•研究报告•

全基因组复制事件的绝对定年揭示莲座蕨属植物的迟滞演化

王婷^{1,2,3}, 夏增强^{1,2,4}, 舒江平^{1,2,5}, 张娇^{1,2,5}, 王美娜^{1,2}, 陈建兵^{1,2}, 王慷林^{1,2}, 王建英^{1,2*}, 严岳鸿^{1,2*}

1. 深圳市兰科植物保护研究中心, 广东深圳 518114; 2. 兰科植物保护与利用国家林业和草原局重点实验室, 广东深圳 518114; 3. 西南林业大学生物多样性保护学院, 昆明 650224; 4. 中国科学院分子植物科学卓越创新中心/上海植物生理生态研究所, 上海 200032; 5. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 6. 西南林业大学绿色发展研究院, 昆明 650224; 7. 西南林业大学云南生物多样性研究院, 昆明 650224

摘要: 全基因组复制在维管植物的物种形成过程中普遍存在, 被认为是物种适应极端环境的重要机制之一。确定全基因组复制事件的发生时间对理解生物的适应性演化具有重要意义。然而, 在维管植物, 特别是蕨类植物中, 全基因组复制事件的发生时间及其演化意义仍知之甚少。本研究以蕨类植物重要基部类群——福建莲座蕨(*Angiopteris fokiensis*)为例, 基于不同采样点(广东、广西、上海)的3个转录组学数据, 利用同义替换率(Ks)和绝对定年的方法分析全基因组复制事件的发生时间和物种单位时间内的分子演化速率, 并对事件发生后保留下的基因进行基因功能注释和富集分析。结果表明, 福建莲座蕨在159–165 Mya发生了一次全基因组复制事件, 该复制事件优先保留的基因主要与营养代谢、信号传导、适应调节和组织结构生长相关。另外, 福建莲座蕨的分子演化速率为 1.66×10^{-9} (同义替换/位点/年), 是除裸子植物外, 陆生植物中已知演化速率最缓慢的类群。综合以上研究结果, 我们推测福建莲座蕨全基因组复制的发生可能与裸子植物繁盛、核心被子植物集中兴起或托阿尔阶灭绝事件有关。而复制后显著保留基因可能促进了莲座蕨属(*Angiopteris*)植物的遗传和形态创新, 从而帮助其快速适应环境的剧烈变化。进一步对该类群植物演化速率缓慢的原因进行讨论, 推测莲座蕨属缓慢的演化速率可能与其本身世代周期长、基因组较大及其生长环境稳定有关。本研究通过分析福建莲座蕨的全基因组复制历史和复制基因的保留模式, 推测全基因组复制事件对促进演化速率较慢的植物适应极端环境变化具有重要意义, 可为理解其他陆生植物的适应性演化提供更多启发。

关键词: 多倍化; 适应性演化; 演化速率; 蕨类植物; 转录组学

王婷, 夏增强, 舒江平, 张娇, 王美娜, 陈建兵, 王慷林, 王建英, 严岳鸿 (2021) 全基因组复制事件的绝对定年揭示莲座蕨属植物的迟滞演化. 生物多样性, 29, 722–734. doi: 10.17520/biods.2020484.

Wang T, Xia ZQ, Shu JP, Zhang J, Wang MN, Chen JB, Wang KL, Xiang JY, Yan YH (2021) Dating whole-genome duplication reveals the evolutionary retardation of *Angiopteris*. Biodiversity Science, 29, 722–734. doi: 10.17520/biods.2020484.

Dating whole-genome duplication reveals the evolutionary retardation of *Angiopteris*

Ting Wang^{1,2,3}, Zengqiang Xia^{1,2,4}, Jiangping Shu^{1,2,5}, Jiao Zhang^{1,2,5}, Meina Wang^{1,2}, Jianbing Chen^{1,2}, Kanglin Wang^{1,2}, Jianying Xiang^{1,2*}, Yuehong Yan^{1,2*}

1 The Orchid Conservation and Research Centre of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518114

2 Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Orchid Conservation and Utilization, Shenzhen, Guangdong 518114

3 College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224

4 CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences/Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032

5 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650

6 Green Development Institute, Southwest Forestry University, Kunming 650224

7 Yunnan Academy of Biodiversity, Southwest Forestry University, Kunming 650224

收稿日期: 2020-12-29; 接受日期: 2021-04-14

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515010920)和云南省教育厅科学研究基金(2021Y273)

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: yan.yh@126.com; jy_xiang@hotmail.com

ABSTRACT

Aim: Whole-genome duplication (WGD) plays a positive role in speciation in vascular plants and is considered to be an important mechanism for species adaptation to the extreme environments. Dating whole-genome duplication events in different species is essential for understanding the adaptive evolution of organisms. However, the role that these mechanisms play in vascular plants, especially ferns, is still poorly understood.

Method: Based on the synonymous substitution rates (Ks) and absolute dating of the WGD event, this study used three different transcriptome sequences of *Angiopteris fokiensis* to analyze the contribution of polyploidy to the evolution of plants, and the silent substitution rate. Gene annotation and functional enrichment were carried out to elucidate the biological processes, molecular function, and cellular component for the genes retained after the WGD.

Results: We found that there was at least one WGD event in *A. fokiensis* at 159–165 Mya, and most duplicated genes were often related to nutrient metabolism, signal transduction, adaptive regulation and anatomical structure development. The silent substitution rate of *A. fokiensis* is 1.66×10^{-9} synonymous substitutions per site per year. Based on the above results, we speculate that the WGD event was associated with gymnosperms flourishing and the emergence of core angiosperms, or the Toarcian extinction event. The retention of particular genes after the WGD may have promoted genetic and morphological innovation in *Angiopteris*, thus helping it adapt to the drastic changes in environmental conditions. At present, *A. fokiensis* is the slowest evolving group of land plants except gymnosperms, which may relate to the long generation time, large genome and stable living habitat.

Conclusion: In this study, we analyzed the whole-genome duplication history and the patterns of retention of duplicated genes in *A. fokiensis*, suggesting that WGD events are of great influence in promoting the adaptation to extreme environmental changes of plants with slower evolutionary rates. These results provide more inspiration for understanding the adaptive evolution of other land plants.

Key words: polyploidization; adaptive evolution; evolution rate; ferns; transcriptome

全基因组复制(whole-genome duplication, WGD) 又称多倍化(polyploidization), 是促进维管植物物种形成、多样性和环境适应的关键机制(Wu et al, 2020; van de Peer et al, 2021), 在重要的地质历史时期中频繁发生(Fawcett et al, 2009; Vanneste et al, 2014; Cai et al, 2019; Zhang et al, 2019)。全基因组复制使得物种基因组内的所有基因都发生加倍, 为生物演化提供了更多可供选择的遗传原材料, 被认为是物种演化过程中的“加速器”(Yu et al, 2017)。例如, 水蕨(*Ceratopteris thalictroides*)在始新纪极热时期(Paleocene Eocene Thermal Maximum, PETM)发生了一次全基因组复制事件, 该事件发生后基因组优先保留与热适应和盐胁迫相关的复制基因, 可能与现存水蕨生长在泛热带的水生环境有关(Zhang et al, 2019); 另外, 作者根据全基因组复制的绝对定年, 推断水蕨同义替换位点的替换速率为 11.04×10^{-9} (同义替换/位点/年)。由此可知, 水蕨是目前蕨类植物中已知演化速率较快的类群之一。该研究结果也证实了多倍化的发生能够加快物种的演化速率(Yu et al, 2019), 帮助物种在更短的时间内累积更多有利的变异, 快速适应极端环境的变化。因此, 了解不同类群发生全基因组复制事件的情况和时间有助于我们了解不同生物对环境的适应机制和演化

特点。

基因组的演化速率对生物有机体的演化具有深远的影响(Yu et al, 2019)。然而, 因受自然选择(生物与非生物变量)、世代时间、代谢速率、群体大小、突变速率等因素的综合影响, 不同的生物体具有不同的演化速率(Gaut et al, 2011)。目前关于生物的演化速率研究主要集中在动物、有花植物和裸子植物上, 例如De La Torre等(2017)通过计算裸子植物和被子植物直系同源基因上的31,968个核苷酸位点, 发现裸子植物的分子演化速率(7.71×10^{-10} 同义替换/位点/年)比被子植物的分子演化速率(5.35×10^{-9} 同义替换/位点/年)低7倍, 证实了裸子植物是世界上最演化最为缓慢的类群; 而作为维管植物第二大类群的蕨类植物, 其各类群的演化速率却罕见报道。Soltis等(2002)通过以不同植物的分化时间为校准点估算陆地植物的分子演化模型发现, 蕨类植物中的合囊蕨属(*Marattia*)、莲座蕨属(*Angiopteris*)和树蕨(tree fern)的估算年龄远比其实际的化石年龄要年轻得多, 推测这3个类群的植物其分子演化速率经历了戏剧性的减速, 并将它们美誉为“分子活化石”。但实际上, 莲座蕨属植物的分子速率究竟如何? 是否为真正意义上的活化石却一直没能得到很好的证实。

莲座蕨属隶属于厚囊蕨类(eusporangiate ferns) 莲座蕨目合囊蕨科, 是蕨类植物基部类群的重要代表。现存的莲座蕨目是由已灭绝的Psaroniaceae和现存的合囊蕨科组成。其中, Psaroniaceae为非常高大的树状蕨类, 高可达10 m; 其化石记录从石炭纪一直延续分布到白垩纪早期(Rothwell et al, 2018)。而现存的合囊蕨科植物均为低矮的草本植物, 其祖先类群(*Marattiopsis crenulatus*、*Marattia anglica*和*Angiopteris blackii*)在三叠纪瑞典植物群和中侏罗纪约克郡(Yorkshire)植物群就已存在(Lundblad, 1950; Harris, 1961; Hill, 1987)。Lehtonen等(2020)基于简约法的全证据(parsimony-based total-evidence)测年方法对合囊蕨目进行定年, 发现该类群最早可追溯到古生代石炭纪(307–320 Mya)时期, 并在晚三叠纪–早侏罗纪时期分化出了莲座蕨属植物; 该研究成果与目前已发现的化石记录较为吻合(Lundblad, 1950; Harris, 1961; Hill, 1987; Rothwell et al, 2018)。另外, 据Clark等(2016)统计, 现存的合囊蕨科植物都有较高的染色体数目, 其中莲座蕨属植物的平均染色体数目达到了40条, 是被子植物平均染色体数目(15.99条)的2.5倍(Klekowski & Baker, 1966)。这暗示着在现存莲座蕨属植物的演化过程中, 多倍化可能扮演着重要的角色(Barker et al, 2009)。

全基因组复制在生物有机体形成的过程中普遍存在, 了解不同物种发生全基因组复制事件的情况和时间有助于我们更好地理解生物有机体的演化过程。然而, 在维管植物特别是蕨类植物中, 全基因组复制事件的发生时间及其演化意义仍知之甚少。本文拟以蕨类植物基部的重要类群——莲座蕨属为研究对象, 选取福建莲座蕨(*Angiopteris fokiensis*)为代表物种, 通过分析该类群植物的全基因组复制历史和复制基因的保留模式, 推测全基因组复制事件对演化速率慢的植物适应极端环境变化的重要意义, 为理解其他生物有机体的适应性演化提供更多的启示。

1 材料与方法

1.1 数据收集

从NCBI官网(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的SRA数据库中下载得到福建莲座蕨、披散木贼(*Equisetum diffusum*)、桂皮紫萁(*Osmundastrum cinnamomeum*)、紫萁(*Osmunda japonica*)、细叶双扇

蕨(*Dipteris lobbiana*)、芒萁(*Dicranopteris pedata*)和假芒萁(*Sticherus truncatus*) 7个物种9个样品的地上组织转录组数据(You et al, 2017; Shen et al, 2018; Wolf et al, 2018; Huang et al, 2020)。

1.2 序列组装和BUSCO评估

将下载的原始数据(raw data)运用Trimmomatic软件(Bolger et al, 2014)进行过滤, 得到高质量的有效数据(clean data); 利用Trinity v2.4.0 (Grabherr et al, 2011)进行*de novo*组装。采用Cd-hit v4.6.2 (Li & Godzik, 2006)进行序列去冗余, 最终得到unigene序列。进一步利用BUSCO软件(Simão et al, 2015)基于真叶植物(viridiplantae_odb10)数据库对拼接完的序列进行完整性评估。

1.3 编码蛋白序列的预测

使用Transdecoder v5.0.1软件(<http://transdecoder.sourceforge.net/>)对unigene进行开放阅读框(ORF)搜索, 从中提取最长的读码框序列。采用BLASTP和hmmscan软件将unigene序列分别与SwissProt和Pfam数据库中已知的蛋白序列进行比对。最后整合BLASTP和hmmscan的搜索结果, 利用Transdecoder.Predict将比对上的序列进行编码序列的预测。

1.4 全基因组复制事件分析

利用同义替换率(Ks)法计算物种是否发生全基因组复制事件。首先对物种的蛋白质序列进行all-against-all BLAST, 以 e^{-5} 为阈值筛选基因家族中的旁系同源对, 使用mclblastline pipeline构建基因家族(Enright et al, 2002), 然后利用MUSCLE对每个基因家族进行比对(Edgar, 2004)。最后在PAML包中的codml程序进行同义替换率计算(Goldman & Yang, 1994; Yang, 2007)。

为了避免近期发生的片段复制和同义替换饱和和效应的影响(Blanc & Wolfe, 2004; Schlueter et al, 2004; Cui et al, 2006), 本研究将Ks值的范围限定在[0.1, 5]的区间内。为了避免峰的假阳性, 我们利用R软件的mclust程序包对数据进行高斯混合模型曲线的拟合(Fraley & Raftery, 2003), 找到明显存在且占比达到20%的Ks峰值。

1.5 绝对定年

1.5.1 Orthogroup的构建

以福建莲座蕨中序列完整性较高的样本SRR6920615为代表, 根据Ks分布图收集峰值附近

($0.40 < K_s < 0.70$)的旁系同源对;若同个基因家族有多对旁系同源对,则去除冗余序列,保留最接近加倍峰值的旁系同源对。运用BLASTP软件将每对旁系同源对分别与6个外类群(披散木贼、桂皮紫萁、紫萁、细叶双扇蕨、芒萁、假芒萁)的蛋白质序列进行比对,最终每个外类群只保留一个比对分值最高的序列作为直系同源。即一个Orthogroup由1对旁系同源序列和6个直系同源序列构成。进一步利用Mafft软件(Katoh et al, 2002)对每个Orthogroup进行矩阵对齐,参考Vandepoele等(2004)的方法对序列进行修整,最终保留序列长度超过100 bp的Orthogroup。

1.5.2 定年时间的计算

本研究主要参考Vanneste等(2014)的方法,具体过程如下:运用BEAST v2.6.3软件(Bouckaert et al, 2014)中的贝叶斯MCMC (Bayesian Markov chain Monte Carlo)法对每个Orthogroup中的旁系同源对节点进行绝对定年(图1),以此推断全基因组复制发生的时间。相关参数设置如下:以宽松分子钟模型和JTT + G演化模型为标准;以Shen等(2008)和Qi等(2018)报道的蕨类系统发育拓扑结构为参考;以紫萁类(osmundaceous ferns) (= 299.0 Mya)、紫萁属

(*Osmunda*) (≥ 199.6 Mya)和里白科(≥ 99.6 Mya) 3个化石作为(桂皮紫萁, 紫萁)、(芒萁, 假芒萁)和((桂皮紫萁, 紫萁), ((芒萁, 假芒萁), 细叶双扇蕨))分歧时间的校正(Schuettpeitz & Pryer, 2009);树根部的时间以披散木贼分化时间325 Mya (Shen et al, 2018)作为二次校正点(图1);MCMC以10,000,000代进行运算,每1,000代抽样1次,总共10,000个样本。运行结束后利用Tracer v1.5软件对结果进行评估,保留有效样本大小(effective sample size, ESS) > 200,即结果已收敛的Orthogroup。

收集所有符合标准的Orthogroup,利用R软件mclust程序包对旁系同源对节点的发生时间进行高斯混合模型曲线的拟合,找到最高的分布密度,以此估算整个全基因组复制绝对年龄的分布。

1.6 基因功能富集

全基因组复制保留下来的基因常常会发生新功能化或亚功能化,而且这些基因往往与一些转录因子、结构蛋白相关(Zhang et al, 2020b)。全基因组复制后特定基因的保留能增加物种对环境的适应性。为了探究全基因组复制事件对福建莲座蕨生存和演化的影响,我们对加倍保留下来的基因进行功能注释和富集。首先,根据Ks分布图收集峰值附近

图1 某个Orthogroup的拓扑结构及化石校正点的位置

Fig. 1 Representation of the structure of an orthogroup and the location of the fossil

($0.40 < K_s < 0.7$)的基因, 基于NCBI非冗余蛋白质(NR)数据库以阈值 e^{-5} 进行BLAST比对注释, 最后利用Blast2GO软件(Conesa et al, 2005)对注释到的基因进行GO富集分析。

2 结果

2.1 序列组装和完整性评估

本研究共获得38.31 Gb的原始数据, Trinity软件拼接后共获得584,067个转录本; 其N50平均值为1,758 bp, GC (鸟嘌呤/胞嘧啶)含量平均为45.25%。利用Transdecoder软件对unigene进行ORF和序列结

构预测后, 平均每个物种可预测到43,581条编码序列(coding sequence, CDS) (表1)。使用BUSCO软件进行序列完整性评估, 结果显示数据完整性均高于78%, 说明本次研究利用的数据序列完整性较高, 可为我们后续分析提供足够的信息量。

2.2 全基因组复制检测

对福建莲座蕨3个样本预测的蛋白质序列分别进行Ks计算, 获得物种Ks频数分布图(图2), 并运用混合模型对其Ks值进行数据拟合(表2)。结果显示, 3个样本在0.55附近均有一个显著的Ks峰, 推测福建莲座蕨在该节点发生了一次全基因组复制事件。

表1 序列组装情况统计

Table 1 Summary of *de novo* assembly for transcriptome

物种 Species	NCBI登录号 NCBI no.	转录本 Transcript	N50 (bp)	鸟嘌呤/胞嘧啶 GC (%)	编码序列数 No. of coding sequence	BUSCO 文献 (%) References
福建莲座蕨 <i>Angiopteris fokiensis</i>	SRR2103714	46,702	1,720	44.95	34,286	89.6 Shen et al, 2018
福建莲座蕨 <i>Angiopteris fokiensis</i>	SRR5499396	62,608	2,021	44.29	39,010	95.1 You et al, 2017
福建莲座蕨 <i>Angiopteris fokiensis</i>	SRR6920615	62,119	2,021	44.29	39,043	95.4 Huang et al, 2020
披散木贼 <i>Equisetum diffusum</i>	SRR2103706	55,430	1,537	44.93	39,399	91.4 Shen et al, 2018
桂皮紫萁 <i>Osmundastrum cinnamomeum</i>	SRR6727971	28,229	1,922	46.43	22,868	84.4 Wolf et al, 2018
紫萁 <i>Osmunda japonica</i>	SRR2103721	42,649	2,005	46.22	31,414	92.8 Huang et al, 2020
细叶双扇蕨 <i>Dipteris lobbiana</i>	SRR6920640	148,711	1,085	46.09	94,834	78.4 Huang et al, 2020
芒萁 <i>Dicranopteris pedata</i>	SRR5490811	62,818	1,954	45.78	40,874	97.5 You et al, 2017
假芒萁 <i>Sticherus truncatus</i>	SRR6920643	74,801	1,557	44.30	50,507	88.2 Huang et al, 2020

表2 基于混合模型拟合3个福建莲座蕨样本的同义替换率(Ks)结果(加粗表示峰值显著)

Table 2 Synonymous substitution rate (Ks) results of three *Angiopteris fokiensis* based on mixture modeling (Bold indicates a significant peaks)

样本 Sample	采集地 Collection sites	加倍数目 No. of duplicates	组件数目 No. of components	贝叶斯信息标准 Bayesian information criterion	中值 Median (Ks)	方差 Variance	比例 Proportion
福建莲座蕨 <i>Angiopteris fokiensis</i> SRR2103714	上海 Shanghai	3,667	6	-6,824.9400	0.1310	0.0005	0.0763
		3,667	6	-6,824.9400	0.2147	0.0029	0.0577
		3,667	6	-6,824.9400	0.5814	0.0200	0.2697
		3,667	6	-6,824.9400	0.9172	0.0312	0.2529
		3,667	6	-6,824.9400	1.3513	0.1683	0.2040
		3,667	6	-6,824.9400	3.0112	0.8830	0.1393
福建莲座蕨 <i>Angiopteris fokiensis</i> SRR5499396	广东 Guangdong	4,238	7	-7,662.1730	0.1241	0.0003	0.0680
		4,238	7	-7,662.1730	0.2002	0.0023	0.0921
		4,238	7	-7,662.1730	0.5856	0.0191	0.2940
		4,238	7	-7,662.1730	0.9331	0.0198	0.1781
		4,238	7	-7,662.1730	1.1911	0.1116	0.1935
		4,238	7	-7,662.1730	2.3596	0.4994	0.1330
福建莲座蕨 <i>Angiopteris fokiensis</i> SRR6920615	广西 Guangxi	4,235	6	-7,662.1730	4.1443	0.2343	0.0412
		4,235	6	-7,662.1730	0.1259	0.0003	0.0753
		4,235	6	-7,662.1730	0.1996	0.0022	0.0834
		4,235	6	-7,662.1730	0.5489	0.0148	0.2082
		4,235	6	-7,662.1730	0.8841	0.0452	0.3284
		4,235	6	-7,662.1730	1.3642	0.1874	0.1606
		4,235	6	-7,662.1730	2.9677	0.9873	0.1441

图2 3个福建莲座蕨样本的同义替换率(Ks)分布图

Fig. 2 Synonymous substitution rate (Ks) frequency distribution of three samples of *Angiopteris fokiensis*

图3 基于峰值附近的重复基因估算福建莲座蕨发生全基因组复制的时间分布

Fig. 3 Absolute age distributions for the peak-based duplicates of *Angiopteris fokiensis*

2.3 全基因组复制发生时间的推断

以序列完整性较高的SRR6920615样本为对象,在Ks峰值附近共筛选到837对旁系同源对,经过BLAST寻找外类群的直系同源基因、Mafft多序列比对以及序列gap剪切筛选后,共获得724个符合标准的Orthogroup。利用BEAST软件对每一个Orthogroup进行绝对定年后,最终保留226个ESS值> 200的Orthogroup用于全基因组复制发生时间的推断。

运用混合模型对226个旁系同源对节点发生时间进行数据拟合发现,在162.3 Mya (95%置信区间: 159–165 Mya)处有一个清晰的峰值(图3),推测福建莲座蕨在这个时间上发生了全基因组复制事件。根据公式 $T = Ks/2r$ 可知该物种的演化速率为 1.66×10^{-9} (同义替换/位点/年)。

2.4 复制基因的功能注释

为探讨全基因组复制保留复制基因的潜在价值,本研究对峰值附近($0.40 < Ks < 0.7$)的基因进行功能注释和GO富集分析。结果显示总共有118个GO term被显著富集,其中与生物学过程(biological

process, BP)相关的基因主要集中在营养代谢(氮化合物代谢、糖代谢、脂类代谢、氨基酸代谢等)、生物调节(信号传导)、非生物应激反应和组织结构生长上;与分子功能(molecular function, MF)相关的有离子结合、激酶活性、跨膜运输、氧化还原等;与细胞成分(cellular component, CC)相关的有细胞质、细胞核、质体等(图4)。

3 讨论

3.1 基于Ks推断福建莲座蕨的全基因组复制事件

检测全基因组复制事件的方法有3种: 共线性、同义替换率(Ks)法和系统基因组学。其中最常见的是基于转录组学根据Ks值的分布来推断全基因组复制的发生(Vanneste et al, 2014; 汪浩等, 2019; Zhang et al, 2019, 2020a)。由于转录组数据具有时空表达性,且只覆盖被积极转录的基因(Matasci et al, 2014),因此转录组数据的取样和测序质量将影响到全基因组复制事件的推断(Zhang et al, 2019)。为了降低转录组数据质量对福建莲座蕨全基因组复制事件推断的影响,本研究收集了该物种3个不同地点且序列完整性高于89%的数据进行Ks计算。经过3个样本的重复计算比较,我们发现在0.55附近均有一个明显的Ks峰,以此确定福建莲座蕨经历了一次全基因组复制事件的结果较为准确。即使Ks分布图(图2)和混合模型数据拟合的结果(表1)显示有6–7个拟合峰的存在,但考虑到边界演化模型在Ks峰值估计中会受到随机效应和饱和性的影响而出现误导混合模型的情况(Li et al, 2019),本研究只考虑< 2且峰值最明显的Ks作为全基因组复制的推断。

3.2 全基因组复制可能促进了福建莲座蕨的适应性演化

区别于一开始认为的演化死胡同(Otto & Whitton, 2000; Mayrose et al, 2011),全基因组复制事件已被证实在生物有机体中普遍存在(Jiao et al, 2012; Vanneste et al, 2015; 汪浩等, 2019; Zhang et al, 2020b)。目前,蕨类植物系统中已发现了19次全基因组复制事件(Huang et al, 2020),是陆生维管植物多倍化发生最为频繁的类群之一。经过绝对定年,福建莲座蕨在159–165 Mya发生了全基因组复制事件,我们推测可能存在以下2种情形:

第一种是由于裸子植物繁盛、核心被子植物集中兴起(159–164 Mya) (Li et al, 2019; Mandel, 2019)

图5 蕨类植物和裸子植物不同地质年代的化石物种数(Niklas et al, 1983; Katz, 2018) (A)及蕨类植物、被子植物起源和物种灭绝速率的时间线(Lehtonen et al, 2017, 2020; Clapham & Renne, 2019; Li et al, 2019) (B)

引发了福建莲座蕨的多倍化(图5)。从石炭纪到二叠纪, 蕨类植物化石在地质历史记录中呈现出显著的多样性水平(Collinson, 1996; Rothwell, 1996; Skog, 2001), 证实了蕨类植物在该时期居于陆地生态系统的主导地位。然而, 随着种子植物的兴起和繁荣, 蕨类植物的物种多样性开始下降(Lidgard & Crane, 1990; Nagalingum et al, 2002), 即使后来的研究表明, 被子植物的崛起为水龙骨科植物提供了更多的生态位, 促进了现代蕨类植物的多样化(Schneider et al, 2004), 但从蕨类植物化石数量的分布(图5A)来看, 种子植物的繁荣确实影响了当时蕨类植物的生存空间。对于在二叠纪兴盛的合囊蕨目(Hu et al, 2006)来说, 裸子植物的繁盛使得原本生长在季节性干旱区域的合囊蕨目植物(DiMichele et al, 2002)逐渐减少。其中, 树蕨Psaroniaceae可能因其假茎型的树干(Morgan, 1959)无法匹敌裸子植物的生长速度而逐渐被自然淘汰; 而以草本形态生长的莲座蕨属植物可能在此时期通过多倍化为自身提供更多可供选择的遗传原材料, 逐渐适应荫湿栖息地的转变; 证实了植物在应对环境胁迫的时候, 可能通过多倍化来提高物种自身抵抗、容忍损伤和获取资源的能力(van De Peer et al, 2010)。

第二种是福建莲座蕨在托阿尔阶灭绝时期(~183 Mya)就已经发生了多倍化(图5), 但由于其异常缓慢的演化速率(Soltis et al, 2002), 多倍化发生时间的推断稍有提前(159–165 Mya)。因此, 我们推测在托阿尔阶灭绝时期, 由于CO₂浓度上升导致全球性大洋缺氧事件和温度快速上升事件(Zhou et al, 2020)的发生, 是激发福建莲座蕨发生多倍化的重要环境因素。植物支持多倍化是其应对极端环境的一种适应机制(van De Peer et al, 2010)。结合莲座蕨属植物的化石纪录最早可追溯到侏罗纪中期, 我们推测全基因组复制事件的发生也可能是促进福建莲座蕨乃至整个莲座蕨属植物起源的关键性因素。

在对福建莲座蕨经全基因组复制而保留的基因进行注释和GO富集分析后发现, 与营养代谢(氮化合物代谢、糖代谢、脂类代谢、氨基酸代谢等)、信号传导、适应调节相关的生物学过程被显著富集。有研究发现, 在对环境的适应和演化过程中, 植物会逐渐演化形成各种次生代谢途径, 并生产相应的次生代谢产物来缓解环境的胁迫(阎秀峰等, 2007)。例如, 当营养供给不足等环境压力出现时,

植物组织会通过增加游离的氨基酸浓度以调控体内氮的代谢(Zhang et al, 2012), 满足植物正常生长发育的基本元素需求。同时也会增加糖类和脂类代谢, 提高植物生长发育的物质和能量基础, 在一定程度上缓解水分、光照、养分等生存竞争压力给植物带来的不利影响。值得注意的是, 本次GO富集还发现了与组织结构生长相关的重复基因, 由于暂无古老莲座蕨属根状茎形态的化石, 我们推测这可能与福建莲座蕨多倍化后加速形态创新(Chao et al, 2013; Diallo et al, 2016), 形成区别于其他植物的硕大肉质且淀粉和水分含量高的根状茎有关, 因为这可以帮助自身储存更多的物质和能量以适应环境的改变。可见, 全基因组复制事件的发生对促进福建莲座蕨的演化成功与长期生存具有重要作用。

3.3 全基因组复制的绝对定年揭示莲座蕨属植物的迟滞演化

众所周知, 演化速率在整个生命之树当中是千变万化的(Bromham & Penny, 2003; Jansa et al, 2006; Schuettelpelz & Pryer, 2006; Thomas et al, 2006), 即不同物种的演化速率迥然不同(Futuyama, 2016)。了解不同类群的演化速率有助于我们更好地理解不同物种的演化特点。2014年, 瑞典科学家Benjamin Bomfleur等(2014)通过测量与近缘类群绒紫萁(*Osmunda claytoniana*)相似的侏罗纪化石, 发现该化石所包含的染色体数及DNA含量与现存的紫萁科植物相同, 支持了物种“演化停滞”的现象, 同时也强化了基部蕨类植物“活化石”的地位。而比紫萁科植物更为古老的莲座蕨属植物虽也被誉为“分子活化石”(Soltis et al, 2002), 但其真正的演化特点却未见报道。

结合分子钟公式 $r = Ks/2T$ 可知, 福建莲座蕨的分子演化速率为 1.66×10^{-9} (同义替换/位点/年), 是目前除裸子植物外, 植物界已知演化速率最为缓慢的类群, 暗示了该类群植物长时期演化缓慢的现象。这与过去发现莲座蕨属植物的系统发育分支长度比相近其他类群谱系要短得多的结果相一致(Pryer et al, 2004)。众所周知, 莲座蕨属植物的系统分类是蕨类植物分类学的主要难点, 其物种界线长期不清晰, 导致该类群的物种数量可从一个多态性的物种增加到200个定义不清晰的物种(Murdock, 2008b)。许多研究人员(Murdock, 2008a; 和兆荣,

2009; PPG I, 2016; 江秋煜, 2020^①)尝试通过叶绿体片段来解决莲座蕨属的系统分类,但最终均得不到稳定的系统发育结构。我们推测,以上这些情况均与莲座蕨属本身演化速率低而导致物种“迟滞”演化有关。因此,随着测序成本的下降,解决诸如莲座蕨属这类物种界限不清晰、系统发育结构不稳定的物种分类,在增加更多模式产地样本的同时,选用变异位点更多的简化基因组或转录组学数据,构建更加稳健的系统发育树才是最科学的方法。

3.4 莲座蕨属植物“迟滞”演化可能存在的原因

对于演化生物学而言,物种发生快速演化并不难解释,难题在于解释演化为什么如此缓慢(葛颂等, 2016)?就物种本身特性来说,演化速率缓慢可能与其自身世代时间长和基因组较大有关(Korall et al, 2010; Zhong et al, 2014; Bromham et al, 2015; De La Torre et al, 2017)。对于动物或植物来说,生命周期较短的物种单位时间内能够发生更多的基因复制,从而导致更多的突变率(Laird et al, 1969; Wu & Li, 1985)。而生命周期长的物种由于其低的绝对生长率会导致更少的细胞分裂和DNA复制错误,使得单位时间内基因的突变率变低(Lanfear et al, 2014)。目前虽没有直接的研究表明莲座蕨属世代时间长,但从一些间接证据可以看出该类群的世代时间比其他蕨类植物相对要长很多,如莲座蕨属植物从配子体进入孢子体世代的时间是研究蕨类植物配子体发育模式物种(水蕨)时长的8倍以上(Banks, 1999; 陈蔚辉和肖卫彬, 2008)。因此,世代时间长可能是影响该物种演化速率缓慢的一个原因。

Bromham等(2015)在探究有花植物突变率与基因组大小关系时发现,平均基因组较大的类群在核蛋白编码基因中的同义替换率较低。即假如基因组大小的增加与更大的细胞和生长速度的降低有关,那么具有更大基因组的植物在单位时间内可能进行更少的基因组复制,其积累突变的机会就会变少。De La Torre等(2017)在研究裸子植物的演化速率时也得到相似的结果。莲座蕨属植物的平均基因组大小为10.3 Gb (Hanson & Leitch, 2002; Clark et al, 2016),是被子植物平均基因组大小的2倍。若该假设成立,我们推测福建莲座蕨属植物缓慢的演化速

率可能也与本身基因组较大、染色体数目较多的特点相关。

而就自然选择来说,“迟滞”演化可能是物种最适表型的稳定选择(Charlesworth & Smith, 1982)。最著名的例子是在更新世冰期和间冰期的交替期,虽然气候、物种的地理范围及物种间的关联反复发生了剧烈变化,但某一物种的“有效环境”比我们想象的更为稳定。例如,生长分布在寒冷气候区的植物铁杉(*Tsuga canadensis*)在冰期南迁,在间冰期北移,通过主动选择栖息地减轻了环境变化造成的影响(Futuyma, 2016),从而减少更多适应性表型的出现。福建莲座蕨在裸子植物繁盛、核心被子植物集中兴起的条件下发生加倍,为自身提供更多可供选择的遗传原材料,从而逐渐适应由季节性干旱转荫湿的生存环境。而在这种荫蔽且稳定环境的长期庇护下,莲座蕨无需通过频繁的演化变异来适应外部环境的动荡,这可能是导致该类群演化速率缓慢的另一原因。

ORCID

王婷 <https://orcid.org/0000-0002-8622-5459>
夏增强 <https://orcid.org/0000-0002-0014-1466>
舒江平 <https://orcid.org/0000-0001-9714-3064>
张娇 <https://orcid.org/0000-0002-3052-2526>
王美娜 <https://orcid.org/0000-0001-5998-6028>
王慷林 <https://orcid.org/0000-0002-1154-8237>
向建英 <https://orcid.org/0000-0001-8398-7119>
严岳鸿 <https://orcid.org/0000-0001-6768-2833>

参考文献

- Banks JA (1999) Gametophyte development in ferns. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 163–186.
- Barker MS, Vogel H, Schranz ME (2009) Paleopolyploidy in the Brassicales: Analyses of the *Cleome* transcriptome elucidate the history of genome duplications in *Arabidopsis* and other Brassicales. Genome Biology Evolution, 1, 391–399.
- Blanc G, Wolfe KH (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. The Plant Cell, 16, 1667–1678.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30, 2114–2120.
- Bomfleur B, McLoughlin S, Vajda V (2014) Fossilized nuclei and chromosomes reveal 180 million years of genomic stasis in royal ferns. Science, 343, 1376–1377.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D,

① 江秋煜 (2020) “分子活化石”——莲座蕨属植物质体基因组学研究. 硕士学位论文, 中国科学院大学, 北京.

- Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ (2014) BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10, e1003537.
- Bromham L, Hua X, Lanfear R, Cowman PF (2015) Exploring the relationships between mutation rates, life history, genome size, environment, and species richness in flowering plants. *The American Naturalist*, 185, 507–524.
- Bromham L, Penny D (2003) The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics*, 4, 216–224.
- Cai LM, Xi ZX, Amorim AM, Sugumaran M, Rest JS, Liu L, Davis CC (2019) Widespread ancient whole-genome duplications in Malpighiales coincide with Eocene global climatic upheaval. *New Phytologist*, 221, 565–576.
- Chao DY, Dilkes B, Luo HB, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE (2013) Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science*, 341, 658–659.
- Charlesworth B, Smith DB (1982) A computer model of speciation by founder effects. *Genetical Research*, 39, 227–236.
- Chen WH, Xiao WB (2008) On the development of gametophyte and sporophyte of *Ceratopteris thalictroides*. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 34, 306–310, 383. (in Chinese with English abstract) [陈蔚辉, 肖卫彬 (2008) 水蕨配子体和孢子体发育的研究. 湖南农业大学学报(自然科学版), 34, 306–310, 383.]
- Clapham ME, Renne PR (2019) Flood basalts and mass extinctions. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 47, 275–303.
- Clark J, Hidalgo O, Pellicer J, Liu HM, Marquardt J, Robert Y, Christenhusz M, Zhang SZ, Gibby M, Leitch IJ, Schneider H (2016) Genome evolution of ferns: Evidence for relative stasis of genome size across the fern phylogeny. *New Phytologist*, 210, 1072–1082.
- Collinson ME (1996) What use are fossil ferns? – 20 years on: with a review of the fossil history of extant pteridophyte families and genera. In: *Pteridology in Perspective: Proceedings of the Holttum Memorial Pteridophyte Symposium*, Kew, 1995 (eds Camus JM, Gibby M, Johns RJ), pp. 349–394. Whitstable Litho Ltd., Kent.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674–3676.
- Cui LY, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, dePamphilis CW (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, 16, 738–749.
- De La Torre AR, Li Z, van de Peer Y, Ingvarsson PK (2017) Contrasting rates of molecular evolution and patterns of selection among gymnosperms and flowering plants. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 1363–1377.
- Diallo AM, Nielsen LR, Kjaer ED, Petersen KK, Raebild A (2016) Polyploidy can confer superiority to West African *Acacia senegal* (L.) Willd. trees. *Frontiers in Plant Science*, 7, 821.
- DiMichele WA, Phillips TL, Nelson WJ (2002) Place vs. time and vegetational persistence: A comparison of four tropical mires from the Illinois Basin during the height of the Pennsylvanian Ice Age. *International Journal of Coal Geology*, 50, 43–72.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Enright AJ, van Dongen S, Ouzounis CA (2002) An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Research*, 30, 1575–1584.
- Fawcett JA, Maere S, van de Peer Y (2009) Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 5737–5742.
- Fraley C, Raftery AE (2003) Enhanced model-based clustering, density estimation, and discriminant analysis software: MCLUST. *Journal of Classification*, 20, 263–286.
- Futuyma DJ (translated by Ge S, Gu HY, Rao GY, Zhang DX, Yang J, Kong HZ, Wang YF) (2016) *Evolution*. Higher Education Press, Beijing. (in Chinese) [葛颂, 顾红雅, 饶广远, 张德兴, 杨继, 孔宏智, 王宇飞 (译) (2016) 生物进化. 高等教育出版社, 北京.]
- Gaut B, Yang L, Takuno S, Eguiarte LE (2011) The patterns and causes of variation in plant nucleotide substitution rates. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics*, 42, 245–266.
- Goldman N, Yang Z (1994) A *Codon*-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 725–736.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29, 644–652.
- Hanson L, Leitch IJ (2002) DNA amounts for five pteridophyte species fill phylogenetic gaps in C-value data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140, 169–173.
- Harris TM (1961) The Yorkshire Jurassic Flora. I. *Thalophyta-Pteridophyta*. Trustees of the British Museum (Natural History), India.
- He ZR (2009) Systematic Study of Angiopteridaceae from China. PhD dissertation, Yunnan University, Kunming. (in Chinese with English abstract) [和兆荣 (2009) 中国莲座蕨科系统学研究. 博士学位论文, 云南大学, 昆明.]
- Hill CR (1987) Jurassic *Angiopteris* (Marattiales) from North

Yorkshire. Review of Palaeobotany and Palynology, 51, 65–93.

- Hu SS, Dilcher DL, Schneider H, Jarzen DM (2006) Eusporangiate ferns from the Dakota formation, Minnesota, USA. *International Journal of Plant Sciences*, 167, 579–589.
- Huang CH, Qi X, Chen D, Qi J, Ma H (2020) Recurrent genome duplication events likely contributed to both the ancient and recent rise of ferns. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 433–455.
- Jansa SA, Forsman JF, Voss RS (2006) Different patterns of selection on the nuclear genes IRBP and DMP-1 affect the efficiency but not the outcome of phylogeny estimation for didelphid marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 363–380.
- Jiao YN, Leebens-Mack J, Ayyampalayam S, Bowers JE, McKain MR, McNeal J, Rolf M, Ruzicka DR, Wafula E, Wickett NJ, Wu XL, Zhang Y, Wang J, Zhang YT, Carpenter EJ, Deyholos MK, Kutchan TM, Chanderbali AS, Soltis PS, Stevenson DW, McCombie R, Pires JC, Wong GKS, Soltis DE, Depamphilis CW (2012) A genome triplication associated with early diversification of the core eudicots. *Genome Biology*, 13, R3.
- Jiao YN, Li JP, Tang HB, Paterson AH (2014) Integrated syntenic and phylogenomic analyses reveal an ancient genome duplication in monocots. *The Plant Cell*, 26, 2792–2802.
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T (2002) MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 3059–3066.
- Katz O (2018) Extending the scope of Darwin's 'abominable mystery': Integrative approaches to understanding angiosperm origins and species richness. *Annals of Botany*, 121, 1–8.
- Klekowski EJ, Baker HG (1966) Evolutionary significance of polyploidy in the pteridophyta. *Science*, 153, 305–307.
- Korall P, Schuettelpelz E, Pryer KM (2010) Abrupt deceleration of molecular evolution linked to the origin of arborescence in ferns. *Evolution*, 64, 2786–2792.
- Laird CD, McConaughy BL, McCarthy BJ (1969) Rate of fixation of nucleotide substitutions in evolution. *Nature*, 224, 149–154.
- Lanfear R, Kokko H, Eyre-Walker A (2014) Population size and the rate of evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 29, 33–41.
- Lehtonen S, Poczai P, Sablok G, Hyvönen J, Karger DN, Flores J (2020) Exploring the phylogeny of the marattialean ferns. *Cladistics*, 36, 569–593.
- Lehtonen S, Silvestro D, Karger DN, Scotese C, Tuomisto H, Kessler M, Peña C, Wahlberg N, Antonelli A (2017) Environmentally driven extinction and opportunistic origination explain fern diversification patterns. *Scientific Reports*, 7, 4831.
- Li HT, Yi TS, Gao LM, Ma PF, Zhang T, Yang JB, Gitzendanner MA, Fritsch PW, Cai J, Luo Y, Wang H, van der Bank M, Zhang SD, Wang QF, Wang J, Zhang ZR, Fu CN, Yang J, Hollingsworth PM, Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Li DZ (2019) Origin of angiosperms and the puzzle of the Jurassic gap. *Nature Plants*, 5, 461–470.
- Li WZ, Godzik A (2006) Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22, 1658–1659.
- Lidgard S, Crane PR (1990) Angiosperm diversification and Cretaceous floristic trends: A comparison of palynofloras and leaf macrofloras. *Paleobiology*, 16, 77–93.
- Lundblad AB (1950) Studies in the Rhaeto-Liassic Flora of Sweden, 1. Pteridophyta, Pteridospermae and Cycadophyta from the mining district of NW Scania. *Kungl Svenska Vetenskap Handl, Fjärde Ser*, 1, 1–82.
- Mandel JR (2019) A Jurassic leap for flowering plants. *Nature Plants*, 5, 455–456.
- Matasci N, Hung LH, Yan ZX, Carpenter EJ, Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Ayyampalayam S, Barker M, Burleigh JG, Gitzendanner MA, Wafula E, Der JP, DePamphilis CW, Roure B, Philippe H, Ruhfel BR, Miles NW, Graham SW, Mathews S, Surek B, Melkonian M, Soltis DE, Soltis PS, Rothfels C, Pokorny L, Shaw JA, DeGironimo L, Stevenson DW, Villarreal JC, Chen T, Kutchan TM, Rolf M, Baucom RS, Deyholos MK, Samudrala R, Tian ZJ, Wu XL, Sun X, Zhang Y, Wang J, Leebens-Mack J, Wong GKS (2014) Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *GigaScience*, 3, 2047–217X.
- Mayrose I, Zhan SH, Rothfels CJ, Magnuson-Ford K, Barker MS, Rieseberg LH, Otto SP (2011) Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*, 333, 1257.
- Morgan J (1959) The morphology and anatomy of American species of the genus *Psaronius*. *Illinois Biological Monographs*, 27, 1–108.
- Murdock AG (2008a) Phylogeny of marattioid ferns (Marattiaceae): Inferring a root in the absence of a closely related outgroup. *American Journal of Botany*, 95, 626–641.
- Murdock AG (2008b) A taxonomic revision of the eusporangiate fern family Marattiaceae, with description of a new genus *Ptisana*. *Taxon*, 57, 737–755.
- Nagalingum NS, Drinnan AN, Lupia R, McLoughlin S (2002) Fern spore diversity and abundance in Australia during the Cretaceous. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 119, 69–92.
- Niklas KJ, Tiffney BH, Knoll AH (1983) Patterns in vascular land plant diversification. *Nature*, 303, 614–616.
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34, 401–437.
- PPG I (2016) A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of Systematics and Evolution*, 54, 563–603.
- Pryer KM, Schuettelpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR,

- Cranfill R (2004) Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany*, 91, 1582–1598.
- Qi XP, Kuo LY, Guo CC, Li H, Li ZY, Qi J, Wang LB, Hu Y, Xiang JY, Zhang CF, Guo J, Huang CH, Ma H (2018) A well-resolved fern nuclear phylogeny reveals the evolution history of numerous transcription factor families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 961–977.
- Rothwell GW (1996) Phylogenetic relationships of ferns: A palaeobotanical perspective. Royal Botanic Gardens, Kew, 395–404.
- Rothwell GW, Millay MA, Stockey RA (2018) Resolving the overall pattern of marattialean fern phylogeny. *American Journal of Botany*, 105, 1304–1314.
- Schlueter JA, Dixon P, Granger C, Grant D, Clark L, Doyle JJ, Shoemaker RC (2004) Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. *Genome*, 47, 868–876.
- Schneider H, Schuettpelz E, Pryer KM, Cranfill R, Magallón S, Lupia R (2004) Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature*, 428, 553–557.
- Schuettpelz E, Pryer KM (2006) Reconciling extreme branch length differences: Decoupling time and rate through the evolutionary history of filmy ferns. *Systematic Biology*, 55, 485–502.
- Schuettpelz E, Pryer KM (2009) Evidence for a Cenozoic radiation of ferns in an angiosperm-dominated canopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 11200–11205.
- Shen H, Jin DM, Shu JP, Zhou XL, Lei M, Wei R, Shang H, Wei HJ, Zhang R, Liu L, Gu YF, Zhang XC, Yan YH (2018) Large-scale phylogenomic analysis resolves a backbone phylogeny in ferns. *GigaScience*, 7, gix116.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31, 3210–3212.
- Skog JE (2001) Biogeography of Mesozoic leptosporangiate ferns related to extant ferns. *Brittonia*, 53, 236–269.
- Soltis PS, Soltis DE, Savolainen V, Crane PR, Barraclough TG (2002) Rate heterogeneity among lineages of tracheophytes: Integration of molecular and fossil data and evidence for molecular living fossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99, 4430–4435.
- Thomas JA, Welch JJ, Woolfit M, Bromham L (2006) There is no universal molecular clock for invertebrates, but rate variation does not scale with body size. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103, 7366–7371.
- Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, van de Peer Y (2004) Major events in the genome evolution of vertebrates: Paraneome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 1638–1643.
- Vanneste K, Baele G, Maere S, van de Peer Y (2014) Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications in association with the Cretaceous-Paleogene boundary. *Genome Research*, 24, 1334–1347.
- Vanneste K, Sterck L, Myburg AA, van de Peer Y, Mizrahi E (2015) Horsetails are ancient polyploids: Evidence from *Equisetum giganteum*. *The Plant Cell*, 27, 1567–1578.
- van de Peer Y, Ashman TL, Soltis PS, Soltis DE (2021) Polyploidy: An evolutionary and ecological force in stressful times. *The Plant Cell*, 33, 11–26.
- Wang H, Zhang R, Zhang J, Shen H, Dai XL, Yan YH (2019) De novo transcriptome assembly reveals the whole genome duplication events of *Didymochlaena trancatula*. *Biodiversity Science*, 27, 1221–1227. (in Chinese with English abstract) [汪浩, 张锐, 张娇, 沈慧, 戴锡玲, 严岳鸿 (2019) 转录组测序揭示翼盖蕨(*Didymochlaena trancatula*)的全基因组复制历史. 生物多样性, 27, 1221–1227.]
- Wolf PG, Robison TA, Johnson MG, Sundue MA, Testo WL, Rothfels CJ (2018) Target sequence capture of nuclear-encoded genes for phylogenetic analysis in ferns. *Applications in Plant Sciences*, 6, e01148.
- Wu SD, Han BC, Jiao YN (2020) Genetic contribution of paleopolyploidy to adaptive evolution in angiosperms. *Molecular Plant*, 13, 59–71.
- Wu CI, Li WH (1985) Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82, 1741–1745.
- Yan XF, Wang Y, Li YM (2007) Plant secondary metabolism and its response to environment. *Acta Ecologica Sinica*, 27, 2554–2562. (in Chinese with English abstract) [阎秀峰, 王洋, 李一蒙 (2007) 植物次生代谢及其与环境的关系. 生态学报, 27, 2554–2562.]
- Yang ZH (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1586–1591.
- You CJ, Cui J, Wang H, Qi XP, Kuo LY, Ma H, Gao L, Mo BX, Chen XM (2017) Conservation and divergence of small RNA pathways and microRNAs in land plants. *Genome Biology*, 18, 158.
- Yu Y, Xiang QY, Manos PS, Soltis DE, Soltis PS, Song BH, Cheng SF, Liu X, Wong G (2017) Whole-genome duplication and molecular evolution in *Cornus* L. (Cornaceae)—Insights from transcriptome sequences. *PLoS ONE*, 12, e0171361.
- Zhang LS, Chen F, Zhang XT, Li Z, Zhao YY, Lohaus R, Chang XJ, Dong W, Ho SYW, Liu X, Song AX, Chen JH, Guo WL, Wang ZJ, Zhuang YY, Wang HF, Chen XQ, Hu J, Liu YH, Qin Y, Wang K, Dong SS, Liu Y, Zhang SZ, Yu XX, Wu Q, Wang LS, Yan XQ, Jiao YN, Kong HZ, Zhou XF, Yu CW, Chen YC, Li F, Wang JH, Chen W, Chen XL, Jia QD, Zhang C, Jiang YF, Zhang WB, Liu GH, Fu JY, Chen F, Ma H, van de Peer Y, Tang HB (2020a) The water

- lily genome and the early evolution of flowering plants. *Nature*, 577, 79–84.
- Zhang LS, Wu SD, Chang XJ, Wang XY, Zhao YP, Xia YP, Trigiano RN, Jiao YN, Chen F (2020b) The ancient wave of polyploidization events in flowering plants and their facilitated adaptation to environmental stress. *Plant, Cell & Environment*, 43, 2847–2856.
- Zhang PP, Fu JM, Hu LX (2012) Effects of alkali stress on growth, free amino acids and carbohydrates metabolism in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*). *Ecotoxicology*, 21, 1911–1918.
- Zhang R, Wang FG, Zhang J, Shang H, Liu L, Wang H, Zhao GH, Shen H, Yan YH (2019) Dating whole genome duplication in *Ceratopteris thalictroides* and potential adaptive values of retained gene duplicates. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1926.
- Zhong BJ, Fong R, Collins LJ, McLenachan PA, Penny D (2014) Two new fern chloroplasts and decelerated evolution linked to the long generation time in tree ferns. *Genome Biology and Evolution*, 6, 1166–1173.
- Zhou N, Wang YD, Ya L, Porter AS, Kürschner WM, Li LQ, Lu N, McElwain JC (2020) An inter-comparison study of three stomatal-proxy methods for CO₂ reconstruction applied to Early Jurassic Ginkgoales plants. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 542, 109547.

(责任编辑: 郭亚龙 责任编辑: 黄祥忠)