

巴西橡胶树病程相关蛋白：抗逆、乳管堵塞、过敏原性及转基因育种

代龙军，刘明洋

农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室/中国热带农业科学院橡胶研究所，海南海口 571101

摘要：病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PR 蛋白) 是植物响应胁迫的重要功能蛋白，在巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 中具有多重生物学作用。本文系统综述了橡胶树 PR 蛋白的研究进展，重点探讨其在抗逆机制、乳管堵塞及过敏原性方面的功能特性，特别关注了 PR 蛋白与乳管堵塞的重要关系。PR 蛋白通过复杂的分子网络参与橡胶树的防御反应，可能通过乳管堵塞过程影响胶乳产量；部分 PR 蛋白具有较强的过敏原性。PR 蛋白的转基因研究已取得初步进展，但需进一步优化表达调控策略以平衡抗逆性、产量和过敏原性等性状。未来研究应加强 PR 蛋白作用机制的解析，特别是深入探究几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶这 2 种病程相关蛋白的表达水平与橡胶产量之间的关联性，同时重视对 PR-14 等尚未充分研究的蛋白类别的功能研究，开发精准的分子育种技术，为橡胶树品种改良提供理论依据和技术支撑。

关键词：巴西橡胶树；病程相关蛋白；抗逆；乳管堵塞；过敏原性；转基因育种

中图分类号：S794.1 文献标志码：A

Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Pathogenesis-related Proteins: Stress Resistance, Laticifer Plugging, Allergenicity, and Transgenic Breeding

DAI Longjun, LIU Mingyang

Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops / Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Pathogenesis-related (PR) proteins are crucial functional proteins in plants responding to stress, exhibiting multiple biological roles in rubber trees (*Hevea brasiliensis*). This article systematically reviewed recent advances in PR protein research in rubber trees, with emphasis on the functional characteristics in stress resistance mechanisms, laticifer plugging, and allergenicity, while highlighting the critical relationship between PR proteins and laticifer plugging. PR proteins participate in defense responses against stresses through complex molecular networks, potentially influencing latex yield via laticifer plugging processes. Some PR proteins exhibit strong allergenic properties. Although transgenic studies of PR proteins have achieved preliminary progress, further optimization of expression regulation strategies is required to balance stress resistance, yield, and allergenicity. Future research should prioritize elucidating the mechanistic roles of PR proteins, especially investigating how the expression levels of pathogenesis-related proteins (particularly chitinases and β -1,3-glucanases) correlate with rubber productivity. Concurrently, functional exploration of understudied PR protein categories like PR-14 warrants attention. Developing precise molecular breeding technologies based on these findings will provide both theoretical foundations and technical support for rubber tree variety improvement.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; pathogenesis-related proteins; stress resistance; laticifer plugging; allergenicity; transgenic breeding

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.10.001

收稿日期 2025-04-07; 接受日期 2025-06-13

基金项目 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 322RC785); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630022025004)。

作者简介 代龙军 (1976—), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 橡胶树分子生物学与生理学; E-mail: dailongjun@126.com。

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 作为天然橡胶的主要来源, 在全球经济中具有重要意义。随着气候变化和病虫害压力的增加, 橡胶树的抗逆性和产量稳定性面临前所未有的挑战。病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PR 蛋白) 是由宿主植物编码, 在应对病原感染和非生物胁迫时诱导表达的一类多功能蛋白质, 其在植物的先天免疫中发挥着至关重要的作用^[1]。这些蛋白质不仅参与橡胶树的防御反应, 还与乳管堵塞和排胶过程密切相关, 部分成员是胶乳过敏原的主要来源。因此, 在遗传育种和品种改良的过程中, 对这些基因的研究与评估显得尤为关键。

PR 蛋白通常是单体蛋白, 分子量较低, 范围在 6~43 kDa 之间。根据等电点, 它们被分为酸性蛋白和碱性蛋白两大类。酸性蛋白 (如 PR-1 和 PR-5) 在细胞外空间或细胞壁间隙中稳定且能抵抗蛋白酶的酶解; 而碱性蛋白 (如 PR-2 和 PR-3) 通常被运输到液泡中, 对蛋白酶敏感。这些蛋白质不仅在感染组织中局部积累, 还在未感染的组织中系统性积累, 以阻止感染扩散至宿主的健康部分^[1-2]。

目前, PR 蛋白根据功能差异可划分为 19 个家族, 每个家族均有其特定的生化特性和防御机制。如 PR-1 家族通过结合病原体固醇或释放活性肽 CAPE1 抑制真菌侵染; 而 PR-2 (β -1,3-葡聚糖酶) 与 PR-3/4/8/11 (几丁质酶) 通过协同降解真菌细胞壁的 β -1,3-葡聚糖和几丁质实现直接抗病; PR-5 (类甜蛋白) 通过形成跨膜孔或干扰真菌信号通路发挥双重防御功能; PR-6 (蛋白酶抑制剂) 则通过抑制昆虫及病原体的消化酶降低其侵染能力; PR-9 (过氧化物酶) 通过催化细胞壁木质素沉积增强物理屏障, PR-15/16 (草酸氧化酶及草酸氧化酶样蛋白) 通过产生活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 提升系统抗性; PR-10 (核糖核酸酶样蛋白) 通过降解 RNA 及诱导细胞凋亡遏制感染扩散; 而 PR-12/13/14 (防卫素、硫素、脂质转移蛋白) 则通过破坏病原体膜结构实现广谱抗菌^[1-3]。

PR 蛋白的表达受到植物激素信号通路的精细调控。水杨酸 (SA) 途径主要激活 PR-1、PR-2、PR-5 等蛋白, 应对活体营养型病原体 (如病毒、细菌), 并介导系统获得性抗性 (Systemic Acquired Resistance, SAR)。而茉莉酸 (JA) / 乙烯 (ET) 途径则激活 PR-3、PR-4、PR-12 等蛋白,

应对死体营养型病原体 (如真菌、昆虫), 并介导诱导系统抗性 (Induced Systemic Resistance, ISR)。此外, SA 与 JA/ET 途径之间存在交叉对话 (crosstalk), 这种拮抗关系确保了植物资源的优化分配。关键调控节点包括 NPR1 蛋白 (作为 SA 信号的核心调控因子, 促进 PR 基因表达) 以及转录因子 (如 WRKY 和 MYC 家族), 它们整合环境信号并启动 PR 转录^[1, 3]。

PR 蛋白在转基因育种中具有重要的应用潜力。过量表达 PR 基因, 可以显著提高植物对病原体的抗性。如几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的转基因表达已被证明能够增强植物对真菌病害的抗性。相关研究成果不仅揭示了 PR 蛋白在植物防御机制中的关键作用, 还为植物的遗传改良提供重要的工具和策略, 为培育具有更强抗逆性和产量稳定性的橡胶树品种奠定基础^[1, 4]。

本文旨在分析橡胶树 PR 蛋白的多重功能及其在转基因育种中的应用潜力。通过分析 PR 蛋白在抗逆性、乳管堵塞的作用机制, 并概述其过敏原性特性, 探讨其在橡胶树改良中的应用前景, 为未来橡胶树育种研究提供新思路。

1 橡胶树 PR 蛋白概述

橡胶树黄色体 (胶乳中的一种亚细胞结构) 的内含液体 (也称 B-乳清) 中富含 PR 蛋白, 这些蛋白主要包括 β -1,3 葡聚糖酶、几丁质酶和 ProHevein (其水解产物为 Hevein, 即橡胶素)。PR 蛋白具有多样化的生物学功能, 它们不仅参与植物对病原体的防御反应, 还在非生物胁迫耐受、排胶和过敏原性等方面发挥重要作用。

PR 蛋白中的碱性蛋白多存在于液泡, 在橡胶树胶乳中的黄色体具有液泡性质, 黄色体中的主要 PR 蛋白 Hevein 却为酸性^[5]。在正常生理状态下, PR 蛋白表达水平较低; 但在受到胁迫时, 其表达量显著增加。割胶作为一种强烈的胁迫因素, 诱导 PR 蛋白大量表达, 使其在黄色体蛋白凝胶电泳中形成主要的蛋白条带^[6-7], 并且在全胶乳蛋白中也呈现高丰度^[8]。

β -1,3 葡聚糖酶、几丁质酶和 Hevein 等 3 种 B-乳清蛋白能够被病原微生物诱导, 并具有抗真菌特性^[9-12]。其中, 几丁质酶 (专用名为 Hevamine) 还表现出抗细菌特性 (具有溶菌酶活性)^[10]。这些高丰度蛋白也是胶乳的主要过敏原, 因此受到较多关注, 其晶体结构也已被解析^[13-17]。此外,

这 3 种蛋白还与乳管堵塞过程密切相关, 被认为是乳管堵塞的关键参与者或调节因素。

尽管 PR 蛋白对橡胶树的自我防御机制至关重要, 目前仅有少数研究尝试将外源 PR 蛋白(如烟草渗透素 Osmotin, 属于 RP-10) 导入橡胶树^[18-19]。除上述蛋白质外, 其他种类的 PR 蛋白研究相对较少, 将在后文进一步讨论。

2 橡胶树 PR 蛋白的抗逆功能

以对各类型 PR 蛋白的研究深入程度为序对其抗逆功能进行分述。

2.1 ProHevein/Hevein (PR-4)

Hevein 最早由 ARCHER^[5] 从橡胶树 B-乳清中发现并命名。Hevein 是 ProHevein 的成熟形式, 是 ProHevein 被切割后的 N 端部分(43 个氨基酸残基), 二者均属于 PR-4 类蛋白。C 端肽段类似大麦伤口诱导蛋白(barwin-like domain)^[20-22], 具有淀粉样蛋白特性, 可能通过形成物理屏障或增强病原体捕获效率在植物防御中发挥作用^[23]。ProHevein 和 Hevein 均呈酸性^[5]。Hevein 是胶乳中含量最丰富的可溶性蛋白, 占比约 22%^[24], 在 B-乳清可溶蛋白质中占比高达 70%^[25]。然而, 因 Hevein 的小分子量特性, 样本制备过程中容易丢失(不易被 TCA-丙酮法沉淀), 也需 Tricine-SDS PAGE 电泳分离。

Hevein 在橡胶树中具有多种抗逆作用, 包括抗真菌、伤口诱导的防御反应、促进橡胶粒子聚集和增强植物整体抗性等。这些作用可能通过其几丁质结合能力(凝集素活性)、抗真菌活性以及基因表达调控机制来实现^[12, 24]。目前仅发现 Hevein 具有几丁质结合活性以及对酵母和红细胞的凝集效应, 尚未发现其催化活性^[24, 26]。

2.2 β -1,3-葡聚糖酶(PR-2)和几丁质酶(PR-8)

β -1,3 葡聚糖酶(PR-2)和几丁质酶(PR-3/4/8/11)被认为可以通过水解病原真菌菌丝尖端的细胞壁化学成分直接对抗生物胁迫或释放激发子间接激活植物系统抗性(SAR), 且二者的作用具有协同性^[27-28]。在橡胶树中, 这 2 种酶均在 B-乳清中高丰度表达。其中, β -1,3 葡聚糖酶能够水解葡聚糖的 β -1,3-糖苷键。橡胶树中的主要几丁质酶, 即 Hevamine(归类为 PR-8), 由 ARCHER^[29] 发现并命名。Hevamine 具有抗真菌和抗细菌的双重活性: 既可以作为几丁质酶水解几丁质(存在于真菌和昆虫外骨骼中)中的 β -1,4-连接, 也可以

作为溶菌酶^[30]或糖苷水解酶家族 18 的成员^[31], 切割细菌细胞壁中肽聚糖的 N-乙酰- β -D-葡萄糖胺和胞壁酸之间的连接。

在橡胶树中, β -1,3 葡聚糖酶和几丁质酶的抗逆性相关研究主要集中在橡胶树叶感染真菌的响应上。如当橡胶树感染真菌 *Phytophthora meadii*^[32]、*P. palmivora*^[33]、*Neofusicoccum ribis*^[34-35]、*Rigidoporus microporus*^[36] 或南美叶疫病真菌(*Microcyclus ulei*)^[37] 时, β -1,3 葡聚糖酶基因的表达上调。同样, 当橡胶树感染 *N. ribis*^[34-35]、*R. microporus*^[36, 38] 或白粉菌(*Oidium heveae*)^[39] 时, 几丁质酶基因的表达也上调。橡胶树外施水杨酸导致胶乳 β -1,3 葡聚糖酶增多^[40], 外施乙烯^[41-42]、甲基茉莉酸^[42] 或真菌效应蛋白 cassicolin Cas1^[43] 也导致几丁质酶表达上调。

β -1,3 葡聚糖酶在真菌抗性橡胶树品系中有更高的表达^[8, 39, 44]。此外, 橡胶树品系 GT.1 的 β -1,3 葡聚糖酶是一种糖蛋白, 含有 2 个糖基化位点(Asn-27 和 Asn-314), 而其他品系(如 PR261 和 RRIM 600) 的酶则几乎无糖基化。尽管 GT.1 的酶含量较高, 但其比活性显著低于其他品系^[6]。

2.3 类甜蛋白(PR-5)

PR-5 家族, 也称为类甜蛋白家族(thaumatin-like proteins, TLPs), 包括渗透素和类甜蛋白, 能够通过膜透化作用抑制真菌生长。TONG 等^[45] 研究表明, 橡胶树 Osmotin 蛋白主要定位于乳管细胞的黄色体中, 可能参与排胶过程中的渗透调节。此外, 乙烯刺激对 Osmotin 蛋白的表达具有显著影响: 在已割胶的橡胶树中, 其表达显著上调; 而在未割胶的橡胶树中, 表达则受到轻微抑制。在拟南芥中过表达 HbOsmotin 会导致植物对渗透胁迫的耐受性降低, 表现为在 PEG 处理下发芽率和存活率下降。然而, 通过将烟草 Osmotin 基因转入橡胶树, 可显著提高橡胶树幼苗对干旱、寒冷和盐胁迫等非生物胁迫的抗性^[18-19]。

在橡胶树的抗真菌机制中, Osmotin 蛋白具有重要作用。抗真菌能力强的橡胶树品系(如 PR 261、RRIM 600), 25 kDa 的 Osmotin 同源蛋白含量较高, 而易感品系(如 GT.1、LCB 1320) 中几乎缺失^[6]。Osmotin 通过膜透化作用直接抑制真菌生长, 其含量与橡胶树对病原菌的抗性呈正相关^[6, 36]。此外, 病原模式分子 Flg22(细菌来源)和几丁质(真菌来源)均可显著诱导橡胶树叶肉原生质体中 HbPR5 的转录^[46], 这进一步表明

Osmotin 蛋白在橡胶树的免疫反应中的重要作用。

2.4 PR-1 家族

PR-1 是一种抗真菌蛋白,其 C 端肽段 CAPE1 是防御信号的重要介质。小麦 TaPR1 蛋白通过蛋白酶切割释放 CAPE1,后者作为移动信号激活包括 TaPR1 基因在内的防御应答,形成自我放大的正反馈环路^[47]。

在橡胶树中,PR-1 相关研究也取得了进展,多个 PR-1 基因被克隆。罗红丽等^[48]克隆了橡胶树叶片中一个 150 个氨基酸残基的 PR-1 碱性蛋白基因,发现该基因受水杨酸诱导。病原模式分子 Flg22 (细菌来源)也能显著诱导叶肉原生质体中 HbPR1 的转录^[46]。橡胶树中一个含有 164 个氨基酸残基的 PR-1 碱性蛋白基因被克隆,命名为 HbPR-1b。该基因在健康植株的树皮和成熟叶中高表达,并在接种 *R. microsporus* 后被诱导表达。在抗病橡胶树品系 PB5/51 中,表达较高且响应迅速;而在易感品系 RRIM600 和 BPM24 中,其表达较低且响应缓慢^[49]。接种南美叶疫病真菌后,抗病品系的 PR1a 的表达显著上调^[37, 50]。一个含有 163 个氨基酸残基的 PR-1 碱性蛋白基因被克隆,该基因在烟草瞬时表达系统中成功实现高效表达,并显著抑制疫霉菌 (*P. palmivora*) 侵染及孢子萌发^[51]。转录组研究显示外施乙烯上调 PR-1 基因的表达^[41]。

2.5 蛋白酶抑制剂家族 (PR-6)

橡胶树中已发现多种蛋白酶抑制剂 (PIs),它们在植物防御机制中发挥重要作用。这些抑制剂通过特异性地抑制病原体或昆虫的蛋白酶活性,保护植物免受侵害。

从橡胶树胶乳中发现的碱性蛋白酶抑制剂 (HP-In),分子量为 11.73 kDa,等电点为 4.15,能够以 1:1 摩尔比高效抑制枯草杆菌蛋白酶(属于丝氨酸蛋白酶家族),但对胰蛋白酶和木瓜蛋白酶无显著抑制作用,显示出高度的底物特异性^[52]。此外,从橡胶树胶乳中克隆的另一个丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 Hb-PI,编码一个含 70 个氨基酸残基的蛋白质,特异性地抑制胰蛋白酶,最高抑制率达 35.5%,但对其他蛋白酶无显著抑制效果。重组表达的 Hb-PI (rHb-PI) 在 10 mg/mL 浓度下对革兰氏阳性菌(如 *Micrococcus luteus* 和 *Staphylococcus aureus*) 具有抑制作用,但对革兰氏阴性菌(如 *Pseudomonas aeruginosa*) 无显著效果^[53]。在硫酸铜诱导下,橡胶树细胞悬浮细胞分

泌的蛋白通过阴离子交换层析和两步制备电泳纯化出 1 个 25 kDa 的蛋白条带,该蛋白对枯草杆菌蛋白酶 A 具有强抑制作用(抑制率>80%),但对胰蛋白酶、糜蛋白酶和木瓜蛋白酶无抑制作用,推测其属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族。此外,该蛋白还能抑制棕榈疫霉 (*P. palmivora*) 的孢子萌发和菌丝生长,处理染病叶片后病斑面积显著缩小^[54]。

从橡胶树 RRIT251 品种叶片中分离出的丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 251Hbpi,编码一个含 70 个氨基酸残基的蛋白质。重组表达的 251HbPI 蛋白能够抑制胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶 A,但不抑制胰蛋白酶。此外,251HbPI 还显示出对常见的皮肤病菌红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*) 具有抗性,免疫共沉淀试验表明其与红色毛癣菌的 27 kDa 丝氨酸蛋白酶相互作用^[55]。与 251HbPI 相比,从橡胶树 B-乳清中纯化的另一个 PI-I 家族蛋白酶抑制剂 600HbPI (与 251HbPI 氨基酸序列相似度为 87%),显著抑制枯草杆菌蛋白酶 A (残留活性为 26.91%),但对胰凝乳蛋白酶的抑制活性较弱(残留活性为 92.77%),且不抑制胰蛋白酶。这表明结构差异(如保守基序)可能影响靶标偏好性^[56]。

从橡胶树 B-乳清中经硫酸铵沉淀和阴离子交换层析纯化出的一个 21.5 kDa 蛋白组分,该组分抑制木瓜蛋白酶(属于半胱氨酸蛋白酶)活性达 30%,对 *Ganoderma boninense*、*Sclerotium* sp. 和 *Rigidoporus lignosus* 的抑制率分别为 44.17%、42.92%、46.25%,显示出广谱抗真菌潜力^[57]。此外,一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂 HbCPI (101AA, 11.2 kDa) 在橡胶树的叶片、种子和乳液中组成型表达,在叶片中的表达丰度最高。病原菌 *P. palmivora* 侵染显著诱导叶片 HbCPI 的转录水平,表明其参与植物的防御响应^[58]。接种南美叶疫病真菌后,抗病橡胶树品系的一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂的表达显著上调^[50]。

2.6 内切蛋白酶家族 (PR-7)

3 个枯草杆菌蛋白酶样 (subtilisin-like) 丝氨酸蛋白酶 HbSPA、HbSPB、HbSPC 基因被克隆。研究表明, HbSPA 直接响应病原体 *P. palmivora*, 而 HbSPB 和 HbSPC 依赖水杨酸 (SA) 信号。此外, HbSPB 和 HbSPC 在胶乳中表达,表明其可能参与乳管特异性防御^[59]。从胶乳中纯化出的一个丝氨酸蛋白酶 Hevain (不是 Hevein), 分子量

为 69 kDa, 富含酸性氨基酸, 等电点为 4.3, 由多个亚基组成, 对特定蛋白质底物有活性, 且可被二异丙基氟磷酸酯 (DFP) 抑制。Hevain 可能参与胶乳凝固或防御反应, 例如在伤口愈合时降解病原体蛋白^[60]。

在植物-病原互作研究中, 橡胶树在病原菌感染早期通过快速诱导 HbSPA 蛋白表达并分泌至细胞外基质。HbSPA 可能通过降解病原菌细胞壁蛋白质或激活免疫信号通路 (如蛋白酶介导的损伤信号) 来抑制病原菌扩展。然而, 在免疫抑制阶段, *P. palmivora* 分泌效应蛋白 PpEPI10, 后者特异性地抑制 HbSPA 的酶活性, 从而阻断其防御功能^[61-62]。这种“蛋白酶-抑制剂”的对抗关系构成了宿主与病原菌之间的进化军备竞赛。

橡胶树中还存在半胱氨酸蛋白酶。一个乳管特异表达的半胱氨酸蛋白酶 *HbCPI* 基因具备毒性结构域 RTX^[63]; 而一个根特异表达的半胱氨酸蛋白酶基因 *HbCP2* 则不具备该结构域^[64]。对木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶 (PLCP) 基因家族的分析表明, 橡胶树中共有 43 个 *PLCP* 基因, 分属 9 个亚家族, 其中与落叶相关的 SAG12 亚家族显著扩展。然而, 乙烯刺激后, 乳管中 *PLCP* 的总体表达水平下降^[65]。

在胶乳超速离心后的底层 (主要是黄色体) 中发现了 1 个酸性蛋白酶, 其最适活性 pH 为 3.5, 可被特异性抑制剂胃酶抑素 (pepstatin) 强烈抑制, 属于天冬氨酸蛋白酶 (羧基蛋白酶) 类。但其功能尚待进一步分析^[66]。

2.7 过氧化物酶家族 (PR-9)

过氧化物酶 (PR-9) 的作用主要体现在 2 个方面^[3]。首先, 当植物受到病原体攻击时, 会产生活性氧 (ROS), 如过氧化氢 (H_2O_2)。过氧化物酶可以催化 H_2O_2 与底物的反应, 生成具有抗菌作用的氧化产物, 从而抑制病原体的生长。其次, 通过氧化反应, 过氧化物酶还可以促进木质素的合成与沉积, 加固细胞壁, 防止病原体入侵。木质素的合成, 对于橡胶树的抗风能力有特别重要的意义。

从 *P. palmivora* 中纯化出了 2 种激发子: Elicitin 和一种新的 75 kDa 蛋白。这 2 种激发子能够诱导橡胶树过氧化物酶活性、增加菝葜亭 (scopoletin) 和酚类化合物的积累, 并增强橡胶树对病原体的局部抗性^[67]。研究者从橡胶树细胞悬浮液中纯化了过氧化物酶, 并探索其在染料脱

色中的应用潜力。纯化的过氧化物酶 (70 kDa) 意外表现出多酚氧化酶 (PPO) 活性, 但需进一步验证这种活性是来自单一蛋白的多种功能, 还是来自共纯化的异构体^[68]。个别橡胶树品系 (PR107) 感染白根病 (病原 *R. microsporus*) 后 PR-9 中显著上调 9 倍, 可能通过增强木质化以限制病原扩展^[38]。橡胶树分子量分别为 29 kDa 和 33 kDa 的阴离子过氧化物酶在接种疫霉菌 (*P. meadii*) 24 h 后表达显著上调^[69]。接种南美叶疫病真菌后, 抗病橡胶树品系的过氧化物酶的表达显著上调^[50]。寒冷胁迫下, 过氧化物酶基因的转录显著上调^[70]。蛋白质水平的研究也显示了橡胶树感染真菌 (*R. microsporus* 和 *R. lignosus*) 后过氧化物酶的上调^[71]。

2.8 MLP 类似蛋白 (PR-10)

PR-10 类蛋白具有核糖核酸酶 (RNase) 活性, 可能通过降解病原体 RNA 来抑制其增殖。MLP (major latex protein) 具有 PR-10 类蛋白的保守结构^[72]。MLP 最初在罂粟 (*Papaver somniferum*) 胶乳中被发现并命名, 是一种胶乳特异性蛋白, 分子量约为 20 kDa, 呈酸性, 具有多个异构体, 等电点在 3.5~6.0 之间, 占胶乳总蛋白含量约 35%^[73-74]。其典型结构包括疏水腔 (可结合长链脂肪酸、植物激素、污染物等疏水配体, 并进行长距离运输) 和甘氨酸富集环^[72]。

橡胶树受到白根腐病菌 *R. microsporus* 感染后, 其叶片中包括 PR-10 蛋白在内的多种防御相关蛋白和基因发生了显著变化, 表明橡胶树的防御反应是系统性的, 从感染根部扩展到远端的叶片^[75]。通过对巴西橡胶树的全基因组鉴定, 发现了 132 个非冗余的 PR-10 蛋白, 主要分为 2 个亚组: Pru ar 1-like 主要过敏原蛋白和 MLP-like 蛋白, 这些基因在 15 号染色体上成簇分布, 推测是通过串联复制进化而来^[76]。转录组测序结果显示, Pru ar 1-like 蛋白在橡胶树响应真菌效应蛋白 (如 cassicolin Cas1) 时显著上调; 而 MLP-like 蛋白在白粉菌 (*Oidium heveae*) 感染时下调, 可能参与负调控^[76]。MLP-like 蛋白也在一些胶乳的蛋白质组学研究中被鉴定^[77-78]。

2.9 类防卫素家族 (PR-12)

防卫素是一类广泛存在于动植物中的小分子抗微生物多肽 (AMPs), 具有广谱抗菌活性。然而, 迄今橡胶树中的 AMPs 仍缺乏深入研究。有学者从获取了橡胶树基因组 (ASM165405v1,

NCBI) 中的 7 个防御素基因序列, 其翻译产物的分子量介于 8.3~10.8 kDa 间, 符合 AMPs 的典型特征 (<10 kDa)。这些防御素的等电点多数大于 7, 表明其为阳离子多肽, 有利于与带负电的微生物膜相互作用^[79]。也有研究尝试从橡胶树胶乳中分离小肽, 但未报道所鉴定多肽的氨基酸序列^[80]。橡胶树中 AMPs 的研究仍需进一步深入。

2.10 其他

目前暂无关于橡胶树硫素蛋白 (Thionin, PR-13)、脂质转移蛋白 (PR-14) 和草酸氧化酶 (PR-15) 等在抗逆方面的报道。已有橡胶树脂质转移蛋白过敏性相关报道^[81-83]。对基因组数据库进行检索, 发现橡胶树脂质转移蛋白构成了一个较大的蛋白家族。此外, 天然橡胶合成过程中, 脂质转移蛋白可能负责为橡胶粒子膜补充脂质。

3 橡胶树 PR 蛋白与乳管堵塞

割胶 (即切割乳管) 后, 从橡胶树乳管中流出胶乳, 一段时间后, 自切口往内的一小段乳管内将发生堵塞, 进而停止排胶。乳管堵塞的快慢及排胶时间长短是影响橡胶树产量的关键因素。目前乳管堵塞的机制主要有 3 种假说: 电中和假说、凝集素假说和蛋白质网假说。这些假说在解释乳管堵塞及胶乳凝固机制中存在诸多差异, 都涉及了一些高丰度 PR 蛋白的作用。

电中和假说认为, 乳管切口处流出的胶乳通过凝固实现伤口封闭, 这一过程涉及黄色体的破裂并释放氢离子、金属阳离子和碱性蛋白/阳离子蛋白, 它们中和橡胶粒子表面的负电荷, 并导致橡胶粒子凝聚^[84]。 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶属于碱性蛋白或阳离子蛋白。Hevein 为酸性蛋白, 且在 B-乳清中以超高丰度存在。有研究认为 Hevein 中和了黄色体中的碱性蛋白, 从而有利于排胶^[85]。

凝集素假说为 Hevein 在乳管堵塞中的作用提供了相反的解释。该假说认为, 黄色体破裂后释放的凝集素 Hevein 以二价形式结合橡胶粒子表面的 22 kDa 糖蛋白受体 (氨基酸序列未明确), 促使橡胶粒子交联形成凝固网络。这一过程依赖于 Hevein 对 N-乙酰-D-葡萄糖胺 (GlcNAc) 的钙离子依赖性识别。这种结合导致橡胶粒子聚集, 从而在乳管切口附近形成堵塞。几丁质酶则被认为可以分解受体上的 GlcNAc, 从而缓解凝集素的凝集效应, 是有利于产量的因素^[86-88]。

蛋白质网假说由 HAO 等^[89]提出, 并由 SHI 等^[90]进一步完善。该假说认为, Hevein、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等 B-乳清来源的 PR 蛋白, 与肌动蛋白共同形成蛋白质网, 截留橡胶粒子、黄色体及黄色体碎片, 导致乳管堵塞。这一假说与凝集素假说中几丁质酶的作用存在明显矛盾。根据蛋白质网假说, β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶的作用是促进乳管堵塞, 从而不利于胶乳产量。然而, 有研究认为 35 kDa 的 β -1,3-葡聚糖酶 (糖基化程度高) 与高产和 TPD (割面干涸) 耐受相关, 而 32 kDa 的 β -1,3-葡聚糖酶 (糖基化程度低) 可能与低产和 TPD 相关^[91]。另一项研究也报道了 β -1,3-葡聚糖酶与胶乳产量的正相关性^[92], 其解释为 β -1,3-葡聚糖酶通过溶解愈伤组织中的胼胝质以减缓乳管堵塞 (此解释可能不合理)。几丁质酶的表达增加有助于排胶的观点获得黄瑾等研究的支持^[87-88]。而转录水平的研究显示, 在排胶晚期, β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶的转录本下调^[93], 表明其相应蛋白质合成已经减缓 (而不是增加)。

上述关于 Hevein、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等蛋白质如何影响乳管堵塞的对立观点表明, 这些蛋白质的表达对乳管堵塞与胶乳产量的影响仍需深入研究, 了解这些信息是进一步进行遗传改良的基础和依据。

4 橡胶树 PR 蛋白的过敏性

橡胶树 PR 蛋白的过敏性不作详述, 仅列出橡胶树过敏原与 PR 蛋白的对应关系 (表 1)。如前一节所述, 在不同的橡胶树品系中, β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等关键过敏原的丰度存在差异, 因此胶乳过敏原性的强弱也可能存在差异。在产量问题得到解决后, 可根据需要选育低过敏原的橡胶树, 或者通过基因编辑等技术手段降低 Hevein、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶等高丰度蛋白的过敏性 (如修改抗原表位或糖基化位点的氨基酸残基)。

5 PR 蛋白在橡胶树转基因育种中的应用

转基因技术是基因功能验证和作物抗病抗逆性改良的重要手段。目前, 几丁质酶 (PR-3/4/8/11)、葡聚糖酶 (PR-2)、类甜蛋白 (PR-5)、防卫素 (PR-12) 和草酸氧化酶 (PR-15/16) 等 PR 蛋白基因已被成功转入水稻、小麦、马铃薯和

表 1 橡胶树胶乳过敏原与 PR 蛋白的对应关系

Tab. 1 Correspondence between latex allergens of rubber trees and PR proteins

过敏原编号 Allergen	名称 Identification	分子量 kDa	交叉反应性 Cross reactivity	PR 编号 PR No.
Hev b 1	橡胶延伸因子(REF)	14.6	木瓜蛋白酶	-
Hev b 2	β -1,3-葡聚糖酶	41.3	其他葡聚糖酶	PR-2
Hev b 3	小橡胶粒子蛋白 (SRPP)	23.0	-	-
Hev b 4	微螺旋蛋白	50.0~57.0	-	-
Hev b 5	酸性蛋白	16.0	猕猴桃酸蛋白	-
Hev b 6.01	前橡胶素	20.0	几丁质酶 (香蕉、鳄梨)	PR-4
Hev b 6.02	橡胶素	4.7	几丁质酶 (香蕉、鳄梨、栗子)	PR-4
Hev b 6.03	橡胶素 C	14.0	-	-
Hev b 7	马铃薯同源物	42.9	茄科植物中的储存蛋白	-
Hev b 8	脯氨酰蛋白	14.0	泛过敏原	-
Hev b 9	烯醇化酶	51.0	-	-
Hev b 10	超氧化物歧化酶	26.0	-	-
Hev b 11	I 类几丁质酶	33.0	泛过敏原	PR-3
Hev b 12	脂质转移蛋白	9.3	泛过敏原	PR-14
Hev b 13	酯酶	42.0	-	-
Hev b 14	Hevamine (几丁质酶+溶菌酶活性)	30.0	-	PR-8
Hev b 15	丝氨酸蛋白酶抑制剂	60.0~90.0	PR-6	PR-6

注：过敏原资料引自文献[94]；“-”表示缺少相关信息。

Note: Allergen information is cited from the literature[94]; “-” indicates missing relevant information.

大豆等作物，显著增强了这些作物的抗病性^[4]。然而，将外源 PR 基因引入橡胶树的研究仍处于起步阶段。目前仅有 PR-5 基因被引入橡胶树，通过农杆菌介导、以 CaMV35S 启动子驱动的方式，将烟草的渗透蛋白 (PR-5) 基因在橡胶树合子胚来源的胚性愈伤组织中表达，获得较高的转化效率并成功再生出植株^[18]。该研究的目标是增强橡胶树对盐、干旱、低温和病原等胁迫的响应能力以及细胞渗透调节能力，但相关效果未有进一步报道。另一项类似的研究将烟草渗透蛋白基因转入橡胶树未成熟花药诱导的胚性愈伤组织，结果显示，在 6% PEG 胁迫下，转基因愈伤组织的脯氨酸（一种渗透保护剂）含量较对照组提高近 2 倍；在 150 mmol/L NaCl 胁迫下，转基因愈伤组织的存活率为 72%，而对照组仅为 3.2%^[19]。

橡胶树转基因改造需综合考虑抗病/抗逆性、乳管堵塞/产量以及过敏原性等因素，有选择地进行基因引入和表达调控。PR 蛋白的协同作用至关重要，采用多基因共转化策略进行转基因改良可显著提升橡胶树的抗逆性^[4]。通过选择合适的橡胶树内源启动子，可以实现 PR 蛋白在橡胶树中的组织特异性表达或组成性表达（高自然抗病性植物通常组成性表达 PR 蛋白），进而调控其表

达量。以 *Hev2.1* 启动子为例，虽其在胶乳中特异性表达，但因具有光敏特性，也可在叶片中诱导表达^[95]，从而为橡胶树的抗病抗逆改良提供更多可能性。

6 展望

橡胶树 PR 蛋白在植物抗逆性、乳管堵塞和过敏原性等方面发挥多重作用，在转基因育种中具有重要应用价值。深入研究 PR 蛋白的作用机制和调控网络，将为提高橡胶树的抗逆性、产量和质量提供新的策略。未来的研究应加强 PR 蛋白作用机制的解析，特别是深入探究几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶等蛋白的表达量与橡胶产量的关系，同时重视对 PR-14 等尚未充分研究的蛋白种类的功能研究，开发精准的分子育种技术，为橡胶树品种改良提供理论依据和技术支撑。

参考文献

- [1] ISLAM M M, EL-SAPPAH A H, ALI H M, ZANDI P, HUANG Q, SOAUD S A, ALAZIZI E M Y, WAFI H A, HOSSAIN M A, LIANG Y. Pathogenesis-related proteins (PRs) countering environmental stress in plants: a review[J]. South African Journal of Botany, 2023, 160: 414-427.

- [2] JOSHI V, JOSHI N, VYAS A, JADHAV S K. Pathogenesis-related proteins: role in plant defense[M]//JOGAIAH S. Biocontrol agents and secondary metabolites. Cambridge: Woodhead Publishing, 2021: 573-590.
- [3] DOS SANTOS C, FRANCO O L. Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses[J]. *Plants*, 2023, 12: 2226.
- [4] SHARMA D, KAUR A, KAUR S, KAUR SARAO N, KAUR A. Pathogenesis-related proteins and their transgenic expression for developing disease-resistant crops: strategies progress and challenges[M]//WANG H. Case studies of breeding strategies in major plant species. Rijeka: IntechOpen, 2022.
- [5] ARCHER B L. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. isolation and characterization of crystalline hevein[J]. *Biochemical Journal*, 1960, 75(2): 236-240.
- [6] SUBROTO T, DE VRIES H, SCHURINGA J J, SOEDJANAATMADJA U M S, HOFSTEENGE J, JEKEL P A, BEINTEMA J J. Enzymic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (luteoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39(12): 1047-1055.
- [7] WANG X, SHI M, WANG D, CHEN Y, CAI F, ZHANG S, WANG L, TONG Z, TIAN W M. Comparative proteomics of primary and secondary luteoids reveals that chitinase and glucanase play a crucial combined role in rubber particle aggregation in *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(11): 5146-5159.
- [8] HAVANAPAN P O, BOURCHOOKARN A, KETTERMAN A J, KRITTANAI C. Comparative proteome analysis of rubber latex serum from pathogenic fungi tolerant and susceptible rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 131: 82-92.
- [9] SUN J T, WANG H X, LV W P, MA C Y, LOU Z X, YAO H, DAI Y X. Cloning and expression of a thermostable β -1,3-1,4- glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(3): 1235-1242.
- [10] MARTIN M N. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1991, 95(2): 469-476.
- [11] KANOKWIROON K, TEANPAISAN R, WITITSUW-ANNAKUL D, HOOPER A B, WITITSUWANNAKUL R. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms[J]. *Mycoses*, 2008, 51(4): 301-307.
- [12] VAN PARIJS J, BROEKAERT W F, GOLDSTEIN I J, PEUMANS W J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex[J]. *Planta*, 1991, 183(2): 258-264.
- [13] RODRÍGUEZ-ROMERO A, HERNÁNDEZ-SANTOYO A, FUENTES-SILVA D, PALOMARES L A, MUÑOZ-CRUZ S, YÉPEZ-MULIA L, OROZCO-MARTÍNEZ S. Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2(endo- β -1, 3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(Pt 2): 329-341.
- [14] ROZEBOOM H J, BUDIANI A, BEINTEMA J J, DIJKSTRA B W. Crystallization of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 212(3): 441-443.
- [15] MARTÍNEZ-CABALLERO S, CANO-SÁNCHEZ P, MARES-MEJÍA I, DÍAZ-SÁNCHEZ A G, MACÍAS-RUBALCAVA M L, HERMOSO J A, RODRÍGUEZ-ROMERO A. Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain[J]. *The FEBS Journal*, 2014, 281(19): 4535-4554.
- [16] RODRÍGUEZ A, TABLERO M, BARRAGÁN B, LARA P, RANGEL M, ARREGUÍN B, POSSANI L, SORIANO-GARCÍA M. Crystallization of hevein: a protein from latex of *Hevea brasiliensis*(rubber Tree)[J]. *Journal of Crystal Growth*, 1986(3): 710-714.
- [17] ASENSIO J L, CANADA F J, BRUIX M, RODRIGUEZ-ROMERO A, JIMENEZ-BARBERO J. The interaction of Hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 230(2): 621-633.
- [18] REKHA K, NAZEEM P A, VENKATACHALAM P, JAYASHREE R, SOBHA S, SUSHAMA KUMARI S. Development of osmotin transgenics in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. using explants of zygotic origin[J]. *Journal of Tropical Agriculture*, 2014, 52(1): 7-20.
- [19] REKHA K, NAZEEM P A, VENKATACHALAM P, JAYASHREE R, SOBHA S, AKSHARA S R, MATHEW S A, SUSHAMAKUMARI S. Expression of stress tolerance in transgenic callus integrated with osmotin gene in *Hevea Brasiliensis*[J]. *Rubber Science*, 2016, 2(29): 140-152.
- [20] SINGH R S, TIWARI J, SHARMA V, SINGHB P, RAWAT S. Role of pathogen related protein families in defence mechanism with potential role in applied biotechnology[J]. *International Journal of Advanced Research*, 2014, 2: 210-226.
- [21] SOEDJANAATMADJA U M S, SUBROTO T, BEINTEMA J J. Processed products of the hevein precursor in the latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. *FEBS Letters*, 1995, 363(3): 211-213.
- [22] BROEKAERT I, LEE H I, KUSH A, CHUA N H, RAIKHEL N. Wound-induced accumulation of mRNA con-

- taining a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(19): 7633-7637.
- [23] BERTHELOT K, LECOMTE S, COULARY-SALIN B, BENTALEB A, PERUCH F. *Hevea brasiliensis* prohevein possesses a conserved C-terminal domain with amyloid-like properties *in vitro*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2016, 1864(4): 388-399.
- [24] BERTHELOT K, PERUCH F, LECOMTE S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro) hevein proteins[J]. Biochimie, 2016, 127: 258-270.
- [25] ARCHER B L, AUDLEY B G, MCSWEENEY G P, HONG T C. Studies on composition of latex serum and "bottom fraction" particles[J]. Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia, 1969, 21(4): 560-569.
- [26] BEINTEMA J J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins[J]. FEBS Letters, 1994, 350(2): 159-163.
- [27] MAUCH F, MAUCH-MANI B, BOLLER T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and beta-1,3-glucanase[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3): 936-942.
- [28] BROGUE K, CHET I, HOLLIDAY M, CRESSMAN R, BIDDLE P, KNOWLTON S, MAUVAIS C J, BROGLIE R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Science, 1991, 254(5035): 1194-1197.
- [29] ARCHER B L. Hevamine: a crystalline basic protein from *Hevea brasiliensis* latex[J]. Phytochemistry, 1976, 15(2): 297-300.
- [30] TATA S J, BEINTEMA J J, BALABASKARANS S. The lysozyme of *Hevea brasiliensis* latex: isolation, purification, enzyme kinetics and a partial amino-acid sequence[J]. Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia, 1983, 31(1): 35-48.
- [31] BOKMA E, VAN KONINGSVELD G A, JERONIMUS-STRATINGH M, BEINTEMA J J. Hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme[J]. FEBS Letters, 1997, 411(2/3): 161-163.
- [32] THANSEEM I, JOSEPH A, THULASEEDHARAN A. Induction and differential expression of β -1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*[J]. Tree Physiology, 2005, 25(11): 1361-1368.
- [33] SUNPAPAO A, PORNSURIYA C. Overexpression of β -1,3-glucanase gene in response to *Phytophthora palmivora* infection in leaves of *Hevea brasiliensis* clones[J]. Agriculture Technology and Biological Sciences, 2016, 13(1): 35-43.
- [34] NYAKA NGOBISA A I C. Characterisation and pathogenicity of *Neofusicoccum ribis* and gene expression study of pathogenesis-related genes in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)[D]. Selangor: Universiti Putra Malaysia, 2014.
- [35] NYAKA NGOBISA A I C, NTSOMBOH-NTSEFONG G, YUN W M, DZARIFAH M Z, NDONGO P A O. Transcriptional expression of three putative pathogenesis-related proteins in leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) inoculated with *Neofusicoccum ribis*[J]. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 2016, 4: 11-15.
- [36] WORAATHASIN N, KORAKOT N, NUALSRI C. Expression responses of pathogenesis-related proteins in tolerant and susceptible *hevea brasiliensis* clones to the white root disease[J]. Pakistan Journal of Biotechnology, 2017, 14(2): 141-148.
- [37] GARCIA D, CARELS N, ARAUJO DE SOUZA L, KOOP DANIELA M, PUJADE-RENAUD V, DA SILVA D C, MATTOS CARLOS RAIMUNDO R, CASCARDO JULIO CEZAR M. Transcriptome comparison of resistant and susceptible *Hevea brasiliensis* cultivars infected by *Microcyclus ulei*[C]//IRRDB Workshop on the *Hevea* Genome and Transcriptome, Montpellier, France, 2009.
- [38] OGHENEKARO A O, OMORUSI V I, ASIEGBU F O. Defence-related gene expression of *Hevea brasiliensis* clones in response to the white rot pathogen, *Rigidoporus microporus*[J]. Forest Pathology, 2016, 46(4): 318-326.
- [39] LI X, BI Z, DI R, LIANG P, HE Q, LIU W, MIAO W, ZHENG F. Identification of powdery mildew responsive genes in *Hevea brasiliensis* through mRNA differential display[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(2): 181.
- [40] 黎瑜, 白先权, 曾日中, 段翠芳. 割胶和水杨酸刺激对胶乳中蛋白质代谢及 β -1,3-葡聚糖酶活性的影响[J]. 热带农业科学, 2004, 24(5): 1-4.
- LI Y, BAI X Q, ZENG R Z, DUAN C F. Effects of exploitation and exogenous salicylic acid on protein metabolism and activity of β -1,3-Glucanase in latex from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2004, 24(5): 1-4. (in Chinese)
- [41] YANG H, DAI L, LIU M, FAN X, LU L, GUO B, WANG Z, WANG L. Integrative analysis of transcriptome and metabolome reveals how ethylene increases natural rubber yield in *Hevea brasiliensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1444693.
- [42] DAI L, KANG G, NIE Z, LI Y, ZENG R. Comparative proteomic analysis of latex from *Hevea brasiliensis* treated with Ethrel and methyl jasmonate using iTRAQ-coupled two-

- mensional LC-MS/MS[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 132: 167-175.
- [43] RIBEIRO S, LABEL P, GARCIA D, MONTORO P, PUJADE-RENAUD V. Transcriptome profiling in susceptible and tolerant rubber tree clones in response to cassiicolin Cas1, a necrotrophic effector from *Corynespora cassiicola*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(7): e0254541.
- [44] KRISHNAN A, JOSEPH L, ROY C B. An insight into *Hevea-Phytophthora* interaction: the story of *Hevea* defense and *Phytophthora* counter defense mediated through molecular signalling[J]. *Current Plant Biology*, 2019, 17: 33-41.
- [45] TONG Z, SUN Y, WANG D, WANG L, LI L, MENG X, FENG W, WURTELE E S, WANG X. Identification and functional characterization of *HbOsmotin* from *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 109: 171-180.
- [46] ZHANG X D, WANG L J, HE C Z, LUO H L. An efficient transient mesophyll protoplast system for investigation of the innate immunity responses in the rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2016, 126(2): 281-290.
- [47] SUNG Y C, OUTRAM M A, BREEN S, WANG C, DAGVADORJ B, WINTERBERG B, KOBE B, WILLIAMS S J, SOLOMON P S. PR1-mediated defence via C-terminal peptide release is targeted by a fungal pathogen effector[J]. *New Phytologist*, 2021, 229(6): 3467-3480.
- [48] 罗红丽, 秦云霞, 闫志焯, 向鹏. 巴西橡胶树病程相关蛋白基因(*HbPR1*)的克隆及分析[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(8): 1499-1502.
- LUO H L, QIN Y X, YAN Z Y, XIANG P. Cloning and expression analysis of gene encoding pathogenesis-related protein1 in *Hevea brasiliensis*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(8): 1499-1502. (in Chinese)
- [49] WORAATHASIN N, NAKKANONG K, NUALSRI C. Cloning and expression analysis of *HbPR-1b* and *HbPR-3* in *Hevea brasiliensis* during inoculation with *Rigidoporus microporus*[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2017, 20(5): 233-243.
- [50] DE ANDRADE JUNIOR S J. Analise de genes diferencialmente expressos na interaçao *Hevea brasiliensis-Microcyclus ulei*[D]. Br sil: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2008.
- [51] KHUNJAN U, EKCHAWENG K, PANRAT T, TIAN M, CHURNGCHOW N. Molecular cloning of *HbPR-1* gene from rubber tree, expression of *HbPR-1* gene in *Nicotiana benthamiana* and its inhibition of *Phytophthora palmivora*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157591.
- [52] ARCHER B L. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex[J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(3): 633-639.
- [53] MUSOOR A. Cloning and characterization of cDNA clone encoding protease inhibitor from latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[D]. Hatyai: Prince of Songkla University, 2008.
- [54] BUNYATANG O, CHIRAPONGSATONKUL N, CHURNGCHOW N. Purification of a protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* cell suspension and its effect on the growth of *Phytophthora palmivora*[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 22(2): 185-192.
- [55] CHINNAPUN D, PALIPOCH S, HONGPHRUK H. Cloning and characterization of a putative gene encoding serine protease inhibitor (251 Hbpi) with antifungal activity against *Trichophyton rubrum* from *Hevea brasiliensis* leaves[J]. *Plant Omics*, 2016, 9: 142-148.
- [56] CHINNAPUN D, PALIPOCH S. Isolation, expression, and characterization of the serine protease inhibitor gene (600 Hbpi) from *Hevea brasiliensis* leaves, RRIM600 cultivar[J]. *Plant Omics*, 2017, 10: 134-138.
- [57] PUTRANTO R A, SISWANTO, MULYATNI A S, BUDIANI A, TISTAMA R. Purification, characterization, and bioassay of putative protease inhibitors from *Hevea brasiliensis* latex[J]. *Menara Perkebunan*, 2017, 84(2): 220.
- [58] BANGRAK P, CHOTIGEAT W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(3): 244-250.
- [59] EKCHAWENG K, KHUNJAN U, CHURNGCHOW N. Molecular cloning and characterization of three novel subtilisin-like serine protease genes from *Hevea brasiliensis*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2017, 97: 79-95.
- [60] LYNN K R, CLEVETTE-RADFORD N A. Purification and characterization of hevain, a serine protease from *Hevea brasiliensis*[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(5): 963-964.
- [61] EKCHAWENG K, EVANGELISTI E, SCHORNACK S, TIAN M, CHURNGCHOW N. The plant defense and pathogen counterdefense mediated by *Hevea brasiliensis* serine protease HbSPA and *Phytophthora palmivora* extracellular protease inhibitor PpEPI10[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175795.
- [62] CHINNAPUN D, TIAN M, DAY B, CHURNGCHOW N. Inhibition of a *Hevea brasiliensis* protease by a Kazal-like serine protease inhibitor from *Phytophthora palmivora*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2009, 74(1): 27-33.
- [63] PENG S Q, ZHU J H, LI H L, TIAN W M. Cloning and characterization of a novel cysteine protease gene (*HbCPI*) from *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal of Biosciences*, 2008, 33(5): 681-690.

- [64] 邹智, 刘建汀, 庄美露, 杨礼富. 橡胶树半胱氨酸蛋白酶基因 HbCP2 的克隆与表达特性分析[J]. 西南林业大学学报, 2014, 34(4): 26-30.
ZOU Z, LIU J T, ZHUANG M L, YANG L F. Molecular cloning and expression analysis of a cysteine protease gene (*HbCP2*) from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2014, 34(4): 26-30. (in Chinese)
- [65] ZOU Z, XIE G S, YANG L F. Papain-like cysteine protease encoding genes in rubber (*Hevea brasiliensis*): comparative genomics, phylogenetic, and transcriptional profiling analysis[J]. *Planta*, 2017, 246(5): 999-1018.
- [66] AMPON K H, SALLEH M. Preliminary studies of acid protease and its inhibitor in latex of *Hevea brasiliensis*[D]. Kuala Lumpur: Universiti Putra Malaysia, 1990.
- [67] DUTSADEE C, NUNTA C. Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitor and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2008, 72(4): 179-187.
- [68] CHANWUN T, MUHAMAD N, CHIRAPONGSATONKUL N, CHURNGCHOW N. *Hevea brasiliensis* cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization[J]. *AMB Express*, 2013, 3(1): 14.
- [69] NARASIMHAN K, KOTHANDARAMAN R, THULASE-EDHARAN A. Detection of pathogenesis related proteins in *Hevea brasiliensis* infected by *phytophthora meadii*[J]. *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 2000, 13(1): 30-37.
- [70] ANNAMALAINATHAN K. Quantitative expression analysis of stress responsive genes under cold stress in *Hevea brasiliensis*[J]. *Rubber Science*, 2012, 25(2): 199-203.
- [71] SIDDIQUI N, MIDDLETON C, RIBEIRO C, ATAN S, DI COLA A. Gel-based proteomic study for differential expression of *Hevea brasiliensis* root proteins in response to infection by soil fungus *Rigidoporus microporus*[M]/III International Conference on Agricultural and Food Engineering. Leuven: International Society for Horticultural, Science, 2017.
- [72] FUJITA K, INUI H. Review: biological functions of major latex-like proteins in plants[J]. *Plant Science*, 2021, 306: 110856.
- [73] NESSLER C L, ALLEN R D, GALEWSKY S. Identification and characterization of latex-specific proteins in opium poppy[J]. *Plant Physiology*, 1985, 79(2): 499-504.
- [74] OZBER N, CARR S C, MORRIS J S, LIANG S, WATKINS J L, CALDO K M, HAGEL J M, NG K K S, FACCHINI P J. Alkaloid binding to opium poppy major latex proteins triggers structural modification and functional aggregation[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6768.
- [75] LONGSAWARD R, PENGNOO A, KONGSAWADWORAKUL P, VIBOONJUN U. A novel rubber tree PR-10 protein involved in host-defense response against the white root rot fungus *Rigidoporus microporus*[J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 157.
- [76] LONGSAWARD R, VIBOONJUN U. Genome-wide identification of rubber tree pathogenesis-related 10 (PR-10) proteins with biological relevance to plant defense[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 1072.
- [77] WANG X C, WANG D, SUN Y, YANG Q, CHANG L L, WANG L M, MENG X R, HUANG Q X, JIN X, TONG Z. Comprehensive proteomics analysis of laticifer latex reveals new insights into ethylene stimulation of natural rubber production[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13778.
- [78] WANG D, XIE Q L, SUN Y, TONG Z, CHANG LL, YU L, ZHANG X Y, YUAN B X, HE P, JIN X, DONG Y Y, LI H B, MONTORO P, WANG X C. Proteomic landscape has revealed small rubber particles are crucial rubber biosynthetic machines for ethylene-stimulation in natural rubber production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5082.
- [79] PASEEHA M, ELVITIGALA D A, BANDARA D, RAJAPAKSHA D, ATTANAYAKA T. *In silico* characterization of a group of anti-microbial peptides: defensins from *Hevea brasiliensis*[C]/Agricultural Research Symposium, Sri Lanka: Waymba University, 2022: 291-295.
- [80] HAVANAPAN P, PHUNGTHANOM N. Peptidomic and bioinformatic analysis to evaluate the application of peptides from latex of *Hevea brasiliensis* clone BPM24[J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2019, 526: 012037.
- [81] FABER M A, SABATO V, BRIDTS C H, NAYAK A, BEEZHOLD D H, EBO D G. Clinical relevance of the *Hevea brasiliensis* lipid transfer protein Hev b 12[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 135(6): 1645-1648.
- [82] BEEZHOLD D H, HICKEY V L, KOSTYAL D A, PUHL H, ZUIDMEER L, VAN REE R, SUSSMAN G L. Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein[J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2003, 90(4): 439-445.
- [83] RIHS H P, RUÉFF F, LUNDBERG M, ROZYNEK P, BARBER D, SCHEURER S, CISTERÓ-BAHIMA A, BRÜNING T, RAULF-HEIMSOTH M. Relevance of the recombinant lipid transfer protein of *Hevea brasiliensis*: IgE-binding reactivity in fruit-allergic adults[J]. *Annals of*

- Allergy, Asthma & Immunology, 2006, 97(5): 643-649.
- [84] SOUTHORN W A. Physiology of *Hevea* (latex flow)[J]. Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia, 1969, 21(4): 494-512.
- [85] SOEDJANAATMADJA U, SUBROTO T, BEINTEMA J, SOEDIGDO S. Does hevein stabilise or destabilise rubber latex?[J]. Journal of Rubber Research, 1999, 2(2): 69-77.
- [86] GIDROL X, CHRESTIN H, TAN H L, KUSH A. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(12): 9278-9283.
- [87] 黄瑾, 校现周. 乙烯利和乙烯刺激对橡胶树胶乳中几丁质酶活性和胶乳产量的影响[J]. 热带作物学报, 2003, 24(4): 1-5.
HUANG J, XIAO X Z. Effects of ethrel treatment on chitinase activity in latex of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2003, 24(4): 1-5. (in Chinese)
- [88] 黄瑾, 校现周, 金志强. 橡胶树胶乳几丁质酶基因表达的品种差异[J]. 热带作物学报, 2004, 25(1): 1-5.
HUANG J, XIAO X Z, JIN Z Q. Differences of chitinase gene expression in latex from 3 *Hevea* clones[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2004, 25(1): 1-5. (in Chinese)
- [89] HAO B Z, JI-LIN W U, MENG C X, GAO Z Q, TAN H Y. Laticifer wound plugging in *Hevea brasiliensis*: the role of a protein-network with rubber particle aggregations in stopping latex flow and protecting wounded laticifers[J]. Journal of Rubber Research, 2004, 7(4): 281-299.
- [90] SHI M, LI Y, DENG S, WANG D, CHEN Y, YANG S, WU J, TIAN W M. The formation and accumulation of protein-networks by physical interactions in the rapid occlusion of laticifer cells in rubber tree undergoing successive mechanical wounding[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 8.
- [91] ELIATHE E A A, EDMOND K K, MATHURIN O K, JUSTIN L Y, PIERRE N G A S, KOUADIO D K, ABDOURAHMANE S. Detection of *Hevea brasiliensis* clones yield potential and susceptibility to tapping panel dryness in Côte d'Ivoire using the 32 and 35 KDa lutoic proteins[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 44(11): 10200-10206.
- [92] SUBROTO T, VAN KONINGSVELD G A, SCHREUDER H A, SOEDJANAATMADJA U M S, BEINTEMA J J. Chitinase and β -1,3-glucanase in the lutoic-body fraction of *Hevea latex*[J]. Phytochemistry, 1996, 43(1): 29-37.
- [93] CHAO J, YANG S, CHEN Y, TIAN W M. Transcript profiling of *Hevea brasiliensis* during latex flow[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1904.
- [94] PARISI C A S, KELLY K J, ANSOTEGUI I J, GONZALEZ-DÍAZ S N, BILÒ M B, CARDONA V, PARK H-S, BRASCHI M C, MACIAS-WEINMANN A, PIGA M A, ACUÑA-ORTEGA N, SÁNCHEZ-BORGES M, YAÑEZ A. Update on latex allergy: new insights into an old problem[J]. World Allergy Organization Journal, 2021, 14(8): 100569.
- [95] MONTORO P, LAGIER S, BAPTISTE C, MARTEAUX B, PUJADE-RENAUD V, LECLERCQ J, ALEMANN L. Expression of the *HEV2.1* gene promoter in transgenic *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2008, 94(1): 55-63.