

红豆杉科及相关类群叶绿体 *rbcL* 基因与 *trnL trnF* 间隔区序列的分支分析^{*}

王 艇, 苏应娟, 郑 博, 李雪雁
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 运用对 PCR 产物克隆后测序和对 PCR 产物直接测序的方法对红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科 16 种植物的叶绿体 *rbcL* 基因和 *trnL-trnF* 基因间隔区序列进行了测定。选用 PAUP 软件分别对 *rbcL* 基因、*trnL trnF* 间隔区和 *rbcL* 基因—*trnL trnF* 间隔区联合数据矩阵进行分支分析, 结果显示: ① 穗花杉属以置于红豆杉科内为宜, 将穗花杉属独立成科的意见未得到支持; ② 三尖杉属内篦子三尖杉地位特殊, 赞同成立篦子三尖杉组; ③ 罗汉松科属单系群, 竹柏类应归属罗汉松科, 不同意将其从该科中分离出来成立新科竹柏科; ④ 不支持红豆杉科独立成目, 其单生单轴球果可能是由复合双轴球果减化而来。

关键词: 红豆杉科; 三尖杉科; 罗汉松科; *rbcL* 基因; *trnL trnF* 间隔区; 系统发育

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 04-0070-05

红豆杉科 (Taxaceae)、三尖杉科 (Cephalotaxaceae) 和罗汉松科 (Podocarpaceae) 是认识裸子植物系统发育历程的重要类群。它们的分类地位、相互间的系统关系、科内属间和属下等级的分类学处理均争议颇多, 其中部分问题可称得上是裸子植物系统学研究中争论最久的难题。红豆杉科的胚珠单生于侧短枝末端, Florin 强调这属于原始特征, 可追溯至泥盆纪的 Psilophytales, 主张将红豆杉科单独分离出来成立红豆杉目 (Taxales), 处理成一支和银杏目 (Ginkgoales)、Cordaitales 及松杉目 (Coniferales) 平行演化的谱系^[1, 2]。然而, 与此相反, Chamberlain, Takhtajan, Harris 等^[3-5] 提出, 红豆杉科的末端生单胚珠球果是复合双轴球果经过减化并由侧部迁移至顶端位置衍生而来, 不同意将红豆杉科提升为目。历史上, 三尖杉科曾被包括在红豆杉科内。Neger 根据雌球花的特征提出成立三尖杉科, 只包括三尖杉属 (*Cephalotaxus*) 一属。目前虽然多数学者认为红豆杉科、三尖杉和罗汉松科之间存在较为密切的联系, 但是它们之间更为细致的演化关系仍待确定。在科内水平上, 一些亟待澄清的系统学问题主要有: 红豆杉科内白豆杉属 (*Pseudotaxus*)、穗花杉属 (*Amentotaxus*) 的分类处理及其与科内其它成员间的关系; 三尖杉科三尖杉属内是否成立篦子三尖杉组 (Sect. *Pectinata*); 罗汉松科内具平行叶脉的竹柏类的分类地位和系统发育更是为近

年的研究所关注。

迄今为止, 红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科的研究已在形态学、比较解剖、胚胎发育、孢粉学、化石、植物化学、核型分析、同工酶和等位酶等方面积累了许多资料^[6-13]。运用 PCR-RFLP 和 DNA 测序等方法, 从分子系统学角度对这些类群进行研究的工作也有一些报道^[14-16], 所选择的基因包括 *rbcL*、*matK*、和 rDNA。叶绿体 *rbcL* 基因的进化速率适于科以上分类阶元的系统学分析, 而位于同一基因组的 *trnL trnF* 基因间隔区由于是非编码序列, 进化速率快, 可能适合探讨属间或属下等级的亲缘关系。为此, 本文尝试对 *rbcL*、*trnL trnF* 间隔区和由前两者联合构建的数据矩阵分别进行分支分析, 目的是: ① 对所重建出的系统发育关系进行相互比较; ② 对红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科的一些系统分类问题从分子系统学的角度予以讨论。

1 材料和方法

1.1 材料来源

本研究所用植物材料, 如粗榧 *Cephalotaxus sinensis* (Rehd. et Wils.) Li, 海南粗榧 *Cephalotaxus hainanensis* Li, 三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f., 篦子三尖杉 *Cephalotaxus oliveri* Mast., 红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd, 云南红豆杉 *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu, 南方红豆杉 *Taxus chinensis* var.

* 收稿日期: 2002-02-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39700117, 30170789), 广东省自然科学基金资助项目 (970176)

作者简介: 王 艇 (1969-), 男, 副教授; E-mail: jsswt@zsu.edu.cn

mairi(Lemee et Lev.), 云南穗花杉 *Amentotaxus yunnanensis* Li, 穗花杉 *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger, 云南榧树 *Torreya yunnanensis* Cheng et L. K. Fu, 白豆杉 *Pseudotaxus chienii* (Cheng) Cheng, 罗汉松 *Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) D. Don, 百日青 *Podocarpus neriifolius* D. Don, 鸡毛松 *Podocarpus imbricatus* Bl., 陆均松 *Dacrydium pierrei* Hickel 采自中国科学院华南植物园内, 样品株数为 3 株; 竹柏 *Podocarpus nagi* (Thunb.) Zoll. et Mor. 采自中山大学校园内, 样品株数为 3 株; 黑松(*Pinus thunbergii* Parl.) 序列取自 GenBank(登录号为 D17510)。

1.1 总 DNA 提取

总 DNA 提取方法采用改进的 CTAB 法^[17]。

1.2 试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 100 bp DNA Ladder 购自 Genda Technology Corp., Canada; PCR 反应在 Perkin Elmer Centus 公司 2400 型热循环仪上进行。

1.3 PCR 扩增反应

每 100 μL PCR 反应体积中包括: 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris HCl; 1.5 mmol/L MgCl₂; φ = 0.1% Triton X-100; dNTP 各 0.2 mmol; 模板用量为 50~100 ng; 2.0 单位 Taq DNA 聚合酶; 引物各 40 pmol。扩增 *rbcL* 基因引物参考 GenBank 中已报道序列设计, 引物 1: 5'ATGTCACCACAAACAGAGACT 3', 引物 2: 5'CCTTCATTACGAGCTTGCACAC 3'。扩增 *trnL trnF* 间隔区引物采用 Taberlet 等的设计^[18], 引物 1: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3', 引物 2: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。*rbcL* PCR 反应程序为: 94℃1 min, 54℃2 min, 72℃3 min, 总计 35 个循环; 末次循环 72℃延伸 10 min。*trnL trnF* 间隔区 PCR 反应程序为: 94℃30 s, 60℃30 s, 72℃90 s, 总计 25 个循环; 末次循环 72℃延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测其分子量。

1.5 低熔点琼脂糖回收 PCR 产物

w=1.0%琼脂糖凝胶 1×TAE 电泳 2 h, 在所需条带前填充低熔点琼脂糖, 回收 PCR 产物。

1.6 克隆测序

回收所得 PCR 产物与 pUC mT 载体连接, 转化导入由大肠感菌 DH-5α 所制的感受态细胞中, 采用蓝白斑筛选法获得克隆。应用质粒电泳和酶切的方法确定阳性克隆。所得阳性克隆在 ABI377 自动测序仪上测序。

1.7 PCR 扩增产物直接测序

取 PCR 产物 5 μL 测序, 测序引物与 PCR 反应引物相同。

1.8 数据处理

序列比对用 CLUSTALX 软件自动完成。新测序列报送 GenBank (登录号 AB083229—AB083244)。分支分析采用 PAUP 4.0 软件^[19] 进行。外类群选取黑松。运用 Treeview 软件绘制分支图。

2 结 果

将测得的红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科 16 种植物叶绿体 *rbcL* 基因序列同黑松的相应序列比对后得到能提供 174 个信息位点的矩阵; *trnL trnF* 基因间隔区比对后得到有 543 个信息位点的矩阵; 将 *rbcL* 基因与 *trnL trnF* 基因间隔区数据联合后比对得到的数据矩阵提供 717 个信息位点。

对 *rbcL* 基因序列数据进行启发式搜寻获得 6 个最简约树, 步长 1 091; 对 *trnL trnF* 基因间隔区序列数据搜寻获得 2 个最简约树, 步长 1 267; 而对 *rbcL* 基因和 *trnL trnF* 间隔区序列联合构建的数据矩阵进行分析得到惟一最简约树, 步长 2 361。分别对 3 种数据矩阵进行 Bootstrap 分析, 重复 1 000 次。图 1—3 分别给出了由各数据矩阵求出的严格一致树与惟一最简约树。

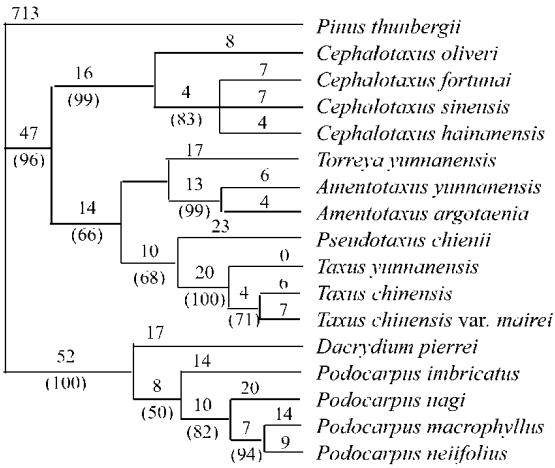


图 1 对 *rbcL* 基因序列进行最简约分析得到的严格一致树

Fig. 1 Strict consensus tree derived from maximum parsimony analysis of *rbcL* gene sequences
树长 1 091, CI 为 0.903, RI 为 0.818

比较 *rbcL* 基因和 *trnL trnF* 基因间隔区序列的分支分析结果 (图 1, 2) 发现: 两者相同之处是所研究的各属都属单系群, 罗汉松科 (包括竹柏类) 的单系性也得到有力支持 (bootstrap 值均为 100%); 而最明显的不同之处是三尖杉科与红豆杉科的分支式样以及白豆杉属在分支图中的位置。在图 1 中, 三尖杉科和红豆杉科互为姊妹群并得到有

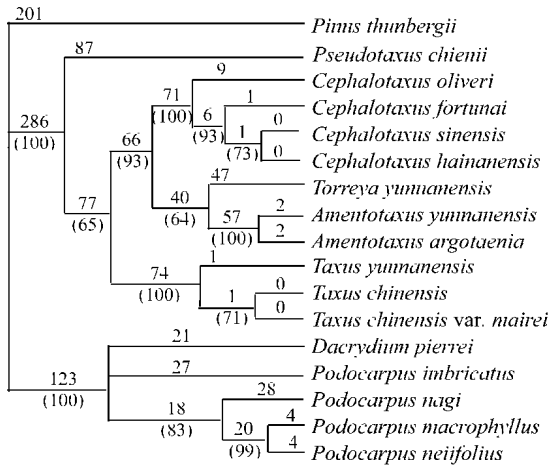


图 2 对 *trnL trnF* 基因间隔区序列进行最简约分析得的严格一致树。

Fig. 2 Strict consensus tree derived from maximum parsimony analysis of *trnL trnF* intergenic spacer sequences
树长 1 274, CI 为 0.811, RI 为 0.900

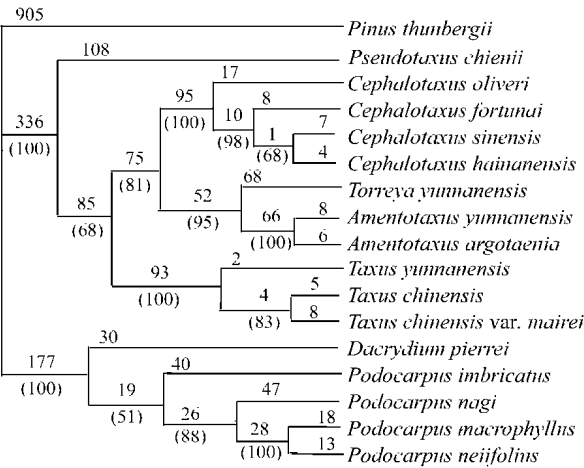


图 3 对 *rbcL* 基因和 *trnL trnF* 基因间隔区序列联合数据矩阵进行分析得到的惟一最简约树

Fig. 3 Single maximum parsimonious tree derived from combined analysis of *rbcL* gene and *trnL trnF* intergenic spacer sequences
树长 2 361, CI 为 0.855, RI 为 0.885

力支持 (bootstrap 值 96%), 白豆杉属为红豆杉属姊妹群但支持强度较弱 (bootstrap 值 68%)。然而, 在图 2 中, 三尖杉科的成员却同红豆杉科中的云南榧树 (*Torreya yunnanensis*)、云南穗花杉 (*Amentotaxus yunnanensis*) 和穗花杉 (*Amentotaxus argotaenia*) 组成一分支且得到有力支持 (bootstrap 值 93%), 该分支又和红豆杉属构成姊妹群 (支持强度较弱, bootstrap 值 65%); 而白豆杉属则成为由三尖杉科和红豆杉科所有其余成员构成的分支的姊妹群, 并得到 Bootstrap 分析 100% 支持。

对 *rbcL* 基因和 *trnL trnF* 间隔区联合数据矩阵

的最简约法分析结果与对 *trnL trnF* 间隔区数据单独进行分析求出结果的结果相同 (图 2, 3)。在由前者得到的分支图中, 各分支的 Bootstrap 支持强度均获增加, 只有两个分支例外。

3 讨论

3.1 穗花杉属与白豆杉属的系统位置

对于穗花杉属 (*Amentotaxus*) 的分类意见主要有: ①Pilger 根据雄球果的复合性把穗花杉属和三尖杉属归入三尖杉科^[20,21]; ②Kudo 和 Yamamoto^[22]基于雌球果的特点建议成立穗花杉科 (*Amentotaxaceae*), 花粉外壁的超微结构研究结果显示了这种观点的合理性; ③Florin 强调三尖杉属和穗花杉属间雌球果和气孔结构上的差异, 认为应把穗花杉属从三尖杉科移到红豆杉科^[23]; ④将穗花杉属归入罗汉松科, 管启良等研究穗花杉 (*Amentotaxus argotaenia*) 雌株和雄株的染色体数目及核型后支持这种观点, 发现穗花杉染色体数目、随体和次缢痕位置均不同于红豆杉科其它属和三尖杉科, 而接近罗汉松科罗汉松属的某些种^[24]。对 *rbcL* 基因、*trnL trnF* 间隔区和 *rbcL* 基因—*trnL trnF* 间隔区联合数据的最简约法分析均显示穗花杉属应被视作红豆杉科的成员, 而且在该科中它同榧树属的亲缘关系最为密切。对 18S rRNA 序列的分析, 也发现穗花杉属与榧树属的关系比与三尖杉属的关系更紧密, 建议穗花杉属归属于红豆杉科^[25]。对松柏类植物形态性状的分支分析和对叶绿体 DNA 结构突变的研究也都取得同样结果^[26,27]。

白豆杉属 (*Pseudotaxus* Cheng) 由郑万钧建立, 是中国裸子植物特有属之一。Florin 将之更名为 *Nothotaxus* Florin, 现被作为白豆杉属的异名。本属仅有白豆杉 (*Pseudotaxus chienii* (Cheng) Cheng) 一种, 其染色体数目 ($n=12$) 与红豆杉属相同, 核型和胚胎发育也类似于红豆杉属^[28,29]。然而, 白豆杉所含的铁杉树脂醇在红豆杉科其余属中均未发现。花粉形态的研究也认为可以把白豆杉由红豆杉属中分离出来成立为一新属。在由 *rbcL* 基因序列求得的分支图 (图 1) 中, 白豆杉属显示为红豆杉科的一个分支并且同红豆杉属互为姊妹群, 支持建立白豆杉属。但由 *trnL trnF* 间隔区序列和 *rbcL* 基因—*trnL trnF* 间隔区联合数据构建的分支图中 (图 2, 3), 白豆杉属成为包括红豆杉科和三尖杉科分支的姊妹群。因此, 该结果虽然也承认白豆杉属, 但同时暗示可将之进一步提升至科的地位, 成立白豆杉科 (*Pseudotaxaceae*)。考虑到结果并不完全一致, 要确定白豆杉属的系统位置还有待于补充新的证据。

3.2 三尖杉属和篦子三尖杉的地位

三尖杉属是 Siebold 和 Zuccarini 命名的, Endlicher 把它记入《植物属志补编》(Genera Plantarum Supplementum) 置于红豆杉科内。Neger 认为三尖杉属的雌球花极为特殊, 与红豆杉科区别显著, 首次提出成立三尖杉科。胡玉熏在光镜与扫描电镜下比较观察三尖杉属植物叶片构造与叶表面角质层特征后, 发现篦子三尖杉 (*Cephalotaxus oliveri*) 和三尖杉属的其余种类不同^[8]。傅立国将三尖杉属分为篦子三尖杉组 (*Sect. Pectinatae* L. K. Fu) 和三尖杉组 (*Sect. Cephalotaxus*)^[33]。这种处理方式得到胚胎学、花粉形态及其外壁超微结构、生物碱结构类型与组分等方面证据的支持^[11, 31]。本研究显示三尖杉属为单系群; 在对 *rbcl* 基因数据进行最简约的分析得到, 三尖杉属和红豆杉科互为姊妹群, 支持成立三尖杉科; 但是在对 *trnL trnF* 间隔区数据和联合数据分析的结果中, 三尖杉属和榧树属、穗花杉属聚合在一起共同构成红豆杉属的姊妹群, 有力地支持将三尖杉属归在红豆杉科内。仅根据本研究结果还无法确定三尖杉属的地位。与之相对, 篦子三尖杉在三尖杉属中的特殊性却得到所有分支图的支持; 在该属内它总是首先分歧为其他成员的姊妹群。我们赞同在三尖属内建立篦子三尖杉组的主张。

3.3 竹柏类的分类处理

罗汉松科是否为单系群一直广有争议, 其中竹柏类的分类地位近年来也颇受关注。竹柏类具特殊的叶脉和生殖器官构造, De Laubenfels 修订罗汉松科时曾将其独立成属^[32]。Page 承认 *Nageia* 属名的合法性, 并称竹柏类是极自然的类群^[33]。然而, 傅德志提出将狭义的竹柏属从罗汉松科中分离出来, 建立单属新科竹柏科 (*Nageiaceae* D. Z. Fu)^[32]。他认为该科和南洋杉科 (*Araucariaceae*)、麻黄科 (*Ephedraceae*)、Welwitschiaceae 及银杏科 (*Ginkgoaceae*) 共同构成了一支多脉叶谱系, 其来源可回溯至古生代的 *Cordaitales*^[34]。*rbcl* 基因、*trnL trnF* 间隔区和联合 *rbcl* 基因—*trnL trnF* 间隔区数据的最简约分析结果均显示罗汉松科为一单系群, 竹柏类应作为罗汉松科成员处理。对线粒体核糖体小亚基 RNA 序列、细胞核核糖体小亚基 RNA 基因序列及叶绿体 *rbcl* 基因序列联合进行系统发育分析, 显示罗汉松属和竹柏属构成一单系群^[14]。*matK* 基因序列分支分析和遗传距离研究结果也表明竹柏和罗汉松组成一单系分支^[15]。分子系统学的研究结果不赞同将竹柏类由罗汉松科独立出来提升为科。

3.4 红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科间的联系

红豆杉科的分类地位是裸子植物系统学研究中的

争论时间最久的问题之一。Sahni 提出建立红豆杉目, 但是其中包含三尖杉科的成员^[35]。Florin 后来强调, 只有红豆杉科的单生单轴球果才与其它松柏类的复合双轴球果截然不同, 主张将红豆杉科单独提升至目^[1, 2]。在 *rbcl* 基因序列的分支分析结果中三尖杉科与红豆杉科各自组成一单系分支, 两者互为姊妹群。对 *trnL trnF* 间隔区和 *rbcl* 基因—*trnL trnF* 间隔区联合数据进行分析的结果显示, 三尖杉科应被合并入红豆杉科内作为后者的一属处理。虽然这些结果提示三尖杉科和红豆杉科的关系还需要深入研究, 但是它们仍然指出将红豆杉科独立上升为目是不恰当的。对松柏类 28S rRNA 基因序列的系统发育分析结果也得出同样结论^[36]。我们更倾向于承认红豆杉科单生单轴球果是由复合双轴球果减化而来的假说, 支持 Buchholz^[37] 把红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科保留在松杉目的处理方式。

参考文献:

[1] FLORIN R. On the morphology and relationships of Taxaceae [J]. Bot Gaz, 1948, 110: 31—39.

[2] FLORIN R. Evolution in cordaites and conifers[J]. Acta Horti Bergiani, 1951, 15: 1—389.

[3] CHAMBERLAIN C J. Gymnosperms, structure and function [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1935.

[4] TAKHTAJAN A L. Phylogenetic principles of the system of higher plant[J]. Bot Rev, 1953, 19: 1—45.

[5] HARRIS T M. The mesozoic gymnosperms[J]. Rev Paleobot Palynol, 1976, 21: 119—134.

[6] 桂耀林, 胡玉熏. 红豆杉属叶子的表皮特征与分类的关系[J]. 植物分类学报, 1974, 12(3): 329—333.

[7] 周 灏, 姜笑梅. 木材构造特征在裸子植物系统学中的意义[J]. 植物分类学报, 1992, 30(5): 405—414.

[8] 胡玉熏. 三尖杉属植物叶片结构的比较观察[J]. 植物分类学报, 1984, 22(4): 289—296.

[9] 李莹, 王伏雄, 陈祖铿. 篦子三尖杉的胚胎学研究及其系统位置探讨[J]. 植物分类学报, 1986, 24(6): 411—422.

[10] 席以珍. 穗花杉属花粉外壁的超微结构及其分类意义[J]. 植物分类学报, 1986, 24(6): 439—442.

[11] 朱太平. 三尖杉属植物的生物碱研究及其化学分类问题[J]. 植物分类学报, 1979, 17(4): 7—20.

[12] 张君增, 方启程, 梁晓天, 等. 从化学成分探讨白豆杉属的系统位置[J]. 植物分类学报, 1996, 34(3): 282—287.

[13] 周其兴, 葛松, 顾志建, 等. 中国红豆杉属及其近缘植物的遗传变异和亲缘关系分析[J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 323—332.

[14] CHAW S M, PARKINSON C L, CHENG Y Y, et al. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes.

- Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers[J]. PNAS, 2000, 97: 4086—4091.
- [15] 汪小全, 舒艳群. 红豆杉科及三尖杉科的分子系统发育——兼论竹柏属的系统位置[J]. 植物分类学报, 2000, 38(3): 201—210.
- [16] 王艇, 苏应娟, 黄超, 等. 红豆杉科及相关类群叶绿体 *rbcl* 基因 PCR-RFLP 分析[J]. 植物学通报, 2001, 18(6): 714—721.
- [17] SU Y J, WANG T, YANG W D, et al. DNA extraction and RAPD analysis of *Podocarpus*[J]. Acta Scien Natur Univ Sunyatseni, 1998, 37(4): 13—18.
- [18] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17: 1105—1109.
- [19] SWOFFORD D L. Paup: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, USA, 1993.
- [20] PILGER R. Die Taxales[J]. Mitt Deutsch Dendrol Ges, 1916, 25: 1—28.
- [21] PILGER R. Coniferae// Engler A, et al. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 13[M]. Leipzig: W. Engelmann, 1926: 121—407.
- [22] KUDO Y, YAMAMOTO Y. Amentotaxaceae//Kudo Y. Materials for a flora of Formosa[J]. IV. J. Soc Trop Agric (Taihoku). 1931, 3(2): 110—111.
- [23] FLORIN R. The female reproductive organs of conifers and taxads. Biol Rev[J], 1954, 29: 367—389.
- [24] 俞中铭, 冯有林. 穗花杉染色体的研究[J]. 云南植物研究, 1993, 15(4): 385—391.
- [25] CHAW S M, SUNG H M, LONG H, et al. The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus*, and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences[J]. Jour Mole Evol, 1995, 41: 224—230.
- [26] HART J A. A cladistic analysis of conifers: preliminary results[J]. Jour Arnold Arbor, 1987, 68: 269—307.
- [27] RAUBESON L A, JANSEN R K. A rare chloroplast-DNA structural mutation is shared by all conifers[J]. Biochem Syst Ecol, 1992, 20: 17—24.
- [28] 管启良, 林立. 白豆杉的核型和性染色体的研究[J]. 遗传学报, 1993, 20(2): 155—158.
- [29] 陈祖铿, 王伏雄. 白豆杉的胚胎发育及其系统位置的商榷[J]. 植物分类学报, 1978, 16(2): 1—10.
- [30] 傅立国. 三尖杉属的研究[J]. 植物分类学报, 1984, 22(4): 277—288.
- [31] 席以珍. 三尖杉科的花粉形态及其外壁超微结构研究[J]. 植物分类学报, 1993, 31(5): 425—431.
- [32] LAUBENFELS D J de. A revision of the malesian and pacific rainforest conifers, I. Podocarpaceae, in part[J]. Jour Am Arb, 1969, 50: 274—361.
- [33] PAGE C N. New and maintained genera in the conifer families[J]. Not Roy Bot Gard Edinb, 1988, 45(2): 337—395.
- [34] 傅德志. 裸子植物一新科—竹柏科[J]. 植物分类学报, 1992, 30(6): 515—528.
- [35] SAHNI B. On certain archaic features in the seed of *Taxus baccata*, with remarks on the antiquity of *Taxineae*[J]. Annal Bot, 1920, 34: 117—133.
- [36] STEFANOVIC S, JAGER M, DEUTSCH J, et al. MASSELOT M. Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences[J]. Amer Jour Bot, 1998, 85: 688—697.
- [37] BUCHHOLZ J T. The classification of Coniferales[J]. Trans Illin State Acad Sci, 1934, 25: 112—113.

Cladistic Analysis of Sequences of Chloroplast *rbcl* Gene and *tmL trnF* Intergenic Spacer in Taxaceae and Related Taxa

WANG Ting, SU Ying juan, ZHENG Bo, LI Xue yan

(School of Life Sciences, Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Chloroplast *rbcl* gene and *tmL trnF* intergenic spacer sequences (IGS) of 16 species in Taxaceae, Cephalotaxaceae and Podocarpaceae were determined by sequencing cloned PCR products or amplified fragments directly. PAUP package was employed to conduct the cladistic analyses of *rbcl* gene, *tmL trnF* IGS and combined *rbcl* gene-*tmL trnF* IGS data matrices, respectively. The results reveal: ① that genus *Amentotaxus* is suggested to be included in Taxaceae rather than to be treated as a separate family; ② that the unique status of *Cephalotaxus oliveri* in the genus of *Cephalotaxus* is confirmed which supports the establishment of Section *Pectinata*; ③ that *Nageia* and some other members of Podocarpaceae constitute a monophyletic group which argue against the separation of *Nageia* to create a new family, Nageiaceae; ④ that the establishment of Taxales is not supportive which implies that the single uniaxial strobilius of Taxaceae is probably derived from the reduction of complex biaxial one.

Key words: Taxaceae; Cephalotaxaceae; Podocarpaceae; *rbcl* gene; *tmL trnF* intergenic spacer; phylogeny