

橡胶树水通道蛋白 HbPIP1;4 的亚细胞定位与多聚化分析

邹 智, 郑玉皎, 乔雪莹

热带作物生物育种全国重点实验室/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/中国热带农业科学院三亚研究院, 海南海口 571101

摘 要: 质膜内在蛋白 (PIP) 隶属于水通道蛋白家族, 其以细胞膜定位并具有高效的水分转运活性而著称。PIP 高度保守, 主要包含 PIP1 和 PIP2 两个亚类。天然橡胶是重要的工业原料和战略物资, 其主要来源为巴西橡胶树。作为橡胶合成和储藏的特异组织, 乳管与邻近的薄壁细胞之间缺乏胞间连丝, 其水平平衡主要由 PIP 介导。通过前期研究, 团队鉴定到一个 PIP1 亚类成员 *HbPIP1;4*, 该基因在乳管中高水平表达, 然而, 其在蟾蜍卵母细胞中异源表达却无水转运活性, 推测因不能有效定位到细胞膜所致。为探讨 *HbPIP1;4* 在植物体内的功能部位及作用模式, 本研究构建了其亚细胞定位和双分子荧光互补 (BiFC) 载体。通过利用农杆菌介导法瞬时转化烟草叶片, 再用激光共聚焦显微镜进行观察, 发现荧光信号出现在细胞膜, 这与生物信息学预测的细胞膜定位结果一致。BiFC 实验进一步证实 *HbPIP1;4* 定位在细胞膜, 结果同时显示, *HbPIP1;4* 可形成同源多聚体, 这与 3D 结构预测结果一致。上述结果为深入揭示乳管的水分平衡机制奠定了坚实的基础。但 *HbPIP1;4* 的异源互作模式还有待进一步研究。

关键词: 橡胶树; 乳管; 水通道蛋白; 质膜内在蛋白; 亚细胞定位; 双分子荧光互补

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

Subcellular Localization and Multimerization Analyses of HbPIP1;4, a PIP Aquaporin from Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

ZOU Zhi, ZHENG Yujiao, QIAO Xueying

National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), which belong to the aquaporin (AQP) family within the major intrinsic protein (MIP) superfamily, are known for the high water transport activity at the cell membrane. The subfamily is highly conservative and only includes two phylogenetic groups named PIP1 and PIP2. Natural rubber, an important industrial raw material and strategic material, is mainly derived from Para rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), a big tree originated in the Amazon basin of South America. As a special tissue for rubber synthesis and storage, the laticiferous cells possess no plasmodesmata with neighboring parenchyma cells, and the water balance is mainly mediated by PIP aquaporins. In previous studies, a highly abundant PIP gene denoted *HbPIP1;4* was identified, however, no detectable water transport activity was found when heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes, which may be due to its inability to localize to the cell membrane. To uncover the acting site and multimerization features of *HbPIP1;4* *in vivo*, recombinant plasmids *pNC-Cam1304-SubN-HbPIP1;4*, *pNC-BiFC-ECN-HbPIP1;4*, and *pNC-BiFC-ENN-HbPIP1;4* for subcellular localization and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) were successfully constructed. *Agrobacterium tumefaciens* transformed with above recombinant plasmids were used to infiltrate tobacco (*Nicotiana benthamiana*), and transiently transformed leaves were subsequently checked using laser confocal microscopy. Compared with wide distribution of fluorescence signals throughout the cell for the control *pNC-Cam1304-SubN*, signals of *pNC-Cam1304-GFP-HbPIP1;4* were restricted to the cell membrane, supporting the plasma membrane local-

收稿日期 2023-06-07; 修回日期 2023-06-30

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. 319MS093)。

作者简介 邹 智 (1982—), 男, 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。

ization of HbPIP1;4, which is consistent with the bioinformatics prediction. The result was further supported by the BiFC analysis, which also implied that HbPIP1;4 could form homomultimer, in accordance with the 3D prediction via homology modeling. The results would lay a solid foundation for further uncovering the mechanism of water balance of the laticifer. Nevertheless, PIP aquaporins that could interact with HbPIP1;4 in rubber tree remain to be further characterized.

Keywords: rubber tree; laticifer; aquaporin; plasma membrane intrinsic protein; subcellular localization; BiFC

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.001

质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic protein, PIP) 隶属于水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 家族, 其以细胞膜定位并具有高效的水分转运活性而著称^[1]。相比于其他亚族, PIP 高度保守, 仅包含 2 个进化小组, 其中 PIP1 具有延伸的 N 端, 而 PIP2 具有较长的 C 端^[2-5]。结构分析显示, PIP 包含 6 个跨膜螺旋、2 个半螺旋以及半螺旋上高度保守的 NPA 基序, 其在细胞膜上以四聚体的形式起作用^[6-8]。虽然 PIP1 和 PIP2 都具有便于水分转运的 F-H-T-R ar/R 选择性滤器, 但 PIP1 在蟾蜍卵母细胞、酵母等体外体系中一般无活性或活性极低, 其主要原因是 PIP1 不能有效定位到细胞膜^[9-11]。然而, 当 PIP1 与 PIP2 共表达时, PIP2 可介导 PIP1 的有效定位, 从而提高水分转运活性^[9-12]。

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) 起源于南美亚马逊河流域, 是天然橡胶的主要商业来源^[13]。橡胶在橡胶树的乳管细胞中特异合成和储藏, 并在割胶过程以胶乳的形式被排出^[14]。由于乳管与邻近的薄壁细胞之间不存在胞间连丝, 故水分出入乳管主要由细胞膜定位的 PIP 介导^[2]。前期的全基因组分析显示, 橡胶树共含有 15 个 PIP 基因, 其中包含 5 个 PIP1 和 10 个 PIP2^[2]。蛋白互作分析显示, 隶属于 PIP2 的 HbPIP2;3 可形成同源多聚体^[15], 然而, 隶属于 PIP1 的 HbPIP1;1 虽然在植物体内也定位在细胞膜, 却并不能形成同源多聚体^[16]。为探究 HbPIP1;1 不能形成同源多聚体是属于亚类特征还是个体特性, 本研究对另外一个 PIP1 成员 HbPIP1;4^[2, 17]进行亚细胞定位和多聚化分析, 并通过序列比较以期揭示潜在的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 橡胶树品系热研 7-33-97 种植于中国热带农业科学院试验场, 胶乳的采集参考文献[2]; 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 的

栽培与管理参照文献[16]。

1.1.2 菌株及载体 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、内含辅助质粒 pSoup-P19 的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、pNC-Cam1304-SubN、pNC-BiFC-ENN 和 pNC-BiFC-ECN 由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 酶、试剂盒及各类生化试剂参照文献[16, 18]。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与反转录 胶乳总 RNA 的提取采用改良的 SDS 法^[2], 经质量检测合格后用 TaKaRa 反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA 第一链。

1.2.2 基因克隆与载体构建 根据前期鉴定的 HbPIP1;4 基因序列^[2]及本地的热研 7-33-97 的基因组序列设计引物对 HbPIP1;4F/R (ATGGAGGG-CAAGGAAGAGGATG/GGCCCTGGCCTTGAAA-GG) 和 pNC-HbPIP1;4F/R (AGTGGTCTCTGTCC-AGTCCTATGGAGGGCAAGGAAGAGGATG/GG-TCTCAGCAGACCACAAGTGGCCCTGGCCTTG-AAAGG), 并以上述反转录 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。参考文献[16], 利用无缝克隆技术将 HbPIP1;4 构建到载体 pNC-Cam1304-SubN、pNC-BiFC-ENN 和 pNC-BiFC-ECN。

1.2.3 生物信息学分析 本研究所用数据库、软件及其网址详见表 1。同源分析和多序列比对分别采用 BLAST 和 MUSCLE 软件; 蛋白的理化特性、亚细胞定位、保守结构域、二级结构和 3D 结构预测分别采用 ProtParam、WoLF PSORT、CDD、SOPMA 和 SWISS-MODEL 软件。跨膜螺旋区及保守氨基酸基于与 SoPIP2;1^[6]、AtPIP2;1^[7]和 AtPIP2;4^[8]的序列比对进行界定。

1.2.4 亚细胞定位和双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 实验 参照文献[19-20], 采用冻融法将上述重组质粒导入农杆菌感受态, 挑选单克隆进行菌落 PCR 验证后制备农杆菌浸染液, 采用微量注射法转化 4 周龄

表 1 本研究所用数据库、软件及其网址
Tab. 1 Databases, software and related websites used in this study

数据库/软件 Database/software	网址 Website	用途 Application
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	PIP 蛋白下载
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	同源分析
MUSCLE	https://mega6.software.informer.com/	蛋白多序列比对
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	蛋白理化特性分析
WoLF PSORT	https://www.genscript.com/wolf-psort.html	亚细胞定位预测
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd	保守结构域预测
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	二级结构预测
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive	3D 结构预测
InterPro	http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/	生物学功能预测

的烟草叶片，遮光保湿 48 h 后制片，并用激光共聚焦显微镜 Zeiss LMS880 进行荧光观察。

2 结果与分析

2.1 载体构建与序列比较

本研究首先以 HbPIP1;4F/R 为引物对基因的编码区序列进行分离，目的条带切胶回收后用于第二轮 PCR 扩增，并利用无缝克隆技术成功构建了亚细胞定位载体 *pNC-Cam1304-SubN-HbPIP1;4* 以及 BiFC 载体 *pNC-BiFC-ENN-HbPIP1;4* 和 *pNC-BiFC-ECN-HbPIP1;4*。桑格测序显示，研究分离到的序列与基因组的对应区域完全一致，预测编码 287 个氨基酸（aa），其理论分子量（MW）、等电点（pI）、脂肪族指数（AI）、总平均疏水指数（GRAVY）和不稳定系数（II）与 HbPIP1;1、HbPIP2;3、SoPIP2;1、AtPIP2;1、AtPIP2;4 相当（表 2）；该蛋白的第 44~274 位为保守的 MIP 结构域（pfam00230），共包含 230 个残基（图 1A）；从氨基酸组成来看，蛋白的小分子氨基酸 A 和 G 含

量最高，分别为 12.5%和 11.5%（图 1B）。HbPIP1;4 与 HbPIP1;1、HbPIP2;3、SoPIP2;1、AtPIP2;1、AtPIP2;4 的序列相似性分别为 91.0%、76.0%、72.6%、72.8% 和 70.2%，其跨膜螺旋区（TM1~TM6）和保守氨基酸如图 1C 所示，2 个半螺旋区（HB 和 HE）含有典型的 NPA 基序；连环 LA 含有 1 个与二聚化相关的 C⁸² 残基；连环 LB 含有 1 个保守的磷酸化位点 S¹²⁸；连环 LD 含有 1 个与门控相关的 L²¹¹ 残基；ar/R 选择性滤器为 F⁹⁴-H²²⁴-T²³¹-R²³⁹；Froger 位点为 E¹⁵⁴-S²⁴⁰-A²⁴⁴-F²⁵⁹-W²⁶⁰。与 SoPIP2;1、AtPIP2;1、AtPIP2;4 和 HbPIP2;3 相比，HbPIP1;4 具有较长的 N 端和较短的 C 端，缺乏磷酸化调控相关的 C 端 S 残基。二级结构预测显示，这些蛋白均以 α-螺旋和无规则卷曲为主，分别为 30.24%~40.42%和 37.98%~47.74%（表 2）。基于 SoPIP2;1 的同源建模显示，HbPIP1;4 可以形成同源四聚体（图 1D）。

2.2 亚细胞定位分析

为明确 HbPIP1;4 的功能执行部位，研究以空

表 2 HbPIP1;4 与 HbPIP1;1、HbPIP2;3、SoPIP2;1、AtPIP2;1 和 AtPIP2;4 理化特性和二级结构比较
Tab. 2 Comparison of physicochemical properties and secondary structure of HbPIP1;4, HbPIP1;1, HbPIP2;3, SoPIP2;1, AtPIP2;1 and AtPIP2;4

蛋白 Protein	aa	MW /kDa	pI	GRAVY	AI	II	MIP	α-螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended strand/%	β-转角 Beta turn/%	无规则卷曲 Random coil/%
HbPIP1;4	287	30.80	8.59	0.334	95.89	28.42	44~274	32.40	17.42	2.44	47.74
HbPIP1;1	287	30.78	8.62	0.352	93.90	27.46	46~276	30.66	18.47	3.14	47.74
HbPIP2;3	286	30.58	8.50	0.449	100.38	31.68	32~267	36.36	17.48	3.50	42.66
SoPIP2;1	281	29.90	9.03	0.579	102.81	27.81	31~260	36.65	18.15	2.14	43.06
AtPIP2;1	287	30.47	8.60	0.506	97.94	30.27	30~266	40.42	16.72	4.88	37.98
AtPIP2;4	291	30.95	8.22	0.490	96.29	29.29	30~266	30.24	20.96	5.15	43.64

载 *pNC-Cam1304-SubN* 为对照, 将含 *pNC-Cam1304-SubN-HbPIP1;4* 的农杆菌工程菌微量注射烟草叶片, 共聚焦观察结果如图 2 所示, 对照的荧光信号散布于整个细胞, 而实验组仅见于细胞膜, 证实 HbPIP1;4 的作用部位是细胞膜。

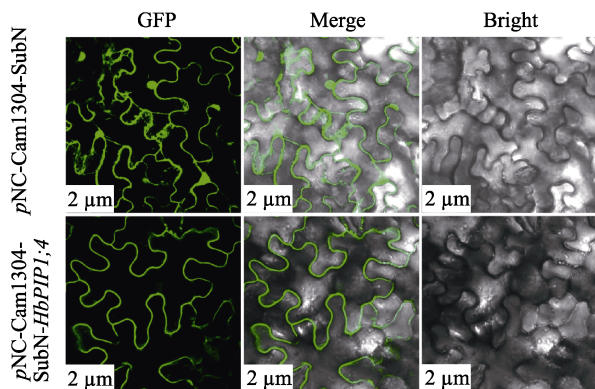


图 2 HbPIP1;4 的亚细胞定位分析

Fig. 2 Subcellular localization analysis of HbPIP1;4

2.3 BiFC 分析

为明确 HbPIP1;4 是否可形成同源多聚体, 研究以转 *pNC-Cam1304-SubN-HbPIP1;1*^[2] 的农杆菌工程菌为阳性对照, 单转 *pNC-BiFC-ENN-HbPIP1;4* 或 *pNC-BiFC-ECN-HbPIP1;4* 的为阴性对照, 将转 *pNC-BiFC-ENN-HbPIP1;4* 和 *pNC-BiFC-ECN-HbPIP1;4* 的农杆菌工程菌等量混合后瞬时转化烟草叶片。共聚焦观察结果如图 3 所示, 阳性对照和实验组在细胞膜均发现强烈的荧光信号, 而阴性对照均无信号, 证实 HbPIP1;4 可在细胞膜上形成同源多聚体。

3 讨论

与其他作物相比, 橡胶树的水分平衡显得更为重要: 首先, 除蒸腾耗水外, 周期性的割胶活动会造成水分的大量流失; 其次, 相对于多数植物邻近的细胞间存在大量的胞间连丝, 用于割胶的成熟乳管与邻近细胞缺乏功能性的胞间连丝, 这使得乳管水分的补给严重依赖于细胞膜定位的 PIP^[2, 14]。在橡胶树的 15 个 PIP 基因中, 有 10 个在乳管中有表达, 其中包括 *HbPIP1;4*、*HbPIP2;3* 和 *HbPIP1;1*^[2]。在蟾蜍卵母细胞中的功能分析显示, *HbPIP2;3* 具有高效的水分转运活性^[17], 而 *HbPIP1;4* 和 *HbPIP1;1* 的活性极低^[17, 21]。根据在玉米、水稻、草莓等植物中的研究, PIP1 亚类成员之所以在体外体系中无水分转运活性主要归因

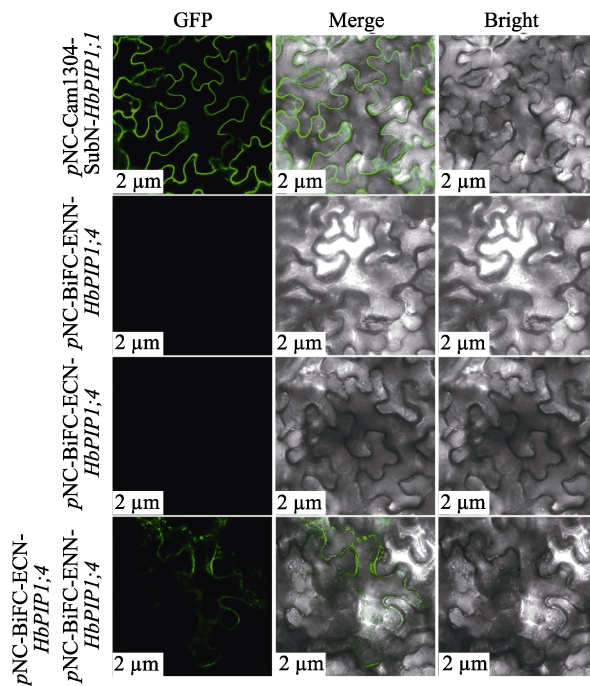


图 3 基于 BiFC 的 HbPIP1;4 多聚化分析

Fig. 3 BiFC-based multimerization analysis of HbPIP1;4

于其自身不能有效定位到细胞膜, 相反, PIP2 自身不仅可定位到细胞膜, 还可介导 PIP1 的细胞膜定位^[9-12]。有意思的是, 在前期的研究中, 团队发现 HbPIP1;1 与 HbPIP2;3 均定位在烟草叶片的细胞膜; HbPIP2;3 可形成同源多聚体, 而 HbPIP1;1 却不能^[15-16]。为探讨 HbPIP1;1 不能形成同源多聚体的可能结构特征, 本研究进一步鉴定了 HbPIP1;4 的细胞膜定位和多聚化特征。据前期研究, *HbPIP1;4* 在乳管中的表达水平显著高于 *HbPIP2;3* 和 *HbPIP1;1*^[2]。亚细胞定位分析显示, 与 HbPIP1;1 和 HbPIP2;3 相同, HbPIP1;4 也定位在烟草叶片的细胞膜; 与 HbPIP1;1 不同的是, BiFC 显示 HbPIP1;4 可形成同源多聚体, 这与 3D 结构预测结果一致。系统的序列比较显示, HbPIP1;4、HbPIP1;1、HbPIP2;3、SoPIP2;1、AtPIP2;1 和 AtPIP2;4 均属于稳定的疏水型碱性蛋白, 即等电点 > 7.0 (8.22~9.03)、总平均疏水指数 > 0 (0.334~0.579)、不稳定系数为 < 40 (27.46~31.68); 具有完全一致的 NPA 基序和 ar/R 选择性滤器 (F-H-T-R); 对应于 SoPIP2;1 S¹¹⁵ 的磷酸化位点、L¹⁹⁷ 的门控位点以及 C⁶⁹ 的二聚化位点高度保守; 对应于 SoPIP2;1 S¹⁸⁸ 的磷酸化位点仅在 AtPIP2;1 中保守, 而在其他蛋白中均为 N; 在 5 个 Froger 位点中, 仅 P1 存在变异, SoPIP2;1 为 M, AtPIP2;1、AtPIP2;4 和 HbPIP2;3 为 Q, HbPIP1;1

和 HbPIP1;4 为 E; 相比其他蛋白, HbPIP1;1 和 HbPIP1;4 均缺乏 PIP2 C 端的磷酸化位点。这些结果表明 HbPIP1;4 与 HbPIP1;1 的序列特征高度一致, 而基于前期的研究结果很难通过序列比对找到决定同源多聚化的结构特征。此外, 研究还采用 SWISS-MODEL 预测了 HbPIP1;4 与 HbPIP1;1^[16]、HbPIP2;3^[15] 和 HbPIP2;7^[22] 的互作关系, 发现它们都不能形成异源多聚体, 不过这还有待进一步的实验验证; 同时, 本团队已构建了胶乳特异性的酵母杂交文库, 利用 HbPIP1;4 作为诱饵的筛选工作还在进行中。

参考文献

- [1] DANIELS M J, MIRKOV T E, CHRISPEELS M J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(4): 1325-1333.
- [2] 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 ethphon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1001.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] VERDOUCQ L, GRONDIN A, MAUREL C. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons[J]. *The Biochemical Journal*, 2008, 415(3): 409-416.
- [8] WANG H, SCHOEDEL S, SCHMITZ F, DONG H, HEDFALK K. Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2020, 1862(2): 183065.
- [9] 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.
- [10] ZELAZNY E, BORST J W, MUYLEAERT 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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)
- [15] 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.
- [16] 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)
- [17] 邹智, 乔雪莹, 郑玉皎, 阳江华. 橡胶树 HbPIP2;3 的亚细胞定位与多聚化分析[J]. *热带作物学报*, 2024, 45(3): 443-449.
- [18] ZOU Z, QIAO X Y, ZHENG Y J, YANG J H. Subcellular localization and multimerization analyses of HbPIP2;3, an efficient water transporter from *Hevea brasiliensis*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2024, 45(3): 443-449. (in Chinese)
- [19] 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.
- [20] 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)
- [21] 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.
- [18] 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)
- [19] 徐硕, 邹智, 肖艳华, 张丽, 孔华, 郭静远, 郭安平. 油莎豆块茎油脂积累相关基因 *CeWRI1* 的克隆与功能分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(5): 923-929.
- XU S, ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, KONG H, GUO J Y, GUO A P. Cloning and functional characterization of *CeWRI1*, a gene involved in oil accumulation from tigernut (*Cyperus esculentus* L.) tubers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(5): 923-929. (in Chinese)
- [20] ZOU Z, ZHENG Y J, ZHANG Z T, XIAO Y H, XIE Z N, CHANG L L, ZHANG L, ZHAO Y G. Molecular characterization of oleosin genes in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant producing oil in underground tubers[J]. Plant Cell Reports, 2023, 42(11): 1791-1808.
- [21] TUNGNGOEN K, VIBOONJUN U, KONGSAWADWO RAKUL 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.
- [22] 邹智, 郑玉皎, 乔雪莹, 阳江华. 橡胶树水通道蛋白 HbPIP2;7 的亚细胞定位与多聚化分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2024, 44(1): 1-6.
- ZOU Z, ZHENG Y J, QIAO X Y, YANG J H. Subcellular localization and multimerization analyses of HbPIP2;7, a PIP aquaporin from rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Science), 2024, 44(1): 1-6. (in Chinese)