


 *Jenny Helander* 

M.Sc: Biology + Chemistry

**Poul Møllers Vej 7, DK - 2000 Frbg.**

FAX +  (45) 38 34 34 07

Email: info@conifers.dk

-----  
Email address and title corrected 2005

# Gymnospermernes fylogeni

## KU-Speciale (Et semester)

**Intern vejleder: Knud Ib Christensen, Botanisk Have**

**Extern vejleder: Anders Barfod, Århus Universitet**



Afleveret den 25. september 2001.

# INDHOLD.

<b>Side:</b>	
<b>1</b>	Gymnospermernes fylogeni: Sammendrag (dansk) + Abstract (engelsk).
<b>2 - 3</b>	<b><u>Indledning:</u></b>
<b>2</b>	Taxonomi på basis af morfologi, molekylærgenetik, kemi. Metode-begrænsning. Traditionel opfattelse.
<b>3</b>	Gymnospermer: Monofyletisk gruppe; relation til Angiospermer+Pteridofytter; tidl. taxonomiske probl.
<b>4 - 5</b>	<b><u>Materialer og metoder:</u></b>
<b>4</b>	Valg af gener og outgroup. De tre plantegenomers nedarvning. Mutationsratens betydning (problemer).
<b>5</b>	<b>Analyse:</b> Manuel alignering + "håndtælling" + PAUP (NJ, ML, MP). Manipulation (uens vægtning). Molekylærgenetik + "Det genetiske ur": Variation i mutationsrate + statistiske problemer.
<b>6 - 10</b>	<b><u>Resultater:</u></b>
<b>6</b>	<b>rbcL:</b> Observeret troværdighed. Håndtalte mutationer. Mutationer i <i>Pinus</i> + <i>Abies</i> .
<b>7</b>	<b>18S rRNA + 28S rRNA:</b> Sekventeringsfejl, aligneringsproblemer, alignering i praksis.
<b>8</b>	<b>Kemi:</b> Resultat af litteratur: Specielle indholdsstoffer, manglende identifikation af aromastoffer.
<b>8</b>	<b>Kladistiske analyser:</b> Variation i outgroup + algoritme. Kladogrammer m.m. se BILAG.
<b>9</b>	Sml. af rbcL-, 18S rRNA-, 28S rRNA-kladogrammerne med andres undersøg. + Gnetales placering.
<b>10</b>	<b>Nålearomaen:</b> Resultaterne af den praktiske smagsprøvning og konklusioner herudfra.
<b>11 - 16</b>	<b><u>Diskussion:</u></b>
<b>11</b>	I. Angiospermer. II. Gymnospermer. III. Gnetales: Morfologisk + Kemisk.
<b>12</b>	III. Gnetales (fortsat): Molekylærgenetisk. Oversigt over Gnetales tilhørsforhold i TABEL
<b>13</b>	III. Gnetales (fortsat): Gnetales tilhørsforhold, diskussion. IV. Ginkgo + Cycadales.
<b>14</b>	V. Coniferales: A. Monofyli. B. Stamtræ. C. Pinaceae: Problemer vedr. stamtræet.
<b>15</b>	V. Coniferales: C. Pinaceae (fortsat): Mulig løsning af Pinaceaes fylogeni. + <i>Genus Pinus</i> .
<b>16</b>	V. Coniferales: C. Pinaceae (fortsat): <i>Genus Abies</i> + <i>Genus Picea</i> .
<b>16</b>	V. Coniferales: D. Coniferales II: 1. Araucariaceae/Podocarpaceae s.l. 2. Sciadopitys.
<b>17</b>	V. Coniferales: D. Coniferales II: 3. Taxac./Toxodiac./Cupressac. 3a. Taxaceae.s.l. 3b. Cupressaceae s.l.
<b>17 - 19</b>	<b><u>Konklusion:</u></b>
<b>17 - 19</b>	<b>Konklusion:</b> 14 specifikke resulterende konklusioner + Generelle konklusioner. -----
<b>20</b>	<b>Tabel 1:</b> Oversigt over de anvendte taxa.
<b>21</b>	<b>Figur 1:</b> Stamtræ: Gymnospermernes fylogeni.
<b>22</b>	<b>Tabel 2:</b> Gymnospermernes fylogeni. Sammendrag af samtlige træer i tillægget + lit.-træer.
<b>23</b>	<b>Figur 2 A-D:</b> Stamtræer: Pinaceae's fylogeni.
<b>24 - 26</b>	<b>Litteraturliste.</b>

## Bilag:

### **Bilag. 1.del: Gymnospermkladistik.**

Kladistiske parametre.

Kommentarer til kladistiske parametre.

Tabel 2: Gymnospermernes fylogeni. Sammendrag af samtlige træer i tillægget + lit.-træer.

Figur 1: Stamtræ: Gymnospermernes fylogeni.

rbcL-kladogrammer: MP, MP-cons., ML, NJ. Outgr: Nymf+Lyco, Gnetales, Ginkgo/Cycadales.

18S- kladogrammer: MP, MP-cons., ML, NJ. Outgr: Nymf+Lyco, Gnetales, Ginkgo/Cycadales.

28S- kladogrammer: MP, MP-cons., ML, NJ. Outgr: Nymf+Poly, Gnetales, Ginkgo/Cycadales.

### **Bilag. 2.del: Pinaceae-kladistik.**

Figur 2 A-D: Stamtræer: Pinaceaes fylogeni.

rbcL-kladogrammer: MP (Bootstrap), MP-cons., ML, NJ. Outgroup: Podocarpaceae+ Sciadopitys

rbcL-kladogrammer: MP (Bootstrap), MP-cons., ML, NJ. Outgroup: Ginkgo.

## Sammendrag.

Undersøgelsens formål er at analysere fylogenen for Gymnospermerne med alle midler især molekylærgenetiske, men også tildels morfologiske og kemiske. Det er hovedsagelig et endog særdeles omfattende review arbejde, der er suppleret med egne kladogrammer og smagskemiske undersøgelser. De egne molekylærgenetiske undersøgelser er foretaget vha af gensekvenser fra GenBank i rbcL, 18S rRNA og 28S rRNA. Gensekvenserne er alignerede manuelt, mutationerne er for Pinaceae i rbcL også "håndtalte", og kladogrammerne i MP, NJ og ML er konstrueret vha PAUP. De smags-kemiske undersøgelser er foretaget ved at bide i en frisk nål fra træet og sammenligne aromaen med den tilsvarende nålesmag fra *Picea abies*.

Ved vurderingen er der lagt vægt på, at de forskellige (såvel egne som andres) kladistiske undersøgelser giver overensstemmende resultater, og at disse passer med med såvel de kemiske som de morfologiske kendetegn og disses udvikling, hvorimod der ikke er argumenteret med traditionel kladistisk statistik i form af Bootstrap og decay-analyser.

Undersøgelsen bygger på, at Gymnospermerne er en monofyletisk gruppe, dvs at Gnetales tilhører Gymnospermerne. Dette er vist ved en litteraturundersøgelse, der omfatter både molekylærgenetik, morfologi og kemi. For selv at kontrollere Gnetales placering er de egne Gymnosperm-kladogrammer konstrueret med følgende tre outgroups: 1) Nærmeste Angiosperm + Pteridofyt, 2) Gnetales, og 3) Cycadales/Ginkgo.

Resultatet af undersøgelsen viser for de fire ordener, at Cycadales kommer først, den efterfølges af Ginkgo, og tilsidst kommer Coniferales. Gnetales stilling er usikker, mine egne molekylærgenetiske undersøgelser anbringer Gnetales tæt ved Cycadales, medens nogle andre forfattere placerer den tæt ved (og sågar inde i) Coniferales.

Coniferales er opsplittet i Pinaceae, der er søster til Coniferales II, som inbefatter alle de øvrige familier i Coniferales. Coniferales II er igen opsplittet i en gren med søstre Araucariaceae-Podocarpaceae s.l., og denne gren er så søster til de øvrige Coniferales II begyndende med Sciadopitys, fulgt af Taxaceae s.l. og til slut kommer Cupressaceae s.l. (dvs Taxodiaceae, der fortsætter i Cupressaceae s.s.).

Phyllocladaceae synes iflg. litteraturen at være en del af Podocarpaceae s.l.

Min egen undersøgelse tyder på, at Cephalotaxaceae er en del af Taxaceae s.l.

Stamtræet for slægterne i Pinaceae synes at afhænge af valg af outgroup. Meget taler dog for, at Ginkgo skal anvendes som outgroup, hvilket medfører, at Pinaceae har en *Cedrus*-lignende forfader. Herved opnås et træ, der synes at forklare væsentlige makromorfologiske træk på en logisk måde.

## Abstract.

This investigation tries to analyse the phylogeny of the Gymnosperms by all available means, particularly molecular-genetics, but partly morphology and chemistry, too. It is mainly a very comprehensive review, which is supplemented by own cladograms and investigations of the chemical aroma by taste. The own molecular-genetic investigations are done by means of gene-sequences from GenBank using rbcL, 18S rRNA, and 28S rRNA. The gene-sequences are manually aligned, and the Pinaceae-mutations for the gene rbcL are "handcounted" too. The cladograms are done in MP, NJ, and ML by means of PAUP. The aroma-investigation is carried out by biting in a fresh needle from the tree and compare the taste to the taste of a needle from *Picea abies*.

The results are evaluated by determining the agreement between the different cladistic investigations, as well as the agreement of the cladistics with chemistry and morphology, whereas the traditional statistics such as Bootstrap and decay-analysis is scarcely used.

The investigation is based on the Gymnosperms as a monophyletic group, which means that Gnetales is a part of the Gymnosperms. This theory is confirmed by reviewing the latest papers including molecular genetics, morphology as well as chemistry. In order to verify the theory myself the cladograms of the Gymnosperms are constructed by the use of the following three outgroups: 1) Nearest Angiosperm + Pteridophyt, 2) Gnetales, and 3) Cycadales/Ginkgo.

For the included four orders the investigation shows that Cycadales is first, followed by Ginkgo, and at last comes Coniferales. The position of Gnetales is uncertain, according to my molecular-genetic investigations Gnetales is close to Cycadales, whereas other investigations show that it may be close to (as well as inside) the Coniferales.

Coniferales is divided into Pinaceae and its sister Coniferales II, which includes all the other families within the Coniferales. Coniferales II again is divided in a branch including the sisters Araucariaceae-Podocarpaceae s.l., and this branch is a sister to the other Coniferales II, starting with Sciadopitys, followed by Taxaceae s.l. and finished by Cupressaceae s.l. (which is Taxodiaceae followed by Cupressaceae s.s.).

According to the latest molecular-genetic investigation Phyllocladaceae seems to be a part of Podocarpaceae s.l.

My investigation suggest that Cephalotaxaceae is a part of Taxaceae s.l.

The family tree for the genera of Pinaceae seems to depend of the chosen outgroup. It is most likely that the right outgroup is Ginkgo, which means that Pinaceae has a *Cedrus*-like ancestor. This achieves a tree, which seems to explain all essential macromorphological characters in a logical manner.

## Indledning.

Planternes taxonomiske inddeling er traditionelt baseret på sammenligning af deres morfologiske karakterer, da man oprindeligt ikke havde andre sammenligningsmuligheder. Selv om de makroskopiske karakterer efterhånden er blevet suppleret med stadig flere og finere mikroskopiske detaljer, så er antallet af karakterer, der egner sig til dette formål, trods alt begrænset. Desuden kan der være problemer med at bedømme, hvorvidt en karakter er oprindeligt primitiv, eller den er en reduktion af et avanceret træk, ligesom en eventuel paralleludvikling giver mulighed for fejltolkning. Alligevel er det imponerende, hvor langt man er kommet ad denne vej, specielt når man tager de ovennævnte forbehold i betragtning.

Molekylærgenetikkens anvendelse i kladistikken kom derfor som en god supplerende hjælp. Antallet af karakterer er næsten ubegrænset, og de inducerede mutationer er tilfældige. Molekylærgenetikken er en videnskab under opbygning, og man har ikke på samme måde som under morfologien fået opstillet de begrænsende forbehold. Personligt har jeg fundet en del forbehold, som enten slet ikke er nævnt, eller som ikke alle tager hensyn til. Selv ikke de inducerede mutationer er tilfældige (vekslende jordradioaktivitet, kosmisk stråling, atmosfærekemi), men planten overlever kun, såfremt mutationen enten er uskadelig eller gavnlig for planten. Yderligere er mutationernes nyttevirkning bestemt af det omgivende miljø. Fx kan mutationer, der er skadelige ved stabilt miljø være gavnlige under klimaændringer og vice versa. Generelt må det antages, at flere mutationer kan vise sig nyttige for planten under miljøskift end i en stabil periode. Disse fakta gør, at de biologiske mutationer ikke følger en simpel matematisk sandsynlighedsfordeling, noget som der sjældent bliver taget hensyn til. Selv om det er et velkendt faktum, at ikke alle gener muterer med samme hastighed, findes der alligevel molekylærgenetikere, der vægter gener med vidt forskellig mutationsrate ens, hvilket svarer til at vægte kirsebær, æbler og kæmpegræskar ens, noget man er tvunget til at gøre indenfor morfologien, medens det indenfor molekylærgenetikken er en fejlkilde, som man bør være opmærksom på. (Som det vil fremgå senere i rapporten bliver problemet ikke mindre, når forskellige arter muterer med forskellig hastighed indenfor det samme gen).

Selv om naturstofkemien har undergået en rivende udvikling indenfor de seneste 50 år, og det kemiske materiale efterhånden er endog særdeles overvældende, så har kemien spillet en alt for lille rolle indenfor taxonomien, og de kemiske resultater er oftest ikke systematiseret, så de kan bruges til dette formål. Dog har specielt forskelle i synteseveje været medvirkende til at fastslå visse taxonomiske sammenhænge.

Gymnospermer betyder nøgenfrøede og indbefatter de nulevende ordener Cycadales, Ginkgoales, Gnetales og Coniferales. (Den eneste nulevende Ginkgoales er *Ginkgo biloba*, og ordenen betegnes fremover "Ginkgo" for nemheds skyld).

Gymnospermerne er tidligere og bliver tildels stadig betragtet som en slags parafyletisk "affaldsspand", hvor det eneste sikre fælles træk, der sammenknytter de indbefattede ordener, er nøgenfrøetheden. Dette gælder også de mest moderne oversigtsværker som fx Page (1990) i "The Families and Genera of Vascular Plants", Judd et al. (1999) i "Plant Systematics, a phylogenetic approach", og Frederiksen et al. (1997) i vor hjemlige lærebog "De højere planters evolution og klassifikation". Den nyeste forskning burde dog ændre dette billede.

Den tidligere opfattelse byggede især på to misforståelser. – For det første mente man, at Angiospermerne var en videreudvikling af om ikke nulevende Gymnospermer, så dog stadig eksisterende Gymnospermfamilier. Denne opfattelse bygger især på det palæobotaniske argument, at fossiler af gymnospermer går knapt 300 millioner år tilbage [fx er Ginkgo ca. 250 mill. år gammel iflg. Stewart & Rothwell (1993)], medens tidligere kendte, sikre fossiler af Angiospermer først dukker op i kridttiden for ca. 100 mill. år siden, dvs længe efter progymnospermernes uddøen. Nu er der dog iflg. Sun et al. (1998) fundet en Angiosperm med frø i kapsel, der er mere end 140 mill. år gammel. – For det andet fandt de fleste botanikere, at Gnetales (sin nøgenfrøethed til trods) morfologiske ligheder med Angiospermerne var størst, og man kædede disse grupper sammen som de eneste nulevende anthofytter.

Donoghue & Doyle (2000), som tidligere var to af de største tilhængere af anthofyt-teorien på grundlag af morfologien, har nu revurderet deres synspunkt, fordi et stigende antal molekylærgenetiske undersøgelser viste, at Gnetales hører sammen med Gymnospermerne (se senere). Det drejede sig især om morfologiske ligheder med Angiospermerne mht kar, blomsterlignende strukturer med nektardannelse og delvis insektbestøvning hos nogle arter af alle Gnetales familierne, dobbelt befrugtning og i nogen grad Gnetums fjerstrengede blade. Nogle af disse ligheder afviger i detaljerne, således at der sandsynligvis er tale om en paralleludvikling, og andre af lighederne genfindes hos Gymnospermerne. Donoghue & Doyle (2000) siger således om megasporerne, at tunica består af to cellelag hos Angiospermerne, men et hos Gnetales; og megaspore væggen er tynd hos Gnetales, men mangler hos Angiospermerne". Karrene er en paralleludvikling iflg. Carlquist (1996). Også dobbelt befrugtning hos Gnetales kan være en paralleludvikling til Angiospermerne iflg. Friedman & Carmichael (1995), og iflg. Friedman & Floyd (2000) kan dobbelt befrugtningen hos Gnetales tværtimod være homolog med sjældne lignende tilfælde hos Gymnospermerne.

Udover de generelle kladogrammer, der viser Gymnospermerne som en monofyletisk gruppe, tolker Winter et al. (1999) de såkaldte MADS-box gener, der styrer udviklingen af forplantningsorganerne, således, at Gnetales tilhører Gymnospermerne.

Kemien har for mange år siden påvist det samme. Ganske vist beskrev den berømte plantekemiker Hegnauer (1962) på baggrund af Anthofyt-teorien en stor kemisk lighed mellem Angiospermerne og Gnetales, men Gottlieb & Kubitzki (1984) påviste punkt for punkt, at alle de nævnte ligheder måtte være paralleludviklinger, idet disse ligheder ikke fandtes hos de ældste Angiospermer, men først i senere udviklede familier. Ligeledes påviste de, at Gnetales manglede nogle ganske fundamentale kemiske træk (dannelse af Schiff-baser og O-methylering), der findes i alle Angiospermer, men er yderst sjældne blandt nåletræerne. – Carnachan & Harris (2000) angiver på grundlag af Ferulic acid i cellevæggene, at Gymnospermerne er en monofyletisk gruppe.

I betragtning af, at der næppe mere kan herske nogen begrundet tvivl om, at Gnetales tilhører Gymnospermerne, bygger molekylærkladistikken i nedenstående arbejde på dette faktum.

Imidlertid må det tilføjes, at fylogeni for Coniferales nærmest er totalt uafhængig af, hvor Gnetales er placeret, da Gnetales udgør en selvstændig gruppe, der ligger langt fra de øvrige grupper.

Naturligvis ændrer det dog sagen, såfremt man anbringer Gnetales midt i Coniferales, hvilket Chaw et al. (2000) gør på et særdeles spinkelt grundlag, idet Coniferales så ikke bliver monofyletisk. Basis for deres påstand er et enkelt kladogram for et enkelt gen (skønt små 20 andre gener viser noget andet) i forbindelse med en manipulation med rbcL-baserne, så de også giver et lignende træ, der er i delvis modstrid med de træer, som man får uden manipulation. Chaws påstand er i skarp modstrid med Raubeson & Jansen (1992), der vha en sjælden strukturel cpDNA mutation viser, at Coniferales er monofyletisk. Raubeson & Jansens (1992) arbejde er særdeles grundigt, idet de har påvist, at alle 7 undersøgte Coniferales familier med ialt 19 arter har tabt et "inverted repeat", som findes i samtlige 15 andre undersøgte familier, der alle står nær Coniferales [Gnetales (3 fam.), Cycadales (2 fam.), Ginkgo, Lycopodium, Selaginella, Isoetes, Psilotum, samt 5 bregnefam.]. Donoghue & Doyle (2000) tilbageviser også Chaw et al. (2000) med henvisning til Raubeson & Jansen (1992).

Når man betragter Angiospermer og Gymnospermer som monofyletiske grupper viser det sig, at den nærmeste Angiosperm og den nærmeste Pteridofyt står nærmest nøjagtig lige langt og desværre meget langt fra Gymnospermerne, og det er derfor naturligt at vælge en eller flere arter fra hver gruppe som outgroup i kladogrammer vedrørende Gymnospermernes fylogeni.

Gymnospermernes fylogeni kan naturligt opdeles i dels relationerne mellem de forskellige ordener og dels i slægtskabrelationerne indenfor Coniferales. Fx minder Ginkgo jo rent umiddelbart i statur mere om et nåletræ end om en cycadé. Af den grund har nogle botanikere bl.a. Page (1990) foretrukket at knytte Ginkgo til Coniferales, skønt Ginkgos forplantningsbiologi knytter den sammen med Cycadales, hvilket de fleste botanikere er enige om. Emnet har dog ikke været genstand for nær den samme opmærksomhed som Gnetales problemet. Andre botanikere har anset Taxaceae for så afvigende fra de øvrige nåletræer [diskussion med henvisninger i Chaw et al. (1993) og Cheng et al. (2000)], at den har været rubriceret som en særskilt orden Taxales som fx i Frederiksen et al. (1997) og delvis i Page (1990).

Gode historiske udredninger om de enkelte familier indenfor Coniferales findes bl.a. i Chaw et al. (1993, 1995, 1997A).

## Materialer og metoder.

### Valg af gener.

Valget faldt naturligt på de gener, der var tilgængelige i sekventeret form i GenBank i maj 1999, hvor undersøgelsen blev startet. Først anvendtes chloroplastgenet *rbcL*, der muterer langsomt og giver pålidelige sekvenser uden længdemutationer. Siden anvendtes de ribosomale gener 18S rRNA og 28S rRNA fra kernen, hvor sekvenserne var mere upålidelige og indeholdt længdemutationer.

Oversigt over de valgte arter findes i tabel 1 på side 20 sidst i rapporten.

I denne undersøgelse indgik oprindeligt et utal af kladogrammer både små, der kun omfattede en enkelt familie, og store, der inddrog alt fra grønalger til Gymnospermer og de første Angiospermer. Selv om en del af dette var gentagelser af andre forfatters arbejder, har det givet erfaring og en uvurderlig baggrund for dette arbejde. Efter at have indset, at Gnetales er en Gymnosperm, og at det er af stor betydning at have den nærmeste forudgående plante som outgroup, blev hele undersøgelsen gentaget, så den (bortset fra Pinaceae kladogrammerne) kun omfattede gymnospermerne med den nærmeste Angiosperm og den nærmeste Pteridofyt som outgroup. Supplerende foretoges undersøgelser uden disse med henholdsvis Gnetales og Cycadales/Ginkgo som outgroup for at undersøge betydningen af Gnetales placering.

Siden starten af undersøgelsen er der publiceret et væld af nye undersøgelser af andre, hvori bl.a. en række nye gener indgår. Disse nye resultater er naturligvis medvurderet i denne undersøgelse.

De tre plantegenomer og deres nedarvning. I mange af de nyeste afhandlinger er der offentliggjort resultater med gener fra alle tre plantegenomer (chloroplast = plastid, mitochondrie og nucleus), der nedarves uafhængigt af hinanden. Iflg. min opfattelse er det kun en fordel, hvis det medfører et større antal sekventerede gener, medens det kun er tale om en sammenligning med allerede kendt viden, såfremt generne er en gengivelse af tidligere undersøgelser. Enkelte forfattere referer til disse genomer som henholdsvis paternelle, maternelle og biparentelle indenfor Coniferales, fx Wang et al. (2000) indenfor Pinaceae.

Arvegangen for chloroplaster og mitochondrier er langt overvejende uniparentel, selv om opfattelsen af arvemønstret har ændret sig som konsekvens af udviklingen af undersøgelsesmetoderne. Der er tre forskellige: 1) Fenotype markører, 2) Molekylære teknikker (RFLP) og 3) Cytologi (EM + alm. mikroskopi) jvf. oversigt i Reboud & Zeyl (1994). Metoderne har forskellige begrænsninger, og man kan heller ikke generalisere på baggrund af de relativt få undersøgte arter. Fordelen ved uniparentel nedarvning kendes ikke, men den er iflg. Gillham (1994) med stor sikkerhed opstået flere gange uafhængig af hinanden i udviklingens løb. Som regel er der maternal nedarvning af begge hos Angiospermer, hvorimod Coniferales har overvejende paternal nedarvning af chloroplaster bl.a. iflg. Szmids et al. (1987) og Dong et al. (1992), medens der for mitochondrierne er forskellige meldinger iflg. oversigter i Mogensen (1996) og Reboud & Zeyl (1994). Specielt Gnetales, Cycadales og Ginkgo er sparsomt undersøgt og kun vha mikroskopi iflg. Mogensen (1996).

Inddelingen i paternal, maternal og biparentel arvegang må formodes at være uden betydning for genernes mutering, jvf. Otto et al. (1996). Det er også uden betydning for mutationernes videreførelse, såfremt der ikke sker kønsbestemt hybridisering, hvad intet tyder på. Page (1990) påstår således, at Pinaceae har udviklet sig ved hybridisering mellem slægter, men iflg. *rbcL*-mutationerne for Pinaceae er der intet, der tyder på noget sådant (se side 6). Selv nært beslægtede arter, der gror tæt, og som kan hybridisere, hybridiserer tilsyneladende normalt ikke i naturen, jvf. Christensen & Dar (1997) og Filppula et al. (1992).

Mutationsratens betydning. Derimod har mutationsraten stor betydning. Det er matematisk ukorrekt at blande forskellige gener med forskellig mutationsrate og siden vægte dem ens! Rent faktisk kan mutationsraten også variere indenfor det samme gen (jvf. fx Gnetales), både mht tid og mht familie. Efterhånden er man blevet klar over, at hurtigt muterende arter, der giver "long branch attraction" i kladogrammer, ofte giver problemer i blanding med langsomt muterende, se fx Sanderson et al. (2000). Medens man naturligvis skal sammenligne de molekylærgenetiske resultater med de morfologiske facts, er det helt tåbeligt at vægte genetiske og morfologiske karakterer ens.

Om MADS-box gener, der styrer udviklingen af de morfologiske strukturer, se senere.

### Analyse.

Aligneringen er foretaget ved håndkraft, hvilket var tidskrævende, men det viste sig til gengæld at være helt nødvendigt for at bedømme kvaliteten m.m. af basesekvenserne, der tilsyneladende varierede med sekventøren (det fremgik specielt for 18S rRNA).

Der blev anvendt "håndtælling" af mutationer indenfor Pinaceae i rbcL genet, hvor der er relativt få mutationer og ingen fejlmuligheder i aligneringen. (De blev sammenlignet med *Ginkgo biloba*, der er ekstremt konservativ med meget få mutationer). Da de ved "håndtællingen" fremkomne resultater også fremgår af den senere databehandling vha PAUP (omend noget mindre tydeligt), udelades disse resultater stort set helt af rapporten her. Dog nævnes væsentlige observationer, der ikke fremgår af PAUP kladogrammerne.

Computerbehandlingen er udført ved hjælp af **PAUP v. 4.0b2**, jvf. Swofford (1998).

I modsætning til morfologiske data, hvor parsimoniske metoder er nødvendige, synes ligheder at være det mest logiske ved molekylære data, men sekundært må parsimonien samtidig gælde.

Pålideligheden af lighedsalgoritmen **NJ** (Neighbor-Joining) og **ML** (maximum likelihood, der både sammenligner afstand og karaktertilstand) er derfor vurderet ved sammenligning med resultaterne fra **MP** (parsimoni) kladogrammerne.

Generelt viste overensstemmelsen sig at være næsten bedre end man skulle forvente ifølge de traditionelle kladistiske usikkerhedsbestemmelser som fx afstand og Bootstrap. Dvs at såvel NJ, ML og MP hver må formodes at give et muligt kladogram på grundlag af det gen, som man betragter.

Der eksisterer forskellige teorier med henblik på at lade de forskellige former for mutationer tælle forskelligt, men der lader ikke til at være enighed om, hvilke manipulationer der er hensigtsmæssige. (I så fald burde den slags manipulationer jo være standard indenfor cladistikken!).

Dels kan man lade **transitioner** tælle anderledes end **transversioner**, men anvendt på rbcL og 18S rRNA basesekvenserne gav det bedre overensstemmelse med den morfologiske taxonomi og resultaterne indbyrdes at lade dem tælle ens, hvilket derfor er valgt.

En anden mulighed er forskellig vægtning af **1., 2. og 3. base**. Dette blev forsøgt på samme måde som ovenstående med samme resultat. Man kunne fx tænke sig, at fjernelse af 3. codon basen ville være en fordel ved hurtigt muterende gener, hvilket det dog iflg. nedennævnte undersøgelse af Sanderson et al. (2000) ikke tyder på.

Källersjö et al. (1998) har undersøgt følgende manipulationer indenfor rbcL: (1) Alle baser medtages. (2) Kun 1. og 2. codon baser medtages. (3) Kun 3. codon baser medtages. (4) Kun transversioner medtages. For deres over 2500 taxa giver medtagelsen af alle baser det bedste resultat!

Sanderson et al. (2000) har især vurderet 1. og 2. codon baser contra 3. codon baser mht bl.a. "long branch attraction" for psbA og psbB generne i frøplanter, hvor de kommer til et lignende resultat.

Der måtte være enorme muligheder for statistisk talbehandling med alle de "tilfældige mutationer", troede jeg inden starten på projektet. Desuden havde jeg store forventninger om aldersbestemmelse vha "det genetiske ur", hvor antallet af mutationer regnes proportionalt med tiden.

Desværre varierer de mutationsskabende faktorer (radioaktivitet, UV, fri radikaler m.m.) i forbindelse med den geologisk-klimatologiske udvikling, men selv om den udefra kommende påvirkning var konstant er det kun de mutationer, der gavner planten, der promoveres, hvilket giver en biologisk usikkerhed. Hvis vi endelig ser bort fra den manglende konstans i de to nævnte faktorer, er den matematiske usikkerhed så stor, at al snak om noget "genetisk ur" nærmest virker absurd. Dette bekræftes i Hillis et al. (1996), og det er i overensstemmelse med de nyere observationer af biologiske eksplosioner i forbindelse med geologiske katastrofer i tidligere jordperioder.

Således fandt jeg for rbcL-genet, at *Ginkgo*, som iflg. bl.a. Pearson (1995) er ældst, havde langt færre mutationer end de fleste af de formodentlig noget yngre Pinaceae-arter, ligesom antallet af mutationer indenfor Pinaceae også varierede, hvor især *Larix* og *Cedrus* (der pga få rbcL mutationer muligvis hører til de "ældste" Pinaceae) havde forbløffende få mutationer. Mine resultater er forøvrigt i overensstemmelse med Szmidt et al.s (2001) undersøgelser vedrørende cox1-genet, hvad angår *Ginkgo* og *Larix* (ingen RNA-editing som ved øvrige Pinaceae). *Cedrus* er ikke undersøgt af dem.

På den baggrund har jeg indtil videre opgivet al statistisk behandling af talmaterialet.

## Resultater:

**rbCL:** Under aligeringen konstateredes det, at samtlige rbcL-sekvenser, som blev undersøgt, dvs også diverse Pteridophytter m.m. som ikke vedrører denne rapport, virkede yderst troværdige (bortset fra *Selaginella selaginoides*) ned til hver enkelt base!

Der startedes med en undersøgelse, hvor samtlige sekventerede Pinaceae-arter indgik. Siden blev der foretaget lignende undersøgelser af andre familier. I undersøgelser med mange familier blev der først kun medtaget et par arter fra hver familie. Først tilsidst blev alle de undersøgte taxa samlet i et eneste kæmpekladogram.

Ved sammenligning efter aligeringen jävnførtes Pinaceae sekvenserne med sekvensen for *Ginkgo biloba*. Det fremgik heraf klart, at der var et fåtal af baser, der var ens for samtlige Pinaceae, men afveg fra *Ginkgo* dvs Ginkgoales. Disse baser ville man kunne nummerere og angive som forskellen mellem Pinaceae og *Ginkgo*, dvs at disse mutationer nærmest definerede Pinaceae ud fra *Ginkgo*. (Der blev naturligvis set bort fra mutationer, hvor en del af Pinaceae-slægterne havde baser identiske med *Ginkgo*, medens andre Pinaceae-slægter havde baser forskellige fra *Ginkgo*.)

Under sammenligningen af Pinaceae med *Ginkgo* gjordes også en del andre interessante observationer.

Således var visse Pinaceae-slægter, det drejer sig foreløbig især om *Pinus* (7 arter) og *Abies* (6 arter), tilsyneladende defineret i forhold til *Ginkgo* ved mutationer, der var fælles for samtlige arter indenfor slægten, men forskellige fra de øvrige Pinaceae. Disse mutationer definerede således specifikt slægterne *Pinus* henholdsvis *Abies* indenfor Pinaceae (med forbehold for det begrænsede artsantal). Disse helt klare forhold fik mig til at "håndtælle" mutationer, en fremgangsmåde, der fortalte mig meget, og som fx fik mig til at indse, at en i Japan groende *Abies* (*A. mariesii*) var mere i familie med en i Californien groende *Abies* (*A. magnifica*), end den var i familie med de øvrige japanske *Abies*-arter, hvilket i øvrigt også kan ses ud fra PAUP-resultaterne, selv om det ikke er så iøjnefaldende.

Da "håndtælling" ikke er almen praksis indenfor kladistik, vil jeg især bruge resultaterne af mine "håndtællinger" på de områder, som PAUP ikke kan belyse. Dog vil jeg nedenfor demonstrere metoden for at vise dens enkelhed i praksis, faktisk kræver den kun, at man kan tælle til 30, hvis man ellers kan kende forskel på A, G, C og T. Det må pointeres, at der kan være en vis usikkerhed på de angivne talværdier, der således ikke kan opfattes som 100% korrekte videnskabelige fakta. Hvis samtlige 23 benyttede Pinaceae taxa alle har en anden base end *Ginkgo*, er usikkerheden naturligvis nul, men der må udøves et skøn, såfremt det fx kun gælder 21 af de 23 Pinaceae taxa.

Af særlig interesse kan det nævnes, at specielt *Larix* og *Cedrus* tilsyneladende havde meget få mutationer i forhold til *Ginkgo*. Udover de mutationer, der var fælles for alle Pinaceae havde *Larix* kun ca. 10 mutationer ialt, og *Cedrus* havde kun ca. 14 (hvoraf de 7 var helt unikke for *Cedrus*). For de øvrige slægter angives nedenstående ca. tal, der naturligvis kun gælder for de i undersøgelsen indgående arter. De 6 *Abies* havde ca. 20 mutationer hver, og de 7 *Pinus* arter havde i gennemsnit ca. 25, men noget varierende for de enkelte arter, medens *Picea abies* slog rekorden med 38 mutationer. *Cathaya* lignede ingen af de øvrige slægter og havde 8 unikke mutationer. Af unikke mutationer havde *Cedrus* (som nævnt) 7, *Picea abies* 7, og *Tsuga heterophylla* 7, *Pinus radiata* 4, *Pseudolarix* 3, *Pseudotsuga* 3, *Larix* 2, *Keteleeria* (der lignede *Abies* meget) 2, to *Pinus*-arter 2 hver, seks arter 1 hver, og de resterende seks arter havde ingen unikke mutationer. OBS: De angivne antal af unikke mutationer ville med al sandsynlighed formindskes, såfremt det medtagne artsantal af Pinaceae blev væsentligt forøget, men dette ville kun forvirre og mindske overskueligheden, såfremt resultaterne ikke påfølgende undergik en gennemgribende matematisk analyse.

Bl.a. ovennævnte mange unikke mutationer synes at modsige Page's (1990) teori om intergeneriske hybridiseringer.

**Pinus.** Ud af 1440 baser definerer 15 ens mutationer slægten *Pinus*. Yderligere 6 andre ens mutationer definerer kun subgenus *Strobilus* = haploxyton (dvs  $15 + 6 = 21$  ialt), og yderligere 6 andre ens mutationer (forskellige fra haploxyton) definerer subgenus *Pinus* = diploxyton (dvs  $15 + 6 = 21$  ialt), dertil kommer enkelte spredte artsspecifikke mutationer. Man kunne også påstå, at 27 mutationer definerer slægten *Pinus*, af hvilke 15 er ens for alle *Pinus*, forskellen mellem haplo- og diploxyton er 12 mutationer, 21 er ens for alle haploxyton, og 21 er ens for alle diploxyton.

**Abies.** Ud af 1330 baser definerer 14 ens mutationer slægten *Abies*. Yderligere 5 andre ens mutationer definerer kun "japanske" *Abies* (dvs  $14 + 5 = 19$  ialt), og yderligere 4 andre ens mutationer (forskellige fra de "japanske") definerer "californiske" *Abies* (dvs  $14 + 4 = 18$  ialt), dertil kommer enkelte spredte artsspecifikke mutationer: Man kunne også påstå, at 23 mutationer definerer slægten *Abies*, af hvilke 14 er ens for alle *Abies*, forskellen mellem "japanske" og "californiske" *Abies* er 9 mutationer, 19 er ens for alle "japanske", og 18 er ens for alle "californiske".

Til de fire "japanske" *Abies* hører ikke overraskende de nært beslægtede *Abies veitchii*, *A. sachalinensis*, *A. homolepis* og *A. firma*.

Til de to "californiske" *Abies* i denne undersøgelse hører ikke overraskende *Abies magnifica*, men måske mere overraskende *Abies mariesii*, der tidligere har været betragtet som en ægte "japansk" *Abies*. Nu viser det sig altså, at *Abies mariesii* i virkeligheden er en "californisk" *Abies*, selv om den gror i Japan!!! *Abies mariesii*'s særstilling bekræftes iøvrigt af Tsumura & Suyama (1998) på grundlag af mitochondrie DNA polymorfisme og af Isoda et al. (2000) på grundlag af cp-DNA trnL-intergenic spacer. Sidstnævnte finder dog en flerdeling af de 18 dér undersøgte *Abies* arter.



Transitioner anses som bekendt for at være mere almindelige end transversioner, selv om det ifølge teorien burde være omvendt. Regnet i forhold til *Ginkgo* viser optællinger af mutationer direkte på den alignerede datamatrix, at medens Podocarpaceae (*Afrocarpus gracilior*) har ca. 28% transversioner, har Pinaceae ca. 38%, og Araucariaceae har ca. 59%.

Podocarpaceae. Da min undersøgelse blev foretaget, var kun den ovennævnte art i Podocarpaceae sekventeret i rbcL. Nu har Conran et al. (2000) sekventeret yderligere 75 arter, men jeg har ikke haft tid til at udnytte dette overvældende materiale, skønt Podocarpaceae virker enormt spændende med alle deres ændringer i kromosomtallet iflg. Khoshoo (1961). *Afrocarpus gracilior* virker dog yderst repræsentativ for Podocarpaceae. Der findes en Podocarpaceae sekventering i 18S rRNA af Kelch (1998), men den giver ingen sikre konklusioner, og 18S rRNA data virker i øvrigt upålidelige (se nedenfor).

Araucariaceae. Rent faktisk er der sekventeret ikke mindre end 30 forskellige arter af Araucariaceae i Setoguchi et al. (1998) i rbcL, hvilket giver enestående muligheder for at sammenligne mutationsmønstret hos Araucariaceae med mutationsmønstret hos Pinaceae med henblik på statistisk behandling. Oprindeligt var det min hensigt at foretage en sådan sammenligning, men jeg har ikke haft tid til det. Araucariaceae virker heller ikke så spændende som Podocarpaceae.

### **18S rRNA:**

Aligneringen voldte visse problemer. 18S rRNA (dvs ribosomalt RNA) koder ikke for proteiner, og længdemutationer behøver derfor ikke at bestå af 3 baser. Yderligere synes sekventeringsfejl hyppige (og afhængige af undersøgeren), bl.a. tyder de mange "x" i sekvenserne på dette. Derfor voldt aligneringen meget store problemer, indtil man har fundet den korrekte "standardlængde". Når denne først er fundet, er det bare at indsætte streger eller spørgsmålstegn på de steder, hvor der mangler baser, og slette overskydende baser, hvor disse alligevel ikke giver information, som beskrevet i Manhart (1995) for 16S rRNA. Hellere bortkaste information end at indføre fejlinformation.

Tilfældigvis begyndte jeg aligneringen med karsporeplanterne, der ikke anvendes i denne rapport. De nævnes alligevel her, fordi aligneringen var både meget vanskelig og meget tidskrævende, og helt i modsætning til 18S rRNA-sekvenserne i Coniferales (se nedenfor). Så dersom jeg ikke havde beskæftiget mig med karsporeplanterne, ville jeg have fået en helt forkert opfattelse af problemerne med det ikke proteinkodende ribosomale RNA, og jeg ville givetvis have anset 18S rRNA for næsten lige så nem og sikker som rbcL.

Coniferales. De fleste coniferales var sekventeret af Chaw et al. (1993, 1995, 1997A), der beskriver en speciel omhu ved sekventeringen, og der var intet angivet om, at basesekvenserne skulle være korrigerede inden de kom til GenBank. De faldt i to grupper, hvor den eneste forskel var en enkelt extra base i den ene gruppe. Den ene gruppe var identisk med min alignering af karsporeplanterne.

Pinaceae. Chaw et al. (1997B) har sekventeret diverse arter indenfor Pinaceae, der ikke findes i GenBank, men Chaw nægtede personligt i 1999 at frigive basesekvenserne med henvisning til en forestående Pinaceae-artikel. En fornyet henvendelse i 2000 gav samme negative resultat.

Podocarpaceae. Kelch (1998) har sekventeret og aligneret nogle Podocarpaceae arter. For at danne mig et indtryk om Podocarpaceae uden selv at udføre arbejdet med at hente baser hjem fra GenBank og alignere disse, anmodede jeg Kelch om at maile mig hans alignerede baser, hvilket han slet ikke svarede på. Da jeg ikke behøvede alle arterne, fordi jeg alligevel ikke kunne sammenligne dem med Pinaceae, som Chaw ikke ville frigive, er kun 6 repræsentative arter medtaget.

PAUP-kladogrammer med 18S rRNA blev ligesom ved rbcL (om end i mindre udstrækning) lavet i forskellige kombinationer af fx Coniferales, Karsporeplanter og alle grønne planter, hvor udvalgte arter eller samtlige alignerede arter blev medtaget. Til rapporten her blev det hele gentaget som beskrevet under rbcL med de 3 dér nævnte outgroups.

### **28S rRNA:**

Aligneringen af 28S rRNA voldte tilsvarende problemer som nævnt under 18S rRNA. Da baseantallet i 28S rRNA kun var lidt over en trediedel af base-antallet for 18S rRNA gik aligneringen lettere, og problemerne blev løst på tilsvarende måde.

PAUP-kladogrammerne i 28S rRNA var præget af det færre antal sekventerede arter, hvorfor der i første omgang blev der kun lavet kladogrammer med det totale artsantal. Yderligere er der grund til igen at gøre opmærksom på, at 28S rRNA-kladogrammerne med al sandsynlighed må være betydeligt mere usikre end de tilsvarende 18S rRNA-kladogrammer, idet der kun er godt en trediedel så mange baser i sekvenserne til brug for 28S rRNA-kladogrammerne. I modsætning til Stefanovic et al. (1998), der kun anvender transversioner, anvendte jeg samtlige mutationer. Til rapporten her blev det hele gentaget som beskrevet under rbcL med de 3 dér nævnte outgroups.

## **Kemi:**

Medens rapportens molekylærgenetiske undersøgelser udelukkende bygger på andres sekventeringer, bygger mine kemiske overvejelser kun delvis på andres analyser, idet der også er et selvstændigt moment med brug af nålesmagen (se senere), skønt anvendelse af smagssansen bestemt ikke er en officielt anerkendt videnskabelig analysemetode.

Terpener og andre æteriske olier såvel som flavonoider og andre kemiske indholdsstoffer ville kunne belyse slægtskabsforholdene indenfor Gymnospermerne yderligere, så jeg har forsøgt at undersøge disse nøjere. Desværre står resultaterne af mit arbejde på dette område slet ikke mål med indsatsen, idet der ikke findes ordentlige oversigter over tilstedeværelse, mængdeangivelse og fravær af disse stoffer hos hver væsentlig art indenfor hver slægt.

Gottlieb et al. (1990) bringer ganske vist 3 tabeller over henholdsvis flavonoider, terpenoider m.m. og andre specifikke kemiske forbindelser, men disse meget fyldige tabeller er for det meste kun baseret på undersøgelse af en eller få tilfældige arter indenfor hver familie (og arten er ikke angivet), og de er uden mængdeangivelse. Tabellerne bygger hovedsagelig på oplysninger fra Hegnauer (1962 og 1985), da forfatterne ikke selv har kunnet overkomme at søge i Chemical Abstracts. Flavonoidværket af Harborne & Baxter (1999) er først kommet til senere.

Flavonoider: Det synes at fremgå af Harborne & Baxter (1999), at nogle Podocarpaceae og nogle Zamia arter indeholder de samme flavonoider. Andre flavonoider, der er almindelige blandt Coniferales, findes ikke nævnt for Pinaceae. Oplysningerne er som ovenfor nævnt ikke så meget værd, når man ikke ved, om der er undersøgt for identiske flavonoider i et stort antal af arter indenfor diverse slægter og familier.

Æteriske olier: De æteriske olier er terpenoider m.m. Speciel de lettest flygtige kan give de forskellige Coniferales-nåle en karakteristisk smag (se nedenfor).

Kemien for Gnetales: Som allerede omtalt i indledningen på side 3 synes kemien at være det mest sikre tegn på Gnetales tilhørsforhold til Gymnospermerne.

Nålearomaen: Ved at bide i nåletræernes nåle m.m. når de æteriske olier (nok især de letflygtige monoterpener) frem til lugtecentret, hvor de vil påvirke sansecellerne i forskellig grad. Dvs at man anvender sin smags- lugtesans som en slags kemisk gaskromatograf. Uden andet sammenligningsgrundlag end en Picea abies nål er det dog yderst ubestemt, hvad man egentlig bestemmer vha nålearomaen, og jeg har ikke lugtet granlugt i de olier, som Hegnauer angiver som karakteristiske for grannåle. Imidlertid er man intet øjeblik i tvivl om, at nålearomaen er en karakteristisk arvelig egenskab med kemisk baggrund. Det ville således være dumt at se bort fra de oplysninger, som man kan hente på denne måde (aroma resultater se senere).

**OBS.** Lignende kemiske analyser af smagsstoffer er førhen anvendt andetsteds i plantetaxonomien. Således er glycosinolater karakteristiske for Capparales, og slægtskabet mellem nogle Brassicaceae arter er tidligere blevet revurderet og ændret på grundlag af de sennepsolier, som de indeholder.

## **Kladistiske analyser:**

**Kladogrammerne findes som NJ, MP(1000), MP(strict cons.), ML + enkelte MP(Bootstrap).**

**Se alt i separat bilag: BILAG med OVERSIGT.**

For samtlige medtagne Gymnosperm-taxa med de tre gener rbcL, 18S rRNA og 28S rRNA blev såvel outgroup som algoritme varieret, hvilket gav en mængde kladogrammer.

### **A. Variation i outgroup:**

- 1) Total: Nærmeste Angiosperm + nærmeste Pteridofyt i outgroup.
- 2) Gnetales som outgroup. (Ingen Angiosperm og ingen Pteridofyt).
- 3) Cycadales/Ginkgo som outgroup. (Ingen Angiosperm og ingen Pteridofyt).

Variationen i outgroup blev gennemført dels for at undersøge indflydelsen på Gnetales og dels for at se om valget af outgroup havde indflydelse på træet indenfor Coniferales.

**B. Variation i algoritme:** Der anvendtes NJ, MP og ML for at undersøge algoritmens indflydelse.

**"off the record":** Det er praktisk umuligt detaljeret i ord at sammenligne mindst 36 kladogrammer (12 for hvert gen) indbyrdes samt at sætte dem i relation til alle tidligere foretagne undersøgelser. En oversigt er forsøgt i tabel 2 på side 22. Nedenfor er forsøgt en mere sproglig redegørelse på én side. Hvert gen er her først sammenlignet med tidligere undersøgelser, dernæst er Gnetales stilling diskuteret for samtlige kladogrammer. Coniferales er ikke gennemgået nøjere i den sproglige oversigt, fordi træet for Coniferales generelt ikke volder problemer. Tabellen og den sproglige del har taget over en uge at udarbejde. **Det er ikke let læsning, og kontrol af træerne tager tid!!!**

### **rbcL-resultater:**

Bortset fra Gnetales (som nærmest er "tvunget" ind blandt Gymnospermerne) og de ekstraordinært mange Coniferales taxa er resultaterne identiske med de tidligere rbcL-undersøgelser hos Brunfeldt et al. (1994), Chase et al. (1993), Price et al. (1993), Källersjö et al. (1998) og for de få her medtagne Araucariaceae arter også Setoguchi et al. (1998), når der er anvendes de samme arter (dvs ens sekvenser) og samme algoritmer.

Gnetales får tre forskellige placeringer i total-træerne (Angiosperm/Pteridofyt outgroup).

NJ giver Gnetales som søster til alle andre Gymnospermer. MP giver Gnetales i outgroup med Pteridofytten (og altså ikke Angiospermen)!!! ML giver Gnetales som søster til Pinaceae.

Gnetales-outgroup træerne opfører sig alle ens og pænt, Gnetales forbliver i outgroup som eneste taxa. Cycadales/Ginkgo træerne opfører sig pænt, Gnetales er Pinaceae-søster i MP og ML, men søster til Conifer II (Coniferales minus Pinaceae) i NJ.

### **18S rRNA-resultater:**

Undersøgelsen er identisk med de tidligere foretagne undersøgelser (bortset fra evt. forskelle i aligering), og den giver derfor stort set samme resultater som tidligere angivet hos Chaw et al. (1993, 1995, 1997 A, 2000) [sekvenserne fra Chaw (1997 B) er desværre ikke tilgængelige], Doyle et al. (1994), Hamby & Zimmer (1992), Qui et al. (1999), Troitsky et al. (1991) og for de få her medtagne Podocarpaceae arter også Kelch (1998).

Gnetales bliver søster til Coniferales i NJ, MP og ML totaltræerne (Angiosperm/Pteridofyt outgroup), som det også er angivet hos fx Chaw (1997A og 2000).

Gnetales-outgroup træerne opfører sig alle ens og pænt, Gnetales forbliver i outgroup som eneste taxa. Cycadales/Ginkgo træerne opfører sig ens og pænt, Gnetales bliver søster til alle Coniferales.

### **28S rRNA-resultater:**

Der er lavet et NJ-træ med kun Pteridofytter som outgroup, men det er ikke gengivet i rapporten. Dette træ er med brug af alle data nærmest identisk med det tilsvarende træ i Stefanovic et al. (1998), skønt de har "manipuleret" med deres data og kun brugt transitions for at få et fornuftigt træ!

Gnetales bliver søstergruppe til Angiospermen (Nymphaeales) i outgroup'en på NJ-totaltræet, medens Pteridofytten (Polypodium), der også er defineret som outgroup, først kommer i næste trin med samtlige øvrige Gymnospermer som søstergruppe. Cycadales/ Ginkgo bliver så søstergruppe til Pinaceae. — I MP(cons.)-totaltræet forbliver Nymphaeales og Polypodium pænt i outgruppen, hvor de bliver søstergruppe til en tvedelt Coniferales II, dvs at træet kommer til at virke helt forkert. Således kommer Pinaceae først ca. 6 trin inde i Coniferales II, hvor den er søstergruppe til Ginkgo. Ginkgo/Pinales er søster til Cycadales fulgt af Gnetales (der altså står ekstremt langt inde i træet). — ML-totaltræet er næsten identisk med MP-træet (dvs næsten lige så forkert), dog er Gnetales nu søster til Cycadales/Ginkgo, medens Pinaceae står alene i den anden gren.

Gnetales er søster til Cycadales i MP- og ML-totaltræerne, i NJ-totaltræet er den Nymph.-søster.

Gnetales-outgroup træerne giver alle Cycas nærmest ved Gnetales og Ginkgo nærmest Pinaceae.

Cycadales/Ginkgo træerne NJ, MP (delvis ML) giver Ginkgo/Pin. yderst og Cycas/Gnetales dernæst.

**OBS.** Næsten samtlige træer placerer Gnetales nærmest Cycas, og Ginkgo er nærmest ved Pinaceae (medens Ginkgo sædvanligvis stadig er nær ved Cycadales).

## Nålearomaen:

### **Kemi. Aroma.**

**Definition:** Smagen (aromaen) af *Picea abies* nåle (ved at bide i dem) kaldes Picea-smag.

Pinaceae med tydelig Picea-smag: *Picea*, *Abies*, *Tsuga*, *Cedrus*.

Pinaceae uden tydelig smag: *Larix*.

Pinaceae med en tydelig smag, der er mere eller mindre forskellig fra Picea-smagen: *Pinus* (smagen ligner Picea-smagen en del), *Pseudotsuga* (med en appelsinlignende aroma).

*Araucaria araucana* og *A. heterophylla* har ingen tydelig smag.

Podocarpaceae med tydelig Picea-smag: *Saxogothea conspicua*, *Podocarpus nivalis*, *P. alpinus*, *P. cunninghamii* (= *P. hallii*).

Podocarpaceae uden tydelig smag: *Podocarpus nivalis* var. *erectus* (vistnok hybrid mellem *P. nivalis* og *P. totara*), *P. totara*, *P. henkelii*, *P. latifolius*, *P. macrophyllus*, *Decussocarpus mannii*.

Podocarpaceae med en tydelig smag, der er forskellig fra Picea-smagen: *Afrocarpus gracilior*, *Afrocarpus falcatus*.

*Sciadopitys* har en smag, der tydeligt indeholder Picea-smagen, men den ligner mere *Torreya*-smag. *Torreya nucifera*, *T. californica*, og *T. taxifolium* har en speciel aromatisk smag.

*Taxus baccata*, *Cephalotaxus fortunei*, *C. harringtonii* og *Amentotaxus argotaenia* har ingen tydelig smag.

*Cunninghamia lanceolata*, *Taxodium distichum*, *Metasequoia* og *Cryptomeria japonica* fra Taxodiaceae har ingen markant smag, medens diverse Cupressaceae (fx *Chamaecyparis*, *Thuja* og *Juniperus*) er kendt for deres meget markante lugt og smag, der dog er meget forskellig fra fra Picea-smagen.

### **Konklusioner mht aromaen i Coniferales:**

Da samme aroma er tilstede i såvel Pinaceae som i Coniferales II synes Picea-smagen at være en arv fra forfædrene til samtlige Coniferales.

Aromaen synes at være temmelig stabil. Den findes således (med mindre variationer) i næsten hele Pinacea (ikke tydelig i *Larix*). I Araucariaceae vides kun, at to af slægten *Araucaria* ikke har smagen.

Podocarpaceae er derimod meget interessant af flere grunde. Dels at den overhovedet har Picea-smag, selv om den hører til Conifer II. Dels at smagen er tilstede i *Saxogothea*, der iflg. Conran et al. (2000) tilhører en af de første afspaltninger på Podocarpaceae-træet, men også i nogle *Podocarpus* arter, der hører til blandt de sidste afgreninger i træet, medens de "mellemliggende" (men trods alt nok mere ændrede) *Afrocarpus* ikke har smagen. Endelig har *P. nivalis* smag, medens den endog meget nærtbeslægtede *P. totara* ikke har det, og hybrididen *P. nivalis* var. *erectus* heller ikke har det.

Interessant er det, at aromaen fortsætter i *Sciadopitys*, hvor den delvis ændrer smag og videre i *Torreya*, hvor smagen er yderligere ændret. Til gengæld findes den ikke i resten af Taxaceae, og samtidig forsvinder den i Taxodiaceae. Til gengæld dukker smag af en helt ny og intensiv smagende karakter op i Cupressaceae s.s.

Picea-smagen ser således ud til at være forsvundet flere gange i udviklingen, medens der ikke er sikre tegn på, at den er genopstået (stort set uændret) efter at have været forsvundet. Til gengæld kan en helt ny aroma (Cupressaceae s.s.) dukke op, efter at smagen har været borte hos Taxodiaceae.

**Aromastofferne er ikke identificeret.** Det kemiske navn og mængden af aromastofferne i diverse nåle er egentlig uden betydning for min brug af disse. Desuden ville det have været svært at få udført de kemiske analyser, og disse ville have krævet en stor arbejdsindsats.

**En forklaring på manglende smag:**

For Taxales (excl. *Torreya*) angiver Gottlieb et al. (1990) følgende: "A very different situation is observed for mono and sesquiterpenes which abound in types and numbers in most conifers. Only the Taxaceae (*Taxus*, but not *Torreya*) and Ginkgoaceae are exceptional in this respect, both characterized by highly oxidized diterpenoids, respectively taxanes and ginkgolides. The oxidative power of their biosynthetic machinery seems hardly compatible with the presence of easily oxidizable, simple monoterpenes."

Dvs at de smagsgivende monoterpener mangler i Taxaceae (excl. *Torreya*) pga en grundlæggende biokemisk forskel. Muligvis gør noget lignende sig gældende for de øvrige aromafattige arter?

## **Diskussion.**

Når der ses bort fra Gnetales placering indenfor Gymnospermerne, som vil blive diskuteret nedenfor, er på Fig. 1 (side 21) angivne stamtræ endog særdeles sikkert, selv om der naturligvis er enkelte undersøgelser, der angiver små afvigelser herfra. Det er således i overensstemmelse med både rbcL og 18S rRNA-træerne, når en Angiosperm + en Pteridofyt anvendes som outgroup. Det er værd at notere sig, at det angivne træ er den bedste fællesnævner for samtlige molekylærgenetiske undersøgelser, og der er ikke offentliggjort noget andet træ, der er underbygget med lignende evidens.

### **I. Angiospermerne er monofyletisk (og søstergruppe til gymnospermerne).**

Alle hidtidige molekylærgenetiske undersøgelser viser, at de nulevende Angiospermer er en monofyletisk gruppe. De seneste undersøgelser i Qui et al. (1999) og delvis i Källersjö et al. (1998), Bowe et al. (2000) og Chaw et al. (2000) viser at de ældste Angiospermer synes at være Amborella, Nymphaeales og Illicales. Familierelationerne indenfor Angiospermerne behandles ikke her.

### **II. Gymnospermerne er monofyletisk (og søstergruppe til Angiospermerne).**

Næsten alle hidtidige molekylærgenetiske undersøgelser viser, at de nulevende Gymnospermer er en monofyletisk gruppe. Som undtagelser kan nævnes Gnetales placering som søstergruppe til Angiospermerne i kladogrammerne baseret på rbcL- og NJ - 28S rRNA-træet, hvis kun Pteridofytter anvendes som outgroup, men denne fejlplacering må være et artefakt (se nedenfor).

Donoghue & Doyle (2000) når (som tidligere nævnt i "Indledning" side 3) til den samme konklusion, at Gnetales er en Gymnosperm, selv om de tidligere begge tidligere er gået stærkt ind for anthofyt-teorien, og de fastslår, at det er nødvendigt med mere morfologisk arbejde så palæobotanikerne får et bedre arbejdsgrundlag.

### **III. Gnetales er Gymnospermer (muligvis nær Pinaceae, eller nær Cycadales).**

Fylogeni for den besynderlige orden Gnetales er meget interessant. Selv om alle andre planters fylogeni rent faktisk er helt uafhængig af Gnetales, har den store uenighed om netop dette problem alligevel sinket opklaringen af de øvrige frøplanters fylogeni. Formålet med denne afhandling er først og fremmest at fastslå, at Angiospermerne ikke nedstammer fra nulevende Coniferales familier, og dernæst at prøve at fastlægge fylogeni indenfor Coniferales.

Selv om en diskussion af Gnetales stilling i udviklingstræet måske kan sløre rapportens egentlige formål, er det nu så sikkert, at Gnetales tilhører Gymnospermerne, at man næppe kan undlade at omtale dette faktum.

#### **Gnetales tilhørsforhold morfologisk.** Her gentages det tidligere nævnte i "Indledning" på side 3:

Donoghue & Doyle (2000), som tidligere var to største tilhængere af anthofyt-teorien på grundlag af morfologien, har nu revurderet deres synspunkt, fordi et stigende antal molekylærgenetiske undersøgelser viste, at Gnetales hører sammen med Gymnospermerne (se senere). Det drejede sig især om morfologiske ligheder med Angiospermerne mht kar, blomsterlignende strukturer med nektar-dannelse og delvis insektbestøvning hos nogle arter af alle Gnetales familierne, dobbelt befrugtning og i nogen grad Gnetums fjerstrengede blade. Nogle af disse ligheder afviger i detaljerne, således at der sandsynligvis er tale om en paralleludvikling, og andre af lighederne genfindes hos Gymnospermerne. Donoghue & Doyle (2000) siger således om megasporerne, at tunica består af to celleglag hos Angiospermerne, men et hos Gnetales; og megaspore væggen er tynd hos Gnetales, men mangler hos Angiospermerne". Karrene er en paralleludvikling iflg. Carlquist (1996). Også dobbelt befrugtning hos Gnetales kan være en paralleludvikling til Angiospermerne iflg. Friedman & Carmichael (1995), og iflg. Friedman & Floyd (2000) kan dobbelt befrugtningen hos Gnetales tværtimod være homolog med sjældne lignende tilfælde hos Gymnospermerne.

Konklusion: Gnetales påståede morfologiske tilhørsforhold til Angiospermerne viser sig nu tvivlsomt. Ang. morfologien se: "Biology and Evolution of Gnetales" i Int. Jour. Pl. Sci. 157(6): S1-S125 (1996).

#### **Gnetales tilhørsforhold kemisk.** Her gentages det tidligere nævnte i "Indledning" på side 3:

Selv om den berømte plantekemiker Hegnauer (1962) på baggrund af Anthofyt-teorien beskrev en stor kemisk lighed mellem Angiospermerne og Gnetales, påviste Gottlieb & Kubitzki (1984) punkt for punkt, at alle de nævnte ligheder måtte være paralleludviklinger, idet disse ligheder ikke fandtes hos de ældste Angiospermer, men først i senere udviklede familier. Ligeledes påviste de, at Gnetales manglede nogle ganske fundamentale kemiske træk (dannelse af Schiff-baser og O-methylering), der findes i alle Angiospermer, men er yderst sjældne blandt nåletræerne. – Carnahan & Harris (2000) angiver på grundlag af Ferulic acid i cellevæggene, at Gymnospermerne er en monofyletisk gruppe.

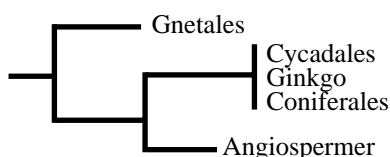
Konklusion: Gnetales kemi viser store ligheder med Gymnospermernes kemi, og de kemiske ligheder med Angiospermerne, der tidligere har været fremhævet, skyldes paralleludvikling.

**Gnetales tilhørsforhold molekylærgenetisk.**

Når Gnetales altid har voldt så store problemer at få placeret korrekt, skyldes det, at Gnetales har undergået langt flere mutationer end de øvrige Gymnospermer, hvilket medfører at den giver lange grene "long branch" i kladogrammerne. Det betyder igen, at en umiddelbar sammenligning med naboerne bliver mere usikker, noget man må tage med i sine overvejelser.

To af de første molekylærgenetiske undersøgelser, der blev udført, anvendte *rbcL* og 28S rRNA, og begge disse gener giver oftest rent umiddelbart kladogrammer, som (uden stor signifikans) synes at vise, at Gnetales står nærmere Angiospermerne end Coniferales.

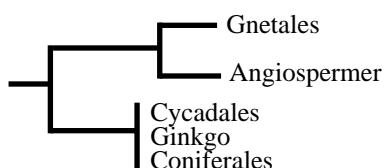
Reelt er der stadig kun sekventeret ialt 3 gener med et større artsantal, det er foruden de to ovennævnte 18S rRNA, dvs akkurat de 3 gener som jeg har undersøgt. Netop når det drejer sig om Gnetales (mange mutationer, "long branch") har artsantallet måske større betydning end ellers.

**OVERSIGT: Gnetales tilhørsforhold iflg. litteraturen (incl. morfologi og kemi):****A. Gnetales**

18S + 26S rRNA: Hamby & Zimmer (1992).

*rbcL*: Albert et al.\* (1994); Källersjö et al. (1998).

Alle de med \* mærkede forfattere er kun citeret efter en oversigtsartikel i Doyle (1998).

**B. Anthofyt**

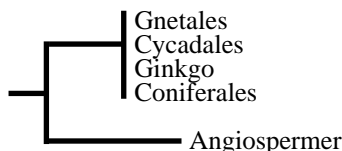
Morf.: Crane\* (1985); Doyle & Donoghue\* (1986, 1992);

Laconte & Stevenson\* (1990); Nixon et al.\* (1994); Doyle (1996).

18S + 26S rRNA: Hamby & Zimmer (1992).

*rbcL*: Chase et al. (1993); Price (1996).

28S rRNA: Stefanovic et al. (1998).

**C1. Gymnosp. Ukendt**

Morf.: Donoghue & Doyle (2000); [Friedman & Carmichael (1995) + Friedman & Floyd (2001), dette er en mulighed, se side 10.]

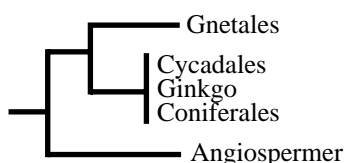
Kemi: Gottlieb & Kubitzki (1984); Carnachan & Harris (2000).

MADS-box: Becker et al. (2000); Theissen et al. (2000); Winter et al. (1999); LEAFY: Frohlich & Meyerowitz (1997).

4,5S + 5S + 5,8S: Troitsky et al. (1991).

9149 baser fra diverse gener: Hansen et al. (1999).

cpDNA-ligheder: Raubeson (1998) + personlig kommunikation.

**C2. Gymnosp. Først**

Legumin: Shutov et al. (1998).

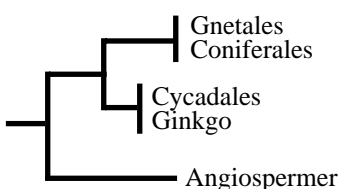
*rbcL*: Haseby et al.\* (1992).

*chlB*: Boivin et al. (1996) - **OBS**: Excl. Angiospermer.

cpITS1 + cpITS2: Goremykin et al. (1996).

rpoC1: Samigullin et al. (1999).

psbA + psbB: Sanderson et al. (2000).

**C3. Gymnosp. Conif.-søst.**

cpITS1 + cpITS2: Goremykin et al. (1996).

18S rRNA: Chaw et al. (1995, 1997, 2000)

*rbcL* (manipuleret): Chaw et al. (2000).

mtSSUrDNA: Chaw et al. (2000).

*cox3*: Malek et al. (1996).

*cox1*: Bowe & DePamphilis (1997).

3 + 4 gener samlet (kun mt-atpA er nyt): Bowe et al. (2000).

psbA + psbB: Sanderson et al. (2000).

5 gener (incl. *rbcL* + 18S rRNA): Qui et al. (1999).

rpoC1: Samigullin et al. (1999).

Der skal ikke gås i detaljer med de enkelte undersøgelser, men visse hovedpunkter skal fremdrages. Selv om botanikerne er i tvivl om, hvorvidt Gnetales morfologi reelt er homolog til Angiospermerne, eller det drejer sig om en paralleludvikling, dominerer disse tilsyneladende ligheder helt botanikernes syn på Gnetales fylogeni. (Homologiproblemet kan i fremtiden løses vha MADS-box gener, se nedenfor). Stor set ingen botanikere inddrager kemien i den nyere diskussion, skønt det med sikkerhed allerede i 1984 med sikkerhed er blevet vist, at alle Gnetales tilsyneladende kemiske ligheder med Angiospermerne er paralleludviklinger, medens Gnetales på de afgørende punkter ligner Gymnospermerne kemisk.

Molekylærgenetisk kommer de populære rbcL-undersøgelser ret tidligt, de virker sikre (i starten er man ikke opmærksom på "long branch" fænomenet), og rbcL resultaterne understøtter den i forvejen mest anerkendte anthofyt-teori, om end signifikansen ikke er overvældende. Om Hamby & Zimmers (1992) undersøgelse vha 18S + 26S rRNA er at sige, at Chaw et al. (1995, 1997 og 2000) netop bruger 18S rRNA som et væsentligt argument for Gnetales samhørighed med Gymnospermerne. Den sidste undersøgelse (28S rRNA), der tilsyneladende støtter Anthofyt-teorien, gør det i så ringe grad, at den aldrig har været brugt som argument for teorien.

Samtlige molekylærgenetiske undersøgelser af Gnetales fylogeni (undtagen rbcL) understøtter således, at Gnetales tilhører Gymnospermerne!!! Selv om ingen af disse undersøgelser enkeltvis er særligt overbevisende, og selv om mange af dem blander op med gener, hvor resultatet er kendt på forhånd, er det vel alligevel overvældende, at ca. 20 - 30 gener påstås at vise Gnetales samhørighed med Gymnospermerne, hvor kun rbcL rigtigt viser det modsatte. Endelig må tilføjes, at signifikansen af rbcL resultaterne ikke er større, end at Chaw et al. (2000) vha manipulation anvender rbcL som argument for Gnetales samhørighed med Gymnospermerne.

MADS-box gener, der viser at Gnetales tilhører Gymnospermerne, er specielle, fordi de koder for transkriptionsfaktorer, der kontrollerer udviklingen af de morfologiske strukturer (herunder forplantningsorganerne), og de er meget konservative. De kan derfor vise, om sådanne strukturer er homologe eller ej, selv om strukturerne er morfologisk svært sammenlignelige. Fylogenien af MADS-box gener er kraftigt korreleret med oprindelse og evolution af planternes reproduktive strukturer såsom frøanlæg og blomster, se fx Theissen et al. (2000).

Det andet spørgsmål, hvorvidt Gnetales er søstergruppe til alle de øvrige Gymnospermer, eller den er søstergruppe til Coniferales synes overfladisk iflg. ovenstående oversigt at være afgjort med stor majoritet til fordel for Coniferales som søstergruppe. Ved en nøjere analyse af de enkelte arbejder, giver mange af generne mulighed for begge tolkninger, og hvis man sletter alle de særligt tvivlsomme resultater, er der omtrent ligevægt mellem de to muligheder.

Mine personlige resultater, hvor jeg har undersøgt samtlige 3 gener, hvor der er sekventeret et større artsantal indenfor Gymnospermerne, giver alle til resultat, at Gnetales er søstergruppe til samtlige Gymnospermer. [Bemærk at min 18S rRNA version giver et andet resultat end Chaw et al.s (1997, 2000), nok pga af en mindre forskel i aligeringen]. Specielt 28S rRNA undersøgelsen, der dog er ret upålidelig pga det lave baseantal, indicerer kraftigt, at Gnetales er søster til Cycadales.

Gnetales er dog som "long branch" så afvigende, at jeg ikke vil drage en sikker konklusion på et så svagt grundlag.

Selv om enkelte andre forfattere også har fået placeret Gnetales inde i Coniferales, må man alligevel undre sig, når Chaw et al. (2000) i en artikeloverskrift påstår, at Gnetales er opstået midt i Coniferales. Påstanden er heller ikke så velbegrunderet i artiklen, at man behøver bekymre sig. (Således bygger hovedbegrunderen på en manipulation med de anerkendte rbcL-data, hvor samme manipulation desuden forvrænger Coniferales fylogenien). Rent faktisk synes en samtidig og korresponderende artikel af Bowe et al. (2000) at give større baggrund for den absurde påstand, men alle de deri afbildede kaotiske fylogenetiske afbildinger (non-rooted) er svært tolkelige (og fx viser rbcL-"plamagen" ikke overensstemmelse med de alm. anerkendte rbcL-træer).

I samtlige kladogrammer havner Ginkgo og Cycadales langt hyppigere i Coniferales, end Gnetales gør det!

#### **IV. Ginkgo og Cycadales er nært beslægtede (og de er ældre end Coniferales).**

Ginkgo og Cycadales er nært beslægtede, ligesom deres forplantnings organer og udviklingen af disse er det morfologisk iflg. bl.a. Bhatnagar & Moitra (1997) . Sandsynligvis kommer Cycadales før Ginkgo som vist på Fig. 1, men mange kladogrammer viser dem ligestillede som søstergrupper, enkelte har endda Ginkgo først.

## V. Coniferales er monofyletisk, og stamtæet fremgår af Fig. 1.

### A. Monofyli.

Til trods for, at Coniferales mangler autapomorfier, udgør de alligevel en så morfologisk homogen gruppe, der ligger fjernt fra alt andet undtagen Ginkgo, jvf. Page (1990). Det er derfor naturligt at antage, at gruppen er monofyletisk.

Som tidligere nævnt har Raubeson & Jansen (1992) vha en meget sjælden strukturel cpDNA mutation vist, at Coniferales med meget stor sikkerhed er monofyletisk. De har påvist, at alle 7 undersøgte Coniferales familier med ialt 19 arter har tabt et "inverted repeat", som findes i samtlige 15 andre undersøgte familier, heraf 6 Gymnospermfam. [Gnetales (3 fam.), Ginkgo og Cycadales (2 fam.)] og heller ikke i 9 forskellige familier af karsporeplanter [Lycopodium, Selaginella, Isoetes, Psilotum, samt 5 bregnefamilier].

### B. Oversigt over stamtræet Fig. 1:

Nogle steder i litteraturen inddeles Coniferales i Coniferales I = Pinaceae, der anses for at være søstergruppe til alle de øvrige Coniferales = Coniferales II.

Coniferales II spalter sig ud i to grene. Den ene gren er de sydlige nåletræer bestående af claden Araucariaceae og Podocarpaceae s.l. (= Phyllocladaceae + Podocarpaceae). Fra den anden gren afspalttes først Sciadopitys, dernæst Taxaceae s.l. (= Taxaceae + Cephalotaxaceae), og grenen ender i Cupressaceae s.l. (dvs først den tidligere Taxodiaceae, der uden skel overgår i Cupressaceae s.s.). Det må dog tilføjes, at selv om Taxaceae er en sidegren, så er afstanden mellem Cunninghamia, der er den ældste Taxodiaceae, og den nærmeste Taxaceae ikke specielt stor. Måske er den mindre end afstanden mellem Cunninghamia og Cupressus (som er en af de sidst udviklede Cupressaceae).

Ovennævnte inddeling støttes (evt. med mindre afvigelser) af næsten samtlige forfattere, og specielt er der slet ikke noget alternativ, der støttes af andre end den enkelte forfatter selv.

### C. Coniferales I: Pinaceae oversigt.

Som nævnt er Pinaceae søstergruppe til alle andre nåletræer. Trods ihærdige forsøg er fylogenen indenfor Pinaceae ikke tidligere sikkert fastlagt. Der er tre hovedspørgsmål som fremgår af Fig. 2A, B, C og D, side 23.

- 1) Valget af outgroup synes at influere på resultatet, som det fremgår af Fig. 2: B, C og D.
  - Vælges "forfædrene" Ginkgo (el. Cycas) som outgroup (få mutationer), fås træerne 2C og 2D.
  - Vælges søstergrupperne Podocarpaceae-Sciadopitys som outgroup, fås nærmest træ 2B.
- 2) Slægtskabet mellem *Pinus*, *Picea* og *Cathaya* er ukendt, de er langt fra nært beslægtede (Fig. 2A), men de ses alligevel sædvanligvis i forbindelse med hinanden i kladogrammerne (Fig. 2B, 2C, 2D).
- 3) Hvilken Pinaceae-slægt er ældst på stamtræet?
  - a. Er det *Pinus*, *Picea* el. *Cathaya* som egne rbcL (NJ + MP) kladogrammer med Podocarpaceae-Sciadopitys som outgroup viser? Dette støttes af rbcL (MP) med Cycas-Podocarp.-Arauca. som outgroup i Wang et al. (1998 B) og RFLP-trnK (MP 50% cons.) uden rod i Wang et al. (1998 A). *Pinus* er også ældst iflg. RFLP af 6 cp.-gener med Sciadopitys som outgr. i Tsumura et al. (1995).
  - b. Er det *Cedrus* som mine rbcL (NJ + MP) cladogrammer med Ginkgo som outgroup viser? Dette støttes af rbcL (NJ) med Cycas-Podocarp.-Arauca. som outgroup i Wang et al. (1998 B) og af matK + nad5 (uafhængig i MP + ML) med Cycas som outgroup samt 4CL uden outgroup i Wang et al. (2000).
  - c. Er det *Larix/Pseudotsuga*-claden [ Gernandt & Liston (1999) ] som 18S rRNA (NJ + ML + MP) cladogrammer med Sciadopitys-Podocarpaceae-Araucariaceae iflg. Chaw et al. (1997 B) viser?

Træ 2A med claden *Larix/Pseudotsuga* og claden (*Pseudolarix*+*Tsuga*+*Abies/Keteleeria*) er ret sikker.

Det er irriterende, at Chaw et al.s (1997 B) træer er utilgængelige, og Chaw nægter at oplyse 18S rRNA Pin.-baserne. Det er irriterende, at Wang et al. (2000) kun har brugt Cycadales og ikke også Podocarpaceae-Sciadopitys som outgroup.



Molekylærgenetisk giver kladogrammerne ikke entydigt svar på familierelationerne indenfor Pinaceae. Tilsyneladende er valget af outgroup afgørende for resultatet. Det ikke er specielt logisk, at en outgroup fra en anden orden (Ginkgo/Cycas), selv om det er en forfader, skulle give et mere korrekt resultat end en outgroup fra en nær søstergruppe (Podocarpaceae/Sciadopitys) indenfor samme orden. Men molekylærgenetikken kan fortælle mere, såfremt man går i detaljer med mutationerne. Som nævnt brugte jeg *Ginkgo* (med ekstremt få rbcL-mutationer) som udgangspunkt ved "håndtælling" til at bestemme dels de mutationer, der var fælles for alle Pinaceae, og dels de mutationer, der ikke var det. Det viste sig, at specielt *Cedrus* og *Larix* havde langt færre mutationer end de øvrige Pinaceae (*Cedrus* 14, hvoraf 7 unikke; *Larix* 10, hvoraf 2 unikke), hvilket gør begge til kandidater til titlen som stamfader. Dette bekræftes af den ligeledes tidligere nævnte undersøgelse af Szmidt et al. (2001), iflg. hvilken *Ginkgo* og *Larix* (*Cedrus* er ikke undersøgt) afviger fra de øvrige undersøgte Coniferales ved ikke at indeholde "RNA edited sites" i cox1 genet. Da *Cedrus* optæder som stamfader i kladogrammer fra de 3 gener rbcL, matK og nad5 (4CL har ingen rod) og kun i 18S rRNA viser *Larix* sig som stamfader, tyder dette på en *Cedrus*-lignende vækst som den mest sandsynlige stamfader.

Kemisk har *Cedrus* Picea-smagen, der genfindes i næsten hele Pinaceae + visse Podocarpaceae, medens *Larix* har tabt den, hvilket også gør *Cedrus* en anelse mere sandsynlig end *Larix*.

Skudmorfologisk er "juletræsteorien", dvs inddeling af Pinaceae i *Pinus*-lignende, *Abies*-lignende og *Larix*-lignende efter deres skudmorfologi både velkendt og udbredt, selv om den er forkert. Den får nu nye dimensioner. *Cedrus* har både kort- og langskud og kan derfor udvikle sig til alle Pinaceae. Skudmorfologisk er *Cedrus* og *Larix* så lig hinanden, at det ikke kan undre, at der er en temmelig "lige linie" mellem de to. Men også kortskuddene på både *Pinus* og *Pseudolarix*, kan være udviklet ud fra en *Cedrus*-ane, selv om de to førstnævnte står meget langt fra hinanden i kladogrammet.

Koglestillingens morfologi kan måske også give et vink. Store, opretstående kogler ser ret tyngdestridige ud, og opretstående kogler er formodentlig det oprindelige (findes også hos Araucariaceae). Opretstående kogler (især store) ændres sandsynligvis lettere til nedhængende end omvendt. *Cedrus* har opretstående koglestilling, der går igen i hele claden *Pseudolarix/Tsuga/Nothotsuga/Keteleeria/Abies* undtagen *Tsuga* samt delvis i *Larix*. Det bekræfter claden, da *Pinus/Picea/Cathaya* samt *Pseudotsuga* har nedhængende kogler. [Koglemorfologien bl.a. iflg. Farjon (1990)].

Morfologien af harpikskanaler kan også bekræfte det, idet kun *Pinus*, *Cathaya*, *Picea*, *Pseudotsuga* og *Larix*, der netop ikke står i den ovennævnte clade, altid har harpikskanaler i såvel xylem som 2 harpikskanaler i karstrengen i den unge pælerod iflg. Farjon (1990).

**OBS.** Tilfældige morfologiske overensstemmelser viser naturligvis ingenting, men de ovennævnte eksempler er ikke tilfældige, men viser, at makromorfologien ikke er i modstrid med træerne C og D. Farjon (1990) har lavet et resumé af stort set alle tidligere morfologiske afhandlinger, og han giver selv et intuitivt bud, der i høj grad bygger på forplantningsmorfologien. Farjons kladogram ligner faktisk de molekylærgenetiske 2C og 2D en del bortset fra, at Farjon har *Cedrus* som søstergruppe til *Abies*, hvorved *Cedrus* kommer til at stå meget langt fra *Pinus/Cathaya/Picea/Pseudotsuga/Larix*.

En *Cedrus*-ane som potentiel stamfader til Pinaceae vil sikkert skuffe mange botanikere, der har en intuitiv fornemmelse af at *Pinus* er ældst, fordi den afviger mest fra de øvrige Pinaceae og har en ældgammel opspaltning i haplo- og diploxyton. Jeg mener, at molekylærgenetikken suppleret med smagskemiske og morfologiske kendsgerninger viser, at træ 2C (med *Pseudolarix* tæt ved grenen til *Abies/Keteleeria*) er det sandsynligste og mest logiske stamtræ for Pinaceae.

### **Pinaceae: Genus *Pinus* (haplo- og diploxyton).**

*Pinus* (og *Abies*) blev undersøgt i separate rbcL-kladogrammer, der dog ikke gengives her, da samlekladogrammerne for Pinaceae og hele Coniferales m.m. (se disse i bilagene) gengiver resultaterne med tilstrækkelig tydelighed. For *Pinus* ses en tydelig opdeling i haplo- og diploxyton, der helt er i overensstemmelse med resultaterne fra den tidligere omtalte "håndtælling".

En senere, langt grundigere og større undersøgelse, der omfatter 32 arter af eurasiske *Pinus* under brug af rbcL, matK, trnV intron og rpl20-rps18 spacer regioner (ialt 3570 baser), findes i Wang et al. (1999), og mht opdelingen i haplo- og diploxyton giver den nøjagtigt samme resultat.

**Pinaceae: Genus *Abies* ("japanske" contra "californske").**

*Abies* blev som ovenfor nævnt også undersøgt i et separat rbcL-kladogram, der dog ikke gengives her, da samle-kladogrammerne for Pinaceae og hele Coniferales m.m. (se disse i bilagene) gengiver resultaterne med tilstrækkelig tydelighed. For *Abies* ses en tydelig opdeling i "japanske" (4 af de 5 i Japan voksende arter) og "californske" *Abies* (*A. magnifica* og den i Japan voksende *A. mariesii*). Dette er helt i overensstemmelse med de langt tydeligere resultater fra den tidligere omtalte "håndtælling". Af kladogrammerne fremgår samtidig den også under "håndtællingen" konstaterede store lighed mellem *Abies* og *Keteleeria*. Genetisk er ligheden i rbcL-kladogrammerne mellem *Keteleeria* og *Abies* så stor, at de måske burde indregnes i den samme slægt.

En tidligere undersøgelse af Tsumura & Suyama (1998) under anvendelse af mtDNA polymorfisme af de 5 i Japan groende *Abies*-arter viser, at *Abies mariesii* er totalt afvigende fra de øvrige 4 arter, men desværre havde forfatterne dengang ikke tilstrækkeligt fantasi til at medtage nogle ikke japanske arter til sammenligning. *A. mariesii*'s særstilling iht de 4 andre i Japan groende arter bekræftes også af Isoda et al. (2000), der har undersøgt 18 *Abies* arter vha cp-DNA trnL-intergenet-ic spacer, men desværre er *A. magnifica* ikke medtaget.

**Pinaceae: Genus *Picea*.**

*Picea sitchensis* er meget genetisk forskellig fra *P. abies* og *P. pungens*, forskellen skyldes dog ikke så meget spredte mutationer, men *P. abies* og *P. pungens* har en lang række ens mutationer (der er forskellige fra de øvrige sekventerede Pinaceae) et sted i slutningen af gensekvensen.

**D. Coniferales II: Coniferales minus Pinaceae.****1. Araucariaceae, Phyllocladaceae-Podocarpaceae claden.**

De "sydlige nåletræer" = Araucariaceae, Phyllocladaceae-Podocarpaceae claden er den ene gren af Coniferales II. Araucariaceae er hovedsageligt sekventeret og undersøgt i rbcL af Setoguchi et al. (1998), denne undersøgelse har jeg ikke gentaget bl.a. pga af tidsmangel, selv om det ville have meget interessant at sammenligne variationen i mutationerne for de enkelte Araucariaceae-arter med forholdene indenfor Pinaceae. Podocarpaceae-Phyllocladaceae er først for nylig sekventeret og undersøgt i rbcL af Conran et al. (2000). Den viser, at Phyllocladaceae er en del af Podocarpaceae. Tidligere undersøgelser er foretaget i 18S rRNA af Kelch (1998) og af Chaw et al. (1995 og 1997A). Conran et al. (2000) angiver, at deres resultater er i modstrid med Kelch (1998), men i overensstemmelse med de 4 arter i Chaw et al. (1997A). Udviklingen af Araucariaceae og Phyllocladaceae-Podocarpaceae synes at være startet nogenlunde samtidigt. Iflg. Kelch (1998) er Phyllocladaceae tidligere end resten af Podocarpaceae, hvilket er i modstrid med Conran et al. (2000). Selv om en af hovedideerne i mit arbejde er at sammenligne resultaterne fra forskellige gener, vil jeg ikke forsøge at kommentere forskelle og ligheder i de to undersøgelser. Da jeg foretog min undersøgelse var der desværre kun en Podocarpaceae-art sekventeret i rbcL, hvilket dog ikke syntes at have forårsaget fejlkonklusioner.

**2. *Sciadopitys* (= *Sciadopityaceae*).**

*Sciadopitys verticillata* har tidligere bl.a. været klassificeret som tilhørende Taxodiaceae (hvilket er komplet uforståeligt for mig), men allerede den første molekylærgenetiske undersøgelse og de videre af Chase et al. (1993), Price et al. (1993), Brunfeldt et al. (1994), Tsumura et al. (1995), Chaw et al. (1997) og Stefanovic et al. (1998), der omfatter rbcL, RFLP af 6 gener, 18S rRNA og 28S rRNA, viste alle at *Sciadopitys* var en egen familie (jvf. Fig. 1, side 21). En både vanskelig og usikker "håndtælling" i rbcL viste, at *Sciadopitys* var langt fra både Pinaceae, Podocarpaceae og Taxodiaceae, men nok nærmest Podocarpaceae.

Der er nærmest umuligt at drage en fornuftig konklusion ud fra de kemiske ligheder og i mindre grad forskelle, der er angivet i Hegnauer (1962, 1986), hvor *Sciadopitys* er rubriceret som en Taxodiaceae (som Hegnauer dog angiver som en meget varieret familie). Til gengæld kan man konstatere, at den *Picea*-smag, der er tilstede i de fleste Pinaceae-nåle og nogle Podocarpaceae-nåle, delvis findes i *Sciadopitys*-nåle, hvor den dog er blandet med en tydelig smag af *Torreya*-nåle.

### 3. Taxaceae-Cephalotaxaceae, Taxodiaceae, Cupressaceae claden.

I store træk er der en nogenlunde jævn og gradvis udvikling ned gennem claden, så det må være et spørgsmål om personlig opfattelse, hvorvidt man vil bibeholde inddelingen i 4 familier, eller om nogle af familierne skal slås sammen. Taxaceae-Cephalotaxaceae er nok en clade, især morfologisk og iflg. Cheng et al. (2000) også molekylærgenetisk (det er nok et artefakt, når den i andre gener spaltes op), derfor kan det være praktisk at beholde claden som en særskilt familie. Som tidligere nævnt er afstanden fra den nærmeste Taxaceae til Taxodiaceae-arten *Cunninghamia* dog ikke specielt stor. Gennem de seneste år har der været en tiltagende forståelse for, at udviklingen gennem Taxodiaceae og Cupressaceae er glidende, og at de derfor bedst kan anses for at være en enkelt familie, der iflg. de internationale nomenclaturregler får navnet Cupressaceae s.l.

#### 3a. Taxaceae-Cephalotaxaceae (der nok bør kaldes Taxaceae s.l.)

Fra egne træer (rbcL, 18S rRNA og 28S rRNA) såvel som fra cladogrammerne i Bowe (2000), Chase et al. (1993), Chaw et al. (1993, 1995, 1997A, 2000), Cheng et al. (2000), Källersjö et al. (1998), Stefanovic et al. (1998) og Tsumura et al. (1995) synes det at fremgå, at Cephalotaxaceae ikke har nogen berettigelse som selvstændig familie. Træerne fra rbcL, 18S rRNA og 28S rRNA viser *Taxus* før *Cephalotaxus*, men mtSSU, nuSSU, matK og ITS viser det modsatte.

*Torreya* er på allekladogrammer nær søster til *Amentotaxus*, denne clade kaldes her *Torreya*. Dog er der den ganske væsentlige forskel, at *Torreya* har nålesmag (afledt af *Picea*-smagen), medens *Amentotaxus* ikke har denne smag. Pga nålesmagen af *Torreya* konkluderes det, at *Torreya* claden med al sandsynlighed står først i familien, idet nålesmagen som tidligere nævnt har en dybere liggende kemisk årsag. (OBS. Der må så være sket smagstab to gange indenfor Taxaceae). Også molekylærgenetisk står *Torreya* først iflg. de fleste af mine træer i både rbcL og 28S rRNA, men sidst iflg. 18S rRNA. Iflg. et træ baseret på matK i Cheng et al. (2000) kommer *Cephalotaxus* med en Bootstrap værdi på 73 før *Torreya*, der er søstergruppe til *Taxus*-claden. Iflg. Cheng et al. (2000), der refererer andre forfattere, ligner *Cephalotaxus* morfologisk *Torreya* på mange punkter, men den afviger især ved, at de unge æg dannes i par.

Såfremt *Torreya* kommer først (hvad specielt kemien synes at vise), og også *Cephalotaxus* kommer før *Taxus*-claden, ville det være praktisk at ophæve Cephalotaxaceae som en selvstændig familie, da Taxaceae ellers bliver parafyletisk.

#### 3b. Cupressaceae s.l. (= Taxodiaceae + Cupressaceae s.s.).

Lige fra de første molekylærgenetiske cladogrammer med både Cupressaceae s.s. og Taxodiaceae stod det klart, at Taxodiaceae ville være parafyletisk, hvis Cupressaceae s.s. var en separat familie. De to tidligere familier anses nu samlet (excl. *Sciadopitys*) for en monofyletisk familie. Som tidligere nævnt er det måske en smagssag, om man skal slå dem sammen med Taxaceae til en endnu større monofyletisk familie, men det er nok meget upraktisk i daglig brug.

De første fire undersøgelser af Gadek & Quinn (1993), Chase et al. (1993), Price et al. (1993) og Brunsfeld et al. (1994) anvendte alle rbcL. Tsumura et al. (1994) brugte RFLP af 6 gener, medens Chaw et al. (1995, 1997) brugte 18S rRNA, Stefanovic et al. brugte 28S rRNA, Källersjö et al. (1998) brugte rbcL, og Gadek et al. (2000) brugte matK + rbcL. Der er naturligvis ikke total overensstemmelse mellem samtlige resultater, men Taxodiaceae-slægtens *Cunninghamia* lader til at være ældst, og iflg. Gadek et al. (2000) og andre ser det ud til, at hele Cupressaceae s.s. claden er den yngste og sidste del af Cupressaceae s.l.

## Konklusion.

Følgende må herefter anses for fastslået med sikkerhed:

### 1. Gnetales tilhører Gymnospermerne.

Dette fremgår med sikkerhed af kemien, næsten alle molekylærgenetiske undersøgelser viser det samme (herunder også MADS-box generne, der koder for morfologien), og de små morfologiske forskelle mellem Gnetales og Angiospermerne kan tolkes derhen, at der er tale om paralleludviklinger og ikke homologe strukturer.

**2. Gnetales er muligvis søstergruppe til samtlige Gymnospermer, muligvis kun til Coniferales.** Det kan ikke afgøres med sikkerhed. Alle mine cladogrammer tyder på, at Gnetales står nær Cycadales og er søstergruppe til samtlige Gymnospermer, medens andre undersøgelser indikerer, at Gnetales står inde i Gymnospermerne og kun er søstergruppe til Coniferales.

**3. Gymnospermerne (incl. Gnetales) er en monofyletisk gruppe.**

Argumenterne er de samme som for Gnetales tilhørsforhold til Gymnospermerne.

**4. Angiospermerne er en monofyletisk gruppe, der er søstergruppe til de nuværende Gymnospermer.**

Det har længe været fastslået, at Angiospermerne er monofyletisk. Sandsynligvis er dækfrøethed opstået ud fra en nøgenfrøet plante, idet der ses bort fra muligheden for en selvstændig udvikling fra en sporeplante. Oprindelsen ligger dog så langt tilbage, at den genetiske afstand mellem Angiospermer og Gymnospermer er af samme størrelsesorden som den genetiske afstand mellem Pteridofytter og Gymnospermer.

**5. Coniferales er monofyletisk.**

Selv om såvel Cycadales/Ginkgo som i mindre grad Gnetales i visse molekylærgenetiske klado-grammer havner inde i Coniferales, må dette anses som værende artefakter. Coniferales er en så specialiseret gruppe, at selv en så foranderlig gruppe som Gnetales næppe kan have udviklet sig derfra. Yderligere påviser en sjælden mutation, der er fælles for alle Coniferales, og som ikke deles med nogle af de øvrige Gymnospermer og Pteridofytter, at Coniferales er monofyletisk.

**6. Stamtræet for hovedfamilierne indenfor Gymnospermerne er (bortset fra Gnetales stilling) nu fastlagt med sikkerhed.**

Stamtræet er gengivet på Figur 1.

**7. Pinaceae udgør den ene halvdel af Coniferales, og det molekylærgenetisk mest sandsynlige stamtræ for Pinaceae giver en logisk forklaring på vigtige morfologiske træk.**

De sikre slægtskabsforhold indenfor Pinaceae er gengivet på Figur 2A. Figur 2B fremkommer med Podocarpaceae som outgroup, men er nok ikke korrekt. Herefter ser det mest troværdige træ ud som Figur 2D. Hvis man vover nogle sandsynlige gæt, kan træet specificeres til Figur 2C, der også fås molekylærgenetisk vha rbcL med Ginkgo som outgroup.

**8. *Abies* er med stor sandsynlighed næsten lige så dybt delt som *Pinus*.**

*Pinus* er delt i haplo- og diploxyton, men *Abies* er iflg. molekylærgenetikken også dybt delt, hvor 4 af de 5 "japanske" *Abies* tilhører en gren. [I denne afhandling er kun påvist en tvedeling, medens undersøgelsen af Isoda et al. (2000) tyder på en flerdeling].

**9. Der er ikke tilstrækkelige data for en nøjere undersøgelse af *Picea*.**

*Picea abies* og *P. pungens* afviger fra de øvrige her behandlede Coniferales (herunder *Picea sitchensis*) ved en lang række ens rbcL-mutationer, hvilket ikke er tilstrækkeligt grundlag for videregående konklusioner.

**10. Coniferales II (= Coniferales minus Pinaceae) udgør en samlet clade.**

Næsten alle molekylærgenetiske undersøgelser viser denne clade, hvis opbygning fremgår af Figur 1.

**11. Araucariaceae/Podocarpaceae s.l. (= Phyllocladaceae + Podocarpaceae s.s.) udgør en clade.**

Disse familier kommer først i Coniferales II-claden. Phyllocladaceae synes at tilhøre Podocarpaceae, der ellers ikke er monofyletisk. Det er ikke fastlagt, om Araucariaceae eller Podocarpaceae er ældst, og det er ikke undersøgt i rapporten, da der manglede rbcL-data for Podocarpaceae på tidspunktet for rapportens undersøgelser.

**12. *Sciadopitys* udgør en selvstændig familie.**

Som allerede antaget af enkelte indenfor molekylærgenetikken og som sikkert fastslået af denne udgør *Sciadopitys* en egen familie, der ligger mellem Araucariaceae/Podocarpaceae s.l. og Taxaceae s.l. i Coniferales II-claden.

**13. Taxaceae s.l. (= Cephalotaxaceae + Taxaceae s.s.).**

Taxaceae s.l. kommer efter Sciadopitys og inden Taxodiaceae i Coniferales II-claden ifølge molekylærgenetikken.

Specielt med kemiske begrundelser, men støttet af visse molekylærgenetiske cladogrammer, kommer *Torreya*-claden (*Torreya* + *Amentotaxus*) først i familien. Dernæst kommer *Cephalotaxus*, og tilsidst kommer *Taxus*-claden (*Taxus* + *Pseudotaxus* + *Austrotaxus*).

Såfremt de er sandt, og man vil opretholde Cephalotaxaceae som en særskilt familie, bliver Taxaceae s.s. ikke monofyletisk, og det er upraktisk!

**14. Cupressaceae s.l. (= Taxodiaceae + Cupressaceae s.s.).**

Cupressaceae s.l. kommer tilsidst i Conifer II-claden iflg. molekylærgenetikken.

Det har længe været anerkendt at Taxodiaceae ville blive parafyletisk, hvis man opretholdt Taxodiaceae og Cupressaceae s.s. som to separate familier, hvilket er upraktisk, hvorfor man har slået de to tidligere familier sammen. Morfologisk er der også tale om en glidende udvikling gennem rækken.

I de fleste kladogrammer synes de tidligere Taxodiaceae ikke overraskende at stå først, medens de tidligere Cupressaceae (= Cupressaceae s.s.) kommer tilsidst.

(Ved en sådan sammenlægning opnår man en familie med meget store forskelle mellem *Cunninghamia*, der er det ældste medlem, og de yngste medlemmer som fx *Cupressus*. Rent bortset fra kuglerne ligner *Cunninghamia* mere Taxaceae end den ligner *Cupressus*).

**Generelt.**

Måske lige bortset fra *Torreya*'s placering i Taxaceae burde der ikke være meget nyt i min rapport. Ved at sammeholde kemien og morfologien med diverse divergerende molekylærgenetiske undersøgelser synes der at være nået et fornuftigt og sammenhængende resultat. Til gengæld har palæobotanikken, som jeg rent faktisk også har studeret grundigt, hidindtil stort set kun bragt forvirring i systematikken. Det er derfor min opfattelse, at på nuværende tidspunkt kan fylogeni ikke hente megen hjælp hos palæobotanikerne, men fremover er palæobotanikerne naturligvis de eneste, der kan udfylde de huller i fylogeni, som de nu uddøde arter har efterladt.

Molekylærgenetikken er stadig en ung videnskab, hvor man nu desværre med glæde blander diverse frugter af forskellig størrelse og siden vægter dem ens. Desuden anvender man en statistik, der er matematisk korrekt for tilfældige begivenheder, men som ikke gælder for en biologisk udvikling. Helt galt går det, når visse begynder at misbruge diverse teorier om transitioner/transversioner og 1., 2. og 3. base-mutationer til at manipulere med resultaterne, så de kan opnå det resultat, som de gerne vil opnå.

**OBS:** Selv om arbejdet her kun i meget ringe udstrækning bygger på og medtager traditionel kladistisk statistik, må der dog gøres opmærksom på den enestående overensstemmelse som den matematiske behandling af de 3 kladistiske parametre træ længde, CI og RI giver med de observerede forhold. Af behandlingen heraf på de første sider af "Bilag. 1.del: Gymnospermkladistik" fremgår følgende:

For det første fremgår det, at rbcL data er mere pålidelige end 18S rRNA data, medens 28SrRNA data er de mest upålidelige. (Dette blev erkendt allerede under aligeringen m.m.)

For det andet fremgår det, at træer med Gnetales som outgroup får omtrent samme længde som træer med Cycadales/Ginkgo som outgroup, medens træer med Pterodofyt/Angiosperm som outgroup bliver længere. Dette indikerer, at Gnetales med al sandsynlighed er en Gymnosperm.

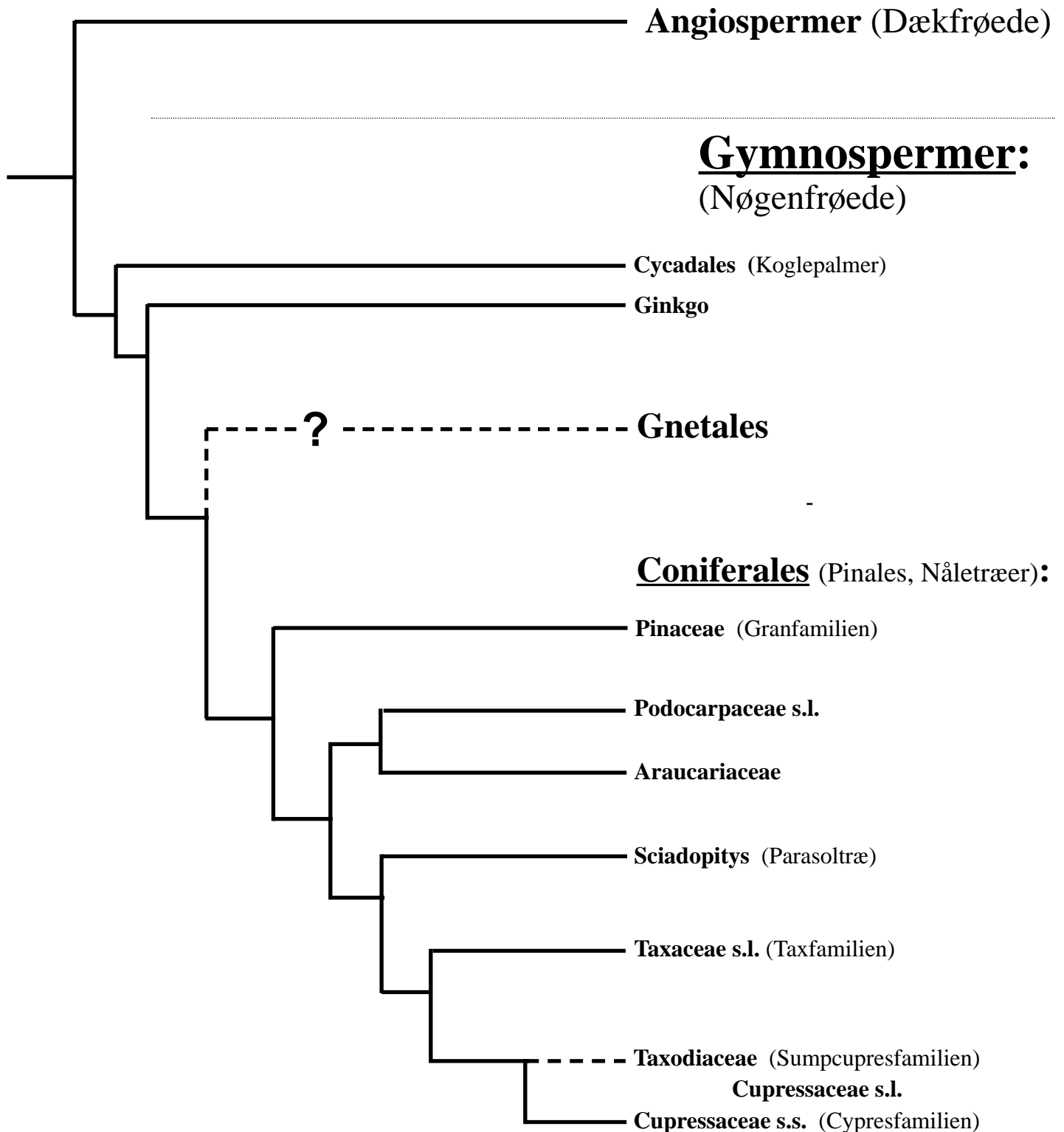
Frederiksberg, den 1. september 2001

Jenny Helander.

## Oversigt over de anvendte taxa:

<b>rbcL:</b> (ca. 1330-1550 baser)			<b>18S rRNA:</b> (ca. 1740 baser)		
Ab.f	<i>Abies firma</i>	AB015647	Ab.la	<i>Abies lasiocarpa</i>	X79407
Ab.h	<i>Abies homolepis</i>	AB015648	Pn.wa	<i>Pinus wallichiana</i>	X75080
Ab.mf	<i>Abies magnifica</i>	X58391	Picea	<i>Picea mariana</i>	L07059
Ab.ms	<i>Abies mariesii</i>	AB015650	Larix	<i>Larix leptolepis</i>	D85294
Ab.s	<i>Abies sachalinensis</i>	AB015651	Ar.cu	<i>Araucaria cunninghamii</i>	AF051794
Ab.v	<i>Abies veitchii</i>	AB015649	Ag.bo	<i>Agathis borneensis</i>	D85302
Cat	<i>Cathaya argyrophylla</i>	AF015786	Pod.c	<i>Podocarpus costalis</i>	D38473
Ced	<i>Cedrus deodora</i>	X63662	Pod.t	<i>Podocarpus totara</i>	U87301
Ket	<i>Keteleeria davidiana</i>	X63664	Dacry	<i>Dacrycarpus imbricatus</i>	D38247
Lar	<i>Larix occidentalis</i>	X63663	Nagei	<i>Nageia nagi</i>	D16447
Pc.a	<i>Picea abies</i>	X75478	Saxeg	<i>Saxegothaea conspicua</i>	U87294
Pc.p	<i>Picea pungens</i>	X58136	Phyll	<i>Phyllocladus trichomanoides</i>	D38244
Pc.s	<i>Picea sitchensis</i>	X63660	Sciad	<i>Sciadopitys verticillata</i>	D85292
Plar	<i>Pseudolarix kaempferi</i>	X58782	C.tax	<i>Cephalotaxus wilsoniana</i>	D38241
Psts	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	X52937	Amtax	<i>Amenotaxus formosana</i>	D38248
Tshe	<i>Tsuga heterophylla</i>	X63659	Torrn	<i>Torreya nuncifera</i>	D38249
Pn.b	<i>Pinus balfouriana</i> (hap.)	X63661	Taxus	<i>Taxus mairei</i>	D16445
Pn.e	<i>Pinus edulis</i> (hap.)	X58137	Caloc	<i>Calocedrus decurrens</i>	D85293
Pn.k	<i>Pinus krempfii</i> (hap.)	X63665	Cup.m	<i>Cupressus macrocarpa</i>	AF051797
Pn.l	<i>Pinus longaeva</i> (hap.)	X58138	Jun.c	<i>Juniperus chinensis</i>	D38243
Pn.w	<i>Pinus wallichiana</i> (hap.)	X58131	Crypt	<i>Cryptomeria japonica</i>	D85304
Pn.p	<i>Pinus pinea</i> (dip.)	X58133	Msequ	<i>Metasequoia stroboides</i>	L00970
Pn.r	<i>Pinus radiata</i> (dip.)	X58134	Taiwc	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	D38250
Agbo	<i>Agathis borneensis</i>	U96476	Ep.ca	<i>Ephedra californica</i>	U42492
Agov	<i>Agatis ovata</i>	U96483	Gn.le	<i>Gnetum leyboldii</i>	L24045
Woll	<i>Wollemia nobelis</i>	AF030419	We.mi	<i>Welwitschia mirabilis</i>	D85299
A.an	<i>Araucaria angustifolia</i>	U87750	Ginkg	<i>Ginkgo biloba</i>	D16448
A.hu	<i>Araucaria hunsteinii</i>	U87749	Cy.ta	<i>Cycas taitungensis</i>	D85297
Na.f	<i>Nageia falcatus</i>	X58135	Za.pu	<i>Zamia pumilla</i>	M20017
=	( <i>Afrocarpus gracilior</i> el. <i>A. falcatus</i> )		Nym.t	<i>Nymphaea tuberosa</i>	L24404
Scia	<i>Sciadopitys verticillata</i>	L25753	Ly.in	<i>Lycopodiella inundata</i>	U18512
Taxb	<i>Taxus baccata</i> x <i>T. cuspidata</i>	AJ235811			
Taxc	<i>Taxus chinensis</i>	AB027316		<b>28S rRNA:</b> (ca. 640 baser)	
Torn	<i>Torreya nuncifera</i>	AB027317	Ab.gra	<i>Abies grandis</i>	U90683
Atax	<i>Amentotaxus argotaenia</i>	L12580	Pi.cem	<i>Pinus cembra</i>	U90681
Cunn	<i>Cunninghamia lanceolata</i>	L25757	Pi.nig	<i>Pinus nigra</i>	U90680
Taxo	<i>Taxodium distichum</i>	S75127	Cederd	<i>Cedrus deodora</i>	U90684
Taiw	<i>Taiwania cryptomeroides</i>	L25756	Podo.m	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	U90685
Sequ	<i>Sequoia sempervirens</i>	L25755	Po.Fal	<i>Falcatifolium taxoides</i>	U90687
Meta	<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	AJ235805	Agatis	<i>Agathis australis</i>	U90692
Cryp	<i>Cryptomeria japonica</i>	L25751	Ar.Wol	<i>Wollemia nobilis</i>	U90694
Libo	<i>Libocedrus plumosa</i>	L12574	Arau.a	<i>Araucaria angustifolia</i>	U90691
Widd	<i>Widdringtonia cedabergensis</i>	L12538	Sciado	<i>Sciadopitys verticillata</i>	U90698
Cham	<i>Chamecyperis nootkatensis</i>	AF127431	Torrgr	<i>Torreya grandis</i>	U90696
Cupr	<i>Cupressus arizonica</i>	AF127430	Taxusb	<i>Taxus baccata</i>	U90695
Juni	<i>Juniperus conferta</i>	L12573	C.taxh	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	U90697
Th.o	<i>Thuja occidentalis</i>	L12573	Sequ.s	<i>Sequoia sempervirens</i>	U90701
Th.s	<i>Thuja standishii</i>	AF127428	Cunn.l	<i>Cunninghamia lanceolata</i>	U90699
Tjop	<i>Thujopsis dolobrata</i>	L12577	Taxodi	<i>Taxodium distichum</i>	U90702
Gink	<i>Ginkgo biloba</i>	D10733	Taiwcr	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	U90700
Cyca	<i>Cycas circinalis</i>	L12674	Cryptj	<i>Cryptomeria japonica</i>	U90703
Bow	<i>Bowenia serrulata</i>	L12671	Cypres	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	U90704
Z.fl	<i>Zamia floridana</i>	D10736	Junipc	<i>Juniperus communis</i>	U90705
Z.in	<i>Zamia inermis</i>	L12683	Platyc	<i>Platycladus orientalis</i>	U90706
E.di	<i>Ephedra distachya</i>	U72821	C.cedd	<i>Calocedrus decurrens</i>	U90707
E.tw	<i>Ephedra tweediana</i>	U72822	Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	U90672
W.mi	<i>Welwitschia mirabilis</i>	AJ235814	Cyca.r	<i>Cycas revoluta</i>	U90673
Gn.g	<i>Gnetum gnemon</i>	L12680	Eph.ne	<i>Ephedra nebrodensis</i>	U90709
Gn.p	<i>Gnetum parvifolium</i>	D10735	Gne.gn	<i>Gnetum gnemon</i>	U90710
Nymp	<i>Nymphaea odorata</i>	M77034	Welwit	<i>Welwitschia mirabilis</i>	U90708
Lyc	<i>Lycopodium digitatum</i>	L11055	NymphN	<i>Nymphaea nouchali</i>	U90711
			Fil.Po	<i>Polypodium vulgare</i>	U90712

**Fig. 1**



**Stamtræ for Gymnospermerne (Nøgenfrøede):**

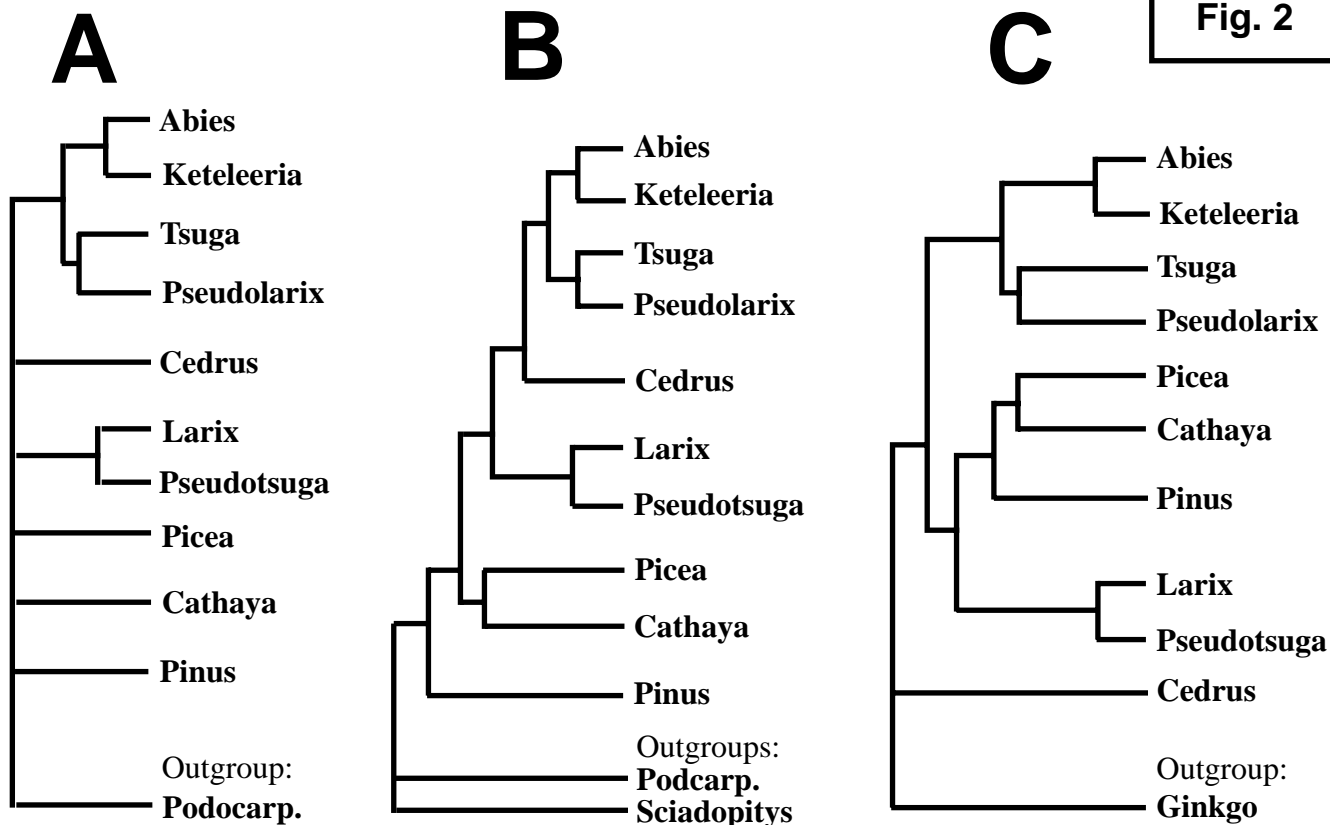
Angiospermerne og Gymnospermerne er søstergrupper. Gnetales tilhører Gymnospermerne.  
 Sciadopitys danner en selvstændig familie.  
 Taxodiaceae og Cupressaceae s.s. er reelt en samlet familie, der kan navngives Cupressaceae s.l.  
 Taxaceae s.l. ligger så tæt på Taxodiaceae, at hele claden Taxaceae-Cupressaceae s.l. kan opfattes som en familie.

GEN: Outgroup:	Ang.+Pter. NJ, MP, ML		Cyc.+Gink NJ, MP, ML		Ang.+Pter. NJ, MP, ML		18S rRNA Gnetales NJ, MP, ML		Cyc.+Gink NJ, MP, ML		Ang.+Pter. NJ, MP, ML		28S rRNA Gnetales NJ, MP, ML		Cyc.+Gink NJ, MP, ML		BoweA Få taxa	BoweB Få taxa	miSSU	RFLP ændret NJ, MP	Resultat
<b>Gnetales</b> i outgroup	x																				
søster til Conif. 1+2	(1)																				
søster til Pinaceae	x																				
søster til Conifer 2																					
søster til Cycadales																					
<b>Cyc./Gink.</b> før Gnet.	x																				
søster til Gnetales																					
søster til Conif. 1+2	x																				
søster til Pinaceae	x																				?
søster til Conifer 2																					
<b>Cycad.</b> før Ginkgo	x																				
søster til Ginkgo	x																				
efter Ginkgo																					
<b>Pinaceae</b> før Conif. 2																					
søster til Conifer 2	(6)	x	(7)	(6)	(6)	(7)	(7)	(7)	x	x	x	(6)	(6)	(3)	(3)	x	(7)	(7)			x
efter Conifers 2																					x
<b>Podocarp.</b> før Arauc.																					
søster til Araucariac.	x																				
efter Araucariaceae	x	(x)																			
<b>Pod.+Arau.</b> før Scia.																					
søster til Sciadopitys	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
efter Sciadopitys																					
<b>Sciadopitys</b> før Tax.																					
søster til Taxales	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
efter Taxales																					
<b>Torreya</b> før Taxus																					
søster til Taxus	x	x																			(x)(x)
efter Taxus																					(x)(x)
<b>Taxaceae</b> før Taxo																					
søster til Taxo+Cupr.	(8)	(8)																			(x)
efter Taxod.+Cupr.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
<b>Taxodiac.</b> før Cupr.																					
søster til Cupres.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x
efter Cupressaceae																					(x)(x)

(1) + Cycad.; (2) kun Cycad.; (3) + Gink.; (4) kun Gink.; (5) + Gnet.; (6) Pin.+ Cyc/Gink.; (7) Pin.+ Gnet.; (8) Torr. først.; (x) parafyletisk., klapper sammen, el. ikke opløst.



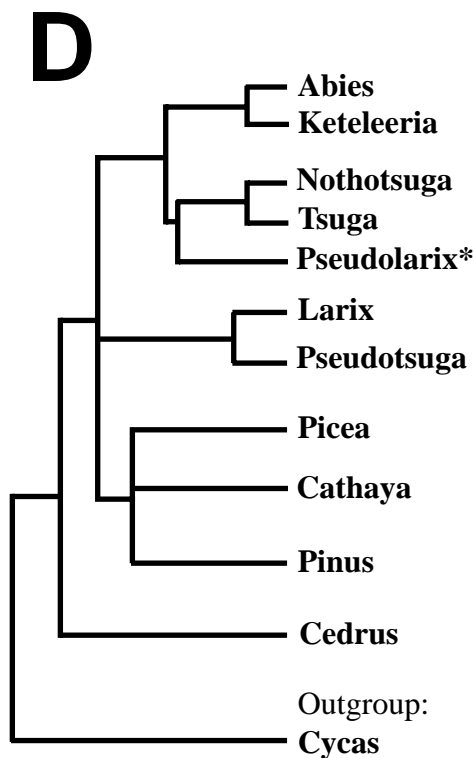
Fig. 2



rbcl, MP-Bootstrap (1000)

rbcl, NJ, Out: Podocarp. +  
RFLP-trnK, MP 50% cons.

rbcl, NJ, Out: Ginkgo



**OBS\*:** Pseudolarix først i claden ved nad5 (og evt. 4CL).

matK+nad5+4CL, MP=ML, Out: Cycas

## Slægter i Pinaceae:

### Molekylærgenetisk:

Cedrus er den mest sandsynlige rod.

Abies og Keteleeria er meget nært beslægtede.

Pseudolarix + Nothotsuga/Tsuga + Abies/Keteleeria er en sikker clade, men det er uvist, om Pseudolarix er først eller er i clade med Tsuga.

Larix og Pseudotsuga er ret nært beslægtede.

Picea, Cathaya og Pinus er sandsynligvis en clade, meget fjernt beslægtede.

Cathaya er muligvis lidt nærmere beslægtet med Picea end med Pinus.

### Skudmorfologisk:

Cedrus giver mulighed for alle de i **D** angivne udviklingsmuligheder.

### Koglestilling:

Sore, opretstående kogler ser ret tyngdestridige ud, og opretstående kogler er formodentlig det oprindelige (findes også hos Araucariaceae). Opretstående kogler ændres sandsynligvis lettere til nedhængende end omvendt. Cedrus har opretstående koglestilling, der går igen i Larix + hele claden Abies/Keteleeria/Pseudolarix/Tsuga/Nothotsuga undtagen Tsuga.

### Harpikskanaler i stamme og rod.

Kun Pinus, Cathaya, Picea, Larix og Pseudotsuga har altid harpikskanaler i såvel xylem som ung pælerod.

## Referencer

- Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H., & Theissen, G. 2000. MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. - *Mol. Biol. Evol.* 17(10): 1425-1434.
- Bhatnager, S.P. & Moitra, A. 1997. *Gymnosperms*. - New age international limited publishers, New Delhi.
- Boivin, R., Richard, M., Beauseigle, D., Bousquet, J. & Bellemare, G. 1996. Phylogenetic inferences from chloroplast *chlB* gene sequences of *Nephrolepis exaltata* (Filicopsida), *Ephedra altissima* (Gnetopsida), and diverse land plants. - *Mol. Phylogenet. Evol.* 6(1): 19-29.
- Bowe, L.M., Cota, G. & dePamphilis, C.W. 2000. Phylogeny of Seed Plants Based on All Three Genomic Compartments: Extant Gymnosperms are Monophyletic and Gnetales' Closest Relatives are Conifers. - *PNAS* 97(8): 4092-4097.
- Bowe, L.M. & dePamphilis, C.W. 1997. Conflict and congruence among the three plant genetic compartments: Phylogenetic analysis of seed plants from gene sequences of *coxI*, *rbcL* and 18S rDNA. - *Am. J. Bot.* 84(6): 178.
- Brunsfeld, S.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Strenge, D.D. & Ranker, T.A. 1994. Phylogenetic Relationships among the Genera of Taxodiaceae and Cupressaceae: Evidence from *rbcL* Sequences. - *Syst. Bot.* 19(2): 253-262.
- Carlquist, S. 1996. Wood, bark, and stem anatomy of Gnetales: A summary. - *Int. J. Plant Sci.* 157(6 Suppl.): S58-S76.
- Carnachan, S. M. & Harris, P. J. 2000. Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families. - *Biochem. System. Ecol.* 28: 865-879.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G. et al. 1993. Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequence from the Plastid Gene *rbcL*. - *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 528-580.
- Chaw, S.-M., Long, H., Wang, B., Zharkikh, A. & Li, W.-H. 1993. The Phylogenetic Position of the Taxaceae Based on 18S rDNA Sequences. - *J. Mol. Evol.* 37: 624-630.
- Chaw, S.-M., Sung, H.-M., Long, H., Zharkikh, A. & Li, W.-H. 1995. The Phylogenetic Positions of the Conifer Genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus*, and *Nageia* Inferred from 18S rRNA Sequences. - *J. Mol. Evol.* 41(2): 224-230.
- Chaw, S.-M., Zharkikh, A., Sung, H.-M., Lau, T.-C. & Li, W.-H. 1997A. Molecular Phylogeny of Extant Gymnosperms and Seed Plant Evolution: Analysis of Nuclear 18S rRNA Sequences. - *Mol. Biol. Evol.* 14(1): 56-68.
- Chaw, S.-M., Long, H., Hsu, W.-L. & Chiang, G.M.-Y. 1997 B. Subdivision and Intergeneric Relationships of the Pinaceae Inferred from Nuclear 18S ribosomal RNA Sequences. - *Amer. J. Bot.* 84(6 suppl.): 182.
- Chaw, S.-M., Parkinson, C.L., Cheng, Y., Vincent, T.M. & Palmer, J.D. 2000. Seed Plant Phylogeny Inferred from All Three Plant Genomes: Monophyly of Extant Gymnosperms and Origin of Gnetales from Conifers. - *PNAS* 97(8): 4086-4091.
- Cheng, Y., Nicolson, R.G., Tripp, K. & Chaw, S.-M. 2000. Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae Genera Inferred from Chloroplast *matK* Gene and Nuclear rDNA ITS Region. - *Mol. Phyl. Evol.* 14(3): 353-365.
- Christensen, K. I. & G. H. Dar. 1997. A morphometric analysis of spontaneous and artificial hybrids of *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* (Pinaceae). - *Nord. J. Bot.* 17(1): 77-86.
- Conran, J. G., Wood, G. M., Martin, P. G., Dowd, J. M., Quinn, C. J., Gadek, P. G. & Price, R.A. 2000. Generic relationships within and between the gymnosperm families Podocarpaceae and Phyllocladaceae based on an analysis of the chloroplast gene *rbcL*. - *Aust. J. Bot.* 48(6): 715-724.
- Dong, J., Wagner, D. B., Yanchuk, A. D., Carlson, M. R., Magnussen, S., Wang, X.-R. & Szmidt, A. E. 1992. Paternal chloroplast DNA inheritance in *Pinus contorta* and *Pinus banksiana*: independence of parental species or cross direction. - *J. Hered.* 83(6): 419-422.
- Donoghue, M.J. & Doyle, J.A. 2000. Seed Plant Phylogeny: Demise of the Anthophyte Hypothesis. - *Current-Biology* 10(3): R106-R109.
- Doyle, J.A. 1996. Seed Plant Phylogeny and the Relationships of Gnetales. - *Int. Jour. Pl. Sci.* 157(6): S3 - S39.
- Doyle, J.A. 1998. Phylogeny of Vascular Plants. - *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 567-99.
- Farjon, A. 1990. *Pinaceae*. - Koeltz Scientific Books, Germany.
- Filppula, S., Szmidt, A. E. & Savolainen, O. 1992. Genetic comparison between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* using isoenzymes and chloroplast DNA. - *Nord. J. Bot.* 12: 381-386.
- Frederiksen, S., Rasmussen, F.N. & Seberg, O. 1997. De højere planter evolution og klassifikation. - GAD, Kbh.
- Friedman W. E. & Carmichael, J. S. 1995. The evolution of fertilization and embryo-nourishing patterns within the Gnetales: implications for understanding reproductive diversifications within the angiosperm clade. - *Am. J. Bot.* 82(6 SUPPL.): 12.
- Friedman W. E. & Floyd S. K. 2001. Perspective: The origin of flowering plants and their reproductive biology - a tale of two phylogenies. - *Evolution.* 55(2): 217-231.
- Frohlich, M.W. & Meyerowitz, E.M. 1997. The Search for Homeotic Gene Homologs in Basal Angiosperms and Gnetales: A Potential New Source of Data on the Evolutionary Origin of Flowers. - *Int. J. Plant. Sci.* 158 (6): S131-S142.
- Gadek, P.A., Alpers, D.L., Heslewood, M.M. & Quinn, C.J. 2000. Relationships Within Cupressaceae *Sensu Lato*: A Combined Morphological and Molecular Approach. - *Amer. J. Bot.* 87(7): 1044-1067.
- Gadek, P.A. & Quinn, C.J. 1993. A Preliminary Analysis of Relationships Within the Cupressaceae *Sensu Stricto* Based on *rbcL* Sequences. - *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 581-586.

- Gernandt, D.S. & Liston Aa. 1999. Internal Transcribed Spacer Region Evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). - *Amer. J. Bot.* 86(5): 711-723.
- Gillham, N. W. 1994. Organelle genes and genomes. - Oxford University Press, Oxford.
- Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A. & Martin, W. 1996. Noncoding Sequences from the Slowly Evolving Chloroplast Inverted Repeat in Addition to *rbcL* Data Do Not Support Gnetalian Affinities of Angiosperms. - *Mol. Biol. Evol.* 13(2): 383-396.
- Gottlieb, O. R., Kaplan, M. A. C., Zocher, D. H. T. & Kubitzki. 1990. A chemosystematic overview of Pteridophytes and Gymnosperms. In Kubitzki, K. (ed.): *The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. I. Pteridophytes and gymnosperms.* - Springer Verlag, N.Y.
- Gottlieb, O.R. & Kubitzki, K. 1984. Chemosystematics of the Gnetaceae and the Chemical Evolution of Seed Plants. - *Planta Medica* 1984: 380-385.
- Hamby, R.K. & Zimmer, E.A. 1992. Ribosomal RNA as a Phylogenetic Tool in Plant Systematics. Pp 50-19. *in* Soltis, P.S., Soltis, D.E. & Doyle, J.A., eds. *Molecular Systematics of Plants.* Chapman and Hall, N.Y.
- Hansen, A., Hansmann, S., Samigullin, T., Antonov, A. & Martin, W. 1999. Gnetum and the Angiosperms: Molecular Evidence that Their Shared Morphological Characters Are Convergent Rather than Homologous. - *Mol. Biol. Evol.* 16(7): 1006-1009.
- Harborne, J.B. & Baxter, H., eds, (1999). *The Handbook of Natural Flavonoids, Vol 1+2.* - Wiley, N.Y.
- Hegnauer, R. 1962. *Chemotaxonomie der Pflanzen, Band I.* - Birkhäuser Verlag, Basel.
- Hegnauer, R. 1986. *Chemotaxonomie der Pflanzen, Band VII (Nachträge zu Band I+II).* - Birkhäuser Verlag, Basel.
- Hillis, D.M., Mable, B.K., & Moritz, C., 1996. Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, M.K., (eds.): *Molecular systematics (2. ed)* - Sinauer Ass., MA.
- Isoda, K., Shiraishi, S. & Kisanuki, H. 2000. Classifying *Abies* species (Pinaceae) based on the sequence variation of a tandemly repeated array found in the chloroplast DNA *trnL* and *trnF* intergenic spacer. - *Silvae Genetica.* 49(3): 161-164.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. *Plant Systematics, a Phylogenetic Approach.* - Sinauer Associates Inc., Massachusetts, USA.
- Kelch, D.G. 1998. Phylogeny of Podocarpaceae: Comparison of Evidence from Morphology and 18S rDNA. - *Amer. J. Bot.* 85(7): 986-996.
- Khoshoo, T.N. 1961. Chromosome Numbers in Gymnosperms. - *Silvae Genetica* 10 (1): 1-9.
- Källersjö, M., Farris, J.S., Chase, M.W., Bremer, B., Fay, M.F., Humphries, C.J., Petersen, G., Seberg, O. & Bremer, K. 1998. Simultaneous parsimony jackknife analysis of 2538 *rbcL* DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants and flowering plants. - *Pl. Syst. Evol.* 213(3-4): 259-287.
- Malek, O., Lättig, K., Hiesel, R., Brennicke, A. & Knoop, V. 1996. RNA editing in Bryophytes and a Molecular Phylogeny of Land Plants. - *EMBO Jour.* 15(6): 1403-1411.
- Manhart, J.R. 1995. Chloroplast 16S rDNA Sequences and Phylogenetic Relationships of Fern Allies and Ferns. - *Am. Fern Jour.* 85(4): 182-192.
- Mogensen, H. L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. - *Am. J. Bot.* 83(3): 383-404.
- Otto, S.P., Cummings, M.P. & Wakely, J. 1996. Inferring phylogenies from DNA sequence data: The effects of sampling. In Harvey, P.H., Leigh Brown, A.J., Maynard Smith, J. & Nee, S. (eds.): *New uses for new phylogenies.* - Oxford University Press, Oxford.
- Page, C.N. 1990. Gymnosperms. In Kubitzki, K. (ed.): *The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. I. Pteridophytes and gymnosperms.* - Springer Verlag, N.Y.
- Pearson, L.C. 1995. *The diversity and evolution of plants.* - CRC Press, New York.
- Price, R.A. 1996. Systematics of the Gnetales: A review of morphological and molecular evidence. - *Int. Jour. Pl. Sci.* 157(6): S40 - S49.
- Price, R.A., Thomas, J., Strauss, S.H., Gadek, P.A., Quinn, C.J., & Palmer, J.D. 1993. Familial Relationships of the Conifers from *rbcL* Sequence Data. - *Amer. J. Bot.* 80(6):172.
- Qui, Y.-L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Savolainen, V. & Chase, M.W. 1999. The Earliest Angiosperms: Evidence From Mitochondrial, Plastid and Nuclear Genomes. - *NATURE* (25 nov. 1999) 402: 404-407.
- Raubeson, L.A. 1998. Chloroplast DNA structural similarities shared by conifers and Gnetales: coincidence or common ancestry? - *Am. J. Bot.* 85: 153
- Raubeson, L.A. & Jansen, K.J. 1992. A Rare Chloroplast-DNA Structural Mutation is Shared by all Conifers. - *Biochem. Syst. Ecol.* 20(1): 17-24.
- Reboud, X. & Zeyl, C. 1994. Organelle inheritance in plants. - *Heridity.* 72(2): 132-140.
- Samigullin, T.K., Martin, W.F., Troitsky, A.V. & Antonov, A.S. 1999. Molecular Data from the Chloroplast *rpoC1* Gene Suggest a Deep and Disinct Dichotomy of Contemporary Spermatophytes into Two Monophyla: Gymnosperms (Including Gnetales) and Angiosperms. - *J Mol. Evol.* 49(3): 310-315.
- Sanderson, M.J., Wojciechowski, M.F., Hu, J.-M., Kahn, T.S. & Brady, S.G. 2000. Error, Bias, and Long-Branch Attraction in Data for Two Chloroplast Photosystem Genes in Seed Plants. - *Mol. Biol. Evol.* 17(5): 782 -797.

- Setoguchi, H., Osawa, T.A., Pinaud, J.-C., Jaffré, T. & Veillon, J.-M. 1998. Phylogenetic Relationships Within Araucariaceae Based on *rbcL* Gene Sequences. - *Amer. J. Bot.* 85(11): 1507-1516.
- Shutov, A.D., Braun, H., Chesnokov, Y.V., Horstmann, C., Kakhovskaya, L.A. & Bäumlein, H. 1998. Sequence Peculiarity of Gnetalian Legumin-Like Seed Storage Proteins. - *J Mol. Evol.* 47(4): 486-492.
- Stefanovic, S., Jager, M., Deutsch, J., Broutin, J. & Masselot, M. 1998. Phylogenetic Relationships of Conifers Inferred from Partial 28S rRNA Gen Sequences. - *Amer. J. Bot.* 85(5): 688 -697.
- Stewart, W.N. & Rothwell, G.W. 1993. *Paleobotanic and the Evolution of Plants* (sec. ed.). - Cambridge Un.Press, G.B.
- Sun, G., Dilcher, D.L., Zheng, S. & Zhou, Z. 1998. In Search of the First Flower: A Jurassic Angiosperm, *Archaeofructus*, from Northeast China. - *Science* Vol 282 [27 Nov. 1998]: 1692-1695.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b2. - Sinauer Ass. MA.
- Szmidt, A.E., Aldén, T. & Hällgren, J.-E. 1987. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*. - *Plant Mol. Biol.* 9: 59-64.
- Szmidt, A.E., Lu, M.-Z. & Wang, X.-R. 2001. Effects of RNA editing on the *coxI* evolution and phylogeny reconstruction. - *Euphytica* 118: 9-18.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Winter, K.-U. & Saedler, H. 2000. A short story of MADS-box genes in plants. - *Plant Mol. Biol.* 42: 115-149.
- Troitsky, A.V., Melehovets, Y.F., Rakhimova, G.M., Bobrova, K.M., Valiiejo-Roman, K.M. & Antonov, A.S. 1991. Angiosperm Origin and Early Stages of Seed Plant Evolution Deduced from rRNA Sequence Comparisons. - *J. Mol. Evol.* 32 (3): 253-251.
- Tsumura, Y. & Suyama, Y. 1998. Differentiation of Mitochondrial DNA Polymorphisms in Populations of Five Japanese *Abies* Species. - *Evolution.* 52 (4): 1031-1042.
- Tsumura, Y., Yoshimura, K., Tomaru, N. & Ohba, K. 1995. Molecular Phylogeny of Conifers Using RFLP Analysis of PCR-amplified Specific Chloroplast Genes. - *Theor. Appl. Genet.* 91(8): 1222-1236.
- Wang, X.-Q., Han, Y. & Hong, D.-Y. 1998 A. A molecular systematic study of *Cathaya*, a relict genus of the Pinaceae in China. - *Pl. Syst. Evol.* 213(3-4): 165-172.
- Wang, X.-Q., Han, Y. & Hong, D.-Y. 1998 B. PCR-RFLP Analysis of the Chloroplast Gene *trnK* in the Pinaceae with Special Reference to the Systematic Position of *Cathaya*. - *Israel Jour. Pl. Sci.* 46(4): 265-271.
- Wang, X.-Q., Tang, D.C. & Sang, T. 2000. Phylogeny and Divergence Times in Pinaceae: Evidence from Three Genomes. - *Mol. Biol. Evol.* 17(5): 773-781.
- Wang, X.-R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K. & Szmidt, A.E. 1999. Phylogenetic Relationships of Eurasian Pines (*Pinus*, Pinaceae) Based on Chloroplast *rbcL*, *matK*, *rps18* spacer and *trnV* intron sequences. - *Amer. J. Bot.* 86(12): 1742-1752.
- Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Saedler, H. & Theissen, G. 1999. MADS-box Genes Reveal that Gnetophytes are More Closely Related to Conifers Than to Flowering Plants. - *PNAS* 96: 7342-7347.