

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201601031

引文格式: 王春波, 郭治友. 膜蕨科植物 *rbcL* 基因的适应性进化和共进化分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(2):145-152

WANG CB, GUO ZY. Adaptive evolution and coevolution of the *rbcL* gene in Hymenophyllaceae [J]. *Guihaia*, 2017, 37(2):145-152

# 膜蕨科植物 *rbcL* 基因的适应性进化和共进化分析

王春波, 郭治友\*

(黔南民族师范学院 生物科学与农学院, 贵州 都匀 558000)

**摘要:** 膜蕨科植物是薄囊蕨类中种类最多的科, 主要分布在潮湿的热带地区, 拥有陆生、附生、半附生和攀生等多种生态型。为进一步了解膜蕨科植物辐射式物种分化的分子适应机制, 该研究在时间框架下采用位点模型对膜蕨科植物 *rbcL* 基因的进化式样进行分析。结果表明: 共鉴定出 6 个氨基酸正选择位点 (125I、227L、231A、258F、304S 和 351L), 其中位点 304S 位于环六上, 对维持 Rubisco 功能有重要作用。此外, 还计算了 Rubisco 大亚基内部氨基酸位点之间的共进化关系, 共检测出 39 组 (35 个氨基酸) 共进化位点, 其中位点在  $\alpha$  螺旋上的占 46%, 在  $\beta$  折叠上的占 14%。膜蕨科植物 *rbcL* 基因这种复杂的进化式样可能与其起源较早有关。鉴于此, 基于 UCLD 分子钟模型对膜蕨科植物的分化时间进行了估计, 结果显示膜蕨科植物首次发生分歧的时间在三叠纪早期, 瓶蕨属和膜蕨属的分歧时间分别发生在侏罗纪早期和白垩纪晚期, 并且得出陆生生态型是其它生态型进化的基础, 推测最近几次最热事件可能对物种分化的形成产生一定的作用。该研究结果对认识膜蕨科植物如何应对被子植物兴起所导致的陆地生态系统改变具有重要意义。

**关键词:** 膜蕨科, *rbcL* 基因, 共进化, 正选择位点, 生态型

中图分类号: Q941.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)02-0145-08

## Adaptive evolution and coevolution of the *rbcL* gene in Hymenophyllaceae

WANG Chun-Bo, GUO Zhi-You\*

(College of Biological Sciences and Agriculture, Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun 558000, Guizhou, China)

**Abstract:** Hymenophyllaceae is the most rich speices family of leptosporangiate ferns. It mainly distributed in the humid tropics, possessing terrestrial, epiphytic, hemepiphytic and climbing ecotypes. To further understand the molecular adaptation linked to fern radiation, evolutionary patterns of the *rbcL* sequences in the family Hymenophyllaceae were examined using random-site models along with the estimated time-scale of Hymenophyllaceous phylogeny. By comparing Modles M1a/M2a and M7/M8 under random-site modles, six amino acid sites (125I, 227L, 231A, 258F, 304S and 351L) were found to be positively selected, in which the site 304S was located in the D-loop six, playing an important role in keeping Rubisco function. We also used CAPS v1.0 (coevolution analysis using protein sequences) to study the evolutionary relationship between the amino sites within the Rubisco large subunit. Thirty-nine groups of coevolutionary sites were detected (totally thirty-five amino sites), of which 46% were located in the  $\alpha$ -helix, 14% in the  $\beta$ -sheet. This complex evolutionary patterns may be related to its earlier origin. In view of this, the phylogenetic tree was reconstructed. The results showed that the initial divergence whin Hymenophyllaceae occurred in the early Triassic. The

收稿日期: 2016-04-20 修回日期: 2016-06-26

基金项目: 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字 [2015]2137 号); 贵州省自然科学基金重点项目 (黔教合 KY 字 [2015]380 号) [Supported by the Science and Technology Foundation of Guizhou Province of China (20152137); the Natural Science Foundation of Guizhou Province of China (2015380)].

作者简介: 王春波 (1987-), 男, 黑龙江海伦人, 博士研究生, 主要从事植物进化遗传学研究, (E-mail) wangchunbo@sgmtu.edu.cn.

\*通信作者: 郭治友, 教授, 从事植物资源学研究, (E-mail) guozhiyou@sgmtu.edu.cn.

divergence within Trichomanes and Hymenophyllum occurred in the early Jurassic and Cretaceous, seperately. The results also indicated that the ancestral state for the Hymenophyllaceae was terrestrial, suggesting possible roles played by the Thermal Maximum recently. These results provide new insights for how Hymenophyllaceae ferns response to the terrestrial ecosystem changes caused by the rise angiosperms.

**Key words:** Hymenophyllaceae, *rbcL* gene, coevolution, positive selection, ecotypes

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(简称 Rubisco),是叶绿体基质中的可溶性蛋白。该酶在植物光合作用中发挥重要作用,既是固定 CO<sub>2</sub> 的羧化酶,也是光呼吸途径中的加氧酶(Rowan & Athena, 2006;张江洪等,2002)。光呼吸代谢途径消耗光合作用过程中合成的有机物,由此造成的损失非常高。现已知,叶绿体 *rbcL* 基因编码 Rubisco 大亚基,且大亚基的 C 末端与催化固定 CO<sub>2</sub>密切相关(Spreitzer & Salvuccim,2002;Curmipm et al,1992)。鉴于此,若能深入了解 Rubisco 的结构并对其进行改造,适当增强与 CO<sub>2</sub>的亲合力,则能提高植物的光合效率(蒋德安等,2001;洪健等,2004)。

基因序列适应性进化分析可为深入理解蛋白质的结构和功能提供参考信息。将蛋白质编码序列分为同义置换(dN)和非同义置换(dS)。 $\omega = dN/dS$  可用来判断蛋白质中氨基酸位点的进化方式(Yang, 2007)。当  $\omega = 1$  表示为中性进化; $\omega < 1$  说明受到负选择; $\omega > 1$  表明发生了正向选择,也即暗示蛋白质发生了适应性进化。与此同时,蛋白质内部氨基酸位点并不是孤立存在,单独进化的,它们之间存在一种共进化关系。氨基酸位点间的这种共进化关系的复杂性与它们在结构和功能上的联系成正比,正是这种分子内部氨基酸位点间的共进化关系网促成了蛋白质的进化。近年来有文献报道,发生正选择的位点多数都伴随着与其它氨基酸之间的复杂的共进化关系,鉴于此,我们计算了 Rubisco 大亚基内部各氨基酸位点间的共进化关系,以期为其功能提供精确的位点参考信息。

膜蕨科植物有 750~800 种,是薄囊蕨类中种类最多的科,主要分布在潮湿的热带地区,拥有多种生态型(陆生、附生、半附生和攀生等)。考虑到膜蕨科植物生境的异质性(Zhang et al,2006),推测在物种发生辐射式分化的过程中,参与光合作用的关键基因可能也发生了某种程度的适应性进化。鉴于此,本研究的目的是①揭示膜蕨科植物 *rbcL* 基因编码的氨基酸位点发生适应性进化式样并进一步检测各氨基酸位点间的共进化关系;②对膜蕨科植物分

歧时间进行估计;③初步探讨膜蕨科植物不同生态型之间的进化关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 序列数据

由 GenBank 获得膜蕨科 139 种植物的 *rbcL* 基因序列(表 1),根据文献以 4 种植物(水蕨,楔叶铁线蕨,凤丫蕨和沼泽蕨)为外类群(Qin,1978)。使用 ClustalW(Thompson et al,1994)软件对序列进行比对,共获得 402 个密码子。

### 1.2 统计分析

运行 Modeltest 3.7(Pos & Crandall,1998)软件选取核苷酸进化模型。采用 Mrbayes 3.1.2(Hulsenbeck & Ronquist,2001)软件构建膜蕨科植物系统发育树。根据 MCMC(Markov Chain Monte Carlo)理论计算 15 000 000 代,每 100 代取样 1 次,总共产生 150 000 棵树,运算过程按照 4 条链同时运行(3 条热链和 1 条冷链),这样最开始的 37 500 棵树作为预热样本被摒弃掉,用余下的样本在时间框架下构建一致树。使用 Tracer v1.4.1(Rambaut & Drummonda,2008)软件检测运算的收敛程度。最后用 Figtree v1.2.3(Rambaut & Drummonda,2009)软件查看膜蕨科植物的系统发育关系。

利用 BEAST v2.2.1 软件估计膜蕨科植物的分歧时间(Drummond & Rambaut,2007)。根据所得的系统发育关系将所有植物划分为 5 个类群集。为准确估计膜蕨科植物的分歧时间,本研究基于最近共同祖先时间(tMRCA)值校正主要分支的分歧时间,由于没有可用化石记录报道,我们采用外类群水蕨属,楔叶铁线蕨属和凤丫蕨属的分歧时间进行单点校正(Pryer et al,2004;Schneider et al,2004)(图 1)。采用 Modeltest 3.7 软件选取核苷酸进化模型并计算 30 000 000 代,每 1 000 代取样 1 次,最开始的 7 500 棵树作为预热样本被摒弃掉,用 Figtree v1.2.3(Rambaut & Drummonda,2009)软件查看剩余样本重建的最大置信度时间树。

表 1 植物材料及其 *rbcL* 基因 GenBank 登录号  
Table 1 Plant materials and their *rbcL* gene GenBank accession numbers

植物 Species	登录号 Accession number	植物 Species	登录号 Accession number	植物 Species	登录号 Accession number
<i>Abrodictyum boninense</i>	AB257472	<i>Hymenophyllum mnioides</i>	AB217849	<i>T. elongatum</i>	AY175802
荷叶铁线蕨	CRU30833	<i>H. nitidulum</i>	AB162683	<i>T. polypodioides</i>	AY175795
<i>Cardiomanes reniforme</i>					
翅柄假脉蕨	AB064297	<i>H. ooides</i>	AB191449	<i>T. endlicherianum</i>	AY175787
<i>Crepidomanes latealatum</i>					
<i>C. schmidtianum</i> var. <i>latifrons</i>	AB378494	<i>H. palmatifidum</i>	AB162682	<i>T. punctatum</i>	AB257492
<i>C. vitiense</i>	AB162689	<i>H. pectinatum</i>	AY095115	<i>T. erosum</i>	AB257495
<i>Didymoglossum krausii</i>	EF463228	<i>H. polyanthos</i>	EU122982	南洋瓶蕨 <i>T. radicans</i>	Y09201
<i>Hymenophyllum acanthoides</i>	AB064291	<i>H. pulcherrimum</i>	AB191451	<i>T. exsectum</i>	AB257458
<i>H. armstrongii</i>	AY095109	<i>H. rarum</i>	AB217845	<i>T. reptans</i>	AB257493
<i>H. australe</i>	AB191439	<i>H. rolandi-principis</i>	AB064286	<i>T. fallax</i>	AB257459
<i>H. badium</i>	AB191440	<i>H. sanguinolentum</i>	AB191452	线片长筒蕨 <i>T. rigidum</i>	AY095108
<i>H. baileyianum</i>	AB191441	<i>H. sibthorpioides</i>	AY095117	<i>T. flavofuscum</i>	AY175804
<i>H. barbatum</i>	AB064287	<i>H. subdimidiatum</i>	AB064290	<i>T. robustum</i>	AY175796
<i>H. braithwaitii</i>	AB162687	<i>H. tenellum</i>	AY095116	<i>T. galeottii</i>	AY175794
<i>H. cruentum</i>	AY095107	<i>Macroglena brassii</i>	AB257483	<i>T. roraimense</i>	EF016127
<i>H. caudiculatum</i>	AB191442	<i>Polyphlebium borbonicum</i>	EU348751	<i>T. gourlianum</i>	Y09194
<i>H. corrugatum</i>	AB191443	<i>P. endlicherianum</i>	EF463229	<i>T. rupestre</i>	AB257464
<i>H. cuneatum</i>	AY775401	<i>Sphaerocionium pilosissimum</i>	AB064308	<i>T. grande</i>	AB257487
<i>H. demissum</i>	AY775402	<i>Serpilopsis caespitosa</i>	AB191456	<i>T. scandens</i>	AB257463
<i>H. digitatum</i>	AB162679	<i>Trichomanes alatum</i>	Y09189	<i>T. hildebrandtii</i>	AY175788
<i>H. dilatatum</i>	AY095111	<i>Trichomanes</i> cf. <i>motleyi</i>	AB257497	<i>T. schlechteri</i>	AB257481
<i>H. dimidiatum</i>	AB064289	<i>T. christii</i>	AB257466	<i>T. holopterum</i>	AB257499
<i>H. exiguum</i>	AB257488	<i>T. colensoi</i>	AB257456	<i>T. schmidianum</i>	AB257465
<i>H. flexuosum</i>	AB217850	<i>T. angustatum</i>	AY175783	<i>T. hostmannianum</i>	AB257500
<i>H. frankliniae</i>	AB162690	<i>T. ankersii</i>	AY175800	<i>Trichomanes</i> sp. 'ISEM-H2901'	Y09202
<i>H. fuciforme</i>	AB191446	<i>T. arbuscula</i>	AY175791	<i>T. hymenoides</i>	AB257489
<i>H. fuscum</i>	AB064304	<i>T. asae-grayi</i>	AB257476	<i>T. strictum</i>	AB257482
<i>H. heimii</i>	AY775404	<i>T. atrovirens</i>	AB257484	<i>T. hymenophylloides</i>	AB257460
<i>H. hirsutum</i>	AY775407	瓶蕨 <i>T. auriculatum</i>	AB257455	盾型单叶假脉蕨 <i>T. tahitense</i>	AB257498
<i>H. hygrometricum</i>	AY095113	叉脉单叶假脉蕨	AB257494	<i>T. ingae</i>	AB257461
		<i>T. bimarginatum</i>			
<i>H. inaequale</i>	AY095112	<i>T. bipunctatum</i>	Y09190	<i>T. trigonum</i>	AY175799
抓哇露蕨 <i>H. javanicum</i>	AB191447	<i>T. borbonicum</i>	AY175782	<i>T. intermedium</i>	AY175785
<i>H. lanceolatum</i>	AF275646	<i>T. boryanum</i>	AB257485	<i>T. venosum</i>	AY175786
<i>H. leratii</i>	AB191448	<i>T. capillaceum</i>	AY175784	<i>T. javanicum</i>	Y09195
<i>H. lyallii</i>	AB162684	<i>T. lyallii</i>	AB162685	<i>T. vieillardii</i>	AB257471
<i>H. marginatum</i>	AB162692	<i>T. mannii</i>	AB257474	<i>T. johnstonense</i>	AB257462
<i>H. tunbrigense</i>	EU553547	<i>T. caudatum</i>	AY175805	<i>T. walleri</i>	AB257469
<i>H. wrightii</i>	AB064294	<i>Trichomanes</i> cf. <i>acutum</i>	AB257473	<i>T. kapplerianum</i>	AB257496
<i>H. villosum</i>	AB191454	<i>T. maximum</i>	AY175781	<i>T. lucens</i>	AY175792
<i>Tichomanes crinitum</i>	AB257501	<i>T. meifolium</i>	AB257479	<i>T. krausii</i>	Y09196
<i>T. crispum</i>	AY175789	<i>T. membranaceum</i>	Y09197	水蕨 <i>Ceratopteris richardii</i>	EU352297
<i>T. cyrtotheca</i>	AB257457	<i>T. mougeotii</i>	AY175793	柯氏假脉蕨	AB257467
<i>T. dentatum</i>	AB257477	线片长筒蕨	AB257480	<i>Trichomanes kurzii</i>	
		<i>T. obscurum</i>		楔叶铁线蕨	ARU05906
<i>T. diaphanum</i>	Y09191	<i>T. osmundoides</i>	Y09198	<i>Adiantum raddianum</i>	
<i>T. digitatum</i>	AY095114	<i>T. ovale</i>	AB257491	<i>Trichomanes laetum</i>	AB257478
<i>T. diversifrons</i>	AY175798	毛叶蕨 <i>T. pallidum</i>	AB191457	凤丫蕨 <i>Coniogramme japonica</i>	DQ432658
<i>T. eglerii</i>	AY175797	<i>T. pilosum</i>	AY175790	阔边假脉蕨	AB257468
<i>T. ekmanii</i>	Y09192	<i>T. pinnatinervium</i>	Y09199	<i>Trichomanes latemarginale</i>	
<i>T. elegans</i>	Y09193	<i>T. pinnatum</i>	Y09200	沼泽蕨 <i>Thelypteris palustris</i>	TPU05947

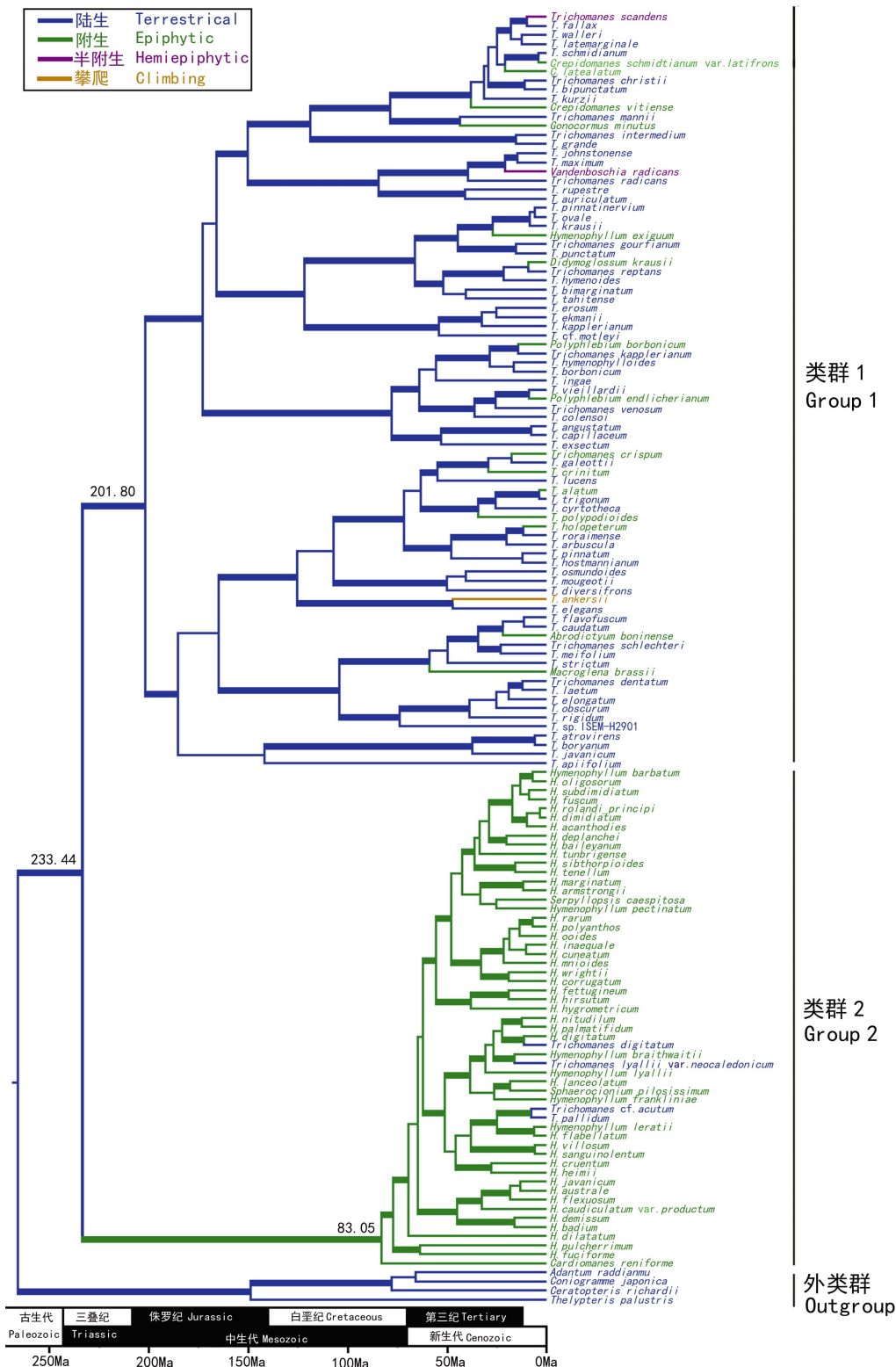
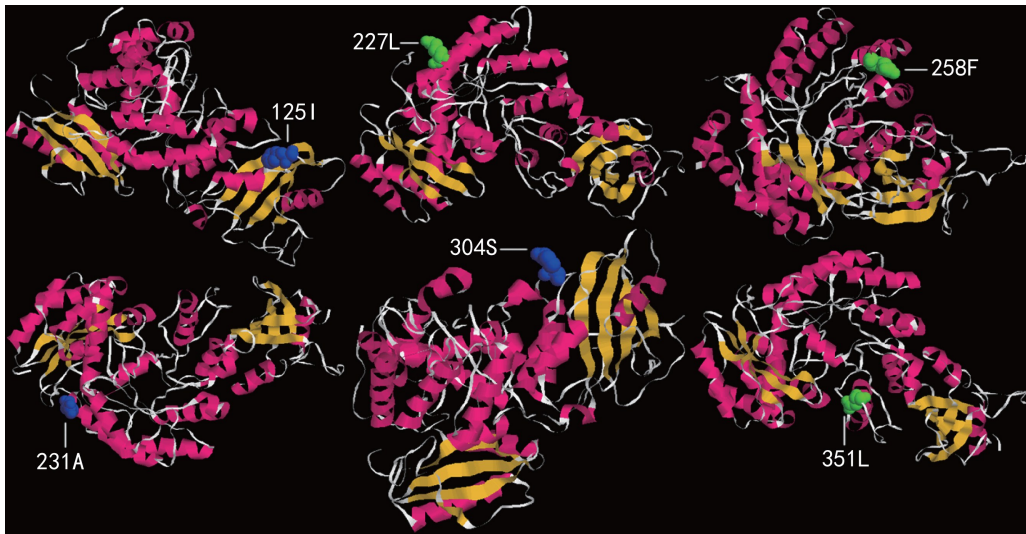


图 1 基于膜蕨科 *rbcL* 基因序列数据和 UCLD 分子钟模型构建的系统发育树。不同的颜色代表不同的生态型,粗线表示该分支后验概率大于 0.9;系统树下端为地质年代表;分支点的数字为估计的分歧时间(单位:百万年)。

Fig. 1 Phylogenetic tree of Hymenophyllaceae *rbcL* gene sequences with uncorrelated lognormal distributed relaxed clock model. Different colors indicate different ecotypes, heavily thickened lines indicate posterior probability  $\geq 90\%$  in the phylogenetic tree; Geologic timescale is labelled below the phylogenetic tree; Estimated divergence time of each node under UCLD are illustrated beside them (Unit: Million years).

表 2 各类位点间可变  $\omega$  比值模型下的参数估计值和对数似然值Table 2 Parameter estimates and log-likelihood values under models of variable  $\omega$  ratios

模型 Model	参数数目 $p^*$	似然值 $\ell$	参数估计值 Estimated value of parameter	正选择位点 Positive selection site
M0 单一比值 One ratio	1	-16 534.96	$\omega = 0.099$	无 None
M1a 近中性 Near neutral	2	-15 697.95	$p_0 = 0.887, \omega_0 = 0.024$ $p_1 = 0.113, \omega_1 = 1$	不允许 Not allowed
M2a 选择 Positive selection	4	-15 634.36	$p_0 = 0.886, \omega_0 = 0.025$ $p_1 = 0.099, \omega_1 = 1$ $p_2 = 0.015, \omega_2 = 3.567$	$P > 99\%$ : 125I, 227L, 231A, 304S $P > 95\%$ : 351L
M3 离散 Discrete	5	-16 398.38	$p_0 = 0.895, \omega_0 = 0.024$ $p_1 = 0.098, \omega_1 = 1$ $p_2 = 0.015, \omega_2 = 3.285$	无 None
M7:beta	2	-15 655.698	$p = 0.095, q = 0.502$	不允许 Not allowed
M8:beta 和 $\omega$ beta & $\omega$ beta, $\omega$ beta & $\omega$	4	-15 578.788	$p_0 = 0.982, p = 0.122, q = 0.99$ $p_1 = 0.017, \omega = 3.046$	$P > 99\%$ : 125I, 227L, 231A, 258F, 304S, 351L

图 2 膜蕨科 *rbcL* 大亚基正选择位点的空间位置 红色区域代表  $\alpha$  螺旋, 黄色区域代表  $\beta$  折叠; 白色箭头所指为正选择位点。Fig. 2 Spatial locations of the positive selected sites in the *rbcL* subunit of Hymenophyllaceae Red region.  $\alpha$ -helix; Yellow-region.  $\beta$ -sheet. Amino acid sites under positive selection are labeled with white arrows.表 3 似然比值检验统计量 ( $2\Delta\ell$ )Table 3 Likelihood ratio statistics ( $2\Delta\ell$ )

模型比较 Comparison	$2\Delta\ell$	自由度 $df$	$\chi^2_{5\%}$
M0-M3	136.43	4	9.49
M1a-M2a	127.18	2	5.99
M7-M8	153.83	2	5.99
M8a-M8	47.02	1	3.84

采用位点模型进行适应性进化分析, 根据 dN 和 dS 的比值 ( $\omega > 1$ ) 来判断氨基酸位点是否发生正向选择 (Yang, 2007)。其中, M0 模型设定系统树上所有的位点及分支具有同样的  $\omega$  值, 即单一比值。近中性 M1a 模型假设蛋白质具保守 ( $0 < \omega < 1$ ) 和中性 ( $\omega = 1$ ) 两类位点。M2a (选择) 模型中  $\omega$  值可以大于 1, 为自由参数, 由此衍生出第三类位点。M3 模型可以根据离散型分布分别计算出三类位点的  $\omega$

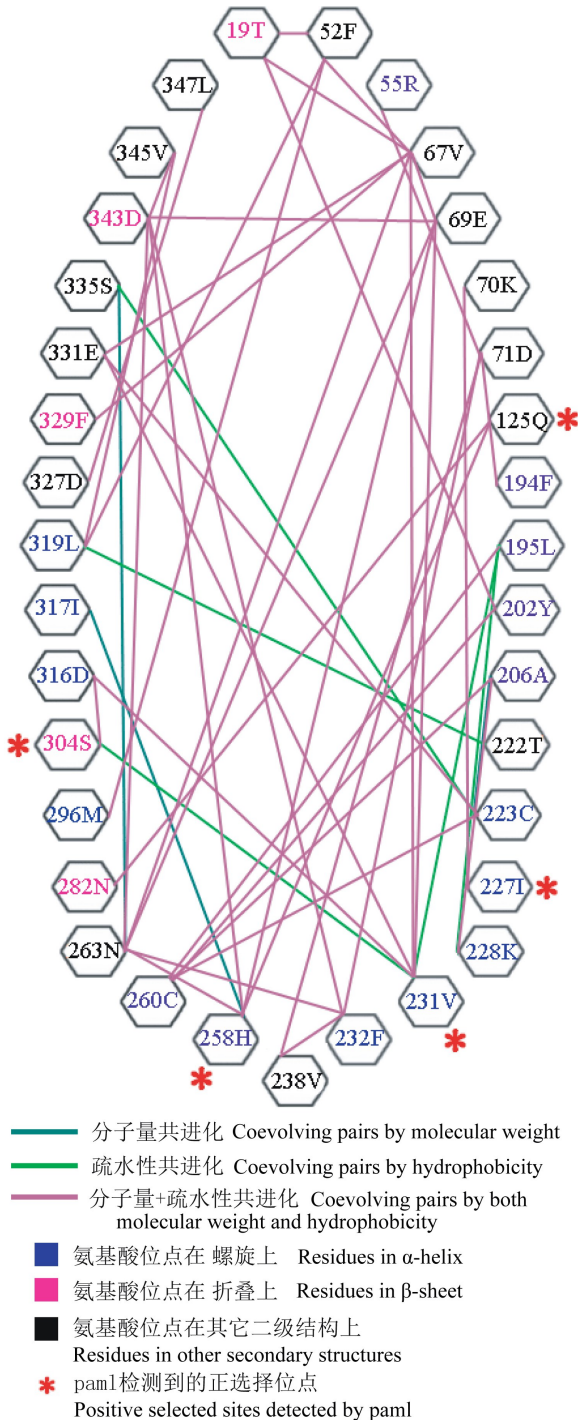


图3 氨基酸位点共进化网络图

Fig. 3 Coevolutionary network of amino acid sites

比值( $\omega_1$ 、 $\omega_2$ 和 $\omega_3$ )及其所占比例( $p_0$ 、 $p_1$ 和 $p_2$ )。M7模型允许 $\omega$ 值在0到1之间,符合beta分布( $p, q$ )。M8(beta和 $\omega$ )模型允许 $\omega$ 值大于1,其数值和比例可由数据计算获得,这样,M8在M7基础上新增了

一类位点。与M8模型类似,M8a(beta和 $\omega=1$ )模型设定 $\omega$ 值固定为1。在此设定基础上对模型进行成对比较(M1a-M2a、M7-M8和M8-M8a),根据比较的结果便可判定位点是否发生过正向选择(Nielsen & Yang, 1998)。以上各种模型的参数利用PAML4软件计算获得(Yang, 2007)。

同时,用CAPS v1.0 (coevolution analysis using protein sequences)计算Rubisco大亚基内部氨基酸位点之间的共进化关系(Fares, 2006)。CAPS既能计算分子内共进化又能计算分子间共进化,本研究属于分子内共进化。CAPS通过检测氨基酸位点的进化速率相关性来揭示它们之间是否存在共进化关系。计算中设置 $\alpha$ 值为0.001,随机抽样值设置为1 000 000,以此减少假阳性。此外,为了消除系统发育拓扑结构的影响,我们采用CAPS v1.0中的亚程序,通过去掉一些明显具有系统发育关系(后验概率>75%)的分支来鉴定出结构和功能共进化位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 膜蕨科的系统发育和分化时间

膜蕨科植物的系统发育关系如图1,主要聚为两大类群(后验概率值为1.00):类群1包括除膜蕨属之外的膜蕨科大部分属(后验概率值为0.97);类群2主要由膜蕨属、簇生蕨属、细口团扇蕨属、肾膜蕨属组成(后验概率值为1.00),其中肾膜蕨属首先分化出来,这与传统分类学的观点是一致的(张巧艳等, 2006)。

BEAST软件计算结果显示膜蕨科的首次分歧时间发生在三叠纪早期(约233 Ma;图1),瓶蕨属的分歧时间发生在侏罗纪早期(约201 Ma),膜蕨属的分歧时间发生在白垩纪晚期(约83 Ma)。结果与以往的研究基本一致(Pryer et al, 2004)。其次,图1很清晰地反映了不同种生态型之间的亲缘关系,陆生生态型是其它几种生态型演化的基础。

### 2.2 膜蕨科 *rbcL* 基因正选择位点的鉴定和空间位置

利用PAML4软件计算各种模型的参数值(表2,表3)。在95%水平上,模型M2a鉴定出5个氨基酸位点(125I、227L、231A、304S和351L)受到正向选择,而模型M8鉴定出有6个氨基酸位点(125I、227L、231A、258F、304S和351L)受到正向选择。

为了更精确地定位上述6个氨基酸正选择位点的空间位置,采用参考序列(烟草Rubisco大亚基,

登录号为 CAA77361) 作为基准进行比对,结果显示 125I、227L、231A、258F、304S 和 351L 六个正选择位点分别对应于烟草 Rubisco 大亚基的 149Q、251I、255V、282H、328S 和 375L。用 raswin 软件(Roger et al, 1995)将这六个位点标定在 Rubisco 晶体结构图中,其中 125I 位于 Rubisco 大亚基 N 末端的环上,227L 和 231A 位于羧基末端  $\alpha/\beta$  桶结构域的第 3 个  $\alpha$  螺旋上,258F 位于第 4 个  $\alpha$  螺旋上,304S 位于  $\alpha/\beta$  桶中的环 6 上,对维持 Rubisco 功能有重要作用。351S 在  $\alpha/\beta$  桶的第 7 个  $\beta$  折叠上(图 2)。

### 2.3 Rubisco 大亚基内部氨基酸位点之间共进化分析

为了研究 Rubisco 大亚基内部氨基酸位点之间的关系,用 CAPS v1.0 软件进行共进化分析,共鉴定出 39 组(35 个氨基酸)共进化位点(图 3),为确定这些位点在 Rubisco 大亚基内部的分布,同样用 raswin 软件进行标定,结果显示其中位点在  $\alpha$  螺旋上的占 46%,14% 的位点在  $\beta$  折叠上。其中大部分位点间伴随着疏水性共进化、分子量共进化和疏水性兼分子量共进化( $P < 0.01$ )。另外,用 CAPS v1.0 的亚程序,在去掉一些明显具有系统发育关系的分支后,所得结果也是 39 组结构和功能共进化位点。

## 3 讨论

本研究虽然构建系统进化树的目的是为随后计算的需要,但仍能给出一些颇具系统分类意义的信息。首先,从系统树上可以看出,膜蕨科主要分为两大类群:既瓶蕨属和膜蕨属,这与传统分类学是一致的。其次,对于假脉蕨属的分类问题一直存在争论,虽然本研究数据有限,不同属之间种类数量的差异比较大,但我们仍然建议将假脉蕨属归为瓶蕨属这一大类。此外,鉴于膜蕨科植物生态型的多样性,我们对其演化关系进行了初步分析,结果与以往的化石证据一致(Axsmith et al, 2001; Dubuisson et al, 2003),即陆生生态型是其它生态型演化的基础。与此同时,Pryer et al(2004)提出,最近几次的最热事件可能是造成生态型多样性的原因。

Rubisco 的大亚基由 N 和 C 两个结构域组成。N 结构域从 N 末端开始,包括 137 个氨基酸,其中含有 5 股  $\beta$  折叠;C 结构域中含有丰富的  $\alpha$  螺旋,其中以  $\alpha/\beta$  桶状结构域( $\alpha/\beta$  barrel domain)最为重要,包括 8 个  $\alpha$  螺旋和 8 个  $\beta$  折叠,彼此连接成 8 个环,

形成了漏滴状的活性中心,由两个大亚基参与组成,  $Mg^{2+}$  也参与其中(Knight et al, 1990; Sopert et al, 1988; Wan et al, 2011)。本研究鉴定出的 6 个正向选择位点中,227L 和 231A 位于  $\alpha/\beta$  桶结构域的第 3 个  $\alpha$  螺旋上,258F 位于第 4 个  $\alpha$  螺旋上,351S 在  $\alpha/\beta$  桶的第 7 个  $\beta$  折叠上。其中,位点 231A 侧链由一个甲基构成,相对较短,由此可以预留出更为宽阔的空间,便于进行催化反应(Persson et al, 2001)。另外, $\alpha/\beta$  桶结构域上的环 6 对 Rubisco 维持活性状态非常关键(Chen & Spreitzer, 1989)。而本研究鉴定出的位点 304S 就位于环 6 上。至于位点 125I,它并不位于酶活性中心区域,推测是在亚基间相互作用时起作用。这些被鉴定出的正向选择位点可为后续的基因工程实验提供参考,推进 Rubisco 催化机制研究的进程(森林等,2010)。

为进一步加深对 Rubisco 大亚基的了解,我们研究了 Rubisco 大亚基内部氨基酸位点间的共进化关系,结果显示疏水性、分子量和疏水性兼分子量共进化位点皆为 39 组,这可能与 *rbcL* 基因高度保守有关。为排除系统发育拓扑结构的影响,在去掉一些明显具有系统发育关系的分支后,得到的结果也是 39 组共进化位点,进一步证明 *rbcL* 基因的高度保守性。另外,Rubisco 活性中心的 3 个赖氨酸残基(Lys175、Lys201 和 Lys334)高度保守且与 Rubisco 活性状态密切相关(熊晓然等,2003)。本研究的共进化位点中没有这 3 个氨基酸,且在这 3 个位点 8Å 范围内并无发现任何其它氨基酸,说明在 Rubisco 大亚基空间结构中并没有其它氨基酸与这 3 个氨基酸相互作用,再次证明了这 3 个位点的高度保守性,不受其它氨基酸的影响,对维持 Rubisco 功能的正常工作起到重要作用。同时,我们发现用 paml 检测出的 6 个正选择位点,除位点 351L 外都存在共进化氨基酸位点。另外,这些与正选择位点存在共进化关系的氨基酸位点很少在  $\alpha/\beta$  桶上,即不在活性中心,这可能是为了更好地维护 Rubisco 的功能而减少正选择位点带来的影响。与其它正选择位点相比,与 125I 共进化的位点只有 3 个,351L 在 Rubisco 大亚基内部没有检测出共进化氨基酸位点,且这两个氨基酸分别位于 Rubisco 大亚基结构的 C 端和 N 端。我们推测与这两个正选择位点共进化的氨基酸可能位于 Rubisco 小亚基上,这需要计算分子间共进化来证明(Rubisco 大、小亚基之间的共进化),这是我们下一步研究的方向。

## 参考文献:

- AXSMITH BJ, KRINGS M, TAYLOR TN, 2001. A filmy fern from the Upper Triassic of North Carolina (USA) [J]. *Am J Bot*, 88(9): 1558-1567.
- CHEN Z, SPREITZER RJ, 1989. Chloroplast intragenic suppression enhances the low CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of mutant ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase [J]. *J Biol Chem*, 264(6): 3051-3053.
- CURMIPM G, CASCI OD, SWEET RM, et al, 1992. Crystal structure of the unactivated form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tobacco refined at 2.0Å resolution [J]. *J Biol Chem*, 267(24): 16980-16989.
- DRUMMOND AJ, RAMBAUT A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees [J]. *BMC Evol Biol*, 7(2): 214-221.
- DUBUISSON JY, HENNEQUIN S, RAKOTONDRAINIBE F, et al, 2003. Ecological diversity and adaptive tendencies in the tropical fern *Trichomanes* L. (Hymenophyllaceae) with special reference to epiphytic and climbing habits [J]. *Bot J Linn Soc*, 142(142): 41-63.
- FARES M, 2006. [2015-07-13]. CAPS v1.0 <http://bioinf.gen.tcd.ie/~faresm>.
- HONG J, WANG WB, HU DW, 2004. The immunogold localization of rubisco and its activase in chloroplast of barley and maize leaves [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 30(5): 561-568. [洪健, 王卫兵, 蒋德安, 等, 2004. 大麦和玉米叶片叶绿体中 Rubisco 及其活化酶的免疫金标记定位 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 30(5): 561-568.]
- HULSENBECK JP, RONQUIST F, 2001. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogeny [J]. *Bioinformatics*, 17(3): 754-755.
- JIANG DA, WENG XY, LU Q, 2001. Quantitation of Rubisco activase by single radial immunodiffusion [J]. *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci Ed)*, 27(3): 255-258. [蒋德安, 翁晓燕, 陆庆, 2001. Rubisco 活化酶免疫单扩散定量分析研究 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 27(3): 255-258.]
- KNIGHT S, ANDERSSON I, BRANDEN CI, 1990. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4Å resolution Subunit interactions and active site [J]. *J Mol Biol*, 215(23): 113-160.
- NIELSEN R, YANG Z, 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene [J]. *Genetics*, 148(3): 929-936.
- PERSSON E, BAK H, OLSEN O, 2001. Substitution of valine for leucine 305 in factor VIIa increases the intrinsic enzymatic activity [J]. *J Biol Chem*, 276(31): 29195-29199.
- POS ADAD, CRANDALL KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 14(9): 817-818.
- PRYER KM, SCHUETTPELZ E, WOLF PG, et al, 2004. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences [J]. *Am J Bot*, 91(10): 1582-1598.
- QIN RC, 1978. Fern families and genera in China: their system of arrangement and history origin [J]. *J Syst Evol*, 3(4): 16-37. [秦仁昌, 1978. 中国蕨类植物科属系统排列和历史来源 [J]. *植物分类学报*, 3(4): 16-37.]
- RAMBAUT A, DRUMMOND J, 2008. [2015-06-15]. Tracer v1.4.1 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- RAMBAUT A, DRUMMOND J, 2009. [2015-06-27]. FigTree v1.2.3 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- ROGER A, SAYLE E, JAMES MW. 1995. RASMOL: biomolecular graphics for all [J]. *Trends Biochem Sci*, 20(9): 374-376.
- ROWAN FS, ATHENA DMK, 2006. Is C4 photosynthesis less phenotypically plastic than C3 photosynthesis [J]. *J Exper Bot*, 57(2): 303-317.
- SCHNEIDER H, SCHUETTPELZ E, PRYER KM, et al, 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms [J]. *Nature*, 428(6982): 553-557.
- SEN L, SU YJ, ZHANG B, et al, 2010. Adaptive evolution of the *rbcl* gene in pteridaceous ferns [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 18(1): 1-8. [森林, 苏应娟, 张冰, 等, 2010. 凤尾蕨科植物 *rbcl* 基因的适应性进化分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 18(1): 1-8.]
- SOPERT S, MURALR J, LARIMER FW, et al, 1988. Essentiality of Lys-329 of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* as demonstrated by site 2-directed mutagenesis [J]. *Protein Eng*, 2(1): 39-44.
- SPREITZER RJ, SALVUCCIM E, 2002. Rubisco: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 53(1): 449-475.
- THOMPSON JD, HIGGINS D G, GIBSON TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weightmatrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 22(22): 4673-4680.
- WAN D, WANG A, ZHANG X, et al, 2011. Gene duplication and adaptive evolution of the CHS-like genes within the genus *Rheum* (Polygonaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 39(1): 651-659.
- XIONG XR, CHEN WM, FENG SY, et al, 2003. Simulation on botanic rubisco active center [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 19(4): 493-498. [熊晓然, 陈蔚梅, 冯胜彦, 等, 植物 Rubisco 活性中心的模拟分析 [J]. *中国生物化学与分子生物报*, 19(4): 493-498.]
- YANG Z, 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. *Mol Biol Evol*, 24(8): 1586-1591.
- ZHANG JH, YNAG HJ, LIN MQ, et al, 2002. Localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaves of two clones of *Hevea brasiliensis* by immunofluorescence method [J]. *J Fujian Agr For Univ (Nat Sci Ed)*, 31(2): 234-237. [张江洪, 杨汉金, 林梅馨, 等, 2002. 巴西橡胶两品系叶片 RuBP 羧化酶的免疫荧光定位 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 31(2): 234-237.]
- ZHANG QY, SU LJ, LIU XR, et al, 2006. Advances in the systematic studies of the Hymenophyllaceae [J]. *Biotechnol Bull*, 8(1): 63-66. [张巧艳, 苏立娟, 刘晓瑞, 等, 2006. 膜蕨科系统学研究进展 [J]. *生物技术通报*, 8(1): 63-66.]