科学通报 2009 年 第 54 卷 第 14 期: 2089 ~ 2095
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

利用 8 个基因的DNA序列探讨南洋杉科的系统发育关系和起源时间

刘念[①], 朱勇[①], 魏宗贤[②], 陈婕[①], 王庆彪[①], 简曙光[④], 周党卫[⑤], 施婧[①], 杨永[⑥], 钟扬[①③*]

① 复旦大学生命科学学院, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433;
② 中国科学院、江西省庐山植物园, 庐山 332900;
③ 上海生物信息技术研究中心, 上海 201203;
④ 中国科学院华南植物园, 广州 510650;
⑤ 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;
⑥ 中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室, 北京 100093
* 联系人, E-mail: yangzhong@fudan.edu.cn

2009-01-16 收稿, 2009-03-27 接受
国家自然科技资源平台(批准号: 2005DKA21403)、科技基础性工作专项(批准号: 2007FY110100)、上海市科学技术委员会基金(批准号: 07XD14025)、上海市重点学科(批准号: B111)、复旦大学研究生创新基金(批准号: EYH1322098)和国家大学生创新性实验计划(批准号: J0630643)资助项目

摘要 南洋杉科是最原始的松杉纲类群之一, 其系统发育关系与起源(分支)时间研究具有极为重要的意义. 利用自行测定和 GenBank 中获得的核核糖体 18S 和 26S, 叶绿体 16S, *rbc*L, *mat*K 和 *rps*4 以及线粒体 *cox* I 和 *atp*1 等 8 个基因的 DNA 序列, 构建了南洋杉科的分子系统树, 确定该科属间系统发育关系应为((瓦勒迈杉属, 贝壳杉属), 南洋杉属). 以瓦勒迈杉属和南洋杉属 Araucaria 族和 *Eutacta* 族的化石记录作为时间标定, 估计南洋杉科的起源在(308 ± 53)百万年前, 即该科在石炭纪晚期起源, 而非以往认为的三叠纪. 用相同基因组合还估计出南洋杉属起源于(246 ± 47) 百万年前, 贝壳杉属起源于(61 ± 15)百万年前. 对不同基因所构建的系统树进行统计分析并对它们所估计的起源时间进行比较表明, 叶绿体 *mat*K 和 *rps*4 基因较为适合南洋杉科的系统发育与起源时间估计研究.

关键词
南洋杉科
系统发育
起源时间

南洋杉科(Araucariaceae)一直被认为是最原始的松杉纲类群. 现存南洋杉科植物主要分布于南半球热带和亚热带地区(包括澳洲、新西兰、新几内亚、新喀里多尼亚和其他南太平洋岛屿及南美洲). 化石证据表明, 该科植物在中生代时期曾广泛分布于南北半球, 而在晚白垩纪后逐渐在北半球消亡. 因而, 研究南洋杉科的起源与分化将有助于我们了解古大陆地质气候变化过程.

南洋杉科包括南洋杉属(*Araucaria*)、贝壳杉属(*Agathis*)和瓦勒迈杉属(*Wollemia*), 共 41 种 1 变种 [1]. 其中, 1994 年发现的单属种瓦勒迈杉曾轰动一时 [2,3], 被喻为“如同在地球上发现了一只活恐龙”, 因为化石证据表明白垩纪时期该种植物就存活于地球上 [4], 它在澳大利亚新南威尔士瓦勒迈国家公园被发现时仅存 26 株成年个体和 14 株幼苗. 瓦勒迈杉在形态学上兼有南洋杉属和贝壳杉属的特征 [5], 具南洋杉属 *Eutacta*族的种鳞整体形状, 而与种鳞分离的具翅种子则与贝壳杉属相似 [6].

近年来, 分子系统学为确定南洋杉科三属间存有争议的系统发育关系提供了新的途径. Setoguchi等

引用格式: 刘念, 朱勇, 魏宗贤, 等. 利用 8 个基因的 DNA 序列探讨南洋杉科的系统发育关系和起源时间. 科学通报, 2009, 54: 2089~2095
Liu N, Zhu Y, Wei Z X, et al. Phylogenetic relationships and divergence times of the family Araucariaceae based on the DNA sequences of eight genes. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0373-2

人 [7]利用叶绿体*rbc*L基因构建了包括瓦勒迈杉、10 种贝壳杉和 19 种南洋杉的系统树, 其中瓦勒迈杉为南洋杉科的基出支, 而贝壳杉属和南洋杉属为姊妹群, 这一结果为许多古生物学家所接受 [8,9]. 然而, 也有许多学者不同意此观点 [10,11], 认为贝壳杉属与瓦勒迈杉构成姊妹群, 而南洋杉属为该科的基出类群. 造成上述争议的原因有二: 一是构树所选择的外类群不同. 松杉纲(Coniferopsida)曾被认为是单系类群 [11,12], 但也有人认为是并系类群 [13,14]. 在既往研究中, 松科(Pinaceae)、金松科(Sciadopityaceae)、罗汉松科(Podocarpaceae)和柏科(Cupressaceae)均被认为是南洋杉科的近缘类群 [13,15~18]. Setoguchi等人 [7]采用杉科、柏科和罗汉松科作为外类群, 而其他研究则直接采用分析整个松杉纲甚至裸子植物门的方法来研究南洋杉科的系统发育 [10,11]. 二是构树所依据的基因不同. 既往研究均采用单一基因, 用不同基因所构建的系统树在拓扑结构上很可能不一致. 有鉴于此, 我们在世界范围内收集南洋杉科的代表种, 利用核核糖体 18S和 26S, 叶绿体 16S, *rbc*L, *mat*K和*rps*4 以及线粒体*cox* Ⅰ和*atp*1 基因序列构建多基因联合系统树, 并以瓦勒迈杉属和南洋杉属*Araucaria*族和*Eutacta*族的化石时间作为标定来估计南洋杉科的起源时间. 此外, 讨论了上述 8 个基因对南洋杉科系统发育重建与起源时间估计的影响.

1 材料和方法

(ⅰ) 实验材料. 瓦勒迈杉由澳大利亚瓦勒迈杉国际有限公司提供; 智利南洋杉由德国汉堡植物园提供. 其余样品包括南洋杉科 7 种, 三尖杉科、红豆杉科、金松科各 1 种, 罗汉松科、杉科、柏科和松科各 2 种均采自华南植物园. 凭证标本存于复旦大学生物多样性研究所. 新鲜叶片采集后迅速在硅胶中干燥, 供 DNA 提取及测序使用.

(ⅱ) 总DNA 提取. 采用CTAB方法 [19].

(ⅲ) 序列扩增与测定. 引物序列参照文献 [14, 20~22]或自行设计合成. 反应体积为 50 μL, 包括 1 μL DNA 模板, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 1×PCR缓冲液, 1 μmol/L 引物, 2.5 U *Taq*酶. DNA 片段扩增程序为: 94℃, 5 min; 94℃, 0.5 min, 45~56℃, 0.5 min, 72℃, 1.5~2 min, 35 个循环; 72℃, 7 min. 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切下经试剂盒回收后, 克隆至pMD19-T载体, 经ABI 377DNA自动测序仪测序. 序列数据均递交至NCBI数据库, GenBank收录号见表 1.

(ⅳ) 序列分析与统计检验. 用CLUSTAL X 软件 [23]对包括南洋杉科在内的松杉纲 9 科 15 属植物的 8 个基因序列分别进行对位排列, 用Modeltest 3.7 软件估算最佳模型参数 [24], 用PHYML软件构建单基因和多基因联合最大似然(ML)树 [25], 自展次数为 1000. 在单基因或联合树(图 1)中, 南洋杉科均聚为一支; 叶枝杉与罗汉松科聚成一支, 其中叶枝杉处于基出位置; 以上两大支为姊妹群, 它们之间的自展支持率除*atp*1 基因较低为 56%外, 其余自展支持率在 80%~100%之间, 说明叶枝杉、罗汉松科与南洋杉科亲缘关系最近. 据此选择叶枝杉作为外类群, 以PAUP 4.0 对南洋杉科构建 8 个基因的单基因ML树和联合ML树 [26], 自展次数为 100.

将南洋杉科系统树归为((贝壳杉, 瓦勒迈杉), 南洋杉)、(贝壳杉, (瓦勒迈杉, 南洋杉))和(瓦勒迈杉, (贝壳杉, 南洋杉)) 3 种树形, 以PAUP 4.0 软件分别穷举得到限定树形下各基因的最佳树, 计算该树及序列每位点的"–lnL"值, 然后采用CONSEL软件进行AU (approximately unbiased)、NP (non-scaled bootstrap probability)、BP (bootstrap probability)、PP (Bayesian posterior probability)、KH (Kishino-Hasegawa)、SH (Shimodaira-Hasegawa)、WKH (weighted Kishino-Hasegawa)和WSH (weighted Shimodaira-Hasegawa)等统计检验 [27].

(ⅴ) 南洋杉科的起源时间估计. 瓦勒迈杉的形态鉴别特征为具有类似南洋杉属的种鳞和与贝壳杉属相似的具翅种子 [6]. 报道最早的瓦勒迈杉化石为位于晚侏罗纪地层的*Agathis jurassica*[4], 但Chambers等人 [6]认为该叶片化石还需进一步确认. Chambers等人 [6]发现澳大利亚Strzelecki地层(Barremian-Aptian)的南洋杉科植物大化石具有类似南洋杉属的种鳞和与贝壳杉属相似的具翅种子, 可归为瓦勒迈杉属. 因而, 我们在本研究中将其作为时间标定依据.

我们在所获得的联合ML树上, 以瓦勒迈杉化石时间(118 百万年前) [6]和南洋杉属*Araucaria*族和*Eutacta*族的化石记录时间(98.9~142.0 百万年前)[28]为标定点, 以PAML4.1 软件中的MCMCTREE程序估计南洋杉科起源时间 [29]. 作为对照, 我们同时采用Beast1.41 软件、r8s1.71 软件和PAML4.1 软件中的Baseml程序以不同模型算法对南洋杉科的起源时间

表 1　本研究所用序列及其 GenBank 登录号

科名	物种/属 [a)]	18S	26S	*rbc*L	*mat*K	*rps*4	*cp*16S	*cox*I	*atp*1
南洋杉科	白贝壳杉 *Agathis alba*	EU164976[b)]	EU165000[b)]	EU164984[b)]	EU164995[b)]	EU165030[b)]	EU164989[b)]	EU165023[b)]	EU165017[b)]
南洋杉科	贝壳杉 *Agathis dammara*	EU164977[b)]	EU165001[b)]	U96477	EU164996[b)]	EU165031[b)]	EU164987[b)]	EU165024[b)]	EU165016[b)]
南洋杉科	昆士兰贝壳杉 *Agathis robusta*	EU164978[b)]	EU165002[b)]	AF249665	AF456371	EU165032[b)]	EU164988[b)]	EU165025[b)]	EU165018[b)]
南洋杉科	智利南洋杉 *Araucaria araucana*	FJ179543	FJ179544	AF249664	AF456373	FJ179545	DQ629437	FJ179546	FJ179547
南洋杉科	大叶南洋杉 *Araucaria bidwillii*	EU164979 [b)]	EU165003[b)]	ABU87751	EU164997[b)]	EU165033[b)]	EU164993[b)]	EU165026[b)]	EU165022[b)]
南洋杉科	巴西南洋杉 *Araucaria angustifolia*	EU164980[b)]	EU165004[b)]	EU164985[b)]	EU164998[b)]	EU165034[b)]	EU164994[b)]	EU165027[b)]	EU165021[b)]
南洋杉科	肯氏南洋杉 *Araucaria cunninghamii*	EU164981[b)]	EU165005[b)]	EU164986[b)]	EU164999[b)]	EU165035[b)]	EU164990[b)]	EU165028[b)]	EU165020[b)]
南洋杉科	异叶南洋杉 *Araucaria heterophylla*	EU164982[b)]	EU165006[b)]	U96462	AF456374	AY188260	EU164991[b)]	AF020558	AF209104
南洋杉科	瓦勒迈杉 *Wollemia nobilis*	EU164983[b)]	EU165007[b)]	U87757	AF456377	EU165036[b)]	EU164992[b)]	EU165029[b)]	EU165019[b)]
叶枝杉科	叶枝杉属 *Phyllocladus*	U87300	EU161339[b)]	AF249654	AF280997	AY188258	DQ629439	AF020573	DQ646219
罗汉松科	竹柏属 *Nageia*	D16447	EU161315[b)]	AF249648	AB023990	AY188248	EU161544[b)]	DQ478773[b)]	EU161400[b)]
罗汉松科	罗汉松属 *Podocarpus*	U87301	DQ008664	AF307931	AF228111	AY188252	EU161550[b)]	AF020575	AF197620
柏科	扁柏属 *Chamaecyparis*	EF053165	EU161307[b)]	L12570	AB030132	AY188283	EU161522[b)]	EF053140	EU161379[b)]
柏科	刺柏属 *Juniperus*	D38243	EU161311[b)]	AF119182	AB030136	AY188279	U24586	AF020567	AF209106
松科	冷杉属 *Abies*	X79407	EU161347[b)]	X58391	AF143441	AY188224	EU161508[b)]	AF020556	DQ646224
松科	云杉属 *Picea*	DQ987890[b)]	EU161351[b)]	X58136	AB161012	AY188226	EU161546[b)]	DQ987880[b)]	EU161403[b)]
三尖杉科	三尖杉属 *Cephalotaxus*	D38241	EU161354[b)]	AF456387	AF457108	AY188264	EU161520[b)]	AF020559	DQ646222
红豆杉科	红豆杉属 *Taxus*	DQ478811[b)]	EU161462[b)]	AF456388	DQ478791[b)]	X84145	EU161474[b)]	AF020579	DQ646221
杉科	柳杉属 *Cryptomeria*	D85304	EU161341[b)]	AJ621937	AB030117	AY188272	EU161523[b)]	DQ478768[b)]	EU161380[b)]
杉科	水杉属 *Metasequoia*	EF053174	EU161306[b)]	AJ235805	AF152203	EF053201	EU161540[b)]	AF020569	AF197619
金松科	日本金松 *Sciadopitys verticillata*	D85292	EU161318[b)]	L25753	AB023994	AY188262	EU161554[b)]	AF020576	EU161409[b)]

a) 以属名标示的序列来自同属不同种植物; b) 本研究自测序列

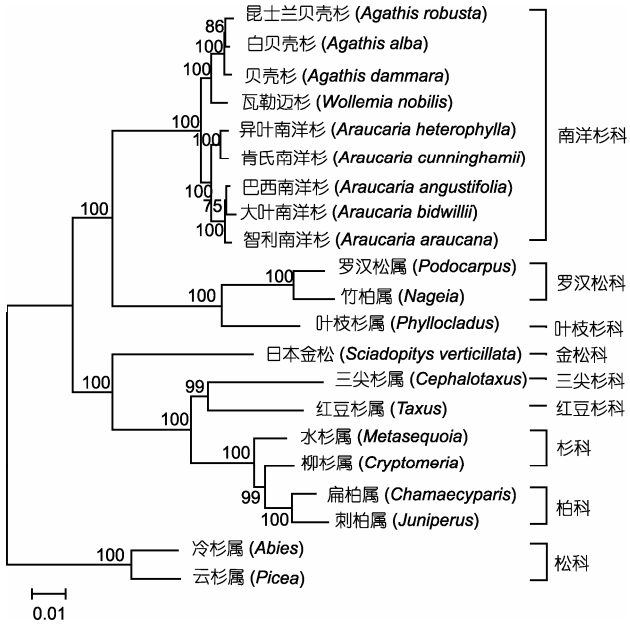


图 1 杉纲的 8 个基因联合 ML 树

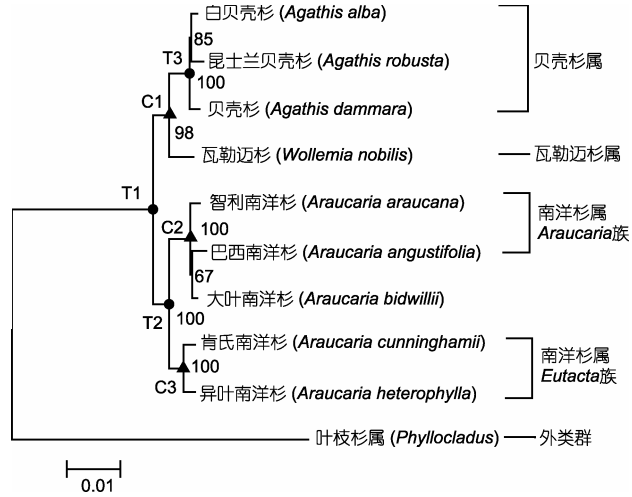


图 2 南洋杉科 8 个基因联合 ML 树

C1, 瓦勒迈杉化石标定点 118 百万年前; C2, 南洋杉属 *Araucaria* 族化石标定点 98.9~142.0 百万年前; C3, 南洋杉属 *Eutacta* 族化石标定点 98.9~142.0 百万年前. T1: (308±53) 百万年前; T2, (246±47) 百万年前; T3, (61±15)百万年前

进行估计.

2 结果

对南洋杉科 3 属 9 种所构建的 8 个单基因 ML 树中, 18S 基因树支持瓦勒迈杉与南洋杉属聚为一支, 自展支持率 69%; 26S 基因树中瓦勒迈杉与贝壳杉属聚为一支, 支持率 90%, 但南洋杉属分辨率不高, 多为平行支; 叶绿体核糖体 16S 基因树分辨率低, 除贝壳杉属聚为一支外, 支持率 90%, 其余都成为平行支; *rbc*L 基因树中南洋杉属、贝壳杉属和瓦勒迈杉分别聚成支, 后两者成姊妹群, 但支持率较低(61%); *mat*K 和 *rps*4 基因树分辨率高, 三属分别聚成单系, 并强烈支持贝壳杉属和瓦勒迈杉为姊妹群, 支持率分别为 98%和 93%; *atp*1 基因树中瓦勒迈杉位于南洋杉科的基出位置, 南洋杉属与贝壳杉属互为姊妹群, 支持率 100%; *cox* Ⅰ基因树中贝壳杉属和瓦勒迈杉为姊妹群, 支持率 92%. 8 种基因的联合 ML 树分辨率最高, 三属分别聚成单系, 支持率均为 100%, 并强烈陆支持贝壳杉属与瓦勒迈杉聚为一支, 支持率为 98% (图 2).

由于叶绿体 16S 序列系统发育树的分辨率太低, 无法归类于 3 种基本树形内进行统计检验. 其他基因中, 18S, *rbc*L 和 *cox* Ⅰ基因都有两种以上树形的 AU 检验 $P > 0.1$; 26S, *atp*1, *mat*K 和 *rps*4 基因统计检验结果中只有一种 AU 检验 $P > 0.95$, 其余两种树形 AU 检验 $P < 0.05$(表 2). 其他统计检验与 AU 检验结果相似.

采用 PAML4.1 中的 MCMCTREE 程序计算获得南洋杉科平均起源时间为(308 ± 53) 百万年前, 南洋杉属为(246 ± 47) 百万年前, 贝壳杉属为(61 ± 15) 百万年前(图 2). 8 个基因序列与联合序列分别估计出的南洋杉科起源时间见表 3. 此外, 利用 Beast, r8s 和 Baseml 等程序以不同模型算法对南洋杉科的起源时间估计结果也在表 3 中列出. 其中, Beast 的估计结果与 MCMCTREE 相近, 而 r8s 和 Baseml 程序因采用了不同算法不能取得一致的可信结果.

3 讨论

本研究选用了分别来自核、叶绿体和线粒体基因组的 8 个基因序列以构建南洋杉科系统树. 多基因联合分析结果强烈支持瓦勒迈杉更接近于贝壳杉属, 即南洋杉科三属之间的系统发育关系应为((瓦勒迈杉属, 贝壳杉属), 南洋杉属), 而Setoguchi等人 [7]的研究结果可能是选取了错误外类群和*rbc*L基因树分辨率过低所致.

从各基因系统发育树统计检验结果来看, 叶绿体 16S, *rbc*L 和线粒体 *cox* Ⅰ基因序列虽然最支持((瓦勒迈杉属, 贝壳杉属), 南洋杉属)系统树, 但也不拒绝((瓦勒迈杉属, 南洋杉属), 贝壳杉属)或(瓦勒迈杉属, (南洋杉属, 贝壳杉属))两种系统树; 而 26S, *mat*K, *rps*4 和 *atp*1 基因的统计检验结果则有显著意义, 如

表 2　不同基因树的统计检验结果

构树序列	系统发育关系 a)	AU 检验	NP 检验	BP 检验	PP 检验	KH 检验	SH 检验	WKH 检验	WSH 检验
	a	0.151	0.198	0.189	0.019	0.187	0.19	0.187	0.315
18S	**b**	**0.907**	**0.782**	**0.795**	**0.977**	**0.813**	**0.875**	**0.813**	**0.855**
	c	0.016	0.047	0.016	0.005	0.104	0.112	0.104	0.195
	a	**0.978**	**0.937**	**0.939**	**0.999**	**0.917**	**0.917**	**0.917**	**0.917**
26S	b	0.022	0.063	0.04	4.00E-04	0.083	0.083	0.083	0.083
	c	0.022	0.063	0.023	4.00E-04	0.083	0.083	0.083	0.083
	a	0.006	0.008	0.008	4.00E-06	0.02	0.02	0.02	0.02
*atp*1	b	0.006	0.008	0	4.00E-06	0.02	0.02	0.02	0.02
	c	**0.994**	**0.992**	**0.992**	**1**	**0.98**	**0.98**	**0.98**	**0.98**
	a	**0.879**	**0.85**	**0.851**	**0.962**	**0.856**	**0.901**	**0.856**	**0.892**
*cox*I	b	0.064	0.021	0.02	0.012	0.08	0.082	0.08	0.159
	c	0.174	0.129	0.129	0.026	0.144	0.144	0.144	0.239
	a	**0.974**	**0.967**	**0.967**	**1**	**0.957**	**0.966**	**0.957**	**0.964**
*mat*K	b	0.046	0.034	0.028	6.00E-05	0.043	0.043	0.043	0.046
	c	0.009	0.007	0.006	3.00E-05	0.031	0.031	0.031	0.077
	a	**0.788**	**0.644**	**0.646**	**0.611**	**0.74**	**0.77**	**0.74**	**0.77**
*rbc*L	b	0.273	0.184	0.182	0.197	0.26	0.276	0.26	0.461
	c	0.265	0.175	0.172	0.192	0.259	0.275	0.259	0.449
	a	**0.998**	**0.952**	**0.977**	**0.999**	**0.939**	**0.939**	**0.939**	**0.939**
*rps*4	b	0.002	0.048	0.023	3.00E-04	0.061	0.061	0.061	0.061
	c	0.002	0.048	0.023	3.00E-04	0.061	0.061	0.061	0.061
	a	**0.979**	**0.978**	**0.978**	**1**	**0.974**	**0.987**	**0.974**	**0.981**
多基因联合	b	0.025	0.022	0.022	4.00E-08	0.026	0.026	0.026	0.043
	c	0.002	4.00E-04	2.00E-04	7.00E-10	0.005	0.005	0.005	0.011

a) 叶绿体核糖体 16S 基因树平行支过多，不能归类于下述 3 种树形之中，不进行统计检验: a, ((贝壳杉，瓦勒迈杉)，南洋杉); b, (贝壳杉, (瓦勒迈杉，南洋杉)); c, (瓦勒迈杉, (贝壳杉，南洋杉)). 粗体所示为该基因一致 ML 树与相关统计检验结果

*rps*4 基因树 3 种树形的检验 *P* 值分别为 0.998，0.002 和 0.002，即瓦勒迈杉与南洋杉属或南洋杉属与贝壳杉属为姊妹群的假设同时被拒绝，只有瓦勒迈杉与贝壳杉属为姊妹群的假设成立. 同样, 26S 和 *mat*K 基因也支持该结论. 然而 *atp*1 基因树的检验结果拒绝瓦勒迈杉与南洋杉属或瓦勒迈杉与贝壳杉属为姊妹群的假设，该结果与其他基因相悖，原因还有待进一步探讨. 考虑到 26S 基因树的分辨率偏低，*mat*K 和 *rps*4 为适合于构建南洋杉科系统发育树的基因.

上述 8 个基因对南洋杉科平均起源时间的估计结果也有所不同. 可以看出，8 个基因联合系统发育树估计的南洋杉科平均起源时间为(308 ± 53)百万年前；而以基因树分辨率低的序列如核 26S，叶绿体 16S 和树形不够可靠的 *rbc*L 基因估计出的起源时间都偏近，分别为(160 ± 24)、(164 ± 48)和(256 ± 64)百万年前；而其他基因估计的起源时间都在 300 百万年前，且相互较接近，说明树分辨率高、树形相对可靠的基因序列适合用于估计起源时间. 值得一提的是，目前用于估计分歧时间的程序较多，而各程序间的估算结果可能有较大差异. 我们的研究表明，采用贝叶斯算法的 MCMCTREE 和 Beast 结果相近，较为合理可靠.

我们估计南洋杉科植物起源于(308±53 百万年前(石炭纪晚期)，但南洋杉科植物化石普遍处于三叠纪(205~250 百万年前)[30~32]. 实际上，化石往往滞后于真正的起源时间. 再考虑南洋杉科起源于原始松杉类植物，原始松杉类植物自石炭纪始已经出现，二叠纪之后开始广泛分布. 此外，原始松杉类植物化石木与南洋杉类植物化石木极为相似，难以区分，以至于二叠纪时期的化石木多用南洋杉型木(*Araucarioxylon*)命名. 因而，南洋杉科完全有可能在石炭纪晚期开始从原始松杉类植物分化. 我们认为，南洋杉科的起源时间可能在石炭纪，而非以往认为的三叠纪. 本研究也为进一步重建裸子植物系统发育关系和估计裸子植物起源时间提供了线索.

表 3　不同基因对南洋杉科起源时间的估计(单位：百万年前)

类群	软件	算法	18S	26S	*cp*16S	*mat*K	*rbc*L	*rps*4	*cox*I	*atp*1	联合树
南洋杉科	**Paml4.1**	**Bayesian**	**320±57**	**160±24**	**164±48**	**338±53**	**256±64**	**327±57**	**352±49**	**340±55**	**308±53**
	BEAST[a)]	Bayesian	297±1.43	150±1.64	154±1.87	308±1.77	250±1.31	308±1.45	329±1.89	326±1.55	285±1.62
	r8s	NPRS	349±78	154±64	135±99	303±83	300±124	267±89	389±76	506±222	323±68
	Paml4.1	Local Clock	313±420	137±266	118±1	148±58	118±1	221±115	809±425	410±370	158±38
	Paml4.1	Globe Clock	318±145	129±20	118±1	261±56	134±23	195±71	485±144	152±29	/
南洋杉属	**Paml4.1**	**Bayesian**	**237±54**	**119±11**	**137±27**	**264±55**	**203±49**	**271±56**	**281±58**	**271±59**	**246±47**
	BEAST*	Bayesian	211±1.47	119±1.34	124±1.64	258±1.32	185±1.21	257±1.63	267±1.55	246±1.35	232±1.17
	r8s	NPRS	220±54	122±58	135±66	227±39	193±47	267±40	310±43	239±123	225±47
	Paml4.1	Local Clock	273±991	101±408	118±1	71.8±36	61±12	181±152	693±495	321±322	93±32
	Paml4.1	Globe Clock	215±122	91±23	118±1	152±45	85±24	146±78	341±120	101±32	/
贝壳杉属	**Paml4.1**	**Bayesian**	**69±25**	**105±11**	**76±25**	**65±22**	**64±19**	**65±27**	**81±32**	**57±36**	**61±15**
	BEAST*	Bayesian	62±0.54	88.3±0.56	65±0.46	59±0.47	50±0.27	53±0.60	76±0.61	49±0.22	56±0.34
	r8s	NPRS	84±26	93±39	52±25	89±22	36±20	37±15	105±27	23±13	39±24
	Paml4.1	Local Clock	29±22	92±15	45±21	35±14	25±8	28.5	46±26	0	38±6
	Paml4.1	Globe Clock	35±24	91±15	45±20	41±12	34±9	28±20	34±18	0	/

a) Beast 软件结果表示为 $\overline{X}\pm$SE，软件表示为 $\overline{X}\pm$SD

致谢　　长谷川政美教授对本文提供宝贵意见.

参考文献

1 Farjon A. World Checklist and Bibliography of Conifers. 2nd ed. Richmond: Royal Botanic Gardens, 2001
2 Anonymous. “Australia Hails a Prehistoric Pine” and “‘Fossil Tree’ Reveals Full Splendour.” Nature, 1994, 372: 712, 719
3 Anderson I. Pine ‘dinosaur’ Lurks in Gorge. New Scientist, 1994, 144 (1957/1958): 5
4 Andrew S. *Wollemia nobilis*: A Living Fossil and Evolutionary Enigma. Institute for Creation Research, 2006, http://www.icr.org/article/2707/
5 Jones W G, Hill K D, Allen J M. *Wollemia nobilis*, a new living Australian genus and species in the Araucariaceae. Telopea, 1995, 6: 173—176
6 Chambers T C, Drinnan A N, McLoughlin S. Some morphological features of wollemi pine (*Wollemia nobilis*: Araucariaceae) and their comparison to Cretaceous plant fossils. Int J Plant Sci, 1998, 159: 160—171[doi]
7 Setoguchi H, Ohsawa T A, Pintaud J C, et al. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on *rbc*L gene sequences. Am J Bot, 1998, 85: 1507—1516[doi]
8 Kershaw P, Wagstaff B. The southern conifer family Araucariaceae: History, status, and value for palaeoenvironmental reconstruction. Ann Rev Ecol Syst, 2001, 32: 397—414[doi]
9 Cantrill D J, Raine J I. *Wairarapaia mildenhallii* gen. et spec. nov., a new *Araucaria*n cone related to *Wollemia* from the Cretaceous (Albian-Cenomanian) of New Zealand. Int J Plant Sci, 2006, 167: 1259—1269[doi]
10 Gilmore S, Hill K D. Relationships of the Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*) and a molecular phylogeny of the Araucariaceae. Telopea, 1997, 7: 275—291
11 Stefanovi S, Jager M, Deutsch J, et al. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. Am J Bot, 1998, 85: 688—697[doi]
12 Rydin C, Källersjö M, Friis E M. Seed plant relationships and the systematic position of Gnetales based on nuclear and chloroplast DNA: Conflicting data, rooting problems and the monophyly of conifers. Int J Plant Sci, 2002, 163: 197—214[doi]
13 Chaw S M, Parkinson C L, Cheng Y, et al. Seed plant phylogeny inferred from all three-plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4086—4091[doi]
14 Bowe M, Coat G, Claude W D. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales closest relatives are conifers. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4092—4097[doi]
15 Hart J A. A cladistic analysis of conifers: preliminary results. J Arnold Arboretum, 1987, 68: 269—307
16 Price R A, Thomas J, Strauss S, et al. Familial relationships of the conifers from *rbc*L sequence data. Am J Bot, 1993, 80: 172[doi]
17 Miller C N. The origin of modern conifer families. In: Beck C B, ed. Origin and Evolution of Gymnosperms. New York: Columbia University Press, 1988. 448—486[doi]
18 Nixon K C, Crepet W L, Stevenson D, et al. A reevaluation of seed plant phylogeny. Ann Missouri Bot Gard, 1994, 81: 484—533
19 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11—15
20 Rydin C, Pedersen K R, Friis E M. On the evolutionary history of *Ephedra*: Cretaceous fossils and extant molecules. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 16571—16576[doi]
21 Ickert-Bond S M, Wojciechowski M E. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Gnetales): Evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence data. Syst Bot, 2004, 29: 834—849[doi]
22 Gernano J, Klein A S. Species-specific nuclear and chloroplast single nucleotide polymorphisms to distinguish *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. rubens*. Theor Appl Genet, 1999, 99: 37—49[doi]
23 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustaX windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 24: 4876—4882[doi]
24 Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 1998, 14: 817—818[doi]
25 Guindon S, Lethiec F, Duroux P, et al. PHYML Online - a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. Nucleic Acids Res, 2005, 33(Suppl): W557—W559[doi]
26 Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic anlysis using parsimony (* and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003
27 Shimodaira H, Hasegawa M. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. Bioinformatics, 2001, 17: 1246—1247[doi]
28 Hill R S, Brodribb T J. Southern conifers in time and space. Austr J Bot, 1999, 47: 639—696[doi]
29 Yang Z. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1586—1591[doi]
30 de Jersey N. Triassic spores and pollen grains from the Clematis Sanstone. Geol Surv Queensland Austr Publ, 1968, 338(Palaeont): 14, 1—44
31 Bamford M K, Philippe M. Jurassic-Early Cretaceous Gondwanan homoxylous woods: a nomenclatural revision of the genera with taxonomic notes. Rev Palaeobot Palynol, 2001, 113: 287—297[doi]
32 Pires E F, Guerra-Sommer M. *Sommerxylon spiralosus* from the Upper Triassic in southernmost Parana Basin (Brazil): a new taxon with taxacean affinity. Anais Acad Bras Cien, 2004, 76: 595—609