

· 研究论文 ·

高山松及其亲本种油松和云南松DHAR基因的功能分化

考洪娜^{1,2}, 兰婷¹, 王晓茹¹, 曾庆银^{1*}

¹中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093; ²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 高山松(*Pinus densata*)是油松(*P. tabulaeformis*)与云南松(*P. yunnanensis*)自然杂交产生的同倍性杂种, 分布于青藏高原东南缘, 占据了油松和云南松两个亲本种都不能正常生长的高海拔地带。为了揭示高山松、油松和云南松脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)基因的组成和功能分化, 分别从高山松、油松和云南松中克隆到2类DHAR基因(DHAR1与DHAR2)。组织表达模式分析表明, 这6个基因在根、韧皮部、叶和芽中均有表达; 通过系统发育分析发现, 高山松在物种形成过程中保留了油松的DHAR1拷贝以及云南松的DHAR2拷贝; 酶学性质分析则表明, 高山松与油松DHAR1蛋白对底物具有相似的催化活性、催化效率、最适pH和热力学稳定性, 但其催化活性比云南松DHAR1蛋白高约300倍。高山松DHAR2蛋白对底物的催化活性和热力学稳定性均高于油松DHAR2蛋白。高山松DHAR基因在生化功能上显示出优于或类似亲本DHAR, 这种优势功能的选择与杂种独特的生态适应性可能有重要的相关性。

关键词 适应性, DHAR, 功能分化, 自然杂种, 蛋白质功能

考洪娜, 兰婷, 王晓茹, 曾庆银 (2012). 高山松及其亲本种油松和云南松DHAR基因的功能分化. 植物学报 47, 1–10.

高山松(*Pinus densata*)是油松(*P. tabulaeformis*)与云南松(*P. yunnanensis*)自然杂交产生的二倍体杂种, 是植物同倍体杂交物种形成的案例(Wang et al., 2001)。高山松是中国重要的高山森林树种, 广泛分布于西藏东南部、四川西部和云南西北部海拔2 700–4 200 m的高山地带; 云南松分布于云南大部 and 贵州、广西西北部及四川西部海拔600–3 100 m地带; 油松分布于吉林南部、辽宁、河北、河南、山东、山西、内蒙古、陕西、甘肃、青海、四川等省区海拔100–2 000 m地带(毛建丰等, 2007; Mao and Wang, 2011)。3个种分别处于不同生境, 在分布区边缘形成少量重叠。目前推测高山松的起源和成种过程与青藏高原的隆起相关。青藏高原隆起时, 剧烈的地理和气候变化为杂种基因型提供了生存和扩展空间, 最终, 高山松占据了其2个亲本种在气象历史上都不能正常生长的高海拔地带, 形成大面积稳定的纯林(Wang et al., 2001)。高山松作为油松和云南松的二倍体杂交种, 杂交成种过程中没有涉及染色体倍性的变化, 能在青藏高原上良好地生长、生殖, 反映了其独特的适应性(Mao et al., 2009; Wang et al., 2011)。高山松的

这些特性使其成为研究同倍性杂交物种形成的独特体系。

还原型抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)是植物体内重要的还原剂, 可清除由光合作用、呼吸作用等氧化反应产生的超氧自由基、过氧化氢和羟自由基等活性氧自由基(Chen and Gallie, 2006)。AsA在活性氧清除的过程中被氧化形成单脱氢抗坏血酸, 单脱氢抗坏血酸被进一步自氧化形成双脱氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid, DHA), DHA在脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR, EC1.8.5.1)的催化作用下与谷胱甘肽(glutathione, GSH)偶联, 再循环形成AsA(Smirnoff et al., 2001)。因此, DHAR对维持植物细胞中还原性抗坏血酸的水平具有重要意义。DHAR广泛存在于植物的叶绿体、线粒体和细胞质中, 不仅参与植物细胞中AsA的再生, 而且广泛地参与植物的抗逆反应。比如, 在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中过量表达拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) DHAR基因可使转基因植株对臭氧和干旱胁迫的抗性增强(Eltayeb et al., 2006); 而在拟南芥中过量表达水稻(*Oryza sativa*)DHAR基因可提高转基因拟南

收稿日期: 2011-09-01; 接受日期: 2011-10-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(No.2009CB119104)和国家自然科学基金(No.30830010)

* 通讯作者。E-mail: qingyin.zeng@ibcas.ac.cn

芥对盐胁迫的抗性(Ushimaru et al., 2006)。这些研究说明,植物细胞中维持较高水平的DHAR活性增强了植物对逆境胁迫的耐受性。本研究从与植物适应性密切相关的脱氢抗坏血酸还原酶基因入手,综合系统发育、基因表达模式、蛋白质结构与功能分析,探索高山松DHAR基因的亲本来源构成及适应机理,进而为该同倍性杂交物种的适应性进化成种提供分子佐证。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验以高山松(*Pinus densata* Mast.)、云南松(*Pinus yunnanensis* Franch.)和油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)的种子为材料。高山松采集于西藏林芝(94.4°E、29.2°N),云南松采集于云南昆明(102.6°E、24.9°N),油松采集于中国科学院植物研究所北京植物园内(116.2°E、39.9°N)。

1.2 方法

1.2.1 DHAR基因的序列鉴定与命名

根据杨树(*Populus trichocarpa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)的全长DHAR蛋白序列,利用TBLASTN程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)扫描GenBank中火炬松(*Pinus taeda*) EST数据库,获得与DHAR基因具有较高相似性的2组序列。将获得的序列经NCBI保守结构域数据库CDD判读,确定序列编码的蛋白具有DHAR典型结构域特征。我们将这2组序列分别命名为PtaDHAR1 (GenBank® Accession No. CO165970)和PtaDHAR2 (GenBank® Accession No. DN614482)。

1.2.2 高山松、油松和云南松DHAR基因的克隆

取高山松、油松和云南松幼苗组织各0.1 g,按照Aurum Total RNA Kit (BIO-RAD)提供的说明书提取总RNA。并以总RNA为模板,通过RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0反转录试剂盒(TaKaRa),将总RNA反转录合成cDNA。以火炬松PtaDHAR1和PtaDHAR2序列为模板,设计2对引物: PtaDHAR1-CL1/2 (PtaDHAR1-CL1, 5'-AGAGGAGGAAGATTGGCAGTA-3'; PtaDHAR1-CL2, 5'-ATGCTTTGTGAGGCCATT-TAT-3')和PtaDHAR2-CL1/2(PtaDHAR2-CL1, 5'-GG

GGAAGTTCTATTTCATTCATCA-3'; PtaDHAR2-CL2, 5'-AAGAGTGGTCTAGGGATATAAATTG-3'),引物由Invitrogen公司合成。以油松、云南松和高山松cDNA为模板,利用2对引物进行PCR扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带割胶回收纯化,纯化产物连接到pGEM-T载体(Promega)中。将构建好的重组质粒转化大肠杆菌JM109感受态,在X-gal/IPTG Amp平板上挑取多个阳性克隆进行双向测序。

1.2.3 系统发育关系分析

将克隆获得的高山松、油松和云南松DHAR基因编码的蛋白序列与其它植物DHAR蛋白序列通过Clustal X 1.83进行氨基酸序列比对,然后经BioEdit手动校对。利用MEGA v.4.0软件的neighbour-joining(NJ)模型构建系统进化树,bootstrap值为1 000。

1.2.4 高山松、油松和云南松DHAR基因的组织表达分布

为了研究DHAR基因在高山松、油松和云南松不同组织中的表达模式,我们以自然生长状态下的树苗为研究对象,分别提取油松、云南松和高山松的根、茎、叶3个组织的总RNA,然后反转录合成cDNA。根据油松、云南松和高山松DHAR基因的序列分别设计特异性引物进行RT-PCR扩增,然后对PCR产物测序。

1.2.5 高山松、油松和云南松DHAR蛋白的表达与纯化

通过定向克隆技术将高山松、油松和云南松DHAR基因的编码序列亚克隆到带有6×His标签的PET30a表达载体中,转化大肠杆菌BL21感受态细胞。将经测序验证正确的重组表达菌于含50 μg·mL⁻¹卡那霉素的LB培养基中培养过夜,以1:100稀释后扩大培养至A₆₀₀为0.6,加入IPTG至终浓度0.1 mmol·L⁻¹,37°C诱导过夜。诱导表达后的菌液于4°C、6 500 × g离心10分钟后收获菌体,用缓冲液A(20 mmol·L⁻¹咪唑、0.5 mmol·L⁻¹NaCl、20 mmol·L⁻¹Na₃PO₄, pH 7.5)重悬,冰上超声破碎裂解。然后4°C、10 000 × g离心10分钟,分别取少量原菌液、超声破碎离心后的上清液和沉淀,经SDS-PAGE检测是否具有目的蛋白,SDS-PAGE检测采用10%的分离胶和5%的浓缩胶。蛋白质纯化用Ni亲和柱(Amersham Pharmacia Biotech)。首先用缓冲液A平衡Ni亲和柱,将超声破碎后离心获得

的上清液上样, 然后以缓冲液A平衡, 最后用缓冲液B($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_3PO_4 , pH 7.5)洗脱目的蛋白, 收集目的蛋白洗脱峰进行下一步酶学活性分析。

1.2.6 高山松、油松和云南松DHAR蛋白的酶学性质测定

植物DHAR基因是植物谷胱甘肽转移酶(glutathione transferase, GST)超家族的一个亚家族。本实验以GSH(glutathione)为第一底物, 5种GST蛋白常见底物作为第二底物, 对融合蛋白进行测定。第二底物分别包括CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)、DCNB(1,2-dichloro-4-nitrobenzene)、NBD-Cl(7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)、NBC(4-nitrobenzyl chloride)和DHA(dehydroascorbic acid)。CDNB、DCNB和NBC的活性测定采用Habig等(1974)的方法; NBD-Cl的活性测定采用Ricci等(1994)的方法; DHA(dehydroascorbate)的催化活性测定采用Edwards和Dixon(2005)的方法。酶促动力学分析以GSH和DHA为底物, 固定GSH的浓度, 利用不同浓度梯度对DHA底物进行蛋白活性测定。酶热力学稳定性分析中, 将酶在设定温度下孵育15分钟, 在孵育结束后检测酶对DHA底物的催化活性。pH依赖的酶活性测定方法是在 25°C 下, 测定酶在不同pH缓冲液中的催化活性。所有反应至少设3次独立重复实验。

1.2.7 DHAR蛋白的结构模拟

选取氯离子通道蛋白(PDB: 1k0o和2yv7)的X衍射晶体结构为模板, 以Align 2D程序(Insight II的Homology模块)进行序列比对, 运用Insight II的Modeler模块构建蛋白质三维结构, 由此产生10个结构。每个结构再产生10个不同的环区结构, 优化水平为高等。以Profiles-3D对各个结构进行评价, 选取最优的蛋白结构。

2 结果与分析

2.1 油松、云南松和高山松DHAR基因的序列分析

在高山松、油松和云南松中分别克隆到2组DHAR基因, 第1组基因分别被命名为PdDHAR1、PtDHAR1和PyDHAR1, 这3个基因的cDNA序列均含有648 bp

的开放阅读框(包括终止密码子), 编码215个氨基酸残基的蛋白质, 预测分子量分别为24.4 kDa、24.35 kDa和24.35 kDa。第2组基因分别被命名为PdDHAR2、PtDHAR2和PyDHAR2, 这3个基因的cDNA序列均含有681 bp的开放阅读框(包括终止密码子), 编码蛋白包含226个氨基酸残基, 预测分子量分别为26.03 kDa、25.96 kDa和26.03 kDa。虽然PdDHAR2和PyDHAR2的cDNA序列有差异, 但是其编码的蛋白序列完全相同。

通过对高山松、油松和云南松DHAR基因的蛋白质序列进行序列同源性分析发现(图1), 第1组3个DHAR蛋白(PdDHAR1、PtDHAR1和PyDHAR1)的序列相似性分别为98.1%、98.6%和99.5%; 第2组3个DHAR蛋白(PdDHAR2、PtDHAR2和PyDHAR2)的序列相似性分别为99.1%、99.1%和100%; 但是第1组和第2组DHAR蛋白的序列相似性范围是44.2%–45.1%, 2组DHAR蛋白的序列有显著差异(t test $P < 0.0001$)。

2.2 系统发育分析

选取5个代表不同进化历史的陆地植物物种的DHAR基因为研究对象, 包括苔藓植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、蕨类植物江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)、裸子植物白云杉(*Picea glauca*)、单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥, 在基因组和EST数据库中搜索其DHAR同源序列。由于DHAR基因是GST超基因家族成员, 将植物GST超基因家族的其它类型, 包括Tau、Phi和Lambda GST序列也加入到系统发育分析中。系统发育树显示, 所有DHAR聚成一大枝, 支持率为100%(图2), 表明本研究克隆的6个基因为DHAR基因。3个高山松、油松和云南松DHAR1聚成一枝, 而3个DHAR2聚成另一枝, 表明3个高山松、油松和云南松DHAR1基因是直系同源基因, 另外3个DHAR2基因也是直系同源基因。

我们发现所有DHAR基因聚成两小枝, D1和D2(图2), 每一小枝中均有小立碗藓、江南卷柏、白云杉、油松、云南松和高山松, 表明在陆地植物形成的早期, DHAR基因发生了1次古老的基因重复事件。在D1枝中包含苔藓植物、蕨类植物、裸子植物和被子植物的DHAR基因, 而D2这一枝中仅仅包含苔藓植物、蕨类植物和裸子植物的DHAR基因, 说明D2枝中的拷贝

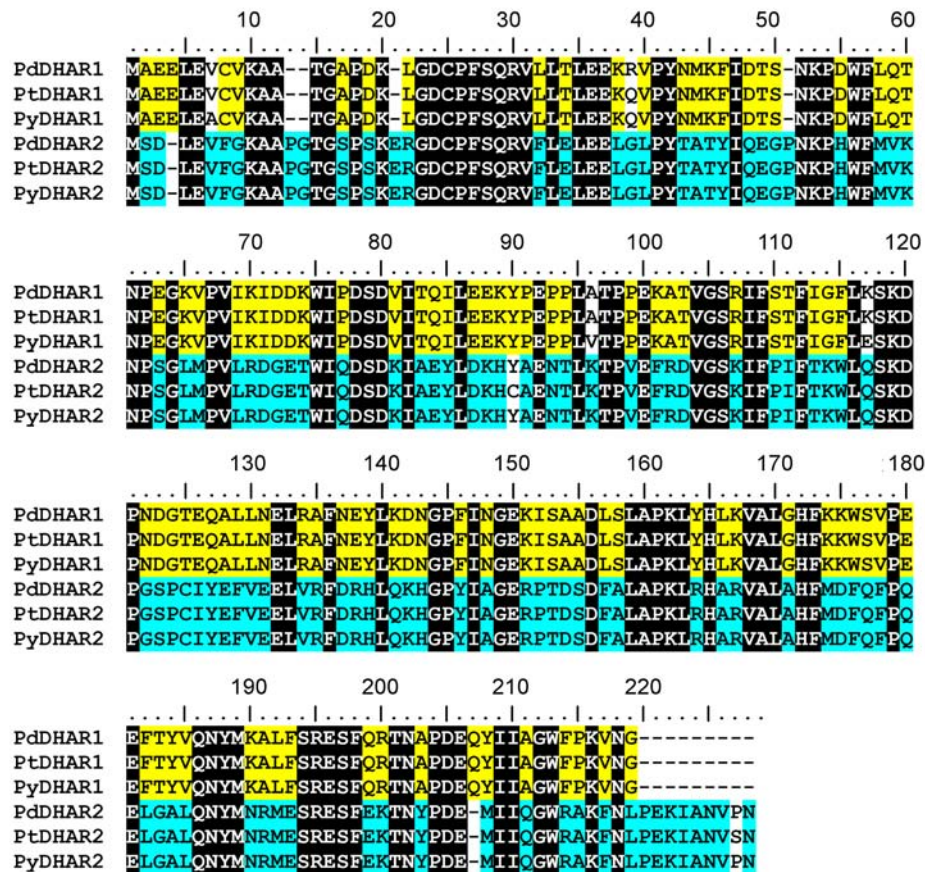


图1 高山松、油松和云南松DHAR蛋白的序列比对

黑色阴影部分表示2类DHAR蛋白均保守的序列，黄色阴影部分表示DHAR1蛋白保守的序列，蓝色阴影部分表示DHAR2蛋白保守的序列。

Figure 1 Sequence alignment of DHAR proteins from *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*. Conserved residues in all DHARs are marked in black. Residues marked in yellow and blue indicate conserved residues in DHAR1 and DHAR2 proteins, respectively.

在被子植物中可能丢失。而重复事件产生的2个重复基因拷贝在油松、云南松和高山松中都被保留了下来。

以Tau类GST为外类群，对高山松、油松和云南松6个DHAR构建系统树(图3)。对于DHAR1基因，高山松PdDHAR1和油松PtDHAR1聚在一起，其序列最相近，与云南松PyDHAR1关系稍远；而对于DHAR2基因，高山松PdDHAR2则与云南松PyDHAR2关系最近。系统进化关系显示，在高山松物种形成过程中，对于DHAR1基因，高山松选择保留了油松的拷贝；

而对于DHAR2基因，高山松选择保留了云南松的拷贝。

2.3 高山松、油松和云南松DHAR基因的组织表达分布

我们通过RT-PCR分析高山松、油松和云南松DHAR基因在正常生长条件下不同组织(根、茎、叶)中的表达分布。RT-PCR扩增后对PCR产物进行测序，结果显示6个DHAR基因在所有组织中均表达(图4)。这表明6个DHAR基因是组成型表达基因，可能在松树的

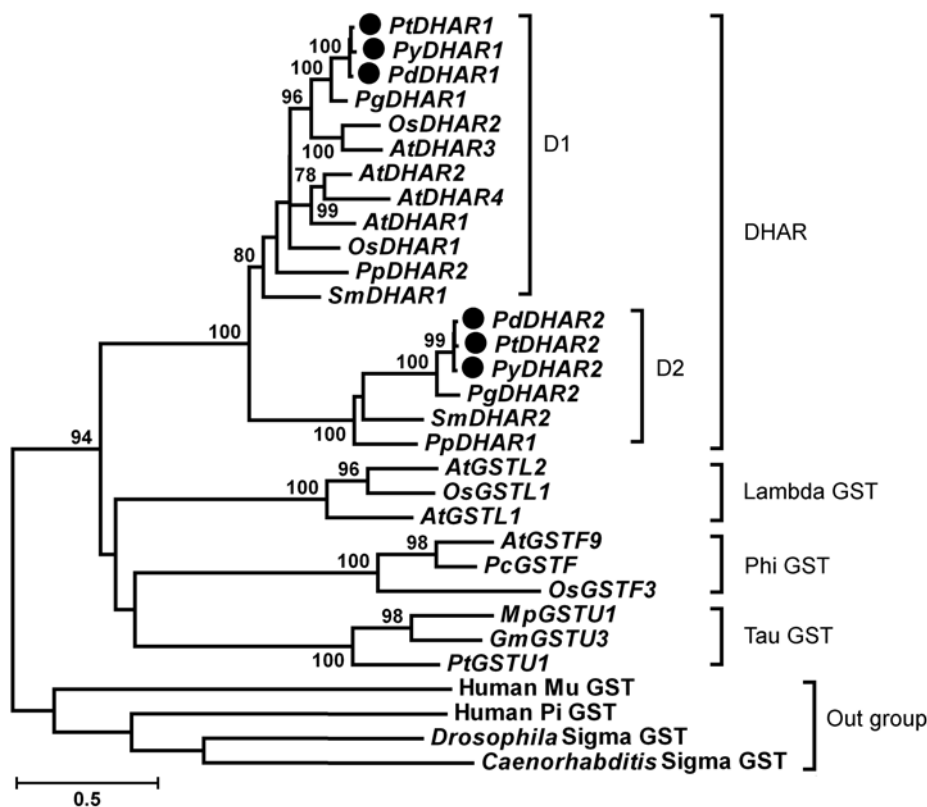


图2 植物DHAR与其它类型GST蛋白的系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic relationship between plant DHAR and other classes of plant GSTs

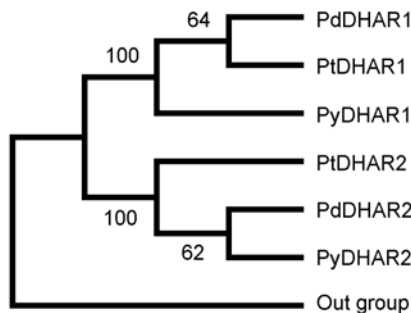


图3 高山松、油松和云南松DHAR的系统发育分析

Figure 3 Phylogenetic tree showing relationships between the DHARs from *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*

生长发育中发挥着重要作用。

2.4 高山松、油松和云南松DHAR蛋白表达、纯化及酶活性分析

由于PdDHAR2和PyDHAR2基因编码相同的蛋白序列，所以在本研究中构建了5个DHAR蛋白(PdDHAR1、PtDHAR1、PyDHAR1、PdDHAR2和PtDHAR2)的表达质粒。将构建的表达质粒分别转化到大肠杆菌BL21感受态细胞中，经IPTG诱导后发现5个DHAR蛋白都能在大肠杆菌中高效表达。通过镍柱亲和层析纯化后，获得纯化的重组蛋白(图5)，SDS-PAGE结果显示纯化的蛋白分子量与预测的蛋白大小一致。

DHAR是植物GST基因家族的成员，由于植物GST对多种底物如CDNB、NDB-Cl、DHA等具有广泛的活性(Basantani and Srivastava, 2007)，所以在

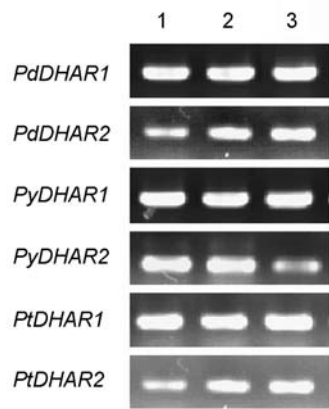


图4 高山松、油松和云南松DHAR基因的组织表达模式分析
第1–3泳道分别代表根、茎、叶3个组织部位。

Figure 4 Expression of the DHAR genes in various tissues of *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*
Lanes 1–3: Root, stem and needle.

本研究中我们分别测定了5个高山松、油松和云南松DHAR蛋白对DHA、NBD-Cl、CDNB、NBC和DCNB五种底物的活性。结果发现5个蛋白只对DHA具有催化活性，说明这5个蛋白均具有脱氢抗坏血酸还原酶活性。其中PdDHAR1、PtDHAR1和PyDHAR1的酶学活性分别为 $1.492 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{per mg}$ 、 $1.498 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{per mg}$ 和 $0.005 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{per mg}$ ；PdDHAR2和PtDHAR2的酶学活性则分别为 $0.388 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{per mg}$ 和 $0.285 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{per mg}$ 。

2.5 DHAR蛋白的酶动力学研究

由于高山松、油松和云南松DHAR蛋白只对DHA底物具有催化活性，所以我们测定了DHAR蛋白对该底物的酶动力学参数。由于PyDHAR1的活性太低，本研究只测定PdDHAR1、PtDHAR1、PdDHAR2和PtDHAR2这4个蛋白的动力学参数(表1)。动力学分析显示，PdDHAR1和PtDHAR1两个蛋白的 K_m^{DHA} 值分别为 0.434 mmol 和 0.963 mmol ，说明PdDHAR1对底物DHA的亲合力是PtDHAR1的2倍。但是2个蛋白对DHA的催化效率(k_{cat}/K_m)相似。对于PdDHAR2和PtDHAR2蛋白，PtDHAR2对底物DHA的亲合力和催化效率均高于PdDHAR2。

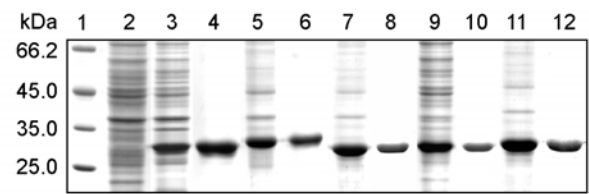


图5 高山松、油松和云南松DHAR蛋白在大肠杆菌BL21中的表达与纯化
泳道1为分子量标准；泳道2为大肠杆菌全菌蛋白；泳道3、5、7、9和11分别是诱导表达PdDHAR1、PdDHAR2、PyDHAR1、PtDHAR1和PtDHAR2的全菌蛋白；泳道4、6、8、10和12分别是纯化后的PdDHAR1、PdDHAR2、PyDHAR1、PtDHAR1和PtDHAR2蛋白。

Figure 5 Overexpression and purification of DHAR proteins from *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*
Lane 1: Molecular mass markers; Lane 2: Total cellular extract from *E. coli* BL21; Lanes 3, 5, 7, 9 and 11: Total cellular extracts from induced bacteria containing PdDHAR1, PdDHAR2, PyDHAR1, PtDHAR1 and PtDHAR2, respectively; Lanes 4, 6, 8, 10 and 12: The purified PdDHAR1, PdDHAR2, PyDHAR1, PtDHAR1 and PtDHAR2, respectively.

表1 DHAR蛋白对底物DHA的酶动力学分析

Table 1 Steady state kinetic constants of the <i>Pinus</i> DHAR proteins towards substrate DHA				
Proteins	K_m (mmol)	V_{max} ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mmol}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$)
PdDHAR1	0.434 ± 0.017	2.054 ± 0.027	5.737	13.218
PtDHAR1	0.963 ± 0.050	5.223 ± 0.191	14.35	14.898
PdDHAR2	1.123 ± 0.019	0.880 ± 0.012	0.491	0.438
PtDHAR2	0.349 ± 0.008	0.567 ± 0.004	0.825	2.363

2.6 热力学稳定性分析

由于PyDHAR1对DHA的活性太低，本研究只测定PdDHAR1、PtDHAR1、PdDHAR2和PtDHAR2这4个蛋白的热力学稳定性(图6A)。结果显示，PdDHAR2蛋白的热力学稳定性与其它3个蛋白相比有较大差异。PdDHAR2在 50°C 时还保持着最高活性的87%，但当温度高于 50°C 时，蛋白活性急剧下降， 55°C 时只剩下8%的活性，表明PdDHAR2蛋白在 50°C 以下都是稳定的，是一个热稳定性较高的酶。而PdDHAR1、

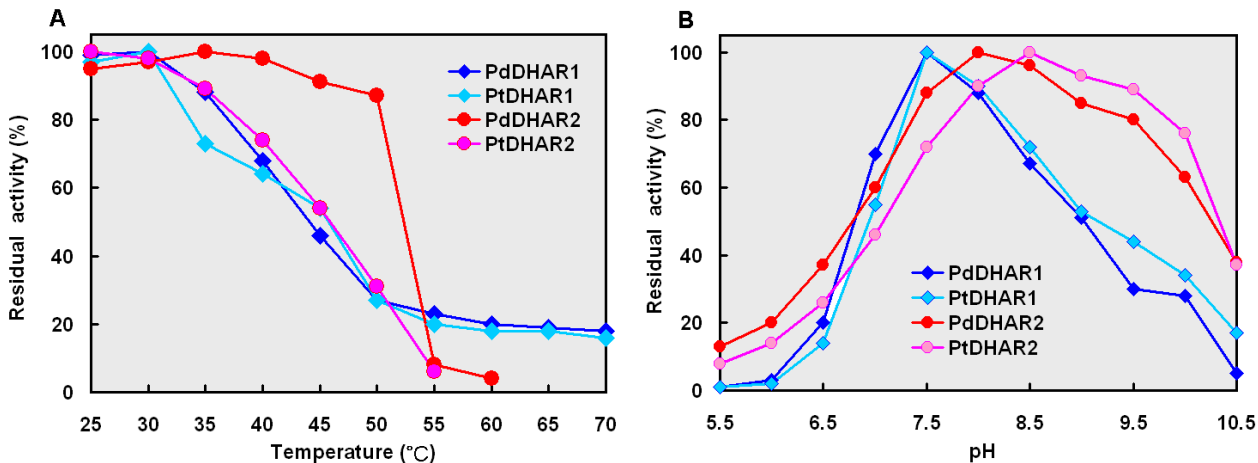


图6 PdDHAR1、PtDHAR1、PdDHAR2和PtDHAR2蛋白的热力学稳定性(A)和最适pH(B)

Figure 6 Thermal stability (A) and pH profiles (B) of PdDHAR1, PtDHAR1, PdDHAR2 and PtDHAR2 proteins

PtDHAR1和PtDHAR2在50℃时分别只保有其最高活性的27%、27%和31%，且活性随着温度的升高一直下降，显示这3个蛋白具有相似的、相对于PdDHAR2较低的热稳定性。

2.7 pH依赖的酶活性分析

在25℃下，测定了4个重组蛋白在不同pH下的酶活力(图6B)。结果显示PdDHAR1、PtDHAR1、PdDHAR2和PtDHAR2对DHA的最适pH分别为7.5、7.5、8.0和8.5，说明这4个酶都在偏碱性的环境中发挥作用。其中PdDHAR2和PtDHAR2在pH7.5–9.5之间保持着80%以上的最高活性，而PdDHAR1和PtDHAR1保持最高活性的80%时，pH值范围是7–8，表明PdDHAR1和PtDHAR1的最适pH范围比PdDHAR2和PtDHAR2窄。PdDHAR2和PtDHAR2的最适pH范围较宽，在pH9.5的环境下还能保持最高活性的80%以上，表明这2个蛋白能在强碱性环境中发挥作用。

2.8 蛋白质结构模拟

图7展示模拟的高山松、油松和云南松5个DHAR蛋白的三维结构。所有DHAR蛋白均具有典型的谷胱甘肽转移酶(GST)结构，包括2个结构域：由α螺旋和β折叠组成的硫氧还原蛋白结构域(N末端结构域)以及由多个α螺旋组成的C末端结构域，2个结构域由10个左右氨基酸残基组成的linker相连接。DHAR蛋白的N末

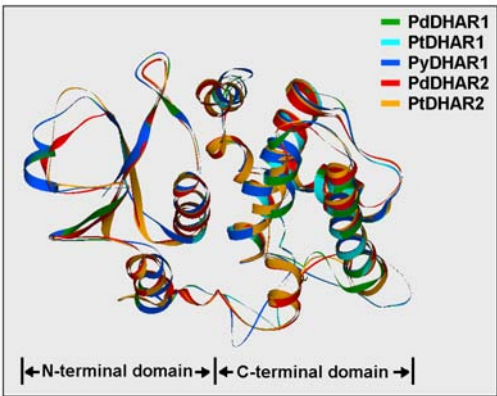


图7 高山松、油松和云南松DHAR蛋白的三维结构比较

Figure 7 Structure modelling of DHAR proteins from *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*

端结构域氨基酸大约组成了蛋白全长的1/3，包括1个βαβαβα结构域，C末端结构域则占整个蛋白质的2/3。对5个DHAR蛋白的结构重叠比较发现，在α螺旋和β折叠区域结构比较保守，而loop区域和linker区域的蛋白质构象有比较大的变异。

3 讨论

脱氢抗坏血酸还原酶是抗坏血酸-谷胱甘肽循环中的重要限速酶，对维持植物细胞AsA水平有重要意义，

而且广泛地参与植物的抗逆反应。在我们先前的研究中,发现DHAR基因在蕨类植物江南卷柏、裸子植物白皮松和双子叶植物杨树中均为组成型表达基因(Lan et al., 2009; Yang et al., 2009; 成子硕等, 2011)。对小麦(*Triticum aestivum*)的2个DHAR基因(*TaDHAR1*和*TaDHAR2*)的研究发现, DHAR基因在小麦各器官中均表达(余春梅等, 2009)。在本研究中,利用RT-PCR并结合PCR产物测序,我们发现高山松、油松和云南松6个DHAR基因在各组织中均表达(图4)。这一系列研究结果预示着在蕨类植物、裸子植物、单子叶植物和双子叶植物中DHAR基因可能均是组成型表达基因,在植物的生长发育中可能发挥着重要作用。

系统发育分析发现,植物DHAR基因分为DHA-R1和DHAR2两种类型(Clade D1和Clade D2, 图2)。在小立碗藓中存在2种类型的DHAR基因,说明在陆地植物形成的早期, DHAR基因发生了1次古老的基因重复事件。第1种类型的DHAR基因在苔藓植物、蕨类植物、裸子植物和被子植物中都存在,说明这类DHAR基因在整个陆地植物中是保守的,功能也可能是保守的。对于第2种类型的DHAR基因,我们搜索了GenBank数据库中的所有核酸、EST以及基因组数据,仅仅发现其在苔藓植物、蕨类植物和裸子植物中存在,说明第2种类型的DHAR基因在被子植物中可能丢失。非常有意思的是,我们发现第1类DHAR蛋白对DHA的酶活性往往高于第2类DHAR蛋白。比如,我们先前的研究发现江南卷柏SmDHAR1对DHA的活性是SmDHAR2的116倍(成子硕等, 2011);而在本研究中,高山松PdDHAR1对DHA的活性是PdDHAR2

的3.8倍。2类DHAR酶学活性的显著差异表示2类DHAR基因可能存在功能上的分化。

蛋白序列比对发现,云南松PyDHAR1与高山松PdDHAR1和油松PtDHAR1有很高的序列相似性,分别为98.1%和98.6%,但是PdDHAR1和PtDHAR1对DHA的酶活性比PyDHAR1高近300倍。比较模拟的三维结构发现这3个蛋白的结构高度保守,但是分析与底物结合的活性口袋区域,发现有1个位点的氨基酸发生变异,即第113位氨基酸位点,在PyDHAR1中是Glu,而PdDHAR1和PtDHAR1中则是Lys(图8)。Glu和Lys是生化性质完全相反的2类氨基酸, Glu侧链有一个羧基,是带负电荷的酸性氨基酸,而Lys侧链有一氨基,是带正电荷的碱性氨基酸。在活性位点区域生化性质完全不同的氨基酸替换可能对催化活性有重要影响。

对高山松同倍性杂交物种形成的生态遗传学研究发现,高山松与其亲本种油松和云南松在形态变异模式和对生态因子的适应性上表现为混合型,即一部分性状高出亲本种,而另一部分性状呈现出居中、较低或者与亲本种类似的适应性(毛建丰等, 2007; Mao et al., 2009; Mao and Wang, 2011)。本研究发现高山松PdDHAR1基因继承了油松拷贝的酶学性质,对底物DHA的活性远高于云南松PyDHAR1。高山松PdDHAR2基因类似云南松, PdDHAR2对DHA的催化活性略高于油松PtDHAR2,而在热力学稳定性上, PdDHAR2显著区别于其它几个DHAR蛋白,是一个热稳定性较高的酶,可能有利于适应温差变化大的环境。高山松DHAR基因在生化功能上显示出优于或类似亲本拷贝,并且形成了优势组合,这种优势功能的

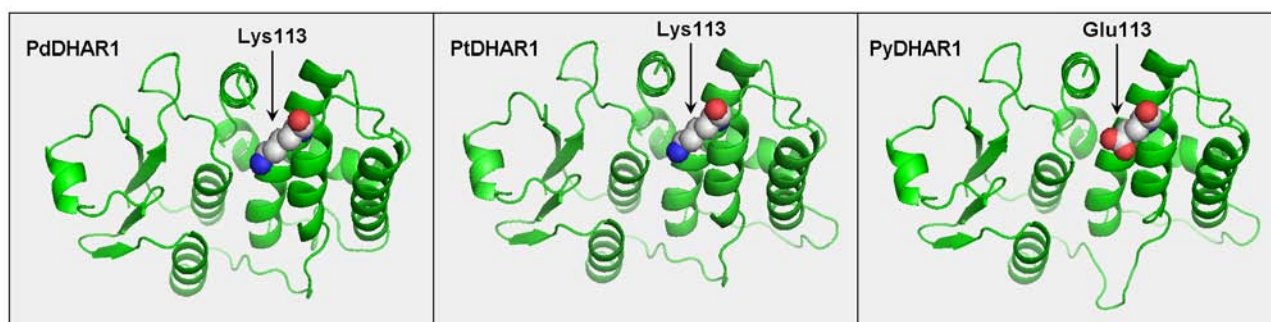


图8 PdDHAR1、PtDHAR1和PyDHAR1的三维结构比较

Figure 8 Structural comparison of PdDHAR1, PtDHAR1 and PyDHAR1 proteins

选择与高山松对环境的适应性进化之间可能存在一定联系。

参考文献

- 成子硕, 兰婷, 李迪, 杨海灵, 曾庆银 (2011). 江南卷柏脱氢抗坏血酸还原酶的分子特性. *生物工程学报* **27**, 76–84.
- 毛建丰, 李悦, 刘玉军, 刘灏, 王晓茹 (2007). 高山松种实性状与生殖适应性. *植物生态学报* **31**, 291–299.
- 余春梅, 杨艳萍, 刘鑫燕, 周蓉, 华梁, 魏贺, 丁胜杰, 王道文 (2009). 普通小麦中双脱氢抗坏血酸还原酶(TaDHAR)基因的克隆与生化特性分析. *生物工程学报* **25**, 1483–1489.
- Basantani M, Srivastava A (2007). Plant glutathione transferases—a decade falls short. *Can J Bot* **85**, 443–456.
- Chen Z, Gallie DR (2006). Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol* **142**, 775–787.
- Edwards R, Dixon DP (2005). Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol* **401**, 169–186.
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi G, Kaminaka H, Sanekata T, Morishima I, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K (2006). Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol Plant* **127**, 57–65.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130–7139.
- Lan T, Yang ZL, Yang X, Liu YJ, Wang XR, Zeng QY (2009). Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell* **21**, 3749–3766.
- Mao JF, Li Y, Wang XR (2009). Empirical assessment of the reproductive fitness components of the hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Evol Ecol* **23**, 447–462.
- Mao JF, Wang XR (2011). Distinct niche divergence characterizes the homoploid hybrid speciation of *Pinus densata* on the Tibetan Plateau. *Am Nat* **177**, 424–439.
- Ricci G, Caccuri AM, Lo Bello M, Pastore A, Piemonte F, Federici G (1994). Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Biochem* **218**, 463–465.
- Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 437–467.
- Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, Daicho K, Naito M, Yamauchi Y, Nonaka H, Amako K, Yamawaki K, Murata N (2006). Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol* **163**, 1179–1184.
- Wang BS, Mao JF, Gao J, Zhao W, Wang XR (2011). Colonization of the Tibetan Plateau by the homoploid hybrid pine *Pinus densata*. *Mol Ecol* **20**, 3796–3811.
- Wang XR, Szmidt AE, Savolainen O (2001). Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics* **159**, 337–346.
- Yang HL, Zhao YR, Wang CL, Yang ZL, Zeng QY, Lu H (2009). Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. *J Integr Plant Biol* **51**, 993–1001.

Functional Divergence of Dehydroascorbate Reductase Genes in *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*

Hongna Kao^{1, 2}, Ting Lan¹, Xiaoru Wang¹, Qingyin Zeng^{1*}

¹State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Plant dehydroascorbate reductase (DHAR) is a physiologically important reducing enzyme in the ascorbate-glutathione recycling reaction. In this study, we cloned 6 *DHAR* genes from a hybrid pine species complex of *Pinus densata*, *P. yunnanensis* and *P. tabulaeformis*. *P. densata* originated by natural hybridization of *P. yunnanensis* and *P. tabulaeformis*. The 6 *DHAR* genes were divided into 2 types: *DHAR1* and *DHAR2*. Phylogenetic analyses indicated that the 3 *DHAR1* and 3 *DHAR2* genes from the 3 *Pinus* species were 2 orthologous groups. *DHAR1* and *DHAR2* genes originated from an ancestral duplication event that occurred in the most recent common ancestor of the early land plants. *P. densata* contains a copy of *DHAR1* similar to that of *P. tabulaeformis* and a copy of *DHAR2* similar to that of *P. yunnanensis*. RT-PCR revealed that the 6 *DHAR* were constitutive expression genes in the 3 *Pinus* species. The recombinant *Pinus* DHAR proteins were overexpressed in *E. coli* and purified by Ni-affinity chromatography. *P. densata* and *P. tabulaeformis* DHAR1 proteins showed similar enzymatic activities, catalytic efficiency, thermal stabilities and optimal pH profiles towards substrate DHA but about 300-fold higher enzymatic activities than *P. yunnanensis* DHAR1 protein. The enzymatic activity and thermal stability of *P. densata* DHAR2 protein were higher than those of *P. tabulaeformis* DHAR2 protein. Joint analyses of sequence structure, phylogenetic relationships, expression patterns, enzymatic properties and protein 3-D structure revealed selective *DHAR* gene composition in the hybrid genome of *P. densata*. Such a combination of divergent copies of *DHAR* gene in *P. densata* may have adaptive implications for its colonization of novel habitats on the Tibetan Plateau.

Key words adaptation, DHAR, functional divergence, hybrid, protein function

Kao HN, Lan T, Wang XR, Zeng QY (2012). Functional divergence of dehydroascorbate reductase genes in *Pinus densata*, *P. tabulaeformis* and *P. yunnanensis*. *Chin Bull Bot* **47**, 1–10.

* Author for correspondence. E-mail: qingyin.zeng@ibcas.ac.cn