麻黄属 *rbcL* 基因的适应性进化检测与结构模建

刘念^{①†}, 王庆彪^{①†}, 陈婕^①, 朱勇^①, 扎西次仁^②, 胡祎瑶^①, 陈凡^③, 钟扬^{②①*}

① 复旦大学生命科学学院生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433;

② 西藏大学生物多样性与地生物学研究所, 拉萨 850000;

③ 中国科学院遗传与发育生物学研究所分子与发育生物学国家重点实验室, 北京 100080

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yangzhong@fudan.edu.cn

2009-04-30 收稿, 2009-08-21 接受

国家自然科学基金(2005DKA21403)、科技基础性工作专项基金(2007FY110100)、上海市重点学科基金(B111)、国家大学生创新性实验计划(J0630643)和复旦大学研究生创新基金(EYH1322098)资助项目

摘要 采用 PAML 程序检测麻黄属 14 种及其他 9 种裸子植物 *rbcL* 基因的适应性进化. 以“分支”模型检测到该属植物 RbcL 蛋白催化活性区先后经历了 3 次大范围的选择; 以“分支-位点”模型检测出在该基因第 365 位密码子位点存在正选择的物种; 计算机三维结构模建进一步显示该位点引起 RbcL 蛋白 β G 折叠、 β H 折叠和 β E 折叠的空间结构变化, 这些变化可能与麻黄属该蛋白对环境的适应有关.

关键词

麻黄属

裸子植物

rbcL 适应性进化

三维结构模建

在植物光合作用过程中, 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)作为一种双功能酶, 既可吸收 CO_2 羧化 1,5-二磷酸核酮糖(RuBP, Ribulose-1,5-bisphosphate)生成 3-磷酸甘油酸(碳固定), 又可吸收 O_2 氧化分解 RuBP. 由于 Rubisco 效率很低, 它催化 RuBP 进行碳固定的反应是光合作用的限速反应, 因而是控制光合作用效率的关键酶. 一般认为, Rubisco 对 CO_2 的利用效率越高, 光合作用效率就越高, 植物适应环境的能力也就越强. 例如, Jordan 等人^[1]推断进化压力将使 Rubisco 朝 CO_2 利用效率更高的方向发展. Galmés 等人^[2]发现干旱生境中植物 Rubisco 对 CO_2 的利用效率相对更高. 通常温度升高时, Rubisco 的氧化反应催化效率比羧化反应催化效率上升要快, 对 CO_2 的利用效率下降^[3], 故在高温干旱环境下, 植物受水分蒸发的压力, 叶片气孔关闭, 导致 CO_2 浓度降低, Rubisco 对 CO_2 的亲合性受到更大的选择压

力^[4], 迫使其向升高亲和性的方向进化. Gulias 等人^[5]发现西班牙巴利阿里群岛特有种的光合作用能力明显低于分布广泛的物种, 认为特有种的 CO_2 利用效率较低可能与地理隔离造成的自然选择有关. 分布范围扩大使物种受到更大的选择压力, 有助于提高 Rubisco 对 CO_2 的利用效率^[5]. 此外, 大气中 CO_2 和 O_2 分压之比、光照强度、生态环境温度也是决定物种 CO_2 利用效率的影响因素^[4,6,7].

麻黄目为单科单属, 全世界约 50 种, 广泛分布于亚洲、欧洲、南北美洲及北非的温带和亚热带干旱少雨地区. 大部分麻黄植物叶长不足 1 cm, 但北美洲的 *Ephedra trifurca* 叶长为 1.5 cm, 中亚和西亚的 *E. foliata* 叶长达 3 cm. 由于叶片退化, 其大部分光合作用相关组织都位于嫩枝表面. 麻黄一般生活在干旱沙化或岩石地区, 如高山、沙漠、峭壁、河谷、沙质海滩、河漫滩地等, 少数在草原. 新大陆麻黄大部分生活在海拔 2000 m 以下, 少数能达到 2300 m, 而

英文版见: Liu N, Wang Q B, Chen J, et al. Adaptive evolution and structure modeling of *rbcL* gene in *Ephedra*. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-3023-9

旧大陆麻黄的海拔分布从海平面到 5300 m, 其中山岭麻黄(*E. gerardiana*)是分布海拔最高的裸子植物, 中麻黄(*E. intermedia*)的海拔则在 100~4600 m. 麻黄可在年平均气温 1.1~14.7°C、年降水量在 350 mm 以下的环境生存, 嗜温、耐热、耐寒、不耐水湿.

所有绿色植物的 Rubisco 都由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成, 大亚基由位于叶绿体的 *rbcL* 基因编码组成, 基本包含了酶催化所需的所有活性位点, 其催化中心区域的氨基酸序列决定了催化效率, 小亚基目前功能未明, 但也影响酶的催化效率^[8]. 可以推断, 植物生境中针对 Rubisco 提高 CO₂ 利用效率的选择压力将导致 *rbcL* 基因的进化. 考虑到麻黄对极端生境的适应性, 本文选择 14 种麻黄及其他裸子植物, 利用 PAML 程序^[9]检测其 *rbcL* 基因的适应性进化.

1 材料和方法

(i) 序列数据. 尽管 Bowe 等人认为松科是买麻藤纲的姊妹群^[10,11], 但仍有不少研究者认为该结论并不可靠^[12,13]. 因此, 本文研究物种除包括买麻藤纲植物外, 还包括苏铁、银杏、松科、柏科和杉科等. 所有 *rbcL* 序列除 *E. triandra* 外均从 GenBank 下载, *E. triandra* 为自测序列. 排除不可靠及无完整 Rubisco 催化活性区的序列, 并弃去 *rbcL* 基因中的非 Rubisco 催化活性区(NCBI CDD: pfam00016)序列, 最终得到包含 14 种麻黄和其他 9 种裸子植物 *rbcL* 基因的 Rubisco 催化活性区序列(共 309 个密码子位点). 本研究所用物种及 GenBank 收录号信息见表 1.

(ii) 进化分析. 以密码子为单位, 用 DNASTAR7.0 软件包中的 MEGALIGN 程序进行序列对位排列; 用 Paup4.0^[14]和 Modeltest3.7^[15]程序检测最适进化模型; 用 Treepuzzle5.2 程序^[16]构建 ML 进化树, 自展值为 10000 次.

基于 ML 树, 以 PAML 4.2 中的 codeml 程序进行适应性进化分析: 计算单一速率模型和自由速率模型下的 lnL 值并进行似然比检验(LRT); 以 codeml 程序中的“分支”模型^[17]检测 ML 树中麻黄各支的适应性进化; 以“分支-位点”模型^[18]检测麻黄属中存在的正选择位点并进行 LRT 检验.

(iii) 三维结构建模. RbcL 蛋白三维结构建模采用 Discovery studio 2.1 软件包. 以木贼麻黄(*E. equisetina*)的 *rbcL* 基因序列对 PDB 数据库进行 Blast 搜索, 获得最佳模板为水稻 Rubisco 三维结构(PDB

ID: 1wdd); 以 Align3d 程序根据 1wdd 结构进行序列对位重排; 以 Modeler 程序根据 1wdd 三维结构进行同源建模得到初始构型. 在得到初始构型后, 对蛋白 Loop 区进行优化, 分别进行 200 步的能量最小化和分子动力学模拟. 分子动力学模拟在水 GBMV 模型中进行, 最后选择能量最低的构型.

2 结果

本文所得到的裸子植物系统发育关系(图 1)与 Chaw 等人^[11]的结果相似, 即买麻藤纲与松科构成姊妹群. 在 ML 树中, 由于只考虑 *rbcL* 催化活性区序列, 麻黄属内聚类关系与地理分布虽基本相符^[19], 但也有例外, 如 *E. americana* 与 *E. triandra* 都为南美洲种群, 但在基因树上分别与亚洲种群和非洲种群聚为一支.

采用“单速率”模型和“自由速率”模型对所获得的 ML 树进行分析, 似然比检验支持“自由速率”模型, 即 ML 树上各分支存在不同选择压. 采用“分支”模型对麻黄属植物进行适应性进化检测(图 1 和表 2), 表明在麻黄属进化支中, dN/dS>1 的 9 处, dN/dS<1 的 13 处. 似然比检验表明结果为 11 处具有统计显著性, 其中 5 处 dN/dS>1, 6 处 dN/dS<1. 从图 1 中可以看出, 麻黄属发生正选择的时间均在其进化历程中期, 而发生负选择的时间除 1 处为进化历程前期, 其余 5 处位于后期.

“分支-位点”模型对麻黄属植物 *rbcL* 基因催化活性区中正选择位点的检测结果见表 3. 在“前景”支(即麻黄属)中有 0.37%的位点经历了正选择(即在 309 个密码子位点中约有 1 个密码子位点). 似然比检验表明该结果有显著意义($P<0.05$), 而经验贝斯方法(BEB)方法表明第 365 位(以木贼麻黄 RbcL 蛋白全长计)密码子位点发生正选择概率最高($P=0.998$). 该位点氨基酸除 (*E. gerardiana*, (*E. americana*, *E. likiangensis*, *E. equisetina*))进化支上为丙氨酸(Ala)或谷氨酸(Glu)外, 其余麻黄在该位点的氨基酸都为苏氨酸(Thr).

以木贼麻黄的 *rbcL* 基因对 PDB 数据库进行 Blast 搜索获得 8 个合适模板, 其中以水稻 Rubisco 三维结构(PDB ID: 1wdd)得分最高. 二者序列一致性为 91.8%, 序列相似性 95.4%, 符合同源建模的可靠性要求. 由 Modeler 同源建模获得初始模型, 经 Loop 区优化、能量最小化和动力学模拟得到木贼麻黄的

表 1 本研究所用序列及其 GenBank 收录号

科名	物种名	收录号	文献或来源
麻黄科 Ephedraceae	<i>Ephedra alata</i> Decne	AY755805	[18]
	<i>Ephedra altissima</i> Desf.	AY755804	[18]
	<i>Ephedra altissima</i> Desf.	AY755804	[18]
	<i>Ephedra americana</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	AY056559	[11]
	<i>Ephedra antisiphilitica</i> Berl. ex C. A. Meyer	AY755789	[18]
	双穗麻黄 <i>Ephedra distachya</i> L.	AY755793	[18]
	木贼麻黄 <i>Ephedra equisetina</i> Bunge.	AP010819	Wu C, Mol Phylogenet Evol, 2009
	脆麻黄 <i>Ephedra fragilis</i> Desf.	AY755784	[18]
	山岭麻黄 <i>Ephedra gerardiana</i> Wallich ex Stapf	AY755785	[18]
	中麻黄 <i>Ephedra intermedia</i> Schrenk & C. A. Meyer	AY056566	[11]
	丽江麻黄 <i>Ephedra likiangensis</i> Florin	AY755780	[18]
	<i>Ephedra rupestris</i> Benth.	AY755797	[18]
	<i>Ephedra torreyana</i> Watson	AY755791	[18]
	<i>Ephedra triandra</i> Tul.	EF053227	自测, 来自英国皇家植物园
	<i>Ephedra trifurca</i> Torrey ex Watson	AY755794	[18]
买麻藤科 Gnetaceae	小叶买麻藤 <i>Gnetum parvifolium</i> (Warb.)	AP009569	Wu C, Mol Phylogenet Evol, 2009
百岁兰科 Welwitschiales	百岁兰 <i>Welwitschia mirabilis</i> Hooker	EU342371	McCoy S R, BMC Evol Biol, 2008
松科 Pinaceae	黑松 <i>Pinus thunbergii</i> Parlatores	D17510	Tsudzuki J, Mol Gen Genet, 1992
	雪松 <i>Cedrus deodara</i> (Roxburgh)	AF456381	Quinn C J, Kew Bull, 2002
杉科 Taxodiaceae	杉木 <i>Cunninghamia lanceolata</i> (Lambert) Hooker	AY140260	Ikegami K, 未发表
柏科 Cupressaceae	铅笔柏 <i>Juniperus virginiana</i> L.	AF119182	Wang M, 未发表
罗汉松科 Podocarpaceae	细叶罗汉松 <i>Podocarpus gracilior</i> Pilger	X58135	Bousquet J, Proc Natl Acad Sci USA, 1992
苏铁科 Cycadaceae	台东苏铁 <i>Cycas taitungensis</i>	AP009339	Chaw S M, Mol Phylogenet Evol, 2005
银杏科 Ginkgoaceae	银杏 <i>Ginkgo biloba</i> L.	DQ069500	Leebens-Mack J, Mol Biol Evol, 2005

RbcL 蛋白最佳三维构象(图 2(a)). 图 2(a)显示, 木贼麻黄的 RbcL 蛋白含有 16 个 α 螺旋 15 个 β 折叠, 与水稻 RbcL 结构特征相似. 优化后得到的三维结构模型用 Profiles-3D 进行氨基酸残基兼容性考察(图 2(b)). 从图 2(b)可以看到, 木贼麻黄的 RbcL 三维构象中绝大部分氨基酸残基得分为正值, 位于合理范围. 优势构象兼容性得分为 194.4, 远高于临界得分 97.6. 结构匹配表明所得三维构象与模板之间主链 α 碳原子的标准偏差(RMSD)为 2.751Å. 上述结果支持了木贼麻黄的 RbcL 三维模型.

对检测出正选择的第 365 位密码子位点的空间分析表明, 该位点位于 RbcL 蛋白的 β H 折叠中. 当该密码子编码的氨基酸为麻黄中最常见的 Thr 时, Thr 中的 β 位羟基与 β G 折叠中 354Ile 羰基形成氢键; 当氨基酸为 Glu(木贼麻黄)时, Glu 中的 α 位羰基与同处于 β H 折叠中的 367Asp 氨基形成氢键; 当氨基酸为 Ala(山岭麻黄)时, Ala 中的羰基与 β E 折叠中 139Arg 中 γ 位氨基形成氢键(见图 3), 而 139Arg 原与 32Lys, 33Asn 和 35Asp 之间的氢键断裂, 只存在于 37Leu 之

间的氢键.

3 讨论

花粉化石表明, 早在二叠纪与三叠纪时代, 买麻藤纲植物就已分布于古大陆^[20]. 然而, 由于缺少保存完好的大化石, 无法判断这些植物是否属于麻黄. 发现最早的可明确归属于麻黄的化石年代为早白垩纪^[19,21,22], 距今约 1.2 亿年. 这些化石具有现存麻黄的生殖和营养器官形态特征, 如种皮上的乳头状突起和花粉壁脱落等^[20], 暗示着现存麻黄应该为中生代起源. Huang 等人^[23]利用麻黄 *rbcL* 分支序列数据, 根据裸子植物中 *rbcL* 的平均核苷酸置换率推断现存麻黄起源于 8~32 百万年前(新生代). 显然, 分子证据与化石证据存在冲突. 对此, 一种论点认为现存麻黄可能为白垩纪麻黄经历一次灭绝后重新于新生代扩散至全球^[19], 但不能解释为何现存麻黄仍保留白垩纪麻黄的生殖和营养器官形态特征^[21]; 另一种论点是现存麻黄为中生代起源, 但这种古老年代起源理论要求麻黄 *rbcL* 基因的进化速率低至令人难以置信的程度.

表 2 麻黄属中各进化支适应性选择检测结果(“分支”模型)^{a)}

进化支	dN/dS	2Δ1	P 值
“单速率”模型 vs “自由速率”模型		127.86	$P<0.001^{***}$
<i>E. triandra</i>	0.0001	0.00	$P>0.05$
<i>E. alata</i>	0.0001	0.92	$P>0.05$
<i>E. altissima</i>	0.0001	7.48	$P<0.01^{**}$
(<i>E. alata</i> , <i>E. altissima</i>)	0.0001	3.30	$P>0.05$
(<i>E. triandra</i> , (<i>E. alata</i> , <i>E. altissima</i>))	— [#]	7.86	$P<0.01^{**}$
<i>E. intermedia</i>	0.0001	7.48	$P<0.01^{**}$
<i>E. distachya</i>	558.9294	1.32	$P>0.05$
<i>E. fragilis</i>	0.0001	5.66	$P<0.05^{*}$
<i>E. rupestris</i>	0.0001	3.38	$P>0.05$
<i>E. trifurca</i>	0.0001	3.28	$P>0.05$
<i>E. antisiphilitica</i>	— [#]	0.44	$P>0.05$
<i>E. torreyana</i>	0.0001	8.26	$P<0.01^{**}$
(<i>E. trifurca</i> , <i>E. antisiphilitica</i> , <i>E. torreyana</i>)	— [#]	7.86	$P<0.01^{**}$
(<i>E. rupestris</i> , (<i>E. trifurca</i> , <i>E. antisiphilitica</i> , <i>E. torreyana</i>))	— [#]	7.86	$P<0.01^{**}$
((<i>E. triandra</i> , (<i>E. alata</i> , <i>E. altissima</i>)), <i>E. intermedia</i> , <i>E. distachya</i> , <i>E. fragilis</i> , (<i>E. rupestris</i> , (<i>E. trifurca</i> , <i>E. antisiphilitica</i> , <i>E. torreyana</i>)))	0.0001	0.92	$P>0.05$
<i>E. gerardiana</i>	0.0001	8.30	$P<0.01^{**}$
<i>E. americana</i>	— [#]	0.86	$P>0.05$
<i>E. likiangensis</i>	0.2542	0.90	$P>0.05$
<i>E. equisetina</i>	— [#]	0.74	$P>0.05$
(<i>E. americana</i> , <i>E. likiangensis</i> , <i>E. equisetina</i>)	— [#]	7.34	$P<0.01^{**}$
(<i>E. gerardiana</i> , (<i>E. americana</i> , <i>E. likiangensis</i> , <i>E. equisetina</i>))	— [#]	13.74	$P<0.001^{***}$
Ephedraceae	0.0030	147.72	$P<0.001^{***}$

a) * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; # dS=0

图 1 裸子植物 *rbcL* 基因(催化活性区)ML 系统发育树
■: 存在负选择; ■: 存在正选择

图 2 木贼麻黄(*E. equisetina*) RbcL 蛋白三维结构(a)及 Profiles-3d 评估(b)

表 3 *rbcL* 基因中的正选择位点检测结果(“分支-位点”模型)

“分支-位点”模型	参数数量	参数	<i>l</i>	MA vs MB	正选择位点
模型 A($\omega_2=1$)	3	$P_0=0.9454$, $P_1=0.0359$ $P_2+P_3=0.0187$ $\omega_0=0.0113$, $\omega_1=\omega_2=1.0$	-3005.64		
模型 B($\omega_2>1$)	4	$P_0=0.9596$, $P_1=0.0370$ $P_2+P_3=0.0034$ $\omega_0=0.0124$, $\omega_2=40.0078$	-3002.63	$P<0.05$	365T($P=0.998$)

图 3 麻黄 RbcL 蛋白 365Thr(a), 365Glu(b)和 365Ala(c)的三维建模及空间结构变化

本文结果表明, 麻黄 *rbcL* 基因催化活性区经历

过 3 次选择: (1) 在麻黄与买麻藤和百岁兰分化之时经受了第一次负选择, 这与化石证据指示的买麻藤植物繁盛于中生代衰败于新生代相符合; (2) 非洲区系、美洲区系和亚洲区系都经历了一次甚至几次正选择, 如此巨大地理范围内的麻黄同时发生适应性进化, 可能与当时全球范围内的地理气候事件有关; (3) 许多现存麻黄物种在分化后期又经历了一次负选择(图 1), 意味着这些麻黄可能更为适应当时环境而得以生存, 其他不适应的物种则被淘汰. 由于麻黄 *rbcL* 催化活性区经历了如此之多的选择, 可以推断麻黄 *rbcL* 基因的进化速率不可能恒定, 至少与其他裸子植物不同, 因而根据裸子植物 *rbcL* 的平均进化速率来推断麻黄起源时间可能导致较大误差. 麻黄 *rbcL* 催化活性区序列发生的多次选择可以解释为现存麻黄 *rbcL* 基因进化速率极低的原因.

本研究在麻黄进化支上检测到 *rbcL* 基因第 365 位密码子经历了正选择. 该密码子在裸子植物中可编码 3 种氨基酸(Thr, Glu 和 Ala), 它们分别与 RbcL 蛋白的 β G 折叠、 β H 折叠和 β E 折叠中的氨基酸形成氢键. 虽然已有许多文献对 RbcL 蛋白中的功能区位点变异进行了研究^[24,25], 但多集中于 RbcL 蛋白 Loop 6 区(331~338 位密码子), 对 β G 折叠、 β H 折叠和 β E 折叠的相关功能仍然知之甚少. 本研究表明 β G 折叠、 β H 折叠和 β E 折叠空间变化可能与麻黄类对生境的适应有关. 例如, 发生第 365 位 Ala 变异的山岭麻黄(*E. gerardiana*)是该属在世界上分布海拔最高的(海拔 3700~5300 m 的青藏高原), 同时存在负选择.

参考文献

- 1 Jordan D B, Ogren W L. Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature*, 1981, 291: 513—515
- 2 Galmés J, Flexas J, Keys A J, et al. Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant Cell Environ*, 2005, 28: 571—579
- 3 Jordan D B, Ogren W L. The CO_2/O_2 specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta*, 1984, 161: 308—313
- 4 Delgado E, Medrano H, Keys A J, et al. Species variation in Rubisco specificity factor. *J Exp Bot*, 1995, 46: 1775—1777
- 5 Gulias J, Flexas J, Mus M, et al. Relationship between maximum leaf photosynthesis, nitrogen content and specific leaf area in Balearic

- endemic and non-endemic Mediterranean species. *Ann Bot*, 2003, 91: 455—463
- 6 Kent S S, Tomany M J. The differential of the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase specificity factor among higher plants and the potential for biomass enhancement. *Plant Physiol Biochem*, 1995, 33: 71—80
- 7 Luo R, Wei H, Ye L, et al. Photosynthetic metabolism of C3 plants shows highly cooperative regulation under changing environments: A systems biological analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 847—852
- 8 Andrews T J. Catalysis by cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase large subunits in the complete absence of small subunits. *J Biol Chem*, 1988, 263: 12213—12219
- 9 Yang Z. PAML 4: A program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1586—1591
- 10 Bowe L M, Coat G, dePamphilis C W. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4092—4097
- 11 Chaw S M, Parkinson C L, Cheng Y, et al. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4086—4091
- 12 Rydin C, Killersj M, Friis E M. Seed plant relationships and the systematic position of Gnetales based on nuclear and chloroplast DNA: Conflicting data, rooting problems, and the monophyly of conifers. *Intl J Plant Sci*, 2002, 163: 197—214
- 13 Burleigh J G, Mathews S. Phylogenetic signal in nucleotide data from seed plants: Implications for resolving the seed plant tree of life. *Am J Bot*, 2004, 91: 1599—1613
- 14 Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003
- 15 Posada D, Crandall K A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817—818
- 16 Schmidt H A, Strimmer K, Vingron M, et al. TREE-PUZZLE: Maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*, 2002, 18: 502—504
- 17 Yang Z. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 568—573
- 18 Zhang J, Nielsen R, Yang Z. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Mol Biol Evol*, 2005, 22: 2472—2479
- 19 Rydin C, Pedersen K R, Friis E M. On the evolutionary history of *Ephedra*: Cretaceous fossils and extant molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16571—16576
- 20 Crane P R. The fossil history of the Gnetales. *Int J Plant Sci*, 1996, 157 (Suppl.): S50—S57
- 21 Rydin C, Pedersen K R, Crane P R. Former diversity of *Ephedra* (Gnetales): Evidence from Early Cretaceous seeds from Portugal and North America. *Ann Bot*, 2006, 98: 123—140
- 22 Yang Y, Geng B, Dilcher D L, et al. Morphology and affinities of an Early Cretaceous *Ephedra* (Ephedraceae) from China. *Am J Bot*, 2005, 92: 231—241
- 23 Huang J, Price R A. Estimation of the age of extant *Ephedra* using chloroplast *rbcL* sequence data. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 435—440
- 24 Kellogg E A, Juliano N D. The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies. *Am J Bot*, 1997, 84: 413—428
- 25 Andersson I, Backlund A. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46: 275—291