

基于 *trnL F* 序列数据利用贝叶斯法推测 罗汉松科的系统发育^{*}

苏应娟, 王 艇, 陈国培, 安 宇, 左武麟, 孙宇飞, 邓 锋, 孙 旭
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 以黑松和 *Agathis australis* 为外类群, 基于罗汉松科 42 种植物的叶绿体 *trnL F* 序列数据通过贝叶斯法对该科的系统发育进行了推测。结果显示: ① *Phyllocladus* 为单系分支, 位于罗汉松科的基部, 是罗汉松科所有其余成员的姊妹群; ② *Nageia* 嵌套在罗汉松科内, 同罗汉松属、*Afrocarpus* 及 *Retrophillum* 的关系较为密切; ③ *Dacrycarpus* 为单系群且处于姊妹分支 *Falcatifolium*—陆均松属的基部; ④ *Lagarostrobus franklinii* 和 *Manoao cokensoi* 应置于同一属 *Lagarostrobus* 内; ⑤ 支持成立 *Halocarpus* 和 *Lepidothamnus* 属; ⑥ 赞同 *Microstrobus* 和 *Microcachrys* 两属亲缘密切的观点。

关键词: 罗汉松科; *trnL F* 非编码序列; 贝叶斯推测; 系统发育

中图分类号: Q949.66⁺2; Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 06-0032-05

罗汉松科 Podocarpaceae 是松柏类植物中形态分化最为多样的类群, 明确其分类和系统学关系对于认识裸子植物的起源与进化具有重要意义。然而, 尽管自 20 世纪 20 年代起一直到本世纪初, 众多学者对罗汉松科进行了广泛而深入的研究, 但是至今该科仍被认为是裸子植物系统发育方面存在疑问较多的一个类群。这些问题集中反映在: ① 广义的罗汉松科是否为一单系群^[1-3]? ② 广义的罗汉松属和陆均松属是否为自然群? 罗汉松科内属间的系统发育关系究竟如何^[4]? 这些都成为亟待澄清的问题。

迄今为止, 围绕着叶和球果的形态特征、木材解剖、孢粉学、假种皮微形态学、筛分子质体的超微结构、配子体发育、染色体核型、叶精油化学成分、叶片总蛋白分析及同工酶酶谱, 已经对罗汉松科开展了诸多研究。分子系统学方面, 叶绿体 *rbcL* 基因序列、叶绿体 *trnL F* 非编码区及核 rDNA ITS2 已被用于研究罗汉松科或其部分成员的系统发育问题^[5-7]。系统发育的贝叶斯推测是指新近发展起来的一种将统计学中的贝叶斯估计和假设检验用于系统树重建的方法。其基本思路是, 由系统树的先验概率和似然值 (假定系统树为真时能得到所观察数据的概率), 利用贝叶斯 (Bayes) 公式可以求出针对所观察到的数据所推测出的系统树为真的后验概率。然后根据系统树的后验概率即可对系统发育作出推测——后验概率最高的系统树被选作系统发育

的最佳估计^[8]。可是, 尽管理论上成立, 但真要用贝叶斯公式直接计算后验概率其实是不可能的; 因为这种分析性方法不仅涉及对所有系统树的求和运算, 而且在计算每个系统树的联合概率时还得顾及枝长和替换模型参数值的各种可能组合^[9]。所幸的是, 已经建立起一些数值法, 可以通过它们去逼近系统树的后验概率。马尔科夫链的蒙特卡罗 (Markov chain Monte Carlo, MCMC) 法就属于这类方法, 其想法是在系统树组成的空间中随机漫游直至趋近系统树的平衡分布, 该平衡分布也即想要求得的贝叶斯后验概率分布^[9]。

鉴于目前还未见有采用贝叶斯法对罗汉松科植物的系统发育进行推测的报道, 本研究对该科共计 42 种植物的叶绿体 *trnL F* 非编码区序列展开了贝叶斯分析, 以期从分子系统学的角度为探讨罗汉松科的系统分类问题提供新的信息。

1 材料与方法

1.1 材 料

本研究测序所用植物材料罗汉松 *Podocarpus macrophyllus*、贺氏罗汉松 *P. henkelii*、短叶罗汉松 *P. macrophyllus* var. *maki*、大理罗汉松 *P. forrestii*、兰屿罗汉松 *P. cotalis*、海南罗汉松 *P. annamiensis*、镰叶罗汉松 *P. falcatulus*、百日青 *P. nerifolius*、竹柏 *Nageia nagi*、鸡毛松 *Dacrycarpus imbricatus* 和陆均松

^{*} 收稿日期: 2004-06-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170789, 30270153)

作者简介: 苏应娟 (1965 年生), 女, 副教授; 通讯联系人: 王 艇; E-mail: lsswt@zsu.edu.cn

Dacrydium pierrei 分别取自中国科学院华南植物园、中山大学校园和深圳仙湖植物园。其余植物序列取自 GenBank^[7]。

1.2 总 DNA 提取

总 DNA 提取方法采用改进的 CTAB 法^[19]。

1.3 试剂和仪器

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

1.4 PCR 扩增反应

每 100 μ L PCR 反应体积中包括：50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris HCl; 1.5 mmol/L MgCl₂; $w = 0.1\%$ Triton X-100; dNTP 各 0.2 mmol; 模板用量为 50 ~ 100 ng; 2.0 单位 TaqDNA 聚合酶;

引物各 40 pmol。扩增 *trnL-F* 区引物采用 Taberlet 等的设计^[11],

引物 1: 5'-ATTTGAAGTGGTGACACGAG-3',

引物 2: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'。

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 总计 30 个循环; 末次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测其相对分子质量。

1.5 低熔点琼脂糖回收 PCR 产物与克隆测序

$w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶 1 $\times$ TAE 电泳 2 h (电压为 5 V/cm), 切下目的片段, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。回收所得 PCR 产物与 PUC mT 载体连接, 转化导入由大肠感菌 DH 5 α 所制的感受态细胞中, 采用蓝白斑筛选法获得克隆。应用质粒电泳和酶切的方法确定阳性克隆。所得阳性克隆在 ABI377 自动测序仪上测序。

1.6 数据处理

新测序列报送 Genbank (登录号: AJ441088—AJ441092, AY678109—AY678115)。序列比对用 CLUSTALX 软件自动完成后再进行适当的手工调整。系统发育的贝叶斯推测使用 MrBayes 软件 (Version 2.01)^[12] 进行。似然模型参数设置: DNA 替换取 General Time Reversible (GTR) 模型, 位点变异速率取 γ 分布。系统发育模型的后验概率依 Metropolis Hastings Green 算法通过 4 条链 (Markov Chain Monte Carlo) 运行 100 000 代估计。每 10 代保存 1 棵树。MCMC 分析以随机树起始。摒弃老化样本后由剩余样本构建一致树。外类群选取黑松 *Pinus thunbergii* 和 *Agathis australis*。运用 Treeview 软件绘制树图。

2 结 果

44 种植物的叶绿体 *trnL-F* 非编码区序列经排列、手工调整及两端切齐后获得长度为 430 bp 的数据矩阵。外类群黑松和 *Agathis australis* 的序列长度分别为 329 bp、386 bp, A+T 含量各为 71.12%、76.17%。42 种内类群的序列长度介于 288 ~ 339 bp 之间, A+T 含量为 66.46% ~ 72.70%; 其中 *Lagarostrobos franklinii* 的序列最短, 兰屿罗汉松的序列最长。所有序列的 A+T 含量明显偏高, 多数非编码序列和假基因都具此特征^[13]。

通过对数似然值和运行代数作图的方法鉴定老化期 (Burn in period)。利用 GTR 模型进行了两次独立的贝叶斯分析: 分析 A 和分析 B (图 1)。2 次结果均显示对数似然值在 10 000 代时开始进入平台期 (图 1)。依此为依据, 将 20 000 代以前存取的树作为老化数据丢弃。

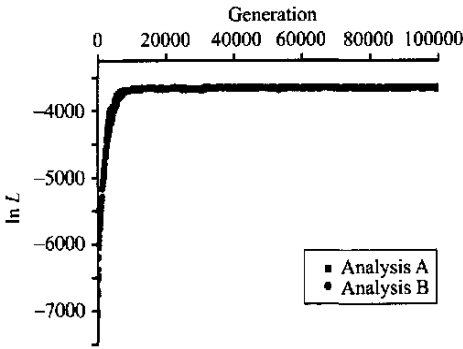


图 1 2 次 (A 和 B) 独立贝叶斯分析得到的老化曲线
Fig 1 Burn-in plots of two independent Bayesian analyses (A and B)

在 MCMC 20 000 ~ 100 000 代期间, 每 10 代取样一次积累的数据基础上求得的 50% 多数一致树 (50% majority consensus tree) 见图 2。该图显示 *Phyllocladus* 和狭义罗汉松科共同组成一单系群 (后验概率 0.86)。*Phyllocladus* 本身为一单系分支也得到有力支持 (后验概率 1.00), 并且是罗汉松科其余成员的姊妹群。狭义罗汉松科包含 2 个主分支: 分支 1 由 *Halocarpus*、*Lagarostrobos*、*Manoao*、*Sundacarpus* 和 *Prumnopitys* 等属组成, 但此分支为真的后验概率仅为 0.20; 分支 2 由 *Lepidothamnus*、*Saxegothea*、*Microcachrys*、*Microstrobos*、*Acropyle*、*Nageia*、*Podocarpus*、*Afrocarpus*、*Retrophyllum*、*Dacrycarpus*、*Falcatifolium* 及 *Dacrydium* 等属组成, 支持此分支为真的后验概率为 0.54。

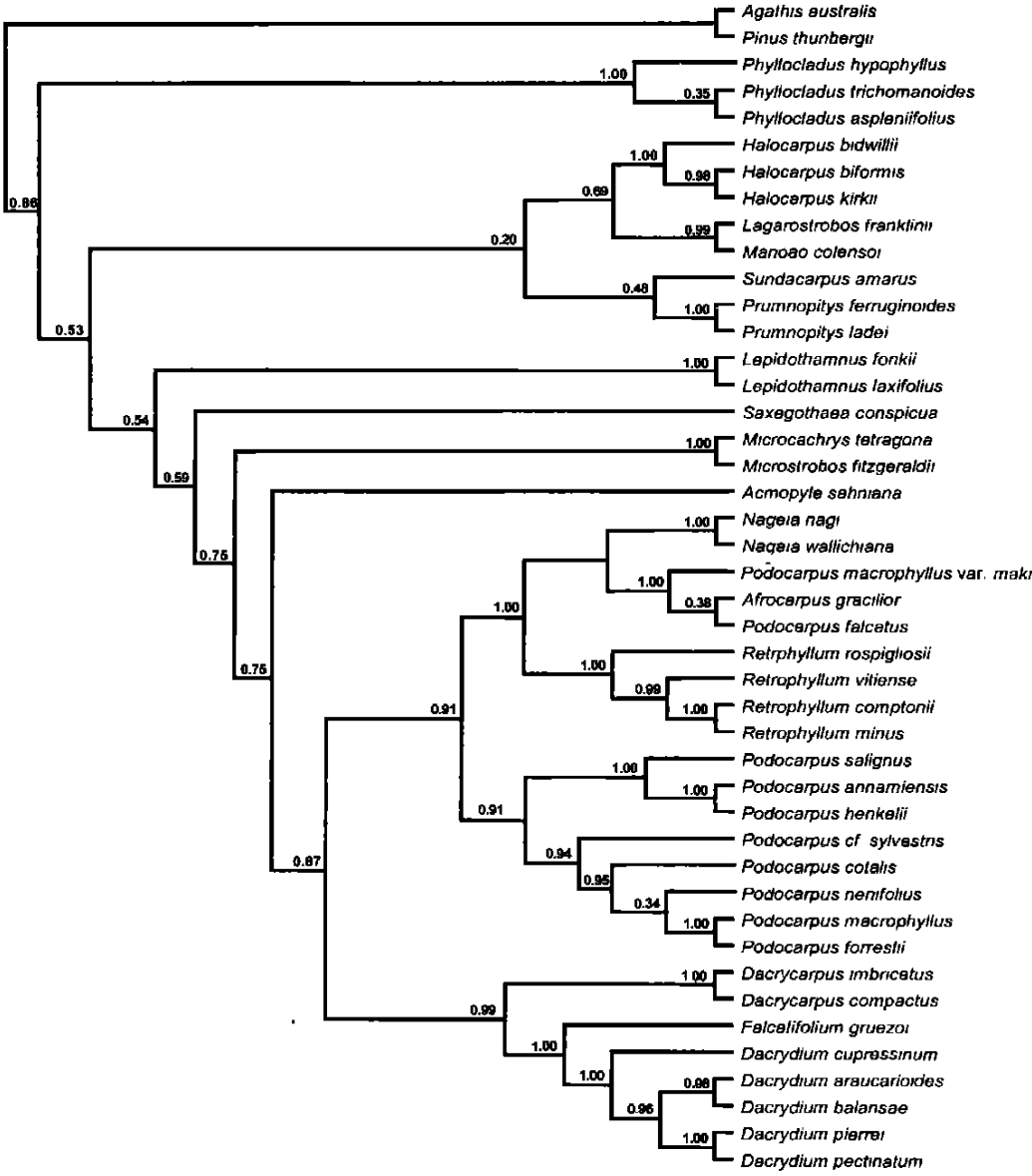


图 2 基于 *trnL-F* 序列数据利用贝叶斯法求得的 50% 多数一致树 (分支上数字为后验概率值)

Fig. 2 Fifty percent majority consensus tree based on *trnL-F* sequence data using Bayesian method

3 讨论

Keng^[14] 认为 *Phyllocladus* 叶状茎代表古老结构并使该属同前裸子植物相联系, 从而提出把该属从罗汉松科中分离出来成立单型科 *Phyllocladaceae*。Quinn^[15, 16] 基于胚胎发生的证据不同意 Keng 的意见。然而, 染色体数目、木材解剖、化学成分、花粉和胚珠形态及传粉机制等资料都显示 *Phyllocladus* 和罗汉松科不同, 因此 Page^[17, 18] 主张保留 *Phyllocladaceae*, 并把它作为罗汉松科的近缘科处理。可是 Bobrov 等^[19] 依据种子形态和解剖特征又提出新的观点: *Phyllocladaceae* 不仅同罗汉松科没有联系, 而且和松柏类所有其余成员的关系也较远。分子系统学方面, Kelch^[20] 利用 18S rDNA 序

列发现 *Phyllocladus* 处于狭义罗汉松科的基部位置, 而 Conran 等^[6] 对 *rbcL* 序列的分析却认为 *Phyllocladus* 嵌套在狭义罗汉松科。但是, 如果仔细检查 Conran 等论文中的严格一致树, 可以看到其实该树并不支持 *Phyllocladus* 嵌套于罗汉松科的提法。该树虽然显示 *Phyllocladus* 是 *Halocarpus* 的姊妹群, 但是并未获得 Jackknife 值的支持; 更引发疑问的是, 使 *Phyllocladus*—*Halocarpus* 分支同严格一致树底部进一步发生联系的各分支也均未获统计支持。在 Kelch 2002 年基于 18S rDNA 序列进行的再次研究中, 给出的一棵最简约树显示 *Phyllocladus* 同 *Lepidothamnus* 互为姊妹群; 但是在同时给出的严格一致树中两者的关系却没有得到 Bootstrap 支持^[21]。对 *trnL-F* 序列数据的贝叶斯推测结果表明:

Phyllocladus 为单系分支 (后验概率 1.00), 位于罗汉松科的基部, 是罗汉松科所有其余成员的姊妹群 (后验概率 0.86)。

分类上, 对竹柏类植物一种较为引人注目的意见是将狭义的竹柏属从罗汉松科中分离出来成立单属新科竹柏科 (*Nageiaceae* D. Z. Fu)^[1]。但是以往的分子系统学研究均显示竹柏类应归属于罗汉松科内^[21-23]。*trnL F* 序列的贝叶斯法分析得到相同结果—*Nageia* 嵌套在罗汉松科内, 成为由 *Afrocarpus gracilior*、镰叶罗汉松 *Podocarpus falcatus* 及短叶罗汉松 *Podocarpus macrophyllus* var. *maki* 所组成分支的姊妹分支 (后验概率 1.00); 上述两分支形成的单系群进一步和 *Retrophyllum* 互为姊妹群 (后验概率 1.00)。Page 曾指出罗汉松属、*Afrocarpus*、*Nageia* 及 *Retrophyllum* 是相互关联的^[18]。本研究推测出的系统关系为这种观点提供了新的佐证。因此, 我们提议分类学上使用较为广义的罗汉松属概念, 即将 *Afrocarpus*、*Nageia* 及 *Retrophyllum* 等仍保留在罗汉松属内处理为组的等级。

基于花粉形态、生殖结构和叶形态及解剖方面的差异, de Laubenfels 将 *Falcatifolium* 从陆均松属分离出来。角质层的微形态观察也证明两者特征上的差异也足以把它们区分开来。贝叶斯推测显示 *Falcatifolium* 与狭义陆均松属互为姊妹群 (后验概率 1.00); 这一结果在对 18S rDNA 序列进行的最简约分析中也得到证实 (严格一致树中 Bootstrap 值为 65%)^[21]。

另外, 本研究还表明 *Dacrycarpus* 属单系群, 并且处于 *Falcatifolium*—陆均松属分支的基部; 而 Kelch 的严格一致树无法分辨出这一关系^[21]。

本研究中的 *Sundacarpus amarus* (Blume) C. N. Page 曾被归在罗汉松属 Sect. *Sundacarpus* Buchh. et Gray 组, 为该组的惟一成员, 名为 *Podocarpus amara* Blume。De Laubenfels 提出将罗汉松属的两个组 Sect. *Stachycarpus* Endl. 和 Sect. *Sundacarpus* Buchh. et Gray 移入其定义的属 *Prumnopitys* Phil. 内; 但是考虑到 *Prumnopitys amara* 具大型、螺旋排列的叶并缺乏副传输组织, 仍给该种保留了组 (*Prumnopitys* sect. *Sundacarpus* (Buchh. et Gray) de Laubenf.) 的地位^[24]。此后, Page 鉴于 *Prumnopitys amara* 同 *Prumnopitys* 其他成员的差异进一步把该种上升到属的水平, 成为 *Sundacarpus amarus* (Blume) C. N. Page。利用 *rbcL* 序列构建的严格一致树中虽显示 *Sundacarpus* 嵌套于 *Prumnopitys* 成员中间并且一起组成单系分支, 但是该分支并未获得 Jackknife 值 (< 50%) 支持⁹。对 18S rDNA 序列最简约分析

得出的严格一致树表明 *Prumnopitys amara* 和 *Prumnopitys* 属其他植物共同组成一得到有力支持的分支 (Bootstrap 100%)^[21]。我们的贝叶斯法分析结果同样发现 *Sundacarpus* 和 *Prumnopitys* 组成单系分支并且处在基部位置, 然而该分支的后验概率较低 (0.48)。希望在将来的研究中, 通过增加 *Prumnopitys* 的取样来更好地分辨两者间的关系。

Quinn 依据形态学和解剖学资料主张将 Florin 的陆均松属 *Dacrydium* C 类 (Group C) 的种分离出来并分别组成 3 个属: *Lepidothamnus* Phil. (含 3 个种)、*Halocarpus* Quinn (含 2 个种) 和 *Lagarostrobs* Quinn (含 2 个种)^[25]。Quinn 注意到 *Lagarostrobs franklinii* 和 *Lagarostrobs colensoi* 两种间存在一些差异, 但仍把它们置于同一属内以反映彼此间较为密切的关系。可是, Molloy 更强调 2 种间的差异, 为 *Lagarostrobs colensoi* 创立新属 *Manoao* Molloy, 结果是 *Lagarostrobs* 和 *Manoao* 均成单型属^[26]。*tmL F* 序列依贝叶斯法推测出的系统发育显示 *Lagarostrobs franklinii* 和 *Manoao colensoi* 组成一单系群且后验概率高达 0.99。这同 18S rDNA 最简约分析所获结果一致 (单系群得到 60% Bootstrap 支持)^[21]。*rbcL* 序列最简约分析虽也显示两种构成单系群但未获得 Jackknife 支持 (50%)^[6]。有趣的是, 在 Sinclair 对 *trnL F* 序列通过简约法获得的严格一致树中尽管 *Lagarostrobs franklinii*、*Manoao colensoi* 及 *Parasitaxus usta* 以多歧分叉的形式分别占据同一分支的末端, 但该分支仍缺乏统计支持 (Bootstrap < 50%)^[7]。根据我们的研究, 并考虑到减少单型属的数目, 认为仍以将 *Lagarostrobs franklinii* 和 *Manoao colensoi* 归在同一属 *Lagarostrobs* 为宜。另外, *Halocarpus* 与 *Lepidothamnus* 两属的建立也获得贝叶斯推测结果的支持。

孢粉学资料反映 *Microstrobus* 和 *Microcachrys* 两属间存在密切的关系。遗憾的是, 分子系统发育研究还未能对探讨这一问题提供较有价值的信息。在对 18S rDNA 或 *rbcL* 序列进行最简约分析得到的严格一致树中, *Microstrobus* 和 *Microcachrys* 的代表成员都是以多歧分叉的形式同树的更底部分支相连, 无法分辨两属间的关系^[6,21]。同样使用最简约法, 基于 *trnL F* 序列求得的严格一致树中, *Microstrobus* 和 *Microcachrys* 虽组成单系分支但 Bootstrap 值 < 50%^[7]。本研究的贝叶斯推测结果清楚显示 *Microstrobus fitzgeraldii* 和 *Microcachrys tetragona* 互为姊妹群 (后验概率 1.00), 支持 *Microstrobus* 和 *Microcachrys* 亲缘密切的观点。

参考文献:

- [1] 傅德志. 裸子植物一新科—竹柏科[J]. 植物分类学报, 1992, 30: 515—528.
- [2] KENG H. On the family Phyllocladaceae[J]. Taiwan, 1973, 18: 142—145.
- [3] GUSSEN H. Les Gymnospermes actuelles et fossiles. Les Podocarpaceae, etude general[J]. Travaux de Laboratoire Forestier de Toulouse, 1974, 12: 1—49.
- [4] PAGE C N. New and maintained genera in the conifer families Podocarpaceae and Pinaceae[J]. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 1988, 45: 377—396.
- [5] CHAW S M, SUNG H, LONG M, et al. The phylogenetic positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus*, and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences[J]. J Molecular Evolution, 1995, 41: 224—230.
- [6] CONRAN J G, WOOD G M, MARTIN P G, et al. Generic relationships within and between the gymnosperm families Podocarpaceae and Phyllocladaceae based on an analysis of the chloroplast gene *rbcL*[J]. Aust J Bot, 2000, 48: 715—724.
- [7] SINCLAIR W T, MILL R R, GARDNER M F, et al. Evolutionary relationships of the New Caledonian heterotrophic conifer, *Parusitaxus usta* (Podocarpaceae), inferred from chloroplast *trnL-F* intron/spacer and nuclear rDNA ITS2 sequences[J]. Plant Syst Evol, 2002, 233: 79—104.
- [8] HUELSENBECK J P, RONQUIST F, NIELSEN R, et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology[J]. Science, 2001, 294: 2310—2314.
- [9] Felsenstein J. Inferring phylogenies[M]. Sunderland: Sinauer Associates, Inc, 2004.
- [10] SU Y J, WANG T, YANG W D, et al. DNA extraction and RAPD analysis of *Podocarpus*[J]. Acta Sci Natur Univ Sunyatseni, 1998, 37(4): 13—18.
- [11] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Mol Biol, 1991, 17: 1105—1109.
- [12] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. Biometrics, 2001, 17: 754—755.
- [13] WANG T, SU Y J, LI X Y, et al. Genetic structure and variation in the relict populations of *Alsophila spinulosa* from southern China based on RAPD markers and cpDNA *atpB-rbcL* sequence data[J]. Hereditas, 2004, 140: 8—17.
- [14] KENG H. On the family Phyllocladaceae[J]. Taiwan, 1973, 18: 142—145.
- [15] QUINN C J. Embryogeny in *Phyllocladus*[J]. New Zealand J Botany, 1986, 24: 575—580.
- [16] QUINN C J. The Phyllocladaceae Keng's critique[J]. Taxon, 1987, 36: 559—565.
- [17] PAGE C N. Phyllocladaceae // KUBITZKI K. The families and genera of vascular plants. Vol. 1. Pteridophytes and gymnosperms[C]. Berlin: Springer Verlag, 1990: 317—319.
- [18] PAGE C N. Podocarpaceae // KUBITZKI K. The families and genera of vascular plants. Vol. 1. Pteridophytes and gymnosperms[J]. Berlin: Springer Verlag, 1990: 332—346.
- [19] BOBROV A V, MELIKIAN A P, YEMBATUROVA E Y. Seed morphology, anatomy and ultrastructure of *Phyllocladus* L. C. & A. Rich. Ex Miob. (Phyllocladaceae (Pilg.) Bessey) in connection with the generic system and phylogeny [J]. Annals of Botany, 1999, 83: 601—618.
- [20] KELCH D G. Phylogeny of Podocarpaceae: comparison of evidence from morphology and 18s rDNA [J]. American J Botany, 1998, 85: 986—996.
- [21] KELCH D G. Phylogenetic assessment of the monotypic genera *Sundacarpus* and *Manoao* (Coniferales: Podocarpaceae) utilizing evidence from 18s rDNA sequences [J]. Australian Systematic Botany, 2002, 15: 29—35.
- [22] CHAW S M, PARKINSON C L, CHENG Y Y, et al. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers [J]. PNAS, 2000, 97: 4086—4091.
- [23] 汪小全, 舒艳群. 红豆杉科及三尖杉科的分子系统发育——兼论竹柏属的系统位置 [J]. 植物分类学报, 2000, 38: 201—210.
- [24] de LAUBENFELS D J. A revision of the Malesian and Pacific rainforest conifers. I. Podocarpaceae. in part [J]. J Arnold Arboretum, 1969, 50: 274—369.
- [25] QUINN C J. Taxonomy of *Dacrydium* Sol. ex Lamb. emend De Lauben. (Podocarpaceae) [J]. Australian J Botany, 1982, 30: 311—320.
- [26] MOLLOY B P J. *Manoao* (Podocarpaceae) — a new monotypic conifer genus endemic to New Zealand [J]. New Zealand J Botany, 1995, 33: 186—201.

Bayesian Inference of the Phylogeny of Podocarpaceae Based on *trnL-F* Sequence Data

SU Ying juan, WANG Ting, CHEN Guo pei, AN Yu, ZUO Wu lin, SUN Yu fei, DENG Feng, SUN Xu
(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using *Pinus thunbergii* and *Agathis australis* as outgroups, the phylogeny of Podocarpaceae was inferred based on chloroplast *trnL-F* non-coding sequence data and a Bayesian method. The results exhibit: ① *Phyllocladus* forms a monophyletic clade which is basal to the rest of the Podocarpaceae as a sister group; ② *Nageia* is nested within members of Podocarpaceae, appearing to be closely related to *Podocarpus*, *Afrocarpus* and *Retrophillum*; ③ *Dacrycarpus* forms a well-supported clade which is basal to a sister clade of *Falcatifolium* and *Dacrydium*; ④ *Lagarostrobs franklinii* and *Manoao colensoi* are suggested to be included in a single genus *Lagarostrobs*; ⑤ The establishment of two genera, *Halocarpus* and *Lepidothamnus*, is lent support; and ⑥ the mutual affinity between *Microstrobs* and *Microcachrys* is proved.

Key words: Podocarpaceae; *trnL-F* non-coding sequence; Bayesian inference; phylogeny