい

なかったと考えられていた (Friis et al. 1987)。しかし、Martin et al. (1989b) はグリセロールアルデヒド 3 磷酸脱水素酵素遺伝子の塩基配列の比較から単子葉植物と双子葉植物の分岐年代を石炭紀 (3 億 2 千万年前) と算出した。この値はこれまでの古生物学的な見解と余りにもかけ離れたものだったが Wolfe et al. (1989b) は葉緑体上に存在する多くの遺伝子の塩基配列を比較することによって双子葉植物と単子葉植物の分岐年代はジュラ紀 (2 億年前) であるという結論を導き、被子植物はジュラ紀に既に多様化していた可能性を示唆した。さらに、Martin らの調べたグリセロールアルデヒド 3 磷酸脱水素酵素は他の遺伝子に比べて進化速度が速いため彼らは分岐年代を過大評価していたことを示した。今後、塩基配列の情報量が増えるにつれさらに正確な分岐年代の推定が可能になってくるものと思われる。

葉緑体 DNA の特徴

葉緑体 DNA は多くの陸上植物について研究されてきた (Palmer 1985a, b, 1986a, 1987, Birky 1988, Zurawski and Clegg 1987)。タバコ (Shinozaki et al. 1986)、イネ (Hiratsuka et al. 1989)、ゼノゴケ (Ohya et al. 1986) については葉緑体 DNA の全塩基配列が決定されている。これらの研究から陸上植物のなかで葉緑体 DNA はゲノムサイズ、構造、遺伝子配列が高度に保存されていることがわかってきた。葉緑体 DNA の最も特徴的な構造は大単一配列 (large single copy region; LSC) と小単一配列 (small single copy region; SSC) に挟まれた巨大な逆位反

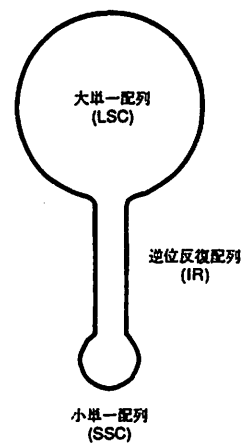


図 2. 葉緑体 DNA の模式図

復配列 (inverted repeat; IR) が存在することである (図 2)。IR の長さはほとんどの被子植物において約 25 kb であるが、10 kb (*Coriandrum sativum*, Palmer 1985a) から 76 kb (*Pelargonium hortorum*, Palmer et al. 1987) まで変化がある。葉緑体のゲノムサイズは陸上植物では通常約 150 kb であるが IR の長さの変化に伴い変動する。このような IR 長の変化は IR に接している LSC 領域が IR の中に取り込まれることにより引き起こされる。*Pelargonium* では通常 LSC に存在する *rps* 19 から *rbcL* までの遺伝子が IR 内に存在する。しかし、IR の伸張や短縮はかなり稀な現象で属内、種内ではこの形質はほとんど安定している。裸子植物 (イチョウ *Ginkgo biloba*, Palmer and Stein 1986)、シダ植物 (ゼンマイ属 *Osmunda*, Palmer and Stein 1986; イノデ属 *Polystichum*, D. B. Stein 私信; ヘゴ属 *Cyathea*, D. B. Stein, D. Conant 私信)、コケ植物 (ゼンゴケ *Marchantia polymorpha*, Ohyama et al. 1986; *Physcomitrella patens*, Calie and Hughes 1987) は被子植物に比べ短い 10~20 kb の IR を持つことが知られている。Palmer and Stein (1987) はタバコなどで IR に存在する *rpl* 2, *rps* 19 等の遺伝子がイチョウ、ゼンマイでは LSC に存在しており、このために被子植物より短い IR を持つことを示した。しかし、これらの領域は約 4 kb であり被子植物 (約 25 kb) とイチョウ (約 15 kb)、ゼンマイ (約 10 kb) との差を説明するには短すぎる。Hasebe and Iwatsuki (1990a) はホウライシダ *Adiantum capillus-veneris* の葉緑体 DNA の解析からホウライシダの IR 内にはタバコの IR 内に存在する ORF (open reading frame, 開始コドンと終止コドンが存在し実際に翻訳されている可能性のある領域) 581 と 1708 (約 7 kb) が存在しないであろうことを予想し、さらに Hasebe et al. (投稿中) は IR 内に存在するタバコの ORF 581 と 1707 に相当する領域は少なくとも被子植物では IR 内に存在することを示した。従って、被子植物は他の陸上植物に比べて潜在的に約 7 kb 長い領域を IR 内に持つ可能性がある。

葉緑体 DNA には rRNA, tRNA, タンパク質をコードする遺伝子として光合成関連遺伝子群、遺伝情報の発現に関与する遺伝子群などからなる約 120 個の遺伝子が存在している。遺伝子の配列は陸上植物を通じて広く保存されている (Sugiura 1987)。

葉緑体 DNA の遺伝様式は被子植物で母性または両性、裸子植物では父性または両性、シダ植物では母性であることが知られている (黒岩と堀 1990, Gillham

et al. in press)。

DNA の単離、精製

葉緑体 DNA はショ糖密度勾配遠心によって葉緑体を分離した後、界面活性剤で葉緑体を壊し、CsCl 平衡密度勾配遠心する方法 (Palmer 1986b) によって単離できる。植物によって単離のしやすさは様々である。イネ等では CsCl 平衡密度勾配遠心を行なわなくても純度の高い DNA が精製できるが (Hirai et al. 1985)、通常は CsCl 平衡密度勾配遠心なしでは制限酵素で切断可能な程度に純度の高い DNA は回収できない。葉緑体 DNA を単離するさまざまな技術は Palmer (1986b) に詳しい。

全 DNA は通常 CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 法 (Doyle and Dickerson 1987, Doyle and Doyle 1987) によって抽出される。通常ほとんど全ての植物から DNA を抽出可能である。収率の悪い時は、4×CTAB 溶液を用いる (Palmer et al. 1988)、あるいは界面活性剤を加える (Hasebe and Iwatsuki 1990b) と良い結果が得られることがある。また、粘性の高い夾雑物を伴うときは CTAB 法で精製した DNA を CsCl 平衡密度勾配遠心で再精製する、カラムを通す、材料を液体窒素中で粉碎後、適当な緩衝液に懸濁し、遠心して核と葉緑体 DNA を単離した後 (Terauchi et al. 1989)、CTAB 法を適用するなどの方法をとると改善されることがある。

葉緑体 DNA の解析方法

葉緑体 DNA の解析方法については Palmer (1986b), Palmer et al. (1988), Crawford (1990) に詳しい解説がある。また実験で用いる分子生物学的なテクニックについては和文、英文で多くの成書が現されているのでそれを参照にさせていただきたい (Sambrook et al. 1989, 渡辺 1989, 松村 1988)。

1. 構造変異解析

前述したように葉緑体 DNA の遺伝子配列、構成は陸上植物を通して広く保存されている。従って、遺伝子配列、構成の変化を検出できれば、その変異は変異を共有する群の共有派生形質として有力な系統学的情報となりうる。なぜならこのような変化が平行進化によっておこる確率は低く、もし類似の変化が起こったとしても詳細な遺伝子地図を作ったり、塩基配列を決定すれば平行進化をほぼ確実に区別できるからである。しかし、このような変化は稀にしか起きないので対象としている分類群で速く構造変異が見つかる

は限らない。

遺伝子配列、構成の変化を検出するには、既知の葉緑体 DNA の遺伝子構成を比較したり、実際にいくつかの分類群で遺伝子プローブを用いて遺伝子地図を作製してみることになる。遺伝子プローブ（特定の遺伝子領域を含むプローブ）は葉緑体 DNA クローンバンク（通常は全塩基配列の決定されているタバコ、イネ、ゼニゴケのバンクを用いるときが多い）からサブクローニングしたり、塩基配列がわかっているときは適当なプライマーを作製して PCR 法（変温処理により相補的二本鎖の合成と一本鎖への解離を繰り返し、特定の DNA 断片を増幅する方法）で増幅すれば簡単に作製できる。また一部の遺伝子については既に遺伝子プローブが作製されているのでこれを分与してもらうことも可能である。

遺伝子配列、構成の変化は挿入 / 欠失、逆位の 2 つに大きく分けられる。挿入 / 欠失については IR の 欠失、遺伝子やイントロンの挿入 / 欠失が知られている。ある分類群で遺伝子配列、構成の変化が検出されたならば、次に近縁の分類群においてこの変異の分布を調べてみることになる。この際には、一々全ての群について遺伝子地図を作製する必要はない。例えば、IR の欠失を調べるには Lavin et al. (1990) が行ったように IR と LSC の境界領域に存在する約 1kb 程度のいくつかの断片をプローブとして用いればよい。図 3-1, 2, 3 に示したようにプローブ 1, 2 は IR の LSC 寄りの部分、プローブ 3, 4 は IR より SSC と LSC の部分である。もし IR が一組存在すれば（図 3-1）、プローブ 1, 2 は 2 本の長さの異なる制限酵素切断断片とハイブリダイズし、IR が片方欠失しているのならば

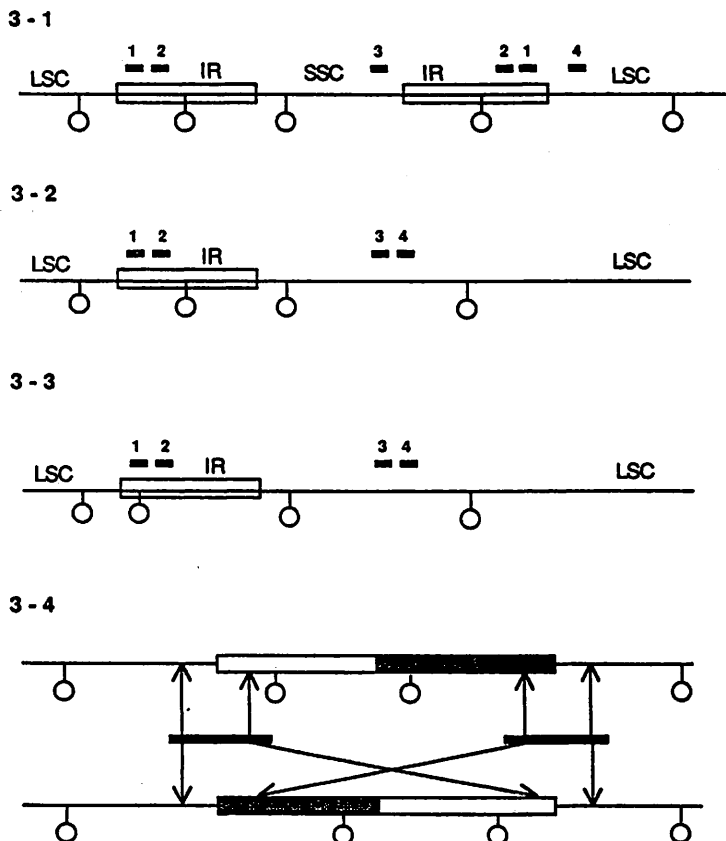


図 3. 構造変異解析の方法。太い線はプローブ、LSC は大単一配列、SSC は小単一配列、IR は逆位反復配列、○は制限酵素切断点を表す。2-4 の太い部分は逆位を起している部分で遺伝子配列の方向を表すために模様を付けてある。矢印はプローブがハイブリダイズする断片を示す。

(図3-2) 1本の断片とハイブリダイズするはずである。プローブ1, 2はIRの一番端に存在しているため、これらのプローブがハイブリダイズする断片の片方の端はIR内に存在し共通であるが、もう一方の端はLSC内に存在し異なっているはずだからである。但し、プローブのハイブリダイズする領域内に制限酵素の切断点があるときには(図3-3)IRの一方が欠失していても2本の断片とハイブリダイズしてしまう。このことによる誤差を防ぐため、彼らは近接する2本のプローブ(1, 2)を用いている。図3-3のようにプローブ1がハイブリダイズする領域内に制限酵素切断点があると、プローブは2本の断片にハイブリダイズしてIRが欠失していないかのように見えるが、プローブ2が1本の断片にしかハイブリダイズしないことからIRが欠失していることがわかる。プローブ3, 4は図3-1, 2から明らかなように完全なIRを持つ種類では2断片にIRの片方を欠いている種類には1断片にハイブリダイズする。遺伝子, イントロンの挿入/欠失は挿入/欠失を起こしている断片をプローブとして、ハイブリダイズする断片の有無を検出すればよい。逆位の検出にはJansen and Palmer (1987b)が行なったように逆位の末端を含むような2本の断片をプローブとすればよい。図3-4では上側の図と同じ遺伝子配列をしているプローブ(太い黒線)を用いたときの状態を表している。調べている種がプローブとした種と同じ遺伝子配列をしているとすれば、各プローブはそれぞれ1本の断片とハイブリダイズするし(上側の図)、逆位が存在するとすれば、2本の断片とハイブリダイズするはずである(下側の図)。求められた形質状態の情報は節約法によって系統樹へと構築される(Jansen and Palmer 1987b)。

これまでに被子植物のマメ科(Kolodner and Tewari 1979, Koller and Delius 1980, Palmer and Thompson 1981, Chu and Tewari 1982), 裸子植物のマツ科(Lidholm et al. 1988, White 1990a)でIRの一方が欠けていることが知られている。Lavin et al. (1990)はIRの欠失をマメ科25連(*sensu* Polhill and Raven 1981) 77属について調べた結果、IRの欠失はゲンゲ連 Galegeae, イワオウギ連 Hedysareae, Carmichaelieae 連, ソラマメ連 Viciaeae, Cicereae 連, シヤジクソウ連 Trifolieae におこっていることからこれらの連の単系統性を証明した。またフジ連 Millettieae のなかで、フジ属 *Wisteria* にのみIRの欠失が見られた。従って、フジ属はIRの欠失の起きている群と単系統でありフジ連は側系統群であると考

えられる。マツ属におけるIRの欠失からも、今後の研究の進展により系統学的な情報が得られることと思われる。

Palmer et al. (1988)は *rpo A*, *rpl 2* のイントロンの各分類群における分布を調べた。Manhart and Palmer (1990)は陸上植物の tRNA^{Ala} と tRNA^{Ile} にはイントロンが存在するが緑藻植物には通常存在しないことから研究を進め、更に、これらのイントロンはサヤゲモ属 *Coleochaete*, フラスコモ属 *Nitella*, アオミドロ属 *Spirogyra* には存在していることを発見した。このことから陸上植物の直接の祖先はこれらの仲間であることがほぼ証明された。Hasebe et al. (投稿中)はタバコの持つ ORF581 と 1708 の存在の有無を被子植物について検討した。その結果、被子植物のなかでもカヤツリグサ目, イグサ目等ではこれらの ORFs が欠失しており近縁な群の系統関係をしるうえでの材料になるかもしれない。

Jansen and Palmer (1987b)はキク科におけるLSC領域に存在する約22 kbの逆位の分布を調べた結果、コヤボウキ連 Mutisieae の Barnadesia 亜連がキク科の中で最も古くに分化した群であることを示した。マメ科には多くの逆位が知られており、今後この逆位の分布を利用することによって系統学的な情報が得られることが期待されている(Palmer et al. 1988)。Hasebe and Iwatsuki (1990a)はホウライシダ葉緑体DNAはタバコと比べて遺伝子の配列が大きく異なり何回かの逆位がおこっていることを示した。その後、イノデ属 *Polystichum*, ヘゴ属 *Cyathea*, ワラビ属 *Pteridium* でも同様な遺伝子配列をしていることがわかり(D. B. Stein, D. S. Conant 私信)、現在他のシダ類でも逆位の分布が研究中なので、シダ植物の系統に関するなんらかの情報が得られるものと期待される。イネ科ではタバコに比べて何回かの逆位が起きていることが知られているが(Hiratsuka et al. 1989), ネギ科, キジカクシ科, ヒガンバナ科, ラン科(Chase and Palmer 1989), ヤマノイモ科(Terauchi et al. 1989)では逆位が存在せずにタバコと同じ遺伝子配列をしていることがわかっているのでこの逆位の分布を調べることによりイネ科の系統を知るうえでの情報が得られるかも知れない。ゼニゴケ, *Physcomitrella* でもタバコと比べて逆位が起きていることが知られているのでコケ植物の系統に関する情報が得られるかも知れない。

2. 制限酵素断片長多型(RFLPs)

制限酵素はDNAの特定の配列を認識して切断する

酵素である。制限酵素の認識配列に突然変異が起きると、制限酵素はその配列を切断しなくなってしまうので断片パターンに変化が生じる。このことを利用して、間接的に塩基置換の状態を推定し、系統推定の情報に利用するのが RFLPs の解析である。後にふれるようにこの方法は既に多くの分類群で利用されており確立された方法として定着している。葉緑体 DNA の RFLPs を解析する場合、葉緑体 DNA を直接単離して制限酵素で切断、アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド (EtBr) で染色して葉緑体 DNA のバンドパターンを検出する方法と全 DNA (核、ミトコンドリア、葉緑体 DNA を含む) を単離して制限酵素で切断、アガロース電気泳動後、ナイロン又はニトロセルロース膜に DNA を転写し、葉緑体 DNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションによって葉緑体 DNA のバンドパターンを検出する方法がある。前者は葉緑体 DNA のバンドパターンを直接比較できる点で優れているが、多量のサンプル (生重量 40~200 g) を必要とすること、単離の操作が煩雑な点、塩基置換数が多いとバンドパターンが複雑になり、断片の変異を解析しにくいといった短所もある。また、植物によっては葉緑体 DNA を単離しにくい場合もある。一方、後者の方法は前者に比べ実験の手間はかかるが、確実に断片パターンの変化を検出できる点、少量の材料 (生重量 1~5 g 程度) でデータが得られる点で優れている。解析に用いる制限酵素は断片パターンの解釈のしやすさから 6 塩基認識のものがよく使われる。4 塩基認識の酵素はあまりにも多くの断片が検出されてしまうため断片パターンの解釈が困難となり余り有用ではない。但し比較的短い葉緑体 DNA 断片をプローブとし、アクリルアミドの長いゲルを用いれば利用可能である。

葉緑体 DNA を単離した場合は切断された DNA をアガロースゲルを電気泳動し、そのままエチジウムブロマイドで染色し UV 光下で観察すれば良い。我々は市販のサブマリン型の電気泳動槽 (ゲルサイズが 14 cm×15 cm) で、0.7% のゲルを用い、一度に 24 サンプルと 1 マーカーを泳動している。全 DNA を単離する場合は電気泳動後、ナイロン膜へ DNA を転写する。膜はいくつかのプローブとハイブリダイズさせねばならないので実験効率をあげるため、通常は 1 枚のゲルから 2 枚の膜へ転写する (Smith and Summers 1980)。我々はアイソトープでラベルしたプローブを用いる場合は NEN の Gene Screen Plus, Digoxigenin (Boehringer Mannheim) でラベルしたプローブを用

いる場合は Amarsham の HybondN を仕様書に従って用いている。膜に転写した全 DNA の中から葉緑体 DNA 断片を検出するには葉緑体 DNA プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なう。葉緑体 DNA プローブとして、被子植物については全塩基配列の決定しているタバコ葉緑体 DNA クローンバンク (Sugiura et al. 1986) を用いれば、単子葉、双子葉植物共に、十分良い結果がえられる。但し、キク科、イネ科などタバコとは異なった遺伝子配列をした葉緑体 DNA を持つグループについては同様な遺伝子配列を持った葉緑体 DNA クローンバンク (レタス, Jansen and Palmer 1987a; イネ, Hiratsuka et al. 1989) を用いるべきである。単子葉植物はネギ科、キジカクシ科、ヒガンバナ科、ラン科ではイネ科に見られる逆位が存在せず、タバコと同じ遺伝子を配列していることが知られているので (Chase and Palmer 1989) ラン科の *Oncidium excavatum* のクローンバンク (Chase and Palmer 1989) を用いた方が良いであろう。近縁の分類群で制限酵素地図、遺伝子地図が作製されておらず、遺伝子の配列が未知の場合は、葉緑体 DNA の遺伝子配列が保存的であるとはいえ、一応それらの地図を作製して確認してから、プローブを選択する方が望ましい。裸子植物に関してはタバコ葉緑体 DNA クローンバンクで十分解析可能であるがマツの仲間では IR の片方の配列が欠失しており近縁群のバンク (Lidholm et al. 1988) を用いた方がよいかもしいない。シダ植物ではこれまで葉緑体 DNA 全体をカバーするようなバンクが存在しなかったが、Hasebe and Iwatsuki (1990a) によってホウライシダの葉緑体 DNA のほぼ全域を含むようなバンクが作製されたのでこれを用いることが可能である。薄葉シダ類内におけるこのプローブの汎用性については Hasebe and Iwatsuki (1990b) に示してある。コケ植物については全塩基配列が決定されているゼニゴケのバンク (Ohya et al. 1986) を用いると良いであろう。それぞれのクローンバンクは製作者に問い合わせれば通常は容易に入手できる。葉緑体 DNA 断片はプラスミドの中に組み込まれているので適当な制限酵素で切断後アガロース電気泳動をして、プラスミドから単離した後ラベルする。しかし、簡便法としてプラスミドから単離することなくラベルしてもよい。但し、この場合、プラスミドが葉緑体 DNA にハイブリダイズしないことを事前に確かめておくことが必要である。プローブとする葉緑体 DNA 断片の長さは試料とする DNA の塩基置換の割合が大きいときは短い断片を、

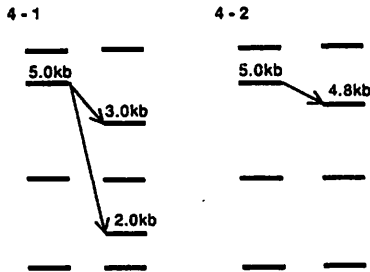


図4. 制限酵素切断断片長多型の説明図。太い線は制限酵素切断断片、数字は断片の長さを表す。

小さいときは長い領域を一度にハイブリダイズさせるとよい。例えば、タバコ葉緑体 DNA クローンバンクは12の *Bam* HI クローンでカバーできるが、塩基置換が少ないと予想される近縁な分類群を取り扱う時にはこの12のクローンを4つのグループに分けて我々は用いている。プローブのラベルは ^{32}P , ^{35}S のアイソトープを用いても、Digoxigenin, ECL (Amersham) などの非アイソトープ化合物を用いても良い結果が得られる。ラベルの方法はニクトランストレーション (Rigby et al. 1977), オリゴラベリング (Feinberg and Bogelstein 1983, 1984) のどちらを用いてもよいが後者の方が比活性の高いプローブが得られる。ハイブリダイゼーションと膜の洗いの条件は近縁な分類群から作られたクローンバンクが得られている時には 65°C 、それ以外の場合には $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ で行なうと良い。被子植物にタバコのプローブを用いたり、シダ植物にホウライシダのプローブを用いるときには 60°C で良好な結果が得られる。ハイブリダイゼーション溶液と膜の洗浄液の塩濃度は通常の条件で行なっている。

葉緑体 DNA の RFLPs の原因は塩基置換と挿入/欠失のふたつに分けられる。図4-1のように1本の断片が、合計すると1本の断片と同じ長さになる2本の断片に分れている時、あるいはその逆の時は塩基置換がおきて制限酵素認識部位の獲得、損失があったと考えられる。図4-2のように断片の長さだけが変化しているときは挿入/欠失が起きていると考えられる。また、挿入/欠失はどの制限酵素で切断したときでも同じ領域に検出できるが制限酵素認識部位の獲得、損失は特定の酵素に特異的である。

葉緑体 DNA の RFLPs のデータを用いた系統樹構築法は大きく分けて3つある。距離行列法、節約法および最尤法である。系統樹構築法については Nei (1987)

に詳しいので参照していただきたい。距離行列法は全ての試料の対について遺伝距離(進化距離)を求めた後、この距離データを用いていくつかの方法で系統樹を構築する。まず、RFLPs のデータを用いて、制限酵素認識部位の変化が1つの塩基置換によって引き起こされた、と仮定して全ての試料対について塩基置換数を計算する。次に、制限酵素認識部位の変化は必ずしも1つの塩基置換によって引き起こされているわけではないこと(6塩基認識の酵素ならば1から6まで塩基置換が起きている可能性がある)、同じ塩基が何回も置換を起している可能性があること、我々が調べている塩基は葉緑体 DNA の一部分なので標本抽出による誤差があること、を考慮して統計的に補正した塩基置換数の期待値(d)を求める。Gotoh et al. (1979), Nei and Tajima (1983) は制限酵素地図から制限酵素切断点を決定し、この制限酵素切断点データからdを求める方法を考案した。しかし、葉緑体 DNA のように種間でゲノムサイズが一定している(挿入/欠失がほとんどない)場合は2つの DNA 配列間の遺伝的分化の程度(塩基置換数)は互いに共有する制限酵素切断断片の量と相関があることを考えにいれば、一々制限酵素切断点を決定しなくても2種間で共有する断片数を比べることによってdが推定できるはずである。Upholt (1977), Nei and Li (1979), Engels (1981) はそれぞれ制限酵素切断断片データからのdの推定方法を考案した。dが0.05より小さい時は制限酵素断片データでも非常に良い推定値を与えることが知られている (Nei 1987)。但し、検出不可能な断片数、断片長の誤差による影響、分散の大きさは制限酵素断片データの方が大きい。葉緑体 DNA の場合は属内種間ではdが0.05以下の場合が普通なので (Palmer et al. 1988), わざわざ制限酵素切断点を特定せず制限酵素断片データからdを求めても問題はないようである。しかし、属間や科間でこの方法を取ると大きな誤差を生み出すので注意が必要である。また、シダ植物では属内種間でも大きなdを持つことが観察されており(ビカクシダ属 *Platyserium*, Sandbrink et al. 1990; ホウライシダ属 *Adiantum*, 長谷部未発表) 同じく注意が必要である。また、計算方法はどの方法をとっても同じような結果が得られるが、計算の簡略さ等の点から Nei and Li (1979) の方法が使われることが多いようである。

距離行列法に属する系統樹構築法には UPG 法 (Sokal and Michener 1958), Fitch-margoliash 法 (Fitch and Margolish 1967), 変換距離法 (Farris

1977), Farris 法 (Farris 1972), Modified Farris 法 (Tateno et al. 1982, 館野 1984), 最小進化法 (Cavalli-Sforza and Edwards 1967, Saitou and Imanishi 1989), 近隣結合法 (NJ 法) (Saitou and Nei 1987) などがある。UPG 法は有根系統樹, 他の方法は無根系統樹を構築する。UPG 法は進化速度の一定性を仮定するが, 他の方法は進化速度の一定性を仮定しないで系統樹を構築する。しばしば, 距離行列法は進化速度が変動する条件下では適用不可能であると言われることがあるが完全な誤解である (Crawford 1990)。無根系統樹を作る構築法で系統樹の根を決めるためには, 系統関係を知りたい群の外群を取り外群の分岐点を根とすれば良い。適当な外群が見つからないときには進化速度の一定性を仮定して一番長い枝 (一番離れた位置にある試料どうしを結ぶ枝) の中心を根にする方法もある。但し, 当然, 進化速度が変動すれば根の位置もずれることになるのでなるべく外群を用いる方がよい。分子系統学では用いている形質数が多く, ほぼ等価なため (塩基配列の一つが一つの形質と考えられる), データを統計的に評価することができる。このため, 分子系統樹の大きな特徴は系統樹の正しさを統計的に評価できる点にある。

系統樹の正当性の統計的検定方法には一般的な方法としてブーツストラップ法がある (Felsenstein 1985)。この方法は n 種類が m 個の形質を持つとき, まず, このデータセットを使って系統樹を構築してみる。次に, 新しい m 個の形質を元の m 個の形質の中から繰り返しをゆるして選び, 新しいデータセットとする。この操作を繰り返して, いくつかのデータセットを作り, それぞれのデータセットについて系統樹を構築してみる。これらの系統樹を元の系統樹と比べてみて, それぞれの分岐が何%の割合で再現されているかを調べてみる (Nei 1987, 長谷川 1989)。我々の得ているデータはあくまで標本集団であり標本抽出の分散 (誤差) が伴う。ブーツストラップ法は, 現在得ているデータから, 標本の抽出の仕方によってどのくらいの分散が生まれうるかを調べているのである。

このブーツストラップ法を距離行列法に用いれば系統樹の統計的検定ができる。また, UPG 法, NJ 法等系統樹の枝の長さの分散を求められるものもある。しばしば, UPG 法を用いて系統樹を構築しているのに, 枝の長さの分散を示してない場合があるがこれは分子系統学の大きな長所を有効に利用していないことになる。また枝の分散が大きく分岐順序が統計学的には決定できないのに特定の系統樹を示すことは全くナンセ

ンスである。距離行列法には, 前述したようにさまざまな方法がある。これらの方法の優劣について計算機シミュレーションによる研究が盛んになされている (文献は Nei 1987 に詳しい)。大まかに言って, NJ 法と最小進化法が高い確率で正しい系統樹を構築することが知られている (Saitou and Imanishi 1989)。UPG 法も進化速度が一定の条件の時には高い確率で, 正しい系統樹を構築する。しかし, 当然, 進化速度が一定でないときは正しい系統樹を構築しない。NJ 法, UPG 法等のパソコン用のプログラムは国内で入手可能である。

RFLPs でよく用いられている節約法は Wagner Parsimony と Dollo Parsimony の2つがある。Wagner Parsimony は制限酵素サイトの獲得と損失が同じ割合で起きると仮定している。Dollo Parsimony では制限酵素サイトの損失の方が獲得より起こりやすいように形質の重みづけをしている。これは, 例えば6塩基認識の酵素ならば6個の塩基のうちの一つでも塩基置換が起これば, 制限酵素サイトの損失が起きるが, サイトの一つ獲得するためには何回かの継続した塩基置換が必要であるからである。Wagner Parsimony および Dollo Parsimony は D. Swofford の作った Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP), J. Felsenstein の作った Phylogeny Inference Package (PHYLIP) というプログラムのなかに含まれており, 広く使われている。節約法における統計的な検定方法はブーツストラップ法 (PAUP 3.0, PHYLIP 3.2 に含まれている) を用いる。

最尤法は通常, PHYLIP に含まれている RESTML というプログラムが用いられる。最尤法の原理については塩基配列からの系統樹推定の項でふれる。

実際に葉緑体 DNA の RFLPs データをどの方法を使って系統樹構築したらよいか, 現状では定説はない。従って, 距離行列法, 節約法, 最尤法のいくつかの方法で系統樹を構築してみてコンセンサスを示す部分についてのみ結論を下すことが必要である。UPG 法, NJ 法, Wagner Parsimony, Dollo Parsimony, 最尤法の5つの方法を用いれば十分であろう。1つの方法だけで系統樹を構築して議論することは極めて危険なことである。また, 分子系統樹の最大のメリットである系統樹の統計的検定は必ず行なうべきである。さらに, 統計的検定を行えばわかることであるが, 統計的に有意な数のデータを用いて系統樹を構築することが必要である。2, 3種類の制限酵素で求めたデータで系統樹を構築するなど余りにも馬鹿げている。

試料の進化速度にもよるが通常は20~30酵素程度を用いるべきである。

RFLPs に関する研究は既に数多く発表されている。葉緑体 DNA は進化速度が遅いために通常、種内集団間における研究にはあまり有用ではないが用いる酵素数を増やすことによって多型が見つければ有意な系統学的な情報が得られる。Scowcroft (1979) は *Nicotiana glauca* (ナス科) の集団内の個体間には制限酵素 *Eco* RI による多型は存在しないが、集団間では一つの制限酵素サイトの変化が観察されたことを報告した。Palmer and Zamir (1982) は25制限酵素を用いて *Lycopersicon peruvianum* (ナス科) の RFLPs を解析したが多型は検出されなかった。Palmer et al. (1983) は28酵素で RFLPs をアブラナ属 *Brassica* (アブラナ科) について調べたところ *B. nigra* は4個の多型をもつことを示した。Clegg et al. (1984) は葉緑体ゲノムの約25%をプローブとして *Pennisetum americanum* (イネ科) の産地の異なる12個体の RFLPs を解析したが多型は検出されなかった。Palmer et al. (1985) は16酵素を用いて制限酵素地図を作製し *Pisum humile* (マメ科) の集団内に *Hpa* I サイトに一箇所多型があり、いくつかの欠失や挿入があることを報告した。Banks and Birky (1985) は *Lupinus texensis* (マメ科) の21集団100個体の RFLPs を調べた結果、100個体中88個体に多型が検出されなかったが、3集団に属する12個体が2つのサイトに多型があり、1つの欠失を観察した。Sytsma and Schaal (1985) は *Lisianthus skinneri* (リンドウ科) の3集団を22制限酵素を用いて解析した結果、1箇所のサイト多型と1箇所の挿入/欠失を検出し、rDNA の RFLPs の結果と合わせて、この種は *Lisianthus skinneri* complex の中において側系統群であることがわかった。Wagner et al. (1987) は *Pinus contorta* (マツ科) の63集団153個体、*Pinus banksiana* の68集団210個体を2酵素について調べた結果 *Sal* I について2つ、*Sst* I について13の多型を見つけた。この値は通常観察される葉緑体 DNA の多型よりも大きい印象を受けるが(彼らは2酵素しか用いていないので定量的な扱いはできないが)これはマツ属では IR の片方が欠失していることに影響されているのかもしれない。Doebly et al. (1987) はトウモロコシ *Zea mays* (イネ科) の亜種間の RFLPs を21酵素を用いて調べたところ、2つのサイト多型と1つの挿入/欠失が見つかったがこの多型はこれまでの亜種の分類と対応していなかった。この結果を彼らは葉緑体 DNA の平行

進化か交雑によって引き起こされたものであろうと考察している。Neale et al. (1988) は *Hordeum vulgare* subsp. *sapontaneum* (イネ科) の30集団245個体から3酵素を用いて、3つのサイト多型と1つの挿入または欠失を観察した。Rieseberg et al. (1988) は36制限酵素を用い、雑草性の *Helianthus annuus* (キク科)、蛇紋岩生の *H. bolanderi* と雑草性の *H. bolanderi* の18集団について葉緑体 DNA の RFLPs を調べ *H. annuus* には5個、蛇紋岩生の *H. bolanderi* には1個の多型が存在し、雑草性の *H. bolanderi* には多型が存在しないことを示した。また彼らはこの結果から、系統樹を構築し雑草性の *H. bolanderi* は蛇紋岩生の *H. bolanderi* に雑草性の *H. annuus* が浸透交雑することによって種分化したという仮説を否定し、蛇紋岩生の *H. bolanderi* は *H. annuus* とは独立に雑草性の *H. bolanderi* から分化したことを示した。Soltis et al. (1989a) は *Tolmiea menziesii* (ユキノシタ科) の2倍体と4倍体の合計37集団について19酵素を用いて RFLPs を調べたところ、集団内多型は見つからなかったが、集団間に7個のサイト多型を発見した。また、系統樹を構築してみると4倍体集団の方が2倍体集団より祖先型に近い変異をもっていることがわかった。Soltis et al. (1989b) は *Heuchera micrantha* (ユキノシタ科) の2倍体と4倍体の合計28集団を19酵素を用いて RFLPs を調べたところ、14個のサイト多型を検出した。この結果から、2倍体から4倍体への倍数化が少なくとも3回起きたことがわかった。Doyle et al. (1990a) は倍数性複合体 *Glycine tabacina* (マメ科) において多くのサイト多型を検出し、Doyle et al. (1990b) はこのうち3つの RFLPs をマーカーを用いて91系統 *Glycine tabacina* が2つのサイトタイプに分けられることを示した。White (1990b) は4.3 kb の *Hind* III クローンをプローブとして用いて *Pinus monticola* (マツ科) 16集団の RFLPs を調べたところ2種類のサイト多型が9集団で観察された。シダ植物ではクジャクシダ *Adiantum pedatum* (ホウライシダ科) は3つのグループに分化していることが葉緑体 DNA の RFLPs から確認されている (Parris et al. 1990)。また、ヤマドリゼンマイ *Osmunda cinnamomea* (ゼンマイ科) は日本と北米の変種間で RFLPs 多型が存在することが観察されている (長谷部未発表)。

種間レベルの系統関係を推定する場合に葉緑体 DNA の RFLPs は大きな効果を発揮する。Palmer and Zamir (1982) は25制限酵素を用いてトマト属、

Lycopersicon (ナス科) 8種, ナス属 *Solanum* 2種の系統関係を明らかにした。この結果から, 赤い実を持つグループは単系統であること, *Solanum pennellii* はトマト属と単系統性を示すことなどがわかった。コムギ属 *Triticum*, *Aegilopus* 属の2倍体, 倍数体の系統関係については Ogihara and Tsunewaki (1982, 1983, 1988), Tsunewaki and Ogihara (1983), Bowman et al. (1983) によって詳細に研究された。Palmer et al. (1985) は16種類の制限酵素を用いてエンドウ属5種22系統の系統関係を解析し, エンドウ *Pisum sativum* (マメ科) は *P. humile* の北方型の集団から作物化されたものであるという見解を支持した。Sytsma and Schaal (1985) は熱帯性の低木 *Lisianthus* 属 (リンドウ科) 6種を22酵素を用いて解析し, rDNA の RFLPs のデータと合わせて狭い分布域を持ち雲霧帯に分布する種は低地に広域分布する祖先種から独立に2回進化したことを示した。Doebley et al. (1987) は21酵素を用いてトウモロコシ属 *Zea* (イネ科) 5種の系統関係を解析し, これまでの分類体系を支持した。Coates and Cullis (1987) は6酵素を用いてアマ属 *Linum* (アマ科) 10種について検討した結果, perenne と non-perenne という二つのグループに分れるという, これまでの分類体系を支持した。このほか, ミカン属 *Citrus* (Green et al. 1986), コーヒーノキ属 *Coffea* (Berthou et al. 1983), キウリ属 *Cucumis* (Perl-Treves and Galun 1985, Perl-Treves et al. 1985), ナス属 *Solanum* (Hosaka et al. 1984, Hosaka 1986) でこれまでの分類体系を支持する結果がでてい。Sytsma and Gottlieb (1986a) は花, 果実の形態が *Clarkia* 属 (アカバナ科) と大きく異なる *Heterogaura* 属は *Clarkia* 属が分化した後に属内の一種から分化したものであり, 両属は単系統群であることを示した。更に, Sytsma and Gottlieb (1986b) は *Clarkia* 属 *Peripetasma* 節の系統関係について, Sytsma and Smith (1988), Sytsma et al. (1990) は *Clarkia* 属全体の系統関係を明らかにした。彼らの研究結果はこれまでの形態学や交配能力に基づいた分類体系とは大きく異なったものであった。伝統的な分類と分子分類学による分類の不一致の理由に関しては本稿の最後に詳しくふれることとする。Hilu (1988) はオヒシバ属 *Eleusine* を調べ, これまで雑種では染色体がほとんど完全な不対合を示すことから無関係とされてきた, 2倍体種 *E. indica* と4倍体種 *E. cornata* とが同じ葉緑体 DNA を持つことを示した。このことから, *E. indica* は *E.*

cornata の母親であろうと予想された。Terauchi et al. (1989) はヤマノイモ属 *Dioscorea* の系統関係を解析した。Chase and Palmer (1989) はラン科の *Oncidium* 属, *Trichocentrum* 属について検討した。これまで騾馬の耳 (mule-ear) と呼ばれる多肉の栄養器官を持つ *Oncidium* 属の種と同じような栄養器官を持つ *Trichocentrum* 属は花の形態が大きく異なるために栄養器官の類似は平行進化に寄るものであろうと考えられてきた。しかし, RFLPs の結果から mule-ear を持つ種は単系統であることがわかり, 両属の花の形態の大きな違いは形態の急激な変化によるもので系統的な遠さを表しているわけではないことを示した。Soltis et al. (1990b) はユキノシタ科において *Bensoniella* 属, *Conimitella* 属とは形態的に大きく異なっている *Mitella* 属が両属の最も近縁な属であることを示した。

シダ植物に関する研究はこれまで良いプローブがなかったこともあり (Hasebe and Iwatsuki 1990b) あまり進んでいない。Yatskievych et al. (1988) はイノデ属 *Polystichum*, ヤブソテツ属 *Cyrtomium*, *Phanerophlebia* 属の系統関係を調べた。これまでヤブソテツ属と *Phanerophlebia* 属は形態がよく似ていることからイノデ属の特定のグループからヤブソテツ属と *Phanerophlebia* 属が分化したという説と両属は異なったイノデ属のグループから独立に分化したという説があったが, 彼らの研究から後者の仮説が正しいことがわかった。Sandbrink et al. (1990) はビカクシダ属 *Platyserium* (ウラボシ科) の系統関係を調べたが一部の属内種間で葉緑体 DNA の分化が激しく, 制限酵素切断断片の対応がうまくできないことを報告した。同じ現象はゼンマイ属 *Osmunda* (Stein et al. 1986) やホウライシダ属 *Adiantum* (長谷部未発表) でも知られており, 1) シダ植物の葉緑体 DNA の進化速度は被子植物のそれより速い, あるいは2) シダ植物の属の分化した年代は被子植物の属の分化した年代よりも古いという可能性が考えられる。

属間レベルの系統関係に関する研究はキク科で Jansen を中心としたグループによって精力的に進められている。これまでに, Jansen and Palmer (1988), Palmer et al. (1988) によってキク亜科 *Asteroideae* は単系統であるがタンポポ科 *Cichorioideae* (*sensu* Thorne 1973, 北村他1957の定義とは異なる) は側系統群であることがわかった。また調べられた14連のうち, ヒマワリ連, コウヤボウキ連, *Tageteae* 連が単系統群でなく側系統群であることがわかった。

3. 塩基配列の解析

葉緑体 DNA の RFLPs は前述したように属内種間や近縁な属間の系統関係の推定には有用であったが、それ以上のレベルの分類群の系統関係を推定することは困難である。従って、より高次の分類群の系統関係を知るためには葉緑体の遺伝子の塩基配列を直接決めるという手段を取ることとなる。塩基配列を用いた系統学的な研究として rDNA を用いたもの (Hori et al. 1985, Hori and Osawa 1987, Hamby and Zimmer 1988, Zimmer et al. 1989) が広く知られており、多くの系統学的な貢献をしている。これまでの研究から rDNA は高次(門や綱)の分類群の系統関係の解析に有用であることがわかったが科以下のレベルの系統解析には不向きである。葉緑体上には約 120 の遺伝子が存在するが、*rbcL* (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase の大サブユニットの遺伝子) が、植物の遺伝子のなかでは最も多くの分類群で塩基配列が決定されており、1.4 kb の十分な長さを持ち、rDNA に比べて進化速度が速い (Palmer et al. 1988) といった理由から用いられることが多い。*rbcL* の塩基配列を用いた系統分類学的な研究は発表された業績としては Soltis et al. (1990a), Golenberg et al. (1990) しか知られていないが、1990年のアメリカ植物学会シンポジウムとして取り上げられているように (Am. J. Bot., 1990, 77 (6) Supplement), いくつかのグループで研究が始められており、今後研究の進展が予想される。

これまで、塩基配列を決定するには多大な労力、時間、コストが必要であり、系統学でこの技術を用いることはかなり困難を伴っていた。しかし、PCR (polymerase chain reaction) 法 (Saiki et al. 1985) の開発により、一人の人間が 1 週間で 2 種類について *rbcL* の塩基配列を決定することも可能となってきた。また、自動塩基配列決定機を用いればさらに研究のスピードは速くなることは確実である (Wilson et al. 1989)。PCR 法の原理と実験方法については Erlich (1989), Erlich et al. (1989), Innis et al. (1990) などを参考にさせていただきたい。ここでは我々の研究室で行なっている実験から得た多少の経験を交えながら方法の概略を説明する。

実験の手順としては、まず試料から前述の方法によって全 DNA を抽出する。RFLPs を行なうときは 2~3g 程度の生葉から DNA を抽出することが必要であるが、PCR 法で増幅するときには 1.5 ml のチューブで耳掻き 1 杯程度の試料で十分量の DNA が得られる。RFLPs の解析をする際には、粘性を帯びた

不純物の混入に悩まされることが時々あるが PCR 法を用いるときには、この粘性を帯びた不純物の混入は反応に影響を与えない。もちろん、PCR 法では微量な DNA を増幅してしまうので別の試料の DNA の混入には十分な注意を払う必要がある。次に、既知の *rbcL* の塩基配列を参考にして PCR 法で用いるプライマーを合成する。我々は *rbcL* を、オーバーラップするような約 500 bp ずつの 3 つの領域に分けて増幅し、塩基配列を決定している。プライマーは増幅する領域の両端の相異なる鎖から、25~30 塩基程度で GC 含量を 50% 程度にすることに注意して作製した。1 番目の領域はタバコ *rbcL* の 1~26 と 571~544, 2 番目は 496~521 と 1123~1096, 3 番目は 1024~1052 と 1386~1360 とし、DNA 合成機で合成した。PCR 法による反応はシータス社の Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit を用い、両方向のプロープを 50 pmol ずつ、試料の全 DNA を 5 μ l 加え、kit のプロトコールに従って反応液を調整している。反応は、アステック社の自動温度制御装置を用い、94°C で 4 分間保温した後、94°C 1 分、50°C 1 分、65°C 3 分のサイクルを 30 回行なった後、72°C で 5 分間保温している。この条件下で、ほとんどアーティファクトのバンドを伴わずに *rbcL* を増幅できる。これまで、タバコのプライマーを用いて、ナス属 *Nicotiana*, カエデ属 *Acer*, ドクウツギ属 *Coriaria*, ブナ属 *Fagus*, ホウライシダ属 *Adiantum* で *rbcL* の増幅に成功している。増幅した断片を精製するために、増幅した DNA 溶液のうち 10 μ l を低融点アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドを切り出した後、等量の TE を加え、65°C で 10 分間加熱する。アガロースが完全にとけているのを確認した後、同容積のフェノールを加え、1 分間良く攪拌後氷上に 3 分間静置し、遠心して上清をとる。これにフェノールとクロロホルムを 1/2 容積ずつ加え、攪拌後再び遠心して上清をとる。この上清の 5 μ l を非対称 PCR 法 (Gyllensten and Erlich 1988) にかけて 1 本鎖 DNA を合成する。反応液はプライマーの一方を 0.5 pmol とし、もう一方は 50 pmol 加え、増幅後精製した試料を 5 μ l 加える以外は同じである。反応は 94°C で 3 分間保温後、94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 2 分を 40 回繰り返した後、72°C で 5 分間保温している。この後、Centricon 30 (Amicon) でプライマーを除去した後、エタノール沈殿した試料を、シーケネース Ver. 2.0 (UBC) を用いてサンガー法で塩基配列決定を行なっている。

塩基配列データを用いた系統樹構築法には距離行列

法、節約法、最尤法の3つがある。距離行列法では前述したように2試料間での塩基置換数の期待値 d を推定しなければならない。 d の詳しい推定法については Nei (1987), 五条堀 (1989) を参照していただきたい。Gojobori et al. (1982), Tajima and Nei (1984) の研究から Tajima and Nei (1984) の方法, Kimura (1981) の6変数法が良い推定値を与えることがわかってきた。塩基置換にはアミノ酸置換を伴う、非同義的置換と、アミノ酸置換を伴わない同義的置換がある。この二つの置換は進化速度を異にしているので別々に d を推定し別々のデータセットとして系統樹構築に用いるのが好ましい。系統樹構築法については RFLPs のところでのべたことが配列データにもそのままあてはまる。

節約法による系統樹の構築方法も RFLPs のところで述べたとうりである。但し、RFLPs に比べ、塩基配列は平行進化の割合が大きく、同じ塩基座位で何回も塩基置換が起きるので誤った系統樹を構築する可能性がある (Sourdis and Nei 1988, Saitou and Imanishi 1989)。

最尤法 (Felsenstein 1981) は長谷川 (1989) に詳しいので、ここではおおまかな概念のみに言及する。DNA の塩基置換はある確率過程のもとで起きていると考えられる。例えば、 i という塩基が j という塩基に時間 t の間に変化すると考えると、その確率 $P_{ij}(dt)$ は、 $P_{ij}(dt) = u p_j dt$ (ここで u は塩基置換速度、 p_j は塩基 j の組成値を表すとする) のようにあらわすことができる (Felsenstein 1981)。調べている現存の試料の塩基配列がこの確率モデルのもとで実現する確率を尤度という。この尤度の最も高くなるように系統樹を選択するのが最尤法である。Langley and Fitch (1974) の方法、Felsenstein (1981) の方法が知られている。通常は Felsenstein の作った PHYLIP というプログラムパッケージがよく用いられる。統計的な検定方法はブーツトラップ法をもちいる。葉緑体 DNA の塩基配列への最尤法の適用は Ritland and Clegg (1987) を参照していただきたい。

塩基配列データからの系統樹の構築法については以上大まかに分けて3つの方法が知られているが、これら3方法についてのコンピューターシミュレーションによる研究 (Sourdis and Nei 1988, Saitou and Imanishi 1989) によると距離行列法の NJ 法や最小進化法、そして最尤法は節約法より正しい系統樹を構築する確率が高い。これは節約法が平行進化の影響を受けやすいことが原因になっている。

Palmer et al. (1988) はこれまで知られている *rbcL* の塩基配列から系統樹を UPG 法によって構築し、これまでの系統学的見解と一致した系統樹が書けること、被子植物の科のレベルの系統関係を探求するのに *rbcL* が良い材料であることを示した。Golenberg et al. (1990) は2千万年前のモクレン属 *Magnolia* の化石から *rbcL* の 820 bp の領域を増幅、塩基配列の決定を行ない現生の被子植物のデータを用いて系統樹を構築することに成功した。この研究によって良い状態の化石が産出されさえすれば(彼らの用いた化石はまだ緑色をしていたらしい)、分子系統学的手法が、系統学はもちろんのこと古生物学、生物地理学、進化速度の研究において多大な貢献をしようことを示した (Niklas 1990)。Soltis et al. (1990a) はユキノシタ科8種の *rbcL* の塩基配列を決定し、距離行列、節約、最尤法の3方法で系統樹を構築した。その結果、ユキノシタ科は少なくとも側系統群であり、おそらくは多系統群であること、ウメバチソウ属 *Parnasia* と *Brexia* 属はユキノシタ科とは系統的に離れた単系統群であること、ナス科とユキノシタ科が近縁であることを示した。

分子系統学の今後の課題

分子系統学自体の問題点として異種間浸透 (高畑 1986a, b, e), 遺伝子系統樹と種系統樹の関係 (高畑 1986c, d, e), 進化速度の変動, 実験技術, 祖先集団の集団サイズの推定 (Takahata 1986) などが上げられる。

葉緑体 DNA は通常母性遺伝するため、A種を母親とするB種との雑種はA種の葉緑体 DNA を持つ。このように葉緑体 DNA は一回の交配で他種へ広がっていく可能性を持っている。従って、既に分化した2種間で交配がおこり、葉緑体 DNA の異種間浸透が引き起こされ、両種の葉緑体 DNA が同一になってしまったとすると、その時点から両種の葉緑体 DNA は再び分化を始めることになるので、分岐年代の推定は過小評価されることになる。また、葉緑体 DNA の異種間浸透が起きた時点で両種は共通祖先を持つことになってしまうので系統樹のトポロジーにも影響を与える。葉緑体 DNA では異種間浸透の例は知られていないが、同じく母性遺伝するミトコンドリア DNA ではそのような例が知られているので (Powell 1983, Ferris et al. 1983) 注意が必要である。一方、核 DNA は同じような交配現象が起こっても子供へは1/2の割合でしか遺伝しないことと、組換えが起こるために交

配が重なるにつれどどんB種の中に拡散していき、A種の核DNAがB種の核DNAに置き変わることはまず考えられない。従って、今後葉緑体DNAの研究と合わせて核DNAの分子系統学的研究を進めていく必要がある。

現生の種内でDNAには多型が存在している。祖先集団についても同じ状態が予想されるので種分化を起す前にDNAは既に分化している可能性がある。従って、我々が構築している系統樹は遺伝子系統樹であり、種系統樹ではないことを認識することが必要であろう。通常、遺伝子系統樹は種系統樹に先駆けて分岐する。幸い、葉緑体DNAにはほとんど種内多型が存在しないのでこのような心配はほとんどいらぬであろう。遺伝子系統樹から3種の系統関係を正しく推測できる確率Pは $P=1-2e^{-(t_2/N)}/3$ (但し、 t_2 は3種の系統樹を書いたときの最初の分岐点から次の分岐点までの時間、Nは祖先集団の大きさ)で表されるので、 $t_2 \gg N$ ならば $P=1$ 、 $t_2 \ll N$ ならば $P=1/3$ になる (Takahata and Nei 1985, 高畑 1986e, Takahata 1989)。つまり、分岐年代の古い分類群間では遺伝子系統樹は必ず種系統樹と一致するが、分岐年代が新しく祖先集団の個体数が多い場合は遺伝子系統樹と種系統樹は全くの偶然(3種の系統関係を表す系統樹は3通りしか書けないので $P=1/3$ ということも偶然正しい系統樹を選ぶ確率と同じである。)でしか一致しないことになる。従って、核DNAの様に種内多型が顕著な材料を取り扱う場合にはこの点に関する注意が必要である。

祖先集団における遺伝的多型を利用してTakahata (1986)は共通祖先集団の個体数を推定した。上記のように遺伝子系統樹と種系統樹の分岐年代の差は祖先集団の大きさに比例するので、遺伝子系統樹と種系統樹の分岐年代のずれを調べれば、祖先集団の大きさが推定できることになる。進化速度の変動と技術の改良の点については先述したとおりである。

分子系統学的データが蓄積するにつれ、形態や細胞学的情報など表現型レベルの形質から得られた系統樹(表現型系統樹)とタンパク質、核酸レベルの形質から得られた系統樹(分子系統樹)のくい違いがみられるようになってきた。このような時に我々はどうに対処したら良いのであろうか。この点についてはPatterson (1987), Sytsma and Smith (1988), Sytsma (1999)でかなり詳細に議論されているので参照していただきたい。ここではSytsma (1990)の意見を紹介する。彼はくい違いの原因として7個の問題点を提起している。一つはこれまで書かれてきた表現型系統樹

の不備である。過去30年間、キク科内の系統関係については6つの異なる意見があり一致した見解は形成できなかった。Jansen and Palmer (1987b)の研究によって逆位の分布からコウヤボウキ連のBarnadesia亜連がキク科の中で最も速く共通祖先から分化したと、Jansen and Palmer (1988), Palmer et al. (1988)のRFLPsのデータから各連の系統関係が解明され長年の論争に決着がついた。しかし、Bremer (1987)は形態的形質に基づき分岐学的方法を用いてBarnadesia亜連がキク科の中で最も古くに分岐したことを示す系統樹を導いている。このことは、これまで表現型レベルの形質を用いた系統推定の誤りが表形的(phenetical)方法によってひきおこされている場合があることを表している。

第二の問題点は交配能力(生殖的隔離)と系統関係を等価に扱う、即ち、生殖的隔離が起きている種同士は遠縁であり、生殖的隔離が形成されていない種同士は近縁であるという誤った考え方によっている。2種間での生殖的隔離が成立しているということは必ずしも遺伝的な遠さを現しているわけではない(De Wet and Haelan 1972)ということは多くの分類群で証明されてきた。生殖的隔離がないということは共有祖先形質であり、生殖的隔離があるということは、ある場合には共有派生形質として扱われるべきものである。Clarkia rostrataの垂節への所属(Sytsma and Gottlieb 1986b, Sytsma and Smith 1988), Eleusine属(Hill 1988)に関する研究における分子系統樹と表現型系統樹の不一致はこのことが原因で表現型系統樹が誤って構築されていたために引き起こされたのであると考えられる。

第三の問題点は分子系統樹構築における不適切な分子の選択である。5SrDNAを用いた系統関係の研究(Hori and Osawa 1987)は高次の分類群の系統関係を推定するうえでは非常に有用であったが、陸上植物の系統を調べる(Hori et al. 1985)のためには不適切であった。5SrDNAは約100塩基程度の分子であり情報量が少ないうえに分子内に進化速度の異なる領域を持ち平行進化の割合も大きい(Bremer et al. 1987)。

Hori et al. (1985)のUPG法によって構築した系統樹はコケ植物がシダ植物と単系統群を形成すること、コムギが他の単子葉植物ではなくトマトと単系統性を示す点でこれまでの表現型系統樹と異なっている。このような不一致は5SrDNAの分子系統学的な材料としての不適切さによっていると考えられる。

第四の問題点は表現型レベルの形質の進化速度の激

しい変動である。特に比較的短期間に生じた形態の著しい特殊化はしばしば誤った系統関係の推定につながる。*Heterogaura* 属は葉緑体 DNA と核 DNA の研究から *Clarkia* 属の中の一系統にすぎないことがほぼ疑いなく証明されたが (Sytsma and Gottlieb 1986a, b), 形態学的には *Clarkia* 属を特徴付ける共有派生形質を一つも持たないうに *Clarkia* 属の姉妹種の候補にする理由すらない。Soltis et al. (1990a) のエキノシタ科, Chase and Palmer (1989) の *Oncidium* と *Trichocentrum* に関する研究もこのような原因から不一致が起きていると考えられる。

第五の理由は表現型レベルの形質, 分子レベルの形質 双方における平行進化である。Palmer et al. (1988), Chase and Palmer (1989) の *Oncidium* に関する研究ではいくつかの花形態における平行進化が誤った系統関係を構築させてきたことが明らかになった。また, Yatskievich et al. (1988) はこれまで分類上重要視されてきた, 網状脈を形成するという形質が平行進化によって何度も生じたことを示した。Hasebe et al. (未発表) はカエデ属 *Acer* の *A. fabri* はほぼ全縁で常緑の葉を持つことからクスノハカエデ節に分類されていたが葉緑体 DNA の RFLPs からイロホモミジ節と単系統群であることを示し, この仲間でも形態レベルの平行進化がおきたと考察した。また, タンパク質, 核酸レベルの形質でも 5SrDNA の例で見たように平行進化は起きうる。しかし, 平行進化に関する遺伝学的な知識はタンパク質, 核酸レベルの形質の方が格段に明らかになっているのでかなり平行進化を起こしている分類群でも系統樹を構築することが可能である (Zimmer et al. 1989)。例えば, 制限酵素認識部位の異なったタイプの平行進化がどのような確率で起こるかについてはよく知られている (Templeton 1983)。

第六の理由は交雑や浸透交雑による影響である。この問題については先に検討した。

第七の理由は倍数性の問題である。*Aegilopus triuncialis* は種内に2系統の異なった葉緑体 DNA を持つグループである。この種は *A. caudata* と *A. umbellulata* を2倍体親とする異質倍数体である。この2種が交互に母親となって倍数体形成がおこったためにこのような現象がおこったと考えられる (Ogihara and Tsunewaki 1988)。同じような現象は *Solanum* (Hosaka and Hanneman 1988), *Plagiomnium* (Wyatt et al. 1988), *Heuchera* (Soltis et al. 1989b) でも知られている。

結論として, これまで表現型レベルの形質から構築された系統樹とタンパク質, 核酸レベルの形質を用いた分子系統樹との不一致は確実に系統学的な知見の進歩を約束するのである。Sytsma は Patterson (1987) の “cease the debate about ‘molecules versus morphology’ and begin to cooperate on the basis of molecules and morphology” という文章を引用している。

以上葉緑体 DNA 分子系統学の陸上植物系統分類学における適用について概観した。合衆国では分子系統学的方法是植物分類学者が利用すべき当たり前の方法となりつつあり, 分子系統学的方法自体を実際に採用していないハーバリウムタクソノミストでもその方法とそれに基づく発展に対して正確な知識を持つことはほとんど常識になっている。しかし, 日本では植物分子系統学は極めて発展途上の学問である。分子系統学は系統解析に於ける重要な技術の一つである。それはこれまでの系統学を否定するものでもパラダイムを变革させるものでもない。系統推定をするうえで有力な技術が新しく得られた時に, 少しでも真実に近い系統を解明したいと思う科学者の選択の道はそう多くはないと思われる。

謝 辞

本文中で引用した私の研究結果は全て岩槻邦男先生の研究室で行なわれたものである。原稿について有益な助言をいただいた清水建美, 矢原徹一, 植田邦彦, 伊藤元己の各氏, 日頃, 活発な意見交換をさせていただいている東京大学植物園セミナーの出席者の方々に感謝致します。

引用文献

- 赤池弘次. 1976. 情報量基準 AIC とは何か. 数理科学 153: 5-11.
- Axelrod, D.I. 1952. A theory of angiosperm evolution. *Evolution* 6: 29-60.
- . 1960. The evolution of flowering plants. In Tax, S., ed. *The Evolution of Life*. pp. 227-305. University of Chicago Press, Chicago.
- . 1970. Mesozoic paleogeography and early angiosperm history. *The Botanical Review* 36: 277-319.
- Banks, J.A. and C.W. Birky, 1985. Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant *Lupinus texensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6950-6954.

- Berthou, F., C. Mathieu and F. Vedel, 1983. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. *Theor. Appl. Genet.* 65: 77-84.
- Birky, C.W. Jr. 1988. Evolution and variation in plant chloroplast and mitochondrial genomes. In Gottlieb, L.D. and S.K. Jain, eds. *Plant Evolutionary Biology*. pp. 23-53. Chapman and Hall, London.
- Bowman, C.M., G. Bonnard and T.A. Dyer, 1983. Chloroplast DNA variation between species of *Triticum* and *Aegilops*. Location of the variation on the chloroplast genome and its relevance to the inheritance and classification of the cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 65: 247-262.
- Bremer, K. 1987. Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics* 3: 210-253.
- , C.J. Humphries, B.D. Mishler and S.P. Churchill, 1987. On cladistic relationships in green plants. *Taxon* 36: 339-349.
- Britten, R.J. 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231: 1393-1398.
- Calie, P.J. and K.W. Hughes, 1987. The consensus land plant chloroplast gene order is present, with two alterations, in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 208: 335-341.
- Catzeffis, F.M., F.H. Sheldon, J.E. Ahlquist, C.G. Sibley, 1987. DNA-DNA hybridization evidence of the rapid rate of rodent DNA evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 242-253.
- Cavalli-Sforza, L.L. and A.W.F. Edwards, 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.* 19: 233-257.
- Chase, M. W. and J.D. Palmer, 1989. Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *Amer. J. Bot.* 76: 1720-1730.
- Chu, N.M. and K.K. Tewari, 1982. Arrangement of the ribosomal RNA genes in chloroplast DNA of Leguminosae. *Mol. Gen. Genet.* 186: 23-32.
- Clegg, M.T., J.R.Y. Rawson and K. Thomas, 1984. Chloroplast DNA variation in pearl millet and related species. *Genetics* 106: 449-461.
- Coates, D. and C.A. Cullis, 1987. Chloroplast DNA variability among *Linum* species. *Am. J. Bot.* 74: 260-268.
- Crane, P.R. 1985. Phylogenetic analysis of seed plants and the origin of angiosperms. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 71: 716-793.
- Crawford, D.J. 1990. *Plant Molecular Systematics*. 388 pp. John Wiley and Sons, New York.
- DeSalle, R. and A.R. Templeton, 1988. Founder effect and the rate of mitochondrial DNA evolution in Hawaiian *Drosophila*. *Evolution* 42: 1076-1084.
- DeWet, J.M.J. and J.R. Harlan. 1972. Chromosome pairing and phylogenetic affinities. *Taxon* 21: 67-70.
- Doebley, J.F., W. Renfro and A. Blanton, 1987. Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. *Genetics* 117: 139-147.
- Doyle, J.J. and E.E. Dickerson, 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36: 715-722.
- and M.J. Donoghue, 1987. The origin of angiosperms: a cladistic approach. In Friis, E.M., W.G. Chaloner and P.R. Crane, eds. *The Origin of Angiosperms and their Biological Consequences*. pp. 17-46. Cambridge University Press, Cambridge.
- and J.L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- , — and A.H.D. Brown, 1990a. A chloroplast-DNA phylogeny of the wild perennial relatives of soybean (*Glycine* subgenus *Glycine*): congruence with morphological and crossing groups. *Evolution* 44: 371-389.
- , J.L. Doyle, J.P. Grace and A.H.D. Brown, 1990b. Reproductively isolated polyploid races of *Glycine tabacina* (Leguminosae) had different chloroplast genome donors. *Syst. Bot.* 15: 173-181.
- Engels, W.R. 1981. Estimating genetic divergence and genetic variability with restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6329-6333.
- Erlich, H.A., ed. 1989. *PCR Technology*. Stockton Press, New York.
- , R. Gibbs and H.H. Kazazian, Jr., eds. 1989. *Polymerase Chain Reaction*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Farris, J.S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Amer. Natur.* 106: 645-668.

- . 1977. On the phenetic approach to vertebrate classification. In Hecht, M.K., P.C. Goody and B.M. Hecht, eds. *Major Patterns in Vertebrate Evolution*. pp. 823-850. Plenum Press, New York.
- Feinberg, A.P. and B. Bogelstein, 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- and B. Bogelstein, 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum *Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences - a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- . 1985. Confidence limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferris, S.D., R.D. Sage, C.-M. Huang, J.T. Nielsen, U. Ritte and A.C. Wilson, 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2290-2294.
- Fitch, W.M. 1976. Molecular evolutionary clock. In Ayala, F.J., ed. *Molecular Evolution*. pp. 160-178. Sinauer, Sunderland, Mass.
- and E. Margoliash, 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155: 279-284.
- Friis, E.M., W.G. Chaloner and P.R. Crane, 1987. Introduction to angiosperms. In Friis, E.M., W.G. Chaloner and P.R. Crane, eds. *The Origin of Angiosperms and their Biological Consequences*. pp. 1-15. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Gillham, N.G., J.E. Boynton and E.H. Harris, in press. Transmission of plastid genes. In Bogorad, L. and I. Vasil, eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 7. Academic Press, London.
- Gojobori, T., K. Ishii and M. Nei, 1982. Estimation of average number of nucleotide substitution when the rate of substitution varies with nucleotide. *J. Mol. Evol.* 18: 414-423.
- 五条堀孝. 1989. 比較分子進化. 木村資生, 大沢省三共編. *生野の歴史 (岩波講座—分子生物学 3)*. pp. 61-88. 岩波書店, 東京.
- Golenberg, E.M., D.E. Giannasi, M.T. Clegg, C.J. Smiley, M. Durbin, D. Henderson and G. Zurawski, 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344: 656-658.
- Goodman, M. 1985. Rates of molecular evolution: the hominid slow down. *Bio Essays* 3: 9-14.
- Gotoh, O., J.-I. Hayashi, H. Yonekawa and Y. Tagashira, 1979. An improved method for estimating sequence divergence between related DNAs from changes in restriction endonuclease cleavage sites. *J. Mol. Evol.* 14: 301-310.
- Green, R.M., A. Vardi and E. Galun, 1986. The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72: 170-177.
- Gyllensten, U.B. and H.A. Erlich, 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7652-7656.
- Hamby, R.K. and E.A. Zimmer, 1988. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family. *Pl. Syst. Evol.* 160: 29-37.
- Hasebe, M. and K. Iwatsuki, 1990a. Chloroplast DNA from *Adiantum capillus-veneris* L., a fern species (Adiantaceae); clone bank, physical map and unusual gene localization in comparison with angiosperm chloroplast DNA. *Curr. Genet.* 17: 359-364.
- and —, 1990b. *Adiantum capillus-veneris* chloroplast DNA clone bank: as useful heterologous probes in the systematics of the leptosporangiate ferns. *Amer. Fern J.* 80: 20-25.
- 長谷川政美. 1989. 増補 DNA からみた人類の起源と進化. 海鳴社, 東京.
- Hilu, K.W. 1988. Identification of the "A" genome of finger millet using chloroplast DNA. *Genetics* 118: 163-167.
- Hirai, A., T. Ishibashi, A. Morikami, N. Iwatsuki, N. Shinozaki and M. Sugiura, 1985. Rice chloroplast DNA: a physical map and the location of the genes for the large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase and the 32 kd photosystem II reaction center protein. *Theor. Appl. Genet.* 70: 117-122.
- Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori, C. Kondo, Y. Honji, C.-R. Sun, B.-Y. Meng, Y.-Q. Li, A. Kanno, Y. Nishizawa, A. Hirai, K. Shinozaki and M. Sugiura, 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome:

- Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-194.
- Hori, H., B.-L. Lin and S. Osawa, 1985. Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 820-823.
- and S. Osawa, 1987. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 4: 445-472.
- Hosaka, K. 1986. Who is the member of the potato? - Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 72: 606-618.
- , Y. Ogihara, M. Matsubayashi and K. Tsunewaki, 1984. Phylogenetic relationships between the tuberous *Solanum* species as revealed by restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA. *Jpn. J. Genet.* 59: 349-369.
- and R.E. Hanneman, Jr. 1988. Origin of chloroplast DNA diversity in the Andean potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 333-340.
- 今堀宏三, 木村資生, 和田敬四郎共編. 1986. 統分子進化学入門. 257 pp. 培風館, 東京.
- Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. 1990. *PCR Protocols*. 482 pp. Academic Press, New York.
- Jansen, R.K. and J.D. Palmer, 1987a. Chloroplast DNA from lettuce and *Barnadesia* (Asteraceae): structure, gene localization, and characterization of a large inversion. *Curr. Genet.* 11: 553-564.
- and —, 1987b. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5818-5822.
- and —, 1988. Phylogenetic implication of chloroplast DNA restriction site variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 75: 753-766.
- Kikuno, R., H. Hayashida and T. Miyata, 1985. Rapid rate of rodent evolution. *Proc. Jpn. Acad.* 61[B]: 153-156.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 454-458.
- . 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 木村資生編. 1984. 分子進化学入門. 296 pp. 培風館, 東京.
- . 1986. 分子進化の中立説 (向井輝美, 日下部真一訳). 396 pp. 紀伊国屋書店, 東京.
- , 大沢省三共編. 1989. 生物の歴史 (岩波講座—分子生物科学3). 204 pp. 岩波書店, 東京.
- Kishino, H. and M. Hasegawa. in press. Converting distance to time—an application to human evolution. In Doolittle, R.F. ed. *Meth. Enzymol.* 183: Computer analysis of protein and nucleic acid sequences. Academic Press, New York.
- 北村四郎, 村田源, 堀勝. 1957. 原色日本植物図鑑, 草本編(1) 合弁花類. 297 pp. 保育社, 大阪.
- Kohne, D.E., J.A. Chiscon and B.H. Hoyer, 1972. Evolution of primate DNA sequences. *J. Hum. Evol.* 1: 627-644.
- Koller, B. and H. Delius, 1980. *Vicia faba* chloroplast DNA has only one set of ribosomal RNA genes as shown by partial denaturation mapping and R-loop analysis. *Mol. Gen. Genet.* 178: 261-269.
- Kolodner, R. and K.K. Tewari, 1979. Inverted repeat in chloroplast DNA from higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 41-45.
- 黒岩常祥, 堀輝三. 1990. 母性遺伝の様式と植物の系統. 文部省特定研究報告書, 植物の生活環, 調節機構の動的解析, pp. 149-188, 東京大学.
- Laird, C.E., B.L. McConaughy and B.J. McCarthy, 1969. Rate of fixation of nucleotide substitutions in evolution. *Nature* 224: 149-154.
- Langley, C.H. and W.M. Fitch, 1974. An examination of the constancy of the rate of molecular evolution. *J. Mol. Evol.* 3: 161-177.
- Lavin, M., J.J. Doyle and J.D. Palmer, 1990. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the leguminosae subfamily papilioideae. *Evolution* 44: 390-402.
- Lidholm, J., A.E. Szmidt, J.-E. Hallgren and P. Gustafsson, 1988. The chloroplast genomes of conifers lack one of the rRNA-encoding inverted repeats. *Mol. Gen. Genet.* 212: 6-10.
- Manhart, J.R. and J.D. Palmer, 1990. The gain of two chloroplast tRNA introns marks the green algal ancestors of land plants. *Nature* 345: 268-270.
- Margoliash, E. 1963. Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 50: 672-679.
- Martin, W., A. Gierl and H. Saedler, 1989. Molecular evidence for pre-Cretaceous angiosperm origin. *Nature* 339: 46-48.
- 松村正実. 1988. ラボマニュアル遺伝子工学. 丸善, 東京.
- Neale, D.B., M.A. Saghai-Marroof, R.W. Allard, Q. Zhang and R.A. Jorgensen, 1988. Chloroplast DNA diversity in populations of wild and cultivated barley. *Genetics* 120: 1105-1110.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- and W.-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- and F. Tajima, 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics* 105: 207-217.
- 根井正利. 1990. 分子進化遺伝学 (五条堀孝, 斉藤成也訳). 433 pp. 培風館, 東京.
- Niklas, K.J. 1990. Turning over an old leaf. *Nature* 344: 587-588.
- Ogihara, Y. and K. Tsunewaki, 1982. Molecular basis of the genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. I. Diversity of the chloroplast genome and its lineage revealed by the restriction pattern of ct-DNAs. *Jpn. J. Genet.* 57: 371-396.
- and —, 1983. The diversity of chloroplast DNA among *Triticum* and *Aegilops* species. *Proc. 6th International Wheat Genetics Symposium*, Kyoto, Japan, pp. 407-413.
- and —, 1988. Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.* 76: 321-332.
- Ohta, T. 1976. Role of slightly deleterious mutations in molecular evolution and polymorphisms. *Theoret. Popul. Biol.* 10: 254-275.
- Ohshima, H., H. Fukuzawa, T. Kohch, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Cgang, S.-I. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki, 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Palmer, J.D. 1985a. Comparative organization of chloroplast genomes. *Ann. Rev. Genet.* 19: 325-354.
- , 1985b. Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In MacIntyre, ed. *Molecular Evolutionary Biology*. pp. 131-240. Plenum, New York.
- , 1986a. Chloroplast DNA and phylogenetic relationships. In Dutta, S.K., ed. *DNA Systematics, Volume II, Plants*. pp. 63-80. CRC press, Boca Raton, Florida.
- , 1986b. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Meth. Enzymol.* 118: 167-186.
- , 1987. Chloroplast DNA evolution and bio-systematic uses of chloroplast DNA variation. *Amer. Natur.* 130: S6-S29.
- , R.K. Jansen, H.L. Michaels, M.W. Chase and J.R. Manhart, 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
- , R.A. Jorgensen and W.F. Thompson, 1985. Chloroplast DNA variation and evolution in *Pisum*: patterns of change and phylogenetic analysis. *Genetics* 109: 195-213.
- , J.M. Nugent and L.A. Herbon, 1987. Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 769-773.
- , C.R. Shields, D.B. Cohen and T.J. Orten, 1983. Chloroplast DNA evolution and the origin of *Brassica* species. *Theor. Appl. Genet.* 65: 181-189.
- and D.B. Stein, 1986. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Curr. Fenet.* 10: 823-833.
- and W.F. Thompson, 1981. Rearrangements in the chloroplast genomes of mung bean and pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5533-5537.
- and D. Zamir, 1982. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5006-5010.
- Parris, C.A., N. Nakato and D.B. Stein, 1990. Divergent speciation in the *Adiantum pedatum* complex: evidence from chloroplast DNA variation, cytology, and isozyme electrophoresis. Abstracts of the International Association of Pteridologist Conference of Progress

- in Pteridology, pp. 19.
- Patterson, C., ed. 1987. Molecules and morphology in evolution: conflict or compromise? 229 pp. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Perl-Treves, R. and E. Galun, 1985. The *Cucumis* plastome: physical map, intrageneric variation and phylogenetic relationships. *Theor. Appl. Genet.* 71: 417-429.
- , D. Zamir, N. Navot and E. Galun, 1985. Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 71: 430-436.
- Polhill, R.M. and P.H. Raven, eds. 1981. *Advances in Legume Systematics, Part 1.* 425 pp. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
- Powell, J.R. 1983. Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow-evidence from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 492-495.
- Rieseberg, L.H., D.E. Soltis and J.D. Palmer, 1988. A molecular reexamination of introgression between *Helianthus annuus* and *H. bolanderi* (Compositae). *Evolution* 43: 227-238.
- Rigby, P.W.J., M. Dieckman, C. Rhodes and P. Berg, 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to higher specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237.
- Ritland, K. and M.T. Clegg, 1987. Evolutionary analysis of plant DNA sequences. *Amer. Natur.* 130: S74-S100.
- Saiki R., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim, 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saitou, N. and T. Imanishi, 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6: 514-525.
- and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning (2nd)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandbrink, J.M., C.H.J. van ham Roeland and J.V. Brederode, 1990. Chloroplast DNA and morphological variation in the genus *Platyserium* (Polypodiaceae). Abstracts of the International Association of Pteridologist Conference of Progress in Pteridology, pp. 22.
- Scherer, S. 1989. The relative-rate test of the molecular clock hypothesis: a note of caution. *Mol. Biol. Evol.* 6: 436-441.
- , 1990. The protein molecular clock: time for a reevaluation. In Hecht, M., B. Wallace and J.R. MacIntyre, eds. *Evolutionary Biology* 24, pp. 83-105. Plenum, New York.
- Scowcroft, W.R. 1979. Nucleotide polymorphism in chloroplast DNA of *Nicotiana dabneyi*. *Theor. Appl. Genet.* 55: 133-137.
- Sheldon, F.H. 1987. Rates of single-copy DNA evolution in herons. *Mol. Biol. Evol.* 4: 56-69.
- Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohta, K. Torazawa, B.Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamagashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada and M. Sugiura, 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5: 2043-2049.
- Sibley, C.J. and J.E. Ahlquist, 1987. DNA hybridization evidence of homonid phylogeny: results from an expanded data set. *J. Mol. Evol.* 26: 99-121.
- Smith, G.E. and M.D. Summers, 1980. The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzoyloxymethyl-paper. *Anal. Biochem.* 109: 123-129.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener, 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 28: 1409-1438.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis, T.A. Ranker and B.D. Ness, 1989a. Chloroplast DNA variation in a wild plant, *Tolmiea menziesii*. *Genetics* 121: 819-826.
- , — and B.D. Ness, 1989. High levels of chloroplast DNA variation and multiple origins of autopolyploidy in *Heuchera micrantha* (Saxifragaceae). *Evolution* 43: 650-656.
- , —, M.T. Clegg and M. Durbin, 1990a. *rbcl* sequence divergence and phylogenetic

- relationships in Saxifragaceae *sensu lato*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4640-4644.
- , — and K.D. Bothel, 1990b. Chloroplast DNA evidence for the origin of the monotypic *Bensoniella* and *Coemitella* (Saxifragaceae). Syst. Bot. 15: 349-362.
- Sourdis, J. and M. Nei, 1988. Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol. 5: 298-311.
- Stebbins, G.L. 1974. Flowering Plants: Evolution above the Species Level. Belknap Press, Cambridge.
- Stein, D.B., J.D. Palmer and W.F. Thompson, 1986. Structural evolution and flip-flop recombination of chloroplast DNA in the fern genus *Osmunda*. Curr. Genet. 10: 835-841.
- Sugiura, M. 1987. Structure and function of the tobacco chloroplast genome. Bot. Mag. Tokyo 100: 407-436.
- , K. Shinozaki, N. Zaita, M. Kusuda and M. Kumano, 1986. Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal protein genes. Pl. Sci. 44: 211-216.
- Sytsma, K.J. 1990. DNA and morphology: inference of plant phylogeny. TREE. 5: 104-110.
- and B.A. Schaal, 1985. Phylogenetics of the *Lisianthus skinneri* (Gentianaceae) species complex in Panama utilizing DNA restriction fragment analysis. Evolution 39: 594-608.
- and L.D. Gottlieb, 1986a. Chloroplast DNA evidence for the origin of the genus *Heterogaura* from a species of *Clarkia* (Onagraceae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5554-5557.
- and —, 1986b. Chloroplast DNA evolution and phlogenetic relationships in *Clarkia* sect. *Peripetasma* (Onagraceae). Evolution 40: 1248-1261.
- and J.F. Smith, 1988. DNA and morphology: comparisons in the Onagraceae. Ann. Missouri Bot. Gard. 75: 1217-1237.
- , — and L.D. Gottlieb, 1990. Phylogenetics in *Clarkia* (Onagraceae): restriction site mapping of chloroplast DNA. Syst. Bot 15: 280-295.
- Tajima, F. and M. Nei, 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. Mol. Biol. Evol. 1: 269-285.
- Takahata, N. 1986. An attempt to estimate the effective size of the ancestral species common to two extant species from which homologous genes are sequenced. Genet. Res. 48: 187-190.
- , 1989. Gene genealogy in three related populations: consistency probability between gene and population trees. Genetics 122: 957-966.
- and M. Nei, 1985. Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. Genetics. 110: 325-344.
- 高畑尚之. 1986a. 細胞質オルガネラ DNA の変異と進化(1). 遺伝 40: 51-58.
- , 1986b. 細胞質オルガネラ DNA の変異と進化(2). 遺伝 40: 64-70.
- , 1986c. 細胞質オルガネラ DNA の変異と進化(3). 遺伝 40: 57-61.
- , 1986d. 細胞質オルガネラ DNA の変異と進化(4). 遺伝 40: 77-83.
- , 1986e. 遺伝子の系図と種の系統関係. 今堀宏三, 木村資生, 和田敬四郎共編. 統分子進化学入門. pp.111-134. 培風館, 東京.
- , 長谷川政美. 1987. 分子系統学, 分子集団遺伝学—生物進化研究の新しい発展. Jpn. J. Genet. 61: 633.
- Takhtajan, A. 1969. Flowering Plants: Origin and Dispersal. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Tateno, Y., M. Nei and F. Tajima, 1982. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. J. Mol. Evol. 18: 387-404.
- 館野義男. 1984. 分子系統樹の作り方とその評価. 木村資生編. 分子進化学入門. pp.164-184. 培風館, 東京.
- Templeton, A.R. 1983. Convergent evolution and nonparametric inferences from restriction data and DNA sequences. In Weir, B.S., ed. Statistical Analysis of DNA Sequence Data. pp. 151-179, Marcel Dekker, New York.
- Terauchi, R., T. Terachi and K. Tsunewaki, 1989. Physical map of chloroplast DNA of aerial yam, *Dioscorea bulbifera* L. Theor. Appl. Genet. 78: 1-10.
- Thomas, B.A. and R.A. Spicer, 1987. The Evolution and Palaeobiology of Land Plants. 309 pp. Croom Helm Ltd. Beckenham.
- Thorne, R. 1983. Proposed new realignments in the angiosperms. Nordic J. Bot. 3: 85-117.

- Tsunewaki, K. and Y. Ogihara, 1983. The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops* species. II. On the origin of polyploid wheat cytoplasms as suggested by chloroplast DNA restriction fragment patterns. *Genetics* 104: 155-171.
- Upholt, W.B. 1977. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucleic Acids Res.* 4: 1257-1265.
- Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Maroo, S.M. Williams, B.P. Dancik and R.W. Allard, 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2097-2100.
- 渡辺 格監修. 1989. クローニングとシーケンス, 植物バイオテクノロジー実験マニュアル. pp.314. 農林文化社, 東京.
- White, E.E. 1990a. Chloroplast DNA in *Pinus monticola*. 1. Physical map. *Theor. Appl. Genet.* 79: 119-124.
- , 1990b. Chloroplast DNA in *Pinus monticola*. 2. Survey of within-species variability and detection of heteroplasmic individuals. *Theor. Appl. Genet.* 79: 251-255.
- Wilson, A.C., S.S. Carlson and T.J. White, 1977. Biochemical evolution. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 573-639.
- , E.A. Zimmer, E.M. Prager and T.D. Kocher, 1989. Restriction mapping in the molecular systematics of mammals: a retrospective salute. In Fernholm, B., K. Bremer and H. Jornvall, eds. *The Hierarchy of Life*. 407-419. Elsevier, Amsterdam.
- Wilson, M.A., B. Gaut and M.T. Clegg, 1990. Chloroplast DNA evolves slowly in the palm family (Arecaceae). *Mol. Biol. Evol.* 7: 303-314.
- Wolfe, K.H., W.-H. Li and P.M. Sharp, 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9054-9058.
- , P.M. Sharp and W.-H. Li, 1989a. Rates of synonymous substitution in plant nuclear genes. *J. Mol. Evol.* 29: 208-211.
- , M. Gouy, Y.-W. Yang, P.M. Sharp and W.-H. Li, 1989b. Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6201-6205.
- Wu, C.-I. and S.-H. Li, 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1741-1745.
- Wyatt, R., I.J. Odrzykoski, A. Stoneburner, H.W. Bass and G.A. Galau, 1988. Allopolyploidy in bryophytes: Multiple origins of *Plagiomnium medium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5601-5604.
- Yatskievych, G., D.B. Stein and G.J. Gastony, 1988. Chloroplast DNA evolution and systematics of *Phanerophlebia* (Dryopteridaceae) and related fern genera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2589-2593.
- Zhou, D.X., O. Massenot, F. Quigley, M.J. Marion, F. Moneger, P. Huber and R. Mache, 1988. Characterization of a large inversion in the spinach chloroplast genome relative to *Marchantia*: a possible transposon-mediated origin. *Curr. Genet.* 13: 433-439.
- Zuckermandl, E. and L. Pouling, 1962. Molecular disease, evolution, and genetic diversity. In Kasha, M. and B. Pullman, eds. *Holizons in Biochemistry*, pp. 189-225. Academic Press, New York.
- Zimmer, E.A., R.K. Hamby, M.L. Arnold, D.A. LeBlanc and E.C. Thiriot, 1989. Ribosomal RNA phylogenies and flowering plant evolution. In Fernholm, B., K. Bremer and H. Jornvall, eds. *The Hierarchy of Life*. pp. 205-214. Elsevier, Amsterdam.
- Zurawski, G. and M.T. Clegg, 1987. Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 38: 391-418.