

巴西橡胶树大、小橡胶粒子在乙烯调控天然橡胶合成中的作用分析

王 丹¹, 徐兵强², 孙 勇³, 彭存智¹, 常丽丽¹, 仝 征^{1*}

1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院海口实验站(热带果树研究所), 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737

摘 要: 巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是重要的产胶植物, 胶乳中的橡胶粒子 (RP) 是合成天然橡胶的重要细胞器, 但其响应外源乙烯刺激调控天然橡胶合成的具体机制还不清楚。为了明确不同大小 RP 在此过程中的作用, 本研究通过分离外源乙烯刺激后胶乳中不同直径的 RP, 并与对照组进行差异蛋白质组学分析。结果发现: 在直径较大的大橡胶粒子 (LRP) 中鉴定出响应乙烯刺激差异蛋白 37 个, 分别参与天然橡胶合成、糖酵解/糖异生、碳代谢及氨基酸生物合成等代谢通路, 其中包含 4 个 REF/SRPP 家族成员; 在直径较小的小橡胶粒子 (SRP) 中鉴定出 56 个差异蛋白, 分别参与内质网中的蛋白质加工、内吞及剪接体等代谢通路, 其中包含 5 个 REF/SRPP 家族成员。关键差异蛋白 REF138 具有较多等电点 (pI) 和分子量不同的蛋白亚型, LRP 中低于标准等电点 (4.80) 的 REF138 亚型响应乙烯刺激积累减少, 高于标准等电点的 REF138 亚型响应乙烯刺激积累增加; 与 LRP 不同, SRP 上有更多的 REF138 亚型响应乙烯刺激发生变化, 具有标准分子量 (14.7 kDa) 的 REF138 亚型响应乙烯刺激积累增加, 高于标准分子量的亚型响应乙烯刺激积累减少。针对关键差异蛋白的互作蛋白功能分析发现, REF/SRPP 家族成员 REF138、REF175、REF258、SRPP117 及 SRPP204 间存在相互作用, 可能形成蛋白复合体结合在 RP 上。除 REF/SRPP 家族成员外, REF138 的互作蛋白主要参与剪接体及内吞代谢通路, REF258 的互作蛋白主要参与脂代谢过程与次生代谢产物合成调控。综上, 通过对 LRP 及 SRP 上响应乙烯刺激差异蛋白及其互作蛋白的功能分析初步揭示了 LRP 和 SRP 响应外源乙烯刺激调控天然橡胶合成的代谢调控机制。

关键词: 巴西橡胶树; 橡胶粒子; 乙烯; 天然橡胶合成调控; 蛋白互作

中图分类号: TQ332

文献标志码: A

Role of Large and Small Rubber Particles of *Hevea Brasiliensis* in Ethylene Regulated Natural Rubber Synthesis

WANG Dan¹, XU Bingqiang², SUN Yong³, PENG Cunzhi¹, CHANG Lili¹, TONG Zheng^{1*}

1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Haikou Experimental Station (Institute of Tropical Fruit Tree Research), Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: *Hevea brasiliensis* is an important natural rubber-producing plant. Rubber particles (RP) in latex are important organelles for the synthesis of natural rubber, which can be divided into large rubber particles (LRP) and small rubber particles (SRP) according to the diameter. Although the specific mechanism of its regulation of natural rubber synthesis in response to exogenous ethylene stimulation has been studied. However, the specific regulatory mechanism of LRP and SRP in regulating natural rubber synthesis in response to ethylene stimulation is still unclear. In order to clarify the

收稿日期 2023-08-01; 修回日期 2023-09-08

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31500557)。

作者简介 王 丹 (1984—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 热带作物蛋白质组学。*通信作者 (Corresponding author): 仝 征 (TONG Zheng), E-mail: tongzheng@foxmail.com。

role of RP with different diameters in the synthesis of natural rubber, LRP and SRP stimulated by ethylene were isolated and the proteins of corresponding samples were extracted for differential protein analysis. 37 differential proteins in response to ethylene stimulation were identified in the LRP, which were involved in natural rubber biosynthesis, glycolysis/gluconeogenesis, carbon metabolism and amino acid biosynthesis, and some other metabolic pathways, including four members of the REF/SRPP family. 56 differential proteins were identified in SRP, which were involved in protein processing, endocytosis, splicing in endoplasmic reticulum, and some other metabolic pathways, including five members of the REF/SRPP family. The key differential accumulation protein REF138 had many isoforms with different isoelectric points (pI) and molecular weights (MW). REF138 isoforms below the standard pI (4.80) on LRP were down-regulated in response to ethylene stimulation, while isoforms above the standard pI were up-regulated to ethylene stimulation. Different from LRP, more isoforms of REF138 on SRP changed in response to ethylene stimulation, and isoforms with standard MW (14.7 kDa) were up-regulated in response to ethylene stimulation, while isoforms with higher than standard MW were down-regulated in response to ethylene stimulation. The function analysis of key differential proteins showed that there were interactions among the members of the REF/SRPP family. REF138, REF175, REF258, SRPP117 and SRPP204 may form protein complexes and bind to RP. In addition to the members of the REF/SRPP family, 20 proteins interacting with REF138 were mainly involved in the spliceosome and endocytic metabolic pathways, and 50 proteins interacting with REF258 were involved in the regulation of lipid metabolism and the synthesis of secondary metabolites. In conclusion, functional analysis of differential proteins and the interaction proteins responsive to ethylene stimulation on LRP and SRP might preliminarily reveal the metabolic regulatory mechanism of LRP and SRP in regulating natural rubber synthesis in response to exogenous ethylene stimulation.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; rubber particles; ethylene; regulation of natural rubber biosynthesis; protein interaction

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.005

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是合成天然橡胶的重要产胶植物。位于其形成层中的乳管是合成天然橡胶的重要部位。乳管细胞中的橡胶粒子 (RP) 是天然橡胶合成的关键细胞器, 内部储存天然橡胶, 外部由含有蛋白质和其他成分的单层膜组织包被^[1]。RP 的直径通常在 0.08~4 μm 之间^[2], 不同直径的 RP 合成天然橡胶的效率不同, 小橡胶粒子 (SRP, 直径小于 0.35 μm) 中天然橡胶合成效率高于大橡胶粒子 (LRP, 直径大于 0.75 μm)^[2-3]。结合在 RP 膜上的蛋白质分别参与天然橡胶生物合成、应激或防御相关反应、蛋白质加工和折叠、信号转导和细胞转运等代谢调控^[4]。

天然橡胶生物合成过程中, 蔗糖作为底物经酶促反应生成乙酰辅酶 A^[5], 经由甲羟戊酸途径 (MVA) 生成橡胶单体焦磷酸异戊烯基 (IPP)。在多种酶的共同催化作用下, 经起始、聚合及终止等步骤合成天然橡胶^[6-9]。其中橡胶链的聚合在 RP 上完成, 由多种蛋白酶类共同催化调控^[8]。橡胶延伸因子蛋白 (REF)、小橡胶粒子蛋白 (SRPP) 和顺式异戊烯基转移酶 (CPT) 是 RP 中参与橡胶生物合成的关键蛋白质^[4]。REF 的二级结构主要由 β -折叠构成且高度疏水, 以嵌入的方式结合在 RP 膜上^[10], 有利于调控跨膜运输过程^[11]。胶乳中 LRP 的数量占 RP 总数的 6% 以下, 但其中的天然橡胶含量超过 RP 中总含量的 93%^[12], LRP

中存储更多的天然橡胶。SRPP 的二级结构主要由 α -螺旋构成, 仅与 RP 膜脂质表面结合^[10], 体外实验表明 SRPP 在橡胶链聚合过程中促进了 IPP 的掺入^[13], 并且能够提升橡胶粒子稳定性^[14]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGS) 是 MVA 中的关键酶, 在 SRP 上积累较多^[3]。SRP 与天然橡胶合成的起始过程相关, LRP 与橡胶链合成的终止过程相关。然而, LRP 和 SRP 分别调控天然橡胶生物合成的作用机制仍不清楚。

研究发现外源乙烯可以提高巴西橡胶树天然橡胶产量。施加外源乙烯后, 能够抑制胶乳中参与凝集过程的一系列酶和蛋白质表达, 延迟乳管末端堵塞过程^[15], 延长胶乳流出时间从而获得更多的天然橡胶。RP 及其蛋白质与胶乳凝集密切相关。橡胶树胶乳中的凝集素蛋白识别 RP 蛋白并诱导 RP 的迅速聚集^[16]。然而, RP 蛋白响应乙烯信号并抑制胶乳凝集的调节机制仍不清楚。另一方面, 外源乙烯的施用可通过增加 RP 上天然橡胶合成关键蛋白质的积累促进其合成过程^[17], 其中 REF/SRPP 蛋白质家族在此过程中可能发挥重要作用^[18], 但具体的调控机制还需进一步研究。

因此, 本研究关注巴西橡胶树胶乳中不同大小的橡胶粒子蛋白分别在乙烯刺激过程中的蛋白积累差异, 并分析天然橡胶合成代谢调控关键蛋白的互作蛋白功能, 明确 LRP、SRP 上响应乙烯

刺激的代谢调控机制, 进一步明确 LRP、SRP 在天然橡胶合成过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为未进行过割胶处理的 10 年树龄巴西橡胶树 (*H. brasiliensis* Mull. Arg., R7-33-97)。处理方法参照 WANG 等^[19]的方法, 在距离地面 120 cm 处的树干上开割线, 24 h 后在割线处涂抹 5 mL 的 3% (V/V) 乙烯刺激剂作为处理组 (E), 使用等体积的 ddH₂O 涂抹割线作为对照组 (D), 使用封口膜对处理后的割线进行包裹。处理 24 h 后进行割胶, 在冰上收集流出的胶乳。

1.2 方法

1.2.1 大、小橡胶粒子的分离纯化及形态观测 冰上收集的胶乳在 40 000×g, 4 °C 条件下离心 60 min, 收集离心管上层的 RP, 按照 1:10 (w/V) 的比例用预冷的洗脱溶液 (WS, 20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L 甘露醇, 0.5 mmol/L DTT, pH 7.0) 洗涤。使用基于 percoll 介质的密度梯度离心法 (percoll, 1.31 mg/mL, Pharmacia, 密度梯度由上至下依次为 5%、15%、30%, V/V) 将洗涤后的 RP 分离为 LRP 和 SRP^[20]。具体操作如下: 将 RP 按照 1:10 (w/V) 的比例重新悬浮在含有 30% (V/V) percoll 的预冷 WS 中, 转移到离心管底层。加入含有 15% (V/V) percoll 的预冷 WS 作为中间层和 5% (V/V) percoll 的预冷 WS 作为顶层。在 5000×g, 4 °C 条件下离心 15 min。离心后顶层样本为 LRP, 底层样本为 SRP。

将 RP、LRP 和 SRP 悬浮在固定溶液 (50 mmol/L 二甲基砷钠, 1% (w/V) 单宁酸, 6% (V/V) 戊二醛) 中室温静置 2 h。离心收集固定后的 RP、LRP 和 SRP, ddH₂O 洗涤 3 次。加入 1% (w/V) 的四氧化锇室温固定 1 h, ddH₂O 洗涤 2 次后加入适量的 ddH₂O 重新悬浮。将悬浮液滴加在锡箔纸上, 风干后的 RP、LRP 和 SRP 样品经扫描电子显微镜 (SEM) 观测。

1.2.2 LRP 和 SRP 的蛋白提取及差异蛋白分析 使用酚抽提法获得 LRP 和 SRP 的蛋白质样本。加入双倍 LRP 和 SRP 体积的蛋白提取液 BPP (100 mmol/L EDTA, 50 mmol/L 硼砂, 50 mmol/L 维生素 C, 1% (w/V) PVPP, 1% (w/V) Triton X-100, 2% (w/V) β-巯基乙醇, 30% (w/V) 蔗糖, pH 8.0), 震荡 10 min 后加入等体积的 Tris 饱和苯酚

(pH>7.8), 混合物在 15 000×g, 4 °C 条件下离心 5 min。取离心后的上层液体再加入等体积 BPP, 震荡 5 min 后相同条件离心, 取离心后的上层液体加入 5 倍体积的预冷硫酸铵饱和甲醇溶液并在 -20 °C 环境中静置 12 h 以上, 在 15 000×g, 4 °C 条件下离心 15 min 获得粗蛋白, 加入缓冲液 LB [7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 30 mmol/L Tris, 2% (w/V) CHAPS, pH 8.5] 充分溶解获得蛋白样本, 以 BSA 为标准, 通过 Bradford 法测定样本浓度。

将获得的蛋白质样本进行双向荧光差异凝胶电泳 (DIGE)。50 μg SRP 蛋白样本和 LRP 蛋白样本, 分别以 400 pmol/L 的 Cy3 和 Cy5 荧光染料标记, 所有样本等量混合后用 Cy2 荧光染料标记作为内标。电泳后凝胶图像使用 Typhoon Trio 扫描仪 (GE healthcare) 采集, DIGE 凝胶图谱经 DeCyder 7.0 软件分析获得差异蛋白 (differential accumulation proteins, DAPs), 差异蛋白经胰蛋白酶酶解后进行质谱 (MALDI-TOF/TOF MS, ABsciex) 分析检测。

1.2.3 关键 DAPs 的 Western 印迹分析 胶乳 (TL) 在 40 000×g, 4 °C 条件下离心 60 min, 离心后最上层是 RP, 中间层是 C 乳清 (CS), 底部是黄色体 (LO)。TL、CS、LO 蛋白样本按照 1.2.2 中的方法提取。蛋白样本完成单向凝胶电泳, 经膜转印后, 使用 5% (w/V) 脱脂牛奶封闭, 分别与实验室前期获得的多个 DAPs 多克隆兔血清抗体和 HRP 缀合的羊抗兔 IgG 孵育, 经显色后由 LAS 4000 mini 成像仪 (GE Healthcare) 采集图谱。

1.2.4 关键 DAPs 在巴西橡胶树胶乳中互作蛋白鉴定及分析 采用免疫沉淀结合液质联用质谱技术, 对巴西橡胶树胶乳中关键 DAPs 的互作蛋白进行鉴定。使用多克隆兔血清抗体及 Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP) 试剂盒 (Beyotime) 进行免疫沉淀实验。具体步骤如下: 冰上采集 1 mL 的新鲜胶乳加入等体积预冷的 WS 溶液, 加入 2 μg 多克隆兔血清抗体后 4 °C 孵育过夜。加入 100 μL 充分重悬的 Protein A+G Agarose, 4 °C 孵育 3 h 后在 1000×g, 4 °C 条件下离心 5 min, 除去上清后加入 1 mL 的 PBS 溶液洗涤沉淀 5 次, 加入适量缓冲液 LB 获得互作蛋白样本。对该样本进行胰蛋白酶酶解后, 使用液质联用质谱 HPLC (Dionex Ultra 3000 nano)-ESI-MS/MS (TripleTOF 5600, ABsciex) 进行鉴定, 经蛋白质数据库分析

后, 获得互作蛋白质信息。

2 结果与分析

2.1 乙烯处理后巴西橡胶树胶乳中 LRP 和 SRP 的分离

采用基于 percoll 的密度梯度离心法, 分别从乙烯和 ddH₂O 处理后的巴西橡胶树胶乳中成功分离获得了高纯度的 LRP 和 SRP。通过 SEM 观测到 RP 的直径范围在 0.05 μm 至 1.0 μm (图 1)。直径小于 0.3 μm 的为 SRP, 同时直径大于 0.5 μm 的为 LRP。

2.2 乙烯刺激后巴西橡胶树胶乳中 LRP 和 SRP 的蛋白质组差异分析

通过 2D-DIGE 对乙烯处理 (E) 和 ddH₂O 处理 (D) 24 h 后的橡胶树胶乳 LRP 和 SRP 蛋白质进行差异分析 (图 2)。在 LRP 中, 共检测到 37 个蛋白点在处理组和对照组之间发生变化 ($P < 0.01$, $T < 0.05$, 变化率高于 1.2 倍) (图 2, 表 1)。从这些蛋白点中鉴定到 25 个差异蛋白质 (DAPs)。其中, 13 个蛋白点对应的 4 个 DAPs 与天然橡胶合成直接相关, 属于 REF/SRPP 家族成员。蛋白点 L6 和 L25 鉴定到同一种含有 175

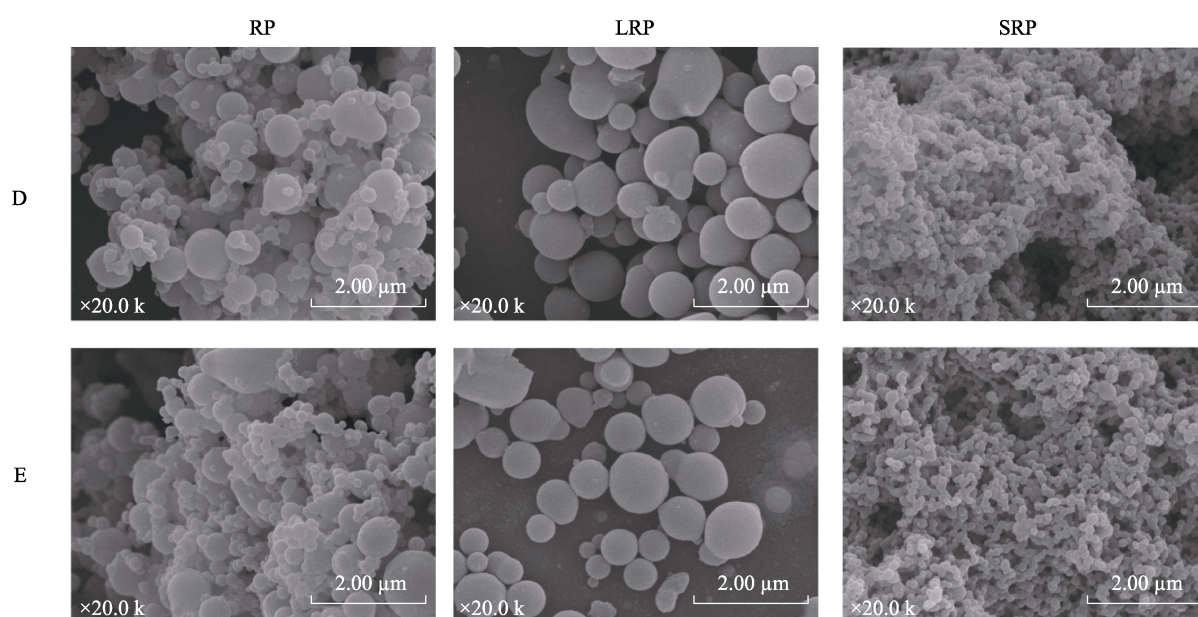


图 1 乙烯和 ddH₂O 处理后巴西橡胶树胶乳中 RP、LRP 和 SRP 的扫描电镜观察

Fig. 1 SEM observation of RP, LRP and SRP in *H. brasiliensis* latex treated with ethylene and ddH₂O

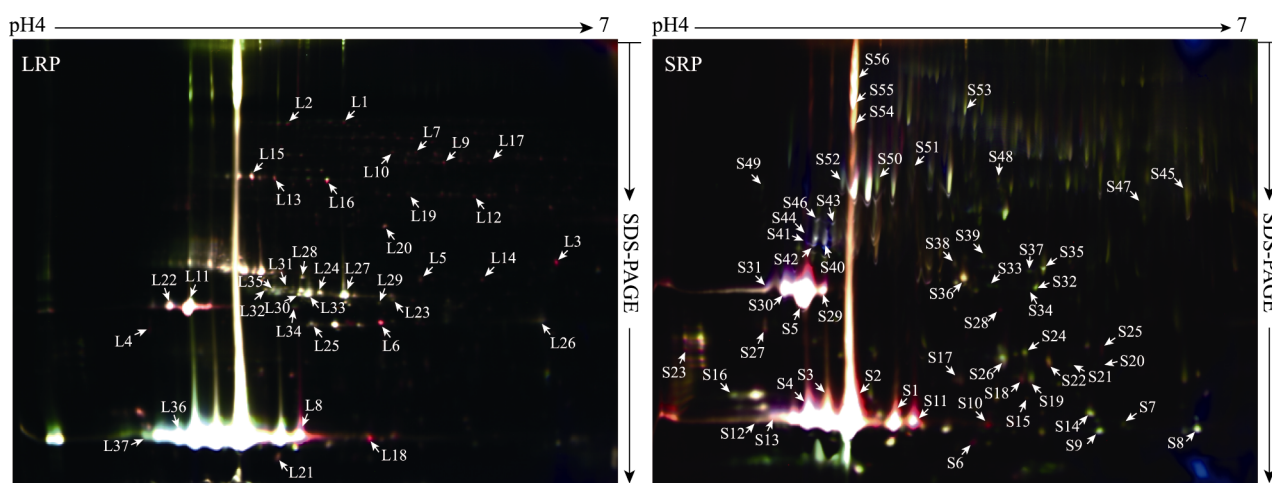


图 2 乙烯处理后巴西橡胶树胶乳中 LRP 和 SRP 蛋白的 2D-DIGE 凝胶图谱

Fig. 2 Differential protein spots on 2D-DIGE gel of LRP and SRP proteins of rubber latex after ethylene treatment

表 1 乙烯处理后巴西橡胶树胶乳中 LRP 差异蛋白信息

Tab. 1 Differential protein information of LRP in latex of *H. brasiliensis* after ethylene and ddH₂O treatment

编号 No.	差异比值 (E/D) Average Ratio (E/D)	差异 可信性 T-test	蛋白名称 Protein name	蛋白登录号 Protein accession	理论等电点 /理论分子量 pI/MW (Da)	质谱 得分 Score	序列 匹配率 Coverage/%
L1	2.11	0.050	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like	XP_021650389.1	5.24/75224	499	12
L2	1.70	0.014	Heat shock 70 kDa protein 5	XP_021691174.1	5.36/72149	643	19
L3	3.88	0.004	Malate dehydrogenase	XP_021640500.1	6.19/36173	279	28
L4	3.84	0.049	Elicitor-responsive protein 3-like isoform X1	XP_021663495.1	4.06/15249	364	40
L5	3.35	0.006	Elicitor-responsive protein 3-like isoform X1	XP_021663495.1	4.06/15249	796	63
L6	3.08	0.005	Rubber elongation factor protein-like (REF175)	XP_021653600.1	5.28/19612	204	26
L7	2.79	0.033	Leucine aminopeptidase 1-like	XP_021672059.1	6.30/61645	382	10
L8	2.76	0.011	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	191	25
L9	2.13	0.022	Elongation factor 1-gamma	XP_021660692.1	5.69/48685	523	29
L10	2.00	0.050	Leucine aminopeptidase 1-like	XP_021672059.1	6.30/61645	280	8
L11	1.95	0.018	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	XP_021653597.1	4.80/22331	659	41
L12	1.84	0.012	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	XP_021651095.1	5.90/42600	648	27
L13	1.69	0.015	Protein DJ-1 homolog D	XP_021645399.1	5.18/42984	469	18
L14	1.62	0.043	Triosephosphate isomerase, cytosolic	XP_021646026.1	5.90/27571	729	55
L15	1.61	0.013	Patatin-like protein 2	XP_021668042.1	5.13/49142	821	27
L16	1.60	0.032	Actin-7	XP_021666817.1	5.31/41897	397	28
L17	1.58	0.013	Enolase 2	XP_021644856.1	5.99/47993	243	17
L18	1.45	0.033	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	431	38
L19	1.42	0.049	Phosphoglycerate kinase, cytosolic-like	XP_021681983.1	5.67/42438	753	38
L20	1.38	0.044	Isoflavone reductase-like protein	XP_021644235.1	5.50/33240	380	20
L21	1.30	0.036	Cysteine proteinase inhibitor-like	XP_021677544.1	5.45/11236	229	34
L22	1.25	0.016	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	XP_021653597.1	4.80/22331	739	74
L23	-1.25	0.018	Petacaspase-4-like	XP_021692568.1	5.01/46443	137	16
L24	-1.26	0.017	Phospholipase A1-IIdelta-like	XP_021650571.1	5.47/47415	358	17
L25	-1.27	0.013	Rubber elongation factor protein-like (REF175)	XP_021653600.1	5.28/19612	384	26
L26	-1.3	0.010	Ricin B-like lectin EULS3	XP_021658810.1	7.77/20724	120	12
L27	-1.31	0.019	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	522	30
L28	-1.32	0.018	Alpha-soluble NSF attachment protein 2-like	XP_021668979.1	5.12/32802	189	19
L29	-1.34	0.020	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	208	25
L30	-1.41	0.047	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	228	16
L31	-1.41	0.027	NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic	XP_021670828.1	5.29/32309	404	24
L32	-1.49	0.013	Actin-7	XP_021666817.1	5.31/41897	467	25
L33	-1.53	0.042	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	555	30
L34	-1.59	0.043	Uncharacterized protein LOC110668061 isoform X1	XP_021684781.1	7.67/29500	232	16
L35	-1.63	0.011	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	560	30
L36	-1.67	0.016	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	629	55
L37	-2.02	0.008	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	548	55

个氨基酸的橡胶延伸因子蛋白 (REF175), 在乙烯刺激后 2 种分子量相同但等电点不同的 REF175 蛋白亚型的含量在 LRP 上呈现不同的变化趋势, 蛋白点 L6 上调 3.08 倍, 蛋白点 L25 下调 1.27 倍。L8、L18、L36 和 L37 均鉴定为含有 138 个氨基酸的橡胶伸长因子蛋白 (REF138), 这 4 种不同蛋白亚型的积累量在乙烯刺激后具有不同变化趋势, 等电点较高的 REF138 亚型经乙烯刺激后积累量增加; 等电点较低的 REF138 亚型积累量减少。L27、L29、L30、L33 和 L35 均鉴定为含有 258 个氨基酸的橡胶伸长因子蛋白 (REF258), 这 5 种不同蛋白亚型的积累量经乙烯刺激后在 LRP 上的积累量都明显减少。S11 和 S22 鉴定为含有 204 个氨基酸的小橡胶颗粒蛋白 (SRPP204), 这 2 个蛋白亚型经乙烯刺激后在 LRP 上积累量均呈现增加的趋势。除 REF/SRPP 家族成员外还鉴定到 21 个 DAPs, 分别参与丙酮酸代谢、内吞、三羧酸循环、谷胱甘肽代谢、RNA

降解、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、磷酸肌醇代谢等通路 (图 3, 表 1)。

SRP 中, 响应乙烯刺激积累量变化的蛋白点较 LRP 多, 共检测到 56 个蛋白点在对照组和处理组之间发生变化 (图 2, 表 2)。其中 22 个蛋白点鉴定到 5 个 REF/SRPP 家族成员。在乙烯刺激后, REF175 (S28) 在 SRP 上的积累量增加。有 13 个蛋白点鉴定为 REF138, 其中 8 个响应乙烯刺激积累量增加。REF258 的 3 个蛋白亚型 (S33、S36 和 S38) 受乙烯刺激后在 SRP 上的积累量减少 (图 2, 表 2)。SRPP204 的 4 个蛋白亚型 (S5、S29、S30 和 S31) 经乙烯刺激后在 SRP 上积累量均增加。一种含有 117 个氨基酸的小橡胶颗粒蛋白亚型 (SRPP117, S16) 受乙烯刺激后 SRP 上的积累量增加。此外, 鉴定到 29 个不属于 REF/SRPP 家族成员的 DAPs, 分别参与内质网中的蛋白质加工、谷胱甘肽代谢、糖酵解/糖异生、花生四烯酸代谢、剪接体和氧化磷酸化等代谢通路 (图 3, 表 2)。

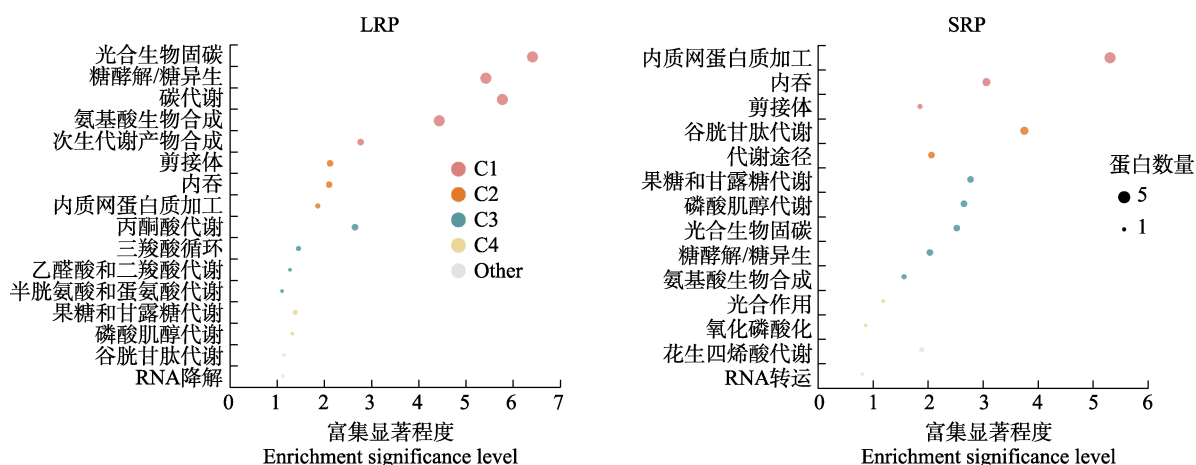


图 3 LRP 和 SRP 中乙烯响应差异蛋白富集的 KEGG 代谢通路

Fig. 3 Enrichment of KEGG metabolic pathways of ethylene responsive differential proteins in LRP and SRP

2.3 乙烯处理后 RP、LRP、SRP 中关键差异蛋白积累量的 Western Blot 分析

为了检测与天然橡胶合成调控相关关键蛋白在胶乳中不同组分间的分布差异, 对 TL、CS、LO、RP、LRP 和 SRP 等不同胶乳组分蛋白样本进行 Western Blot 分析。结果发现, 响应乙烯差异积累的 REF/SRPP 家族成员 REF138、REF175 和 REF258 主要分布在 RP 上, 并且蛋白积累量在 LRP 上要多于 SRP。REF258 在胶乳不同组分中都检测到分子量不同的 2 条带, 这 2 种 REF258 主要在 RP 中积累, CS 中检测到少许, LO 中未检出。SRPP117 主要在 CS 中大量积累, RP 中有

微量检出, 并主要在 SRP 中积累 (图 4)。SRPP117 与其他具有完整 REF domain 的 REF/SRPP 蛋白家族成员不同, 其 REF domain 存在部分缺失; 并且与 SRPP 亚家族成员具有短 N-末端及可变长度的 C 端不同, 只有一个位于 REF 结构域两侧的短 N 端和 C 端序列^[18]。Western Blot 检测到 SRPP117 在 CS 和 SRP 组分中积累。SRPP117 的不同蛋白亚型在 SRP 上响应乙烯刺激积累量增加 (图 2, 表 2), 并存在与 REF138 和 REF258 相互作用的可能 (表 3), SRPP117 可能通过参与 REF138 和 REF258 构成的膜蛋白复合体参与天然橡胶合成的调控。

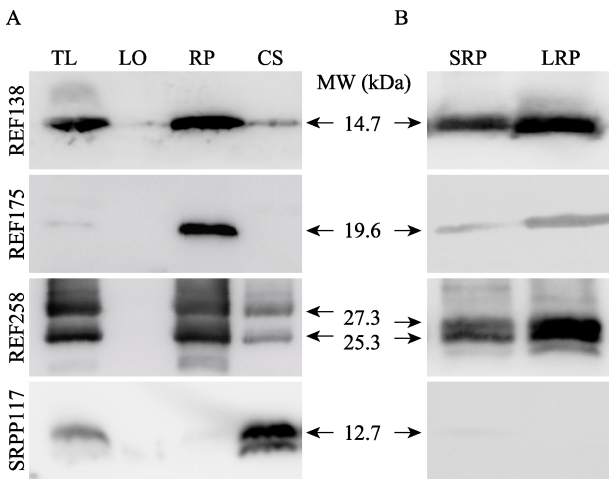
表 2 乙烯和 ddH₂O 处理后巴西橡胶树胶乳中 SRP 差异蛋白信息

Tab. 2 Differential protein information of SRP in latex of *H. brasiliensis* after ethylene and ddH₂O treatment

编号 No.	差异比值 (E/D) Average ratio (E/D)	差异 可信性 T-test	蛋白名称 Protein name	蛋白登录号 Protein accession	理论等电点 /理论分子量 pI/MW (Da)	质谱得分 Score	序列匹配率 Coverage/%
S1	4.25	0.050	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	237	25
S2	4.19	1E-04	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	344	38
S3	4.16	0.001	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	384	55
S4	3.76	0.002	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	286	38
S5	2.19	9E-05	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	XP_021653597.1	4.80/22331	372	60
S6	1.98	0.047	Nuclear transport factor 2	XP_021640386.1	5.65/13692	117	26
S7	1.91	0.010	Pro-hevein	XP_021650927.1	5.89/23154	105	23
S8	1.90	0.019	Pro-hevein	XP_021650927.1	5.89/23154	120	23
S9	1.78	0.010	Pro-hevein	XP_021650927.1	5.89/23154	111	14
S10	1.72	0.046	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	175	25
S11	1.66	6E-04	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	240	38
S12	1.62	0.010	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	283	38
S13	1.61	0.021	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	282	42
S14	1.60	0.050	Thioredoxin-like protein Clot	XP_021656682.1	5.69/15060	140	46
S15	1.59	0.011	Actin-depolymerizing factor 2	XP_021663200.1	5.92/16227	131	23
S16	1.58	0.002	Small rubber particle protein-like isoform X1 (SRPP117)	XP_021653603.1	4.61/12769	168	61
S17	1.57	0.013	17.1 kDa class II heat shock protein-like	XP_021661608.1	5.52/17648	203	35
S18	1.50	0.015	17.9 kDa class II heat shock protein-like	XP_021655193.1	5.80/17535	132	19
S19	1.48	0.009	Actin-depolymerizing factor 2-like	XP_021689182.1	5.92/16220	146	51
S20	1.47	0.021	17.3 kDa class I heat shock protein-like	XP_021638116.1	6.00/18335	551	43
S21	1.42	0.010	Putative 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 2	XP_021673665.1	6.13/17998	257	30
S22	1.40	0.049	Eukaryotic translation initiation factor 5A-like	XP_021645712.1	5.60/17689	311	35
S23	1.39	0.015	Elicitor-responsive protein 3-like isoform X1	XP_021663495.1	4.06/15249	198	45
S24	1.39	0.047	Peroxisredoxin-2B-like	XP_021675296.1	5.55/17542	98	20
S25	1.38	0.016	17.3 kDa class I heat shock protein-like	XP_021638116.1	6.00/18335	327	25
S26	1.34	0.046	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	XP_021674982.1	8.78/26698	41	9
S27	1.30	0.050	ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast)	YP_004327669.1	5.17/53665	37	7
S28	1.25	0.039	Rubber elongation factor protein-like (REF175)	XP_021653600.1	5.28/19612	183	21
S29	1.24	0.010	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	XP_021653597.1	4.80/22331	448	60
S30	1.21	0.016	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	XP_021653597.1	4.80/22331	436	60
S31	1.20	0.046	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	XP_021653597.1	4.80/22331	271	57
S32	-1.20	0.049	Probable glutathione S-transferase	XP_021670613.1	6.23/25563	99	8
S33	-1.23	0.018	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	421	34
S34	-1.23	0.020	Uncharacterized protein LOC110633924	XP_021638455.1	8.91/31899	99	13
S35	-1.25	0.023	Triosephosphate isomerase, cytosolic-like	XP_021677209.1	5.76/27533	191	22
S36	-1.25	0.041	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	172	12
S37	-1.28	0.047	Triosephosphate isomerase, cytosolic	XP_021646026.1	5.90/27571	208	17
S38	-1.29	0.008	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	XP_021653592.1	5.21/25299	174	23

续表 2 乙烯和 ddH₂O 处理后巴西橡胶树胶乳中 SRP 差异蛋白信息
Tab. 2 Differential protein information of SRP in latex of *H. brasiliensis* after ethylene and ddH₂O treatment (continued)

编号 No.	差异比值 (E/D) Average ratio (E/D)	差异 可信性 T-test	蛋白名称 Protein name	蛋白登录号 Protein accession	理论等电点 /理论分子量 pI/MW (Da)	质谱得分 Score	序列匹配率 Coverage/%
S39	-1.31	0.050	Uncharacterized protein LOC110659451	XP_021673087.1	6.09/31590	323	24
S40	-1.34	0.005	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	189	25
S41	-1.35	0.033	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	165	25
S42	-1.35	0.039	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	290	25
S43	-1.38	0.035	Rran-binding protein 1 homolog b-like	XP_021645721.1	4.85/25419	300	31
S44	-1.38	0.040	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	173	42
S45	-1.42	0.017	Ricin B-like lectin R40G3	XP_021663961.1	6.16/34079	209	17
S46	-1.42	0.050	Rubber elongation factor protein (REF138)	XP_021653602.1	5.04/14713	326	55
S47	-1.45	0.023	Ricin B-like lectin R40G3	XP_021663961.1	6.16/34079	165	17
S48	-1.46	0.047	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2	XP_021673535.1	5.54/50142	143	11
S49	-1.47	0.040	Elongation factor 1-delta 1-like isoform X1	XP_021690229.1	4.47/25408	252	18
S50	-1.49	0.020	Pataatin-like protein 2	XP_021672059.1	5.13/49142	142	14
S51	-1.6	0.023	Protein EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7, chloroplastic-like	XP_021658906.1	5.11/48761	314	21
S52	-1.63	0.046	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c isoform X1	XP_021663050.1	5.14/71639	396	12
S53	-1.73	0.002	Heat shock 70 kDa protein 5	XP_021691174.1	5.36/72149	319	19
S54	-1.92	0.030	Leucine aminopeptidase 1-like	XP_021672059.1	6.30/61645	216	9
S55	-2.17	0.038	Phospholipase A1-IIdelta-like	XP_021650571.1	5.47/47415	508	18
S56	-2.53	0.041	Eukaryotic initiation factor 4A-11	XP_021638642.1	5.49/47095	470	35



A: 不同组分中关键蛋白质的 Western Blot; B: LRP 和 SRP 中关键蛋白质的 Western Blot。

A: Western Blot of key proteins in different components;
B: Western Blot of key proteins in LRP and SRP.

图 4 巴西橡胶树胶乳不同组分间关键蛋白质的 Western Blot

Fig. 4 Western blot of key proteins among different components in *H. brasiliensis* latex

以 ddH₂O 处理组作为对照, 比较乙烯刺激后 CS、RP、LRP 及 SRP 上 REF/SRPP 家族蛋白的

积累差异。Western Blot 分析显示, 乙烯刺激后 SRPP117 仅在 CS 组分中检出, 并响应乙烯刺激积累量明显增加; REF138 在 CS 及 RP 组分中都略有增加; REF175 在 RP 中且主要是 LRP 中积累量增加; REF258 在 RP 及 SRP 中变化不明显(图 5)。研究认为 REF 是 LRP 上的主要蛋白而 SRPP 是 SRP 上的主要蛋白^[10-11, 13], 但有一项针对 LRP 与 SRP 间的差异蛋白研究表明, REF138 在 LRP 和 SRP 上的表达量接近^[3], 本研究也证实这一发现, 并且 REF138 在 LRP 和 SRP 中均响应乙烯刺激积累量增加(图 5)。经 2D-DIGE 证实 LRP 及 SRP 中都存在不同等电点的 REF138 蛋白亚型, 并且这些蛋白亚型在乙烯刺激后的积累量存在差异(图 2, 表 1, 表 2)。在 LRP 上低于标准等电点(4.80)的 REF138 蛋白亚型响应乙烯刺激低积累, 高于标准等电点的 REF138 蛋白亚型响应乙烯刺激高积累(表 1)。与 LRP 不同, SRP 上有更多的 REF138 蛋白亚型响应乙烯刺激发生变化, 并且具有标准分子量(14.7 kDa)的不同蛋白亚型绝大部分响应乙烯刺激上调, 高于标准分子量

的蛋白亚型响应乙烯刺激下调（表 2），暗示了乙烯可能通过诱导 REF138 不同蛋白亚型的差异积累调控天然橡胶合成。2D-DIGE 发现 LRP 和 SRP 上 REF258 的一些不同等电点的蛋白亚型表现出明显下调趋势（表 1，表 2），但 Western Blot 分析发现 REF258 的总含量变化不大（图 5），这些结果暗示乙烯刺激后 REF258 可能通过调节其不同蛋白亚型等电点的改变对天然橡胶合成过程进行调控，具体作用机制需进一步研究加以证实。

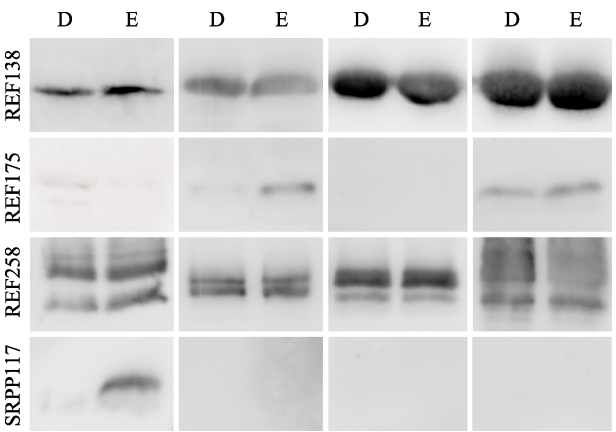


图 5 巴西橡胶树胶 C 乳清和橡胶粒子中乙烯处理组关键蛋白质的 Western Blot

Fig. 5 Western blot of key proteins in *H. brasiliensis* C-serum and rubber particle between the ethylene treated groups

2.4 关键蛋白 REF138、REF258 的互作蛋白鉴定

对巴西橡胶树胶乳中与 REF138 和 REF258 互作的蛋白分别进行鉴定后发现，与 REF138 存在相互作用关系的可信蛋白有 25 个，其中与已知

的天然橡胶合成调控相关的蛋白有 5 个；与 REF258 存在相互作用关系的可信蛋白有 55 个，其中与已知的天然橡胶合成调控相关的蛋白有 5 个（表 3）。通过对比发现，REF138、REF175、REF258、SRPP117 与 SRPP204 等 5 个天然橡胶合成调控关键蛋白质间存在相互作用，可能组成蛋白复合体存在于 RP 膜上，进而高效调控天然橡胶的合成。

除与天然橡胶合成直接相关的蛋白外，与 REF138 互作的蛋白还参与到乙醛酸和二羧酸代谢、RNA 降解与转运、内吞作用以及内质网中的蛋白质加工等过程；与 REF258 互作的蛋白参与到甘油磷脂代谢、戊糖磷酸途径、糖酵解/糖异生、异喹啉生物碱生物合成、脂肪酸代谢、RNA 降解、氧化磷酸化及 MAPK 信号通路等代谢过程中（图 6）。此外，REF138 和 REF258 都能够与一种几丁质酶 hevamine-A 相互作用，可能参与了胶乳凝集过程的调控。

3 讨论

3.1 LRP 与 SRP 响应乙烯刺激后，被抑制和促进的代谢通路存在差异

乙烯响应因子蛋白（ethylene response factor）是茉莉酸和乙烯信号通路的重要因子，调控植物防御相关基因协同作用^[21]。巴西橡胶树中的乙烯响应因子蛋白（HbERF-IXc5）在乳管代谢和应激耐受过程中发挥功能，促进乳胶的再生^[22]。HbERF-IXc4 在胶乳中有较高的转录丰度，乙烯刺激后激活其靶基因 *HbSUT3* 促进其表达^[23]，

表 3 与 REF138 和 REF258 存在相互作用关系的 REF/SRPP 蛋白家族成员信息

Tab. 3 Information of members of the REF/SRPP protein family with interaction to REF138 and REF258

DAP	蛋白登录号 Protein accession	蛋白名称 Protein name	序列匹配率 Coverage/%	匹配多肽数 Peptides
REF138	XP_021653597.1	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	71.6	11
	XP_021653602.1	Rubber elongation factor protein (REF138)	54.3	6
	XP_021653600.1	Rubber elongation factor protein-like (REF175)	21.7	4
	XP_021653603.1	Small rubber particle protein-like isoform X1 (SRPP117)	28.2	2
	XP_021653604.1	Small rubber particle protein-like isoform X2	25.7	2
REF258	XP_021653597.1	Small rubber particle protein isoform X1 (SRPP204)	71.6	11
	XP_021653602.1	Rubber elongation factor protein (REF138)	57.2	8
	XP_021653592.1	Rubber elongation factor protein-like isoform X1 (REF258)	38.4	7
	XP_021653600.1	Rubber elongation factor protein-like (REF175)	12.6	2
	XP_021653603.1	Small rubber particle protein-like isoform X1 (SRPP117)	28.2	2

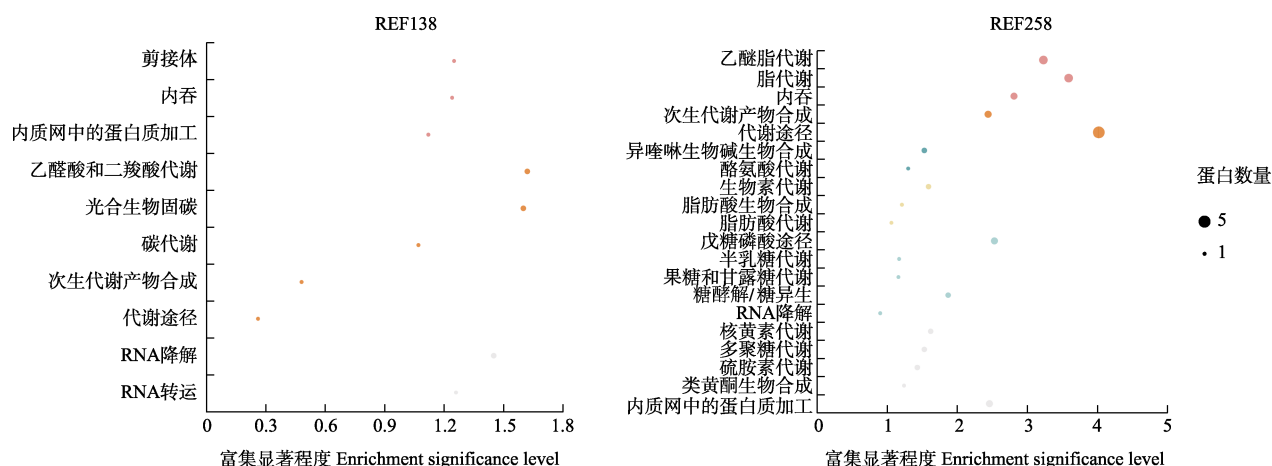


图 6 REF138 和 REF258 互作蛋白富集的 KEGG 代谢通路

Fig. 6 Enrichment of KEGG metabolic pathways of interacting proteins of REF138 and REF258

HbSUT3 的高水平表达能够促进天然橡胶产量。本研究中, 乙烯刺激后 LRP 上的 elicitor-responsive protein 3-like isoform X1 和参与糖酵解/糖异生代谢途径中的蛋白及酶类高积累, 存在相似代谢调控机制的可能。糖酵解/糖异生代谢途径能够为酶促反应提供能量, 并为橡胶链的延伸提供碳骨架^[24], 加速供能可能是 LRP 在乙烯促进天然橡胶生物合成过程中的作用之一。

乙烯促进了 SRP 上的内质网蛋白加工相关的蛋白积累, 同时抑制了内吞过程相关的蛋白积累。单层膜包被的 RP 可能起源于内质网^[25-26], SRP 上参与橡胶生物合成的关键蛋白与内质网膜密切相关^[27]。乙烯刺激可能通过促进 SRP 从内质网上招募更多的天然橡胶合成相关蛋白并进一步与 SRP 膜结合, 进而增加橡胶产量。通过分析 REF138 和 REF258 的互作蛋白功能后发现, 这一过程可能主要由 REF138 及其互作蛋白调控。有研究表明, 乙烯刺激能够明显增加胶乳中 SRP 的比例^[19], 可能进一步促进天然橡胶的合成。

3.2 LRP 与 SRP 响应外源乙烯刺激调控天然橡胶合成的模式存在差异

REF/SRPP 蛋白家族成员可与其他参与天然橡胶合成调控的蛋白形成复合体结合在 RP 膜上。橡胶转移酶 (HRT1, HRT2)、REF、SRPP 及一种桥联蛋白 (HRBP) 以多种复合体形式结合在 SRP 上^[28]。其中 HRT1 与 HRBP 形成的复合体具有异戊二烯基转移酶活性, 并对脂膜及蛋白质 α -螺旋结构域具有亲和力, 介导蛋白与膜的结合过程^[29]。本研究发现, REF138、REF175、REF258 及 SRPP117、SRPP204 间存在相互作用的可能)。乙烯刺激后,

LRP 上积累量发生变化的 REF/SRPP 蛋白家族成员蛋白点有 13 个, SRPP 上有 22 个, SRP 上的蛋白复合体响应外源乙烯刺激后具备更为复杂和精细的天然橡胶合成调控机制。

针对 RP 膜上脂类化合物组成成分分析后发现, 其磷脂含量远高于半乳糖苷含量^[28]。本研究发现 REF258 与大量的脂代谢通路蛋白及相关酶类存在相互作用的可能, 而乙烯刺激后 LRP 及 SRP 上的 REF258 不同亚型的积累均受到抑制。乙烯刺激可能通过改变 RP 膜的通透性影响跨膜运输, 极有可能使某些相关蛋白与 RP 膜的结合位点发生改变, 进而影响天然橡胶的合成调控。

外源乙烯的施用能够延长巴西橡胶树胶乳从乳管中流出的时间, 进而增加单次割胶收集的橡胶产量^[30]。胶乳凝集过程是影响胶乳流出时间的关键因素。巴西橡胶树胶乳 LO 中的胶乳凝集素样蛋白与 SRPP 结合, 促进 RP 及 LO 的聚集进而导致胶乳凝集^[31]。Hevein 是胶乳中重要的凝固因子, 贮存于 LO 中, 一旦 LO 膜破碎释放后胶乳迅速凝集^[32]。胶乳中的几丁质酶是一类抗凝固因子, 能够提高胶乳稳定性延长排胶时间。乙烯刺激后, 胶乳中几丁质酶活性随乙烯浓度增加而增加, 胶乳产量较施用乙烯前也有所增加^[33]。本研究发现 REF138 及 REF258 均可同胶乳中一种几丁质酶 (hevamine-A) 相互作用, 乙烯刺激后, SRP 上分子量为 14 kDa 左右的 REF138 蛋白亚型显著提升了积累水平, 由于 REF138 同 hevamine-A 的相互作用, SRP 上 hevamine-A 的积累水平可能也相应提升, 缓解 SRP 间、SRP 与 LO 的聚集, 延缓胶乳凝集过程。

在本研究中,通过分离 LRP 及 SRP 并获得乙烯刺激后的蛋白样本进行差异分析,LRP 上响应乙烯刺激发生积累差异的蛋白共计 37 个,SRP 上共计 56 个。LRP 的差异蛋白分别参与天然橡胶合成、糖酵解/糖异生、碳代谢及氨基酸生物合成等代谢通路,SRP 的差异蛋白分别参与内质网中的蛋白质加工、内吞及剪接体等代谢通路。并通过 Western Blot 分析部分关键差异蛋白在胶乳不同组分间及相同组分乙烯刺激后的积累差异。对其中的 REF138 及 REF258 的互作蛋白进行检测,分别获得与 REF138 相互作用的 25 个以及 REF258 存在互作关系的 55 个蛋白质信息,初步揭示了 LRP 和 SRP 响应外源乙烯刺激调控天然橡胶合成及增加胶乳产量的代谢调控机制。

参考文献

- [1] HASMA H, SUBRAMANIAM A, HASMA C H, SUBRAMANIAM A. Composition of lipids in latex of *Hevea brasiliensis* clone RRIM 501[J]. Journal of Natural Rubber Research, 1986, 1(1): 30-40.
- [2] SINGH A P, WI S G, CHUNG G C, KIM Y S, KANG H. The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384): 985-992.
- [3] XIANG Q L, XIA K C, DAI L J, KANG G J, LI Y, NIE Z Y, DUAN C F, ZENG R Z. Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasiliensis* using 2D-DIGE[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 60(1): 207-213.
- [4] DAI L J, KANG G J, LI Y, NIE Z Y, DUAN C F, ZENG R Z. In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree)[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 32(1/2): 155-168.
- [5] CHOW K S, WAN K L, ISA M N M, BAHARI A, TAN S H, HARIKRISHNA K, YEANG H Y. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(10): 2429-2940.
- [6] MEN X, WANG F, CHEN G Q, ZHANG H B, XIAN M. Biosynthesis of natural rubber: current state and perspectives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 20(1): 50.
- [7] CHEN F, THOLL D, BOHLMANN J, PICHERSKY E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. The Plant Journal, 2011, 66(1): 212-229.
- [8] ARCHER B L, AUDLEY B G, COCKBAIN E G, MCSWEEENEY G P. The biosynthesis of rubber. Incorporation of mevalonate and isopentenyl pyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis*-latex fractions[J]. Biochemical Journal, 1963, 89(3): 565-574.
- [9] BENEDICT C R, MADHAVAN S, GREENBLATT G A, VENKATACHALAM K V, FOSTER M A. The enzymatic synthesis of rubber polymer in *Parthenium argentatum* Gray[J]. Plant Physiology, 1990, 92(3): 816-821.
- [10] BERTHELOT K, LECOMTE S, ESTEVEZ Y, COULARY-SALIN B, BENTALEB A, CULLIN C, DEFFIEUX A, PERUCH F. Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e48065.
- [11] BERTHELOT K, LECOMTE S, ESTEVEZ Y, PERUCH F. *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): an overview on rubber particle proteins[J]. Biochimie, 2014, 106(1): 1-9.
- [12] YEANG H Y, YIP E, HAMZAH S. Characterisation of zone 1 and zone 2 rubber particles in *Hevea brasiliensis* latex[J]. Journal of Natural Rubber Research, 1995, 10(2): 108-123.
- [13] OH S K, KANG H, SHIN D H, YANG J, CHOW K S, YEANG H Y, WAGNER B, BREITENEDER H, HAN K H. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(24): 17132-17138.
- [14] HILLEBRAND A, POST J J, WURBS D, WAHLER D, LENDERS M, KRZYZANEK V, PRÜFER D, GRONOVER C S. Down-regulation of small rubber particle protein expression affects integrity of rubber particles and rubber content in *Taraxacum brevicorniculatum*[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41874.
- [15] SHI M J, CAI F G, TIAN W M. Ethrel-stimulated prolongation of latex flow in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): an Hev b 7-like protein acts as a universal antagonist of rubber particle aggregating factors from luteoids and C-serum[J]. Journal of Biochemistry, 2016, 159(2): 209-216.
- [16] WITITSUWANNAKUL R, PASITKUL P, KANOKWIR- OON K, WITITSUWANNAKUL D. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation[J]. Phytochemistry, 2008, 69(2): 339-347.
- [17] WANG D, XIE Q L, SUN Y, TONG Z, CHANG L L, 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.
- [18] TONG Z, WANG D, SUN Y, YANG Q, MENG X R, WANG L M, FENG W Q, LI L, WURTELE E S, WANG X C. Comparative proteomics of rubber latex revealed multiple protein species of REF/SRPP family respond diversely to ethylene stimulation among different rubber tree clones[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 958.
- [19] WANG X C, WANG D, SUN Y, YANG Q, CHANG L L, WANG L L, 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(1): 13778.
- [20] PÖSEL C, MÖLLER K, FRÖHLICH W, SCHULZ I, BOLTZE J, WAGNER D C. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50293.
- [21] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, SHINSHI H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [22] LESTARI R, RIO M, MARTIN F, LECLERCQ J, WORAATHASIN N, ROQUES S, DESSAILLY F, CLÉMENT-VIDAL A, SANIER C, FABRE D, MELLITI S, SUHARSONO S, MONTORO P. Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor HbERF-IXc5 enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 322-336.
- [23] ZHANG Y, XIN L S, PIRRELLO J, FANG Y J, YANG J H, QI J Y, MONTORO P, TANG C R. Ethylene response factors regulate expression of HbSUT3, the sucrose influx carrier in laticifers of *Hevea brasiliensis*[J]. *Tree Physiology*, 2021, 41(7): 1278-1288.
- [24] FANG P C, LONG X Y, FANG Y J, CHEN H, YU M. A predominant isoform of fructokinase, HbFRK2, is involved in *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) latex yield and regeneration[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 162(1): 211-220.
- [25] CORNISH K, WOOD D F, WINDLE J J. Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane[J]. *Planta*, 1999, 210(1): 85-96.
- [26] CHRISPEELS M J, HERMAN E M. Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(4): 1227-1234.
- [27] BROWN D, FEENEY M, AHMADI M, LONOCE C, SAJARI R, COLA A D, FRIGERIO L. Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(18): 5045-5055.
- [28] BAE S W, JUNG S, CHOI S C, KIM M Y, RYU S B. Lipid composition of latex and rubber particles in *Hevea brasiliensis* and *Taraxacum kok-saghyz*[J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 5110.
- [29] KUROIWA F, NISHINO A, MANDAL Y, HONZAWA M, SUENAGA-HIROMORI M, SUZUKI K, TAKANI Y, MIYAGI-INOUE Y, YAMAGUCHI H, YAMASHITA S, TAKAHASHI S, TOZAWA Y. Reconstitution of prenyltransferase activity on nanodiscs by components of the rubber synthesis machinery of the Para rubber tree and guayule[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 3734.
- [30] 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.
- [31] WITITSUWANNAKUL R, RUKSEREE K, KANOKWIROON K, WITITSUWANNAKUL D. A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(5): 1111-1118.
- [32] 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.
- [33] 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 ethylene and ethylene stimulation on chitinase activity and latex yield of *Hevea brasiliensis*[J]. *Chinese Journal Tropical Crops*, 2003, 24(4): 1-5. (in Chinese)