

【解説】

針葉樹の葉緑体ゲノムを対象とした最近の研究動向

渡辺 敦史<sup>\*1</sup>・平尾 知士<sup>2</sup>

はじめに

葉緑体ゲノムは環状構造を有しており、2つの逆位反復配列(inverted repeats, IRs)によってLSC (large single copy) とSSC (small single copy) に区別される。葉緑体ゲノムは、植物ゲノムの中でも多様な観点から研究対象にされてきたゲノムであり、比較ゲノム研究をはじめとして、DNA マーカーの開発、進化系統学的研究、集団遺伝学研究に利用されてきた。CLC Genomics workbench (CLC bio社) ソフトウェアを用いて100kb以上、complete等の検索ワードでデータベース検索した場合、現在までに900を超える葉緑体全ゲノム配列が決定されていることが分かる(2014年3月現在)。葉緑体ゲノムには100kb以下のものが存在することから(Chloroplast genome database; <http://chloroplast.cbio.psu.edu/index.html>)、実際にはさらに多数の葉緑体全ゲノム配列が決定されていると推測される。

針葉樹の葉緑体ゲノムは、被子植物と比較してIR構造が著しく短く、ゲノム構造は多様であり、その遺伝性は基本的に父性遺伝であるといった特徴を示す。これらの特徴は、針葉樹の葉緑体全ゲノムが決定される以前から明らかとされてきたが、1995年にクロマツ(*Pinus thunbergii*)の葉緑体全ゲノム(Wakasugi et al. 1994)が公開されたことを受けて、ゲノム構造が明確になるだけでなく、マーカー開発をはじめ前述の研究を含む様々な研究が著しく進展した。クロマツ葉緑体全ゲノム解読を皮切りに、現在までに29種の針葉樹葉緑体全ゲノムが報告されている(表-1)。本稿では、スギを含む最近の研究論文を紹介しながら、針葉樹の葉緑体ゲノム研究の動向について解説する。

スギ葉緑体全ゲノム解読とゲノム構造の変異

クロマツ葉緑体全ゲノム決定以後、2003年にはチョウセンゴヨウ(*Pinus koraiensis*)葉緑体全ゲノムがデータベース上に公開されたものの、針葉樹の葉緑体全ゲノムに関する情報はすぐに蓄積されてきたわけではなかった。実際、100kbを超える葉緑体全ゲノムを単離する、もしくはゲノム全体をカバーするPCR増幅産物を生みだし、ショットガンライブラリーを構築し、サンガー法による塩基配列決定と配列に基づいてゲノムを再構築する一連の作業は著しく労力を伴い、その労力に見合う研究論文が得られる保証がないことも原因の一つであると考えられる。Cronn et al. (2008)は、労力の軽減を考慮して次世代シーケンサーを針葉樹の葉緑体ゲノム解読に利用した。彼らはマツ属とトウヒ属から8種を選び、完全解読されていたマツ2種をリファレンスゲノムとしてPCR産物と次世代シーケンサーを組み合わせた形で配列決定を行い、この手法でゲノムの大部分をカバーできることを示している。

同じく2008年には、我々のグループもスギ(*Cryptomeria japonica*)の葉緑体全ゲノム解読に関する報告を行った(図-1; Hirao et al. 2008)。針葉樹はマツ科で構成されるconifer Iとそれ以外のconifer IIに区分されており(Bowe et al. 2000)、我々の報告は針葉樹葉緑体全ゲノム解読に関してconifer IIでの初めての報告例となった。我々のグループは、葉緑体ゲノムを単離し、ショットガンライブラリーの構築とライブラリーをサンガー法により地道に塩基配列決定するといった、いわゆる古典的手法に則った上で解読を進めた。我々のグループも当初はクロマツをリファレンスゲノムとしてlong PCRを行い、その後ショットガンシーケンスを行うことを念頭に置いていた。しかし、プライマー設計を何度やり直しても5kbp~10kbp単位の明確な増幅産物を得ることが出来なかった。そこで、PCRベースでの解読をあきらめ、無傷葉緑体を単離する手法に切り替えている。しかし、無傷葉緑

\*E-mail: nabeatsu@agr.kyushu-u.ac.jp

<sup>1</sup>わたなべ あつし 九州大学大学院農学研究院

<sup>2</sup>ひらお とものり 森林総合研究所森林バイオ研究センター

表-1 葉緑体ゲノムが解読された針葉樹

樹種	論文掲載年	サイズ (bp)	登録 No.
<i>Calocedrus formosana</i>	2013	127311	NC_023121
<i>Cathaya argyrophylla</i>	2010	107122	NC_014589
<i>Cedrus deodara</i>	2010	119299	NC_014575
<i>Cephalotaxus oliveri</i>	2013	134337	NC_021110
<i>Cephalotaxus wilsoniana</i>	2011	136196	NC_016063
<i>Cryptomeria japonica</i>	2008	131810	NC_010548
<i>Cunninghamia lanceolata</i>	2013	135334	NC_021437
<i>Keteleeria davidiana</i>	2009	117720	NC_011930
<i>Larix decidua</i>	2011	122474	NC_016058
<i>Picea abies</i>	2013	124084	NC_021456
<i>Picea glauca</i>	2013	128520	KF_008668
<i>Picea morrissonicola</i>	2011	124168	NC_016069
<i>Picea sitchensis</i>	2008	120176	NC_011152
<i>Pinus contorta</i>	2008	120438	NC_011153
<i>Pinus gerardiana</i>	2008	117618	NC_011154
<i>Pinus koraiensis</i>	2010	117190	NC_004677
<i>Pinus krempfii</i>	2008	116989	NC_011155
<i>Pinus lambertiana</i>	2008	117239	NC_011156
<i>Pinus massoniana</i>	2013	119739	NC_021439
<i>Pinus monophylla</i>	2008	116479	NC_011158
<i>Pinus nelsonii</i>	2008	116834	NC_011159
<i>Pinus taeda</i>	2013	121530	NC_21440
<i>Pinus thunbergii</i>	1994	119707	NC_001631
<i>Podocarpus lambertii</i>	2014	133734	NC_023805
<i>Podocarpus totara</i>	2013	133259	NC_020361
<i>Podocarpus sinensis var. wilsoniana</i>	2011	122513	NC_016064
<i>Taiwania cryptomerioides</i>	2011	132588	NC_016065
<i>Taiwania flousiana</i>	2013	131413	NC_021441
<i>Taxus mairei</i>	2013	127665	NC_020321

体の単離は、単離そのものに労力を伴うだけでなく、核やミトコンドリアゲノムを完全に排除することが困難であることから、完全解読するためには、予想されるサイズの数十倍の塩基配列を取得する必要性があった。前述のPCRベースの分析が困難であった理由は、スギ葉緑体ゲノムを解読後、比較ゲノム研究に取り組むことでようやく氷解した。

IR構造が葉緑体ゲノムの遺伝子順序の保存に関与することは以前から指摘されていた (Palmer and Thompson 1982)。遺伝子もしくはゲノム領域の順序の変化は、特に genome rearrangement と呼ばれている。Strauss et al. (1988)

は、マツ科における葉緑体ゲノムの rearrangement は、短いIRと繰り返し配列が関与する可能性を指摘した。実際、被子植物のIRは20kbp以上の長さがあるのに対し、クロマツとチョウセンゴヨウではわずかに465bpであり、スギでは、さらに短く284bpであった。スギ葉緑体ゲノムが解読されたことを受けて、葉緑体ゲノム構造の比較を行った結果、進化的に近縁な種群では構造が類似する傾向にあるにもかかわらず、同じ針葉樹に属するマツとスギ間のゲノム構造は、被子植物と比較する以上に進化的イベントを考慮する必要があった (図-2)。マツをリファレンスゲノムとしたPCRベースの解読がスギで上手くい

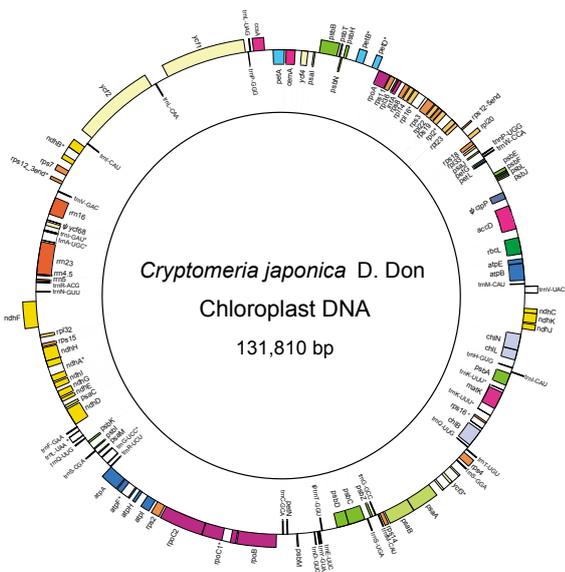


図-1 スギ葉緑体ゲノムの遺伝子地図

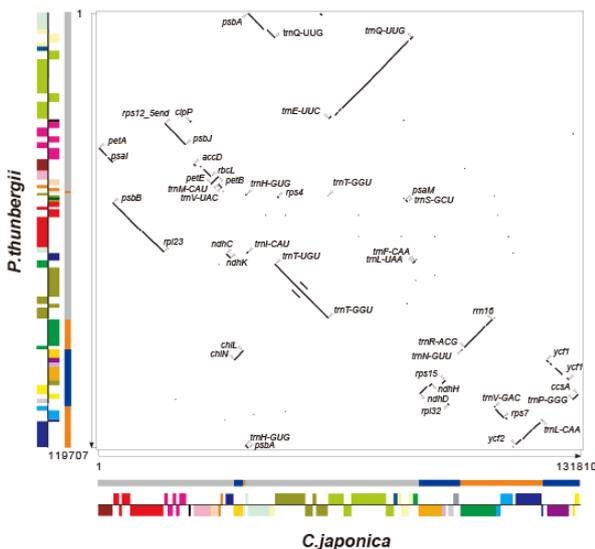


図-2 スギとクロマツ葉緑体ゲノムの比較構造

かななかった理由は著しい頻度で生じた rearrangement が原因であり、針葉樹では IR が短く、葉緑体ゲノムの構造安定性に影響し、スギとマツそれぞれの系統で構造変化を独自に繰り返した可能性が本研究によって強く示唆される結果となっている。針葉樹の IR が短いことは最近決定されている樹種からも明らかであり、タイワンスギ (*Taiwania cryptomerioides*) では 277bp (Wu et al. 2011a)、

イヌガヤ属では 530bp と 544bp (Wu et al. 2011a ; Yi et al. 2013)、マツ科では 236bp~495bp (Lin et al. 2010) とされている。

針葉樹葉緑体ゲノムが徐々に蓄積されたことを受けて、2010 年以降葉緑体ゲノム構造の変化に関する詳細な研究もいくつか報告されるようになった。Wu et al (2011b) はマツ科葉緑体ゲノム構造を比較し、IR で挟まれる領域の構造パターンに基づいてマツ科葉緑体ゲノムを 4 タイプ (A/B/C/P) に区分し、このうち A を原始的と位置づけた後、他タイプへの変化パターンのシナリオを仮定した。conifer II でも構造変異パターンのシナリオが検証されている (Yi et al. 2013)。これらの研究の共通点は、系統的に異なる種間での変化パターンを特定のシナリオで説明することであり、場合によっては IR だけでなく別の繰り返し配列が関与する可能性も指摘している。最近、conifer II の 3 属 (*Calocedrus*, *Agathis*, *Nageia*) からそれぞれ 1 種の葉緑体ゲノムが解読されたことを受けて (Wu and Chaw 2014)、conifer II 葉緑体ゲノムの全体像がより明確となっている。この報告では、*Agathi*→*Nageia*→*Cephalotaxus*→*Taiwania*→*Cryptomeria*→*Calocedrus* に従ってゲノムサイズが小さくなっており、系統進化との関連性が示唆されている。葉緑体ゲノムの構造変化を進化的イベントとして仮定した系統学的研究も報告されている (Lin et al. 2010; Wu et al. 2011a)。系統学的研究から導かれる結果は、塩基置換を情報として用いる分子系統学的研究とはやや異なる結果となっている。基本的に構造変化も進化的イベントに従っていると考えられるものの、針葉樹では少ない種で構成される科や属も多く、homoplacy や系統独自のイベントも視野に入れた上でいわゆる分子時計に従った進化的イベントとして考えることができるかどうかについては一層の議論が必要である。

conifer I ではおおよそ全ての属で葉緑体全ゲノム解読が終了しているのに対し、進化的、地理的観点から多様な種群で構成される conifer II についてもようやく情報の蓄積が加速している段階にある。リファレンスゲノムの充実により PCR ベースの取り組みも容易になったばかりでなく、次世代シーケンサーを活用することで大幅に労力を軽減できる。この結果、これまで主であった針葉樹類の幅広い種群を比較したゲノム研究ではなく、conifer I 同様に比較的近縁な種群を対象とした構造変化を含む進化研究など行うことが可能である。情報蓄積の加速と共に針葉樹葉緑体ゲノム進化についての更なる知見を期待したい。

### 黄金スギの原因遺伝子特定と針葉樹における葉緑体ゲノムの父性遺伝

そもそもスギ葉緑体ゲノム解読に対するモチベーションは、黄金スギの原因遺伝子を特定することにあった。黄金スギは、新葉展開する際に黄白色もしくは白色等の針葉形態を示し、初夏になるに従って緑色になる葉色突然変異体であり、Ohba et al (1971) はこの原因を葉緑体ゲノムに求めた。実際、黄金スギを花粉親として用いた時、その実生から黄金スギが得られるのに対して、種子親とする際にはまれにしか変異体は得られなかった。針葉樹の葉緑体ゲノムが父性遺伝することに関する研究はマツ科を中心に DNA マーカーを利用した研究から確認されており (Wagner et al. 1989)、花粉親から形質が遺伝する黄金スギでも変異を引き起こす原因は葉緑体ゲノムにあると考えられた。

葉色突然変異を引き起こす原因には、葉緑体ゲノム上の遺伝子領域にアミノ酸置換を引き起こす塩基置換 (single nucleotide polymorphism, SNP) もしくは挿入欠失 (insertion/deletion, Indel) のどちらかであると考えられたものの、非遺伝子領域に生じた変異である可能性もあった。そこで、我々は改めて黄金スギを含む複数クローンの葉緑体全ゲノム塩基配列を決定し、クローン間で認められる変異を探索した。ゲノム中に塩基置換は認められたもののその数は極めて少なく、特に遺伝子領域に認められた塩基置換はわずかに3遺伝子に1つずつであり、非遺伝子領域の SNP も含めたとしても黄金スギ特異的な SNP は存在しなかった (表-2)。繰り返し配列に起因する変異もあり、SSR (simple sequence repeat) 以外にも *ycf* 遺伝子近傍には 33bp もしくは 66bp を繰り返し単位とする大きな変異を確認した。*ycf* 遺伝子近傍の繰り返し配列および葉緑体 SSR については精英樹クローンを利用して高い変異性と共にいずれも黄金スギ特異的な変異ではないことを確認した (Hirao et al. 2009a ; Hirao et al. 2009b)。クローン間で認められた様々な変異を精査し、最終的に黄

金スギ特異的な変異は、*matK* 遺伝子に認められた 19bp の Indel と考えられた (Hirao et al. 2009a)。この Indel が原因となって黄金スギの *matK* 遺伝子ではフレームシフト突然変異が生じていた (図-3)。*matK* 遺伝子機能については未だ詳細は解明されていないものの、その他精英樹や天然林由来のクローン、人工交配家系の実生群を利用してこの変異について検証した結果、黄金スギ特異的な変異であること、変異が遺伝子 (コード) 領域に生じていたこと、形態的に黄金スギとなる実生個体ではこの変異を保有することなどの理由から間接的ながらこの変異が葉色突然変異を引き起こす原因と結論づけた。*matK* 遺伝子に認められる変異が黄金スギの原因であることを直接的に証明するためには、遺伝子組換えや遺伝子破壊系統の利用による検証が必要である。

この研究の過程で奇妙な現象に気づいた。開発した遺伝子マーカーを黄金スギと野生型の人工交配家系に適用した上で遺伝性を検証した際に、ほとんどは父性遺伝だったのに対し、母性遺伝と両性遺伝を示す個体が一定の頻度で確認された。この頻度は、Ohba et al (1971) の非

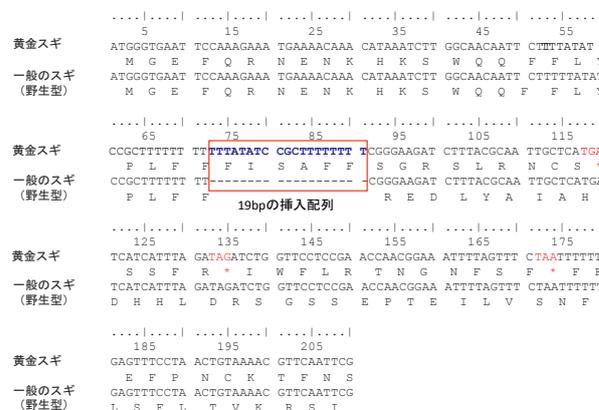


図-3 黄金スギ *matK* 遺伝子領域の変異

表-2 遺伝子領域における変異

遺伝子領域	変異のタイプ	スギ葉緑体ドラフトゲノム	ヤクスギ	黄金スギ
<i>rpl23</i>	一塩基多型	C	A	A
<i>matK</i>	挿入/欠損	-	-	19bp 挿入
<i>chlB</i>	一塩基多型	T	G	G
<i>rps2</i>	一塩基多型	C	A	A

表-3 黄金スギ実生後代の遺伝性の評価

	遺伝パターン			合計
	黄金スギタイプ (父性遺伝)	野生型タイプ (母性遺伝)	キメラタイプ (両性遺伝)	
実生の数	114	6	11	131
割合 <sup>1)</sup>	87.0	4.6	8.4	100
割合 <sup>2)</sup>	89.6	2.9	7.5	100

<sup>1)</sup> *matK* 遺伝子をマーカーとして検証された数。

<sup>2)</sup> Ohba et al. (1971) による割合。

黄金スギ由来の実生が出現する頻度とほぼ一致しており (表-3)、母性遺伝を示した個体では形態的に野生型を示していた。針葉樹では父性遺伝が一般的であるものの、その遺伝性は必ずしも完全ではないことが明らかになっている (Shiraishi et al. 2001)。しかし、黄金スギを利用した本研究では母性遺伝および両性遺伝の頻度は予想されるよりもかなり高い頻度であった。もちろん、突然変異体を利用した結果をスギ一般的な現象であるとする証拠はなく、精英樹等野生型のクローンを利用することで頻度については再検証する必要がある。最近、南半球に分布するヒノキ科植物 (*Callitris species*) でも父性遺伝が検証されており (Sakaguchi et al. 2014)、対象とする種によって不完全父性遺伝の頻度は異なると考えられることから、採種園研究等葉緑体ゲノムをマーカーとして活用する際には事前に父性遺伝する頻度を検証することが正確な花粉親推定を導くためにも重要である。

### DNA マーカーとしての葉緑体ゲノムの活用

1990年代には、葉緑体ゲノム上の *rbcL* 遺伝子を筆頭とする遺伝子群を活用した系統学的研究が盛んに行われた。*rbcL* 遺伝子はおそらく植物で最も情報が蓄積されている遺伝子情報と考えられる。そこで、*rbcL* 遺伝子は *matK* 遺伝子と共に植物の DNA バーコーディング領域として活用されている (吉村 2012)。DNA バーコーディングとは、特定の遺伝子領域を利用して生物種の同定を行う手法であり (Hebert 2003; 日本バーコードオブライフ・イニシアチブ <http://www.jboli.org/>)、最近針葉樹でも葉緑体5領域に対して評価が行われ、*rbcL* 遺伝子を含む3領域が推奨されている (Pang et al. 2012)。黄金スギを対象とした研究で明らかとなったように針葉樹葉緑体ゲノムの種内変異は繰り返し配列を除けば極めて低く、適切な領域を

選択することで種同定は可能である。特に、木製品の種同定を行う場合に解剖学的アプローチでは近縁種を区別することが難しいことから、DNA バーコーディング技術による種同定は古来より木製品としての活用が多い針葉樹では潜在的に高い需要があると考えられる。Tang et al. (2011) は、種同定を行うため、木部の様々な部位から DNA を単離し、葉緑体ゲノムの非遺伝子領域を中心に 300bp~1200bp の PCR 増幅を検証した。氷河から採取した花粉の種同定にも同様の技術が適用されている (Nakazawa et al. 2013)。塩基配列を決定するのではなく、塩基置換によって生じる二次構造の変化を捉えたマーカー (High Resolution Melting, HRM) を利用した類似の研究報告例もある (Ganopoulos et al. 2013)。成木から出土品、花粉から木片まで得られるサンプルの状態や対象種など様々な場面で最も同定に威力を発揮する領域の選定やユニバーサルプライマー化が進めば、専門外でも容易に種同定が行えることから、適用範囲が一層広がることが期待できる。

Parks et al. (2009) は、マツ属 32 種について葉緑体全ゲノムのほとんどをカバーする塩基配列を決定し (平均カバー率 90%以上)、マツ属のより下位の系統関係を明確にすることを試みた。前述したように次世代シーケンサーの普及と葉緑体リファレンスゲノムの充実が大量データセットに基づく研究を可能にした。しかし、かつて隆盛であった系統学的研究に関する近年の報告例は極めて少ない。それに対し、葉緑体ゲノムを活用した針葉樹分子生態学的研究はここ 10 年に限っても数十件の報告がデータベース上に存在した。但し、系統学的研究同様に葉緑体ゲノムのみを利用した研究は少なく、他ゲノムとの併用が一般的になっている。特に、父性遺伝する葉緑体ゲノムとマツ科では母性遺伝すると考えられているミトコンドリアゲノムの併用は一般的になりつつある。葉緑体ゲノムでは、ゲノム中の SSR マーカーが利用されるのが

一般的であり、SNP を扱った研究はまだ希である。SSR は高い多型性を示すものの、突然変異率は不明であることも多く、高い多型性と引き替えに高い突然変異率を示す場合には、正確な評価が得られていない可能性もある。PCR 増幅産物に個体を識別できるタグを連結し、多数の個体の塩基配列情報を次世代シーケンサーによって取得する手法が確立しており、この手法を利用すれば SNP をマーカーとして活用できる。葉緑体ゲノムの進化速度は極めて遅く、多重置換 (multiple hits) が生じにくいと考えられることから SNP マーカーはより正確にハプロタイプを評価できる。但し、進化速度が遅いことから、分析のレベルによっては解像度が低くなることも考えられるため、目的に応じたマーカーの選択が必要である。

## おわりに

本稿では、我々のグループが報告したスギ葉緑体ゲノムから得られた知見を中心に比較ゲノム研究から遺伝性または多様性評価に関する最近の報告を紹介した。集団遺伝学的研究については報告例が数多く、取扱が難しかったことから、より専門の研究者に紹介をお願いしたい。葉緑体ゲノムが採種園の交配実態に利用された報告もいくつか存在した (Stoehr et al. 2006 ; Moriguchi et al. 2008)。リファレンスゲノムが整備され、次世代シーケンサーが普及した現在では、葉緑体ゲノムはますますツールとしての適用範囲が広がることが予測できる。今後の新たな研究の展開に期待する。

## 引用文献

Bowe LM, Coat G, dePamphilis CW (2000) Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4092–4097

Cronn R, Liston A, Parks M, Gernandt DS, Shen R, Mockler T (2008) Multiplex sequencing of plant chloroplast genomes using Solexa sequencing-by-synthesis technology. *Nucleic Acids Research* 36: e122

Ganopoulos I, Aravanopoulos F, Madesis P, Pasentsis K, Bosmall I, Ouzounis C, Tsiftaris A (2013) Taxonomic identification of Mediterranean pines and their hybrids based

on the High Resolution Melting (HRM) and *trnL* approaches: From cytoplasmic inheritance to timber tracing. *PLoS ONE* 8: e60945

Hebert, PDN, Cywinska, A, Ball, SL deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 313–321

Hirao T, Watanabe A, Kurita M, Kondo T, Takata K (2008) Complete nucleotide sequence of the *Cryptomeria japonica* D. Don. chloroplast genome and comparative chloroplast genomics: diversified genomic structure of coniferous species. *BMC Plant Biology* 8: 70

Hirao T, Watanabe A, Kurita M, Kondo T, Takata K (2009a) A frameshift mutation of the chloroplast *matK* coding region is associated with chlorophyll deficiency in the *Cryptomeria japonica* virescent mutant Wogon-Sugi. *Current Genetics* 55: 311–321

Hirao T, Watanabe A, Miyamoto N, Takata K (2009b) Development and characterization of chloroplast microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Molecular Ecology Resources* 9: 122–124

Lin CP, Huang JP, Wu CS, Hsu CY, Chaw SM (2010) Comparative chloroplast genomics reveals the evolution of Pinaceae genera and subfamilies. *Genome Biology and Evolution* 2: 504–517

Moriguchi Y, Kita K, Uchiyama K, Kuromaru M (2008) Enhanced hybridization rates in a *Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* interspecific seed orchard with a single maternal clone revealed by cytoplasmic DNA markers. *Tree Genetics and GENOMES* 4: 637–645

Nakazawa F, Uetake J, Suyama Y, Kaneko R, Takeuchi N, Fujita K, Motoyama H, Imura S, Kanda H (2013). DNA analysis for section identification of individual *Pinus* pollen grains from Belukha glacier, Altai Mountains, Russia *Environmental Research Letters* 8: 014032

Ohba K, Iwakawa M, Okada Y, Murai M (1971) Paternal transmission of a plastid anomaly in some reciprocal crosses of Sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don. *Silvae Genetica* 20: 102–107

Palmer JD, Thompson WF (1982) Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost. *Cell* 29: 537–550

Pang X, Luo H, Sun C (2012) Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed

- plants. *Plant Biology* 14: 839–844
- Parks M, Cronn R, Liston A (2009) Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology* 7: 84
- Sakaguchi S, Tsumura Y, Crisp MD, Bowman DMJS, Isagi Y (2014) Genetic evidence for paternal inheritance of the chloroplast in four Australian *Callitris* species (Cupressaceae). *Journal of Forest Research* 19: 244–248
- Shiraishi S, Maeda H, Toda T, Seido K, Sasaki Y (2001) Incomplete paternal inheritance of chloroplast DNA recognized in *Chamaecyparis obtusa* using an intraspecific polymorphism of the *trnD-trnY* intergenic spacer region. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 935–941
- Stoehr M, Mehl H, Nicholson G, Pieper G, Newton C (2006) Evaluating supplemental mass pollination efficacy in a lodgepole pine orchard in British Columbia using chloroplast DNA markers. *New Forest* 31: 83–90
- Strauss SH, Palmer JD, Howe GT, Doerksen AH (1988) Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 3898–3902
- Tang X, Zhao G, Ping L (2011) Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 77: 609–617
- Wagner, DB, Govindaraju DR, Yeatman CW, Pitel JA (1989) Paternal Chloroplast DNA Inheritance in a Diallel Cross of Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.). *Journal of Heredity* 80: 483–485
- Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M (1994) Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9794–9798
- Wu CS, Wang YN, Hsu CY, Lin CP, Chaw SM (2011a) Loss of different inverted repeat copies from the chloroplast genomes of Pinaceae and Cupressophytes and influence of heterotachy on the evolution of Gymnosperm phylogeny. *Genome Biology and Evolution* 3: 1284–1295
- Wu CS, Wang YN, Lin CP, Hsu CY, Wang RJ, Chaw SM (2011b) Comparative Chloroplast genomes of Pinaceae: Insights into the mechanism of diversified genomic organizations. *Genome Biology and Evolution* 3: 309–319
- Wu CS and Chaw SM (2014) Highly rearranged and size-variable chloroplast genomes in conifer II clade (cupressophytes): evolution towards shorter intergenic spacers. *Plant Biotechnology Journal* 12: 344–353
- Yi X, Gao L, Wang B, Su YJ, Wang T (2013) The complete chloroplast genome sequence of *Cephalotaxus oliveri* (Cepalotaxaceae): Evolutionary comparison of *Cephalotaxus* chloroplast DNAs and insight into loss of inverted repeat copies in gymnosperms. *Genome Biology and Evolution* 5: 688–698
- 吉村 研介 (2012) 日本産樹木の DNA バーコード. *林木の育種* 245: 6–10