

橡胶树 HbPIP2;3 的亚细胞定位与多聚化分析

邹 智¹, 乔雪莹¹, 郑玉皎¹, 阳江华²

1. 热带作物生物育种全国重点实验室/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/三亚研究院, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南海口 571101

摘 要: 水通道蛋白是一类高效转运水分子的膜内在蛋白, 其在生物膜上以四聚体的形式起作用。天然橡胶在橡胶树的乳管细胞中特异合成, 并在割胶过程以胶乳的形式被排出。胶乳系乳管细胞的胞质成分, 其含水量高达 70%, 水分通过调节胶乳的粘稠度和乳管膨压进而影响橡胶树的产排胶能力, 是决定胶乳产量的关键因素。前期研究显示, 橡胶树乳管的水分平衡主要由质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic protein, PIP)特别是 HbPIP2;3 介导。为揭示 HbPIP2;3 调控乳管水分平衡的分子机制, 本研究采用 RT-PCR 技术对其 861 bp 的编码区进行分离。序列分析显示: HbPIP2;3 预测编码 286 个氨基酸, 理论分子量为 30.58 kDa, 等电点为 8.50, 不稳定系数为 31.68, 总平均疏水指数为 0.449, 为稳定的疏水型碱性蛋白; 该蛋白含有保守的 MIP 结构域, 其中包括 6 个典型的跨膜螺旋和 2 个半螺旋; 基于同源建模的 3D 结构预测显示其可以形成同源四聚体。生物信息学预测和在烟草叶片中的亚细胞定位分析显示, HbPIP2;3 定位在细胞膜, 这同时也得到了双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)实验的证实。BiFC 实验显示, HbPIP2;3 可在细胞膜上形成同源四聚体, 这进一步得到酵母双杂交结果的验证。本研究结果表明, HbPIP2;3 可通过同源四聚体的方式调控乳管的水分平衡, 但是否存在异源互作模式还有待进一步研究。

关键词: 乳管; 水通道蛋白; 亚细胞定位; 双分子荧光互补; 酵母双杂交

中图分类号: S794.1

文献标识码: A

Subcellular Localization and Multimerization Analyses of HbPIP2;3, an Efficient Water Transporter from *Hevea brasiliensis*

ZOU Zhi¹, QIAO Xueying¹, ZHENG Yujiao¹, YANG Jianghua²

1. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions / Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Aquaporins (AQPs), assembled in tetramers at the biological membrane, constitute a class of integral membrane proteins facilitating the passive transport of water. Natural rubber, which is specifically synthesized in the laticifer located in the secondary phloem of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) trunk, is expelled out in the form of latex that represents the cytoplasmic content of laticiferous cells upon tapping. Water, accounting for approximately 70% of the latex upon each tapping, plays a crucial role in the latex production by regulating the latex viscosity and laticifer turgor. Previous studies suggested that the water balance of laticifers is governed by plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) especially HbPIP2;3, an efficient and abundant water transporter. To uncover the regulation mechanism of HbPIP2;3 in the laticifer water balance, its 861 bp full-length coding sequence (CDS) was isolated using RT-PCR. Sequence analysis revealed that HbPIP2;3 putatively encoded 286 amino acids with the theoretical molecular weight (MW) of 30.58 kDa, the isoelectric point (pI) of 8.50, the instability index (II) of 31.68, and the grand average of hydropathicity (GRAVY) of 0.449, implying its basic, hydrophobic, and stable features. The protein was shown to contain one conserved MIP (major

收稿日期 2022-12-26; 修回日期 2023-01-14

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31971688, No. 31700580); 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC705)。

作者简介 邹 智 (1982—), 男, 硕士研究员, 研究方向: 基因组进化与逆境适应机制、油脂代谢与调控; E-mail: zouzhi2008@126.com。

intrinsic protein) domain, which including six typical transmembrane helices (i.e. TM1-6) as well as two half helices (i.e. HB and HE). 3D prediction via homology modeling suggested that HbPIP2;3 could assemble in homotetramer. In accordance with the bioinformatics prediction, transient over-expression of HbPIP2;3 in *Nicotiana benthamiana* leaves supported the cell membrane localization, which was also confirmed by bimolecular fluorescence complementation (BiFC). Moreover, BiFC revealed that HbPIP2;3 could interact itself, which was further confirmed by yeast two-hybrid. The results showed that HbPIP2;3 may be involved in the laticifer water balance in the form of homotetramer at the plasma membrane, however, whether it could also function in heterotetramer still needs to be addressed.

Keywords: laticifer; aquaporin; subcellular localization; BiFC; yeast two-hybrid

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.03.001

质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic protein, PIP) 是一类原始而高度保守的水通道蛋白 (aquaporin, AQP) [1]。根据进化关系和序列特征, PIP 可分为 PIP1 和 PIP2 两个亚类, 前者具有较长的 N 端, 而后者具有较长的 C 端 [2-7]。在蟾蜍卵母细胞中的体外分析显示, PIP2 具有高效的水分转运活性, 而 PIP1 无活性或活性极低, 究其原因主要是因 PIP1 不能有效定位到细胞膜所致 [8-14]。在玉米原生质中亚细胞定位分析显示, 隶属于 PIP2 亚类的 ZmPIP2;1 和 ZmPIP2;5 定位在细胞膜, 而属 PIP1 亚类的 ZmPIP1;1、ZmPIP1;2 和 ZmPIP1;6 均定位在内质网 [9]。虽然 PIP 单体本身就具有水分转运活性, 但其在生物膜上以四聚体的形式起作用 [15]。PIP 不仅可形成同源四聚体, 同时也可以形成异源四聚体 [15-18]。

橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) 隶属于大戟科, 是天然橡胶的主要商业来源 [19-21]。生产上, 橡胶通过用胶刀周期性地切割树皮收集胶乳而获得。胶乳系乳管细胞的胞质成分, 水分含量 60%~70%, 水分通过调节胶乳的粘稠度和乳管膨压进而影响橡胶树的产排胶能力, 是决定胶乳产量的关键因素 [4, 11, 14, 22]。通过前期研究, 本团队鉴定到 1 个在乳管中高丰度表达的 AQP 基因, 即 HbPIP2;3, 发现该基因的表达水平与品系的胶乳产量和水分含量呈正相关, 且该基因在蟾蜍中过表达可显著提高卵母细胞的水分透性 [4, 14]。为揭示 HbPIP2;3 调控乳管水分平衡的分子机制, 本研究在前期工作基础上对其编码蛋白的亚细胞定位和多聚化特征进行分析, 以增进对乳管水分平衡的分子认知, 并为利用生物技术手段提高胶乳产量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 基因克隆所用橡胶树品系为热

研 7-33-97; 亚细胞定位和双分子荧光互补 (BiFC) 所用材料为本氏烟草。

1.1.2 菌株及载体 大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 GV3101、pNC-Cam1304-SubN、pNC-BiFC-ENN 和 pNC-BiFC-ECN 由本实验室保存; Y2HGOLD 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 酵母双杂交载体购自宝日医生物技术 (大连) 有限公司。

1.1.3 主要试剂 各类酶、试剂盒及生化试剂详见文献 [23-24]。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和反转录 胶乳总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成参照文献 [4]。

1.2.2 基因克隆与载体构建 根据本地热研 7-33-97 的基因组序列设计引物 (表 1), 并以胶乳来源的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。参照文献 [24], 利用同源重组法将 HbPIP2;3 构建到 pNC-Cam1304-SubN、pNC-BiFC-ENN、pNC-BiFC-ECN、pGADT7 和 pGBKT7。

1.2.3 生物信息学分析 蛋白的理化特性、保守结构域、亚细胞定位和二级结构预测分别采用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)、WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 和 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 等在线工具分析。根据与菠菜 SoPIP2;1 [15] 进行序列比对界定相应的跨膜螺旋区, 并利用其晶体结构作为模板通过 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件进行 3D 建模。

1.2.4 亚细胞定位和双分子荧光互补 含重组质粒农杆菌浸染液的制备及烟草叶片的瞬时转化参照文献 [24], 其中, 烟草幼苗约为 5 周龄, 转化 48 h 后用共聚焦显微镜进行荧光观察。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>HbPIP2</i> ;3F	ATGGCTAAGGACGTGGAAGTT	基因克隆
<i>HbPIP2</i> ;3R	TTAAGCATTGCTCCTGAAGG	
<i>pCam1304-HbPIP2</i> ;3F	<u>AGTGGTCTCTGTCCAGTCCT</u> ATGGCTAAGGACGTGGAAGTT	亚细胞定位
<i>pCam1304-HbPIP2</i> ;3F	<u>GGTCTCAGCAGACCACAAGT</u> AGCATTGCTCCTGAAGG	
<i>pNC-BiFC-HbPIP2</i> ;3F	<u>AGTGGTCTCTGTCCAGTCCT</u> ATGGCTAAGGACGTGGAAGTT	双分子荧光互补
<i>pNC-BiFC-HbPIP2</i> ;3R	<u>GGTCTCAGCAGACCACAAGT</u> AGCATTGCTCCTGAAGG	
<i>pGADT7-HbPIP2</i> ;3F	<u>TACGACGTACCAGATTACGCT</u> ATGGCTAAGGACGTGGAAGTT	酵母双杂交
<i>pGADT7-HbPIP2</i> ;3R	<u>CAGTATCTACGATTTCATCTGC</u> TTAAGCATTGCTCCTGAAGG	
<i>pGBKT7-HbPIP2</i> ;3F	<u>ATCTCAGAGGAGGACCTG</u> ATGGCTAAGGACGTGGAAGTT	
<i>pGBKT7-HbPIP2</i> ;3R	<u>TGCGGCCCGCTGCAGGTCGT</u> TAAGCATTGCTCCTGAAGG	

注：下划线为可与载体进行同源重组的同源臂。
Note: Sequences for homologous recombination with vectors are underlined.

1.2.5 酵母双杂交 诱饵载体 *pGBKT7-HbPIP2*;3 的自激活检测及点对点的酵母双杂交参照宝日医酵母双杂交试剂盒说明书。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与载体构建

以 *HbPIP2*;3F/R 为引物的首轮 PCR 成功扩增到 1 条约 860 bp 的目的条带。随后,以第一轮 PCR 产物作为模板,分别以 *pCam1304-HbPIP2*;3F/R、*pNC-BiFC-HbPIP2*;3F/R、*pGADT7-HbPIP2*;3F/R 或 *pGBKT7-HbPIP2*;3F/R 为引物进行第二轮 PCR 扩增,目的条带切胶回收后分别构建 *pCam1304-HbPIP2*;3、*pNC-BiFC-ECN-HbPIP2*;3、*pNC-BiFC-ENN-HbPIP2*;3、*pGADT7-HbPIP2*;3 和 *pGBKT7-HbPIP2*;3 等载体。

2.2 序列的生物信息学分析

测序及序列分析表明, *HbPIP2*;3 的 CDS 全长为 861 bp, 预测编码 286 个氨基酸, 理论分子量为 30.58 kDa, 等电点为 8.50, 脂肪族指数为 100.38, 总平均疏水指数为 0.449, 不稳定系数为 31.68。CDD 分析显示, 该蛋白含有 1 个高度保守的 MIP 结构域, 即 32~267 位, 共包含 236 个残基 (图 1A)。序列比对显示, *HbPIP2*;3 与 *HbPIP1*;1、*SoPIP2*;1 的序列相似性分别为 72.1% 和 85.1%, 拥有 6 个典型的跨膜螺旋 (即 TM1~6) 和 2 个半螺旋 (即 HB 和 HE), 其中, 位于 2 个半螺旋上的 NPA 基序, 以及位于 TM2、TM5 和 LE 上的 ar/R 选择性滤器完全一致, 均为 F-H-T-R; 在 5 个 Froger 位点 (即 P1~5) 中, 仅 P1 存在变异,

分别为 Q-S-A-F-W、E-S-A-F-W 和 M-S-A-F-W; 此外, 对应于 *SoPIP2*;1 S¹¹⁵ 的磷酸化位点和 L¹⁹⁷ 门控位点也完全一致, 而对应于 *SoPIP2*;1 S²⁷⁴ 的磷酸化位点则只存在 *HbPIP2*;3 和 *SoPIP2*;1 中 (图 1B)。SOPMA 分析显示, *HbPIP2*;3 的 α -螺旋占 36.36%, 延伸链结构占 17.48%, β -转角占 3.50%, 无规则卷曲占 42.66%; 同源建模进一步证实该蛋白含有 6 个跨膜螺旋, 同时也显示其可以形成同源四聚体 (图 1C)。亚细胞定位预测显示, *HbPIP2*;3 定位在细胞膜。

2.3 亚细胞定位分析

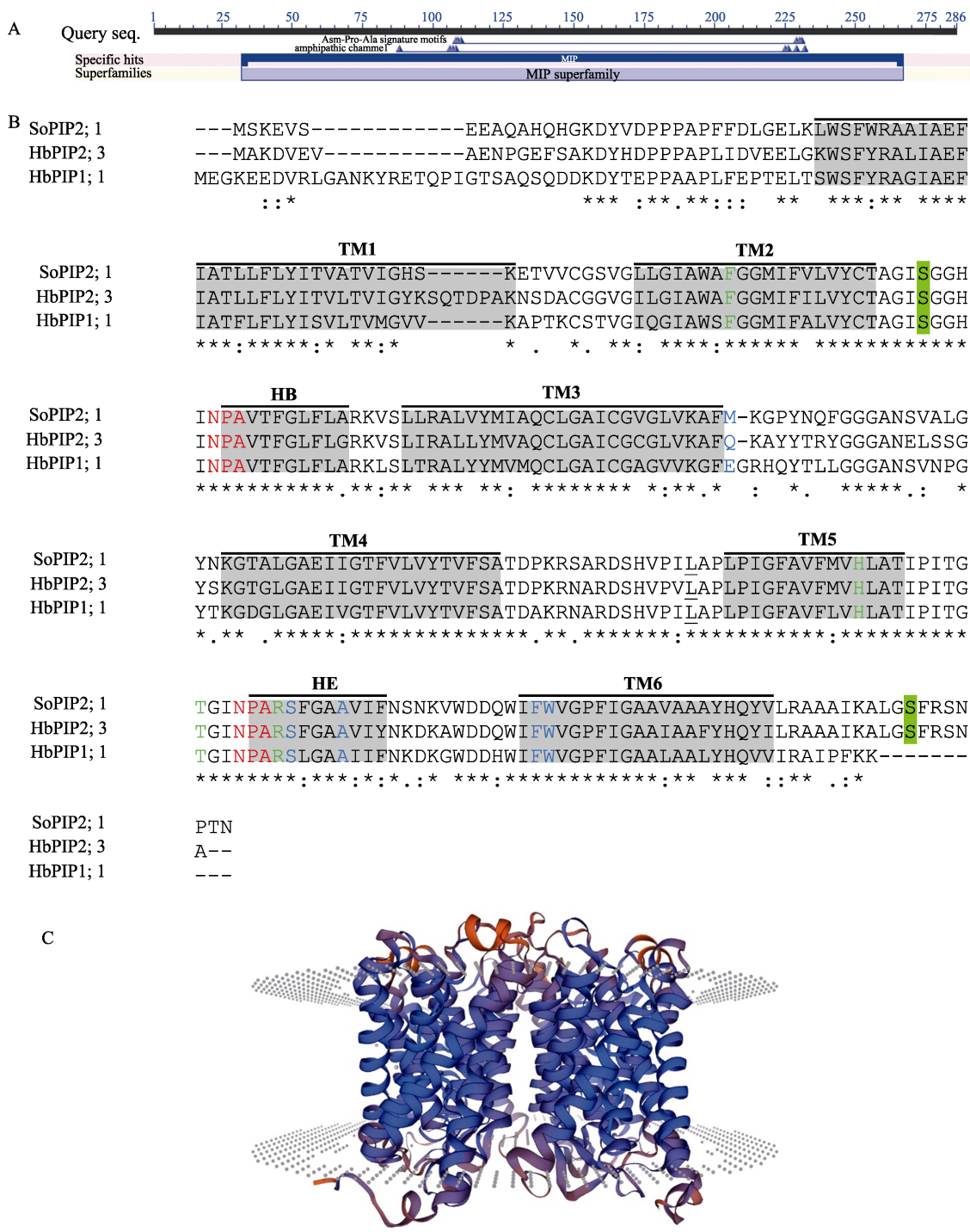
以空载 *pNC-Cam1304-SubN* 为对照, 将含 *pCam1304-HbPIP2*;3 的农杆菌工程菌微量注射烟草叶片后进行荧光观察, 结果如图 2 所示, 转空载的荧光信号散布于细胞的各个区域, 包括细胞核, 而实验组仅见于细胞膜, 这表明 *HbPIP2*;3 定位在细胞膜。

2.4 BiFC 分析

以转 *pCam1304-HbPIP2*;3 的为阳性对照、单转 *pNC-BiFC-ENN-HbPIP2*;3 或 *pNC-BiFC-ECN-HbPIP2*;3 的为阴性对照, 将分别含有 *pNC-BiFC-ENN-HbPIP2*;3 和 *pNC-BiFC-ECN-HbPIP2*;3 的农杆菌工程菌等量混合后转化烟草, 荧光观察结果如图 3 所示, 2 个阴性对照均为未见信号, 而实验组和阳性对照在细胞膜均发现强烈的荧光信号, 这表明 *HbPIP2*;3 可在细胞膜上形成多聚体。

2.5 酵母双杂交实验

自激活检测显示 (图 4), 转 *pGADT7/pGBKT7-HbPIP2*;3 的阳性对照在二缺 (SD-TL)、三缺



A: HbPIP2;3 的保守结构域预测; B: HbPIP2;3、HbPIP1;1 和 SoPIP2;1 的序列比对; C: HbPIP2;3 的 3D 结构预测。
A: Predicted conservative domain for HbPIP2;3; B: Sequence alignment of HbPIP2;3, HbPIP1;1 and SoPIP2;1;
C: Predicted 3D structure for HbPIP2;3.

图 1 HbPIP2;3 的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of HbPIP2;3

(SD-TLH) 和四缺 (SD-TLHA) 营养平板上生长旺盛, 而实验组与阴性对照类似, 在四缺板上均无生长, 这表明 *pGBKT7-HbPIP2;3* 无自激活活性。进一步的酵母双杂交实验显示 (图 5), 实验组和阳性对照类似, 在四缺板上生长旺盛, 而

阴性对照无生长, 这表明 HbPIP2;3 在体外也可形成多聚体。

3 讨论

作为天然橡胶合成和贮藏的场所, 橡胶树乳

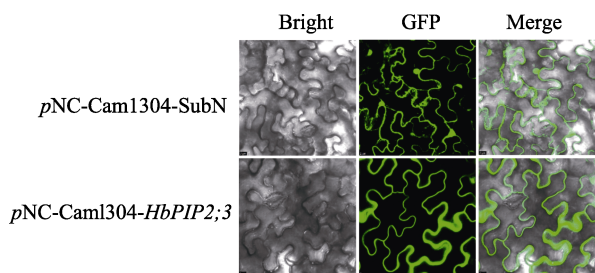


图2 HbPIP2;3 的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization analysis of HbPIP2;3

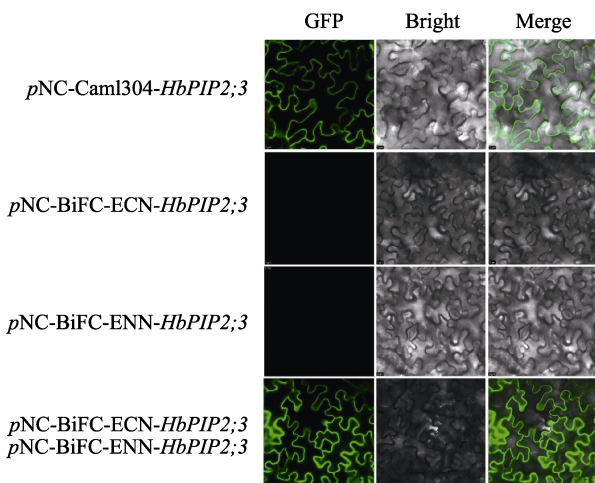


图3 基于 BiFC 的 HbPIP2;3 多聚化分析

Fig. 3 Multimerization analysis of HbPIP2;3 on the basis of BiFC

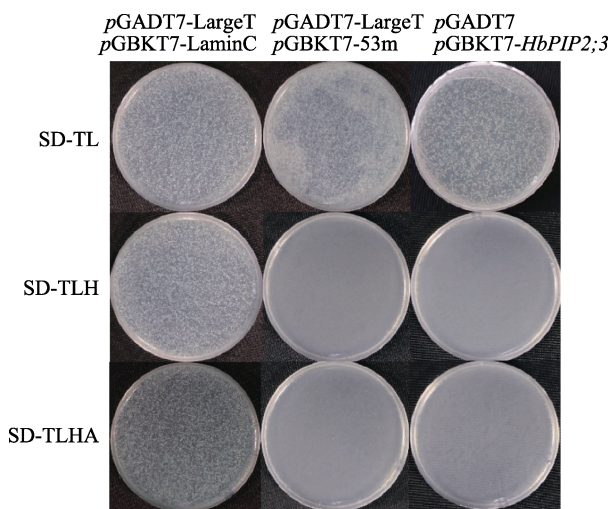


图4 HbPIP2;3 的自激活检测

Fig. 4 Self-activation analysis of HbPIP2;3

管是一类高度分化的单一细胞类型组织^[19]。与成熟叶片等组织不同,乳管无中央大液泡,取而代之的是成百上千的分散性小液泡,即所谓的黄色体^[4, 19]。在成熟叶片中,水分的平衡由 PIP 和液泡定位的液泡内在蛋白 (tonoplast intrinsic protein, TIP) 共同决定,而乳管的水分平衡则主要由 PIP

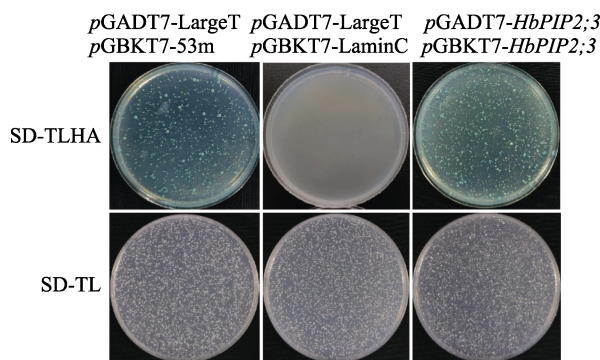


图5 基于酵母双杂交的 HbPIP2;3 多聚化分析

Fig. 5 Multimerization analysis of HbPIP2;3 on the basis of yeast two-hybrid

决定^[7], 因此, 分离和鉴定乳管表达的 PIP 具有重要理论意义和应用价值^[4, 11-14]。在 3 个乳管高丰度表达的 PIP 中, *HbPIP1;4* 和 *HbPIP2;7* 在蟾蜍卵母细胞中异源表达均无水分子转运活性^[13], 而 *HbPIP2;3* 的活性与 *HbPIP2;1* 相当^[11, 14]。由于 *HbPIP2;1* 在乳管中的表达丰度很低, 因此, *HbPIP2;3* 被认为是调控乳管水分平衡的关键基因^[4, 14]。

本研究结果显示, *HbPIP2;3* 含有一个 AQP 家族特有的 MIP 结构域 (Pfam 登录号为 PF00230), 其中包含 6 个典型的跨膜螺旋和 2 个半螺旋, 等电点 > 7.0, 总平均疏水指数 > 0, 不稳定系数为 < 40, 属于稳定的疏水型碱性蛋白。与隶属于 PIP1 亚类的 *HbPIP1;1* 相比, *HbPIP2;3* 与 *SoPIP2;1* 的序列相似性更高, 具有较短的 N 端和较长的 C 端, 且 C 端含有 1 个 PIP2 亚类特有的磷酸化位点^[15]。与生物信息学预测结果一致, 在烟草叶片中的亚细胞定位分析显示 *HbPIP2;3* 定位在细胞膜。与基于同源建模的 3D 结构预测一致, BiFC 和点对点的酵母双杂交实验均表明 *HbPIP2;3* 可形成同源四聚体。*HbPIP1;1* 虽然在烟草中也定位在细胞膜^[24], 但与 *HbPIP2;3* 和 *SoPIP2;1* 不同的是, 其在蟾蜍中并无水分转运活性^[12]。虽然本研究试图通过序列比较寻求答案, 但 *HbPIP1;1* 具有 *HbPIP2;3* 和 *SoPIP2;1* 类似的 ar/R 选择性过滤器 (F-H-T-R) 以及典型的 NPA 基序, 理论上 *HbPIP1;1* 应具有高效的水分转运活性, 因此, 相关的决定因子还有待进一步研究。另外一种可能是, *HbPIP1;1* 自身原本不能定位到细胞膜, 但可以跟烟草中的 PIP2 蛋白互作进而有效定位。事实上, PIP1 和 PIP2 之间的异源互作广泛存在于不同植物中, 如玉米、拟南芥、烟草、葡萄、甜菜、草莓、棉花、大麦, 甚至还包括卷柏^[8-9, 16-18, 25-27]。因此, 进一步筛选

和鉴定与 HbPIP1;1 互作的 PIP2 蛋白有助于阐明复杂的调控机制。

综上,本研究证实 HbPIP2;3 在细胞膜上可通过同源四聚体的方式调控橡胶树乳管的水分平衡,但是否存在异源互作模式还有待进一步研究。

参考文献

- [1] DANIELSON J A, JOHANSON U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 45.
- [2] ABASCAL F, IRISARRI I, ZARDOYA R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1840(5): 1468-1481.
- [3] ZOU Z, GONG J, AN F, XIE G, WANG J, MO Y, YANG L. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1001.
- [4] ZOU Z, GONG J, HUANG Q, MO Y Y, YANG L F, XIE G S. Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.)[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141022.
- [5] ZOU Z, YANG L F, GONG J, MO Y Y, WANG J K, CAO J H, AN F, XIE G S. Genome-wide identification of *Jatropha curcas* aquaporin genes and the comparative analysis provides insights into the gene family expansion and evolution in *Hevea brasiliensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 395.
- [6] ZOU Z, YANG J H. Genome-wide comparison reveals divergence of cassava and rubber aquaporin family genes after the recent whole-genome duplication[J]. BMC Genomics, 2019, 20: 380.
- [7] ZOU Z, ZHENG Y J, XIE Z N. Analysis of *Carica papaya* informs lineage-specific evolution of the aquaporin (AQP) family in Brassicales[J]. Plants, 2023, 12: 3847.
- [8] FETTER K, VAN WILDER V, MOSHELION M, CHAUMONT F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity[J]. The Plant Cell, 2004, 16(1): 215-228.
- [9] ZELAZNY E, BORST J W, MUYLAERT M, BATOKO H, HEMMINGA M A, CHAUMONT F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(30): 12359-12364.
- [10] ZELAZNY E, MIECIELICA U, BORST J W, HEMMINGA M A, CHAUMONT F. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins *ZmPIP2;4* and *ZmPIP2;5* to the plasma membrane[J]. Plant Journal, 2009, 57(2): 346-355.
- [11] TUNGNGOEN K, KONGSAWADWORAKUL P, VIBOONJUN U, KATSUHARA M, BRUNEL N, SAKR S, NARANGAJAVANA J, CHRESTIN H. Involvement of *HbPIP2;1* and *HbTIP1;1* aquaporins in ethylene stimulation of latex yield through regulation of water exchanges between inner liber and latex cells in *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Physiology, 2009, 151(2): 843-856.
- [12] TUNGNGOEN K, VIBOONJUN U, KONGSAWADWORAKUL P, KATSUHARA M, JULIEN J L, SAKR S, CHRESTIN H, NARANGAJAVANA J. Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporin genes[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(3): 253-262.
- [13] 王进, 安锋, 蔡秀清, 邹智, 张薇, 林位夫. 橡胶树水通道蛋白基因 *HbPIP1* 和 *HbPIP2* 的功能鉴定及其表达分析[J]. 林业科学, 2014, 50(1): 69-75.
- [14] WANG J, AN F, CAI X Q, ZOU Z, ZHANG W, LIN W F. Function characterization and expression analysis of aquaporins (*HbPIP1* and *HbPIP2*) in *Hevea brasiliensis*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2014, 50(1): 69-75. (in Chinese)
- [15] AN F, ZOU Z, CAI X Q, WANG J, ROOKES J, LIN W F, CAHILL D, KONG L X. Regulation of *HbPIP2;3*, a latex-abundant water transporter, is associated with latex dilution and yield in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125595.
- [16] TORNROTH-HORSEFIELD S, WANG Y, HEDFALK K, JOHANSON U, KARLSSON M, TAJKHORSHID E, NEUTZE R, KJELLBOM P. Structural mechanism of plant aquaporin gating[J]. Nature, 2006, 439(7077): 688-694.
- [17] LI D D, RUAN X M, ZHANG J, WU Y J, WANG X L, LI X B. Cotton plasma membrane intrinsic protein 2s (PIP2s) selectively interact to regulate their water channel activities and are required for fibre development[J]. New Phytologist, 2013, 199(3): 695-707.
- [18] YANEF A, SIGAUT L, MARQUEZ M, ALLEVA K, PIETRASANTA L I, AMODEO G. Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(1): 231-236.
- [19] BIENERT M D, DIEHN T A, RICHET N, CHAUMONT F, BIENERT G P. Heterotetramerization of plant PIP1 and PIP2 aquaporins is an evolutionary ancient feature to guide PIP1 plasma membrane localization and function[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 382.
- [20] 邹智, 杨礼富, 王真辉, 袁坤. 橡胶树中橡胶的生物合成与调控[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1231-1238.

- ZOU Z, YANG L F, WANG Z H, YUAN K. Biosynthesis and regulation of natural rubber in *Hevea*[J]. Plant Physiology Journal, 2009, 45(12): 1231-1238. (in Chinese)
- [20] 邹智, 杨礼富, 王真辉, 袁坤. 巴西橡胶树转基因研究现状与展望[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(1): 85-92.
- ZOU Z, YANG L F, WANG Z H, YUAN K. Advances and prospects on genetic modification of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Biotechnology, 2010, 30(1): 85-92. (in Chinese)
- [21] ZOU Z, YANG J H. Genomic analysis of Dof transcription factors in *Hevea brasiliensis*, a rubber-producing tree[J]. Ind Crop Prod, 2019, 134: 271-283.
- [22] ZOU Z. A crucial role of the PIP subfamily in the water balance of laticifers[J]. Gene & Translational Bioinformatics, 2016, 2: e1182.
- [23] 邹智, 杨礼富. 巴西橡胶树铁硫簇支架蛋白 cDNA 的克隆与分析[J]. 热带作物学报, 2010, 31(10): 1752-1756.
- ZOU Z, YANG L F. Cloning and analysis of a cDNA encoding an iron-sulfur cluster scaffold protein ISU1 from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(10): 1752-1756. (in Chinese)
- [24] 乔雪莹, 郑玉皎, 阳江华, 曾长英, 邹智. 橡胶树 *HbPIP1;1* 基因的克隆及蛋白的亚细胞定位与多聚化分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(12): 2405-2412.
- QIAO X Y, ZHENG Y J, YANG J H, ZENG C Y, ZOU Z. Gene cloning, subcellular localization and multimerization analysis of *HbPIP1;1* from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(12): 2405-2412. (in Chinese)
- [25] MUROZUKA E, HANISCH S, POMORSKI T G, JAHN T P, SCHJOERRING J K. Bimolecular fluorescence complementation and interaction of various *Arabidopsis* major intrinsic proteins expressed in yeast[J]. Physiologia Plantarum, 2013, 148(3): 422-431.
- [26] SHIBASAKA M, HORIE T, KATSUHARA M. Mechanisms activating latent functions of PIP aquaporin water channels via the interaction between PIP1 and PIP2 proteins[J]. Plant and Cell Physiology, 2021, 62(1): 92-99.
- [27] YANEF A, VITALI V, AMODEO G. PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators?[J]. FEBS Letters, 2015, 589(23): 3508-3515.