

ISSN 0386-5304

No.29 Mar.2011

Bulletin of
The Hiroshima Botanical Garden

Published by

The Hiroshima Botanical Garden
(Municipal)
Kurashige, Saeki-ku, Hiroshima
Japan

CONTENTS

Hamatani, S. : Characterization of <i>Lachenalia</i> , the Liliaceae based on karyomorphological, molecular phylogenetical and molecular cytogenetical studies	1 – 90
Ishida, G. : Karyomorphological comparison in two taxa of <i>Chelidonium</i> (Papaveraceae) in Altai and Japan	91 – 96

目 次

濱谷修一：ユリ科 <i>Lachenalia</i> の核形態学的，分子系統学的および分子細胞遺伝学的特性研究	1 – 90
石田源次郎：アルタイ産と日本産のクサノオウ属（ケシ科）の核形態学的比較	91 – 96

ユリ科 *Lachenalia* の核形態学的, 分子系統学的および
分子細胞遺伝学的特性研究 *

濱谷修一¹⁾

**Characterization of *Lachenalia*, the Liliaceae based on karyomorphological, molecular
phylogenetical and molecular cytogenetical studies***

Shuichi Hamatani¹⁾

Abstract

1. *Lachenalia* Jacq. ex Murray, the Liliaceae is a perennial herb and endemic to the western part of southern Africa. The plants belonging to this genus are used as half-hardy and fall planting bulbs for horticultural use in Japan, and some of which bloom in late fall and others in early spring. About 110 species of this genus are known, and they are expected to become popular for ornamental interior use because of their varied colors and compact plant forms. The production of artificial hybrids has begun, however, it has not yet become popular because there have been some difficulties in cross breeding. Analysis of the relationships of plants within the genus is desired for the purpose of choosing efficient parent plants for cross breeding to obtain excellent strains. Then, 40 species and four varieties of *Lachenalia* were characterized using karyomorphological studies, molecular phylogenetical studies, and molecular cytogenetical studies.

2. In the karyomorphological studies, karyotype was analyzed using the aceto-orcein staining and squashed method. Chromosome numbers were counted as $2n=14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 26, 28$, and 42 . *L. algoensis* ($2n=14$), *L. aloides* var. *vanzyliae* ($2n=28$), *L. aloides* 'Pearsonii' ($2n=15$), *L. latimerae* ($2n=18$), *L. longibracteata* ($2n=14$), *L. longituba* ($2n=28$) and *L. thomasiae* ($2n=14$) have been reported here for the first time, whereas *L. arbutnotiae* ($2n=15$), *L. capensis* ($2n=16$), *L. purpureocoerulea* ($2n=15$), *L. variegata* ($2n=14$), and *L. zeyheri* ($2n=23$) have been reported previously with another chromosome numbers.

On the bases of an analysis of resting nuclei during somatic cell division and somatic chromosomes in the mitotic prophase and metaphase, the taxa studied were categorized into six groups based on the basic chromosome numbers of $x=7, x=8, x=9, x=11, x=12$, and $x=13$ or 14 .

3. In the molecular phylogenetical studies, sequencing of the bases of internal transcribed spacer (ITS) regions on nuclear ribosomal (nr)DNA was performed, and phylogenetical analysis was conducted using data from the ITS regions of selected 34 species and four varieties. In the phylogenetic tree based on the ITS sequences, the taxa studied were roughly divided into the three species (*L. hirta*, *L. latifolia*, and *L. latimerae*) showing no relationships among them, two clades (Clade I and Clade II) had high confidence values and each was constructed from three species, and one clade (Clade III) had a low confidence value and was constructed from 25 species and four varieties. Clade III was further divided into one clade with a high confidence value and was constructed from 12 species (Clade IV), and the remaining

A dissertation submitted in partial fulfillment of requirement for the Degree of Doctor of Agricultural Science of Tokyo University of Agriculture.

* Contribution from the Hiroshima Botanical Garden No. 92.

1) The Hiroshima Botanical Garden

Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden, No. 29 : 1-90, 2011

13 species and four varieties showed no relationships with each other.

The interrelation was confirmed by analyzing variations in basic chromosome numbers and results of comparisons between ITS regions. *L. hirta* showed a basic chromosome number of $x=11$, *L. latifolia* showed $x=12$, *L. latimerae* showed $x=9$, the three species of Clade I showed $x=13$ or 14 , the three species of Clade II showed $x=11$, almost all of the taxa of Clade IV showed $x=8$, and *L. muirii* and *L. pusilla* of Clade IV and the other 13 species, four varieties, and two cultivars showed $x=7$. Whereas some questions were remained; some variations were observed in chromosome numbers between the species of Clade I, which were transferred from genus *Polyxena* to genus *Lachenalia* by Manning *et al.* (2004) and showed close correlations in the comparison of ITS sequences; Clade IV which was constructed from almost all of the taxa of $x=8$, but also included *L. muirii* and *L. pusilla* of $x=7$; the relationships between the taxa of $x=7$ were not determined in both the karyomorphological or molecular phylogenetical studies. Therefore, the molecular cytogenetical methods were applied to somatic cells to solve these assignments.

4. In the molecular cytogenetical studies, 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 5S rDNA and 18S rDNA probes were used for analyzing somatic chromosomes in the mitotic metaphase of selected 20 species and two varieties of *Lachenalia*.

Some taxa showed clear DAPI bands on all chromosomes, some on partial chromosomes, and others not on all chromosomes. Two FISH signals of 5S rDNA sites were observed in almost all taxa, but in some taxa, four signals were observed. Similarly, two signals of 18S rDNA sites were observed in almost all taxa, but in some taxa, four or six signals were observed. In *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. longibracteata*, *L. muirii*, *L. orchioides* var. *orchioides*, and *L. viridiflora* with a basic chromosome number of $x=7$, similarities in the features of the DAPI bands and the signals of 5S rDNA sites were observed in all of these taxa, and in which similarities were also observed in the signals of 18S rDNA sites in addition to the features of the DAPI bands except in case of *L. muirii*. In all five taxa of $x=8$, there were similarities in the features of DAPI bands and the signals of 5S rDNA and 18S rDNA sites. In *L. pusilla* of $x=7$, *L. latimerae* of $x=9$, and *L. hirta*, *L. juncifolia* and *L. zeyheri* of $x=11$, which did not show clear DAPI band in all chromosomes, there were similarities in the features of the signals of 5S rDNA and 18S rDNA sites.

The analysis using DAPI staining and FISH showed similar features in *L. pusilla* of $x=7$ and the taxa of $x=9$ and 11 , which did not show any similarities on karyomorphological analyses and on the comparing the sequences of ITS regions. The taxa of $x=8$ had very similar characteristics, whereas the taxa of $x=7$ had similarities but also some differences. Therefore, it was suggested that the taxa of $x=7$ be speciated from plural ancestral species, and done with crossing each other, transformation of chromosomal structures, and so on. Moreover, it was suggested that there were mutual elements between *L. muirii* of $x=7$ and the taxa of $x=8$. DAPI staining and FISH showed different results between *L. longituba* and *L. paucifolia*, which were transferred from *Polyxena* to *Lachenalia*, and there were different results between these two taxa and the other taxa.

5. It was concluded that *Lachenalia* were divided into roughly three groups. A: The group consisted of the taxa showing clear DAPI bands on their chromosomes. This group included most of the taxa of $x=7$ and $x=8$, which had descended from one or more ancestral species of $x=8$ and from plural ancestral species of $x=7$, and take the hereditary affects each other. Furthermore, this group showed small amount of variations in the ITS regions. B: The group consisted of taxa with no clear DAPI bands on their chromosomes. This group had clear variations in the sequences of the ITS regions and included the taxa of $x=11$, a portion of the taxa of $x=7$ (*L. pusilla*), and the taxa of $x=9$. C: The group consisted of taxa transferred from the genus *Polyxena* by Manning *et al.* (2004). A complex correlations in this group was suggested.

The chromosomal observations using DAPI staining were very useful for researching the relationships among species belonging to *Lachenalia*. It was expected that the results of this study would be utilized as the important basic information, for the future increasing ornamental uses.

緒 言

Lachenalia Jacq. ex Murray は、ユリ科（ツルボ亜科）あるいはヒヤシンス科として分類される、鱗茎を持つ多年生草本植物である。約 110 種がアフリカ大陸の南西部にあたる南アフリカ西部からナミビアに分布し、そのうちの約 80 種がケープ地方に集中している（Manning *et al.* 2002）。

日本国内では、園芸的には半耐寒性の秋植え球根として取り扱われ、株のサイズが概ね高さ 40 cm 以下、幅 30 cm 以下に収まるため鉢植え植物としての利用が一般的である。秋に葉の展開を始め、早い種類では晩秋に開花、多くの種類は早春から春の間に開花する。晩春から夏の間には地上部は枯れる。花色は変化に富み、観賞価値が高い。1 枚の葉を持つ種、2 枚の葉を持つ種が多く、残るいくつかの種はロゼット状に展開する 3 枚以上の葉を持ち、通常は葉の間から 1 本の花茎を出す。花の形状はいくつかのパターンに分けられるが、いずれも花茎の周囲に多数の小花を咲かせる。国内で流通しているのは 10 種程度 of 原種と数種類の選抜系統にとどまり、それ以外のいくつかの原種が愛好家の間で栽培されているというのが現状であるが、今後の観賞目的での利用増大が期待される。人工交配種はいくつか作出されているが、国内ではまだ普及しているとはいえない。交雑が容易に行われる組み合わせや、行われなにか難しい組み合わせが存在することが知られており（Lubbinge 1980, Kleynhans *et al.* 2009）、今後、効率的に交配親を選択し、より優れた人工交配種を作出するために、種間の類縁関係を明らかにすることが望まれている。

Lachenalia 属内の細分化のうち形態情報を用いたものについては、主なものとして Baker (1897) による花被の形状を根拠にした 5 亜属の分類、Duncan (1988) による雄ずいと花被片の長さ関係や花序の形状を根拠にした 2 グループ（10 サブグループ）の分類、Manning *et al.* (2002) による葉や花の形状を根拠にした 5 グループの分類の 3 システムが挙げられる。

生物の類縁関係を分析する際に、染色体の情報を比較するのは有効な方法の一つである。*Lachenalia* における染色体に関する研究は、人工交配種のデータを除くと 55 種 7 変種（Manning *et al.* 2004 により *Lachenalia* に編入された *Polyxena* を含む）から $2n$

= 10, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 40, 42, 44, 49, 56 の染色体数が報告されている（Moffett 1936, de Wet 1957, Fernandes and Neves 1962, Gouws 1964, Ornduff and Watters 1978, Nordenstam 1982, Crosby 1986, Johnson and Brandham 1997, Spies *et al.* 2002 など）。これらの中で、 $2n = 14$ が 18 種 3 変種、 $2n = 16$ が 16 種、 $2n = 28$ が 7 種 1 変種、 $2n = 22$ が 4 種 1 変種と、比較的多く報告されている（同一種、変種で複数の染色体数があるものはすべて計上）。Hancke and Liebenberg (1990) は、染色体数の変異の幅が大きく基本数の推定が困難なものが多い *Lachenalia* において、B-染色体の存在に注目して基本数の整理の手段を探った。Johnson and Brandham (1997) は 52 種 10 変種と種名の判らない 7 個体の染色体数を算定し、基本数 $x = 7$ と 8 が最も頻繁に見られることを報告した。

Lachenalia の染色体に関する報告は、染色体数だけを報告したものが多いが、Moffett (1936) は 15 種 6 変種の体細胞分裂と減数分裂を観察、染色体の形態（核型）を比較し、基本数 $x = 7$ の 2 グループ、 $x = 8$ の 1 グループ、 $x = 11$ の 1 グループの計 4 グループに分けた。de Wet (1957) も染色体情報を用いて種ごとの類縁関係を探った。また、Crosby (1986) は主に染色体情報と人工交配の情報を根拠に 5 グループに分類することを提唱した。なお、*Lachenalia* の核型に関する調査の多くはハンドセクション法が用いられた時代に行われており、より正確に核型を観察することができる押しつぶし法を用いた核型分析の報告は少ない。

Duncan *et al.* (2005) は、外部形態や染色体等の 73 の形質を計算可能なデータに置き換え、最大節約法で系統解析を行い、系統樹を得た。しかしながら、でき上がった系統樹と特定の形質との関連を指摘することが難しかった。このようなことから、Duncan *et al.* (2005) は *Lachenalia* の属内での類縁関係を知るためには、形態の比較だけでは十分ではなく、分子生物学的な情報などとの比較も必要であることを訴えた。

Lachenalia における分子生物学的手法を用いた研究の報告は近年になっていくつか報告され始めている。Pfosser *et al.* (2003) と Manning *et al.* (2004) は、*Lachenalia* を含む周辺属の間での類縁関係を調べ、

Table 1. Plant materials studied

Plant name*	Distributions	Flowering periods in habitats*	Plant heights*	Previous classification systems					Previous counts of chromosome numbers (2n)	References	
				Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)			
<i>Lachenalia</i>											
<i>algoensis</i> Schöenl.	H	July-Aug.	6-30cm	-	Aloides	1d	Group3	L.1-L. mathewsii	-		
<i>aloides</i> (L.f.) Engl.	D**	July**	6-25cm**	Eulachenalia	Aloides	1f	Group3	L.1-L. mathewsii	14	Speta 1972,	
var. <i>aloides</i> (= <i>L. tricolor</i> (L.) Thunb.)										Mogford 1978,	
										Johnson & Brandham 1997	
<i>aloides</i> var. <i>aurea</i> (L.indl.) Engl.	D**	Sep.-Oct.**	6-25cm**	-	Aloides	1f	-	L.1-L. mathewsii	14, 28	Hancke & Liebenbeg 1990	
<i>aloides</i> var. <i>quadricolor</i>	C, D**	July-Aug.**	9-20cm**	-	Aloides	1f	-	L.1-L. mathewsii	14	Johnson & Brandham 1997	
(Jacq.) Engl									21	Moffett 1936	
<i>aloides</i> var. <i>vanzylliae</i> W.F.Barker	C**	Sep.-Oct.**	5-26cm**	-	Aloides	1f	-	L.1-L. mathewsii	-		
<i>arbutifoliae</i> W. F. Barker	D	Aug.-Oct.	18-40cm	-	Orchioides	1a	Group2	L.1-L. elegans	14	Johnson & Brandham 1997	
<i>bachmannii</i> Bak.	D	Aug.-Sep.	15-30cm	Chloriza	Unicolor	1d	Group5	L.1-L. pallida	16	de Wet 1957,	
										Johnson & Brandham 1997	
<i>bulbifera</i> (Cyrillo) Engl.	C, D, E	Apr.-Sep.	8-30cm	Eulachenalia	Aloides	1f	Group3	L.1-L. bulbifera	28, 42	Spies 2004	
(= <i>L. pendula</i> Ait)									28, 42, 49, 56	Kleynhans & Spies 1999	
									28, 42, 56	Crosby 1936, Kleynhans 1997	

The marks of "Distributions" have to be referred to Fig. 1.

* Referred from Manning *et al.* 2002. Expect for (**) referred from Duncan 1988.

*** Measured directly from cultivated plants.

Table 1. Continued

Plant name	Distributions*	Flowering periods in habitats*	Plant heights*	Previous classification systems					Previous counts of chromosome numbers (2n)	References
				Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)		
<i>bulbifera</i> <continued>									28, 56	Hancke 1991
									42	Moffett 1936
<i>capensis</i> W.F.Barker	D	Sep.-Oct.	15-25cm	-	-	1b	Group2	L.1-L. mahtewsii	42, 56	Johnson & Brandham 1997
<i>carcosa</i> Bak.	A, C**	Aug.-Sep.**	8-25cm**	Chloriza	Unicolor	1a	-	L.1-L. pallida	c.28	Johnson & Brandham 1997
(= <i>L. ovatifolia</i> L.Guthrie)									16	Johnson & Brandham 1997
<i>contaminata</i> Ait.	C, D, E	Aug.-Oct.	6-25cm	Chloriza	Unicolor	1d	Group1	L.1-L. pallida	14, 16	Gouws 1964
									16	de Wet 1957
<i>ensifolia</i> (Thunb.)	B, C, D, E, F, G, H	Apr.-June	5cm	-	-	-	(Polyxena)	L.2-Polyxena	16+0-1B, 32	Johnson & Brandham 1997
J. C. Manning & Goldblatt (= <i>Polyxena ensifolia</i> (Thunb.) Schöenl.)									24, 26	Johnson & Brandham 1997
<i>fistulosa</i> Baker	C, D	Sep.-Oct.	8-30cm	Chloriza	-	1a	Group2	L.1-L. mathewsii	14	Johnson & Brandham 1997
<i>hirta</i> (Thunb.) Thunb.	C, D	Aug.-Oct.	10-30cm	Chloriza	-	1f	Group5	L. juncifolia	22, 24	Johnson & Brandham 1997
									24	de Wet 1957
<i>juncifolia</i> Bak.	C, D, E	Aug.-Nov.	7-40cm	Chloriza	Unifolia	2d	Group4	L. juncifolia	22	Johnson & Brandham 1997
									44	Spies 2004
<i>latifolia</i> Tratt.	E, G, H**	Sep.-Nov.**	15-30cm**	Chloriza	-	2c	Group4	-	24	Johnson & Brandham 1997
<i>latimeriae</i> W. F. Barker	F, H	Jul.-Aug.	15-28cm	-	-	2d	Group4	L.2-L. perryae	-	-

Table 1. Continued

Plant name	Distributions*	Flowering periods in habitats*	Plant heights*	Previous classification systems					Previous counts of chromosome numbers (2n)	References
				Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)		
<i>liliflora</i> Jacq.	D	Sep.-Oct.	10-20cm	Orchiops	Unicolor	1e	Group5	L.1-L. pallida	16	Moffett 1936, de Wet 1957,
										Fernandes & Neves 1962,
<i>longibracteata</i> Phillips	C, D	July-Sep.	7-35cm	-	Orchioides	1b	Group2 or 5	-	-	Johnson & Brandham 1997
<i>longituba</i>	B	May-June	7cm	-	-	-	(Polyxena)	L.2-Polyxena	-	
(A. M. van der Merwe) J. C. Manning & Goldblatt (= <i>Polyxena longituba</i> A. M. van der Merwe)										
<i>mathewsii</i> W.F.Barker	D	Sep.	10-20cm	-	-	2c	Group 5	L.1-L.mathewsii	14	Johnson & Brandham 1997
<i>mutirii</i> W. F. Barker	E	Oct.-Dec.	10-25cm	-	-	1a	Group2	L.1-L. mathewsii	14	Johnson & Brandham 1997
<i>mutabilis</i> Sweet	C, D	July-Sep.	10-45cm	-	Orchioides	1a	Group2	L.1-L. mathewsii	10, 14	Johnson & Brandham 1997
									14	Harcke & Liebenberg 1990
									14, 56	de Wet 1957
									24	Kleynhans 1997,
										Spies <i>et al.</i> 2000,
										Minnaar 2004
<i>namaquensis</i>	A**	Aug.-Oct.**	8-23cm**	-	Unicolor	1a	-	L.1-L. pallida	16	Johnson & Brandham 1997
Schltr. ex. W. F. Barker										
<i>orchioides</i>	C, D, E, F**	Aug.-Oct.**	8-40cm**	Orchiops		1a	Group2	L.1-L. mathewsii	16	Sato 1941, de Wet 1957
(L.) Ait. var. <i>orchioides</i>									16, 17	Moffett 1936
									28, 29	Johnson & Brandham

Table 1. Continued

Plant name	Distributions*	Flowering periods in habitats*	Plant heights*	Previous classification systems				Previous counts of chromosome numbers (2n)	References
				Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)	
<i>orchnoides</i> var. <i>glaucina</i> (Jacq.) W. F. Barker	D**	Aug.-Oct.**	10-40cm**	Orchiops	Aloides	1a	-	L.1-L. mathewsii	18 Riley 1962 28 Moffett 1936, Therman 1956, de Wet 1957, Crosby 1986, Johnson & Brandham 1997
<i>orthopetala</i> Jacq.	C, D	Sep.-Oct.	9-27cm	Orchiops	Unicolor	1e	Group1	L.1-L. pallida	16 Zakharyeva & Makushenko 1969, Crosby 1986, Johnson & Brandham 1997
<i>pallida</i> Ait.	C, D	Aug.-Oct.	12-30cm	Chloriza	Unicolor	1e	Group5	L.1-L. pallida	16 Moffett 1936, Sato 1941, Johnson & Brandham 1997
<i>paucifolia</i> (W. F. Barker) J. C. Manning & Goldblatt (= <i>Polyxena paucifolia</i> (W. F. Baker) A. M. van der Merwe et Manning.)	D	Apr.-June	7cm	-	-	-	(Polyxena)	L.2-Polyxena	-
<i>peersii</i> Marloth ex W. F. Barker	D	Oct.-Nov.	15-30cm	-	-	1f	Group5	L.1-L. mathewsii	14 Johnson & Brandham 1997
<i>purpureoerulea</i> Jacq.	D	Oct.-Nov.	10-28cm	Chloriza	-	2c	Group4	L.1-L. pallida	16 Moffett 1936, Johnson & Brandham 1997
<i>pusilla</i> Jacq. f. (= <i>Polyxena pusilla</i> (Jacq.) Schltr.)	C, D, E, G	Apr.-June	1-4cm	Brachyscypha	Pusilla	2c	Group1	L.1-L. pallida	14 Johnson & Brandham 1997 16 Nordenstam 1982, Hancke 1991

Table 1. Continued

Plant name	Distributions*	Flowering periods in habitats*	Plant heights*	Previous classification systems					Previous counts of chromosome numbers (2n)	References
				Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)		
<i>pustulata</i> Jacq.	D	Aug.-Oct.	15-35cm	Chloriza	Unicolor	2d	Group5	L.1-L. pallida	16	Moffett 1936, Johnson & Brandham 1997
<i>reflexa</i> Thunb.	D	June-Aug.	20-25cm	Coelanthus	Aloides	1d	Group3	L.1-L. mathewsii	32	Sato 1941
<i>rosea</i> Andrews	D, E, F, G, H	Aug.-Dec.	8-30cm	Chloriza	Orchioides	1f	Group5	L.1-L. elegans	14	Moffett 1936, Therman 1956, Moffett 1936,
<i>rubida</i> Jacq.	C, D, E, H	Mar-July	6-25cm	Eulachenalia	Aloides	1e	Group3	L.1-?	14	Johnson & Brandham 1997 Moffett 1936, Crosby 1986
<i>splendida</i> Diels (= <i>L. roodeae</i> Phillips)	C	July-Aug.	6-25cm	-	Unicolor	2a	Group4	L.1-L. pallida	16	Johnson & Brandham 1998
<i>thomastae</i> W.F.Barker ex G.D.Duncan	C	Sep.-Oct.	12-38cm	-	-	-	Group4	L.1-L. mathewsii	-	-
<i>unicolor</i> Jacq.	C, D	Sep.-Oct.	8-30cm	Chloriza	Unicolor	2d	Group4	L.1-L. pallida	16	Moffett 1936, Sato 1941, de Wet 1957, Crosby 1986, Johnson & Brandham 1997
<i>unifolia</i> Jacq.	C, D, E	Aug.-Oct.	10-35cm	Chloriza	Unifolia	1f	Group5	L. juncifolia	21, 22, 24, 26	de Wet 1957 22, 26 Moffett 1936 22, 44 Johnson & Brandham 1997 c.80 Spies 2004
<i>variegata</i> W. F. Barker	C, D	Aug.-Oct.	10-40cm	-	-	1b	Group2	L.1-L. bulbifera	28	Spies 2004

Table 1. Continued

Plant name	Distributions*	Flowering periods in habitats*	Plant heights*	Previous classification systems					Previous counts of chromosome numbers (2n)	References
				Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)		
<i>viridiflora</i> W. F. Barker	D	May-July	8-20cm	-	Alroides	1e	Group3	L.1-L. mathewsii	14	Nordenstam 1982, Hancke & Liebenberg 1990, Johnson & Brandham 1997
<i>violacea</i> Jacq.	C	Jul.-Sep.	10-35cm	Chloriza	Unicolor	2d	Group4	L.1-L. violacea	14, 15	Johnson & Brandham 1997
<i>zeyheri</i> Bak.	C	Sep.	15-36cm	Chloriza	Unicolor	1e	Group5	L. juncifolia	22	Johnson & Brandham 1997

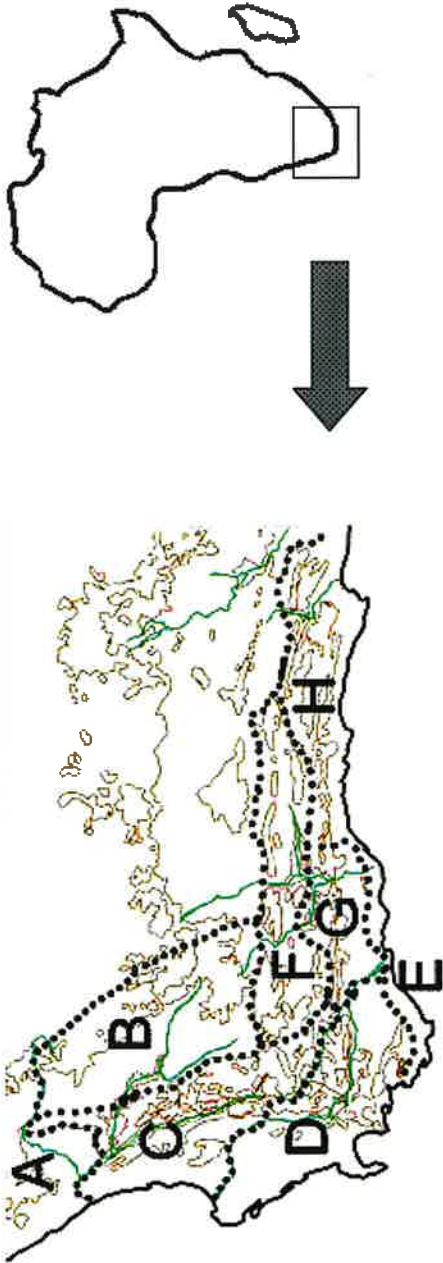


Fig. 1. Distributions of *Lachenalia*.
Alphabetical symbols are linked to Table 1.



Fig. 2. Plants of *Lachenalia* studied.

A: *Lachenalia algoensis*, B: *L. aloides* var. *aloides*, C: *L. aloides* var. *lutea*, D: *L. aloides* var. *quadricolor*, E: *L. aloides* var. *vanzyliae*, F: *L. aloides* 'Lutea', G: *L. arbuthnotiae*, H: *L. bachmannii*, I: *L. bulbifera*, J: *L. capensis*, K: *L. carnos*a, L: *L. contaminata*, M: *L. ensifolia*, N: *L. fistulosa*, O: *L. hirta*, P: *L. juncifolia*, Q: *L. latifolia*, R: *L. latimerae*, S: *L. liliflora*.



Fig. 2. Continued.

T: *L. longibracteata*, U: *L. longituba*, V: *L. mathewsii*, W: *L. muirii*, X: *L. mutabilis*, Y: *L. namaquensis*, Z: *L. orchioides* var. *orchioides*, a: *L. orchioides* var. *glauca*, b: *L. orthopetala*, c: *L. pallida*, d: *L. paucifolia*, e: *L. peersii*, f: *L. purpureoerulea*, g: *L. pusilla*, h: *L. pustulata*, i: *L. reflexa*, j: *L. rosea*.

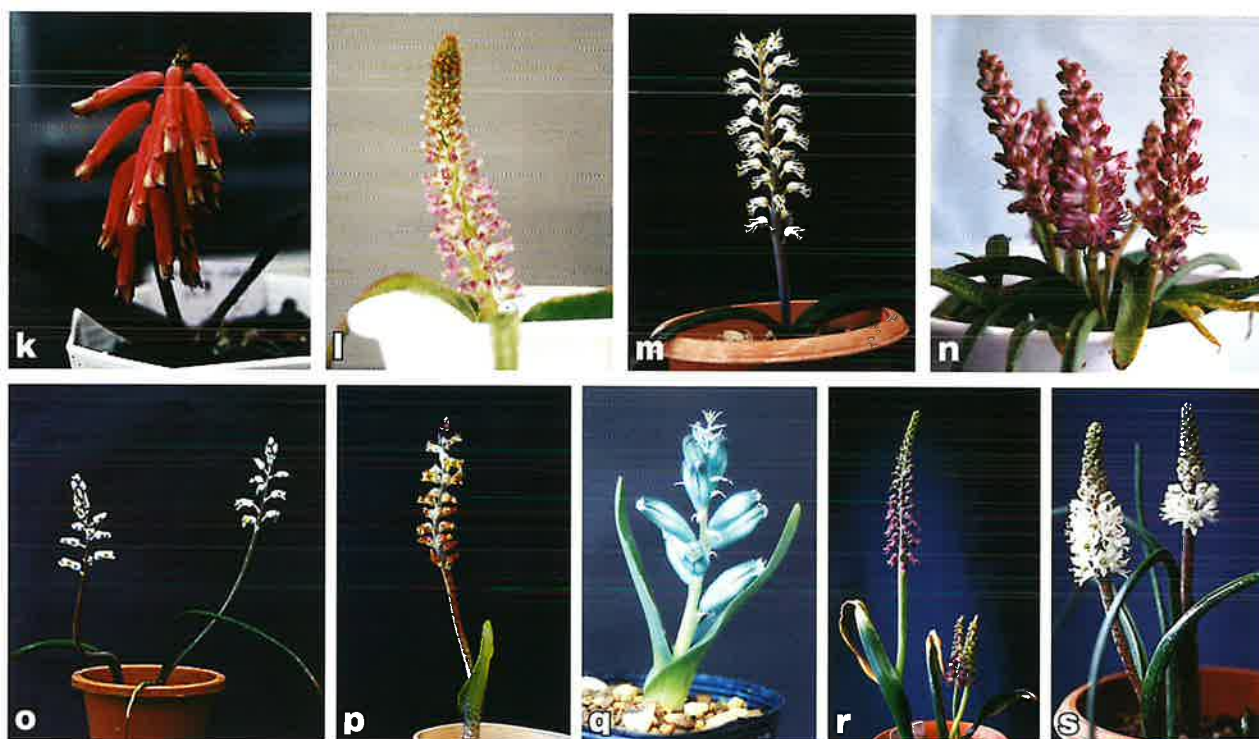


Fig. 2. Continued.

k: *L. rubida*, l: *L. splendida*, m: *L. thomasiae*, n: *L. unicolor*, o: *L. unifolia*, p: *L. variegata*, q: *L. viridiflora*, r: *L. violacea*, s: *L. zeyheri*.

Lachenalia が *Daubenyia*, *Drimiopsis*, *Eucomis*, *Ledebouria*, *Massonia*, *Periboea*, *Polyxena*, *Resnova*, *Schizocarpus*, *Veltheimia* 等の属との間に高い近縁性を持つことを指摘した。なかでも, Manning *et al.* (2004) は葉緑体 DNA の領域である *trnL-F* と *rbcL* のデータを基に, *Lachenalia* の近縁属とされていた *Polyxena* の 5 種を *Lachenalia* に編入した。しかし, Pfosser *et al.* (2003) と Manning *et al.* (2004) の 2 報は *Lachenalia* 属内での種間の類縁関係については詳述していない。属内の類縁関係について調査したものは Spies *et al.* (2002), Spies (2004) に見られる。前者は DNA 解析による系統分析の結果と, Baker (1897), Crosby (1986), Duncan (1988) による分類方法との比較を行い, 染色体情報に注目した Crosby (1986) の結果が最も自然な分類法であると指摘した。後者は DNA 解析による系統分析の結果を根拠に *Lachenalia* を 4 グループ (15 サブグループ) に分類し, 各グループ内では染色体基本数が共通する傾向にあることを指摘した。

なお, 分子生物学的手法を用いた Spies *et al.* (2002), Pfosser *et al.* (2003), Manning *et al.* (2004), Spies (2004) の 4 報は, いずれも葉緑体 DNA の情

報をもとにして検討が行われており, 核 DNA の情報を用いた報告はまだ出されていない。

Lachenalia の属内の類縁関係に関する検討は進みつつある段階ではあるが, 外部形態以外の情報はまだ偏った状況であると判断できる。そこで, 本研究では, 日本国内の植物園, 種苗生産者, 趣味家等から導入し, 広島市植物公園で栽培・維持している 40 種 4 変種の *Lachenalia* を用い (Table 1, Fig. 1, 2), 一連の分析を行った。まず初めに酢酸オルセイン染色した根端を用いて, 「ハンドセクション法」よりも正確に染色体の分析が可能となる「押しつぶし法」による詳細な核型分析を行った (核形態学的研究)。次に, 核リボゾーム (nr) DNA の一領域である内部非転写 (internal transcribed spacer : ITS) 領域の情報を用いた系統解析を行い, 核型分析の結果や過去の主な分類法との比較を行った (分子系統学的研究)。最後に, 以上 2 つの手法で明らかにすることのできなかった部分に焦点を当て, *Lachenalia* ではまだ適用された報告のない 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色および 5S rDNA, 18S rDNA に相補する DNA 断片 (プローブ) を用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) による

染色体の分子生物学的研究を行った（分子細胞遺伝学的研究）。以上の結果をまとめ、*Lachenalia* の属

内での類縁特性について考察した。

第1章 核形態学的研究：酢酸オルセイン染色 押しつぶし法を用いた核型分析

生物の類縁関係の有効な分析方法の一つとして、染色体の比較がある。*Lachenalia* における染色体の研究の多くは染色体数の算定に限られている。また、核型分析の報告はあるものの、多くはハンドセクション法により調査が行われている（Moffett 1936, de Wet 1957 など）。そこで、より正確に染色体の形態観察が可能な押しつぶし法による詳細な核型分析を行った。

材料および方法

核型分析には、Table 2 に示した 40 種 4 変種 5 品種（49 系統）を用いた。伸長中の根端を採取し、20℃の 2mM 8-ヒドロキシキノリン (8-hydroxyquinoline) 溶液中に浸漬して 2 時間維持し（前処理）、その後 -20℃の酢酸アルコール（酢酸：エタノール = 1:3）液で数日間保持した（固定）。60℃の 45% 酢酸、1 規定 塩酸の等量混合液に 1.5 分浸して解離を行った後、プレパラート上で 2% 酢酸オルセインを滴下し、押しつぶしを行った。体細胞分裂の休止期核、分裂前期、分裂中期の染色体の形態について分析を行った。休止期、分裂前期の形態の表現は Tanaka (1980) に、分裂中期の表現は Levan *et al.* (1964) に従った。

結果および考察

特性を評価した全系統の体細胞の静止期の像を Fig. 3 に、分裂期前期の像を Fig. 4 に、分裂期中期の像を Fig. 5 に、相同染色体を考慮に入れながら染色体を大きい順に並べたものを Fig. 6 に、イデオグラムを Fig. 7 に示した。また、各段階における体細胞核の形態について、Tanaka (1980) の分類方法に基づく静止期と分裂前期の表現型、染色体数、染色体長に基づく分裂中期の表現型、Levan *et al.* (1964) の分類方法に基づく腕比（長腕／短腕）による分裂中期の表現型、推定される倍数性と染色体基本数 (x) などを Table 2 に示した。

静止期核の形態による比較

全ての系統の体細胞分裂静止期核の形態は、棒形前染色体型 (E)、球形前染色体型 (F)、またはその中間的な型 (E or F) のいずれかに分類され、前染色体型という点においては共通しており、静止期核の形態で類縁関係を考察するのは困難であった (Table 2, Fig. 3)。

分裂前期染色体の形態による比較

全ての系統の体細胞分裂前期の染色質の凝縮の形と位置とによって分けた染色体の型は、基部型 (p) に分類され、系統間の違いを認めることは困難であった (Table 2, Fig. 4)。

分裂中期染色体の形態による比較

染色体数は $2n = 14$ が 17 種 2 変種 2 品種、15 が 2 品種、16 が 10 種、17 が 2 種、18 が 1 種、22 が 3 種、23 が 1 品種、24 が 2 種、26 が 2 種、28 が 3 種 1 変種、42 が 1 種だった (Table 2, Fig. 5, 6)。このうち、*L. algoensis* ($2n = 14$)、*L. aloides* var. *vanzyliae* ($2n = 28$)、*L. aloides* 'Pearsonii' ($2n = 15$)、*L. latimerae* ($2n = 18$)、*L. longibracteata* ($2n = 14$)、*L. longituba* ($2n = 28$)、*L. thomasiae* ($2n = 14$) の 6 種 1 変種 2 品種の染色体数は初報告、*L. arbuthnotiae* (No.2) ($2n = 15$)、*L. capensis* ($2n = 16$)、*L. purpureocoerulea* ($2n = 17$)、*L. variegata* ($2n = 14$)、*L. zeyheri* (No.2) ($2n = 23$) の 4 種 2 品種の染色体数は既報 (Moffett 1936, Johnson and Brandhan 1997, Spies 2004) と異なる報告だった。

付随体は以下の系統の染色体に観察された。すなわち、*L. aloidea* var. *aurea* の第 4 染色体に、*L. aloides* 'Lutea' の第 6 染色体に、*L. arbuthnotiae* (No.2) の第 4, 5 染色体に、*L. bachmannii* の第 1, 3, 4 染色体に、*L. capensis* の第 1 染色体に、*L. contaminata* の第 1 染色体に、*L. fistulosa* の第 3, 4 染色体に、*L. juncifolia* の第 1 染色体に、*L. latimerae* の第 3 染色体に、*L. liliflora* の第 1, 2 染色体に、*L. pallida* の第 1 染色体に、*L. peersii* の第 1, 2, 3, 4 染色体に、*L.*

Table 2. The results of karyomorphological studies of *Lachenalia*

Species and variety	Classifications of nuclei of somatic chromosomes		Information of mitotic metaphase				Basic chromosome number (x)
			Chromosome number (2n)	Expression from chromosome length**	Expression from arm ratio***	Polyploidy	
	Resting stage*	Mitotic prophase*					
<i>Lachenalia</i>							
<i>algoensis</i> Schöenl.	F	p	14	bi-modal (6L+8S)	symmetric (12m+2sm)	2x	7
<i>aloides</i> (L.f.) Engl. var. <i>aloides</i>	E or F	p	14	bi-modal (2L+12S)	symmetric (7m+5sm+2st)	2x	7
<i>aloides</i> var. <i>aurea</i> (Lindl.) Engl.	F	p	14	tri-modal (2L+8M+4S)	symmetric (9m+2sm+1st)	2x	7
<i>aloides</i> var. <i>quadricolor</i> (Jacq.) Engl.	F	p	14	bi-modal (2L+12S)	symmetric (5m+7sm+2st)	2x	7
<i>aloides</i> var. <i>varzyllae</i> W.F.Barker	E	p	28	gradual or bi-modal (12L+16S)	symmetric (10m+11sm+6st+1t)	4x	7
<i>aloides</i> 'Lutea'	F	p	14	tri-modal (2L+4M+8S)	symmetric (8m+6sm)	2x	7
<i>aloides</i> 'Pearsonii'	F	p	15	tri-modal (2L+2M+11S)	symmetric (5m+4sm+5st+1T)	2x+1	7
<i>arbutmotiae</i> W. F. Barker (No.1)	F	p	14	bi-modal (2L+12S) or tri-modal (2L+6M+6S)	symmetric (1M+6m+5sm+2st)	2x	7
<i>arbutmotiae</i> (No.2)	F	p	15	gradual or bi-modal (7L+8S)	symmetric (7m+6sm+2st)	2x+1	7

* Referred from Tanaka (1980). E: rod-shaped prochromosome type, F: round shaped prochromosome type, p: proximal type

** Classifying followed by relative length of chromosomes. L: long, M: medium, S: short.

*** Referred from Levan *et al.* (1964). Symbols shows regions of centromeres, M: median point, m: median region, sm: submedian region, st: subterminal region, t: terminal region, T: terminal point.

Table 2. Continued

Species and variety	Classifications of nuclei of somatic chromosomes		Information of mitotic metaphase				Basic chromosome number (x)
	Resting stage*	Mitotic prophase*	Chromosome number (2n)	Expression from chromosome length**	Expression from arm ratio***	Ployploidy	
<i>bachmannii</i> Bak.	F	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (12m+3sm+1st)	2x	8
<i>bulbifera</i> (Cyrillo) Engl.	F	p	42	gradual	symmetric (13m+19sm+10st)	6x	7
<i>capensis</i> W.F.Barker	F	p	16	bi-modal (4L+12S) or tri-modal (2L+2M+12S)	symmetric (9m+6sm+1st)	2x	8
<i>carnea</i> Bak.	F	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (7m+9sm)	2x	8
<i>contaminata</i> Ait.	F	p	17	bi-modal (4L+13S)	symmetric (11m+5sm+1st)	2x+1	8
<i>ensifolia</i> (Thunb.) J. C. Manning & Goldblatt	E or F	p	26	bi-modal (3L+23S)	symmetric (12m+13sm+1st)	2x (or 3x?)	13? (or 9)
<i>fistulosa</i> Bak.	E or F	p	14	bi-modal (6L+8S)	symmetric (9m+3sm+2st)	2x	7
<i>hirta</i> (Thunb.) Thunb.	F	p	22	bi-modal (6L+16S)	symmetric (16m+6sm)	2x	11
<i>juncifolia</i> Bak.	F	p	22	gradual	symmetric (15m+7sm)	2x	11
<i>latifolia</i> Tratt.	F	p	24	gradual	symmetric (9m+14sm+1st)	2x	12
<i>latimerae</i> W. F. Barker	F	p	18	bi-modal (2L+16S)	symmetric (8m+9sm+1st)	2x	9
<i>liliflora</i> Jacq.	E or F	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (6m+8sm+2st)	2x	8
<i>longibracteata</i> Phillips	F	p	14	bi-modal (6L+8S) or gradual	symmetric (13m+1sm)	2x	7
<i>longituba</i> (A. M. van der 9Merwe) J. C. Manning & Goldblatt	E or F	p	28	bi-modal (3L+25S)	symmetric (15m+11sm+2st)	2x (or 3x?)	14? (or 9)

Table 2. Continued

Species and variety	Classifications of nuclei of somatic chromosomes		Information of mitotic metaphase				Basic chromosome number (x)
	Resting stage*	Mitotic prophase*	Chromosome number (2n)	Expression from chromosome length**	Expression from arm ratio***	Polyploidy	
<i>mathewsii</i> W.F.Barker	F	p	14	bi-modal (2L+12S)	Symmetric (8m+6sm)	2x	7
<i>muirii</i> W. F. Barker	F	p	14	bi-modal (2L+12S) or tri-modal (2L+4M+8S)	symmetric (7m+6sm+1st)	2x	7
<i>mutabilis</i> Sweet	F	p	14	bi-modal (4L+10S) or tri-modal (4L+2M+8S)	symmetric (1M+6m+6sm+1st)	2x	7
<i>namaquensis</i>	F	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (10m+5sm+1st)	2x	8
Schltr. ex. W. F. Barker							
<i>orchioides</i> (L.) Ait.	F	p	28	gradual	symmetric (15m+13sm)	4x	7
var. <i>orchioides</i>				or bi-modal (7L+21S)			
<i>orchioides</i> var. <i>glaucina</i>	F	p	28	gradual	symmetric (20m+8sm)	3x+x?	7
(Jacq.) W. F. Barker							
<i>orthopetala</i> Jacq.	E	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (7m+6sm+3st)	2x	8
<i>pallida</i> Ait.	F	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (7m+6sm+3st)	2x	8
<i>paucifolia</i> (W. F. Barker)	E	p	26	bi-modal (3L+23S)	symmetric (12m+11sm+3st)	2x (or 3x?)	13? (or 9)
J. C. Manning & Goldblatt							
<i>peersii</i> Marloth ex W. F. Barker	F	p	14	bi-modal (2L+12S)	symmetric (6m+6sm+2st)	2x	8
<i>purpureocoerulea</i> Jacq.	F	p	17	bi-modal (4L+13S)	symmetric (13m+4sm)	2x+1	7

Table 2. Continued

Species and variety	Classifications of nuclei of somatic chromosomes		Information of mitotic metaphase				Basic chromosome number (x)
	Resting stage*	Mitotic prophase*	Chromosome number (2n)	Expression from chromosome length**	Expression from arm ratio***	Polyploidy	
<i>pusilla</i> Jacq. f. (No.1)	F	p	14	bi-modal (7L+7S) or gradual	symmetric (8m+6sm)	2x	7
<i>pusilla</i> (No.2)	F	p	14	bi-modal (6L+8S) or gradual	symmetric (1M+5m+7sm+1st)	2x	7
<i>pustulata</i> Jacq.	E	p	16	bi-modal (4L+12S)	symmetric (7m+7sm+2st)	2x	8
<i>reflexa</i> Thunb.	F	p	14	gradual	symmetric (1M+6m+4sm+2st+1t)	2x	7
<i>rosea</i> Andrews	E or F	p	14	bi-modal (6L+8S)	symmetric (5m+4sm+5st)	2x	7
<i>rubida</i> Jacq.	E or F	p	14	gradual	symmetric (3m+9sm+2st)	2x	7
<i>splendida</i> Diels	F	p	16	bi-modal (4L+12S) or tri-modal (2L+2M+12S)	symmetric (6m+9sm+1st)	2x	8
<i>thomastiae</i>	E or F	p	14	gradual	symmetric (7m+6sm+1st)	2x	7
W.F.Barker ex G.D.Duncan							
<i>unicolor</i> Jacq.	F	p	16	tri-modal (2L+2M+12S)	symmetric (6m+10sm)	2x	8
<i>unifolia</i> Jacq.	E or F	p	24	bi-modal (2L+22S)	symmetric (6m+17sm+1st)	2x+2	11
<i>variegata</i> W. F. Barker	E	p	14	gradual	symmetric (5m+7sm+2st)	2x	7
<i>violacea</i> Jacq.	F	p	14	gradual	symmetric (1M+7m+6sm)	2x	7
<i>viridiflora</i> W. F. Barker	F	p	14	bi-modal (6L+8S)	symmetric (4m+5sm+5st)	2x	7
<i>zeyheri</i> Bak. (No.1)	F	p	22	bi-modal (2L+20S)	symmetric (15m+4sm+3st)	2x	11
<i>zeyheri</i> (No.2)	F	p	23	bi-modal (2L+21S)	symmetric (14m+8sm+1st)	2x+1	11

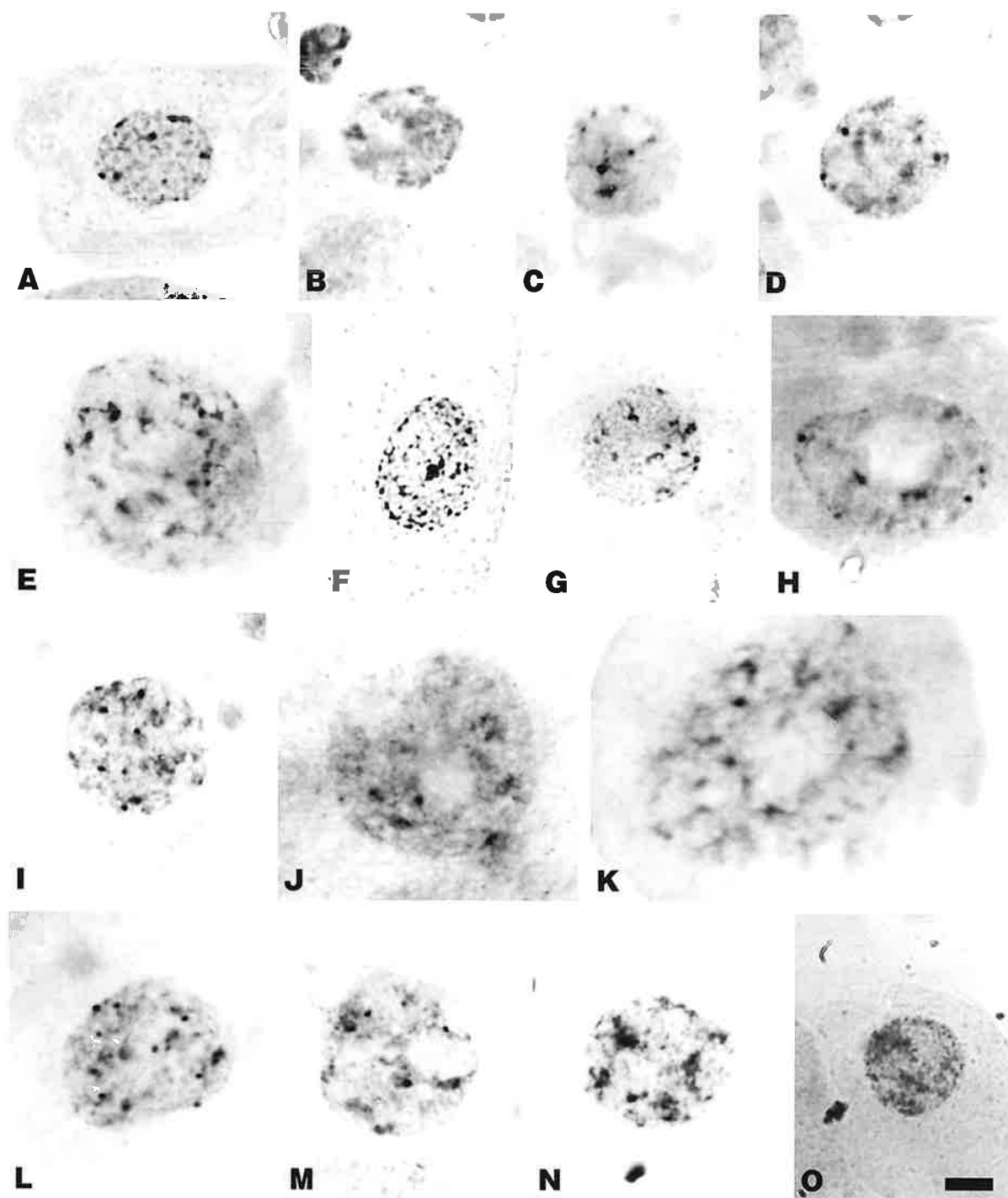


Fig. 3. Resting nuclei of somatic chromosomes of *Lachenalia* studied.

A: *Lachenalia algoensis*, B: *L. aloides* var. *aloides*, C: *L. aloides* var. *aurea*, D: *L. aloides* var. *quadricolor*, E: *L. aloides* var. *vanzyliae*, F: *L. aloides* 'Lutea', G: *L. aloides* 'Pearsonii', H: *L. arbuthnotiae* (No.1), I: *L. arbuthnotiae* (No.2), J: *L. bachmannii*, K: *L. bulbifera*, L: *L. capensis*, M: *L. carnosa*, N: *L. contaminata*, O: *L. ensifolia*. Bar indicates 5 μ m.

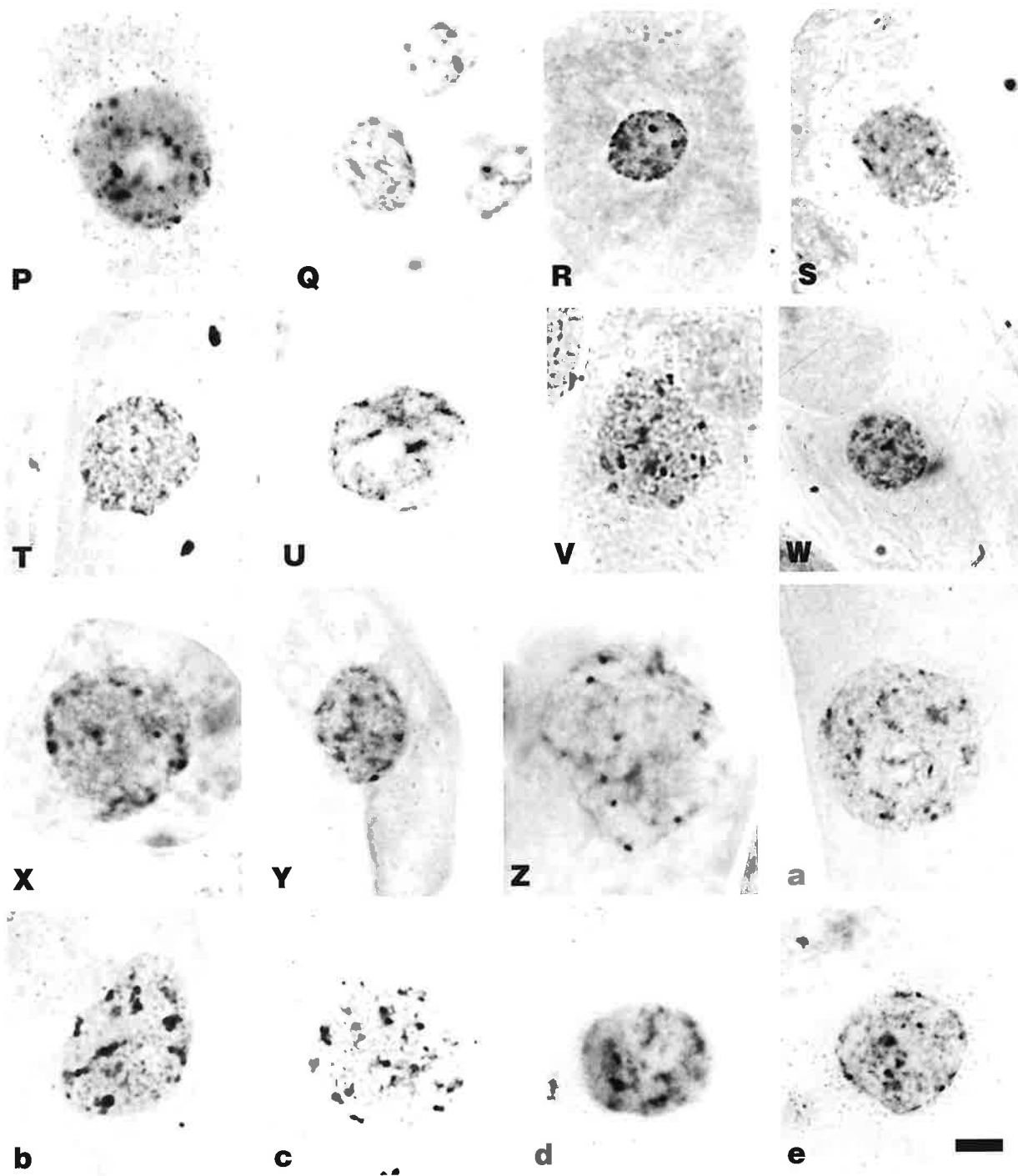


Fig. 3. Continued.

P: *L. fistulosa*, Q: *L. hirta*, R: *L. juncifolia*, S: *L. latifolia*, T: *L. latimerae*, U: *L. liliflora*, V: *L. longibracteata*, W: *L. longituba*, X: *L. mathewsii*, Y: *L. muirii*, Z: *L. mutabilis*, a: *L. namaquensis*, b: *L. orchioides* var. *orchioides*, c: *L. orchioides* var. *glaucina*, d: *L. orthopetala*, e: *pallida*. Bar indicates 5 μ m.

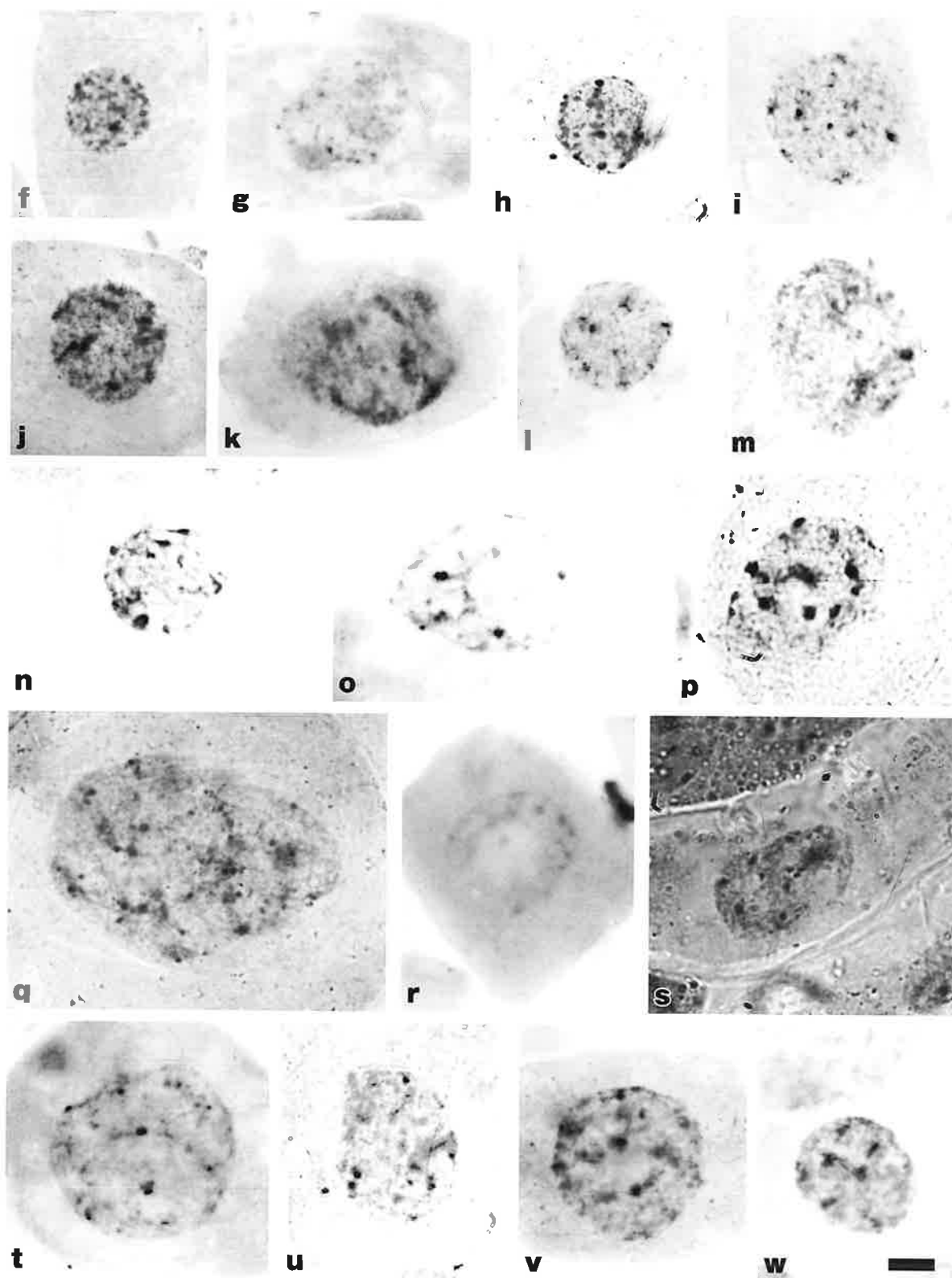


Fig. 3. Continued.

f: *L. paucifolia*, g: *L. peersii*, h: *L. purpureocoerulea*, i: *L. pusilla* (No.1), j: *L. pusilla* (No.2), k: *L. pustulata*, l: *L. reflexa*, m: *L. rosea*, n: *L. rubida*, o: *L. splendida*, p: *L. thomasiae*, q: *L. unicolor*, r: *L. unifolia*, s: *L. variegata*, t: *L. violacea*, u: *L. viridiflora*, v: *L. zeyheri* (No.1), w: *L. zeyheri* (No.2). Bar indicates 5 μ m.

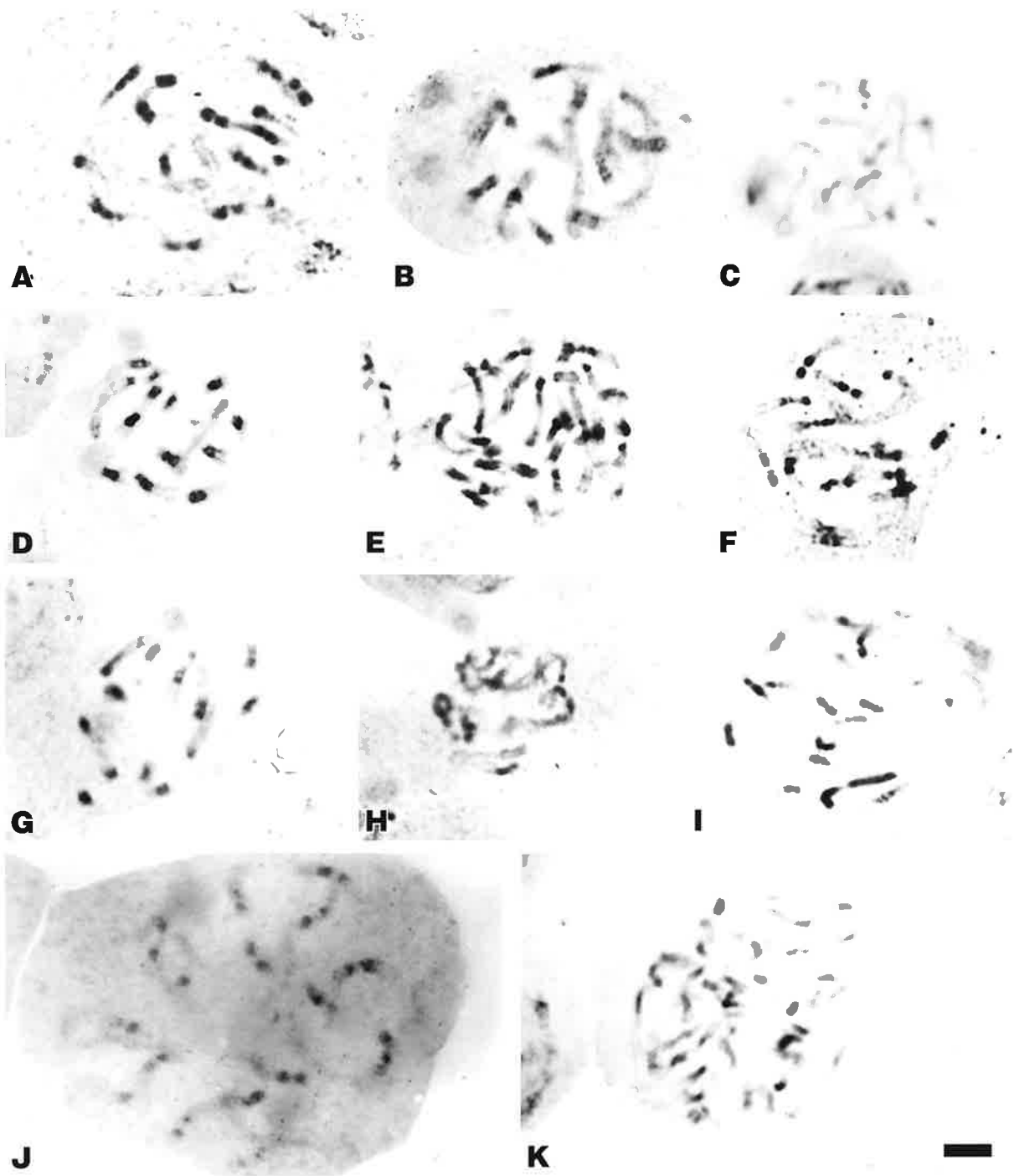


Fig. 4. Mitotic prophase of somatic chromosomes of *Lachenalia* studied.

A: *Lachenalia algoensis*, B: *L. aloides* var. *aloides*, C: *L. aloides* var. *aurea*, D: *L. aloides* var. *quadricolor*, E: *L. aloides* var. *vanzyliae*, F: *L. aloides* 'Lutea', G: *L. aloides* 'Pearsonii', H: *L. arbuthnotiae* (No.1), I: *L. arbuthnotiae* (No.2), J: *L. bachmannii*, K: *L. bulbifera*. Bar indicates 5 μ m.

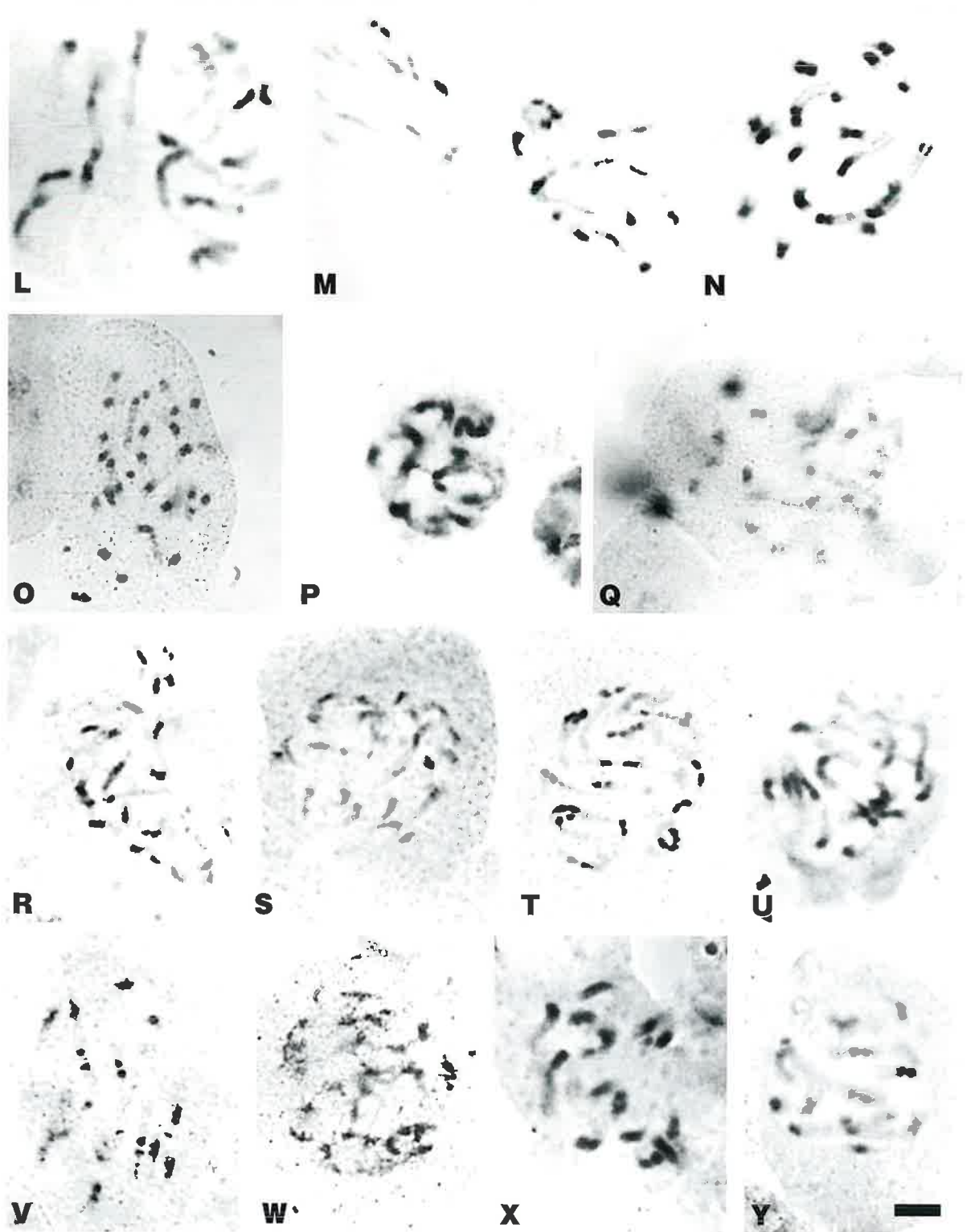


Fig. 4. Continued.

L: *L. capensis*, M: *L. carnosa*, N: *L. contaminata*, O: *L. ensifolia*, P: *L. fistulosa*, Q: *L. hirta*, R: *L. juncifolia*, S: *L. latifolia*, T: *L. latimeriae*, U: *L. liliflora*, V: *L. longibracteata*, W: *L. longituba*, X: *L. mathewsii*, Y: *L. muirii*. Bar indicates 5 μ m.

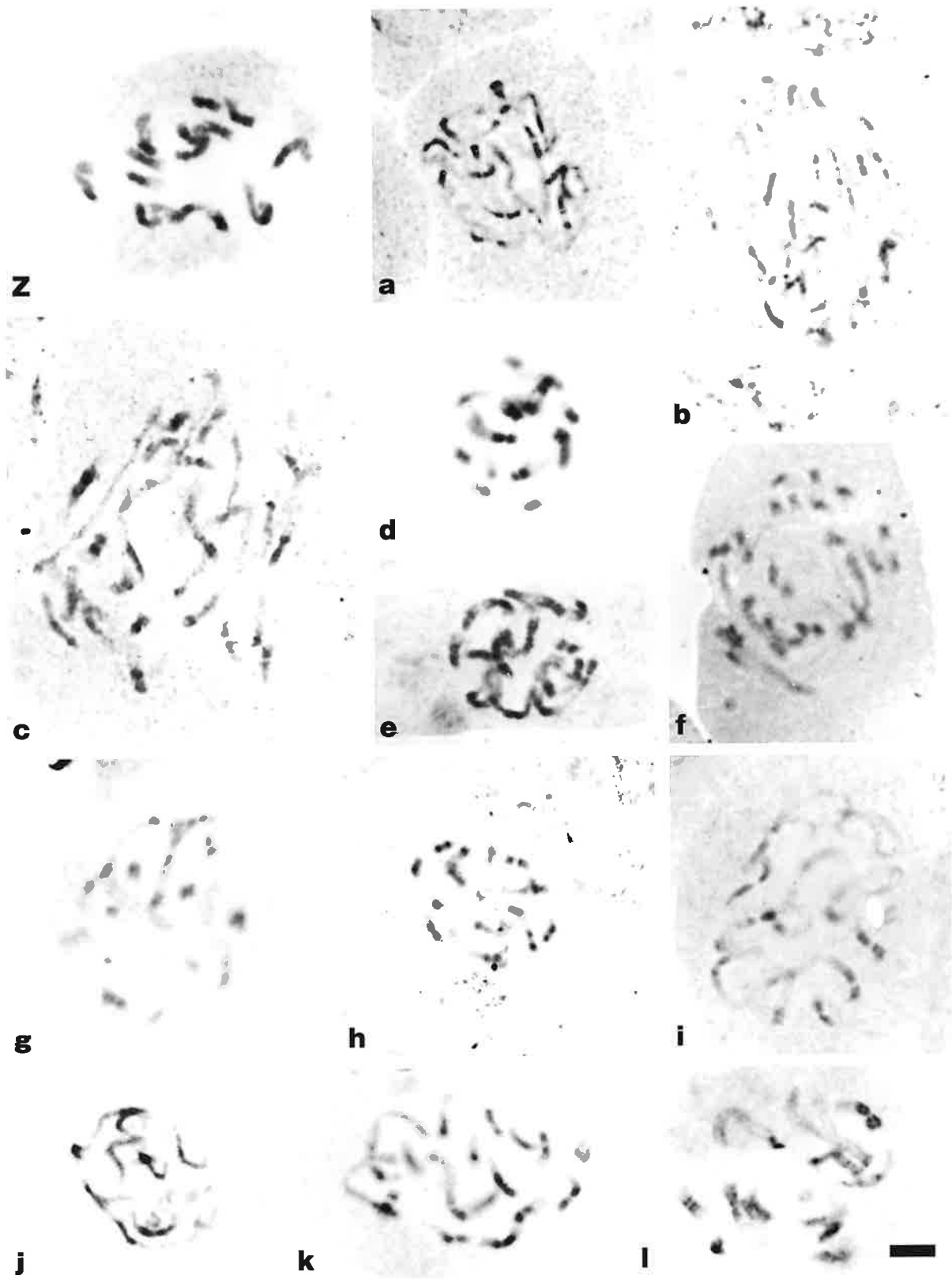


Fig. 4. Continued.

Z: *L. mutabilis*, a: *L. namaquensis*, b: *L. orchiodoides* var. *orchiodoides*, c: *L. orchiodoides* var. *glaucina*, d: *L. orthopetala*, e: *L. pallida*, f: *L. paucifolia*, g: *L. peersii*, h: *L. purpureocoerulea*, i: *L. pusilla* (No.1), j: *L. pusilla* (No.2), k: *L. pustulata*, l: *L. reflexa*. Bar indicates 5 μm.

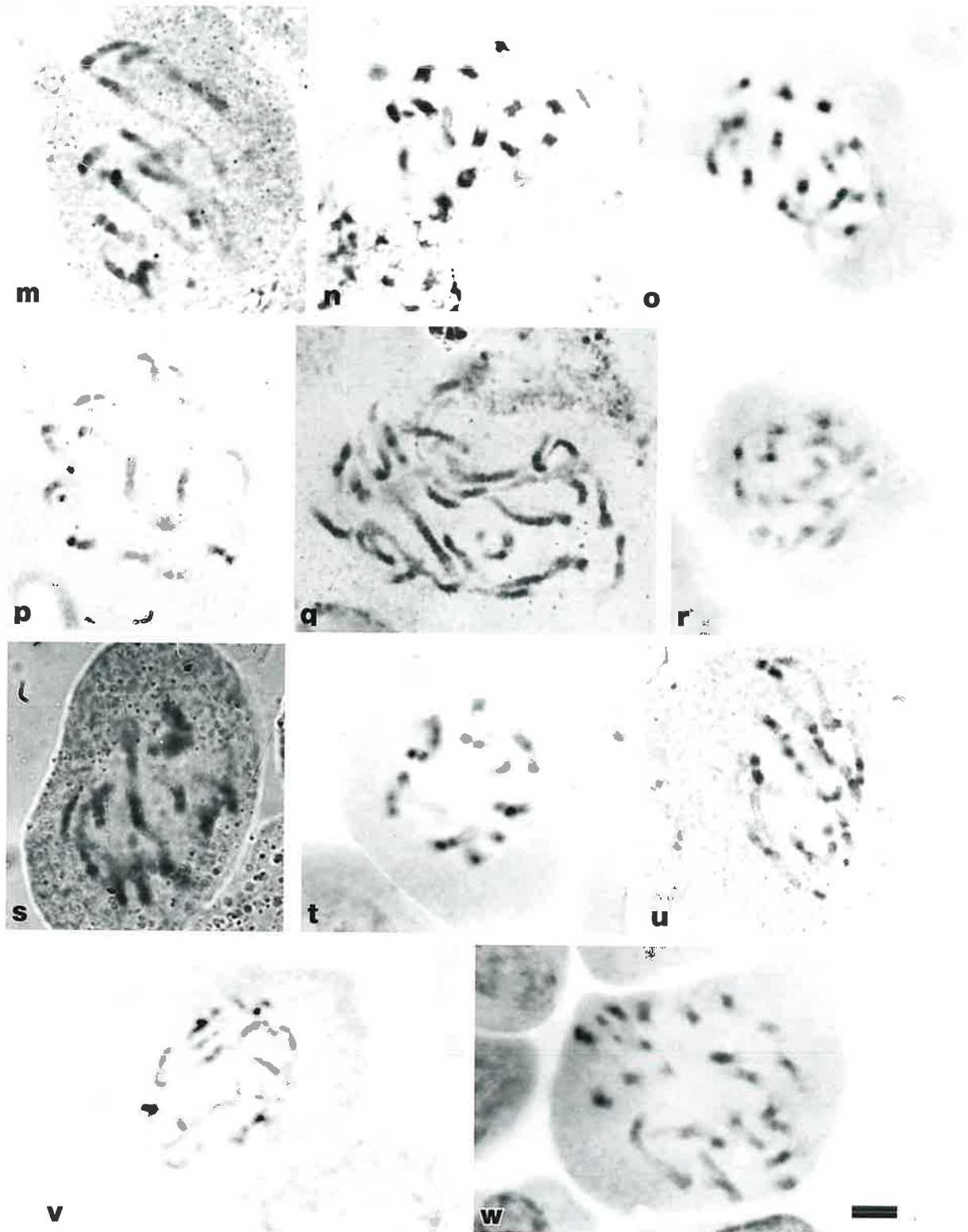


Fig. 4. Continued.

m: *L. rosea*, n: *L. rubida*, o: *L. splendida*, p: *L. thomasiae*, q: *L. unicolor*, r: *L. unifolia*, s: *L. variegata*, t: *L. violacea*, u: *L. viridiflora*, v: *L. zeyheri* (No.1), w: *L. zeyheri* (No.2). Bar indicates 5 μ m.

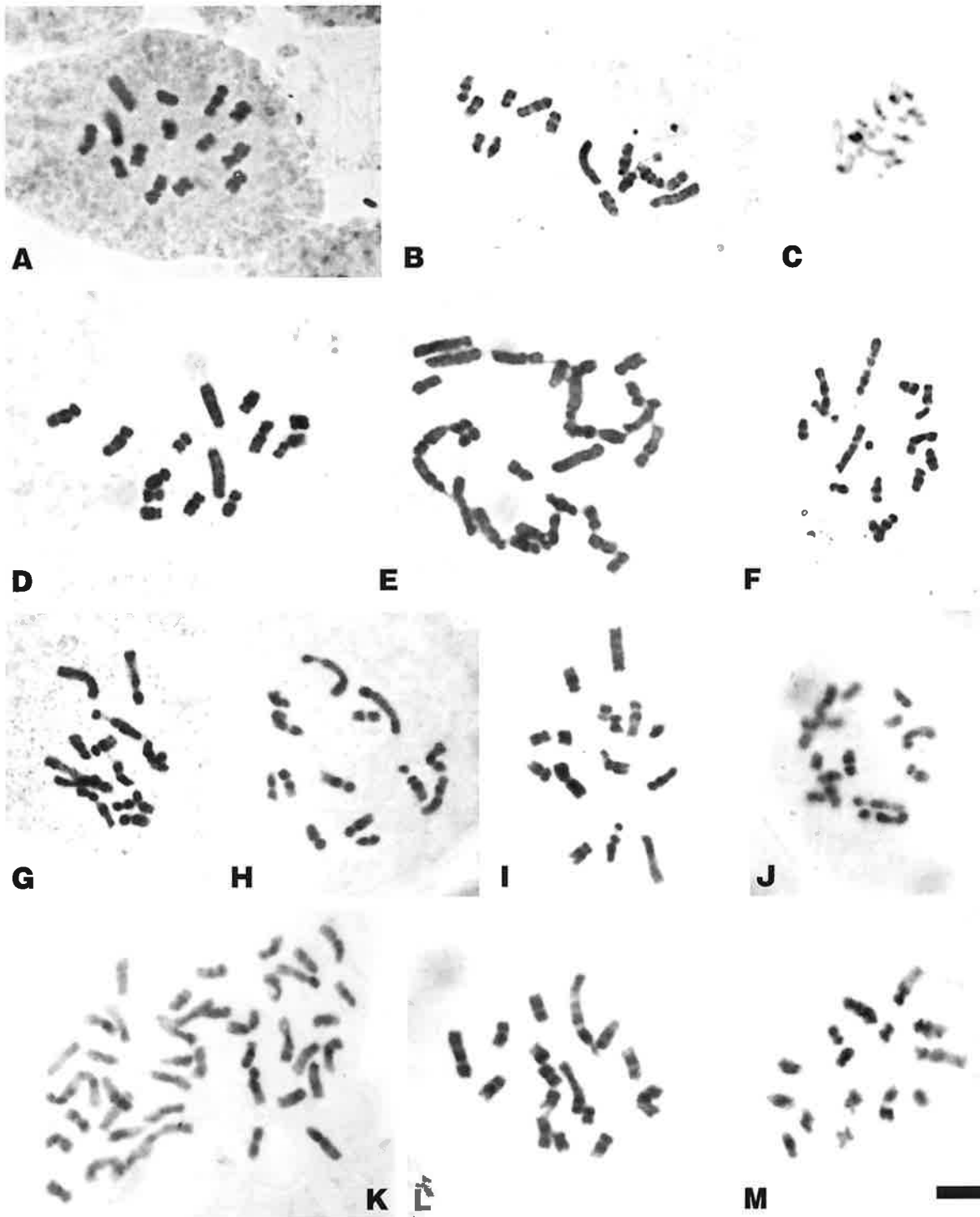


Fig. 5. Mitotic metaphase of somatic chromosomes of *Lachenalia* studied.

A: *Lachenalia algoensis*, B: *L. aloides* var. *aloides*, C: *L. aloides* var. *aurea*, D: *L. aloides* var. *quadricolor*, E: *L. aloides* var. *vanzyliae*, F: *L. aloides* 'Lutea', G: *L. aloides* 'Pearsonii', H: *L. arbuthnotiae* (No.1), I: *L. arbuthnotiae* (No.2), J: *L. bachmannii*, K: *L. bulbifera*, L: *L. capensis*, M: *L. carnosa*. Bar indicates 5 μ m.

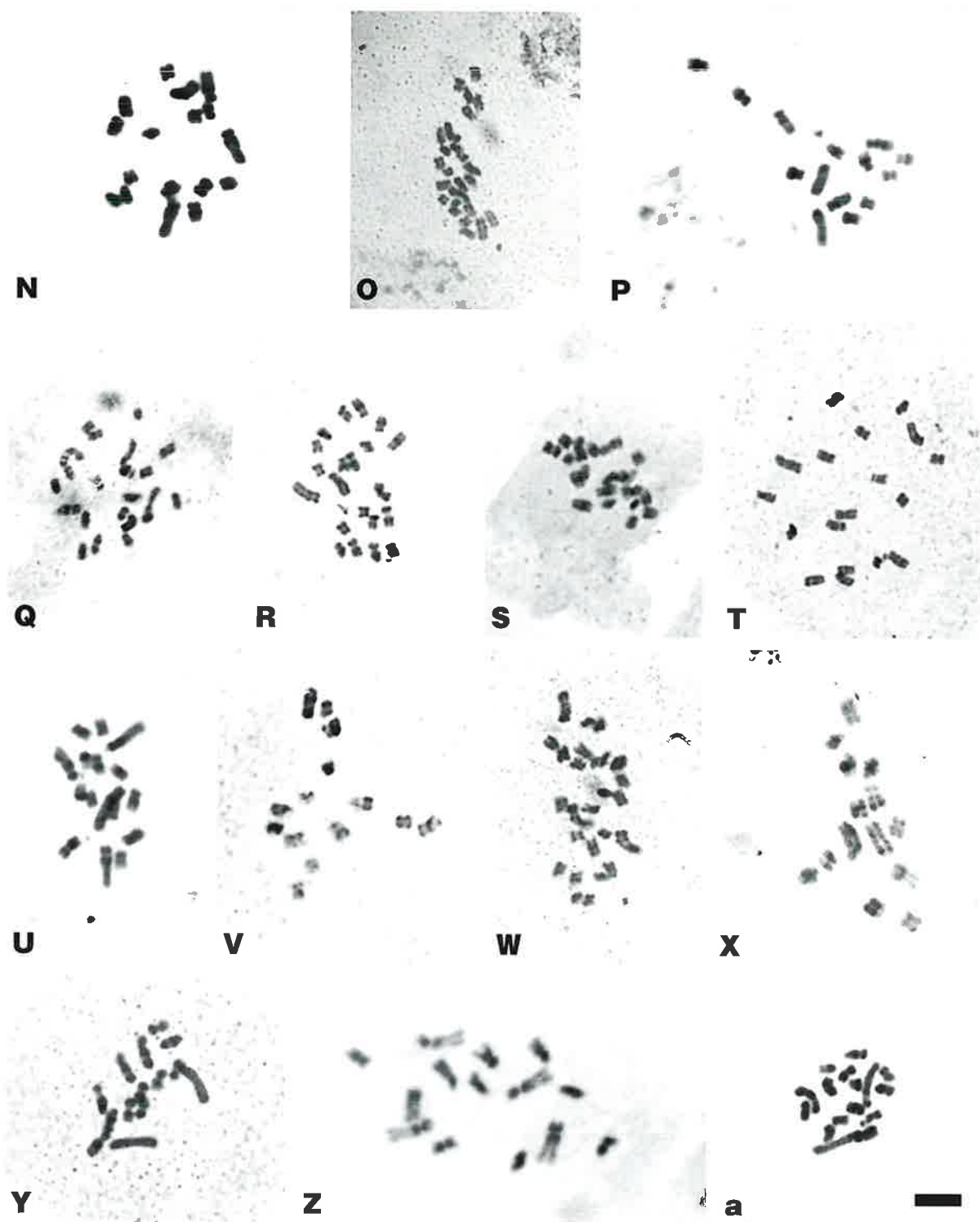


Fig. 5. Continued.

N: *L. contaminata*, O: *L. ensifolia*, P: *L. fistulosa*, Q: *L. hirta*, R: *L. juncifolia*, S: *L. latifolia*, T: *L. latimeriae*, U: *L. liliflora*, V: *L. longibracteata*, W: *L. longituba*, X: *L. mathewsii*, Y: *L. muirii*, Z: *L. mutabilis*, a: *L. namaquensis*. Bar indicates 5 μ m.

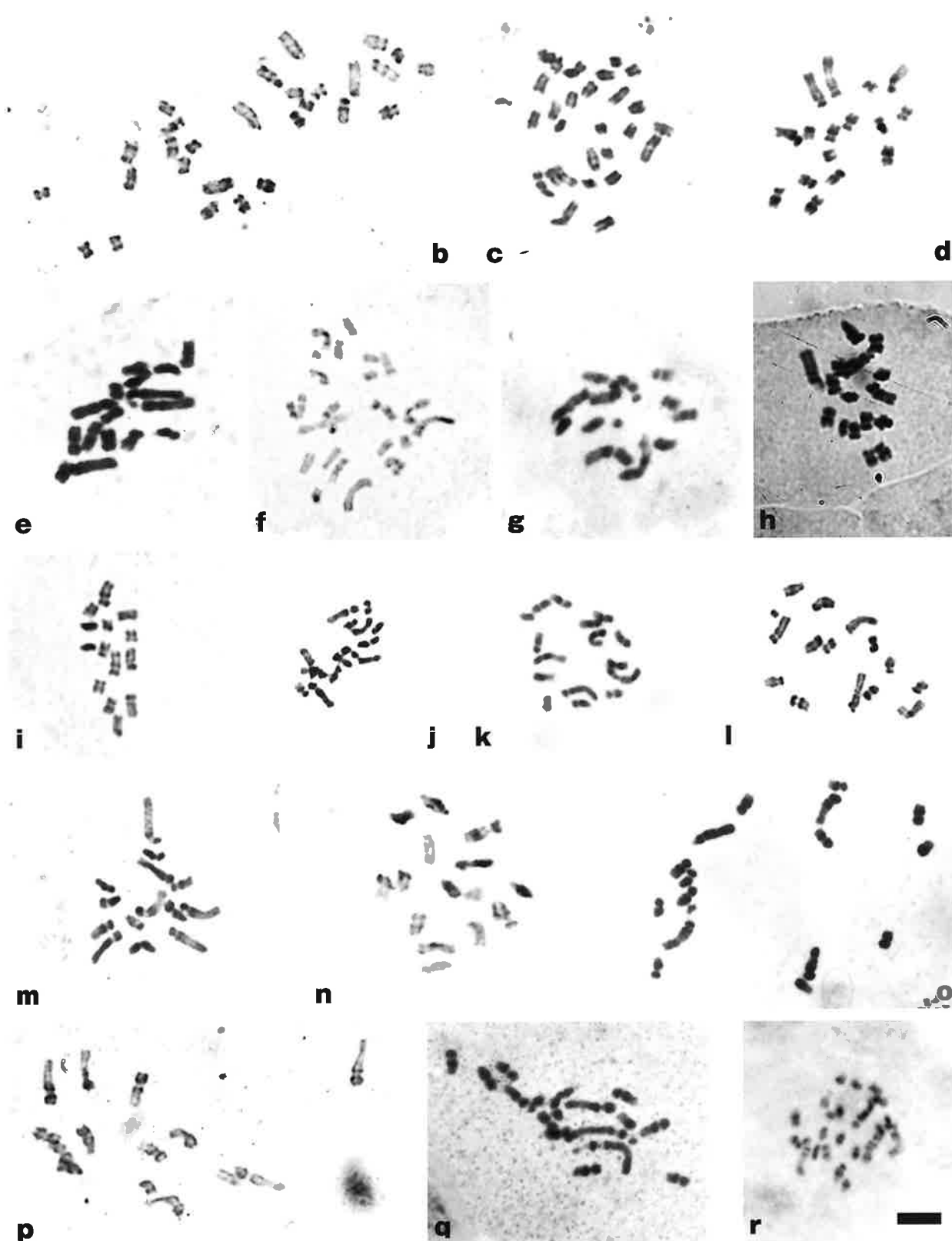


Fig. 5. Continued.

b: *L. orchoides* var. *orchoides*, c: *L. orchoides* var. *glaucina*, d: *L. orthopetala*, e: *L. pallida*, f: *L. paucifolia*, g: *L. peersii*, h: *L. purpureoerulea*, i: *L. pusilla* (No.1), j: *L. pusilla* (No.2), k: *L. pustulata*, l: *L. reflexa*, m: *L. rosea*, n: *L. rubida*, o: *L. splendida*, p: *L. thomasiae*, q: *L. unicolor*, r: *L. unifolia*. Bar indicates 5 μ m.

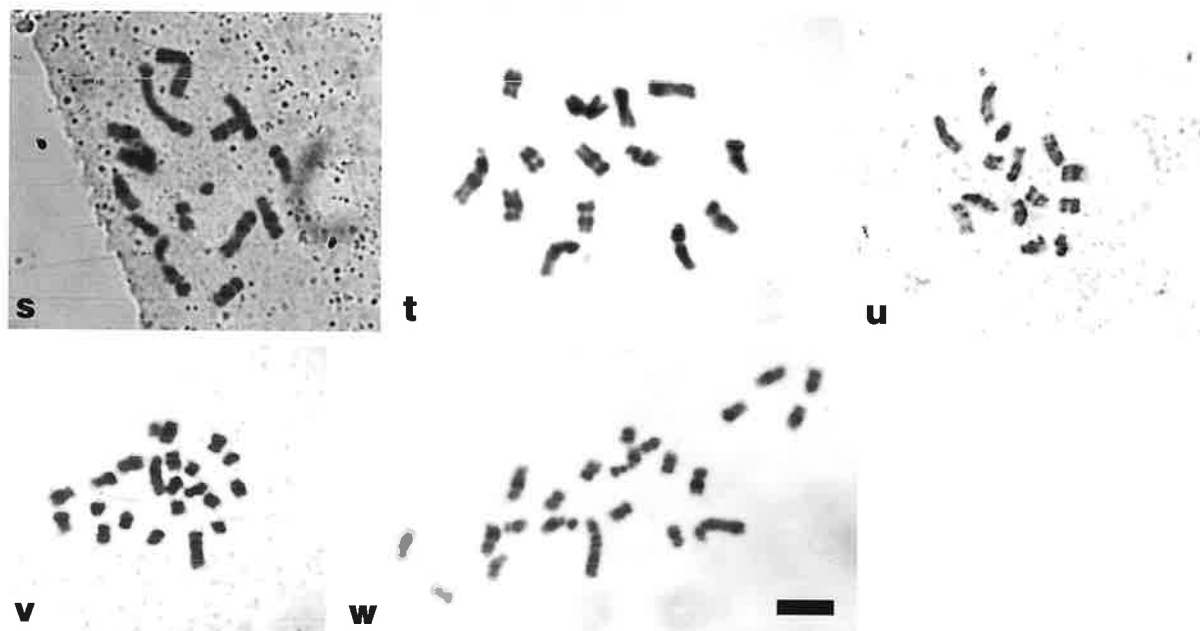


Fig. 5. Continued.

s: *L. variegata*, t: *L. violacea*, u: *L. viridiflora*, v: *L. zeyheri* (No.1), w: *L. zeyheri* (No.2). Bar indicates 5 μ m.

purpureocoerulea の第 1, 2 染色体に, *L. reflexa* の第 5 染色体に, *L. splendida* の第 1, 2 染色体に, *L. unicolor* の第 1, 2 染色体に, *L. variegata* の第 9, 10 染色体に, *L. violacea* の第 13 染色体に, *L. zeyheri* (No.2) の第 5 染色体に観察された (Fig. 6, 7).

L. arbuthnotiae (No.2) の第 3 染色体は, 他の染色体と比べて凝縮の様子が明らかに異なっており (Fig. 5, 6), B-染色体である可能性が示唆された。

染色体長に基づく表現型では, 二相的, 三相的, 勾配的, それらの中間的なものが観察された (Table 2, Fig. 7).

2n = 14 のものは, *L. algoensis* が二相的 (6L+8S), *L. aloides* var. *aloides* が二相的 (2L+12S), *L. aloides* var. *aurea* が三相的 (2L+8M+4S), *L. aloides* var. *quadricolor* が二相的 (2L+12S), *L. aloides* 'Lutea' が三相的 (2L+4M+8S), *L. arbuthnotiae* (No.1) が二相的 (2L+12S) または三相的 (2L+6M+6S), *L. fistulosa* が二相的 (6L+8S), *L. longibracteata* が二相的 (6L+8S) または勾配的, *L. mathewsii*, *L. muirii* が二相的 (2L+12S) または三相的 (2L+4M+8S), *L. mutabilis* が二相的 (4L+10S) または三相的 (4L+2M+8S), *L. peersii* が二相的 (2L+12S), *L. pusilla* (No.1) が二相的 (7L+7S) または勾配的, *L. pusilla* (No.2) が二相的 (6L+8S) または勾配的, *L. reflexa* が勾配的, *L. rosea* が二相的 (6L+8S), *L. rubida*, *L. thomasiae*, *L. variegata*, が二相的 (6L+8S),

L. violacea が勾配的, *L. viridiflora* が二相的 (6L+8S) だった。

2n = 15 のものは *L. aloides* 'Pearsonii' が三相的 (2L+2M+11S), *L. arbuthnotiae* (No.2) が勾配的または二相的 (7L+8S) だった。

2n = 16 のものは, *L. bachmannii* が二相的 (4L+12S), *L. capensis* が二相的 (4L+12S) または三相的 (2L+2M+12S), *L. carnosae*, *L. liliflora*, *L. namaquensis*, *L. orthopetala*, *L. pallida*, *L. pustulata* が二相的 (4L+12S), *L. splendida* が, *L. unicolor* が三相的 (2L+2M+12S) だった。

2n = 17 のものは, *L. contaminata*, *L. purpureocoerulea* が二相的 (4L+13S) だった。

2n = 18 のものは *L. latimeriae* が二相的 (2L+16S) だった。

2n = 22 のものは, *L. hirta* が二相的 (6L+16S), *L. juncifolia* が勾配的, *L. zeyheri* (No.1) が二相的 (2L+20S) だった。

2n = 23 のものは, *L. zeyheri* (No.2) が二相的 (2L+21S) だった。

2n = 24 のものは, *L. latifolia* が勾配的, *L. unifolia* が二相的 (2L+22S) だった。

2n = 26 のものは, *L. ensifolia*, *L. paucifolia* が二相的 (3L+23S) だった。

2n = 28 のものは, *L. aloides* var. *vanzyliae* が勾配的または二相的 (12L+16S), *L. longituba* が二相的

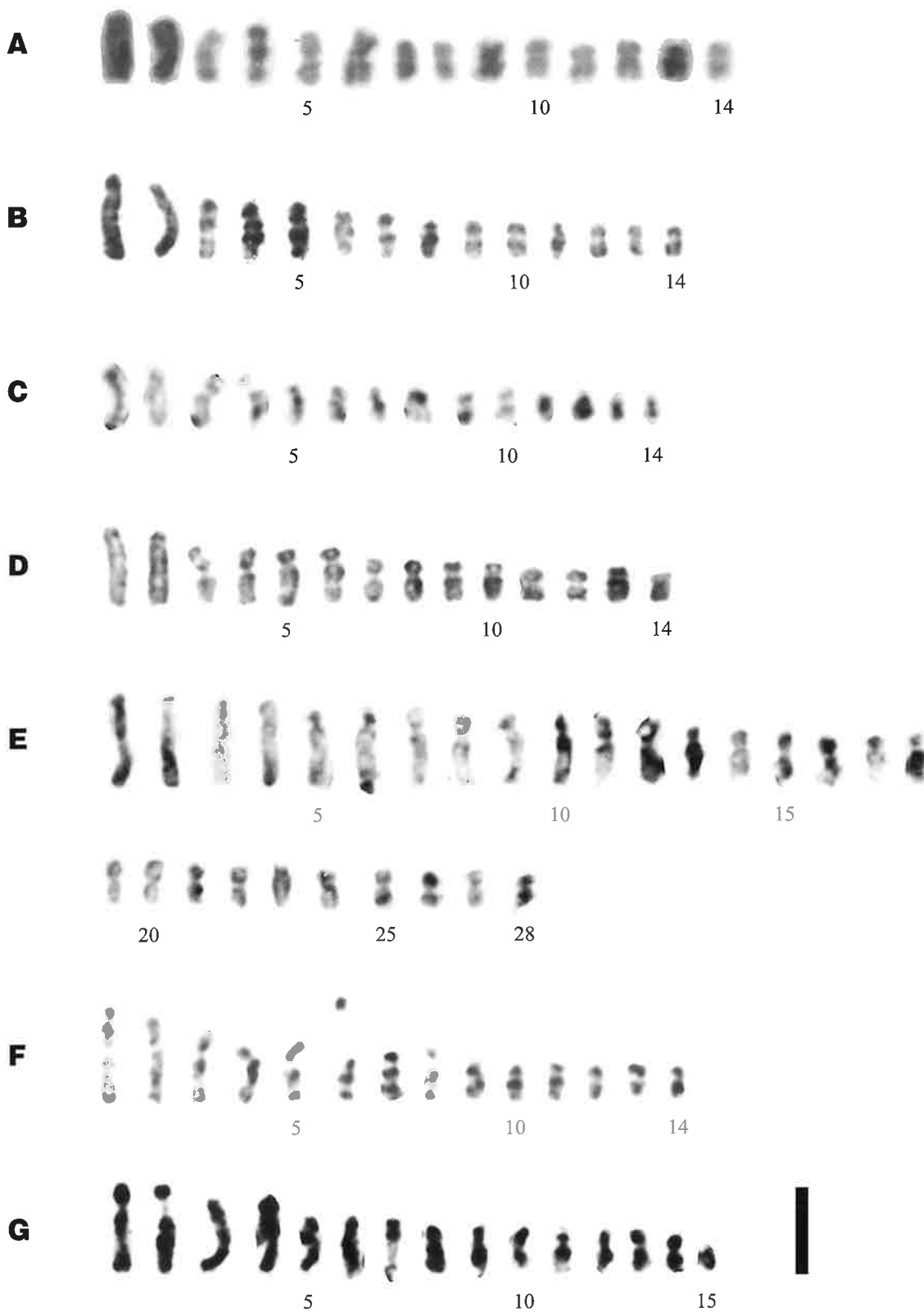


Fig. 6. Karyotypes of *Lachenalia* studied.

A: *Lachenalia algoensis*, B: *L. aloides* var. *aloides*, C: *L. aloides* var. *aurea*, D: *L. aloides* var. *quadricolor*, E: *L. aloides* var. *vanzyliae*, F: *L. aloides* 'Lutea', G: *L. aloides* 'Pearsonii'. Bar indicates 5 μ m.

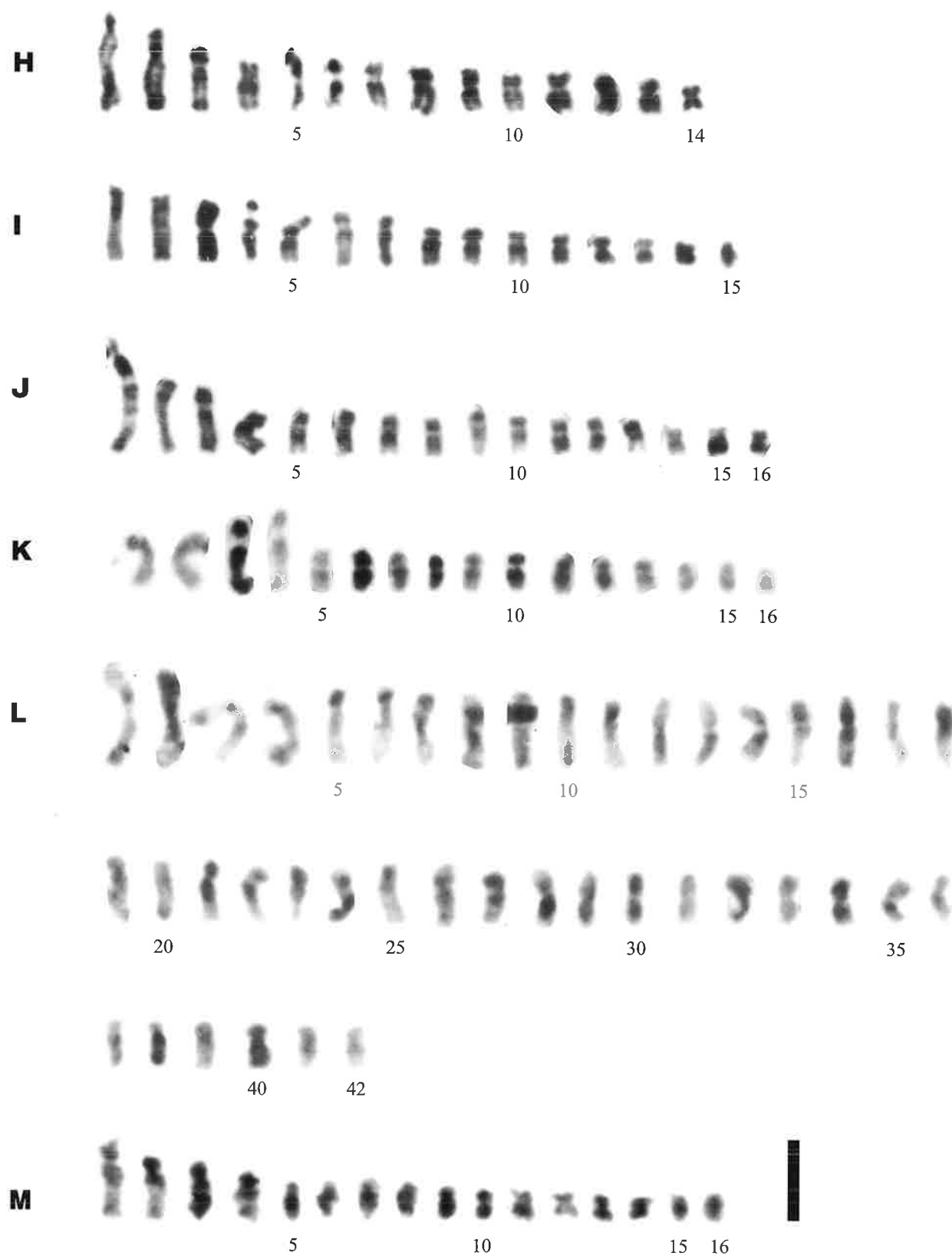


Fig. 6. Continued.

H: *L. arbutnotiae* (No.1), I: *L. arbutnotiae* (No.2), J: *L. capensis*, K: *L. bachmannii*, L: *L. bulbifera*, M: *L. carnosa*. Bar indicates 5 μm.



Fig. 6. Continued.

N: *L. contaminata*, O: *L. ensifolia*, P: *fistulosa*, Q: *L. hirta*, R: *L. juncifolia*, S: *L. latifolia*. Bar indicates 5 μ m.

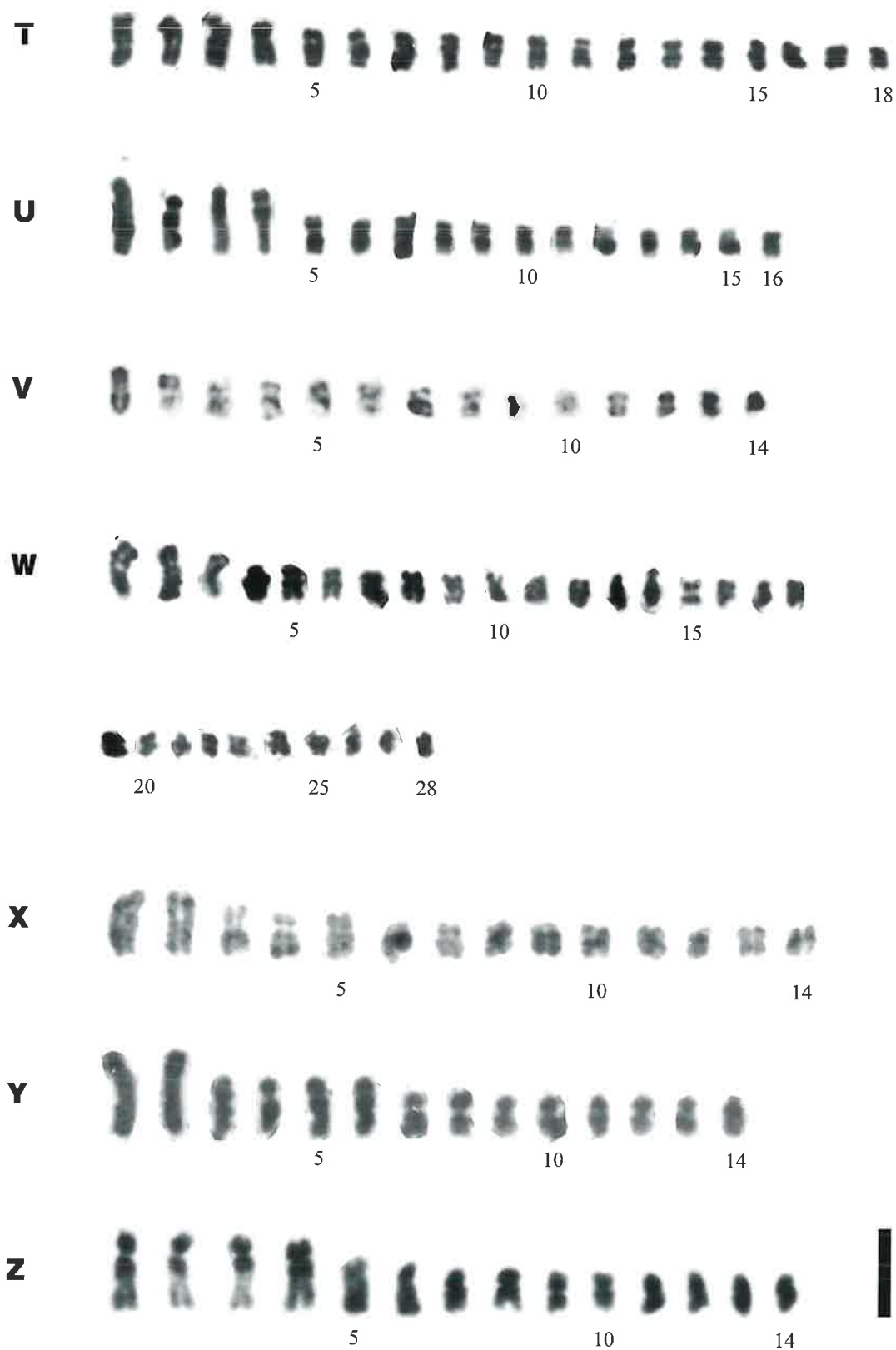


Fig. 6. Continued.

T: *L. latimerae*, U: *L. liliflora*, V: *L. longibracteata*, W: *L. longituba*, X: *L. mathewsii*, Y: *L. muirii*, Z: *L. mutabilis*. Bar indicates 5 μm.

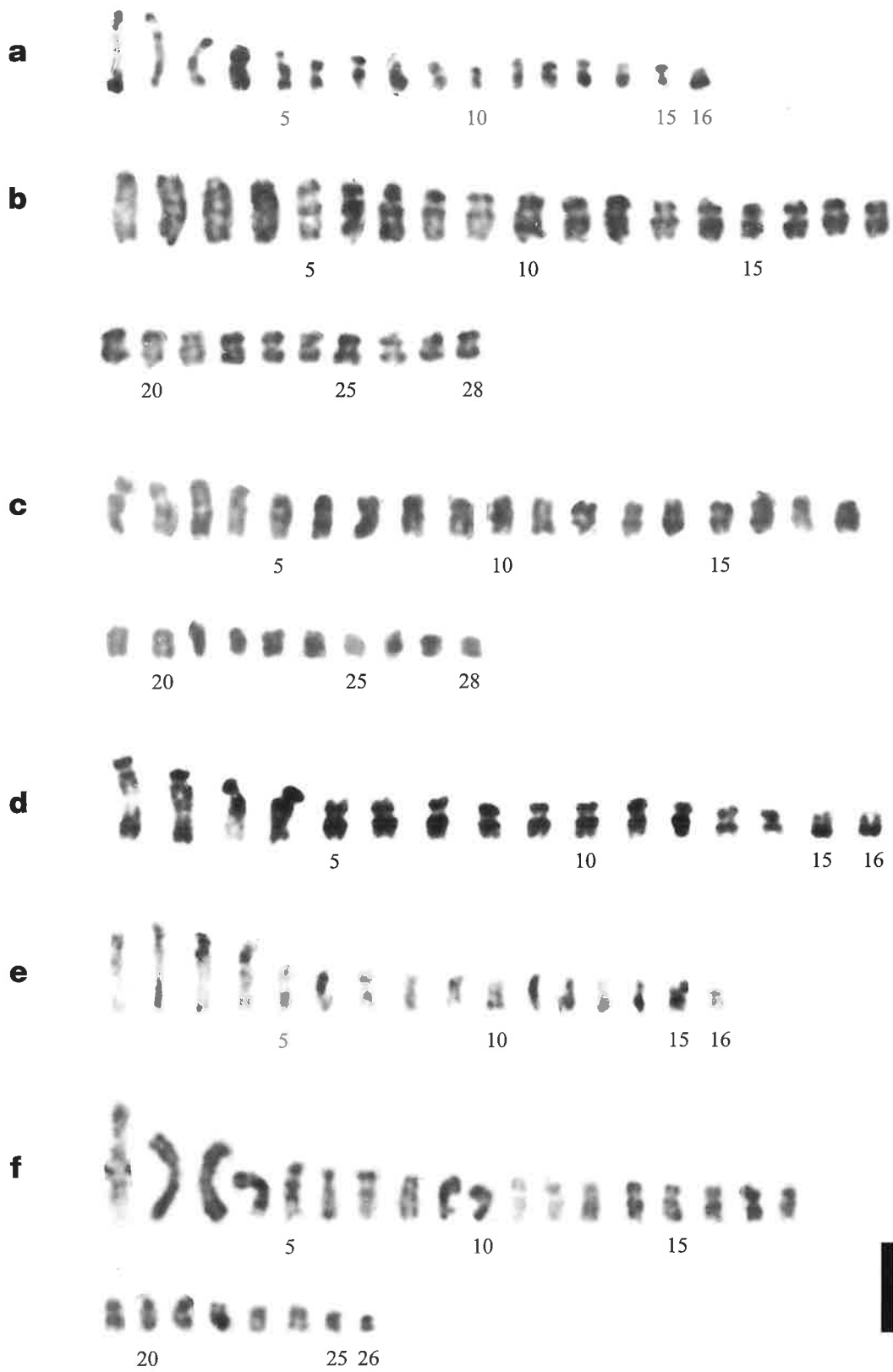


Fig. 6. Continued.

a: *L. namaquensis*, b: *L. orchioides* var. *orchioides*, c: *L. orchioides* var. *glaucina*, d: *L. orthopetala*, e: *L. pallida*, f: *L. paucifolia*. Bar indicates 5 μ m.

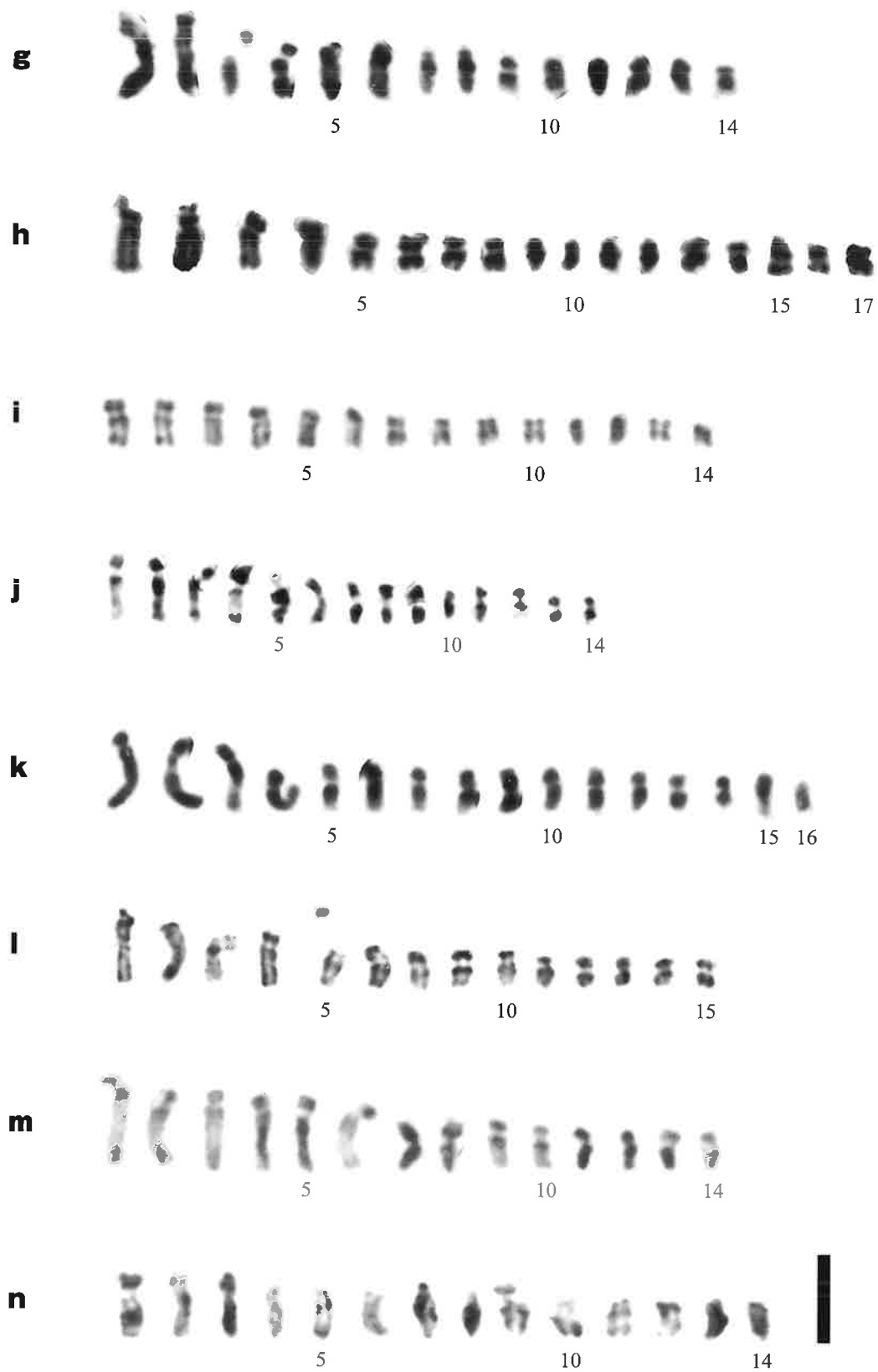


Fig. 6. Continued.

g: *L. peersii*, h: *L. purpureocoerulea*, i: *L. pusilla* (No.1), j: *L. pusilla* (No.2), k: *L. pustulata*, l: *L. reflexa*, m: *L. rosea*, n: *L. rubida*. Bar indicates 5 μ m.

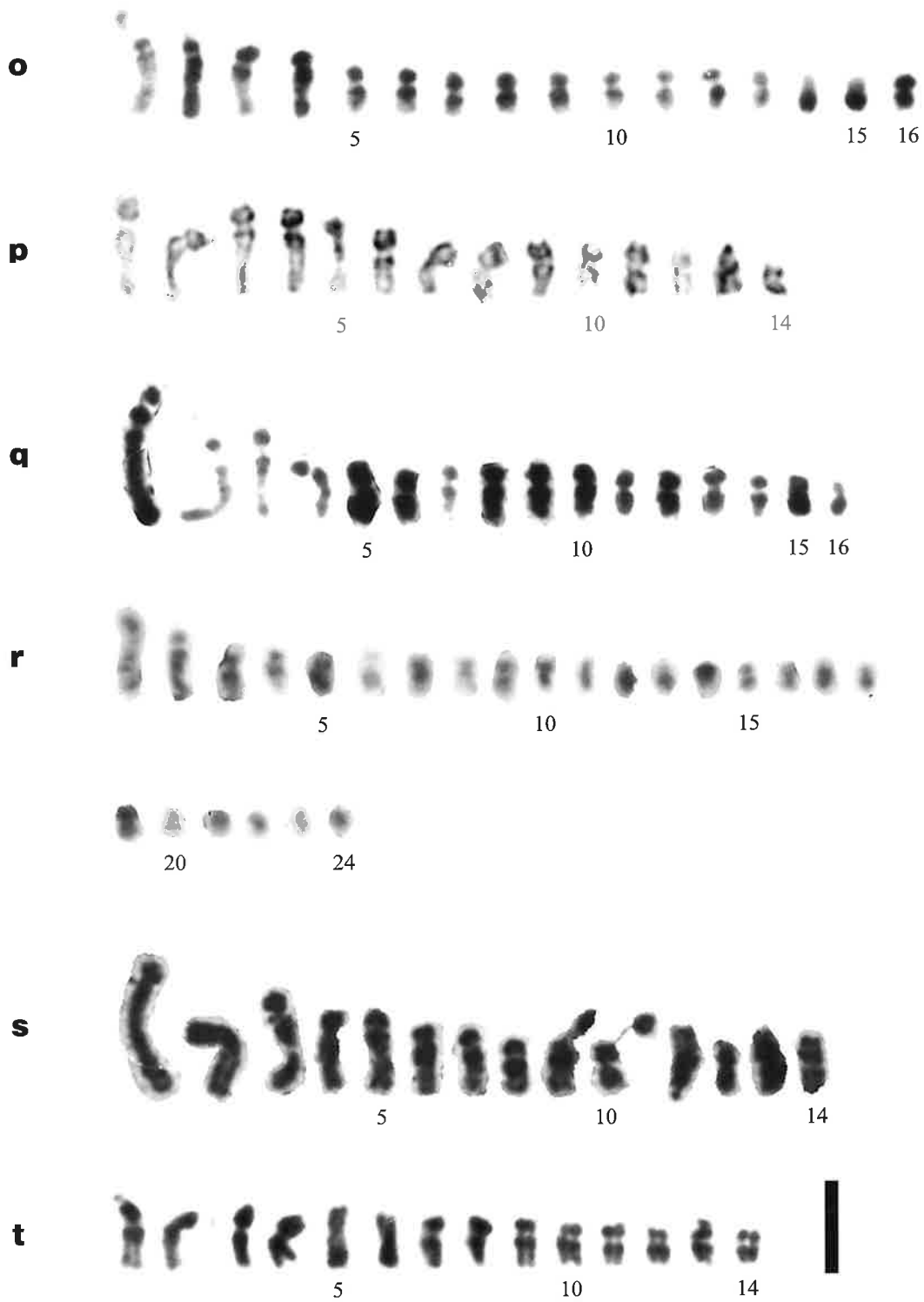


Fig. 6. Continued.

o: *L. splendida*, p: *L. thomasiae*, q: *L. unicolor*, r: *L. unifolia*, s: *L. variegata*, t: *L. violacea*. Bar indicates 5 μ m.



Fig. 6. Continued.

u: *L. viridiflora*, v: *L. zeyheri* (No.1), w: *L. zeyheri* (No.2). Bar indicates 5 μ m.

(3L+25S), *L. orchoides* var. *orchoides* が勾配的または二相的 (7L+21S), *L. orchoides* var. *glaucina* が勾配的だった。

2n = 42 のものは, *L. bulbifera* が勾配的だった。

腕比による表現型は全てが対称的だった (Table 2)。

染色体の倍数性と基本数は, 2n = 14 の全系統は二倍体で x = 7, 2n = 15 の全系統は 2n = 14 の異数体であり二倍体で x = 7, 2n = 16 の全系統は二倍体で x = 8, 2n = 17 の全系統は 2n = 16 の異数体であり二倍体で x = 8 と判断された。2n = 18 は *L. latimeriae* の 1 種で, 大きな染色体が 3 個存在したが, 第 3 染色体については付随体の大きさを除くと第 4 染色体とよく似た姿をしており, この 2 個をペアとすることにより二倍体で x = 9 と判断された。2n = 22 のもののうち *L. juncifolia* と *L. zeyheri* (No.1) は二倍体で x = 11 と判断された。*L. hirta* は大きな染色体が 3 個存在したため三倍体の可能性も考えられたが, 小さい染色体の多くが 2 個ずつのペアを

作ったため, 二倍体で x = 11 と判断するのが妥当と考えられた。2n = 23 の *L. zeyheri* (No.2) は 2n = 22 の異数体であり二倍体で x = 11 と判断された。2n = 24 のうち *L. unifolia* は既報では多くの異数体や 2n = 44 という倍数体が報告されており (de Wet 1957, Moffett 1936, Johnson and Brandham 1997), 今回の 2n = 24 は 2n = 22 の異数体であり x = 11 の二倍体であると判断された。*L. unifolia* の核型が二相的であったのに対し, *L. latifolia* は勾配的であり異なる核型を示していたため, 異なる基本数を持ち x = 12 の二倍体であることが示唆された。2n = 26, 28 のもののうち, Manning et al. (2004) により *Polyxena* から *Lachenalia* に編入された *L. ensifolia*, *L. paucifolia*, *L. longituba* の 3 種は, いずれも 3 個の大きな染色体を持ち, 小さな染色体のペアリングが困難だったため三倍体の可能性も考えられたが, 既報 (Johnson and Brandham 1997) を含めて染色体数が 3 の倍数でないこと, 容易に種子繁殖することから二倍体で x = 13 または 14 と判断するのが妥当と考え

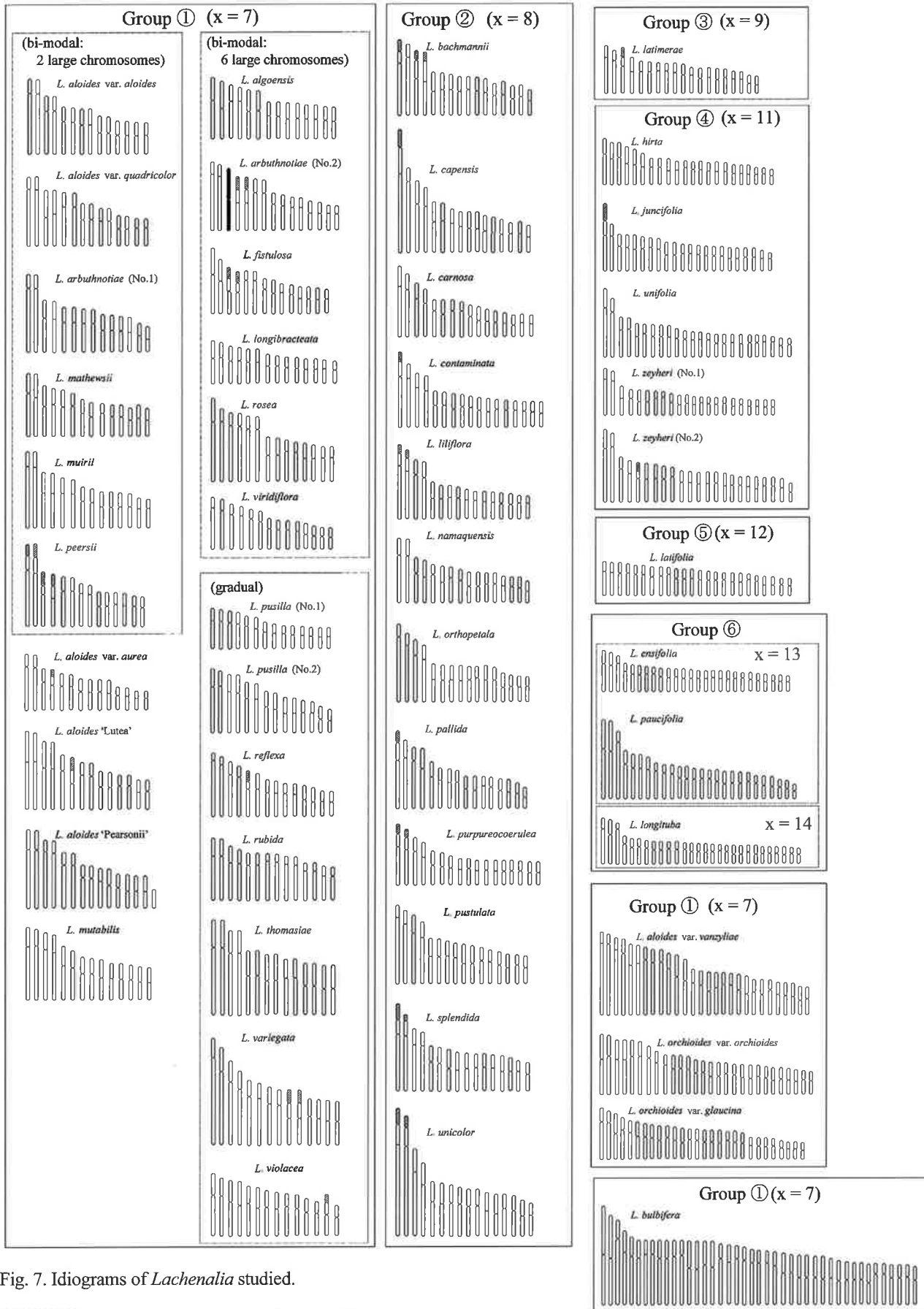


Fig. 7. Idiograms of *Lachenalia* studied.

られた。残る $2n = 28$ の *L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. orchioides* var. *orchioides*, *L. orchioides* var. *glaucina* はいずれも四倍体で $x = 7$ と考えられた。 $2n = 42$ は *L. bulbifera* の 1 種だが、六倍体で $x = 7$ と考えられた。

今回特性を評価した 34 種 4 変種 5 品種を核型の類似するものでまとめると、以下のグループ (①～⑥) に分けることができた (Fig. 7)。

グループ①: $2n = 14, 15, 28, 42$ のうち $x = 7$ のグループ。 *L. aloides* var. *aloides* など 19 種 4 変種 4 品種。二相的, 三相的, 勾配的, それらの中間的な形状を持つものが混在する。二相的, 三相的な形状を示すものについては, 染色体基本数の 7 個のうち 1 個または 3 個が大きいという傾向が観察されたが, 中間的な形状を示す系統が多数存在し, より細分化するための明確な境界を設定することはできなかった。

グループ②: $2n = 16, 17$ のグループ。 *L. bachmannii*

など 12 種。 $x = 8$ 。二相的, 三相的またはそれらの中間的な形状を示す。染色体基本数 8 個のうち 2 個が大きく, 種によっては大きい 2 個のうちの 1 個がさらに大きかった。

グループ③: $2n = 18$ のグループ。 *L. latimeriae* の 1 種。 $x = 9$ 。

グループ④: $2n = 22, 23, 24$ のうち二相的な形状を示すもの。 *L. zeyheri* など 4 種 1 品種。 $x = 11$ 。

グループ⑤: $2n = 24$ のうち勾配的な形状を示すもの。 *L. latifolia* の 1 種。 $x = 12$ 。

グループ⑥: $2n = 26, 28$ のうち $x = 7$ でないグループ。 *L. ensifolia* など Manning *et al.* (2004) により *Polyxena* から編入された 3 種。二相的で 3 個の大きな染色体を持つ。 $x = 13$ と 14 の両方が混在していることも考えられるが, 今回のデータだけではこれ以上細分化できなかった。

第 2 章 分子系統学的研究 : DNA 解析 (ITS シークエンス)

DNA の塩基配列の比較による系統解析は, 類縁関係の分析を行なうために現在一般的に使われている手法の一つである。 *Lachenalia* においてもこれまでに近縁属との比較や種間の比較に関するいくつかの報告がなされているが (Manning *et al.* 2004, Spies 2004 など), いずれも葉緑体 DNA の情報が用いられている。

そこで, これまで *Lachenalia* において報告されていない nrDNA の一部である ITS 領域の情報を用いた系統解析を行い, 過去の主な分類法や核型分析の結果との比較を行った。なお, ITS は, nrDNA 上の反復配列の一部であり, 5.8S rDNA とその両側の ITS 1 と ITS 2 を合わせた領域を示している (Baldwin *et al.* 1995)。5.8S rDNA の塩基配列は種を超えて比較的安定しているが, ITS 1 と ITS 2 の塩基配列は進化に伴って変化しており, 種間の比較に有効であるとされている (Soltis and Soltis 1998)。

材料および方法

DNA 解析には, Table 3 に示した 34 種 4 変種 6 品種を用いた。また, 系統樹作成の際の Outgroup として *Lachenalia* と同じユリ科ツルボ亜科の *Ornithogalum umbellatum* を用い, あわせて, Pfosser

et al. (2003) などで *Lachenalia* との近縁性が指摘されている *Massonia* を 2 種用い, 検討の参考にした。

材料の全 DNA は臭化セシルトリメチルアンモニウム (cetyl trimethyl ammonium bromide : CTAB) 法 (Doyle and Doyle 1987) を用いて新鮮な葉から採取した。ITS 1, 5.8S rDNA, ITS 2 を含む DNA 断片は, 全 DNA から ITS 5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACA AGG-3') と ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') の polymerase chain reaction (PCR) プライマー (White *et al.* 1990) を用いて増幅した。PCR による増幅は, GeneAmp PCR system 2700 (Perkin-Elmer, Boston, Massachusetts, U.S.A.) により, 97°C 1 分 - (97°C 1 分, 52°C 1 分, 72°C 2 分) × 27 反復 - 72°C 2 分の温度プログラムを実行した。PCR により増幅された DNA 断片に対し, 1% のアガロースゲルを用いた電気泳動を行った。その後, QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Calif., U.S.A.) を用いて精製した。ITS 領域は, 自動シーケンサー (3130x Genetic Analyzer; ABI Prism, Foster City, CA, U.S.A.) により, Big Dye Terminator Kit (ABI) の manufacture's protocol に従い塩基配列の読み取り (シークエンス) を行った。 *Lachenalia carnososa*, *L. hirta* 'Type B', *L. reflexa*, *L. unicolor* 'Type A', 'Type B' は十分なシークエンス結果が得られなかったため, pGEM-T Easy Vector

Table 3. The materials used in DNA analysis and intra-individual variation in ITS region in *Lachenalia* and *Massonia* species

Species and variety	Voucher specimen	Database accession	ITS length (bp)			Number of the basis (bp)									
			ITS1	5.8Sr DNA	ITS2	Total length	A	T	G	C	A+T (%)	G+C (%)	inserted* deleted* trans-located*		
<i>Lachenalia algoensis</i> Schöenl.	HIRO 5756-LPCGS	AB304971	248	154	248	650	110	111	226	203	34.00	66.00	0	0	3
<i>L. aloides</i> (L.f.) Engl. var. <i>aloides</i>	HIRO 5762-LPCGS	AB304972	248	154	248	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
<i>L. aloides</i> var. <i>aurea</i> (Lindl.) Engl.	HIRO 5763-LPCGS	AB304973	248	154	248	650	110	111	227	202	34.00	66.000	0	2	
<i>L. aloides</i> var. <i>quadricolor</i> (Jacq.) Engl.	HIRO 5764-LPCGS	AB304974	248	154	248	650	111	110	227	202	34.00	66.00	1	1	5
<i>L. aloides</i> var. <i>vanzyliae</i> W.F.Barker	HIRO 5765-LPCGS	AB304975	248	154	248	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
<i>L. aloides</i> ‘Lutea’	HIRO 5758-LPCGS	AB304976	248	154	248	650	112	111	225	202	34.31	65.69	0	0	3
<i>L. aloides</i> ‘Pearsonii’	HIRO 5760-LPCGS	AB304977	248	154	248	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
<i>L. arbutnotiae</i> W. F. Barker	HIRO 5766-LPCGS	AB304978	249	154	248	651	110	111	228	202	33.95	66.05	1	0	2
<i>L. bachmannii</i> Bak.	HIRO 5767-LPCGS	AB304979	248	154	248	650	110	108	225	207	33.54	66.06	0	0	7
<i>L. bulbifera</i> (Cyrillo) Engl.	HIRO 5767-LPCGS	AB304980	248	154	248	650	109	112	228	201	34.00	66.00	0	0	4
<i>L. carnososa</i> Bak. (Clone1)	HIRO 5805-LPCGS	AB439269	248	154	249	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	0	6
<i>L. carnososa</i> (Clone2)		AB439270	248	154	249	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	0	6
<i>L. carnososa</i> (Clone3)		AB439271	248	154	249	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	0	6
<i>L. contaminata</i> Ait.	HIRO 5769-LPCGS	AB304981	248	154	248	650	109	107	227	207	33.23	66.77	0	0	8

*: (-) means 'unaccounted'.

Table 3. continued

Species and variety	Voucher specimen	Database accession	ITS length (bp)			Number of the basis (bp)							trans-located*
			ITS1	5.8Sr DNA	ITS2	Total length	A	T	G	C	A+T (%)	G+C (%)	inserted* deleted* located*
<i>L. orchoides</i> (L.) Ait. var. <i>orchoides</i>	HIRO 5780-LPCGS	AB304992	248	154	248	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0 0 2
<i>L. orchoides</i> var. <i>glaucina</i> (Jacq.) W. F. Barker	HIRO 5779-LPCGS	AB304991	248	154	248	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0 0 2
<i>L. pallida</i> Ait.	HIRO 5781-LPCGS	AB304993	248	154	248	650	111	108	225	206	33.69	66.31	0 0 7
<i>L. pausifolia</i> (W. F. Barker) J. C. Manning & Goldblatt	HIRO 5792-LPCGS	AB305012	247	154	246	647	113	111	222	201	34.62	65.38	1 4 9
<i>L. peersii</i> Marloth ex W. F. Barker	HIRO 5782-LPCGS	AB304994	248	154	248	650	110	112	227	201	34.15	65.85	0 0 3
<i>L. purpureo coerulea</i> Jacq	HIRO 5794-LPCGS	AB304995	248	154	249	651	110	107	226	208	33.33	66.67	1 0 6
<i>L. pusilla</i> Jacq. f. 'TypeA'	HIRO 5783-LPCGS	AB304996	248	149	243	640	109	110	221	200	34.22	65.78	0 10 3
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	HIRO 5795-LPCGS	AB304997	248	154	245	647	112	114	221	200	34.93	65.07	0 4 7
<i>L. pustulata</i> Jacq. 'TypeA'	HIRO 5784-LPCGS	AB304998	248	154	249	651	111	107	226	208	33.49	66.51	1 0 8
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	HIRO 5785-LPCGS	AB304999	248	154	249	651	110	107	226	208	33.33	66.67	1 0 7
<i>L. reflexa</i> Thunb. (Clone1)	HIRO 5806-LPCGS	AB439282	248	154	248	650	110	113	227	200	34.31	65.69	0 0 4
<i>L. reflexa</i> (Clone2)		AB439275	248	154	248	650	115	114	225	196	35.23	64.77	0 0 15
<i>L. reflexa</i> (Clone3)		AB439276	248	154	248	650	110	113	227	200	34.31	65.69	0 0 4
<i>L. rosea</i> Andrews	HIRO 5788-LPCGS	AB305000	246	154	250	650	110	112	226	202	34.15	65.85	0 0 4
<i>L. rubida</i> Jacq.	HIRO 5796-LPCGS	AB305001	248	154	248	650	110	110	227	203	33.85	66.15	0 0 1

Table 3. continued

Species and variety	Voucher specimen	Database accession	ITS length (bp)			Number of the basis (bp)									
			ITS1	5.8Sr DNA	ITS2	Total length	A	T	G	C	A+T (%)	G+C (%)	inserted* deleted* trans-located*		
<i>L. splendida</i> Diels	HIRO 5789-LPCGS	AB305002	248	154	249	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	1	6
<i>L. unicolor</i> Jacq. 'Type A' (Clone1)	HIRO 5808-LPCGS	AB439277	248	154	248	650	112	109	224	205	34.00	66.00	0	0	9
<i>L. unicolor</i> (Clone2)		AB439278	248	154	248	650	112	110	224	204	34.15	65.85	0	0	12
<i>L. unicolor</i> (Clone3)		AB439279	247	154	248	649	110	108	225	206	33.60	66.40	0	0	9
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	HIRO 5807-LPCGS	AB439280	248	154	248	650	111	109	224	206	33.85	66.15	0	0	8
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)		AB439281	248	154	248	650	111	109	224	206	33.85	66.15	0	0	8
<i>L. unifolia</i> Jacq.	HIRO 5790-LPCGS	AB305003	250	154	248	652	112	104	225	211	33.13	66.87	3	1	17
<i>L. variegata</i> W. F. Barker	HIRO 5797-LPCGS	AB305005	248	154	248	650	110	110	227	203	33.85	66.15	0	0	3
<i>L. viridiflora</i> W. F. Barker	HIRO 5798-LPCGS	AB305006	248	154	248	650	111	111	226	212	34.15	65.85	0	0	3
<i>L. zeyheri</i> Bak.	HIRO 5791-LPCGS	AB305004	251	154	248	653	109	106	226	212	32.92	67.08	3	0	19
<i>Massonia depressa</i> Houtt.	HIRO 5799-LPCGS	AB305007	250	154	248	652	110	123	219	200	35.74	64.26	5	2	52
<i>M. pustulata</i> Jacq.	HIRO 5793-LPCGS	AB305008	249	154	248	651	110	124	220	197	35.94	64.06	5	3	49
<i>Ornithogalum umbellatum</i> L.	HIRO 5803-LPCGS	AB305009	263	154	227	644	111	86	223	224	33.59	69.41	-	-	-

System (Promega, Madison, WI, USA) の manufacture's protocol に従ってクローニングを行った材料を用いてシーケンスを行った。このクローニングには *Escherichia coli* の JM109 系統 (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) を用いた。

シーケンスのデータは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイト (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) 上にある Clustal W program (Thompson *et al.* 1994) のデフォルトセッティングを利用し、目視で調整した。系統樹は以下の2つのプログラムにより作成した。(1) PAUP 4.0b (Swofford 2000) : MulTree のコマンドを「Yes」にし、樹形二分割再結合法 (tree bisection-reconnection : TBR) による 1000 回の再結合を試行した最大節約 (maximum parsimony : MP) 法 (Fitch 1971)。(2) MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) : MrModeltest 2.2 (Nylander 2004) を用いて行った階層的尤度比検定 (Hierarchical Likelihood Ratio Test : hLRTs) により選ばれた最適モデルを適用したベイズ (Bayesian inference : BI) 法。MP 法ではブートストラップ (BS) 値により、BI 法ではベイズの事後確率 (BPP) により系統樹上の分岐群 (クレード) の信用度の根拠とした。BS 解析 (Felsenstein 1985) は PAUP の 1000 回試行により行い、ベイズの事後確率 BPP は MrBayes により算出した。それぞれの値は、挿入と欠失 (indel) 部分を含むデータと除去したデータの両方を用いて算出した。

結果および考察

ヌクレオチドの配列分析と比較

Lachenalia において、核 DNA のデータを用いて系統解析を行った報告は本報が初である。

ITS 領域のデータ配列数は 676 塩基対 (bp) だった。個々の ITS 領域の塩基数は Outgroup の *Ornithogalum umbellatum* の 644bp, *Lachenalia pusilla* 'Type A' の 640bp を除き、およそ 650bp (647 ~ 653bp) だった (Table 3)。本研究で取り扱った系統のヌクレオチドのシーケンスデータは、DDBJ, EMBL, GenBank においてアクセッション番号の AB304971 ~ AB305012, AB439269 ~ AB439282 として登録している。ITS 1 と ITS 2, 5.8S rDNA の領域の境界位置の決定については、*Tulipa clusiana* (Liliaceae) (Accession No. AM180460) の情報と比較することにより行った。その結果、ITS 1 領域の長さは 246 ~

251bp (*O. umbellatum* の 263bp を除く)、5.8S rDNA 領域の長さは 154bp (*L. pusilla* 'Type A' の 149bp を除く)、ITS 2 領域の長さは 243 ~ 249bp (*O. umbellatum* の 227bp を除く) となった。ITS 1, 5.8S rDNA, ITS 2 領域の塩基の構成については、およそ 650bp のうちアデニン (A) が 109 ~ 118bp, チミン (T) が 106 ~ 114bp (*Massonia depressa* の 123bp, *M. pustulata* の 124bp, *O. umbellatum* の 86bp を除く)、グアニン (G) が 219 ~ 228bp, シトシン (C) が 196 ~ 207bp (*O. umbellatum* の 224bp を除く) であった。同領域内の A + T の構成比は 33.08 ~ 34.93 % (*L. mutabilis* の 35.48 %, *M. depressa* の 35.74 %, *M. pustulata* の 35.94 %, *O. umbellatum* の 30.59% を除く)、G + C の構成比は 65.07 ~ 66.92% (*L. mutabilis* の 64.52 %, *M. depressa* の 64.26 %, *M. pustulata* の 64.06 %, *O. umbellatum* の 69.41% を除く) であり、G-C リッチな特徴を持つことがわかった。ClustalW で塩基配列を調整し、さらに目視で修正を加えた結果、*O. umbellatum* を除く 55 系統の中では、挿入 (insert) が 0bp であるのが 32 系統、1bp であるのが 12 系統、2bp であるのが 5 系統、3bp であるのが 4 系統、5bp であるのが 2 系統だった。また、欠失 (delete) が 0bp であるのが 40 系統、1bp であるのが 9 系統、2bp であるのが 2 系統、3bp であるのが 1 系統、4bp であるのが 2 系統、10bp であるのが 1 系統だった。さらに、塩基の違いが認められる箇所について、最も多くの系統で確認される塩基に対して異なる塩基が確認される部分を置換 (translocated) があったとして数えたとき、*Lachenalia* の 53 系統では 1 ~ 19bp の範囲で置換が確認され、*M. depressa* では 52bp, *M. pustulata* では 49bp の置換が確認された。

系統解析

ITS 領域の全シーケンスデータを用いて行った MP 法による再計算の数は 51,226,140 で最大節約系統樹 (best tree) の数は 349, データと出た系統樹の一致指数 (consistency index : CI) 値は 0.808, データセットの保持指数 (retention index : RI) は 0.852 だった。BI 法は 143 のデータパターンに基づき GTR+G モデルを最適モデルとして適用し、50,000,000 generations の再構築を行った。

ITS 領域の挿入と欠失 (insert and delete : indel) 部分を削除して行った MP 法による再計算の数は 49,706,079 で、best tree の数は 351, CI は 0.809, RI

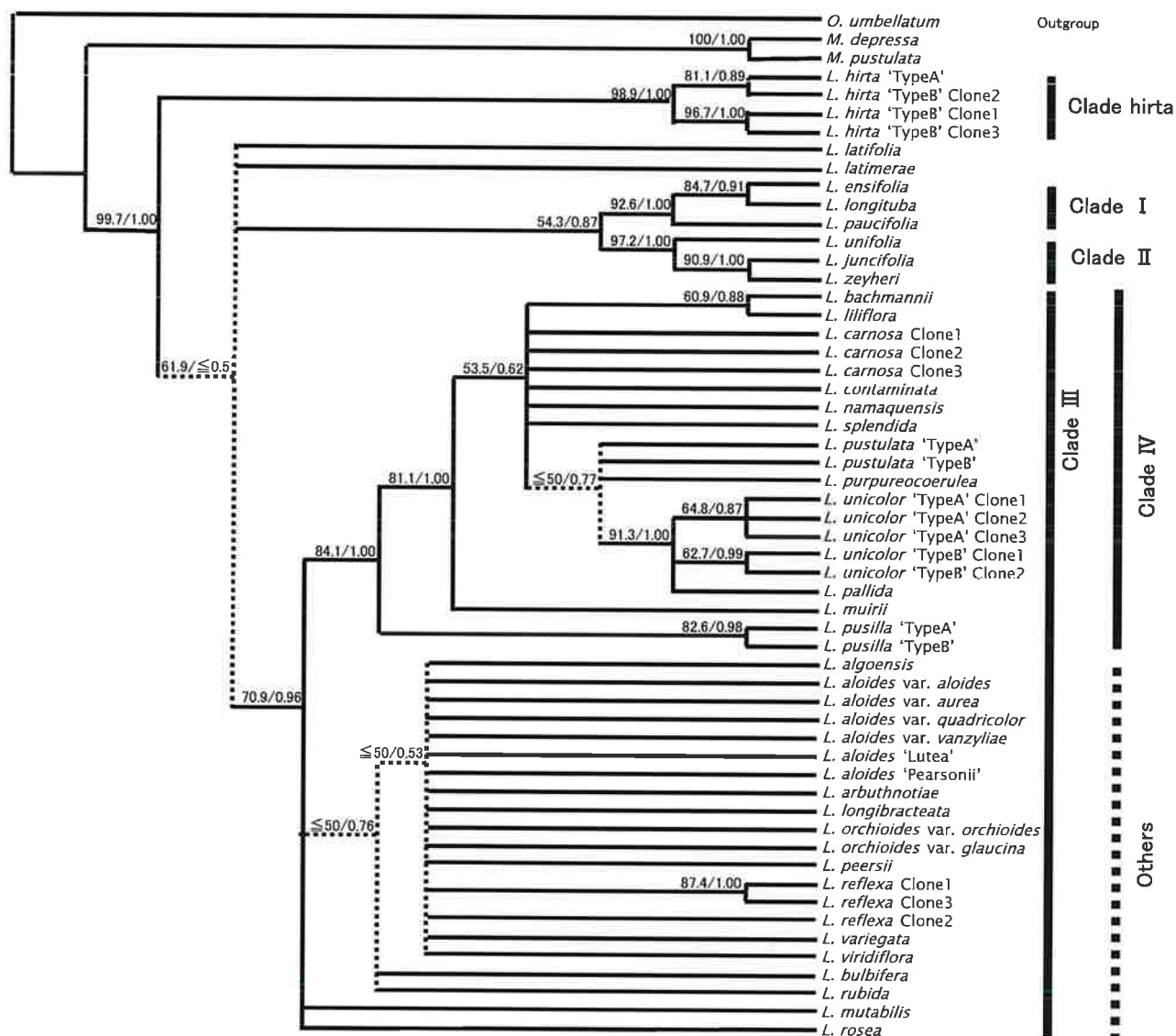


Fig. 8. The strict consensus tree based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence data with indels. (abbreviated as "APT") Numbers along the branch show bootstrap values (BS) on 1,000 replications using MP method by PAUP, and Bayesian posterior probabilities (BPP) by MrBayes (BS in % / BPP). Supporting values more than 50% were overlaid (less than 50%, but with the support in another method, were indicated as 50 and shown with broken line).

は 0.856 だった。BI 法は 135 のデータパターンに基づき GTR+G モデルを最適モデルとして適用し、50,000,000 generations の再構築を行った。

全シーケンスデータを用いて行った系統解析の結果 (APT と示す) を Fig. 8 に、indel 部分を削除して行った系統解析の結果 (CPT と示す) を Fig. 9 に示した。各分岐点に示した数値は MP 法により 1,000 回の再計算に基づく BS 値をパーセント表示したものと、BI 法により算出した BPP を示した。

ITS シーケンスに基づき得られた系統樹について、全シーケンスデータを用いたもの、indel 部分を削除したもののいずれにおいても *Massonia* の 2 種は *Lachenalia* とは異なる一つの系統群 (クレ

ド) を形成した (APT, CPT とともに BS = 100 %, BPP = 1.00)。

Lachenalia の全系統により形成されたクレード (APT の BS = 99.7 %, BPP = 1.00, CPT の BS = 99.9 %, BPP = 0.99) はさらにいくつかのグループに分けられた。すなわち、4 サンプルの *L. hirta* からなるクレード (Clade hirta : APT の BS = 98.9 %, BPP = 1.00, CPT の BS = 99.4 %, BPP = 1.00), *L. ensifolia*, *L. longituba*, *L. paucifolia* からなるクレード (Clade I : APT の BS = 92.6 %, BPP = 1.00, CPT の BS = 90.0 %, BPP = 1.00), *L. unifolia*, *L. juncifolia*, *L. zeyheri* からなるクレード (Clade II : APT の BS = 97.2 %, BPP = 1.00, CPT の BS =

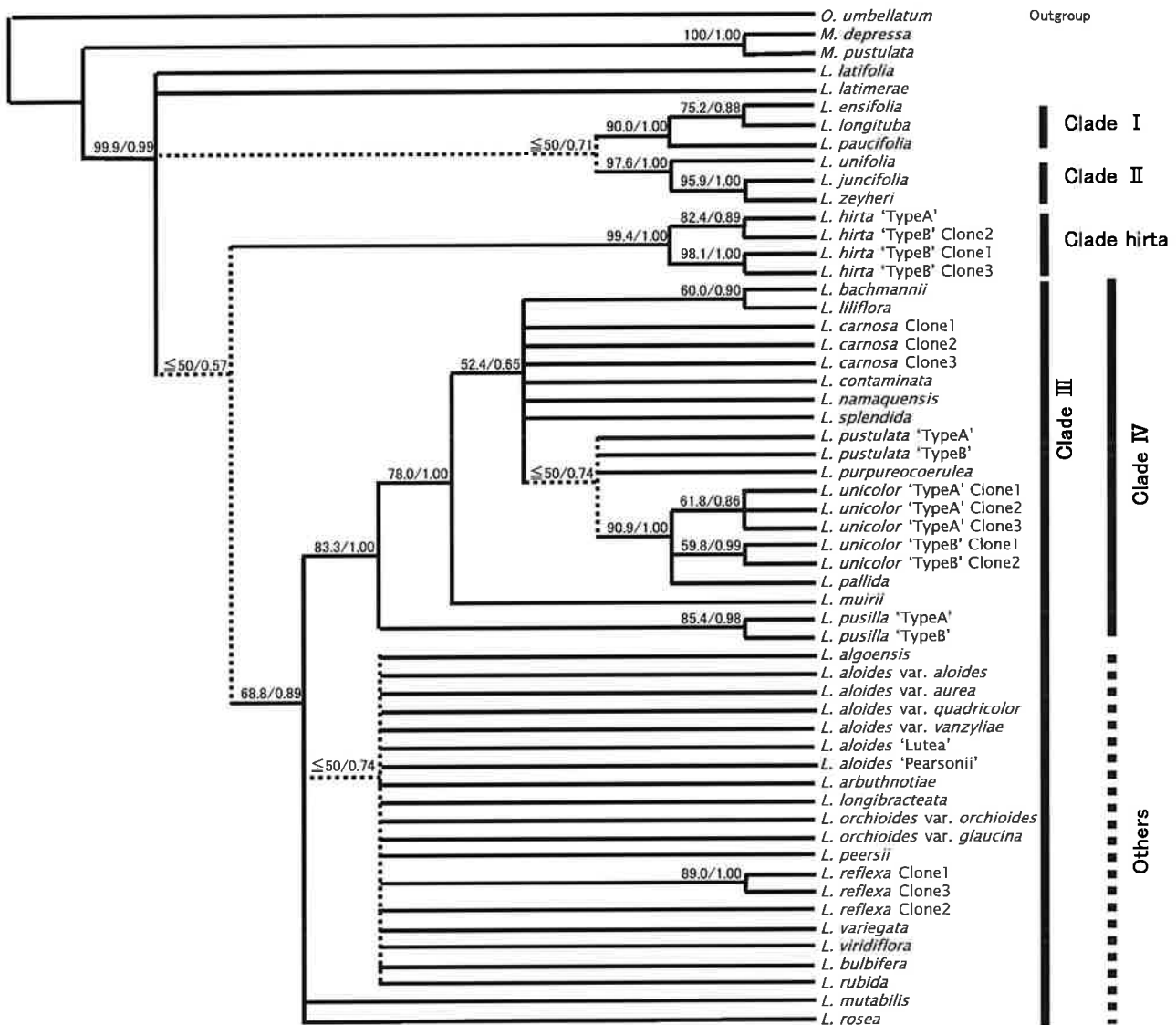


Fig. 9. The strict consensus tree based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence data without indels. (abbreviated as “CPT”) Numbers along the branch show bootstrap values (BS) on 1,000 replications using MP method by PAUP, and Bayesian posterior probabilities (BPP) by MrBayes (BS in % / BPP). Supporting values more than 50% were overlaid (less than 50%, but with the support in another method, were indicated as ≤ 50 and shown with broken line).

97.6%, BPP = 1.00), *L. bachmannii* から *L. rosea* の 25 種 4 変種 5 品種 (41 サンプル) からなるクレード (Clade III: APT の BS = 70.9 %, BPP = 0.96, CPT の BS = 68.8 %, BPP = 0.89), クレードを形成しない *L. latifolia* と *L. latimerae* に分けられた。全シーケンスデータを用いた計算では, Clade hirta を除く 49 サンプルが一つのクレードを形成するという結果が得られたがその信用度は低く (BS = 61.9%, BPP ≤ 0.5), Clade I と Clade II が一つのクレードを形成するという結果が得られたがその信用度は低かった (BS = 54.3 %, BPP = 0.87). indel 部分を削除したデータを用いた計算では Clade hirta と Clade III がクレードを形成するという結果が得られ

たがその信用度は低く (BS ≤ 50 %, BPP = 0.57), Clade I と Clade II が一つのクレードを形成するという結果が得られたがその信用度は低かった (BS ≤ 50 %, BPP = 0.71). また, Clade I の中ではさらに *L. ensifolia* と *L. longituba* が小さなクレードを形成し (APT の BS = 84.7 %, BPP = 0.91, CPT の BS = 75.2 %, BPP = 0.88), Clade II の中ではさらに *L. juncifolia* と *L. zeyheri* が小さなクレードを形成した (APT の BS = 90.9 %, 1.00, CPT の BS = 95.9 %, BPP = 1.00).

Clade III は *L. bachmannii* から *L. pusilla* の 12 種 3 品種 (20 サンプル) からなる小さなクレード (Clade IV) を形成した (APT の BS = 84.1 %, BPP = 1.00,

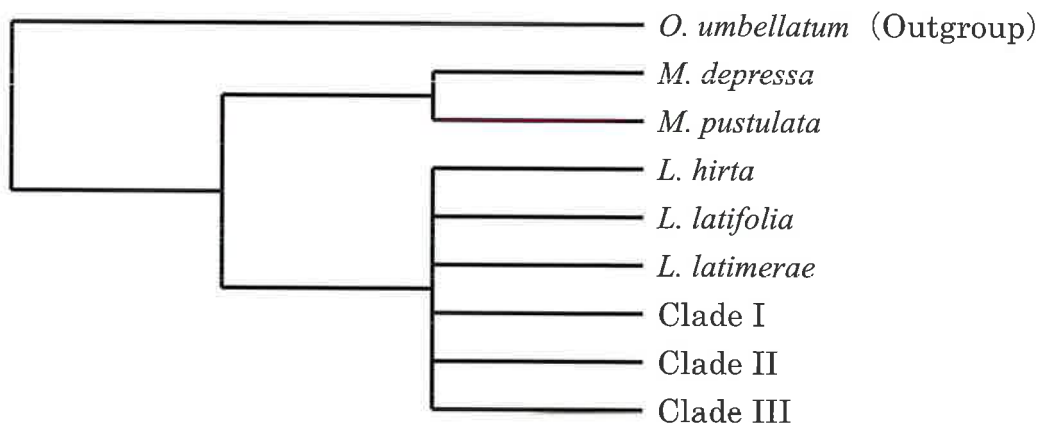


Fig. 10. The consensus tree regulated from two phylogenetic trees based on ITS sequence data with indels (APT) and without indels (CPT).

CPT の BS = 83.3 %, BPP = 1.00). Clade IV は *L. pusilla* の 2 サンプルを除く 11 種 2 品種 (18 サンプル) で、さらに小さなクレードを形成した (APT の BS = 81.1 %, BPP = 1.00, CPT の BS = 78.0 %, BPP = 1.00). さらに *L. muirii* を除く 10 種 2 品種 (17 サンプル) でより小さなクレードを形成したがその信用度は低かった (APT の BS = 53.5 %, BPP = 0.62, CPT の BS = 52.4 %, BPP = 0.65). このクレードの中で、*L. pustulata* の 2 サンプル、*L. purpureocoerulea*, *L. unicolor* の 5 サンプル、*L. pallida* がより小さなクレードを形成するという計算結果が得られたがその信用度は低かった (APT の BS ≤ 50 %, BPP = 0.77, CPT の BS ≤ 50 %, BPP = 0.74). *L. bachmannii* と *L. liliflora* がクレードを形成し (APT の BS = 60.0 %, BPP = 0.90, CPT の BS = 60.9 %, BPP = 0.88), *L. unicolor* と *L. pallida* がクレードを形成した (APT の BS = 90.9 %, BPP = 1.00, CPT の BS = 91.3 %, BPP = 1.00).

Clade III のうち、Clade IV 以外の *L. algoensis* から *L. rosea* の 21 サンプル (Others) のうち *L. mutabilis* と *L. rosea* を除く 11 種 4 変種 2 品種 (19 サンプル) はクレードを形成するという計算結果が得られたが、その信用度は低く (APT の BS ≤ 50 %, BPP = 0.76, CPT の BS ≤ 50 %, BPP = 0.74), さらに全シーケンスデータを用いた計算ではこのクレードから *L. bulbifera* と *L. rubida* を除く 9 種 4 変種 2 品種 (17 サンプル) でさらに小さなクレードを形成するという結果が得られたが、その信用度は低かった (BS ≤ 50 %, BPP = 0.53).

ITS 領域の比較から読み取れる *Lachenalia* 属内の類縁関係

L. hirta は 4 サンプルを調査し、この 4 サンプルで一つのクレードを形成した。このクレードは、全データを基に作成した系統樹 (APT) においては、本種以外の調査した *Lachenalia* 全サンプルからなるクレードの外に位置した。また、indel 部分を削除したデータを基に作成した系統樹 (CPT) においては *Lachenalia* 全サンプルからなるクレードの中に位置して、*L. latifolia*, *L. latimerae*, Clade I, Clade II と区別され、Clade III とともに一つのクレードを形成したが、その位置の信用度については BS, BPP ともに低かった。そのため、*L. latifolia*, *L. latimerae*, Clade I, Clade II, Clade III と同様に疎遠な関係であると判断された (Fig. 10)。

Manning *et al.* (2004) により *Polyxena* から *Lachenalia* に編入された種のうち今回の調査で扱ったのは 3 種だったが、この 3 種だけで Clade I が形成された。ITS 領域の比較において、今回調査した系統の中ではこの 3 種には共通して他と区別される特徴を持つことが明らかとなった。

Clade III は 12 種 3 品種 (20 サンプル) からなる Clade IV とその他 13 種 4 変種 2 品種 (21 サンプル: 「Others」) とに分けられた。Clade IV は明確なまとまりを示し、さらにより小さいレベルにおいてもある程度のグループを形成した一方で、「Others」と称したその他のサンプル群には明確なまとまりが認められずそれぞれの類縁関係が示されなかった。

置換については、「Others」で小さく、その他の種やクレードでは 10 ~ 20bp の値になっているが (Fig. 7), これは「Others」に含まれるサンプル間の

		Number of the bases (bp)									
		Total	A	T	G	C	A+T(%)	G+C(%)	inserted	deleted	translocated
Clade hirta	<i>O. umbellatum</i>	644	111	86	223	224	30.59	69.41	..*	..*	..*
	<i>M. depressa</i>	652	110	123	219	200	35.74	64.26	5	2	52
	<i>M. pustulata</i>	651	110	124	220	197	35.94	64.06	5	3	49
	<i>L. hirta</i> 'TypeA'	651	116	107	224	204	34.25	65.75	2	1	16
	<i>L. hirta</i> 'TypeB' Clone2	651	115	109	225	202	34.41	65.59	3	1	12
	<i>L. hirta</i> 'TypeB' Clone1	652	116	107	224	205	34.20	65.80	2	1	16
	<i>L. hirta</i> 'TypeB' Clone3	651	115	109	225	202	34.41	65.59	2	1	16
	<i>L. latifolia</i>	648	112	106	224	206	33.64	66.36	0	2	16
	<i>L. latimeriae</i>	650	112	107	226	204	33.74	66.26	0	1	10
	<i>L. ensifolia</i>	652	116	105	225	206	33.90	66.10	2	0	16
Clade I	<i>L. longituba</i>	651	112	106	227	206	33.49	66.51	1	0	11
	<i>L. paucifolia</i>	647	113	111	222	201	34.62	65.38	1	4	9
Clade II	<i>L. unifolia</i>	652	112	104	225	211	33.13	66.87	3	1	17
	<i>L. juncifolia</i>	653	109	107	225	212	33.08	66.92	3	0	19
	<i>L. zeyheri</i>	653	109	106	226	212	32.92	67.08	3	0	19
Clade IV	<i>L. bachmannii</i>	650	110	108	225	207	33.54	66.06	0	0	7
	<i>L. liliflora</i>	650	111	108	226	205	33.69	66.31	0	0	8
	<i>L. carnosae</i> Clone1	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	0	6
	<i>L. carnosae</i> Clone2	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	0	6
	<i>L. carnosae</i> Clone3	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	0	6
	<i>L. contaminata</i>	650	109	107	227	207	33.23	66.77	0	0	8
	<i>L. namaquensis</i>	652	110	108	228	206	33.44	66.56	2	1	6
	<i>L. splendida</i>	651	110	108	226	207	33.49	66.51	1	1	6
	<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	651	111	107	226	208	33.49	66.51	1	0	8
	<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	651	110	107	226	208	33.33	66.67	1	0	7
Clade III	<i>L. purpureoerulea</i>	651	110	107	226	208	33.33	66.67	1	0	6
	<i>L. unicolor</i> 'TypeA' Clone1	650	112	109	224	205	34.00	66.00	0	0	9
	<i>L. unicolor</i> 'TypeA' Clone2	650	112	110	224	204	34.15	65.85	0	0	12
	<i>L. unicolor</i> 'TypeA' Clone3	649	110	108	225	206	33.60	66.40	0	0	9
	<i>L. unicolor</i> 'TypeB' Clone1	650	111	109	224	206	33.85	66.15	0	0	8
	<i>L. unicolor</i> 'TypeB' Clone2	650	111	109	224	206	33.85	66.15	0	0	8
	<i>L. pallida</i>	650	111	108	225	206	33.69	66.31	0	0	7
	<i>L. muirii</i>	650	109	111	227	203	33.85	66.15	0	0	10
	<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	640	109	110	221	200	34.22	65.78	0	10	3
	<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	647	112	114	221	200	34.93	65.07	0	4	7
Others	<i>L. algoensis</i>	650	110	111	226	203	34.00	66.00	0	0	3
	<i>L. aloides</i> var. <i>aloides</i>	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. aloides</i> var. <i>aurea</i>	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. aloides</i> var. <i>quadricolor</i>	650	111	110	227	202	34.00	66.00	1	1	5
	<i>L. aloides</i> var. <i>vanzyliae</i>	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. aloides</i> 'Lutea'	650	112	111	225	202	34.31	65.69	0	0	3
	<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. arbutnotiae</i>	651	110	111	228	202	33.95	66.05	1	0	2
	<i>L. longibracteata</i>	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. orchiooides</i> var. <i>orchiooides</i>	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. orchiooides</i> var. <i>glaucina</i>	650	110	111	227	202	34.00	66.00	0	0	2
	<i>L. peersii</i>	650	110	112	227	201	34.15	65.85	0	0	3
	<i>L. reflexa</i> Clone1	650	110	113	227	200	34.31	65.69	0	0	4
	<i>L. reflexa</i> Clone3	650	110	113	227	200	34.31	65.69	0	0	4
	<i>L. reflexa</i> Clone2	650	115	114	225	196	35.23	64.77	0	0	15
	<i>L. variegata</i>	650	110	110	227	203	33.85	66.15	0	0	3
	<i>L. viridiflora</i>	650	111	111	226	212	34.15	65.85	0	0	3
	<i>L. bulbifera</i>	650	109	112	228	201	34.00	66.00	0	0	4
	<i>L. rubida</i>	650	110	110	227	203	33.85	66.15	0	0	1
	<i>L. mutabilis</i>	651	118	113	221	199	35.48	64.52	1	0	12
	<i>L. rosea</i>	650	110	112	226	202	34.15	65.85	0	0	4

Fig. 11. The numbers, the ratio of the bases and the inserted, deleted and translocated basis on ITS regions of *Lachenalia*, *Massonia* and *Ornithogalum* studied.

*: (-) means "uncounted".

塩基配列にほとんど違いが無く、これらの塩基配列が置換の有無の基準となったためである。「Others」以外のサンプルでは、同じクレードに属するものは同様に置換が行われており、この部分がクレード分けの根拠となっているようである。また、挿入、欠失が非常に少なく、置換があったものについても $A \leftrightarrow T$ 間、 $G \leftrightarrow C$ 間の置換が多かったために、塩基数、 $A + T$ や $G + C$ の構成比、挿入や欠失の数についてはクレードごとの特徴は確認できなかった。「Others」の *L. reflexa* Clone 2 は置換が 15bp と、他に比べて多くなっているが、これが原因で他のクレードに移るという計算結果は得られなかった。

ITS 領域の解析により得られた系統樹と酢酸オルセイン染色押しつぶし法による核型分析の結果との比較

ITS 領域の解析により得られた系統樹に酢酸オルセイン染色押しつぶし法で得られた体細胞分裂期中期の核型の観察結果を当てはめると、Fig. 12. のようになった。

まず、互いに高い類縁性を示すとはいえない位置関係にある *L. hirta*, *L. latifolia*, *L. latimeriae* は核型分析の結果ではそれぞれグループ④、⑤、③と分けられていた。Clade I の 3 種は全てグループ⑥、Clade II の 3 種は全てグループ④だった。なお、今回の ITS 領域の比較では同じグループ④に分類され

た Clade II の 3 種 (*L. juncifolia*, *L. unifolia*, *L. zeyheri*) と *L. hirta* の類縁性が裏付けられなかったが, van Rooyen *et al.* (2002) によると, 主に DNA 増幅フィンガープリント法 (DNA amplification fingerprinting : DAFs) のデータを根拠に *L. hirta* と *L. unifolia* の高い近縁性が指摘されている。Clade IV にはグループ②の全種とグループ①の *L. muirii*, *L. pusilla* が含まれた。グループ①の 2 種を除くグループ②の全種だけでより小さなクレードが形成されており (Fig. 8, 9), $x = 8$ の種群の高い類縁性が示された。*L. muirii* と *L. pusilla* を除くグループ①の全種は「Others」に含まれた。

ITS 領域の解析により得られた系統樹と核型分析の結果の中でも特に基本数の情報とを比べると関連する部分が多く認められた。また, $x = 8$ の種群が高い類縁性を示すことが示された。核型分析の結果と ITS 領域の比較の結果とを合わせて検討することにより, $x = 7$ の種群については $x = 9$ や 11, 12 の種群よりむしろ $x = 8$ の種群と近縁であり, $x = 7$ の系統間の類縁関係は $x = 8$ の系統間ほどには高くないということが示唆された。

ITS 領域の比較では, $x = 7$ の系統間のより詳細な類縁関係が示されていないため, この部分の類縁関係の解明が課題として残った。また, *L. muirii* と *L. pusilla* の 2 種は $x = 7$ でありながら ITS 領域の比較では $x = 8$ の種群と近縁であることが示されているが, これが示す意味は何なのか明らかとはならなかった。また, Clade I に含まれた 3 種の間には染色体数に違いがあったが, 基本数にも違いがあるのかどうか, これまでの調査では明らかにできなかった。

系統樹と過去のカテゴリー方法との比較

過去に報告された *Lachenalia* のカテゴリー方法を ITS 領域の比較によって得られた系統樹にあてはめてみると, 外部形態を主たる根拠に行われた Duncan (1988), Mannig *et al.* (2002) のカテゴリーととの間の相関を認めるのは難しかった (Fig. 12)。Baker (1897) のカテゴリーも外部形態 (花被の形状) を根拠に行われたものだが, ITS 領域の比較の結果で疎遠と考えられた *L. hirta*, *L. latifolia*, Clade II の全 3 種, Clade IV

のうち *L. bachmanii*, *L. carnososa*, *L. contaminata*, *L. pallida*, *L. pustulata*, *L. purpureo-coerulea*, *L. unicolor*, 「Others」の *L. rosea* が同じ subgenus *Chloriza* とされて近縁と考えている点において相異した。Crosby (1986) のカテゴリーは染色体情報と交雑情報を主たる根拠に行われたものだが, 今回の結果と共通する部分が多かった。その一方で, ITS 領域の比較結果では互いの類縁関係の大小が認められなかった「Others」に該当する種が Crosby (1986) では group *Aloides* と group *Orchioides* の 2 グループに分けられていた。葉緑体 DNA の情報を基にした系統解析の結果と染色体数の間には関連性があり, 従来のカテゴリー方法の中では Crosby (1986) の方法が最も自然であるということは Spies *et al.* (2002) により指摘されている。また, 今回の結果と, 葉緑体 DNA の一領域である *trnL-F* の塩基配列を比較した Spies (2004) の結果との比較では, 多くの共通点が示された一方で, 今回の結果では Clade II に含まれた *L. zeyheri* が, Clade IV に多く含まれている group *L. unicolor* (*Unicolor*) としてカテゴリーされている点, Clade IV の *L. pusilla* が group *L. pusilla* (*Pusilla*) としてカテゴリーされている点が異なった。また, 「Others」に該当する種が Spies (2004) ではより細かくカテゴリーされていて, 同じ種が Group *L. aloides* (*Aloides*) と Group *L. orchioides* (*Orchioides*) とに区別されて細かくカテゴリーされており, Crosby (1986) と同様に「Others」内の多様性が示されている。なお, Clade IV の中では *L. muirii* だけが '*Lachenalia* 1 - group *L. mathewsii*' (1- *Mathewsii*) としてカテゴリーされており, この点が ITS による解析の結果と異なった。

外部形態の比較は種の同定を行う上で非常に有効な手段の一つであるが, *Lachenalia* の属内の類縁関係を考える際に, 外部形態を根拠にすることは適当でないことはこれまでも指摘されてきた (Duncan *et al.* 2005)。DNA の情報は類縁関係や種分化の歴史を考える際に非常に重要なものとされているが, 今回の ITS 領域の解析結果が過去の染色体情報に基づいたカテゴリーや *trnL-F* 領域の解析結果と異なる見解を示した点については, どちらかあるいは両方に足りない部分があることが原因であると考えられる。

	Baker (1897)	Crosby (1986)	Duncan (1988)	Manning <i>et al.</i> (2002)	Spies (2004)	Grouping by karyotype*
<i>L. hirta</i>	Chloriza	-	1f	Group5	Juncifolia	Group4
<i>L. latifolia</i>	Chloriza	-	2c	Group4	-	Group5
<i>L. latimeriae</i>	-	-	2d	Group4	2-Perryae	Group3
<i>L. ensifolia</i>	-	-	-	(Polyxena)	2-POLYXENA	Group6
<i>L. longituba</i>	-	-	-	(Polyxena)	2-POLYXENA	Group6
<i>L. paucifolia</i>	-	-	-	(Polyxena)	2-POLYXENA	Group6
<i>L. unifolia</i>	Chloriza	Unifolia	1f	Group5	Juncifolia	Group4
<i>L. juncifolia</i>	Chloriza	Unifolia	2d	Group4	Juncifolia	Group4
<i>L. zeyheri</i>	Chloriza	Unicolor	1e	Group5	Juncifolia	Group4
<i>L. bachmannii</i>	Chloriza	Unicolor	1d	Group5	1-Pallida	Group2
<i>L. liliflora</i>	Orchiops	Unicolor	1e	Group5	1-Pallida	Group2
<i>L. carnosia</i>	Chloriza	Unicolor	1a	-	1-Pallida	Group2
<i>L. contaminata</i>	Chloriza	Unicolor	1d	Group1	1-Pallida	Group2
<i>L. namaquensis</i>	-	Unicolor	1a	-	1-Pallida	Group2
<i>L. splendida</i>	-	Unicolor	2a	Group4	1-Pallida	Group2
<i>L. pustulata</i>	Chloriza	Unicolor	2d	Group5	1-Pallida	Group2
<i>L. purpureocoerulea</i>	Chloriza	-	2c	Group4	1-Pallida	Group2
<i>L. unicolor</i>	Chloriza	Unicolor	2d	Group4	1-Pallida	Group2
<i>L. pallida</i>	Chloriza	Unicolor	1e	Group5	1-Pallida	Group2
<i>L. muirii</i>	-	-	1a	Group2	1-Mathewsii	Group1
<i>L. pusilla</i>	Brachyscypha	Pusilla	2c	Group1	1-Pallida	Group1
<i>L. algoensis</i>	-	Aloides	1d	Group3	1-Mathewsii	Group1
<i>L. aloides</i> var. <i>aloides</i>	Eulachenalia	Aloides	1f	Group3	1-Mathewsii	Group1
<i>L. aloides</i> var. <i>aurea</i>	-	Aloides	1f	-	1-Mathewsii	Group1
<i>L. aloides</i> var. <i>quadricolor</i>	-	Aloides	1f	-	1-Mathewsii	Group1
<i>L. aloides</i> var. <i>vanzyllae</i>	-	Aloides	1f	-	1-Mathewsii	Group1
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	-	Aloides	-	-	1-Mathewsii?	Group1
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	-	-	-	-	1-Mathewsii?	Group1
<i>L. arbutnotiae</i>	-	Orchioides	1a	Group2	1-Elegans	Group1
<i>L. longibracteata</i>	-	Orchioides	1b	Group2 or 5	-	Group1
<i>L. orchioides</i> var. <i>orchioides</i>	Orchiops	Orchioides	1a	Group2	1-Mathewsii	Group1
<i>L. orchioides</i> var. <i>glaucina</i>	Orchiops	Aloides	1a	-	1-Mathewsii	Group1
<i>L. peersii</i>	-	-	1f	Group5	1-Mathewsii	Group1
<i>L. reflexa</i>	Coelanthus	Aloides	1d	Group3	1-Mathewsii	Group1
<i>L. variegata</i>	-	-	1b	Group2	1-Bulbifera	Group1
<i>L. viridiflora</i>	-	Aloides	1e	Group3	1-Mathewsii	Group1
<i>L. bulbifera</i>	Eulachenalia	Aloides	1f	Group3	1-Bulbifera	Group1
<i>L. rubida</i>	Eulachenalia	Aloides	1e	Group3	1-?	Group1
<i>L. mutabilis</i>	-	Orchioides	1a	Group2	1-Mathewsii	Group1
<i>L. rosea</i>	Chloriza	Orchioides	1f	Group5	1-Elegans	Group1

Fig. 12. The comparison between the consensus tree based on ITS sequence data and information from the karyomorphological observations and the previous classification systems of *Lachenalia*.

* Refer to Fig.7.

第3章 分子細胞遺伝学的研究:DAPI 染色および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)

核形態学的研究(核型分析)と分子系統学的研究(系統解析)の結果, 系統解析により得られた系統樹の Clade I が染色体数 $2n = 26$ と $2n = 28$ の種から構成されていること, 染色体基本数 $x = 8$ を示す種が多く含まれている Clade IV の中に $x = 7$ を示す種が含まれていること, $x = 7$ の染色体基本数を示す種群の相互の類縁関係が核型分析と系統解析の両方の手法によっても解明されないことといった問題点が残った。また, 過去に行われた分類法による結果と比較しても十分な解決に至らなかった。そこで, これらの問題を解決するために, 鍵となり得る系統を抽出し, DAPI 染色および FISH を行って体細胞分裂中期染色体を調査し, 別の角度から分析を行った。DAPI は DNA の特にアデニン (A), チミン (T) に富んだ領域に優先的に結合するため, 染色体上で他と比べて A, T 含量の多い領域が DAPI バンドとして評価される。5S rDNA, 18S rDNA はそれぞれ nrDNA の特定の領域で, 塩基配列が種を超えて比較的安定しており, FISH 法によりそれぞれのプローブを結合させシグナルとして可視化することにより染色体上の存在位置を特定できる。DAPI バンドや FISH のシグナルの位置を比較することにより, 染色体の構造の類似性を推定することができる。

材料および方法

DAPI 染色および FISH 法での観察には, Table 4 に示した 20 種 2 変種を用いた。

核型分析と同様の方法で前処理を行った後, -20°C の酢酸アルコール (酢酸:エタノール = 1:3) 液で一日固定した。その後, -20°C の 70%エタノールで数日間維持し, 酵素解離に備えた。解離は, 3%のセルラーゼ, 0.5%のペクトリアーゼを含む 37°C の水溶液内で 60 分間行った。その後, 試料をスライドガラス上に移し, 45%酢酸を微量加えて押しつぶしを行った。

5S rDNA および 18S rDNA のプローブは *Cucumis sativus* 'Borszagowski' の全ゲノム DNA から PCR により得た。5S rDNA プローブは Hizume (1993) の方法に従い, 18S rDNA プローブは Sogin (1990) の方法に従い増幅した。FISH のため, 5S rDNA プローブは dNTP 混合液 (0.2 mM dATP, dGTP, dCTP, 0.1 mM

dTTP, 0.1 mM Tetramethylrhodamine-5-dUTP (Roche)) を用い, 18S rDNA プローブは BioNick labeling system (Invitrogen) を用いて標識化した。

FISH 法は, Malinowski *et al.* (2004) の方法を参照した。なお, *Lachenalia* の染色体はフォルムアミドを用いた熱変性の際に崩壊しやすかったため, 処理濃度, 温度, 時間を修正した。押しつぶしを行なった後カバーガラスを除去した試料に $100\mu\text{g/ml}$ の RNA 分解酵素 (RNase) を含む水溶液を滴下し, パラフィルムをかぶせ, 保湿容器内にて 37°C で 60 分間維持した。続いて, プレパラートを 2 倍量の塩化ナトリウム・クエン酸混合液 ($2 \times \text{SSC}$, pH 7.0) に室温下で 10 分間, 室温のリン酸塩緩衝溶液 (Phosphate Buffered Salts: PBS) で 10 分間浸漬した。室温の 4%パラフォルムアルデヒド (PBS 溶液) で 10 分間浸漬し (タンパク質の固定), 68°C の 60%フォルムアミド ($2 \times \text{SSC}$ で希釈) で 60 秒間浸漬した (熱変性)。 -20°C の 70%エタノール, 100%エタノールに順に 10 分ずつ浸漬し, その後風乾した。

10%のデキストラン硫酸ナトリウム及び 50%のフォルムアミド ($2 \times \text{SSC}$ で希釈) に 5S rDNA, 18S rDNA のプローブを加えたものをプレパラートに滴下し, カバーガラスをかぶせ, ペーパーボンドで封入した後 73°C で 5 分間過熱し, その後 37°C で 1 晩維持した。

引き続きカバーガラスを除去後, 42°C の $4 \times \text{SSC}$ に 10 分間浸漬を 2 回繰り返し, 室温の $2 \times \text{SSC}$ (Triton X を 0.2% 混合) に 10 分間浸漬した。ブロッキング液 ($2 \times \text{SSC}$ 中, 2%ウシ血清アルブミン [Bovine Serum Albumin: BSA] と 0.5% Blocking Reagent 混合) を滴下し, パラフィルムをかぶせ, 保湿容器内にて 37°C で 45 分間維持後, 1:200 の Alexa F488:ブロッキング液を滴下し, 再びパラフィルムをかぶせ, 保湿容器内にて 37°C の暗所で 1~2 時間維持した。

その後, 暗所にて室温の $2 \times \text{SSC}$ (Triton X を 0.2% 混合) で 10 分間浸漬を 2 反復, 室温の $2 \times \text{SSC}$ で 5 分間, 室温の DW で 5 分間, 30%, 70%, 100%のエタノールに順に 5 分間ずつ浸漬後, 暗所にて風乾し, 最後に 5% DAPI を含むベクタシールドを滴下してカバーガラスで封入した。

プレパラートの観察は蛍光顕微鏡を用いて, 体細胞分裂中期について行い, UV-1A, B-2A, G-2A のフィ

Table 4. The materials used in the research using DAPI staining and FISH

Species and variety	Chromosome number (2n)	Number of FISH signals	
		5S rDNA	18S rDNA
<i>Lachenalia</i>			
<i>aloides</i> (L.f.) Engl. var. <i>aloides</i>	14	2	2
<i>aloides</i> var. <i>aurea</i> (L.f.) Engl.	14	2	2
<i>aloides</i> var. <i>vanzyliae</i> W.F.Barker	28	4	4
<i>carnosa</i> Bak.	16	2	2
<i>hirta</i> (Thunb.) Thunb.	22	2	4
<i>juncifolia</i> Bak.	22	2	2
<i>latimerae</i> W.F.Barker	18	2	4
<i>liliflora</i> Jacq.	16	2	2
<i>longibracteata</i> Phillips	14	2	2
<i>longituba</i>	28	2	2
(A.M. van der Merwe) J.C.Manning & Goldblatt			
<i>muirii</i> W.F.Barker	14	4	2
<i>mutabilis</i> Sweet.	14	2	6
<i>namaquensis</i> Schltr. ex W.F.Barker	16	2	2
<i>orchioides</i> (L.) Ait. var. <i>orchioides</i>	28	4	6
<i>paucifolia</i> (W.F.Barker) J.C.Manning & Goldblatt	26	2	2
<i>pusilla</i> Jacq.	14	2	2
<i>rubida</i> Jacq.	14	2	2
<i>splendida</i> Diels	16	2	2
<i>unicolor</i> Jacq.	16	2	2
<i>variegata</i> W.F.Barker	14	2	2
<i>viridiflora</i> W.F.Barker	14	2	4
<i>zeyheri</i> Bak.	23	2	2

ルターを通して撮影した画像を Adobe Photoshop Elements 2.0 を用いて加工した。

結果および考察

Lachenalia に対して DAPI 染色, FISH が行なわれた報告はこれまでになく, 本報が初である。

DAPI 染色による比較

調査した 20 種 2 変種の体細胞分裂の分裂期中期の染色体を相同染色体の組合せを考慮しながら大きい順に並べたものを Fig. 13 に示した。また, 計測された染色体数を Table 4 に示した。

染色体数は $2n = 14, 16, 18, 22, 23, 26, 28$ が算定されたが, 酢酸オルセイン染色押しつぶし法による観察結果 (Table 2) と矛盾するものはなかった。

DAPI バンドの発現状況についていくつかのパターンが観察された。

$2n = 14$ を有するもののうち, *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. longibracteata*, *L. muirii*, *L. variegata*, *L. viridiflora* の 5 種 1 変種では最大の 2 個の染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されず, その他の 12 個の染色体上に DAPI バンドが検出された。 *L. mutabilis*, *L. rubida* では 14 個全ての染色体上に DAPI バンドが検出された。 *L. pusilla* では 14 個全ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されなかった。

$2n = 16$ を有する, *L. carcosa*, *L. liliflora*, *L. namaquensis*, *L. splendida*, *L. unicolor* の 5 種は全てにおいて最少の 2 個の染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されず, その他の 14 個の染色体上に DAPI バンドが検出された。 $2n = 18$ を有する *L. latimeriae* は, 18 個全

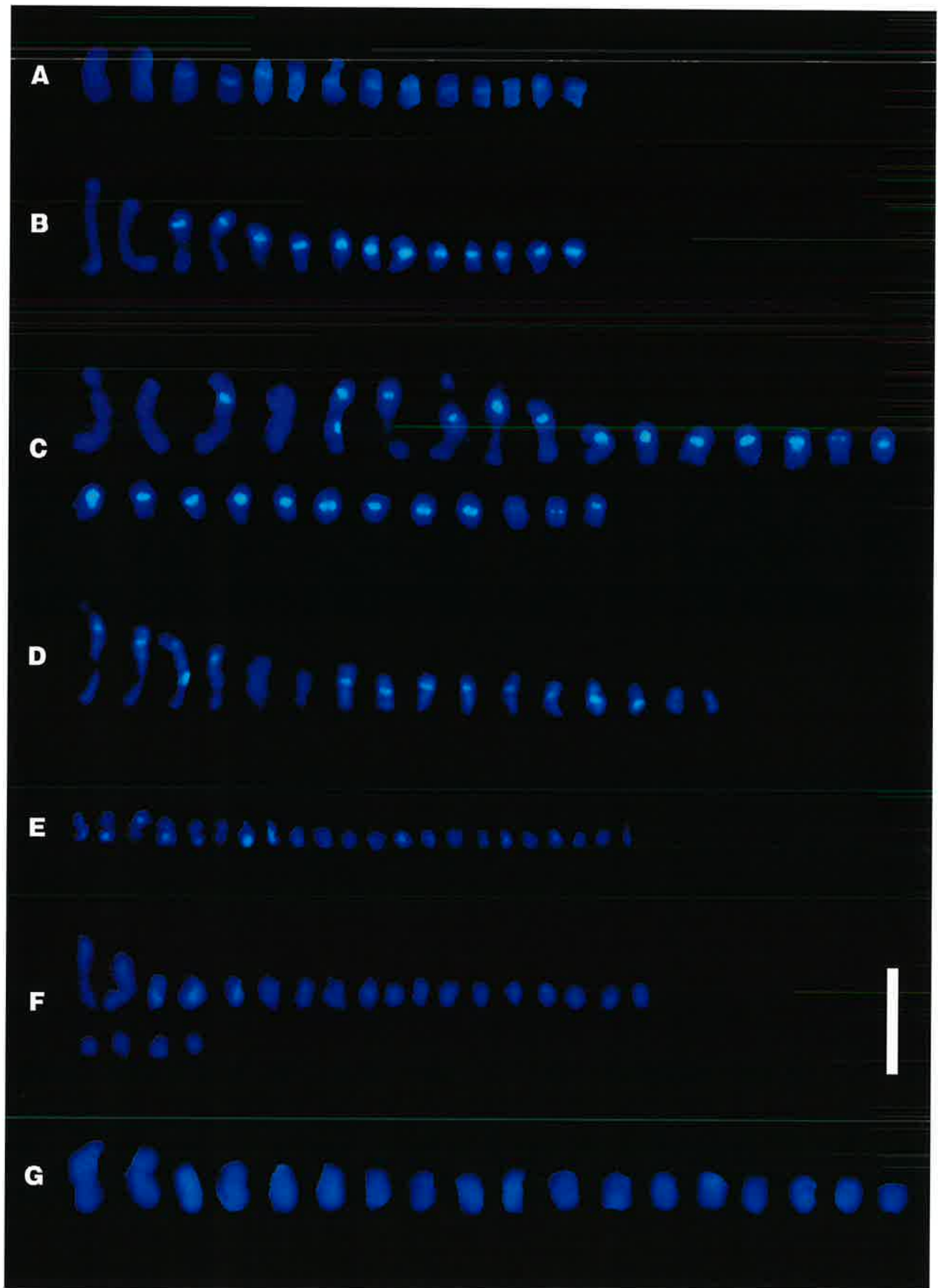


Fig. 13. Mitotic metaphase of somatic chromosomes of *Lachenalia* stained by DAPI.
 A: *Lachenalia aloides* var. *aloides*, B: *L. aloides* var. *aurea*, C: *L. aloides* var. *vanzyliae*, D: *L. carnosa*, E: *L. hirta*, F: *juncifolia*, G: *L. latimeriae*. Bar indicates 10 μm.

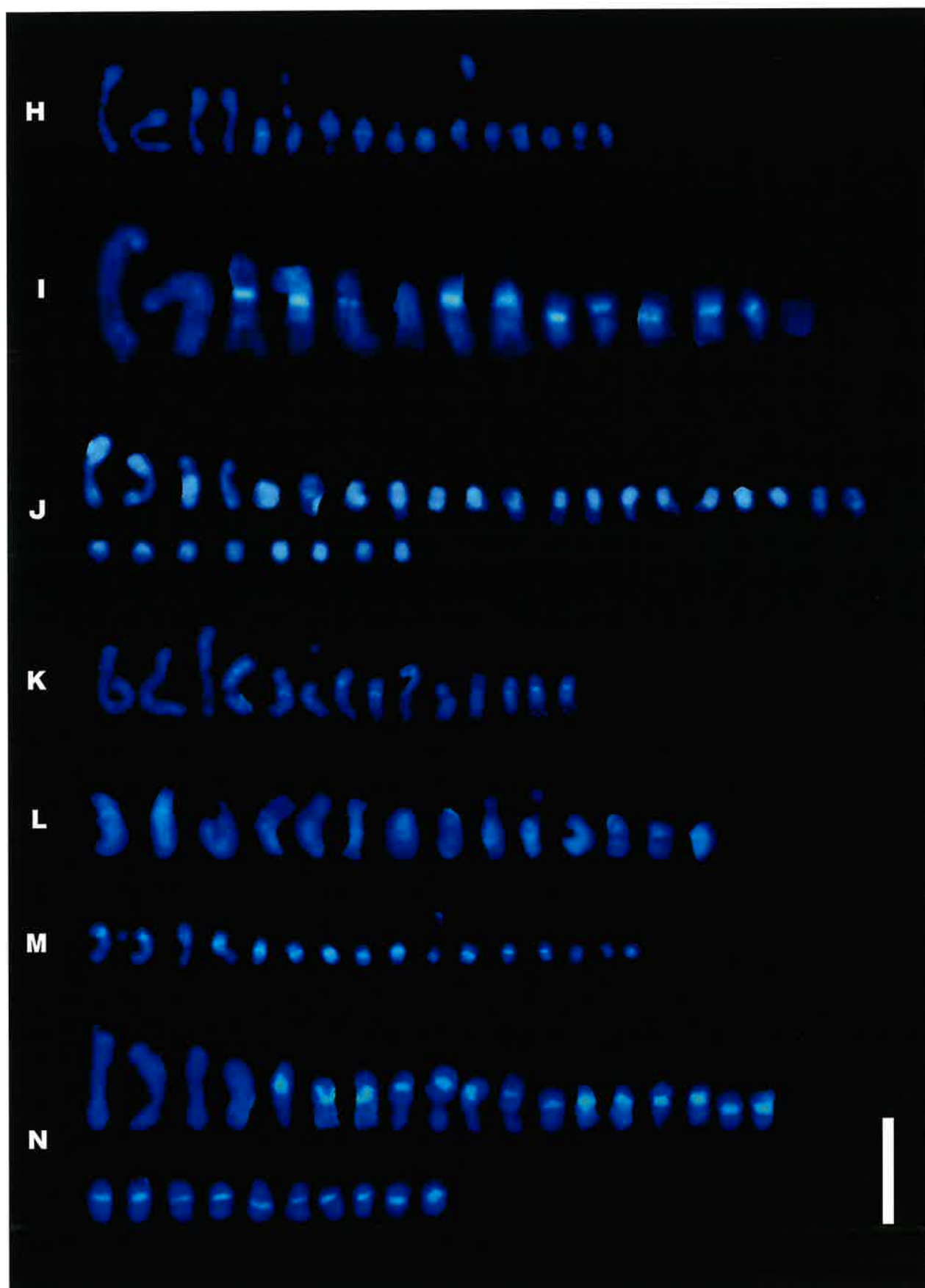


Fig. 13. Continued.

H: *L. liliflora*, I: *L. longibracteata*, J: *L. longituba*, K: *L. muirii*, L: *L. mutabilis*, M: *L. namaquensis*, N: *L. orchoides* var. *orchoides*. Bar indicates 10 μ m.



Fig. 13. Continued.

O: *L. paucifolia*, P: *L. pusilla*, Q: *L. rubida*, R: *L. splendida*, S: *L. unicolor*, T: *L. variegata*, U: *L. viridiflora*, V: *L. zeyheri*.
Bar indicates 10 μ m.

ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されなかった。2n = 22 を有する *L. hirta*, *L. juncifolia* では、22 個全ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されなかった。2n = 23 を有する *L. zeyheri* では 23 個全ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されなかった。2n = 26 を有する *L. paucifolia* では、全ての染色体上に DAPI バンドが検出された。2n = 28 を有するもののうち、*L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. orchioides* var. *orchioides* では最大の 4 個の染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されず、その他の 24 個の染色体上には DAPI バンドが検出された。*L. longituba* では、全ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されなかった。

FISH による比較

DAPI により染められた染色体像に、5S rDNA のプローブおよび 18S rDNA のプローブで標識化した画像を合成したものを、Fig. 14 に示した。5S rDNA の存在領域は赤のシグナルで、18S rDNA の存在領域は黄緑のシグナルで示されている。また、検出された 5S rDNA および 18S rDNA のシグナルの箇所数を Table 4 に示した。

5S rDNA のシグナルは、サンプルにより 2 箇所あるいは 4 箇所に検出された。2 箇所にシグナルが検出されたものは *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. longibracteata*, *L. mutabilis*, *L. pusilla*, *L. rubida*, *L. variegata*, *L. viridiflora* (以上 2n = 14), *L. carnsosa*, *L. liliflora*, *L. namaquensis*, *L. splendida*, *L. unicolor* (以上 2n = 16), *L. latimerae* (2n = 18), *L. hirta*, *L. juncifolia* (以上 2n = 22), *L. zeyheri* (2n = 23), *L. paucifolia* (2n = 26), *L. longituba* (2n = 28) であった。4 箇所に検出されたものは *L. muirii* (2n = 14), *L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. orchioides* var. *orchioides* (2n = 28) であった。

18S rDNA のシグナルは、サンプルにより 2 箇所、4 箇所、あるいは 6 箇所に検出された。2 箇所にシグナルが検出されたものは *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. longibracteata*, *L. muirii*, *L. pusilla*, *L. rubida*, *L. variegata* (以上 2n = 14), *L. carnsosa*, *L. liliflora*, *L. namaquensis*, *L. splendida*, *L. unicolor* (以上 2n = 16), *L. juncifolia* (2n = 22), *L. zeyheri* (2n = 23), *L. paucifolia* (2n = 26), *L. longituba* (2n = 28) であった。4 箇所に検出されたものは *L. viridiflora* (2n = 14), *L. latimerae* (2n = 18), *L. hirta* (2n = 22), *L. aloides* var. *vanzyliae* (2n =

28), 6 箇所に検出されたものは *L. mutabilis* (2n = 14), *L. orchioides* var. *orchioides* (2n = 28) であった。

イデオグラムの比較

DAPI 染色による *Lachenalia* の染色体像は鮮明とはいえず、これだけで狭窄部位を特定することは容易ではなかった。*L. namaquensis* と *L. splendida* の 2 種について、DAPI 染色を行った染色体像と酢酸オルセイン染色を行った染色体像を比較したところ (Fig. 15), DAPI バンドの位置と動原体の位置がわずかにずれているものが多く観察された。Fig. 16 は Fig. 13 と Fig. 14 の情報をもとに作成したイデオグラムであるが、動原体や二次狭窄の位置は酢酸オルセイン染色で得られた核型 (Fig. 7) を参考にしながら、DAPI 染色による染色体像の微妙なくびれや明暗を根拠に推定した。

2n = 14 のもののうち、*L. muirii*, *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. longibracteata*, *L. variegata*, *L. viridiflora* の 6 系統は最大の 2 個を除く 12 個の染色体 (No. 3 ~ No. 14) に DAPI バンドが検出され、かつ最大の 2 個の染色体の短腕端部に 5S rDNA の存在箇所が示されたという点において共通する特徴を示した。これらのうち、*L. muirii* を除く 5 系統は DAPI バンドを示した中で最大の 2 個の染色体 (No. 3, 4) の短腕介在部 (二次狭窄部位と思われる) に 18S rDNA のシグナルが検出されたという点において共通する特徴を示した。しかし、*L. viridiflora* は DAPI バンドを示した別の 2 個の大型染色体 (No. 5, 6) の短腕端部にも 18S rDNA のシグナルが検出されたという点において他の 4 系統と異なっていた。*L. muirii* では 5S rDNA のシグナルが 2 個の中型染色体 (No. 9, 10) の動原体付近にも検出された点、5S rDNA のシグナルが検出された 2 個の染色体の動原体付近に 18S rDNA のシグナルが検出された点において *L. aloides* var. *aloides* 以下の 5 系統と異なっていた。

L. mutabilis, *L. rubida* の 2 種は 14 個全ての染色体に DAPI バンドが検出されたが、DAPI バンドと動原体との位置関係について、異なる点が見られた。すなわち、*L. mutabilis* では全ての DAPI バンドが動原体の近くに検出された。しかし、*L. rubida* では 2 個の最大の染色体 (No. 1, 2) と 2 個の小型染色体 (No. 11, 12) の 4 個では DAPI バンドと動原体が離れていたが、その他の 10 個の染色体では DAPI バンドが動原体の近くに検出された。5S rDNA のシグナル

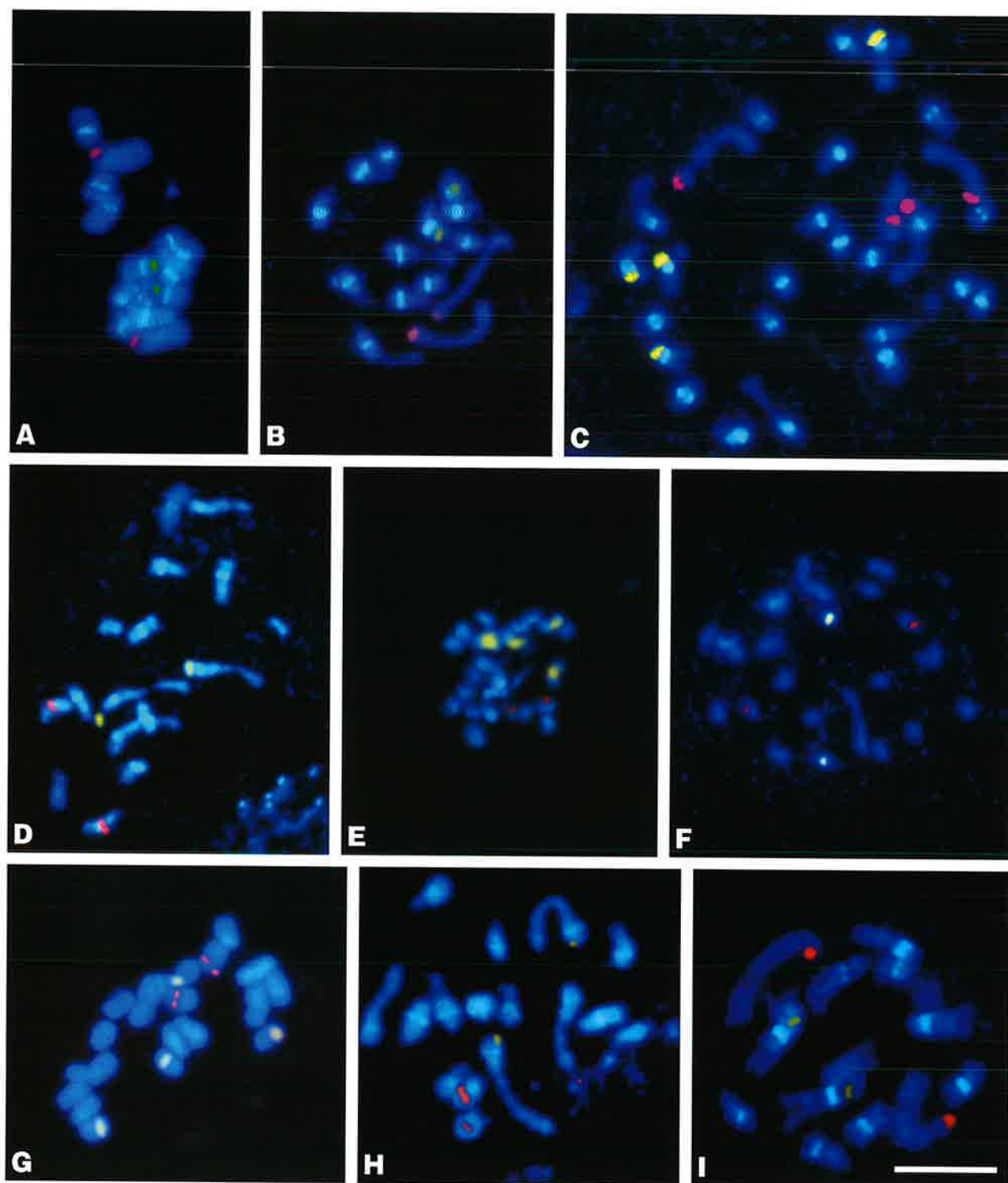


Fig. 14. FISH signals of 5S rDNA and 18S rDNA sites of the metaphase on somatic chromosomes in *Lachenalia* studied. 5S rDNA probed were labeled by tetramethylrhodamine and 18S rDNA probes were labeled by biotin. Biotin-labeled signals were detected with Alexa F488. Blue areas were stained by DAPI, red signals were hybridized with 5S rDNA and yellow signals were hybridized with 18S rDNA.

A: *Lachenalia aloides* var. *aloides*, B: *L. aloides* var. *aurea*, C: *L. aloides* var. *vanzyliae*, D: *L. carnosa*, E: *L. hirta*, F: *L. juncifolia*, G: *L. latimeriae*, H: *L. liliflora*, I: *L. longibracteata*. Bar indicates 10 μ m.

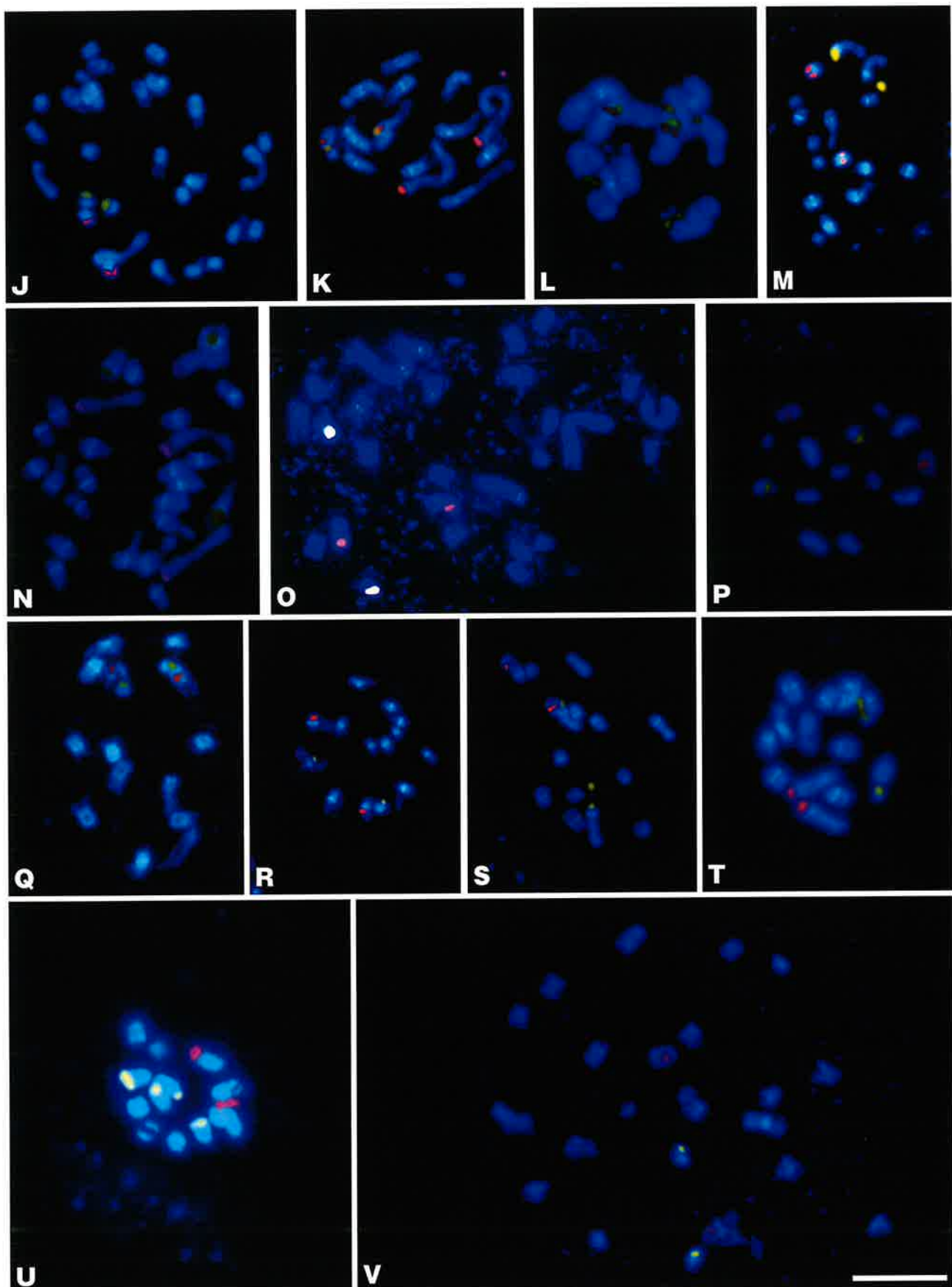


Fig. 14. Continued.

J: *L. longituba*, K: *L. muiirii*, L: *L. mutabilis*, M: *L. namaquensis*, N: *L. orchiooides* var. *orchiooides*, O: *L. paucifolia*, P: *L. pusilla*, Q: *L. rubida*, R: *L. splendida*, S: *L. unicolor*, T: *L. variegata*, U: *L. viridiflora*, V: *L. zeyheri*. Bar indicates 10 μ m.

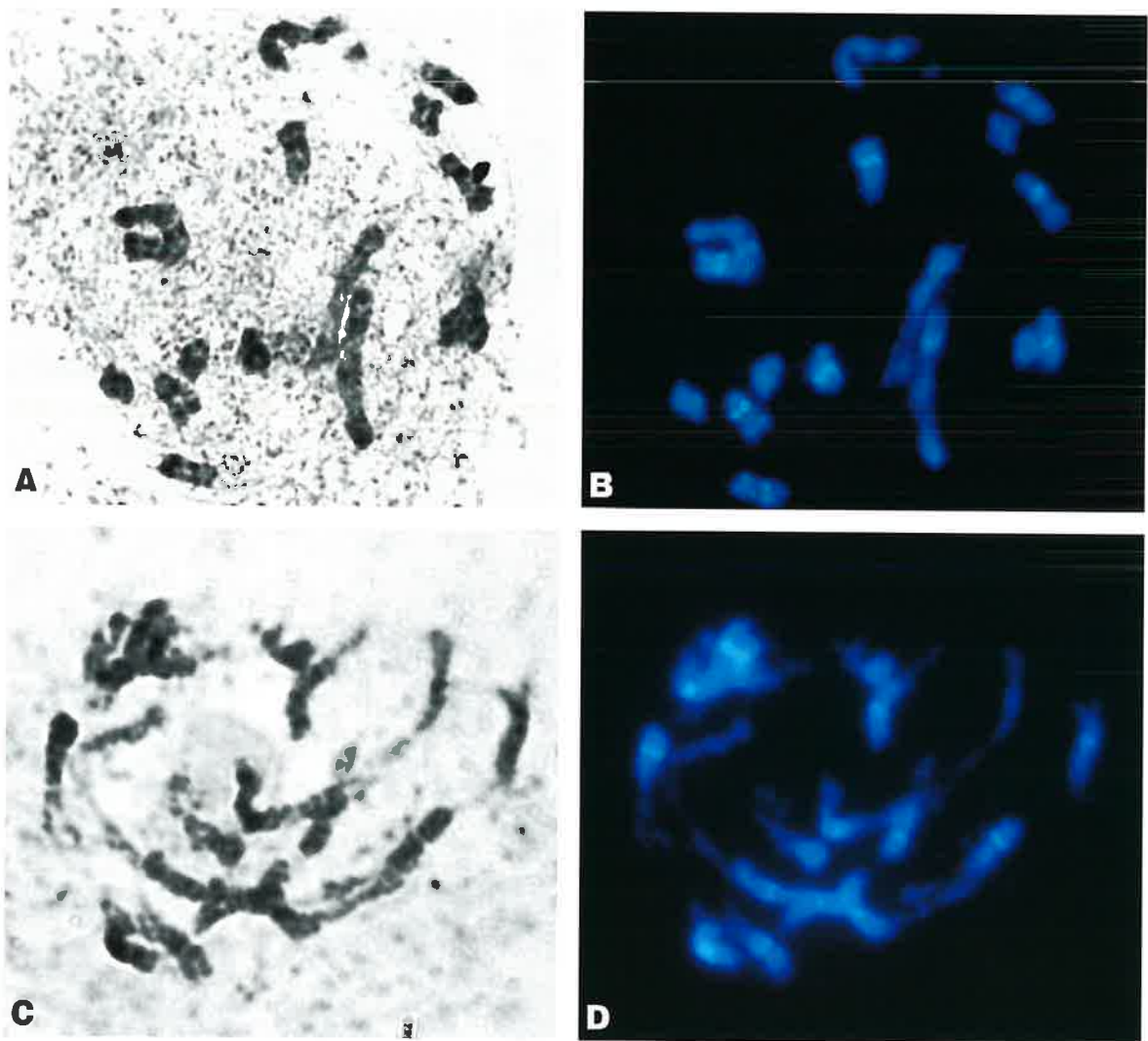


Fig. 15. Mitotic metaphase of somatic chromosomes of *Lachenalia* stained by aceto-orcein and DAPI. A: *L. namaquensis* stained by aceto-orcein, B: *L. namaquensis* stained by DAPI, C: *L. splendida* stained by aceto-orcein, D: *L. splendida* stained by DAPI.

は *L. mutabilis* では 2 個の最大の染色体の動原体付近に, *L. rubida* では 2 個の最大の染色体の長腕介在部に現れ, いずれも DAPI バンドの近くに検出された. 18S rDNA のシグナルは *L. mutabilis* では 2 個の最大の染色体の動原体付近に 1 箇所ずつ現れた. そのうちの 1 個の染色体の短腕端部にさらに 1 箇所, 別の 2 個の大型染色体 (No. 3, 4) の短腕端部に 1 箇所ずつ, さらに 1 個の小型染色体 (No. 5) の短腕端部に 1 箇所の, 計 6 箇所に検出された. また, *L. rubida* では最大の 2 個の染色体の動原体付近に 18S rDNA のシグナルが検出された. *L. mutabilis* の No. 3, 4 染色体の 18S rDNA シグナルの位置は, *L. aloides* var. *aloides* から *L. viridiflora* の 5 系統の No. 3, 4 染色体と類似していた.

L. pusilla では 14 個全ての染色体に明瞭な DAPI

バンドが検出されなかった. この点において他の $2n = 14$ の種群と異なっていた. 5S rDNA のシグナルは 2 個の中型染色体 (No. 5, 6) の動原体付近に, 18S rDNA のシグナルはそれらとは異なる 2 個の中型染色体 (No. 7, 8) の動原体付近に検出された.

$2n = 16$ の 5 種は, DAPI バンドの検出のされ方, 5S rDNA のシグナルが DAPI バンドを示す 2 個の小型染色体 (No. 11, 12) の動原体付近に観察されること, 18S rDNA のシグナルが 2 個の最大染色体の付随体上または短腕端部に観察されるという点で互いに類似していた. 酢酸オルセイン染色による観察では, $x = 8$ を示した系統の多くにおいて大型染色体の短腕側に付随体が観察されたものの, 明瞭でない系統もいくつか存在した. FISH による観察では, 調査した全ての $2n = 16$ ($x = 8$) の系統で同様に 2

個の最大染色体の短腕端部付近に 18S rDNA のシグナルが発現しており、酢酸オルセイン染色では確認できなかった系統においても同様に付随体が存在していることが示唆された。

明瞭な DAPI バンドが検出されなかった $2n = 18$ の *L. latimerae* では 5S rDNA のシグナルが 2 個の小型染色体 (No. 11, 12) の動原体付近、18S rDNA のシグナルが 4 個の小型染色体 (No. 15 ~ 18) の動原体付近から短腕介在部付近に検出された。

$2n = 22$ の *L. hirta*, *L. juncifolia* と $2n = 23$ の *L. zeyheri* の 2 種はいずれも明瞭な DAPI バンドが検出されなかった点において共通していた。*L. juncifolia* では、5S rDNA のシグナルは 2 個の中型染色体 (No. 13, 14) の動原体付近、18S rDNA のシグナルはそれよりも少し大きい 2 個の染色体 (No. 9, 10) の動原体付近に、*L. zeyheri* では 5S rDNA のシグナルが 2 個の中型染色体 (No. 5, 6) の動原体付近、18S rDNA のシグナルがそれよりも少し小さい 2 個の染色体 (No. 9, 10) の動原体付近に検出された。シグナルを持つ染色体の染色体番号は異なり、同一核板内の他の染色体との相対的な大きさは異なったが、両種間において同じ種類のシグナルを持つ染色体同士の様子はそれぞれ類似していた。*L. hirta* は 2 個の染色体 (No. 15, 16) の動原体付近に 5S rDNA のシグナルを示す点で *L. juncifolia* や *L. zeyheri* などと類似していた。一方、4 個の染色体 (No. 3 ~ 6) の動原体付近に 18S rDNA のシグナルを示した点は、シグナルの数、染色体上の位置について *L. latimerae* と類似して見えるように見えた。

すべての染色体に DAPI バンドを示した $2n = 26$ の *L. paucifolia* は、2 個の中型染色体 (No. 7, 8) の長腕介在部に 5S rDNA のシグナルを示し、それよりも少し小さい 2 個の染色体 (No. 15, 16) の長腕介在部に 18S rDNA のシグナルを示した。

$2n = 28$ を有するもののうち、すべての染色体に明瞭な DAPI バンドが検出されなかった *L. longituba* は、2 個の小型染色体 (No. 17, 18) の端部付近に 5S rDNA のシグナルを示し、それよりも少し小さい 2 個の染色体 (No. 21, 22) の端部付近に 18S rDNA のシグナルを示した。*L. aloides* var. *vanzyliae* と *L. orchioides* var. *orchioides* では 4 個の最大染色体を除く 24 個の染色体に DAPI バンドが見られ、4 個の最大染色体の短腕端部に 5S rDNA のシグナルが検出されるという共通点があった。18S rDNA のシグナルについては、*L. aloides* var. *vanzyliae*

では 4 個の中型染色体 (No. 9 ~ 12) の短腕介在部 (二次狭窄部位と思われる) に、*L. orchioides* var. *orchioides* では DAPI バンドを持つ染色体の中では 2 個の大型染色体 (No. 5, 6) の動原体付近と 4 個の中型染色体 (No. 9 ~ 12) の短腕端部付近に検出された。*L. longituba* は 5S rDNA および 18S rDNA のシグナルの数が 2 箇所ずつだったことから、二倍体であると判断された。また、*L. aloides* var. *vanzyliae* では 5S rDNA、18S rDNA のシグナルは 4 箇所ずつに検出され、そのシグナルの現れる位置が安定していることから四倍体であることが裏付けられた。一方、*L. orchioides* var. *orchioides* では 5S rDNA のシグナルが 4 箇所に検出されたのに対し、18S rDNA のシグナルが 6 箇所に検出され、4 個の染色体と 2 個の染色体上でシグナルの位置がそれぞれ類似していたことから $2x + 2x$ の異質四倍体的な特徴を示していると考えられた。

ITS 領域の比較による系統解析および酢酸オルセイン染色押しつぶし法による観察結果との間の比較

酢酸オルセイン染色で観察した際に $x = 7$ のグループ①として分けられた系統は、DAPI 染色および FISH を行った中には $2n = 14$ の 8 種 1 変種と $2n = 28$ の 1 種 1 変種が含まれていた。これらのうち、*L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. longibracteata*, *L. muirii*, *L. orchioides* var. *orchioides*, *L. variegata*, *L. viridiflora* の 5 種 2 変種は明瞭な DAPI バンドが $2n = 14$ の系統では 2 個の最大染色体、 $2n = 28$ の系統では 4 個の最大染色体を除く染色体の動原体付近に検出されること、5S rDNA のシグナルが DAPI バンドを示さない染色体の短腕端部に観察されることにおいて類似した特徴を示した。この特徴は酢酸オルセイン染色による観察結果で分けられたほかの分類群には観察されず、 $x = 7$ の系統にみられる特徴の一つと考えられた。その一方で、酢酸オルセイン染色による観察結果では *L. aloides* var. *aloides* は $2L+12S$ の二相的な形状を、*L. aloides* var. *aurea* は $2L+8M+4S$ の三相的な形状を、*L. aloides* var. *vanzyliae* は勾配的または $12L+16S$ の二相的な形状を、*L. longibracteata* は $6L+8S$ の二相的または勾配的な形状を、*L. muirii* は $2L+12S$ の二相的または $2L+4M+8S$ の三相的な形状を、*L. orchioides* var. *orchioides* は勾配的または $7L+21S$ の二相的な形状を、*L. variegata* は勾配的な形状を、*L. viridiflora* は $6L+8S$ の二相的な形状を示

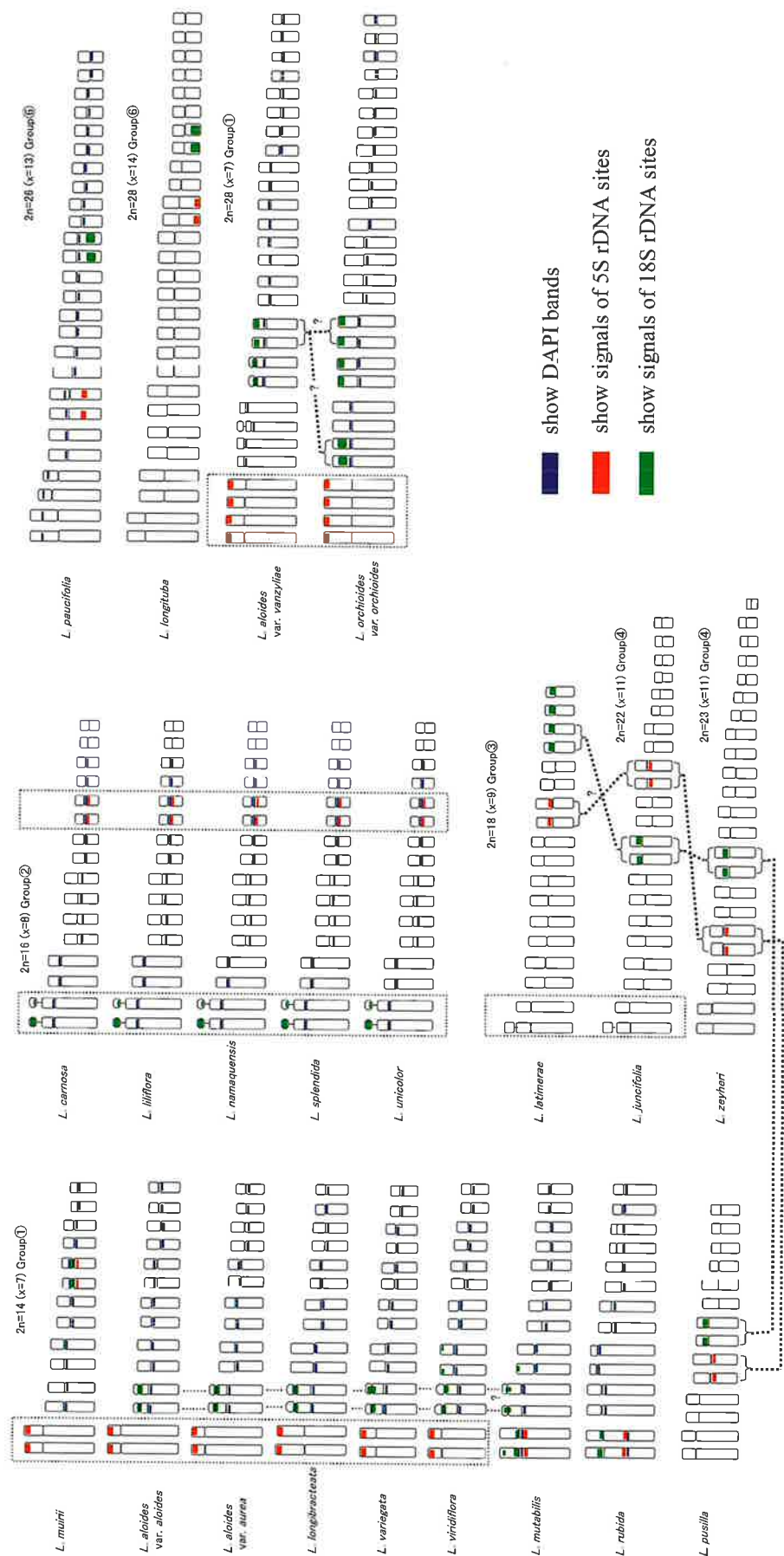


Fig. 16. The idiograms of somatic metaphase chromosomes with DAPI bands, signals of 5S rDNA and 18S rDNA sites in 19 species and two varieties of *Lachenalia* studied. Group Nos. are referred from Fig. 7.

し、変化に富んでおり、染色体長による表現型の違いによる分類を類縁性の判断に当てはめるのは難しいことが示された。

また、この5種2変種の中で *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. longibracteata*, *L. variegata*, *L. viridiflora* は類似した位置 ($2n = 14$ の種群においては DAPI バンドを示す2個の大型染色体の短腕介在部と、 $2n = 28$ の種群においては DAPI バンドを示す4個の大型染色体の短腕介在部) に 18S rDNA のシグナルを示すという共通点があった。一方で、*L. muirii* はこれらとは異なる位置に 18S rDNA のシグナルを示し、*L. viridiflora* はこの2個とは別にさらに2個の 18S rDNA のシグナルを示す染色体が存在し、これらのことは染色体の組み換えや交雑の痕跡と考えられた。*L. orchioideis* var. *orchioideis* では 18S rDNA のシグナルを持つ6個のうち2個の染色体は *L. aloides* var. *aloides* などの相当する染色体と類似した形状を示したが、この2個に対応すると考えられる別の2個の染色体には 18S rDNA のシグナルが存在せず、交雑の痕跡である可能性が示された。

L. mutabilis, *L. rubida* の2種は最大の2個を含め全ての染色体に明瞭な DAPI バンドが観察される点、5S rDNA のシグナルが最大の2個の染色体の短腕端部以外のところに観察される点、最大の2個の染色体上に 18S rDNA のシグナルが観察される点において前述の5種2変種とは異なる特徴を示した。その一方で、18S rDNA のシグナルを示す *L. mutabilis* の第3, 4染色体と *L. aloides* var. *aloides* などの第3, 4染色体が類似していることはこれらの間に共通性がある可能性を示したし、*L. mutabilis* と *L. rubida* の最大の2個の染色体の短腕上の 18S rDNA の位置が類似していることは、これらの間に共通性がある可能性を示した。

L. pusilla は明瞭な DAPI バンドが観察されなかった点、5S rDNA および 18S rDNA のシグナルの位置がグループ①の他の系統と大きく異なり、極めて異質だった。

ここで注目した $x = 7$ の基本数を示す9種2変種のうち、*L. muirii* と *L. pusilla* 以外の系統は ITS 領域の比較による系統解析において Clade III の中で Clade IV に含まれない「Others」という形でお互いの多様性が示されていたが、DAPI 染色および FISH を行うことにより、その中にもより類似したものがあるとともに、異なるいくつかの祖先種に由来する

と考えられる特徴が混在することが示された。これらが複雑に交雑しあうなどしながら種分化が行われてきたことが考えられ、その結果が ITS 領域の比較における「多様性」という結果にも反映されたということが推測される。*L. muirii* と *L. pusilla* が Clade III に含まれたことについては、次の酢酸オルセイン染色による観察のグループ②との比較の中で考察する。

酢酸オルセイン染色で観察した際に $x = 8$ のグループ②として分けられた系統は、DAPI 染色および FISH を行った中には $2n = 16$ の5種が含まれていた。これらは DAPI バンド、5S rDNA および 18S rDNA のシグナルの位置について高い類似性を示した。これらは ITS 領域の比較においても高い類似性を示しており、 $x = 8$ の基本数を持つ種群が遺伝的に高いまとまりを持っていることが確認された。

ITS 領域の比較では $x = 8$ の種群に加え、 $x = 7$ の *L. muirii* と *L. pusilla* も同じ Clade III に含まれていた。このうち、*L. muirii* は最大の2個の染色体の特徴がグループ①の *L. aloides* var. *aloides* などと類似していたが、5S rDNA のシグナルが最大の2個の染色体のほかに中くらいの大きさの2個の染色体 (No. 9, 10) の動原体付近にも存在するという違いがあった。 $x = 8$ の種群を観察してみると、2個の小さな染色体 (No. 11, 12) の動原体付近に 5S rDNA のシグナルが観察された。*L. muirii* の第9, 10染色体にはさらに 18S rDNA のシグナルも存在するが、5S rDNA のシグナルに関してみれば $x = 8$ の種群の第11, 12染色体との間に類似する部分があり、共通の要素を持っている可能性が示唆された (Fig. 17)。Kleynhans et al. (2009) によると、 $x = 8$ の系統と $x = 7$ の系統との間で実験的に結実させることに成功している。*L. pusilla* については、基本数 $x = 7$ を持つ種群だけでなく、 $x = 8$ を持つ種群とも明らかに異質であり、ITS 領域の比較結果と染色体の比較結果との間に違いが見られる例の一つである可能性が示された。

染色体基本数 $x = 9$ を示した *L. latimerae* (グループ③)、 $x = 11$ を示した *L. hirta*, *L. juncifolia* と *L. zeyheri* (グループ④) の間には DAPI 染色および FISH の結果にいくつかの類似点が観察された。4種ともに全ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが観察されなかった。2個の 5S rDNA のシグナル、2個の 18S rDNA のシグナルが、それぞれ中から小型の染色体の動原体付近に存在した。また、この特徴は、

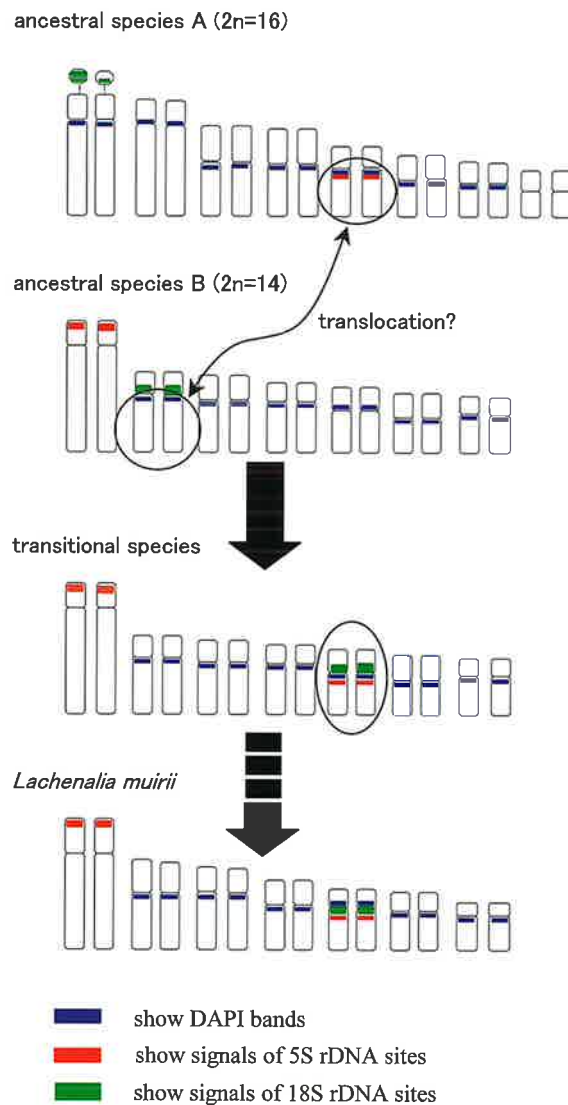


Fig. 17. A hypothesis of the process of chromosome specialization of *Lachenalia muiirii*.

$x = 7$ のグループの中で極めて異質であった *L. pusilla* にも見られる特徴であり、これら4種間の類縁性を示唆するものであった。*L. pusilla* は ITS 領域の比較では *L. carnosae* などの $x = 8$ の系統と同じ Clade IV に含まれ、Spies (2004) による *trnL-F* 領域の比較でも同様に $x = 8$ の taxa と同じ Clade に含まれているが、本種については染色体の質的な違いを考慮し、 $x = 7$ や 8 のグループとは一線を画すと判断するのが適当で、*L. latimerae* などと類縁性が高い可能性が示唆された。*L. juncifolia*, *L. latimerae*, *L. pusilla*, *L. zeyheri* の間には染色体数に違いがあるが、これらは、明瞭な DAPI バンドを示す種とは遺伝的な交流の痕跡を残さずに、染色体数の変化を伴いながら種分化が行われてきたことの結果であると考え

られる。あわせて、 $x = 11$ の *L. hirta* と $x = 12$ の *L. latifolia* に対し、DAPI 染色を行ったところ、いずれも全ての染色体上に明瞭な DAPI バンドが検出されず（データ省略）、*L. latimerae* や *L. juncifolia* と同様の特徴を持つことが示唆された。

L. longituba と *L. paucifolia* はいずれもかつて *Polyxena* (属) とされていた種で、ITS 領域の比較により得られた系統樹ではともに Clade I に含まれており、Spies (2004) による葉緑体 DNA の比較でも近縁性が示されていたが、染色体の観察では相違が見られた。酢酸オルセイン染色による観察において両種はグループ⑥に分類されたが、染色体数については *L. longituba* は $2n = 28$ 、*L. paucifolia* は $2n = 26$ と異なった。DAPI 染色の結果、*L. longituba* では

全ての染色体上に明瞭なバンドが観察されず、*L. paucifolia* では全ての染色体上にバンドが観察された。FISH のシグナルは 5S rDNA, 18S rDNA とともに 2 個ずつでいずれも二倍体である事が裏付けられたが、シグナルの位置が 5S rDNA, 18S rDNA とともに *L. longituba* では染色体の端部に、*L. paucifolia* では染色体の介在部に観察され、異なった特徴を示した。これらのことから、この 2 種の間には明確な違いがあり、染色体数の違いについても異数性によるものではなく、基本数が異なることに由来すると考えら

れた。Manning *et al.* (2004) により、知られている 5 種の *Polyxena* (属) は全て *Lachenalia* (属) に編入すべきものとされたが、より詳細な研究によりこの 5 種がさらに細分化されうるものと考えられる。なお、*L. longituba* について、明瞭な DAPI バンドが観察されなかった点で *L. latimerae* などと類似した特徴を示したが、FISH シグナルの位置に明らかな違いがあり、*L. latimerae* などと高い近縁性を持つと判断するのは難しかった。

結 論

Lachenalia の種間類縁特性

核形態学的研究を行った 40 種 4 変種の分類群の中で、分子系統学的研究と分子細胞遺伝学的研究を行った 20 種 2 変種の観察結果をもとに、それぞれの類縁性について検討したところ、Fig. 18 および Fig. 19 に示すように *Lachenalia* の種間類縁特性は少なくとも大きく 3 つに分けることができることが明らかとなった。

A : DAPI 染色を行った際に染色体上に明瞭な DAPI バンドが見られる種群。バンドの発現の様子が一通りではなくいくつかのパターンが確認された。染色体基本数 $x = 7$ の種のほとんどと $x = 8$ の種が含まれる。核型分析、ITS 領域の解析、DAPI 染色、FISH の結果により $x = 8$ の系統は互いに高い類縁性を示した一方で、 $x = 7$ の系統間にはいくつかの変異が観察された。このグループは、一つ以上の $x = 8$ の祖先種と複数の $x = 7$ の祖先種に由来し、それらが互いに遺伝的な影響を与え合ってこの種群が形成されていると考えられる。ITS 領域の比較による系統解析では、 $x = 8$ の系統が一つのクレードを形成したのに対し、 $x = 7$ の系統は明確なクレードを形成しなかったが、これは ITS 領域の塩基配列の違いが非常に少ないことが原因である。交配においても親和性が高い可能性がある。

B : DAPI 染色を行った際に染色体上に明瞭な DAPI バンドが見られない種群。FISH のシグナルが類似した特徴を示すという共通点がある。その一方で、

このグループ内には染色体基本数 $x = 11$ のほか、 $x = 7$ の種の一部、 $x = 9$ の種が含まれ、染色体数に変化が生じている。また、染色体数が異なるものの間では ITS 領域の比較において十分な違いが認識できるほどの変化が起きており、遺伝的にも大きな差が生じていると考えられる。

C : Manning *et al.* (2004) により *Polyxena* から *Lachenalia* に編入された種群。ITS 領域の比較ではこれらの種は互いに近縁とされた。一方で、このグループ内には DAPI バンドの発現の様子、FISH のシグナルの特徴に変異があり、染色体の基本数 $x = 13$ の種と 14 種の両方が含まれると考えられるため、異質なものが混在している可能性が示唆される。また、他の種との間にも形態的に明確な違いがあり、DAPI バンドの発現の様子、FISH シグナルの特徴に違いがあり、染色体の基本数も異なることから、*Lachenalia* の中では異質な種群であることは否定できない。

おわりに

一連の分析から、DAPI 染色による染色体の特徴付けは *Lachenalia* の類縁特性を探るのに非常に有効であることがわかった。DAPI 染色は比較的簡便な手法であるため、未調査の種についても容易に応用できると期待できる。また、今後の観賞目的での利用増大が見込まれる中で、本研究の結果は交雑育種の重要な基礎資料としての活用が期待される。

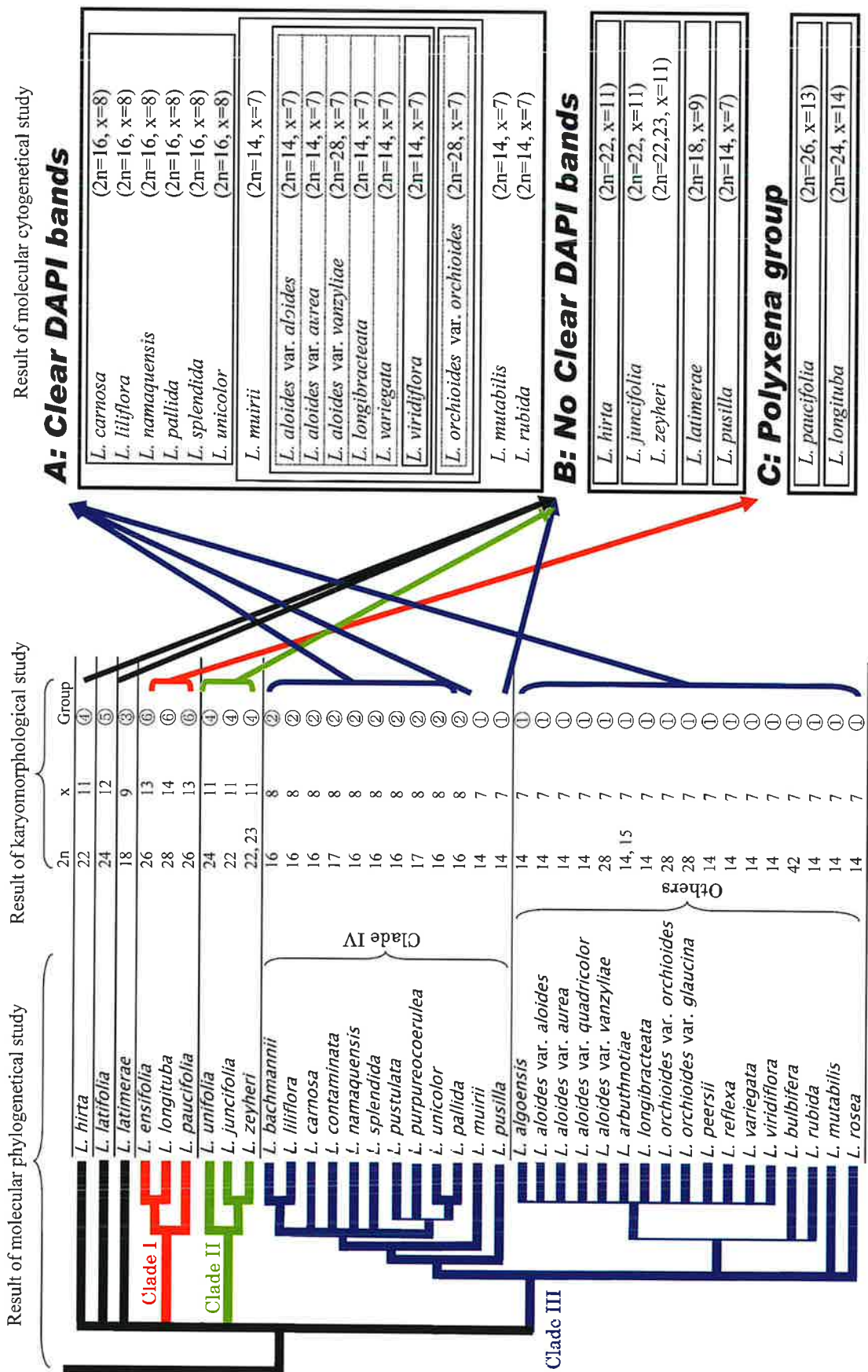


Fig. 18. Conclusion of relationships of *Lachenalia* studied.

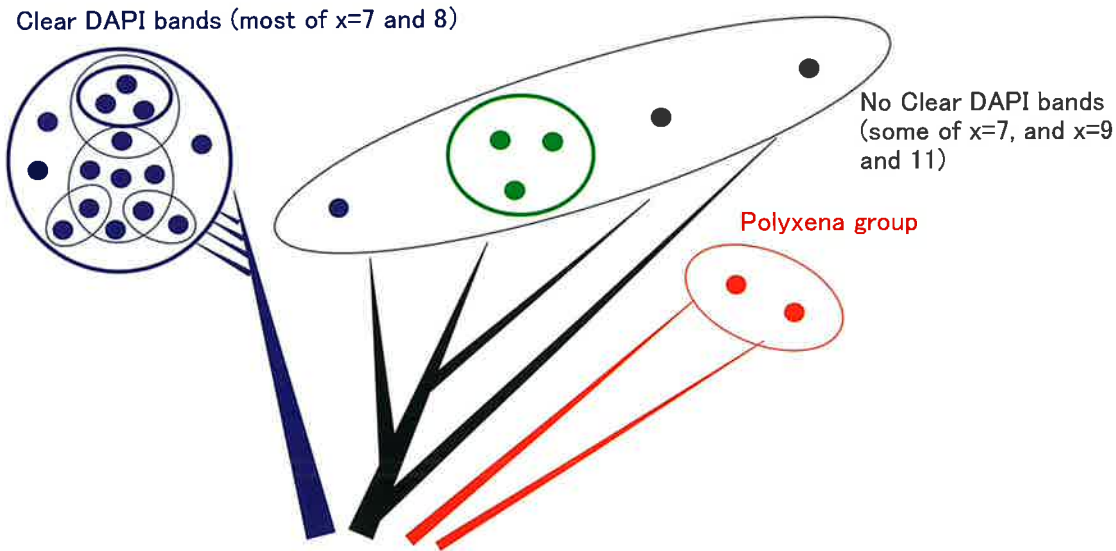


Fig. 19. An image of relationships among the species of *Lachenalia* studied.

摘 要

1. ユリ科 *Lachenalia* (属) はアフリカ南西部に固有の多年生草本である。わが国では半耐寒性の秋植え球根として園芸的に扱われ、晩秋または早春に開花する。約 110 種の野生種があって花色が豊富、かつコンパクトな草姿であるため、主に室内での観賞目的での普及が期待されている。また、人工交配種の作出も行われつつあるが交雑の難しい組み合わせが存在している。今後、効率的に交配親を選択し、より優れた系統を得るために、種間の類縁関係を明らかにすることが望まれている。そこで本研究では、40 種 4 変種の *Lachenalia* を用いて、核形態学的研究、分子系統学的研究、分子細胞遺伝学的研究を行い、類縁特性を評価した。

2. 核形態学的特性研究では、 $2n = 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 26, 28, 42$ の染色体数が算定された。 *L. algoensis* ($2n = 14$), *L. aloides* var. *vanzyliae* ($2n = 28$), *L. aloides* 'Pearsonii' ($2n = 15$), *L. latimeriae* ($2n = 18$), *L. longibracteata* ($2n = 14$), *L. longituba* ($2n = 28$), *L. thomasiae* ($2n = 14$) が初の報告, *L. arbuthnotiae* ($2n = 15$), *L. capensis* ($2n = 16$), *L. purpureocoerulea* ($2n = 15$), *L. variegata* ($2n = 14$), *L. zeyheri* ($2n = 23$) が既報と異なる染色体数を算定した。

体細胞分裂静止期、分裂前期ならびに中期染色体

の形態を分析した結果、調査した系統は染色体基本数により分類することができ、染色体基本数 $x = 7, x = 8, x = 9, x = 11, x = 12$ と、 $x = 13$ または 14 の 6 グループに分けられた。

3. 分子系統学的特性研究では、34 種 4 変種を用いて、核リボゾーム (nr) DNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列の決定と系統解析を行った。ITS 領域の塩基配列の比較により得られた系統樹では、互いに類縁性を示さない 3 種 (*L. hirta*, *L. latifolia*, *L. latimeriae*) と、それぞれ 3 種からなる 2 つの系統群 (クレード) (「Clade I」, 「Clade II」), 25 種 4 変種からなる 1 つのクレード (「Clade III」) に大きく分けられた。さらに、「Clade III」は 12 種からなる 1 つのクレード (「Clade IV」) と種間の類縁関係の違いが明確に示されなかったその他の 13 種 4 変種に分けられた。

この系統樹に、核型分析による染色体基本数の情報を当てはめると、*L. hirta* が $x = 11$, *L. latifolia* が $x = 12$, *L. latimeriae* が $x = 9$, 「Clade I」の 3 種が $x = 13$ または 14 , 「Clade II」の 3 種が $x = 11$, 「Clade IV」のうち *L. muirii* と *L. pusilla* が $x = 7$ でそれ以外の 10 種が $x = 8$, 「Clade III」のうち「Clade IV」に含まれない 13 種 4 変種 2 品種が $x = 7$ となった。核型分析と系統解析の結果との間に関連性が確認さ

れたが、他方では次のような問題が残った。すなわち、Manning *et al.* (2004) により *Polyxena* から *Lachenalia* に編入された種によって構成される「Clade I」の中に異なる染色体数を示す種が混在している点； $x = 8$ の種が多く含まれる「Clade IV」に $x = 7$ の *L. muirii* と *L. pusilla* が含まれている点； $x = 7$ の種間の類縁関係が核型分析や系統解析のいずれでも明確とならない点である。そこで、分子細胞遺伝学的手法を用いて、別の角度から分析した。

4. 分子細胞遺伝学的特性研究では、20 種 2 変種を選択し、4'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色と 5S rDNA と 18S rDNA に相補する DNA 断片（プローブ）を用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）を適用し、体細胞分裂中期染色体の構造比較を行った。

DAPI 染色の結果では、明瞭な DAPI バンドが全ての染色体上に検出された系統、一部の染色体上に検出された系統、全ての染色体に検出されない系統の存在が示された。FISH の 5S rDNA のシグナルは多くの系統で 2 箇所検出されたが、一部の系統で 4 箇所検出された。18S rDNA のシグナルは多くの系統で 2 箇所検出されたが、4 箇所あるいは 6 箇所検出される系統も存在した。 $x = 7$ の *L. aloides* var. *aloides*, *L. aloides* var. *aurea*, *L. aloides* var. *vanzyliae*, *L. longibracteata*, *L. muirii*, *L. orchioides* var. *orchioides*, *L. viridiflora* は DAPI バンド、5S rDNA のシグナルの位置に類似性があり、*L. muirii* を除く 4 種 2 変種は 18S rDNA のシグナルの位置にも類似性があった。 $x = 8$ の全種は DAPI バンド、5S rDNA、18S rDNA 両方のシグナルの位置に類似性があった。 $x = 7$ の *L. pusilla* は、その他の $x = 7$ の種群と比べて明らかに異質であった一方で、明瞭な DAPI バンドが検出されない点や 5S rDNA、18S rDNA のシグナルの位置について $x = 9$ の *L. latimeriae* や $x = 11$ の *L. hirta*, *L. juncifolia*, *L. zeyheri* との間に類似性を示した。

ITS 領域の比較では別クレードに属し、類縁性が示されなかった $x = 7$ の *L. pusilla* と $x = 9$ や 11 の種との間に、DAPI 染色や FISH を行うことによって類似した特徴が認められた。また、 $x = 8$ の種群は互いに非常に類似した特徴を持っているのに対し、 $x = 7$ の種群は部分的には類似し、部分的には異なる特徴を持つ関係があり、 $x = 7$ の種群は複数の祖先種をもとに交雑や染色体の構造変化などを経て現在の形質を得てきたことが示唆された。さらに、 $x = 7$ の *L. muirii* と $x = 8$ の種との間に共通の要素がある可能性が示唆された。また、*Polyxena* から *Lachenalia* に移された *L. longituba* と *L. paucifolia* の両種は種間で DAPI 染色、FISH の結果に違いがあり、それら以外の種との間にも違いが認められた。

5. 以上の結果から、*Lachenalia* の種間類縁特性は、次のように大きく 3 区分できた。

A：明瞭な DAPI バンドがみられる種群で、染色体基本数 $x = 7$ のほとんどの種と $x = 8$ の種が含まれるグループ。一つ以上の $x = 8$ の祖先種と複数の $x = 7$ の祖先種に由来し、互いに遺伝的な影響を与え合っていると考えられる。ITS 領域に十分な差異が存在しなかった。

B：明瞭な DAPI バンドがみられない種群で、染色体基本数 $x = 11$ のほか、 $x = 7$ の一部 (*L. pusilla*)、 $x = 9$ の種が含まれ、ITS 領域の塩基配列による比較でも十分な差がみられるグループ。

C：過去に *Polyxena* に分類されていた群が含まれ、複雑な相互関係の存在が示唆されたグループ。

以上、一連の分析から、DAPI 染色による染色体特徴付けは *Lachenalia* の類縁特性を探るには非常に有効な手段の一つであることがわかった。また、今後の観賞目的での利用増大が見込まれる中で、これらの結果は交雑育種の重要な基礎資料としての活用が期待される。

謝 辞

本研究の遂行と論文のとりまとめを行なうにあたり、永年にわたり終始懇切な指導をしていただきました東京農業大学農学部教授 近藤勝彦博士に対し、謹んで感謝の意を表します。

本論文のとりまとめにあたって、貴重なご助言とご校閲をいただきました東京農業大学農学部教授

陶山一雄博士、同教授 若狭暁博士、小池安比古博士、同准教授 本橋強博士ならびに同客員教授 今西英雄博士に厚くお礼申し上げます。

広島女学院大学生生活科学部生活デザイン・情報学科の田頭紀和准教授と研究室の方々、広島大学大学院理学研究科附属植物遺伝子保管実験施設研究員の

増田優博士と研究室の方々には研究の遂行にあたり様々なサポートをしていただきました。京都府立植物園の小川久雄氏、武田薬品工業（株）京都薬用植物園の古平栄一博士、園芸ニュースレター刊行会の小山毅氏には材料の提供をいただき、南アフリカ Kirstenbosch 植物園の Graham Duncan 氏には種の同定など協力をいただきました。

また、広島市植物公園長 石田源次郎博士、同元園長 橋本清美博士には、このような研究をおこなうきっかけを与えていただき、職場の仲間には温かく見守っていただきました。

そして、終始私を支えてくれた家族に対し、感謝の意を表します。

引用文献

- Baker, J.G. 1897. *Lachenalia* Jacq. In: Thistleton-Dyer, W.T. (ed.), *Flora Capensis* 6: 421-436.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M. and Wojciechowski, M.F. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Crosby, T.S. 1986. The genus *Lachenalia*. *The Plantsman* 8: 129-166.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Duncan, G.D. 1988. The *Lachenalia* handbook. *Annals of the Kirstenbosch Botanic Gardens* 17: 1-71.
- Duncan, G.D., Edwards, T.J. and Mitchell, A. 2005. Character variation and a cladistic analysis of the genus *Lachenalia* Jacq.f. ex Murray (Hyacinthaceae). *Proceedings of the IXth International Symposium on Flower Bulbs. Acta Horticulturae* 673: 113-120.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 6: 227-242.
- Fernandes, A. and Neves, J.B. 1962. Sur la caryologie de quelques Monocotyledones africaines. *Compt. Rend. De la IV-e Reunion Pleniére de l'Assoc. pour l'Etude Taxinomique de la Flore d'Afrique Tropicale. Lisboa*: 439-463.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Gouws, J.B. 1964. Cytological studies in the genus *Lachenalia* Jacq. *Annals of the University College of the Western Cape* 2: 1-7.
- Hancke, F.L. 1991. 'n Sitotaksonomiese ondersoek van sewe *Lachenalia* species vir gebruik in 'n blomteeltprogram. M.Sc. thesis, University of Pretoria.
- Hancke, F.L. and Liebenberg, H. 1990. B-chromosomes in some *Lachenalia* species and hybrids. *South African Journal of Botany* 56: 659-664.
- Hizume, M. 1993. Chromosomal localization of 5S rRNA genes in *Vicia fava* and *Crepis capillaris*. *Cytologia* 58: 417-421.
- Johnson, M.A.T. and Brandham, P.E. 1997. New chromosome numbers in petaloid monocotyledons and in other miscellaneous angiosperms. *Kew Bulletin* 52: 121-138.
- Kleynhans, R. 1997. Genetic variation in *Lachenalia bulbifera*. M.Sc. thesis, University of the Orange Free State.
- Kleynhans, R. and Spies, J.J. 1999. Chromosome number and morphological variation in *Lachenalia bulbifera* (Hyacinthaceae). *South African Journal of Botany* 65: 357-360.
- Kleynhans, R., Spies, J.J. and Spies, P. 2009. Cross-Ability in the genus *Lachenalia*. *Proceedings of the VIth Symposium on New Floricultural Crops. Acta Horticulturae* 813: 385-392.
- Levan, A., Frendga, C. and Stanberg, A.A. 1964. Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lubbinge, J. 1980. *Lachenalia* breeding. I. Introduction. *Acta Horticulturae* 109: 289-295.
- Malinowski, R., Filipecki, M., Tagashira, N., Wisniewski, A., Gaj, P., Plader, W. and Malepszy, S. 2004. Xyloglucan endotransglycosylase / hydrolase genes in cucumber (*Cucumis sativus*) – differential expression during somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 120: 678-685.

- Manning, J.C., Goldblatt, P. and Fay, M.F. 2004. A revised genetic synopsis of *Hyacinthaceae* in sub-saharan africa, based on molecular evidence, including new combinations and the new tribe *Pseudoprosperaeae*. *Edinburg Journal of Botany* 60: 533-568.
- Manning, J.C., Goldblatt, P. and Snijman, D. 2002. The color encyclopedia of Cape bulbs. Timber Press, Portland. Cambridge.
- Minnaar, A. 2004. Genomic relationships in the *Lachenalia Orchioides* group. M.Sc. thesis, University of the Free State.
- Moffett, A.A. 1936. The cytology of *Lachenalia*. *Cytologia* 7: 490-498.
- Mogford, D.J. 1978. Centromeric heterochromatin in *Lachenalia tricolor* (L.) Thunb. *Journal of South African Botany* 44: 111-117.
- Nordenstam, B. 1982. Chromosome numbers of southern African plants: 2. *Journal of South African Botany* 48: 273-275.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest 2.2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala.
- Ornduff, R. and Watters, P.J. 1978. Chromosome numbers in *Lachenalia* (Liliaceae). *Journal of South African Botany* 48: 273-275.
- Pfossner, M., Wetschnig, W., Ungar, S. and Prenner, G. 2003. Phylogenetic relationships among genera of Massonieae (Hyacinthaceae) inferred from plastid DNA and seed morphology. *Journal of Plant Research* 116: 115-132.
- Riley H.P. 1962. Chromosome studies in some South African Monocotyledons. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 4: 40-55.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- van Rooyen, P., Spies, J.J. and Kleynhans, R. 2002. The species delimitation of *Lachenalia unifolia* and *L. hirta*. *Proceedings of the 8th International Symposium on Flowerbulbs. Acta Horticulturae* 570: 395-401.
- Sato, D. 1941. Karyotype alteration and phylogeny in Liliaceae and allied families. *Japanese Journal of Botany* 12: 57-161.
- Sogin, M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. *In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (ed.), PCR Protocols. A guide to Methods and Applications:* 307-322. Academic Press, San Diego, California.
- Soltis, D.E. and Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. *In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Doyle, J.J. (ed.), Molecular systematic of plants II: DNA sequencing:* 1-42. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Speta, F. 1972. Entwicklungsgeschichte und Karyologie von Elaiosomen an Samen und Fruchten. *Naturhandlicher Jahrb. StadtLinz:* 9-65.
- Spies, P. 2004. Phylogenetic relationships of the genus *Lachenalia* with other related liliaceous taxa. *Magister Sci.diseration, University of Free State:* 1-257.
- Spies, J.J., du Preez, J.L., Minnaar, A. and Kleynhans, R. 2000. Hyacinthaceae: Chromosome studies of African plants. 13. *Lachenalia mutabilis*, *L. pustulata* and *L. unicolor*. *Rothalia* 30: 106-110.
- Spies, J.J., van Rooyen, P. and Kleynhans, R. 2002. The subgeneric delimitation of *Lachenalia* (Hyacinthaceae). *Proceedings of the 8th International Symposium on Flowerbulbs. Acta Horticulturae* 570: 225-231.
- Swofford, D.L. 2000. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tanaka, R. 1980. The karyotype. 335-358. *In: H. Kihara (ed.), Plant genetics*, I. Shokabo Book Co., Tokyo. (*In Japanese*).
- de Wet, J.M.J. 1957. Chromosome numbers in the Scilleae. *Cytologia* 22: 145-159.
- Therman, E. 1956. Chromocentres in the mitosis of Liliaceae. *Archaeological Society of Zoology and Botany Fennicae* 11:189-193.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Tayler, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (ed.), PCR protocols: A guide to method and*

applications: 315-322. Academic Press, San Diego, California.

Zakharyeva, O.I. and Makushenko, L.M. 1969.

Chromosome numbers of monocotyledons belonging to the families Liliaceae, Iridaceae, Amaryllidaceae, Araceae. Botanicheskii Zhurnal 54: 1213-1227.

補 遺

Appendix I : Measurements of somatic chromosomes of *Lachenalia* at mitotic metaphase

Table 5. *L. algoensis*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.44+2.42=3.86	10.33	1.68	m
2	1.71+1.87=3.58	9.58	1.09	m
3	1.02+2.30=3.32	8.88	2.25	sm
4	0.86+2.36=3.22	8.61	2.74	sm
5	1.49+1.58=3.07	8.22	1.04	m
6	1.14+1.89=3.03	8.11	1.66	m
7	0.86+1.45=2.31	6.18	1.69	m
8	0.91+1.20=2.11	5.65	1.32	m
9	1.01+1.25=2.26	6.05	1.23	m
10	0.84+1.38=2.22	5.94	1.64	m
11	0.87+1.25=2.12	5.67	1.43	m
12	0.96+1.26=2.22	5.94	1.31	m
13	0.8+1.27=2.07	5.54	1.58	m
14	0.9+1.08=1.98	5.30	1.20	m

Table 6. *L. aloides* var. *aloides*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.11+3.84=4.95	12.22	3.46	st
2	0.91+3.77=4.68	11.55	4.14	st
3	0.94+2.68=3.62	8.93	2.85	sm
4	1.05+2.53=3.58	8.84	2.41	sm
5	1.32+1.90=3.22	7.95	1.43	m
6	0.89+2.00=2.89	7.13	2.24	sm
7	1.01+1.83=2.83	6.98	1.80	sm
8	0.70+1.45=2.15	5.31	2.07	sm
9	1.07+1.29=2.36	5.82	1.21	m
10	0.91+1.24=2.15	5.31	1.36	m
11	0.94+1.24=2.18	5.38	1.31	m
12	0.87+1.17=2.04	5.03	1.34	m
13	0.84+1.15=1.99	4.91	1.37	m
14	0.79+1.09=1.88	4.64	1.38	m

Table 7. *L. aloides* var. *aurea*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.89+3.00=3.89	12.77	3.37	st
2	0.78+2.68=3.46	11.36	3.43	st
3	0.83+2.06=2.89	9.48	2.48	sm
4	0.42+0.75+1.36=2.53	8.30	1.16	m
5	0.64+1.70=2.34	7.68	2.66	sm
6	0.78+1.45=2.23	7.32	1.86	sm
7	0.80+1.45=2.25	7.38	1.81	sm
8	0.83+1.10=1.93	6.33	1.32	m
9	0.77+1.15=1.92	6.30	1.49	m
10	0.81+1.06=1.87	6.14	1.31	m
11	0.54+0.86=1.40	4.59	1.59	m
12	0.52+0.87=1.39	4.56	1.67	m
13	0.45+0.75=1.20	3.94	1.67	m
14	0.44+0.73=1.17	3.84	1.66	m

Table 8. *L. aloides* var. *quadricolor*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.70+4.01=4.71	11.67	5.73	st
2	0.82+3.52=4.34	10.76	4.29	st
3	1.69+1.77=3.47	8.60	1.05	m
4	1.49+1.98=3.47	8.60	1.33	m
5	0.9+2.56=3.46	8.58	2.84	sm
6	0.88+2.43=3.31	8.20	2.76	sm
7	1.04+1.62=2.66	6.59	1.56	m
8	0.97+1.65=2.62	6.49	1.70	sm
9	0.79+1.56=2.35	5.82	1.97	sm
10	0.8+1.55=2.35	5.82	1.94	sm
11	0.93+1.06=1.99	4.93	1.14	m
12	0.86+0.94=1.80	4.46	1.09	m
13	0.63+1.52=2.15	5.33	2.41	sm
14	0.55+1.12=1.67	4.14	2.04	sm

Table 9. *L. aloides* var. *vanzyliae*, $2n = 28$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.73+4.74=5.47	5.83	6.50	st
2	0.64+4.71=5.35	5.70	7.36	t
3	0.83+4.32=5.15	5.49	5.20	st
4	0.94+4.08=5.02	5.35	4.34	st
5	1.40+3.29=4.69	5.00	2.35	sm
6	1.23+2.93=4.16	4.43	2.38	sm
7	0.82+3.73=4.55	4.85	4.54	st
8	0.87+3.45=4.32	4.60	3.97	st
9	0.82+3.47=4.29	4.57	4.23	st
10	1.04+3.01=4.05	4.31	2.89	sm
11	1.43+2.52=3.95	4.21	1.76	sm
12	1.43+2.24=3.67	3.91	1.57	m
13	0.91+2.12=3.03	3.23	2.33	sm
14	0.96+1.93=2.89	3.08	2.01	sm
15	1.27+1.56=2.83	3.01	1.22	m
16	1.01+1.81=2.82	3.00	1.79	sm
17	0.79+1.96=2.75	2.93	2.48	sm
18	0.79+1.96=2.75	2.92	2.47	sm
19	1.04+1.61=2.65	2.82	1.54	m
20	1.19+1.35=2.54	2.71	1.13	m
21	0.81+1.5=2.31	2.46	1.85	sm
22	0.99+1.32=2.31	2.46	1.33	m
23	0.64+1.64=2.28	2.43	2.56	sm
24	0.80+1.35=2.15	2.29	1.69	m
25	0.84+1.28=2.12	2.26	1.52	m
26	0.90+1.19=2.09	2.23	1.32	m
27	0.93+0.95=1.88	2.00	1.02	m
28	0.76+1.05=1.81	1.93	1.38	m

Table 10. *L. aloides* 'Lutea', $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.73+2.96=5.52	1.26	1.16	m
2	1.76+3.04=4.80	1.10	1.73	sm
3	1.66+2.60=4.26	9.74	1.57	m
4	1.67+2.07=3.74	8.55	1.24	m
5	1.10+2.60=3.70	8.46	2.36	sm
6	0.82+0.85+1.60=3.27	7.48	0.96	(m)
7	0.80+2.15=2.95	6.75	2.69	sm
8	0.95+1.93=2.88	6.59	2.03	sm
9	0.97+1.37=2.34	5.35	1.41	m
10	0.82+1.50=2.32	5.31	1.83	sm
11	0.63+1.64=2.27	5.19	2.60	sm
12	0.88+1.15=2.03	4.64	1.31	m
13	0.78+1.07=1.85	4.23	1.37	m
14	0.70+1.10=1.80	4.12	1.57	m

Table 11. *L. aloides* 'Pearsonii', $2n = 15$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.37+3.71=5.08	10.82	2.71	sm
2	1.20+3.86=5.06	10.78	3.22	st
3	0.74+4.06=4.80	10.22	5.49	st
4	0.77+3.31=4.08	8.69	4.30	st
5	1.00+2.48=3.48	7.41	2.48	sm
6	0.77+2.70=3.47	7.39	3.51	st
7	0.65+2.61=3.26	6.94	4.02	st
8	0.81+1.83=2.64	5.62	2.26	sm
9	1.08+1.53=2.61	5.56	1.42	m
10	0.71+1.72=2.43	5.18	2.42	sm
11	1.16+1.25=2.41	5.13	1.08	m
12	1.04+1.05=2.09	4.45	1.01	m
13	0.95+1.41=2.36	5.03	1.48	m
14	0.98+1.07=2.05	4.37	1.09	m
15	1.16	2.47	∞	T

Table 12. *L. arbuthnotiae* (No.1), $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.95+4.93=5.88	14.08	5.19	st
2	0.87+3.97=4.84	11.59	4.56	st
3	1.11+2.74=3.85	9.22	2.47	sm
4	0.93+2.08=3.01	7.21	2.24	sm
5	1.34+1.74=3.08	7.38	1.30	m
6	0.95+1.85=2.80	6.71	1.95	sm
7	0.92+1.88=2.80	6.71	2.04	sm
8	1.77+0.91=2.68	6.42	1.95	sm
9	1.25+1.41=2.66	6.37	1.13	m
10	0.94+1.36=2.30	5.51	1.45	m
11	0.90+1.26=2.16	5.17	1.40	m
12	0.95+1.19=2.14	5.13	1.25	m
13	0.84+1.13=1.97	4.72	1.35	m
14	0.79+0.79=1.58	3.78	1.00	M

Table 13. *L. arbutnotiae* (No.2), $2n = 15$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.76+4.05=4.81$	11.76	5.33	st
2	$0.73+3.41=4.14$	10.12	4.67	st
3	$1.92+1.94=3.86$	9.43	1.01	m
4	$0.83+0.82+1.71=3.36$	8.22	1.04	m
5	$0.76+0.81+1.43=3.00$	7.34	0.91	(m)
6	$0.96+2.36=3.32$	8.12	2.46	sm
7	$0.83+2.33=3.16$	7.72	2.81	sm
8	$0.70+1.65=2.35$	5.75	2.36	sm
9	$0.79+1.39=2.18$	5.33	1.76	sm
10	$0.64+1.44=2.08$	5.09	2.25	sm
11	$0.82+1.08=1.90$	4.65	1.32	m
12	$0.81+1.05=1.86$	4.55	1.30	m
13	$0.75+0.97=1.72$	4.21	1.29	m
14	$0.70+0.91=1.61$	3.94	1.30	m
15	$0.50+1.05=1.55$	3.79	2.10	sm

Table 14. *L. bachmannii*, $2n = 16$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.74+0.74+3.26=4.74$	10.77	2.20	sm
2	$0.82+3.62=4.44$	10.08	4.41	st
3	$0.59+1.56+1.84=3.99$	9.06	1.17	m
4	$0.55+1.63+1.71=3.89$	8.83	1.27	m
5	$1.23+1.45=2.68$	6.09	1.18	m
6	$1.07+1.59=2.66$	6.04	1.49	m
7	$0.94+1.60=2.54$	5.77	1.70	sm
8	$0.92+1.49=2.41$	5.47	1.62	m
9	$0.79+1.74=2.53$	5.75	2.02	sm
10	$0.95+1.52=2.47$	5.61	1.60	m
11	$0.88+1.39=2.27$	5.16	1.58	m
12	$0.76+1.23=1.99$	4.52	1.62	m
13	$0.81+1.28=2.09$	4.75	1.58	m
14	$0.83+1.01=1.84$	4.18	1.22	m
15	$0.75+1.14=1.89$	4.29	1.52	m
16	$0.69+0.91=1.60$	3.63	1.32	m

Table 15. *L. bulbifera*, $2n = 42$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$3.20+3.33=6.53$	4.17	1.04	m
2	$2.83+3.09=5.92$	3.78	1.09	m
3	$1.22+4.91=6.13$	3.92	4.02	st
4	$1.39+3.48=4.87$	3.11	2.50	sm
5	$1.26+3.19=4.45$	2.85	2.53	sm
6	$1.18+3.12=4.30$	2.75	2.64	sm
7	$0.96+3.37=4.33$	2.77	3.51	st
8	$0.89+3.35=4.24$	2.71	3.76	st
9	$1.21+3.05=4.26$	2.72	2.52	sm
10	$0.97+3.17=4.14$	2.65	3.27	st
11	$1.07+3.18=4.25$	2.72	2.97	sm
12	$0.79+3.29=4.08$	2.61	4.16	st
13	$1.88+2.41=4.29$	2.74	1.28	m
14	$1.85+2.34=4.19$	2.68	1.26	m
15	$1.56+2.62=4.18$	2.67	1.68	m
16	$1.73+2.45=4.18$	2.67	1.42	m
17	$0.96+3.21=4.17$	2.66	3.34	st
18	$1.16+2.81=3.97$	2.54	2.42	sm
19	$0.88+3.04=3.92$	2.51	3.45	st
20	$0.64+2.95=3.59$	2.29	4.61	st
21	$1.08+2.57=3.65$	2.33	2.38	sm
22	$0.77+2.74=3.51$	2.24	3.56	st
23	$1.19+2.42=3.61$	2.31	2.03	sm
24	$1.11+2.12=3.23$	2.07	1.91	sm
25	$0.94+2.74=3.68$	2.35	2.91	sm
26	$0.93+1.94=2.87$	1.83	2.09	sm
27	$1.33+2.30=3.63$	2.32	1.73	sm
28	$1.51+1.64=3.15$	2.01	1.09	m
29	$1.48+1.78=3.26$	2.08	1.20	m
30	$1.33+1.56=2.89$	1.85	1.17	m
31	$1.40+1.76=3.16$	2.02	1.26	m
32	$0.84+2.16=3.00$	1.92	2.57	sm
33	$1.38+1.60=2.98$	1.91	1.16	m
34	$1.11+1.64=2.75$	1.76	1.48	m
35	$0.79+1.93=2.72$	1.74	2.44	sm
36	$1.24+1.38=2.62$	1.68	1.11	m
37	$0.70+2.00=2.70$	1.73	2.86	sm
38	$0.65+2.01=2.66$	1.70	3.09	st
39	$0.85+1.77=2.62$	1.68	2.08	sm
40	$0.84+1.78=2.62$	1.68	2.12	sm
41	$0.79+1.83=2.62$	1.67	2.32	sm
42	$0.90+1.59=2.49$	1.59	1.77	sm

Table 16. *L. capensis*, 2n = 16

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.10+1.63+4.91=7.64	15.16	1.80	sm
2	0.88+4.41=5.29	10.50	5.01	st
3	1.43+3.00=4.43	8.79	2.10	sm
4	1.18+2.85=4.03	8.00	2.42	sm
5	1.24+1.89=3.13	6.21	1.52	m
6	1.10+2.00=3.10	6.15	1.82	sm
7	1.07+1.58=2.65	5.26	1.48	m
8	1.03+1.49=2.52	5.00	1.45	m
9	0.92+1.97=2.89	5.74	2.14	sm
10	0.92+1.59=2.51	4.98	1.73	sm
11	0.94+1.32=2.26	4.49	1.40	m
12	1.21+1.24=2.45	4.86	1.02	m
13	0.93+1.08=2.01	3.99	1.16	m
14	0.68+1.13=1.81	3.59	1.66	m
15	0.77+1.18=1.95	3.87	1.53	m
16	0.75+0.96=1.71	3.39	1.28	m

Table 17. *L. carnososa*, 2n = 16

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.27+3.15=4.42	11.79	2.48	sm
2	0.99+2.94=3.93	10.48	2.97	sm
3	1.26+2.39=3.65	9.74	1.90	sm
4	0.91+2.06=2.97	7.92	2.26	sm
5	0.80+1.76=2.56	6.83	2.20	sm
6	0.92+1.00=1.92	5.12	1.09	m
7	0.71+1.74=2.45	6.53	2.45	sm
8	0.58+1.64=2.22	5.92	2.83	sm
9	0.71+1.25=1.96	5.23	1.76	sm
10	0.86+1.01=1.87	4.99	1.17	m
11	0.78+1.15=1.93	5.15	1.47	m
12	0.72+0.86=1.58	4.21	1.19	m
13	0.75+0.85=1.60	4.27	1.13	m
14	0.64+0.72=1.36	3.63	1.13	m
15	0.52+1.10=1.62	4.32	2.12	sm
16	0.66+0.79=1.45	3.87	1.20	m

Table 18. *L. contaminata*, 2n = 17

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.60+0.92+3.17=4.69	11.80	2.09	sm
2	0.91+3.04=3.95	9.94	3.34	st
3	0.91+2.47=3.38	8.51	2.71	sm
4	1.02+2.24=3.26	8.20	2.20	sm
5	1.05+1.20=2.25	5.66	1.14	m
6	0.77+1.38=2.15	5.41	1.79	sm
7	0.98+1.11=2.09	5.26	1.13	m
8	0.77+1.28=2.05	5.16	1.66	m
9	0.71+1.24=1.95	4.91	1.75	sm
10	0.91+1.15=2.06	5.18	1.26	m
11	0.82+0.94=1.76	4.43	1.15	m
12	0.77+1.20=1.97	4.96	1.56	m
13	0.73+1.07=1.80	4.53	1.47	m
14	0.67+1.05=1.72	4.33	1.57	m
15	0.59+0.94=1.53	3.85	1.59	m
16	0.67+0.93=1.60	4.03	1.39	m
17	0.71+0.82=1.53	3.85	1.15	m

Table 19. *L. fistulosa*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.64+2.43=4.07	12.50	1.48	m
2	1.35+2.01=3.36	10.32	1.49	m
3	0.69+0.80+1.40=2.89	8.88	0.94	(m)
4	0.69+0.58+1.31=2.58	7.92	1.03	m
5	0.59+2.09=2.68	8.23	3.54	st
6	0.59+2.07=2.66	8.17	3.51	st
7	0.63+1.50=2.13	6.54	2.38	sm
8	0.82+1.27=2.09	6.42	1.55	m
9	0.56+1.31=1.87	5.74	2.34	sm
10	0.60+1.17=1.77	5.44	1.95	sm
11	0.78+0.93=1.71	5.25	1.19	m
12	0.75+0.94=1.69	5.19	1.25	m
13	0.71+0.87=1.58	4.85	1.23	m
14	0.61+0.87=1.48	4.55	1.43	m

Table 20. *L. ensifolia*, 2n = 26

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.86+1.85=2.71	6.94	2.15	sm
2	0.85+1.37=2.22	5.69	1.61	m
3	0.50+1.88=2.38	6.10	3.76	st
4	0.54+1.35=1.89	4.84	2.50	sm
5	0.62+1.16=1.78	4.56	1.87	sm
6	0.50+1.27=1.77	4.54	2.54	sm
7	0.61+1.11=1.72	4.41	1.82	sm
8	0.43+1.27=1.70	4.36	2.95	sm
9	0.55+0.99=1.54	3.95	1.80	sm
10	0.61+0.79=1.40	3.59	1.30	m
11	0.74+0.78=1.52	3.89	1.05	m
12	0.64+0.86=1.50	3.84	1.34	m
13	0.57+0.86=1.43	3.66	1.51	m
14	0.47+0.93=1.40	3.59	1.98	sm
15	0.53+0.86=1.39	3.56	1.62	m
16	0.55+0.73=1.28	3.28	1.33	m
17	0.50+0.90=1.40	3.59	1.80	sm
18	0.35+0.91=1.26	3.23	2.6	sm
19	0.48+0.76=1.24	3.18	1.58	m
20	0.48+0.71=1.19	3.05	1.48	m
21	0.53+0.65=1.18	3.02	1.23	m
22	0.40+0.70=1.10	2.82	1.75	sm
23	0.43+0.65=1.08	2.77	1.51	m
24	0.39+0.66=1.05	2.69	1.69	m
25	0.36+0.72=1.08	2.77	2.00	sm
26	0.32+0.54=0.86	2.20	1.69	m

Table 21. *L. hirta*, 2n = 22

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.02+2.04=3.06	8.06	2.00	sm
2	1.09+1.73=2.82	7.43	1.59	m
3	0.98+1.82=2.80	7.38	1.86	sm
4	0.67+1.40=2.07	5.45	2.09	sm
5	1.03+1.32=2.35	6.19	1.28	m
6	0.91+1.19=2.10	5.53	1.31	m
7	0.58+1.14=1.72	4.53	1.97	sm
8	0.58+0.98=1.56	4.11	1.69	m
9	0.80+0.92=1.72	4.53	1.15	m
10	0.61+0.99=1.60	4.22	1.62	m
11	0.44+1.14=1.58	4.16	2.59	sm
12	0.51+1.01=1.52	4.00	1.98	sm
13	0.57+0.94=1.51	3.98	1.65	m
14	0.55+0.93=1.48	3.90	1.69	m
15	0.63+0.84=1.47	3.87	1.33	m
16	0.57+0.87=1.44	3.79	1.52	m
17	0.58+0.74=1.32	3.48	1.28	m
18	0.56+0.75=1.31	3.45	1.34	m
19	0.60+0.70=1.30	3.42	1.17	m
20	0.46+0.67=1.13	2.98	1.46	m
21	0.41+0.68=1.09	2.87	1.65	m
22	0.42+0.59=1.01	2.66	1.05	m

Table 22. *L. juncifolia*, $2n = 22$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$1.16+0.96+2.35=4.47$	10.09	1.11	m
2	$0.80+2.30=3.10$	7.00	2.88	sm
3	$0.80+1.65=2.45$	5.53	2.06	sm
4	$0.97+1.45=2.42$	5.46	1.49	m
5	$0.94+1.42=2.36$	5.33	1.51	m
6	$0.64+1.63=2.27$	5.12	2.55	sm
7	$0.77+1.55=2.32$	5.24	2.01	sm
8	$0.93+1.21=2.14$	4.83	1.30	m
9	$0.85+1.05=1.90$	4.29	1.24	m
10	$0.65+0.99=1.64$	3.70	1.52	m
11	$0.64+1.20=1.84$	4.15	1.88	sm
12	$0.60+1.13=1.73$	3.91	1.88	sm
13	$0.70+1.16=1.86$	4.20	1.66	m
14	$0.64+1.00=1.64$	3.70	1.56	m
15	$0.69+1.07=1.76$	3.97	1.55	m
16	$0.63+1.08=1.71$	3.86	1.71	sm
17	$0.72+0.83=1.55$	3.50	1.15	m
18	$0.69+0.83=1.52$	3.43	1.20	m
19	$0.64+0.90=1.54$	3.48	1.41	m
20	$0.62+0.90=1.52$	3.43	1.45	m
21	$0.53+0.83=1.36$	3.07	1.57	m
22	$0.39+0.81=1.20$	2.71	2.08	sm

Table 23. *L. latifolia*, $2n = 24$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.66+1.58=2.24$	5.56	2.39	sm
2	$0.67+1.50=2.17$	5.38	2.23	sm
3	$0.70+1.46=2.16$	5.36	2.08	sm
4	$0.60+1.55=2.15$	5.33	2.58	sm
5	$0.65+1.48=2.13$	5.28	2.28	sm
6	$0.60+1.36=1.96$	4.86	2.27	sm
7	$0.70+1.25=1.95$	4.84	1.79	sm
8	$0.60+1.30=1.90$	4.71	2.17	sm
9	$0.45+1.39=1.84$	4.56	3.09	st
10	$0.64+1.10=1.74$	4.32	1.72	sm
11	$0.63+1.05=1.68$	4.17	1.67	m
12	$0.59+1.01=1.60$	3.97	1.71	sm
13	$0.63+1.04=1.67$	4.14	1.65	m
14	$0.62+0.99=1.61$	3.99	1.60	m
15	$0.54+1.00=1.54$	3.82	1.85	sm
16	$0.45+1.03=1.48$	3.67	2.29	sm
17	$0.60+0.87=1.47$	3.65	1.45	m
18	$0.58+0.90=1.61$	3.99	1.60	m
19	$0.60+0.79=1.39$	3.45	1.32	m
20	$0.37+0.94=1.31$	3.25	2.54	sm
21	$0.58+0.69=1.27$	3.15	1.19	m
22	$0.46+0.78=1.24$	3.08	1.69	m
23	$0.40+0.82=1.22$	3.03	2.05	sm
24	$0.48+0.63=1.11$	2.75	1.31	m

Table 24. *L. latimeriae*, $2n = 18$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.8+2.37=3.17$	8.83	2.96	sm
2	$0.68+2.16=2.84$	7.92	3.18	st
3	$0.66+0.57+1.78=3.01$	8.39	1.54	m
4	$0.95+1.46=2.41$	6.72	1.54	m
5	$0.72+1.46=2.18$	6.08	2.03	sm
6	$0.65+1.44=2.09$	5.83	2.22	sm
7	$0.53+1.47=2.00$	5.58	2.77	sm
8	$0.51+1.48=1.99$	5.54	2.90	sm
9	$0.63+1.37=2.00$	5.58	2.17	sm
10	$0.72+1.21=1.93$	5.38	1.68	m
11	$0.54+1.18=1.72$	4.80	2.19	sm
12	$0.70+0.98=1.68$	4.68	1.40	m
13	$0.64+1.07=1.71$	4.77	2.19	sm
14	$0.75+0.90=1.65$	4.60	1.20	m
15	$0.55+1.09=1.64$	4.57	1.98	sm
16	$0.51+0.95=1.46$	4.07	1.86	sm
17	$0.53+0.67=1.20$	3.35	1.26	m
18	$0.59+0.61=1.20$	3.35	1.03	m

Table 25. *L. liliflora*, $2n = 16$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.78+3.81=5.13$	13.38	2.89	sm
2	$0.92+3.13=4.05$	10.56	3.40	st
3	$0.97+2.82=3.79$	9.89	2.91	sm
4	$0.81+2.62=3.43$	8.95	3.23	st
5	$0.5+0.63+0.84=1.97$	5.14	0.74	(m)
6	$1.02+1.29=2.31$	6.02	1.26	m
7	$0.84+1.3=2.14$	5.58	1.55	m
8	$0.77+1.35=2.12$	5.53	1.75	sm
9	$0.68+1.31=1.99$	5.19	1.93	sm
10	$0.66+1.16=1.82$	4.75	1.76	sm
11	$0.58+1.12=1.70$	4.43	1.93	sm
12	$0.67+1.08=1.75$	4.56	1.61	m
13	$0.54+1.10=1.64$	4.28	2.04	sm
14	$0.70+0.90=1.60$	4.17	1.29	m
15	$0.65+0.81=1.46$	3.81	1.25	m
16	$0.45+0.99=1.44$	3.76	2.20	sm

Table 26. *L. longibracteata*, $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.08+1.60=2.68	10.03	1.48	m
2	0.96+1.45=2.41	9.02	1.51	m
3	0.93+1.41=2.34	8.76	1.52	m
4	0.82+1.50=2.32	8.69	1.83	sm
5	0.83+1.36=2.19	8.20	1.64	m
6	0.97+1.19=2.16	8.09	1.22	m
7	0.74+1.06=1.80	6.74	1.43	m
8	0.74+0.97=1.71	6.40	1.31	m
9	0.67+0.98=1.65	6.18	1.46	m
10	0.69+0.91=1.60	5.99	1.32	m
11	0.67+1.86=1.53	5.73	1.28	m
12	0.65+0.87=1.52	5.69	1.34	m
13	0.55+0.89=1.44	5.39	1.62	m
14	0.55+0.81=1.36	5.09	1.47	m

Table 27. *L. longituba*, $2n = 28$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.72+2.34=3.06	7.44	3.25	st
2	0.97+1.92=2.89	7.02	1.98	sm
3	0.36+2.33=2.69	6.54	6.47	st
4	0.51+1.35=1.86	4.52	2.65	sm
5	0.58+1.12=1.70	4.13	1.93	sm
6	0.56+1.13=1.69	4.11	2.02	sm
7	0.49+1.07=1.56	3.79	2.18	sm
8	0.56+0.93=1.49	3.62	1.66	m
9	0.55+0.92=1.47	3.57	1.67	m
10	0.46+0.99=1.45	3.52	2.15	sm
11	0.52+0.92=1.44	3.50	1.77	sm
12	0.42+0.96=1.38	3.35	2.29	sm
13	0.56+0.78=1.34	3.26	1.39	m
14	0.39+0.77=1.16	2.82	1.97	sm
15	0.58+0.72=1.30	3.16	1.24	m
16	0.48+0.78=1.26	3.06	1.63	m
17	0.37+0.84=1.21	2.94	2.27	sm
18	0.41+0.75=1.16	2.82	1.83	sm
19	0.59+0.60=1.19	2.89	1.02	m
20	0.56+0.62=1.18	2.87	1.11	m
21	0.59+0.60=1.19	2.89	1.02	m
22	0.44+0.73=1.17	2.84	1.66	m
23	0.46+0.63=1.09	2.65	1.37	m
24	0.43+0.66=1.09	2.65	1.53	m
25	0.42+0.65=1.07	2.60	1.55	m
26	0.52+0.53=1.05	2.55	1.02	m
27	0.39+0.63=1.02	2.48	1.62	m
28	0.40+0.58=0.98	2.38	1.45	m

Table 28. *L. mathewsii*, $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.21+2.71=3.92	11.10	2.24	sm
2	1.48+2.43=3.91	11.07	1.64	m
3	1.29+1.84=3.13	8.86	1.43	m
4	0.98+1.98=2.96	8.38	2.02	sm
5	1.07+1.82=2.89	8.18	1.70	sm
6	0.79+1.89=2.68	7.59	2.39	sm
7	0.88+1.44=2.32	6.57	1.64	m
8	0.89+1.20=2.09	5.92	1.35	m
9	0.60+1.46=2.06	5.83	2.43	sm
10	0.71+1.23=1.94	5.49	1.73	sm
11	0.74+1.19=1.93	5.46	1.61	m
12	0.78+1.01=1.79	5.07	1.29	m
13	0.84+1.12=1.96	5.55	1.33	m
14	0.74+1.01=1.75	4.95	1.36	m

Table 29. *L. muirii*, $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.93+3.85=4.78	12.07	4.14	st
2	1.26+3.19=4.45	11.24	2.53	sm
3	1.46+2.05=3.51	8.86	1.40	m
4	1.15+2.16=3.31	8.36	1.88	sm
5	0.97+2.05=3.02	7.63	2.11	sm
6	0.91+2.14=3.05	7.70	2.35	sm
7	0.91+1.67=2.58	6.52	1.84	sm
8	1.13+1.34=2.47	6.24	1.19	m
9	0.95+1.31=2.26	5.71	1.37	m
10	0.99+1.14=2.13	5.38	1.16	m
11	0.88+1.32=2.20	5.56	1.50	m
12	0.82+1.30=2.12	5.35	1.59	m
13	0.82+1.10=1.92	4.85	1.34	m
14	0.59+1.21=1.80	4.55	2.05	sm

Table 30. *L. mutabilis*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.23+3.35=4.58	10.76	2.72	sm
2	1.02+3.38=4.40	10.34	3.31	st
3	1.16+3.26=4.42	10.39	2.81	sm
4	1.11+2.98=4.09	9.61	2.68	sm
5	1.22+2.12=3.34	7.85	1.74	sm
6	1.05+2.00=3.05	7.17	1.90	sm
7	1.03+1.63=2.66	6.25	1.58	m
8	0.96+1.67=2.63	6.18	1.74	sm
9	1.13+1.38=2.51	5.90	1.22	m
10	0.95+1.23=2.18	5.12	1.29	m
11	1.17+1.17=2.34	5.50	1.00	M
12	0.91+1.30=2.21	5.19	1.42	m
13	0.94+1.17=2.11	4.96	1.24	m
14	0.95+1.08=2.03	4.77	1.13	m

Table 31. *L. namaquensis*, 2n = 16

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.21+3.53=4.74	12.56	2.92	sm
2	1.03+3.57=4.60	12.19	3.47	st
3	1.24+2.41=3.65	9.67	1.94	sm
4	1.07+1.60=2.67	7.07	1.50	m
5	0.60+1.76=2.36	6.26	2.93	sm
6	0.84+1.02=1.86	4.93	1.21	m
7	0.70+1.54=2.24	5.93	2.20	sm
8	0.69+1.40=2.09	5.54	2.03	sm
9	0.88+0.99=1.87	4.95	1.13	m
10	0.72+0.85=1.57	4.16	1.18	m
11	0.72+0.1.14=1.86	4.92	1.58	m
12	0.81+1.02=1.83	4.85	1.26	m
13	0.70+1.13=1.83	4.85	1.61	m
14	0.64+1.00=1.64	4.34	1.56	m
15	0.70+0.90=1.60	4.24	1.29	m
16	0.63+0.71=1.34	3.55	1.13	m

Table 32. *L. orchoides* var. *orchoides*, 2n = 28

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.65+2.33=3.98	5.82	1.41	m
2	1.34+2.54=3.88	5.68	1.90	sm
3	1.29+2.32=3.61	5.28	1.80	sm
4	1.56+1.97=3.53	5.16	1.26	m
5	1.07+2.50=3.57	5.22	2.34	sm
6	0.97+2.53=3.50	5.12	2.61	sm
7	0.86+2.41=3.27	4.78	2.80	sm
8	0.73+2.07=2.80	4.10	2.84	sm
9	0.67+1.94=2.61	3.82	2.90	sm
10	0.89+1.65=2.54	3.72	1.85	sm
11	0.84+1.67=2.51	3.67	1.99	sm
12	0.85+1.61=2.46	3.60	1.89	sm
13	0.86+1.38=2.24	3.60	1.22	m
14	0.75+1.43=2.18	3.19	1.91	sm
15	0.94+1.15=2.09	3.06	1.22	m
16	0.89+1.18=2.07	3.03	1.33	m
17	0.70+1.37=2.07	3.03	1.96	sm
18	0.69+1.29=1.98	2.90	1.87	sm
19	0.86+1.12=1.98	2.90	1.30	m
20	0.91+1.06=1.97	2.88	1.16	m
21	0.75+1.17=1.92	2.81	1.56	m
22	0.75+1.07=1.82	2.66	1.42	m
23	0.85+0.89=1.74	2.55	1.05	m
24	0.73+0.98=1.71	2.50	1.34	m
25	0.93+0.76=1.69	2.47	1.22	m
26	0.76+0.84=1.60	2.34	1.11	m
27	0.60+0.95=1.55	2.27	1.58	m
28	0.61+0.88=1.49	2.18	1.44	m

Table 33. *L. orchoides* var. *glaucina*, 2n = 28

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.89+2.50=3.39	6.10	2.81	sm
2	0.78+2.28=3.06	5.51	2.92	sm
3	1.61+1.68=3.29	5.92	1.04	m
4	0.83+1.94=2.77	4.99	2.34	sm
5	0.80+1.74=2.54	4.57	2.18	sm
6	0.95+1.49=2.44	4.39	1.57	m
7	0.88+1.45=2.33	4.19	1.65	m
8	0.86+1.38=2.24	4.03	1.60	m
9	0.95+1.23=2.18	3.92	1.29	m
10	0.75+1.39=2.14	3.85	1.85	sm
11	0.88+1.22=2.10	3.78	1.39	m
12	0.95+1.03=1.98	3.56	1.08	m
13	0.68+1.28=1.96	3.53	1.88	sm
14	0.75+1.22=1.97	3.55	1.63	m
15	0.76+1.12=1.88	3.38	1.47	m
16	0.76+1.10=1.86	3.35	1.45	m
17	0.91+1.03=1.94	3.49	1.13	m
18	0.60+1.19=1.79	3.22	1.98	sm
19	0.73+1.08=1.81	3.26	1.48	m
20	0.68+1.00=1.68	3.02	1.47	m
21	0.54+0.88=1.42	2.56	1.63	m
22	0.54+0.84=1.38	2.48	1.56	m
23	0.59+0.83=1.42	2.56	1.41	m
24	0.38+0.98=1.36	2.45	2.58	sm
25	0.48+0.79=1.27	2.29	1.65	m
26	0.45+0.70=1.15	2.07	1.56	m
27	0.48+0.65=1.13	2.03	1.35	m
28	0.50+0.58=1.08	1.94	1.16	m

Table 34. *L. orthopetala*, 2n = 16

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.36+0.79+4.07=5.22	12.30	3.54	st
2	0.36+0.78+3.52=4.66	10.98	3.09	st
3	0.97+2.90=3.87	9.12	2.99	sm
4	0.87+2.64=3.51	8.27	3.03	st
5	0.98+1.41=2.39	5.63	1.44	m
6	0.96+1.37=2.33	5.49	1.43	m
7	0.91+1.72=2.63	6.20	1.89	sm
8	0.94+1.29=2.23	5.25	1.37	m
9	0.85+1.48=2.33	5.49	1.74	sm
10	0.72+1.51=2.23	5.25	2.10	sm
11	0.93+1.32=2.25	5.30	1.42	m
12	0.83+1.34=2.17	5.11	1.61	m
13	0.90+1.02=1.92	4.52	1.13	m
14	0.72+0.83=1.55	3.65	1.15	m
15	0.68+0.90=1.58	3.72	1.32	m
16	0.57+0.97=1.54	3.63	1.70	sm

Table 35. *L. pallida*, 2n = 16

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.72+1.29+3.70=5.71	12.71	1.84	sm
2	1.09+4.18=5.27	11.73	3.83	st
3	0.82+3.75=4.57	10.17	4.57	st
4	1.32+2.87=4.19	9.33	2.17	sm
5	0.95+2.14=3.09	6.88	2.25	sm
6	0.77+1.76=2.53	5.63	2.29	sm
7	1.17+1.61=2.78	6.19	1.38	m
8	0.73+1.54=2.27	5.05	2.11	sm
9	0.80+1.22=2.02	4.50	1.52	m
10	0.89+0.97=1.86	4.14	1.09	m
11	0.60+1.44=2.04	4.54	2.40	sm
12	0.62+1.34=1.96	4.36	2.16	sm
13	0.77+1.22=1.99	4.43	1.58	m
14	0.79+0.99=1.78	3.96	1.25	m
15	0.65+0.94=1.59	3.54	1.45	m
16	0.60+0.68=1.28	2.85	1.13	m

Table 36. *L. peersii*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.69+0.86+4.15=5.70	14.16	2.68	sm
2	1.00+1.00+2.49=4.49	11.16	1.25	m
3	0.90+0.54+1.99=3.43	8.52	1.38	m
4	0.72+0.92+1.32=2.96	7.35	0.80	(m)
5	0.88+2.21=3.09	7.68	2.51	sm
6	0.90+2.18=3.08	7.65	2.42	sm
7	0.64+2.03=2.67	6.63	3.17	st
8	0.57+2.02=2.59	6.43	3.54	st
9	0.90+1.28=2.18	5.42	1.42	m
10	0.84+1.15=1.99	4.94	1.37	m
11	0.63+1.49=2.12	5.27	2.37	sm
12	0.76+1.26=2.02	5.02	1.66	m
13	0.74+1.35=2.09	5.19	1.82	sm
14	0.65+1.19=1.84	4.57	1.83	sm

Table 37. *L. paucifolia*, 2n = 26

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.92+4.35=6.27	10.16	2.27	sm
2	2.01+3.12=5.13	8.31	1.55	m
3	0.71+3.77=4.48	7.26	5.31	st
4	0.86+2.29=3.15	5.10	2.66	sm
5	0.90+2.05=2.95	4.78	2.28	sm
6	0.91+2.00=2.91	4.72	2.20	sm
7	0.84+1.92=2.76	4.47	2.29	sm
8	0.50+1.84=2.34	3.79	3.68	st
9	0.55+2.02=2.57	4.16	3.67	st
10	0.59+1.38=1.97	3.19	2.34	sm
11	0.96+1.51=2.47	4.00	1.57	m
12	0.83+1.32=2.15	3.48	1.59	m
13	0.68+1.29=1.97	3.19	1.90	sm
14	0.62+1.36=1.98	3.21	2.19	sm
15	0.56+1.29=1.85	3.00	2.30	sm
16	0.76+1.15=1.91	3.10	1.51	m
17	0.83+0.99=1.82	2.94	1.19	m
18	0.78+1.04=1.82	2.94	1.33	m
19	0.74+1.01=1.75	2.84	1.36	m
20	0.57+1.13=1.70	2.75	1.98	sm
21	0.50+1.00=1.50	2.43	2.00	sm
22	0.61+0.88=1.49	2.41	1.44	m
23	0.65+0.78=1.43	2.32	1.20	m
24	0.48+0.76=1.24	2.01	1.58	m
25	0.52+0.67=1.19	1.93	1.29	m
26	0.42+0.49=0.91	1.47	1.17	m

Table 38. *L. purpureocoerulea*, $2n = 17$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.60+0.79+2.41=3.80$	11.22	1.74	sm
2	$0.54+0.77+2.22=3.53$	10.70	1.70	sm
3	$0.88+2.09=2.97$	8.74	2.38	sm
4	$0.93+1.74=2.67$	7.91	1.87	sm
5	$0.86+1.22=2.08$	6.14	1.41	m
6	$0.80+0.96=1.76$	5.17	1.20	m
7	$0.73+1.10=1.83$	5.40	1.50	m
8	$0.66+0.90=1.56$	4.61	1.36	m
9	$0.60+1.02=1.62$	4.78	1.71	sm
10	$0.66+0.90=1.56$	4.61	1.37	m
11	$0.57+1.01=1.58$	4.67	1.75	sm
12	$0.68+0.88=1.56$	4.61	1.30	m
13	$0.68+0.99=1.58$	4.67	1.32	m
14	$0.61+0.79=1.40$	4.13	1.30	m
15	$0.61+0.88=1.49$	4.40	1.42	m
16	$0.68+0.76=1.44$	4.25	1.11	m
17	$0.68+0.77=1.45$	4.28	1.13	m

Table 39. *L. pusilla* (No.1), $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.76+1.78=2.54$	9.99	2.34	sm
2	$0.75+1.71=2.46$	9.67	2.28	sm
3	$0.74+1.62=2.36$	9.28	2.19	sm
4	$0.73+1.54=2.27$	8.93	2.11	sm
5	$0.63+1.42=2.05$	8.06	2.25	sm
6	$0.78+1.26=2.04$	8.02	1.61	m
7	$0.76+1.06=1.82$	7.16	1.39	m
8	$0.59+0.96=1.55$	6.10	1.63	m
9	$0.50+0.98=1.48$	5.82	1.96	sm
10	$0.58+0.84=1.42$	5.58	1.45	m
11	$0.55+0.84=1.39$	5.47	1.53	m
12	$0.55+0.84=1.39$	5.47	1.53	m
13	$0.58+0.79=1.37$	5.39	1.36	m
14	$0.56+0.73=1.29$	5.07	1.30	m

Table 40. *L. pusilla* (No.2), $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$1.14+2.88=4.02$	10.73	2.53	sm
2	$0.96+2.92=3.88$	10.36	3.04	st
3	$1.08+2.60=3.68$	9.82	2.41	sm
4	$1.32+2.30=3.62$	9.66	1.74	sm
5	$1.04+2.18=3.22$	8.60	2.10	sm
6	$1.15+1.79=2.94$	7.85	1.56	m
7	$1.17+1.39=2.56$	6.83	1.19	m
8	$1.04+1.26=2.30$	6.14	1.21	m
9	$1.11+1.20=2.31$	6.17	1.08	m
10	$0.53+1.23=1.76$	4.70	2.32	sm
11	$0.76+1.33=2.09$	5.58	1.75	sm
12	$0.68+1.37=2.05$	5.47	2.01	sm
13	$0.80+0.81=1.61$	4.30	1.01	m
14	$0.71+0.71=1.42$	3.79	1.00	M

Table 41. *L. pustulata*, $2n = 16$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	$0.77+4.17=4.94$	10.89	5.42	st
2	$0.85+3.72=4.57$	10.07	4.38	st
3	$1.13+3.17=4.30$	9.48	2.81	sm
4	$1.01+2.89=3.90$	8.60	2.86	sm
5	$1.15+1.72=2.87$	6.32	1.50	m
6	$0.90+1.87=2.77$	6.10	2.08	sm
7	$0.94+1.71=2.65$	5.84	1.82	sm
8	$1.01+1.54=2.55$	5.62	1.52	m
9	$1.23+1.25=2.48$	5.47	1.02	m
10	$1.01+1.36=2.37$	5.22	1.35	m
11	$0.87+1.54=2.41$	5.31	1.77	sm
12	$0.75+1.34=2.09$	4.61	1.79	sm
13	$0.83+1.17=2.00$	4.41	1.41	m
14	$0.84+0.97=1.81$	3.99	1.15	m
15	$0.60+1.34=1.94$	4.28	2.23	sm
16	$0.74+0.99=1.73$	3.81	1.34	m

Table 42. *L. reflexa*, $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.44+3.64=4.08	11.45	8.28	t
2	0.51+3.24=3.75	10.53	6.35	st
3	1.00+2.48=3.48	9.77	2.48	sm
4	0.68+2.47=3.15	8.84	3.63	st
5	0.70+0.45+1.72=2.87	8.06	1.50	m
6	0.99+1.60=2.59	7.27	1.62	m
7	0.96+1.49=2.45	6.88	1.55	m
8	0.77+1.45=2.22	6.23	1.88	sm
9	0.71+1.43=2.14	6.01	2.01	sm
10	0.71+1.29=2.00	5.61	1.82	sm
11	0.86+1.05=1.91	5.36	1.22	m
12	0.91+0.91=1.82	5.11	1.00	M
13	0.67+0.91=1.58	4.44	1.36	m
14	0.71+0.87=1.58	4.44	1.23	m

Table 43. *L. rosea*, $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.92+3.29=5.21	11.27	1.71	sm
2	0.82+3.75=4.57	9.89	4.57	st
3	1.00+3.55=4.55	9.84	3.55	st
4	0.90+3.35=4.25	9.20	3.72	st
5	0.94+3.16=4.10	8.87	3.36	st
6	0.88+3.05=3.93	8.50	3.47	st
7	1.36+1.44=2.80	6.06	1.06	m
8	1.09+1.67=2.76	5.97	1.53	m
9	0.71+1.89=2.60	5.63	2.66	sm
10	0.67+1.79=2.46	5.32	2.67	sm
11	0.94+1.42=2.36	5.11	1.51	m
12	0.85+1.42=2.27	4.91	1.67	m
13	0.87+1.33=2.20	4.76	1.53	m
14	0.69+1.47=2.16	4.67	2.13	sm

Table 44. *L. rosea*, $2n = 14$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.15+2.74=3.89	9.36	2.38	sm
2	0.97+2.85=3.82	9.19	2.94	sm
3	1.46+2.32=3.78	9.09	1.59	m
4	0.91+2.18=3.09	7.43	2.40	sm
5	0.77+2.30=3.07	7.39	2.99	sm
6	0.73+2.00=2.73	6.57	2.74	sm
7	0.48+2.76=3.24	7.79	5.75	st
8	0.81+2.09=2.90	6.98	2.58	sm
9	1.01+2.38=3.39	8.15	2.36	sm
10	1.17+1.66=2.83	6.81	1.42	m
11	0.50+1.86=2.36	5.68	3.72	st
12	0.83+1.30=2.13	5.12	1.57	m
13	0.80+1.51=2.31	5.56	1.89	sm
14	0.54+1.49=2.03	4.88	2.76	sm

Table 45. *L. splendida*, $2n = 16$

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.01+0.89+3.51=5.41	11.89	1.85	sm
2	0.38+0.95+3.41=4.74	10.42	2.56	sm
3	1.00+2.89=3.89	8.55	2.89	sm
4	0.87+2.83=3.70	8.13	3.25	st
5	0.97+1.79=2.76	6.07	1.85	sm
6	0.99+1.74=2.73	6.00	1.76	sm
7	1.20+1.37=2.57	5.65	1.14	m
8	1.11+1.32=2.43	5.34	1.19	m
9	0.95+1.48=2.43	5.34	1.56	m
10	0.79+1.61=2.40	5.27	2.04	sm
11	0.85+1.46=2.31	5.08	1.72	sm
12	0.83+1.42=2.25	4.95	1.71	sm
13	0.97+1.21=2.18	4.79	1.25	m
14	0.85+1.19=2.04	4.48	1.40	m
15	0.66+1.21=1.87	4.11	1.83	sm
16	0.75+1.04=1.79	3.93	1.39	m

Table 46. *L. thomasiae*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.72+4.19=5.91	10.43	2.44	sm
2	0.40+1.31+4.02=5.73	10.11	2.35	sm
3	1.23+4.13=5.36	9.45	3.36	st
4	1.40+3.90=5.30	9.35	2.79	sm
5	1.23+3.45=4.68	8.26	2.80	sm
6	1.56+2.43=3.99	7.04	1.56	m
7	1.61+2.33=3.94	6.95	1.45	m
8	1.64+2.10=3.74	6.60	1.28	m
9	1.18+2.34=3.52	6.21	1.98	sm
10	1.21+2.11=3.32	5.86	1.74	sm
11	1.39+1.77=3.16	5.57	1.27	m
12	1.18+1.86=3.04	5.36	1.58	m
13	1.46+1.61=3.07	5.42	1.10	m
14	0.80+1.13=1.93	3.40	1.41	m

Table 47. *L. unicolor*, 2n = 16

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.01+1.28+5.75=8.04	13.61	2.51	sm
2	0.75+1.17+5.60=7.52	12.73	2.92	sm
3	1.45+3.99=5.44	9.21	2.75	sm
4	1.37+3.21=4.58	7.75	2.34	sm
5	1.26+2.18=3.44	5.82	1.73	sm
6	1.29+1.50=2.79	4.72	1.16	m
7	1.15+2.06=3.21	5.43	1.79	sm
8	1.03+2.00=3.03	5.13	1.94	sm
9	1.26+1.84=3.10	5.25	1.46	m
10	1.17+1.90=3.07	5.20	1.62	m
11	1.16+1.57=2.73	4.62	1.35	m
12	1.24+1.37=2.61	4.42	1.10	m
13	0.89+1.71=2.60	4.40	1.92	sm
14	0.93+1.60=2.53	4.28	1.72	sm
15	0.81+1.52=2.33	3.94	1.88	sm
16	0.90+1.15=2.05	3.47	1.28	m

Table 48. *L. unifolia*, 2n = 24

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.28+3.26=4.54	9.60	2.55	sm
2	0.91+2.96=3.87	8.18	3.25	st
3	1.02+1.58=2.60	5.50	1.56	m
4	0.75+1.83=2.58	5.45	2.44	sm
5	0.87+1.31=2.18	4.60	1.51	m
6	0.62+1.54=2.16	4.57	2.48	sm
7	0.76+1.52=2.28	4.82	2.00	sm
8	0.77+1.42=2.19	4.63	1.84	sm
9	0.77+1.49=2.26	4.78	1.93	sm
10	0.63+1.23=1.86	3.93	1.95	sm
11	0.55+1.16=1.71	3.62	2.11	sm
12	0.46+1.14=1.60	3.38	2.48	sm
13	0.47+1.21=1.68	3.55	2.57	sm
14	0.57+0.95=1.52	3.21	1.67	m
15	0.43+1.08=1.51	3.19	2.51	sm
16	0.62+0.88=1.50	3.17	1.42	iii
17	0.54+0.97=1.51	3.19	1.79	sm
18	0.60+0.89=1.49	3.15	1.48	m
19	0.49+0.94=1.43	3.02	1.92	sm
20	0.49+0.92=1.41	2.92	1.18	m
21	0.42+0.99=1.41	2.98	2.36	sm
22	0.59+0.78=1.37	2.90	1.32	m
23	0.41+0.96=1.37	2.90	2.34	sm
24	0.41+0.86=1.27	2.69	2.10	sm

Table 49. *L. variegata*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.20+6.43=7.63	13.02	5.36	st
2	1.68+4.38=6.06	10.34	2.61	sm
3	1.30+4.22=5.52	9.42	3.25	st
4	1.15+3.35=4.50	7.68	2.91	sm
5	1.19+3.23=4.42	7.54	2.71	sm
6	0.99+2.93=3.92	6.69	2.96	sm
7	1.05+2.70=3.75	6.40	2.57	sm
8	0.99+2.15=3.14	5.36	2.17	sm
9	0.96+0.95+1.62=3.53	6.02	0.85	(m)
10	0.82+0.96+1.64=3.42	5.83	0.92	(m)
11	1.28+2.24=3.52	6.00	1.75	sm
12	1.18+1.58=2.76	4.71	1.34	m
13	1.57+1.75=3.32	5.66	1.11	m
14	1.48+1.65=3.13	5.34	1.11	m

Table 50. *L. violacea*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.57+1.34+2.51=4.42	10.77	1.31	m
2	0.28+1.10+2.48=3.86	9.41	1.80	sm
3	1.33+2.14=3.47	8.46	1.61	m
4	1.51+1.89=3.40	8.29	1.25	m
5	1.26+2.18=3.44	8.39	1.73	sm
6	1.28+1.69=2.97	7.24	1.32	m
7	1.04+1.77=2.81	6.85	1.71	sm
8	1.03+1.54=2.57	6.26	1.50	m
9	0.80+1.97=2.77	6.75	2.46	sm
10	0.85+1.67=2.52	6.14	1.96	sm
11	0.84+1.42=2.26	5.51	1.69	m
12	0.74+1.38=2.12	5.17	1.86	sm
13	0.54+0.74+1.28=2.56	6.24	1.00	M
14	0.74+1.12=1.86	4.53	1.51	m

Table 51. *L. viridiflora*, 2n = 14

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.67+2.59=3.26	10.82	3.87	st
2	0.72+2.42=3.14	10.42	3.36	st
3	0.67+2.17=2.84	9.42	3.24	st
4	0.59+2.10=2.69	8.93	3.56	st
5	0.59+2.00=2.59	8.59	3.39	st
6	0.78+1.73=2.51	8.33	2.22	sm
7	0.67+1.26=1.93	6.40	1.88	sm
8	0.64+1.23=1.87	6.20	1.92	sm
9	0.59+1.19=1.78	5.91	2.02	sm
10	0.70+1.05=1.75	5.81	1.50	m
11	0.70+0.90=1.60	5.31	1.29	m
12	0.64+0.81=1.45	4.81	1.27	m
13	0.51+0.90=1.41	4.68	1.76	sm
14	0.58+0.74=1.32	4.38	1.28	m

Table 52. *L. zeyheri* (No.1), 2n = 22

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	0.72+2.37=3.09	9.31	3.29	st
2	0.64+2.28=2.92	8.80	3.56	st
3	0.83+1.15=1.98	5.97	1.39	m
4	0.58+1.11=1.69	5.09	1.91	sm
5	0.76+1.11=1.87	5.64	1.46	m
6	0.78+0.95=1.73	5.21	1.22	m
7	0.48+1.33=1.81	5.46	2.77	sm
8	0.38+1.24=1.62	4.88	3.26	st
9	0.57+0.85=1.42	4.28	1.49	m
10	0.63+0.70=1.33	4.01	1.11	m
11	0.57+0.78=1.35	4.07	1.37	m
12	0.52+0.70=1.22	3.68	1.35	m
13	0.38+0.92=1.30	3.92	2.42	sm
14	0.42+0.79=1.21	3.65	1.88	sm
15	0.45+0.71=1.16	3.50	1.58	m
16	0.45+0.73=1.18	3.56	1.62	m
17	0.53+0.60=1.13	3.41	1.13	m
18	0.45+0.73=1.18	3.56	1.62	m
19	0.42+0.60=1.02	3.07	1.43	m
20	0.43+0.57=1.00	3.01	1.33	m
21	0.47+0.54=1.01	3.04	1.15	m
22	0.47+0.54=1.01	3.04	1.15	m

Table 53. *L. zeyheri* (No.2), 2n = 23

Chromosome	Length (μm)	Relative length	Arm ratio	Form
1	1.26+3.54=4.80	9.22	2.81	sm
2	0.90+3.64=4.54	8.72	4.04	st
3	0.79+2.20=2.99	5.74	2.78	sm
4	0.88+1.88=2.76	5.30	2.14	sm
5	0.59+0.50+1.57=2.66	5.11	1.44	m
6	1.05+1.51=2.56	4.92	1.44	m
7	0.93+1.56=2.49	4.78	1.68	m
8	1.01+1.38=2.39	4.59	1.37	m
9	0.64+1.63=2.27	4.36	2.55	sm
10	0.62+1.29=1.91	3.67	2.08	sm
11	0.84+1.23=2.07	3.98	1.46	m
12	0.78+1.18=1.96	3.77	1.51	m
13	0.78+1.19=1.97	3.78	1.53	m
14	0.61+1.35=1.96	3.76	2.21	sm
15	0.84+1.02=1.86	3.57	1.21	m
16	0.67+1.11=1.78	3.42	1.66	m
17	0.56+1.11=1.67	3.21	1.98	sm
18	0.68+1.03=1.71	3.28	1.51	m
19	0.80+0.88=1.68	3.23	1.10	m
20	0.56+1.06=1.62	3.11	1.89	sm
21	0.62+1.02=1.64	3.15	1.65	m
22	0.62+0.93=1.55	2.98	1.50	m
23	0.58+0.64=1.22	2.34	1.10	m

Appendix II: Aligned nucleotide sequence of the ITS region in the nrDNA of *Lachenalia* (L.), *Massonia* (M.) and *Ornithogalum* (O.). Hyphens = gaps. Order of species follows Fig. 8.

	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>O. umbellatum</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCTGTGAACGCACCCGCGCGCCCGGAGCGC	GGGGGGAGGCATATGCCCCCT						
<i>M. depressa</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCGTCAACCCACTC	GTGGGGG	CGG	ATGGGGGGTC	TCGTGCGCCC			
<i>M. pustulata</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCGTCAACCCACTC	GTGGGGG	CGG	G	GGGGCGTC	TCGTGCGCCC		
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTAAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	A	GGGGCGCCATAGTGC	GCCCT		
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTAAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	A	GGGGCGCCATAGTGC	GCCCT		
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCTGTAAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	A	GGGGCGCCATAGTGC	GCCCT		
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCTGTAAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	A	GGGGCGCCATAGTGC	GCCCT		
<i>L. latifolia</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	AGGAGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. latimerae</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCTCCT			
<i>L. ensifolia</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAATCCCCC	GTGAGGA	TGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. longituba</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	TGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. paucifolia</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAA	CCCCC	GTGAGGA	TGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT		
<i>L. unifolia</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. juncifolia</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. zeyheri</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. bachmannii</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. liliflora</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. carnosae</i> (Clone1)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. carnosae</i> (Clone2)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. carnosae</i> (Clone3)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. contaminata</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. namaquensis</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. splendida</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. purpureo-coerulea</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. pallida</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. muirii</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. algoensis</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	AGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. arbutnotiae</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. longibracteata</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. orchinoides</i> v. <i>orchinoides</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. orchinoides</i> v. <i>glaucina</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. peersii</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TAGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. variegata</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. viridiflora</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. bulbifera</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. rubida</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. mutabilis</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGGGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			
<i>L. rosea</i>	TCGAGGCCCGAACGGAAGATCGTGAACCCAGTCAACCCCCC	GTGAGGA	CGG	TGTGGGCGCCATAGTGC	GCCCT			

	90	100	110	120	130	140	150	160
<i>O. umbellatum</i>	CCCCGCCCCG	CTCGGTG	CCCCGCGG	CTCCCCG	CCCCGCGC	CTCGCGGG	ACGGGCGG	GAGCCGAACA
<i>M. depressa</i>	TCTC	CGGCCTCG	TGAGGGGCC	CTAGGTGC	GCCTTCCC	CGCCTCGT	TGCGGGAC	CGGCGCAACATGA
<i>M. pustulata</i>	TCTC	CGGCCTCG	TGAGGGGCC	CTAGGTGC	GCCTTCCC	CGCCTCGT	TGCGGGAC	CGGCGCAACATGA
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	TTTC	CGGCCTCG	TGAGGGGGGCC	CTAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTAGTTGC	GGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	TTTC	CGGCCTCG	TGAGGGGGGCC	CTAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTAGTTGC	GGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	TTTC	CGGCCTCG	TGAGGGGGGCC	CTAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTAGTTGC	GGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	TTTC	CGGCCTCG	TGAGGGGGGCC	CTAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTAGTTGC	GGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. latifolia</i>	TTTC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	TACGCCGAACATGA
<i>L. latimerae</i>	TTCC	AGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGAGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. ensifolia</i>	TCCC	CAGCCTTG	CGGGGG	CCCCAGGTGC	AACCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GAAGCCGAACATGA
<i>L. longituba</i>	TCCC	CAGCCTTG	CGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GAAGCCGAACATGA
<i>L. paucifolia</i>	TCCC	CAGCCTTG	CGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GAAGCCGAACATGA
<i>L. unifolia</i>	TCCCC	CGCCTCG	TGCGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. juncifolia</i>	TCCCTC	CGCCTCG	TGCGGGGG	CCCCAGGTGC	CCCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCTGAACATGA
<i>L. zeyheri</i>	TCCCTC	CGCCTCG	TGCGGGGG	CCCCAGGTGC	CCCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. bachmannii</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. liliflora</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. carnosa</i> (Clone1)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. carnosa</i> (Clone2)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. carnosa</i> (Clone3)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. contaminata</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. namaquensis</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. splendida</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. purpureoerulea</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. pallida</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. muirii</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. algoensis</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. arbutnotiae</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. longibracteata</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. orchioides</i> v. <i>orchioides</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. orchioides</i> v. <i>glaucina</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. peersii</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. variegata</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. viridiflora</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. bulbifera</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. rubida</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. mutabilis</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA
<i>L. rosea</i>	TTCC	CGGCCTTGT	TGGGGG	CCCCAGGTGC	ACCCGCCTCG	CTTGTG	CGGGGCGGG	GACGCCGAACATGA

	170	180	190	200	210	220	230	240
<i>O. umbellatum</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACATTGCTTTA—	GGAGAGCGGAGGGCGCGG—	ACCGCTCAGGCGGACAAGG—	CG				
<i>M. depressa</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAATTCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGTCTTTTCTCCTT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>M. pustulata</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAATTCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTCTCCTT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAATGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAATGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. latifolia</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. latimerae</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. ensifolia</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. longituba</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. paucifolia</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. unifolia</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. juncifolia</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. zeyheri</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. bachmannii</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. liliflora</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. carnosa</i> (Clone1)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. carnosa</i> (Clone2)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. carnosa</i> (Clone3)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. contaminata</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. namaquensis</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. splendida</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. purpureocoerulea</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. pallida</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. muirii</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. algoensis</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. arbutnotiae</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. longibracteata</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. orchioides</i> v. <i>orchioides</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. orchioides</i> v. <i>glaucina</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. peersii</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. variegata</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. viridiflora</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. bulbifera</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. rubida</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. mutabilis</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				
<i>L. rosea</i>	CCCGGGCGCGTGGGCGCCAAGGAACAGTGCTTTT—	CGGAGAGCGTCGTTTGCCTTTTGCCTCT	GGAGGAGGAGG—	CG				

	250	260	270	280	290	300	310	320
<i>O. umbellatum</i>	CCCGAAGCGACCCCTTCTATACCGTAAACTTATAGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>M. depressa</i>	GACGGGGCGATCCCGCAATATCATGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>M. pustulata</i>	GACGGGGCGATCCTGCAATATCATTAACTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	GACGGGTGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	GACGGGTGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	GACGGGTGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	GACGGGTGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. latifolia</i>	GACGGGGTGATCCTGTGATA-CGTGAATTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. latimerae</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. ensifolia</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. longituba</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. paucifolia</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. unifolia</i>	GACGGGGTGATCCTGTAACA-ATTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. juncifolia</i>	GACGGGGTGATCCTGTGATA-ATTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. zeyheri</i>	GACGGGGTGATCCTGTGATA-ATTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. bachmannii</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. liliflora</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. carnosa</i> (Clone1)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. carnosa</i> (Clone2)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. carnosa</i> (Clone3)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. contaminata</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. namaquensis</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. splendida</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. purpureocoerulea</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	GACGGAGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	GACGGGGTTATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	GACGGGGTTATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. pallida</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. muirii</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. algoensis</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. arbutnotiae</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. longibracteata</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. orchioides</i> v. <i>orchioides</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. orchioides</i> v. <i>glaucina</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. peersii</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. variegata</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. viridiflora</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. bulbifera</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. rubida</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. mutabilis</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAATTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							
<i>L. rosea</i>	GACGGGGTGATCCTGTAATA-CGTGAACCTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT							

	330	340	350	360	370	380	390	400
<i>O. umbellatum</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>M. depressa</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>M. pustulata</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. latifolia</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. latimerae</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. ensifolia</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. longituba</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. paucifolia</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. unifolia</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. juncifolia</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. zeyheri</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. bachmannii</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. liliflora</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. carnosae</i> (Clone1)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. carnosae</i> (Clone2)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. carnosae</i> (Clone3)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. contaminata</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. namaquensis</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. splendida</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. purpureoerulea</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	AACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. pallida</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. muirii</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. algoensis</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. aloides</i> v. <i>quadriflorae</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. arbutnotiae</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. longibracteata</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. orchioideae</i> v. <i>orchioideae</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. orchioideae</i> v. <i>glaucina</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. peersii</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. variegata</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. viridiflora</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. bulbifera</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. rubida</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. mutabilis</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							
<i>L. rosea</i>	AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT							

	410	420	430	440	450	460	470	480
<i>O. umbellatum</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCCTCAGCTCGCTCCGCGCGCGCGCTCCCC							
<i>M. depressa</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATTGCGTCGCTTCGCGTACCCCTATGTCCTCCGCGTAGTGTGGGTGGC							
<i>M. pustulata</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATTGTCGCTTCGCGTACCCCTATGTCCTCCGCGTAGTGTGGGTGGC							
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCACAACGCGGGTGGC							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCACAACGCGGGTGGC							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCACAACGCGGGTGGC							
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCACAACGCGGGTGGC							
<i>L. latifolia</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. latimerae</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. ensifolia</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAAGTGCGGGTGGC							
<i>L. longituba</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. paucifolia</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-C—CCATTGCGGGTGGC							
<i>L. unifolia</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. juncifolia</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. zeyheri</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. bachmannii</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. liliflora</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCATGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. carnosa</i> (Clone1)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. carnosa</i> (Clone2)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. carnosa</i> (Clone3)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. contaminata</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. namaquensis</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. splendida</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. purpureoerulea</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. pallida</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. muirii</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCATGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	CCGGCCGAGGGCAC—CCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. algoensis</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. arbutnotiae</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. longibracteata</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. orchioides</i> v. <i>orchioides</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. orchioides</i> v. <i>glaucina</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. peersii</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGT							
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGT							
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. variegata</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. viridiflora</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. bulbifera</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. rubida</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							
<i>L. mutabilis</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCATGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCT-CCACCTAGTGCGGATGGC							
<i>L. rosea</i>	CCGGCCGAGGGCACGCGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTTCGCGTACCCACGTCC-CCGCCAGTGCGGGTGGC							

	490	500	510	520	530	540	550	560
<i>O. umbellatum</i>	—GGCGGGTGCGGAAGCGGAGATTGGCCCTCCGTGCCTCGCGGCGCGG—	CTGGTTGAAGTGCGGGCCGTCGCTCGGGTC						
<i>M. depressa</i>	TATG—CGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTC						
<i>M. pustulata</i>	TATG—CGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCACCCGTGCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTC						
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. latifolia</i>	GGCGGCGAAGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTC						
<i>L. latimerae</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. ensifolia</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. longituba</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. paucifolia</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. unifolia</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. juncifolia</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. zeyheri</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. bachmannii</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. liliflora</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. carnosae</i> (Clone1)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. carnosae</i> (Clone2)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. carnosae</i> (Clone3)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. contaminata</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. namaquensis</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. splendida</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. purpureoerulea</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. pallida</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. muirii</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	GGCG—GACGCGGACGCGGATATTGACCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	AGCG—GACGCGGACGCGGATATTGACCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	CGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. algensis</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. aloides</i> v. <i>quadrifolia</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. arbutifolia</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. longibracteata</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. orchioideae</i> v. <i>orchioideae</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. orchioideae</i> v. <i>glaucina</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. peersii</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. variegata</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. viridiflora</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. bulbifera</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. rubida</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. mutabilis</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						
<i>L. rosea</i>	GGCGGCGGACGCGGACGCGGATATTGGCCCCCGTGCCCTCGCGGCGCGG—	TGGGTCGAAGTGCGGGCCGCGCGGGTT						

	570	580	590	600	610	620	630	640
<i>O. umbellatum</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGCAAAACGCACGGCGCTGAG	CGCCGCGGACCATC	GACCCAAAGCGGCGACGCAAGGAAC					
<i>M. depressa</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCCGAA	CGCCGCGGACTCCC	GGTCTAACTGCCTAATGCAACGAAC					
<i>M. pustulata</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCCGAA	CGCCGCGGACTCCC	GGTCTAAGTGCCCTAATGCAACGAAC					
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. latifolia</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCC	GGCTCTAG--CTAGCGCCAAGGAAC					
<i>L. latimerae</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCACGGACCCCC	GGCTCTAGCGCC--AATGCAAGGAAC					
<i>L. ensifolia</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCAAGCGCCGAACGCAAGGAAC					
<i>L. longituba</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAACGCAAGGAAC					
<i>L. paucifolia</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. unifolia</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCCTAATGCAAGGAAC					
<i>L. juncifolia</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCCTAATGCAAGGAAC					
<i>L. zeyheri</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGTGCCGAACGCAAGGAAC					
<i>L. bachmannii</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. liliiflora</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. carnosa</i> (Clone1)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. carnosa</i> (Clone2)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. carnosa</i> (Clone3)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. contaminata</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. namaquensis</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. splendida</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. purpureocoerulea</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGATCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGATCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGATCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGATCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGATCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. pallida</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGATCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. muirii</i>	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGCCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCC--AATGCAAGGAAC					
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGA--TGCAAGGAAC					
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	GGACGCGGCGTGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. algoensis</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCC--AGTGAAGGAAC					
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. arbutnotiae</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. longibracteata</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. orchioides</i> v. <i>orchioides</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. orchioides</i> v. <i>glaucina</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. peersii</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. variegata</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. viridiflora</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. bulbifera</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. rubida</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. mutabilis</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					
<i>L. rosea</i>	GGACGCGGCGAGTGGTGGACGGAACGCACGGCGCAAAA	CGTCGCGGACCCCC	GGCTCTAGCGCCGAATGCAAGGAAC					

	650	660	670	(Database accession)
<i>O. umbellatum</i>	CCACGCCGCGGGGGCCGACAGGCTC	CCTCGGAAA		(AB305009)
<i>M. depressa</i>	CCATTCTGACGGGAGCCAGTTAGCTC	CCTCAGACC		(AB305007)
<i>M. pustulata</i>	CCATTCTGACGGGAGCCAGTTAGCTC	CCTCAGACC		(AB305008)
<i>L. hirta</i> 'TypeA'	CCACTCTGACGGGAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB304982)
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone2)	CCACTCTGACGGGAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB439273)
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone1)	CCACTCCGACGGGAGCCAACGAGCTC	CATCGGACC		(AB439272)
<i>L. hirta</i> 'TypeB' (Clone3)	CCACTCCGACGGGAGCCAACGAGCTC	CATCGGACC		(AB439274)
<i>L. latifolia</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304984)
<i>L. latimerae</i>	CCACTCCGACGTGAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304985)
<i>L. ensifolia</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCTCGGACC		(AB305010)
<i>L. longituba</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCTCGGACC		(AB305011)
<i>L. paucifolia</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCTCGGACC		(AB305012)
<i>L. unifolia</i>	CCACTCCGAAGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305003)
<i>L. juncifolia</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304983)
<i>L. zeyheri</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305004)
<i>L. bachmannii</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304979)
<i>L. liliflora</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304986)
<i>L. carnosae</i> (Clone1)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB439269)
<i>L. carnosae</i> (Clone2)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB439270)
<i>L. carnosae</i> (Clone3)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB439271)
<i>L. contaminata</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304981)
<i>L. namaquensis</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304990)
<i>L. splendida</i>	CCACTCCGATGGAAGC-AACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305002)
<i>L. pustulata</i> 'TypeA'	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB304998)
<i>L. pustulata</i> 'TypeB'	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB304999)
<i>L. purpureoerulea</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB304995)
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone1)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB439277)
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone2)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB439278)
<i>L. unicolor</i> 'TypeA' (Clone3)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB439279)
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone1)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB439280)
<i>L. unicolor</i> 'TypeB' (Clone2)	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB439281)
<i>L. pallida</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	CCTCGGACC		(AB304993)
<i>L. muirii</i>	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304988)
<i>L. pusilla</i> 'TypeA'	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304996)
<i>L. pusilla</i> 'TypeB'	CCACTCCGATGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304997)
<i>L. algoensis</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304971)
<i>L. aloides</i> v. <i>aloides</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304972)
<i>L. aloides</i> v. <i>aurea</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304973)
<i>L. aloides</i> v. <i>quadricolor</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304974)
<i>L. aloides</i> v. <i>vanzyliae</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304975)
<i>L. aloides</i> 'Lutea'	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304976)
<i>L. aloides</i> 'Pearsonii'	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304977)
<i>L. arbutnotiae</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304978)
<i>L. longibracteata</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304987)
<i>L. orchioides</i> v. <i>orchioides</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304992)
<i>L. orchioides</i> v. <i>glaucina</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304991)
<i>L. peersii</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304994)
<i>L. reflexa</i> (Clone1)	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB439282)
<i>L. reflexa</i> (Clone3)	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB439276)
<i>L. reflexa</i> (Clone2)	CTACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB439275)
<i>L. variegata</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305005)
<i>L. viridiflora</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305006)
<i>L. bulbifera</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304980)
<i>L. rubida</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305001)
<i>L. mutabilis</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCAACGAGCTC	TCTCGGACC		(AB304989)
<i>L. rosea</i>	CCACTCCGACGGGAAGCCATCGAGCTC	TCTCGGACC		(AB305000)

Karyomorphological comparison in two taxa of *Chelidonium* (Papaveraceae) in Altai and Japan*

Genjiro Ishida¹⁾

アルタイ産と日本産のクサノオウ属（ケシ科）の核形態学的比較 *

石田 源次郎¹⁾

Abstract. The karyotype of *Chelidonium majus* L. var. *majus* in Altai area was compared with the karyotype of *C. majus* L. var. *asiaticum* (Hara) Ohwi in Japan. The chromosome number of *C. majus* var. *majus* in Altai area was $2n=12$, and the chromosome number of *C. majus* var. *asiaticum* in Japan was $2n=10$. *C. majus* var. *majus* in Altai area showed a homogeneous and symmetric karyotype, while *C. majus* var. *asiaticum* in Japan showed a low homogeneous and low symmetric karyotype.

Introduction

Genus *Chelidonium* L., the family Papaveraceae, consists of the single species. *Chelidonium majus* L. is a perennial herbaceous plant, and distributes widely in Europe, North Africa and East Asia. The group distributed in Europe and North Africa is considered to be an elementary species (*C. majus* L.), and the group distributed in East Asia is treated as a subspecies (*C. majus* L. subsp. *asiaticum* Hara) or a variety [*C. majus* L. var. *asiaticum* (Hara) Ohwi]. Thus, it is treated as a variety.

Chelidonium majus L. var. *majus* in Altai District and Altai Republic, South Siberia, Russia is found around a roadside and a house. The growth environments of *C. majus* L. var. *majus* in Altai area are approximately similar to those of *C. majus* L. var. *asiaticum* (Hara) Ohwi in Japan.

A capsule of *C. majus* var. *majus* grows in linear column form of 3-4 cm in length obediently and produces many seeds, while a capsule of *C. majus* var. *asiaticum* does not lengthen obediently, because it produces some immaturity ovules. Previous cytological work showed that the maturity of pollen of *C. majus* var. *asiaticum* in Japan was low and 70% of them were sterile (Shimizu, 1977).

The chromosome number of *C. majus* var. *majus* was reported in $2n = 12$ (Hill, 1989. Krahulcova, 1982. Strid and Franzen, 1983) and *C. majus* var. *asiaticum* was counted in $2n = 10$ (Nishikawa, 1985. Probatova and Sokolovskaya, 1986).

In this report, the karyotype of *C. majus* var. *majus* in Altai area was studied in detail and was compared with the karyotype of *C. majus* var. *asiaticum* in Japan.

Material and Methods

The seeds of *C. majus* L. var. *majus* collected at the roadside in Altai area were sown in September 2008 and the seedlings were used as materials for chromosome observations.

Chelidonium majus L. var. *asiaticum* (Hara) Ohwi which was used for chromosome observations was collected in Hiroshima prefecture and was cultivated repeatedly at the Hiroshima Botanical Garden.

* Contribution from the Hiroshima Botanical Garden No. 93.

1) The Hiroshima Botanical Garden.

Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden, No. 29 : 91-96, 2011.

Somatic chromosomes were observed by staining the meristematic cells from root tips according to the aceto-orcein squash method by Tanaka and Kamemoto (1960), with a slight modification. Growing root tips were cut into small pieces in about 2-3 mm thickness. The pieces were immersed in 0.002M 8-hydroxyquinoline for 4 h at 18°C, fixed in 45% acetic acid for 10 min at 5°C, hydrolyzed (treated) in a mixture of 1N hydrochloric acid and 45% acetic acid (2:1) for 30 sec at 60°C, and then, they were stained and squashed in 1% aceto-orcein solution.

The chromosomes at a resting stage were morphologically studied by observing their condensed figures and classified into the types as defined and proposed by Tanaka (1971, 1980).

The chromosomes at a mitotic metaphase were arranged in descending order in length and numbered starting from 1, thus grading the chromosomes from the longest to the shortest. Long and short arm lengths for each chromosome were measured and the ratios of the long- to the short-arm lengths were calculated. According to Levan *et al.* (1964), the arm ratios from 1.0 to 1.7 are median, those from 1.8 to 3.0 are submedian, and those from 3.1 to 7.0 are subterminal. The karyotype formulas were based on the chromosome lengths and positions of centromeres according to Tanaka (1980).

Results

The chromosomes at a resting stage, a prophase and a metaphase of two taxa are shown in Fig. 1. The properties of a mitotic metaphase chromosome after measuring and analyzing are shown in Table 1 and 2. The chromosomes at metaphase arranged in long order are shown in Fig. 2.

C. majus L. var. *majus*

The chromosome number of *C. majus* var. *majus* in Altai area at a mitotic metaphase was $2n=12$, which confirmed the previous reports (Hill, 1989. Krahulcova, 1982. Strid and Franzen, 1983).

This nucleus at a resting stage was 10 μm in diameter and the chromosomes were observed as chromomeric granules, fibrous threads and chromatin blocks scattered throughout the nucleus. The chromosome features at a resting stage were of the complex chromocenter type according to Tanaka's classification (1971). In contrast, the chromosomes at a mitotic prophase shaped several early condensed segments located in the interstitial, proximal and terminal regions of both arms.

The $2n=12$ chromosomes during a mitotic metaphase showed a gradual decrease in length from the longest (5.3 μm) to the shortest (4.0 μm).

Among the 12 chromosomes, eight chromosomes (Nos. 1-4, 7, 8, 11, 12) had the arm ratios from 1.2-1.6 and had centromeres at the median regions, whereas four chromosomes (Nos. 5, 6, 9, 10) had the ratios from 1.9-2.8 and their centromeres at the submedian regions. Four chromosomes (Nos. 5-8) were accompanied with a satellite at the distal end of the short arm.

C. majus L. var. *asiaticum* (Hara) Ohwi

The chromosome number of *C. majus* var. *asiaticum* at mitotic metaphase was $2n=10$, which confirmed the previous reports (Nishikawa, 1985. Probatova and Sokolovskaya, 1986).

The chromosomes at a resting stage and a mitotic prophase of *C. majus* var. *asiaticum* were morphologically similar to those of *C. majus* var. *majus* described above.

The $2n=10$ chromosomes during a mitotic metaphase showed a gradual decrease in length from the longest (6.1 μm) to the shortest (4.1 μm).

Among the ten chromosomes, two chromosomes (Nos. 3, 4) had the arm ratios from 1.2-1.6 and had centromeres at the median regions, whereas six chromosomes (Nos. 1, 2, 5-8) had the ratios from 1.8-2.3 and their centromeres at the submedian regions. Two chromosomes (Nos. 9, 10) gave the ratio of 3.1 having the centromeres at the subterminal

regions. Four chromosomes (Nos. 5-8) were accompanied with a satellite at the distal end of the short arm.

Discussion

12 chromosomes of *C. majus* var. *majus* were constructed in $2n=12$ (8m+4sm), and each of six pairs of chromosomes showed homology.

Thus, this variety showed a homogeneous and symmetric karyotype.

In contrast, ten chromosomes of *C. majus* var. *asiaticum* were constructed in $2n=10$ (2m+6sm+2st), and there were not two small size chromosomes which existed in *C. majus* var. *majus*.

Among five pairs of chromosomes of *C. majus* var. *asiaticum*, three pairs (Nos. 1-2, 3-4, 5-6) showed not homology.

Thus, this variety showed a low homogeneous and low symmetric karyotype.

Four chromosomes (Nos. 5-8) were accompanied with a satellite in the distal end of the short arm in both taxa. And the satellites appeared with Nos. 5-6 chromosomes clearly with two taxa, but a tendency to be lacking in the vividness was seen in the satellite of Nos. 7-8 chromosomes.

Thus, the observation for karyomorphology supports the phenomena with a lot of unripe ovules and the low pollen fertility in *C. majus* var. *asiaticum*.

The karyotypic comparison of two taxa indicated that *C. majus* var. *asiaticum* might be more progressive than *C. majus* var. *majus*, because a symmetry of the chromosome length of the long arm and the short arm of *C. majus* var. *majus* was higher than that of *C. majus* var. *asiaticum*.

Further investigation of the karyotype of the plants in different localities is necessary to clarify a reason of heterogeneous syndesis of *C. majus* var. *asiaticum*, and to clarify relationship between *C. majus* var. *majus* and *C. majus* var. *asiaticum*.

Acknowledgements. The author is cordial thanks to Professor Katsuhiko Kondo, Tokyo University of Agriculture, for giving me a chance to study the plants in Altai area. I am gratefully thanks to Dr. A. I. Shimakov and Dr. S. Smirnov, South-Siberian Botanical Garden, Altai state University, for helping in the field trip in Altai. I am very thankful to Dr. Yoshikazu Hoshi, Faculty of Agriculture, Tokai University and Dr. Tetsuya Sera of the Hiroshima botanical garden for having given their appropriate advice on my manuscript. This study was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research Program (A) 19255004 by Japan Society for the Promotion of Science (Representative: K. Kondo).

Literature Cited

- Hill, L.. M. 1989. IOPB chromosome data I. Int. Organ. Pl. Biosyst. Newslett. (Zurich) 13: 17-19.
- Krahulcova, A. 1982. Cytotaxonomic study of *Chelidonium majus* L. s. l. Folia Geobot. Phytotxa. 17: 237-268.
- Levan, A., K. Fredge, and A. A. Stanberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- Nishikawa, T. 1985. Chromosome counts of flowering plants of Hokkaido (9). J. Hokkaido Univ. Educ., Sect. 2B 36: 25-40.
- Probatova, N. S. & A. P. Sokolovskaya. 1986. Chromosome numbers of the vascular plants from the far east of the USSR. Bot. Zurn. 71: 1572-1575.
- Shimizu, T., 1977. *Chelidonium*. In Asahi Encyclopedia 'Plants of the World'. 63: 1477-1478. Asahi-shinbunsha. Tokyo
- Strid, A. & R. Franzen. 1983. Chromosome numbers in flowering plants from Greece. Willdenowia 13: 329-333.
- Tanaka, R. & H. H. Kamemoto 1960. Meiotic chromosome behavior in diploid and polyploid *Vanda* orchid hybrids. Cytologia 25: 405-418.
- Tanaka, R. 1971. Types of resting nuclei in Orchidaceae. Bot. Mag. Tokyo 84: 118-122.

Tanaka, R. 1980. The karyotype. In Kihara, H. (ed.), Plant genetics 1, pp. 335-358. Shokabo Co., Tokyo. (In Japanese).

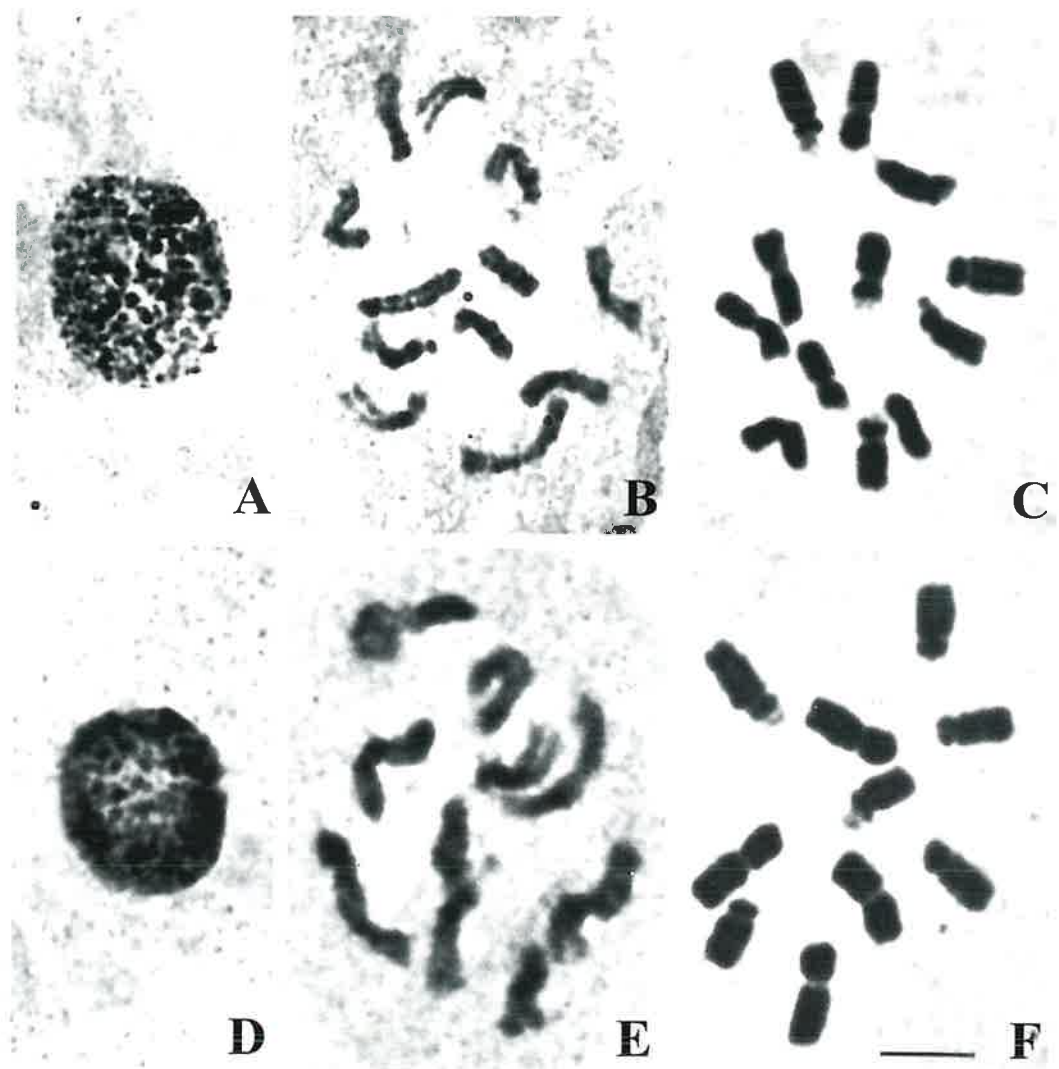


Fig. 1. Somatic chromosomes of two taxa of *Chelidonium*.
A-C. *C. majus* var. *majus*, $2n=12$. D-F. *C. majus* var. *asiaticum*, $2n=10$. A and D. resting stage. B and E. mitotic prophase. C and F. mitotic metaphase. Bar indicates $5\mu\text{m}$.

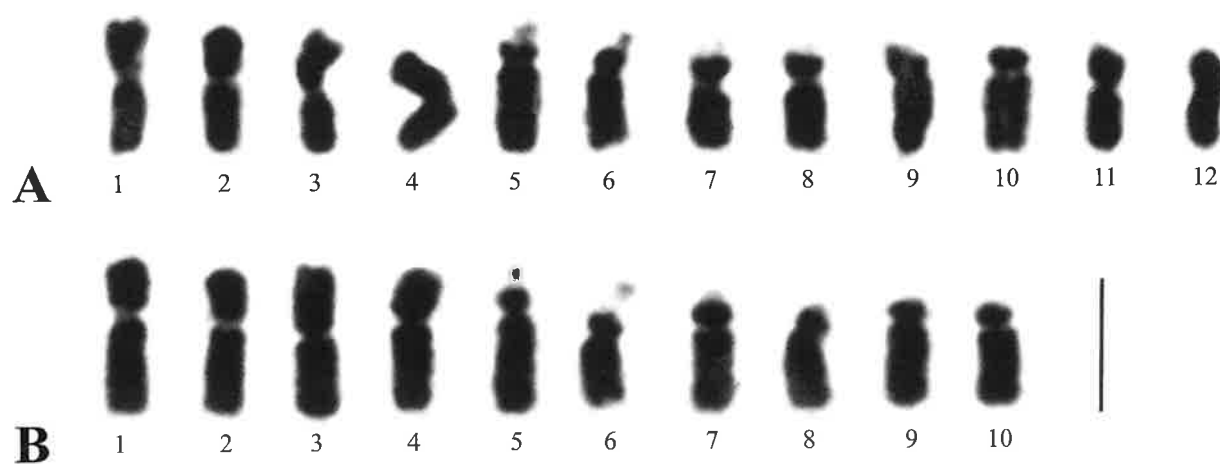


Fig. 2. Metaphase chromosomes alignments of two taxa of *Chelidonium*.

A. *C. majus* var. *majus*, $2n=12$. B. *C. majus* var. *asiaticum*, $2n=10$. Bar indicates 5 μm.

Table 1. Measurements of somatic chromosomes of *Chelidonium majus* var. *majus* at mitotic metaphase, $2n=12$

Number of arranged chromosome order	Chromosome length (μm)				Relative length	Arm ratio	Form
	satellite	short arm	long arm	total length			
1		2.3	3.0	5.3	7.1	1.3	m
2		2.3	3.0	5.3	7.1	1.3	m
3		2.1	2.6	4.7	6.3	1.2	m
4		2.1	2.6	4.7	6.3	1.2	m
5*	0.7	0.9	3.1	4.7	6.3	1.9	sm
6*	0.7	0.9	3.1	4.7	6.3	1.9	sm
7*	0.5	1.1	2.6	4.2	5.6	1.6	m
8*	0.5	1.1	2.6	4.2	5.6	1.6	m
9		1.1	3.1	4.2	5.6	2.8	sm
10		1.1	3.1	4.2	5.6	2.8	sm
11		1.6	2.4	4.0	5.3	1.5	m
12		1.6	2.4	4.0	5.3	1.5	m

*: Chromosome with secondary constriction

Table 2. Measurements of somatic chromosomes of *Chelidonium majus* var. *asiaticum* at mitotic metaphase, $2n=10$

Number of arranged chromosome order	Chromosome length (μm)				Relative length	Arm ratio	Form
	satellite	short arm	long arm	total length			
1		2.1	4.0	6.1	8.7	1.9	sm
2		2.1	3.7	5.8	8.3	1.8	sm
3		2.6	3.1	5.7	8.2	1.2	m
4		2.1	3.4	5.5	7.9	1.6	m
5*	0.7	0.9	3.7	5.3	7.6	2.3	sm
6*	0.7	0.9	3.1	4.7	6.7	1.9	sm
7*	0.5	1.0	3.1	4.6	6.6	2.1	sm
8*	0.5	1.0	3.1	4.6	6.6	2.1	sm
9		1.0	3.1	4.1	5.9	3.1	st
10		1.0	3.1	4.1	5.9	3.1	st

*: Chromosome with secondary constriction

名 称	広島市植物公園紀要第 29 号
主 管 課 所 在 地	財団法人広島市動植物園・公園協会植物公園 広島市佐伯区倉重三丁目 495 〒 731-5156 TEL(082)922-3600
発 行 年 月 日	平成 23 年 2 月 28 日
印 刷 会 社 名	株式会社 ニシキプリント

広島市植物公園 紀要

第 29 号

2 0 1 1

広島市植物公園