

巴西橡胶树胶乳糖基水解酶 36 家族 (HbGH36) 响应割胶和乙烯刺激表达分析

王 丹¹, 孙 勇², 彭存智¹, 仝 征^{1,3*}

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橡胶研究所, 海南儋州 571737;
3. 海南热带农业资源研究院, 海南海口 571101

摘 要: 棉子糖家族寡糖 (RFOs) 是高等植物中分布最广泛的含有半乳糖基 (-Gal) 的低聚糖。棉子糖 (Raf) 和水苏糖 (Sta) 是这一家族中的主要成员, 在多种植物中作为渗透剂或活性氧清除剂维持细胞完整性。糖基水解酶 36 家族 (GH36) 是一类 α -半乳糖苷酶, 能够催化含-Gal 的寡糖生成 RFOs。巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是合成天然橡胶的重要植物, 割胶和外源乙烯刺激后, 胶乳中糖基水解酶大量积累, 在维持胶乳稳定性方面具有重要作用。为了寻找巴西橡胶树胶乳中的功能水解酶, 本研究成功鉴定糖基水解酶 36 家族 (HbGH36) 的 8 个基因 (*HbGH36-1~8*)。qRT-PCR 分析显示, 5 个基因 (*HbGH36-1*、*HbGH36-4*、*HbGH36-6*、*HbGH36-7*、*HbGH36-8*) 在乳胶中显著表达。其中, *HbGH36-4*、*HbGH36-6*、*HbGH36-7* 和 *HbGH36-8* 在割胶刺激下呈高水平表达, 尤以 *HbGH36-4* 和 *HbGH36-7* 的表达变化最为显著。此外, *HbGH36-1*、*HbGH36-4*、*HbGH36-6* 和 *HbGH36-7* 在外源乙烯处理下也表现出高水平表达, 而 *HbGH36-6* 在乙烯诱导后维持高水平表达的时间相对更长。巴西橡胶树胶乳不同组分的 Western Blot 证实, *HbGH36-1* 和 *HbGH36-8* 的表达产物在胶乳的 C 乳清组分中高水平积累。这些结果表明巴西橡胶树 HbGH36s 可能参与了排胶过程中胶乳稳定性维持及割胶、乙烯刺激后的胶乳生理代谢调控。

关键词: 巴西橡胶树; 糖基水解酶 36 家族; 割胶; 乙烯

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

The Expression Analysis of Raffinose and Stachyose Synthetase of Glycoside Hydrolase Family 36 (HbGH36) in Latex of *Hevea brasiliensis* in Response to Tapping and Ethylene Stimulation

WANG Dan¹, SUN Yong², PENG Cunzhi¹, TONG Zheng^{1,3*}

1. Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; 3. Hainan Tropical Agricultural Resources Research Institute, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Raffinose family oligosaccharides (RFOs) are the most widely distributed oligosaccharides containing galactose (-Gal) in higher plants. Raffinose (Raf) and stachyose (Sta) are the main members of this family, which are used as osmotic agents or active oxygen scavengers in many plants to maintain cell integrity. Glycosyl hydrolase 36 family (GH36) is a kind of α -galactosidase, which can catalyze oligosaccharides containing -Gal to produce RFOs. *Hevea brasiliensis* is an important plant for synthesizing natural rubber. After tapping and stimulation by exogenous ethylene, glycosyl hydrolases accumulate in latex and play an important role in maintaining latex stability. Eight genes (*HbGH36-1~8*) of glycosyl hydrolase 36 family (HbGH36) were successfully identified to search for functional hydro-

收稿日期 2025-10-15; 接收日期 2025-10-30

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630052017006, No. 1630052016007); 海南省自然科学基金项目 (No. 325MS135)。

作者简介 王 丹 (1984—), 女, 硕士, 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。

lases in the latex of *H. brasiliensis*. QRT-PCR analysis showed that five genes (*HbGH36-1*, *HbGH36-4*, *HbGH36-6*, *HbGH36-7*, *HbGH36-8*) were obviously expressed in latex. Among the five genes, *HbGH36-4*, *HbGH36-6*, *HbGH36-7* and *HbGH36-8* were highly expressed in response to tapping stimulation, and the expression levels of *HbGH36-4* and *HbGH36-7* changed more obviously. *HbGH36-1*, *HbGH36-4*, *HbGH36-6* and *HbGH36-7* expressed at high levels in response to exogenous ethylene stimulation, and *HbGH36-6* expressed at high levels for a relatively long time after ethylene stimulation. Western blot of different components of *H. brasiliensis* latex confirmed that *HbGH36-1* and *HbGH36-8* were expressed in C-serum component of latex. The results indicate that *H. brasiliensis* HbGH36s may be involved in the regulation of latex stability and latex physiological metabolism in response to tapping and ethylene stimulation.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; glycosyl hydrolase 36 family; tapping; ethylene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.01.014

α -半乳糖苷酶属于糖苷水解酶家族,可催化各类底物中末端非还原性 α -半乳糖苷键的水解。根据其氨基酸序列的相似性,将其划分为 57 个家族 (GH1-57)^[1]。糖苷水解酶 36 家族 (GH36) 具有共同的催化机制和拓扑结构^[2]。棉子糖合成酶 (RafS, EC 2.4.1.82) 和水苏糖合成酶 (StaS, EC 2.4.1.67) 均属于 GH36。RafS 酶促产物棉子糖 (Raf) 及 StaS 酶促产物水苏糖 (Sta) 均属于棉子糖寡糖家族 (RFOs),由蔗糖 (Suc) 通过 α -1,6-糖苷键逐级连接一个或多个半乳糖基 (-Gol) 构成。Raf 普遍存在于生物体中,Sta 仅在某些特定植物中积累^[3]。RFOs 在植物体内具有重要功能,能够作为“水置换”分子提供膜和蛋白质稳定所需的氢键,在种子成熟脱水过程中保护 DNA 免受损伤^[4]。在某些植物中,RFOs 参与碳水化合物的运输和储存,同时能够提高细胞膜的稳定性及细胞的抗氧化性,甚至具备信号传导功能参与植物的胁迫反应^[5-6]。在某些极端环境中,RFOs 能够作为渗透调节物质维持细胞的完整性和基本功能。

在 RFOs 的生物合成过程中,RafS 能够催化-Gol 转移至 Suc 上生成 Raf;StaS 进一步催化-Gol 转移到 Raf 上生成 Sta。Raf 和 Sta 在植物不同部位的积累量存在差异,GolS 和 RafS 的表达水平与植物中的 Raf 和 Sta 浓度密切相关^[7]。WANG 等^[8]研究一种缺失半乳糖醇合成酶 (gols4) 的番茄突变体株系后发现,其体内 RFOs 的含量明显减少,同时其体内与苯丙烷类生物合成相关的基因表达水平降低,苯丙烷类代谢的副产物木质素和黄酮类化合物含量也显著减少。研究发现 RafS 和 StaS 定位于细胞质内,但也有研究证实 Raf 和 Sta 能够进入植物细胞的液泡和叶绿体中,也可以储存在叶肉细胞中^[9]。因此,RafS/StaS 在植

物中的表达部位是 Raf/StaS 生物合成及其行使功能的重要因素。

RafS 和 StaS 均具有不同的亚型,且在植物的特定组织间存在表达差异。在拟南芥基因组数据库中发现 6 个推测为 RafS 的基因 (*RS1-6*),其中 RS3 是一个假基因^[10]。对 RSs 的生化研究表明 AtRSs 异构体具有多种酶活性^[11-12]:RS1 涉及种子萌发的吸胀过程;RS2 对 Raf 具有半乳糖水解酶活性,但不具备 RafS 活性^[13];RS4 同时具有 RafS 和 StaS 活性,以及 Sta 和半乳糖醇特异半乳糖基水解酶活性^[14];RS5 和 RS6 均具有 RafS 活性且有助于干旱胁迫下植物体内 RFOs 的积累^[15]。

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是合成天然橡胶的重要植物。采集胶乳时,割断其位于形成层中的乳管,乳管及其周边薄壁细胞膨压促使胶乳流出。施加外源乙烯可以提高巴西橡胶树天然橡胶产量,该过程可能通过抑制胶乳凝集或延长胶乳流出时间调控胶乳产量^[16]。在前期研究中,本课题组发现巴西橡胶树胶乳中存在一些 RafS/StaS 类蛋白响应乙烯刺激而大量积累^[17],进一步分析确定这些 RafS/StaS 类蛋白属于 GH36。这些 RafS/StaS 类蛋白的大量积累可能水解产生更多的 Raf/StaS,有助于提升割胶过程中乳管细胞的稳定性。目前还未有针对巴西橡胶树 GH36 在乙烯调控天然橡胶合成过程中功能的相关报道,本研究通过分析巴西橡胶树 HbGH36 家族成员的蛋白质序列和基因序列,发现巴西橡胶树 GH36 家族中有 8 个 RafS/StaS 样基因 (*HbGH36-1~8*),其中 5 个 *HbGH36* 基因在胶乳中表达且其响应割胶或乙烯刺激的表达模式互不相同,其蛋白表达产物积累模式也存在差异。本研究结果表明,巴西橡胶树在割胶和乙烯刺激后,HbGH36 在维持胶乳稳定性的过程中发挥一定的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Mull.Arg., RY 7-33-97) 种植于中国海南省儋州市中国热带农业科学院试验农场。选取 30 株 8 年生未割胶的成熟植株, 参考 TONG 等^[18]的方法, 于距地面 120 cm 处开割树干, 收集初始流出的胶乳作为空白对照 (CK)。24 h 后, 将 15 株树的割面涂抹 3% (V/V) 乙烯利, 并分别于处理后 24、72 h 收集胶乳, 作为乙烯处理样本 (E24、E72)。另 15 株树则以 ddH₂O 进行相同处理, 收集胶乳样本 (D24、D72)。每个样本由同组 5 株树的胶乳混合构成一个生物学重复, 各处理设置 3 个生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 巴西橡胶树 GH36 基因的克隆 参照 TONG 等^[18]的方法从胶乳样本中提取总 RNA。使用 1 μ g RNA 和 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒合成第一链 cDNA。通过拟南芥 RS 蛋白序列在巴西橡胶树蛋白质数据库中进行 Blast 比对, 筛选获得巴西橡胶树中同源蛋白信息。根据编码序列设计特异性引物, 扩增 RS 样基因的开放阅读框, 从中获得巴西橡胶树胶乳 GH36 家族基因。进一步采用 RACE 技术克隆 HbGH36 基因 ORF 的 3' 和 5' 末端序列, 提交 HbGH36 家族基因的完整 cDNA 序列至 NCBI GenBank。

1.2.2 HbGH36 的多重序列比对分析及可视化编辑 采用 EBI ClustalW server、BioEdit 7.0 软件进行多重序列比对。采用 MEGA 5.0 软件对 HbGH36s 和 AtGH36s 进行系统发育与分子进化分析。

1.2.3 qRT-PCR 分析 使用 1.2.1 的胶乳样本中提取的总 RNA 进行 qRT-PCR 分析。采用 RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit 合成第一链 cDNA, 并以之为模板, 在 Agilent Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪上使用 2 $\times$ Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 进行扩增反应。以 HbACTIN 基因 (JF775488.1) 作为内参, 通过熔解曲线分析确认扩增产物的特异性。采用 Agilent MxPro qPCR 软件分析基因相对表达量, 以对照组 (CK) 中各基因的表达水平作为校准基准。所有试验均设置 3 个生物学重复。

1.2.4 HbGH36s 的 Western blot 分析 采用改进的苯酚抽提法从第 1.2.1 的胶乳样本中提取蛋白质^[19]。取 20 μ g 蛋白样本经 12% SDS-PAGE 分离后, 通过半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜。使

用 5% 脱脂奶粉对膜进行封闭过夜处理。封闭后的膜依次与兔源 HbGH36 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗孵育。每次孵育后均采用 TBST (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5, 0.5% Tween-20) 洗涤 3 次。使用 BeyoECL Plus 超敏化学发光试剂盒进行显色, 并通过化学发光成像系统采集信号。

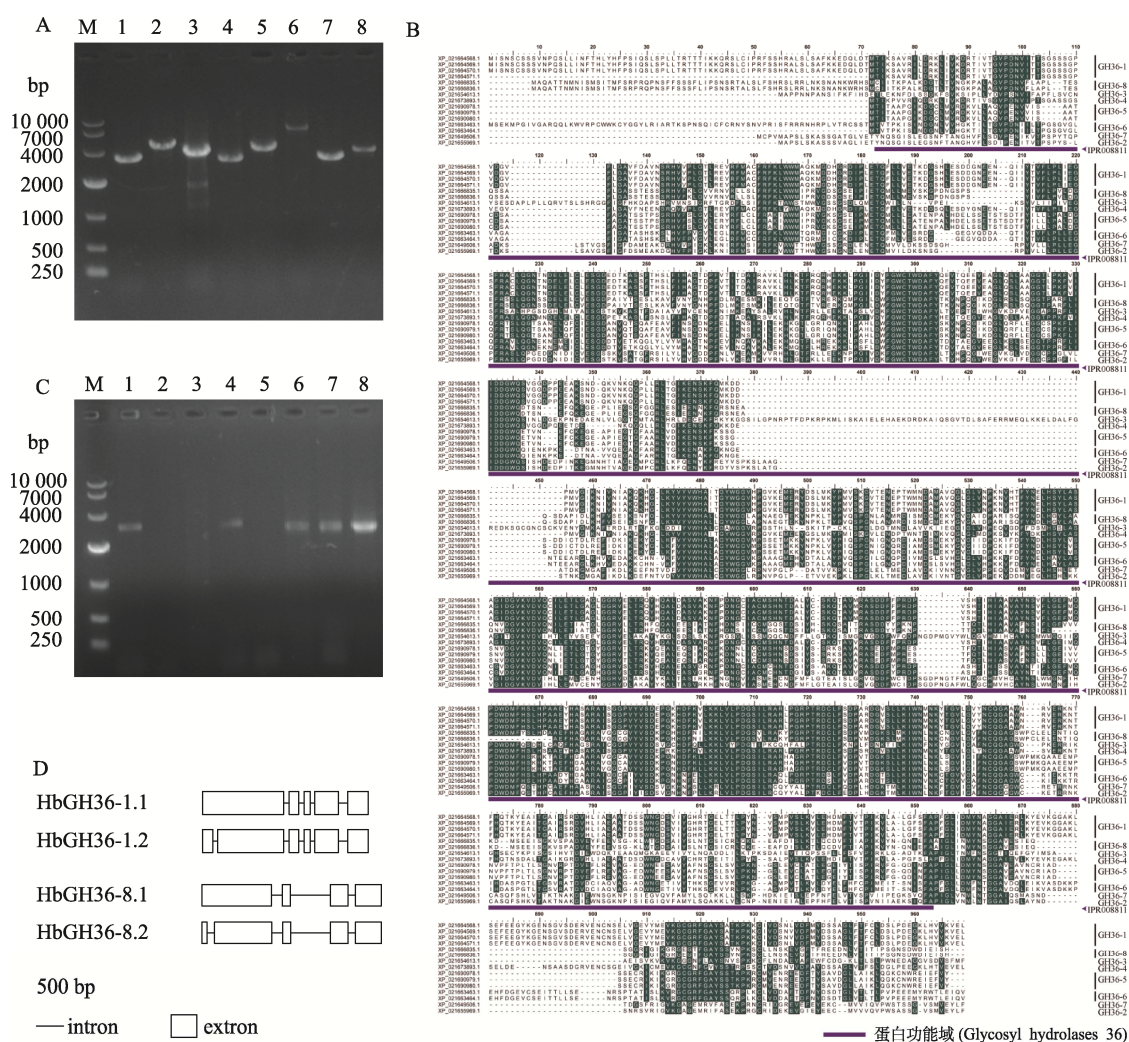
2 结果与分析

2.1 HbGH36 家族基因克隆

通过对巴西橡胶树基因组及蛋白质数据库的系统分析, 本研究共鉴定到 8 个 GH36 家族基因 (HbGH36-1~8) (图 1A, 表 1), 其编码的 15 个蛋白产物均含有典型的 GH36 家族结构域 (图 1B, 表 1), 经序列比对确认其为 GH36 家族成员, 并推测其具有 RafS/StaS 活性。为进一步探究这些基因在胶乳中的表达情况, 以橡胶树胶乳 cDNA 为模板进行开放阅读框扩增, 成功获得 5 个在胶乳中表达的 HbGH36 基因, 分别为 HbGH36-1、HbGH36-4、HbGH36-6、HbGH36-7 和 HbGH36-8 (图 1C)。利用 RACE 技术扩增上述基因 ORF 两侧的 3' 和 5' 末端序列, 发现 HbGH36-1 和 HbGH36-8 各存在 2 种不同形式的可变剪接, 分别命名为 HbGH36-1.1、HbGH36-1.2、HbGH36-8.1 和 HbGH36-8.2 (图 1D)。综上, 本研究从橡胶树胶乳中最终确认了 7 个 HbGH36 家族基因的完整 cDNA 序列, 并已提交至 NCBI GenBank, 登录号如下: HbGH36-1.1 (MF503600)、HbGH36-1.2 (MF503601)、HbGH36-8.1 (MF603602)、HbGH36-8.2 (MF503603)、HbGH36-4 (MF503650)、HbGH36-6 (MF503306) 和 HbGH36-7 (MF502604)。

2.2 HbGH36 家族系统进化分析

将 8 个 HbGH36s 的 CDS 序列与 37 个拟南芥 GH36 家族基因的 CDS 序列共同构建进化树 (图 2), 发现 8 个 HbGH36s 并不聚集在同一个进化分支中, 而是与不同的拟南芥 GH36 家族成员聚集在 3 个进化分支中。表明 HbGH36s 在进化过程中发生了显著的趋异分化, 未形成独立的物种特异性进化聚类群, HbGH36 家族成员可能起源于多轮基因复制事件后的功能分化, 而非单一祖先基因的线性扩增。从功能关联角度推测, 不同分支的 HbGH36s 可能继承了对应拟南芥 GH36 同源蛋白的保守功能特征。



A: 基因组 DNA 中 HbGH36 家族基因的检测; B: HbGH36 蛋白家族多重序列比对; C: 胶乳中 HbGH36 家族基因的表达检测; D: HbGH36-1, HbGH36-8 的不同剪接形式。M: DS10000 DNA marker, 1~8: HbGH36-1~8 基因。
A: Genomic DNA detection of HbGH36 family genes in *H. brasiliensis*; B: Multiple sequence alignment of the GH36 protein family from *H. brasiliensis*; C: Expression analysis of HbGH36 family genes in latex; D: Different splicing forms of HbGH36-1 and HbGH36-8.
M: DS10000 DNA marker, 1~8: PCR products of HbGH36-1 to HbGH36-8, respectively.

图 1 HbGH36 家族基因克隆及多重序列比对

Fig. 1 Cloning and multiple sequence alignment of HbGH36 family genes

2.3 胶乳 HbGH36s 响应割胶和乙烯刺激的表达分析

通过 qRT-PCR 分析割胶和乙烯刺激后胶乳中 HbGH36s 的表达模式,发现 HbGH36-1、HbGH36-4、HbGH36-6、HbGH36-7 和 HbGH36-8 在胶乳中有显著的表达差异(图 3)。在乙烯刺激早期,HbGH36-1 表达水平显著提高,相较 HbGH36-1.1 剪接形式,HbGH36-1.2 剪接形式表现出更显著的变化。HbGH36-1.2 相较 HbGH36-1.1 缺失一段被剪切掉的内含子序列,HbGH36-1.1 中该内含子的存在使得其编码框后移,翻译的蛋白质相较 HbGH36-1.2 对应的蛋白质缺失了 N 端的 71 个氨基酸(缺失的氨基酸序列为: MISNSCSSSVNPQSLINFTHLY-

HFPSIQSLSPLLTRTTTIKKQRSLCIPRFSSHRALSLSAFKKEDQLDT)。在外源乙烯刺激过程中,巴西橡胶树可能通过在胶乳中产生更多的 HbGH36-1.2 剪接形式调控天然橡胶合成;在响应割胶刺激方面,HbGH36-1 表达水平变化不明显。HbGH36-4、HbGH36-6、HbGH36-7 在乙烯刺激早期表达水平均显著提高,其中 HbGH36-6 可能在乙烯刺激后相对较长时间内均持续了高水平的表达;HbGH36-4 不仅受到乙烯刺激诱导,同时也持续响应割胶刺激表达水平明显提高;HbGH36-6 和 HbGH36-7 在早期割胶过程中表达水平提升显著,但之后的割胶刺激表达水平变化不明显。HbGH36-8 响应早期割胶刺激表达水平上升,但对乙烯刺激反应不明显。

表 1 巴西橡胶树中糖基水解酶 36 家族（GH36）同源蛋白及基因列表
Tab. 1 List of homologous proteins and genes of glycohydrolase 36 family (GH36) in *H. brasiliensis*

匹配蛋白编号 Hits protein ID	蛋白名称 Protein name	序列相似性 Identity/%	基因编号 Gene ID	基因名称 Gene name
XP_021664568.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 6 isoform X1	84.264	LOC110653311	<i>HbGH36-1</i>
XP_021664569.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 6 isoform X2	84.264	LOC110653311	
XP_021664570.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 6 isoform X3	84.264	LOC110653311	
XP_021664571.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 6 isoform X4	84.311	LOC110653311	
XP_021655969.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 5	36.742	LOC110646741	<i>HbGH36-2</i>
XP_021654613.1	stachyose synthase	35.892	LOC110645696	<i>HbGH36-3</i>
XP_021673893.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 6	84.082	LOC110660051	<i>HbGH36-4</i>
XP_021690978.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2	43.639	LOC110672496	<i>HbGH36-5</i>
XP_021690979.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2	43.639	LOC110672496	
XP_021690980.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2	43.639	LOC110672496	
XP_021663463.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2 isoform X1	55.443	LOC110652213	<i>HbGH36-6</i>
XP_021663464.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2 isoform X2	55.669	LOC110652213	
XP_021649506.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 5	37.280	LOC110641913	<i>HbGH36-7</i>
XP_021666835.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2 isoform X1	44.374	LOC110654991	<i>HbGH36-8</i>
XP_021666836.1	probable galactinol-sucrose galactosyltransferase 2 isoform X2	42.857	LOC110654991	

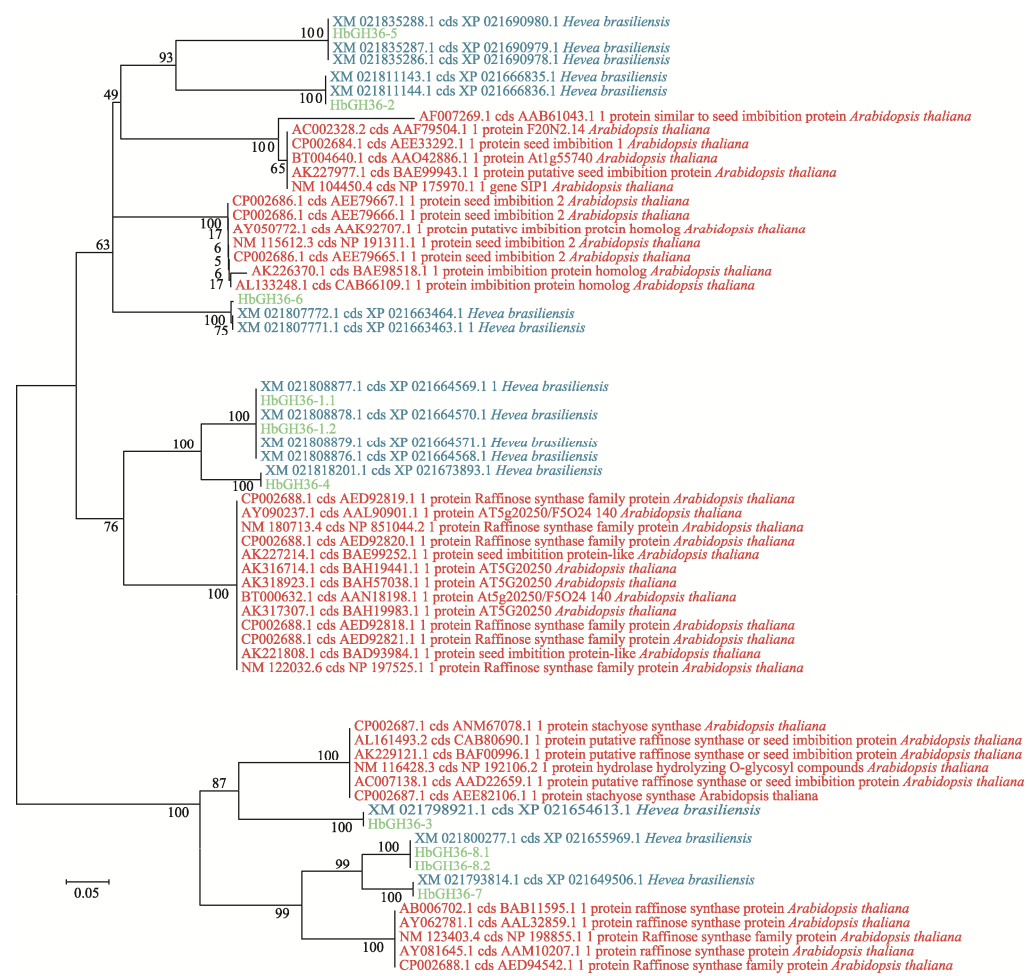
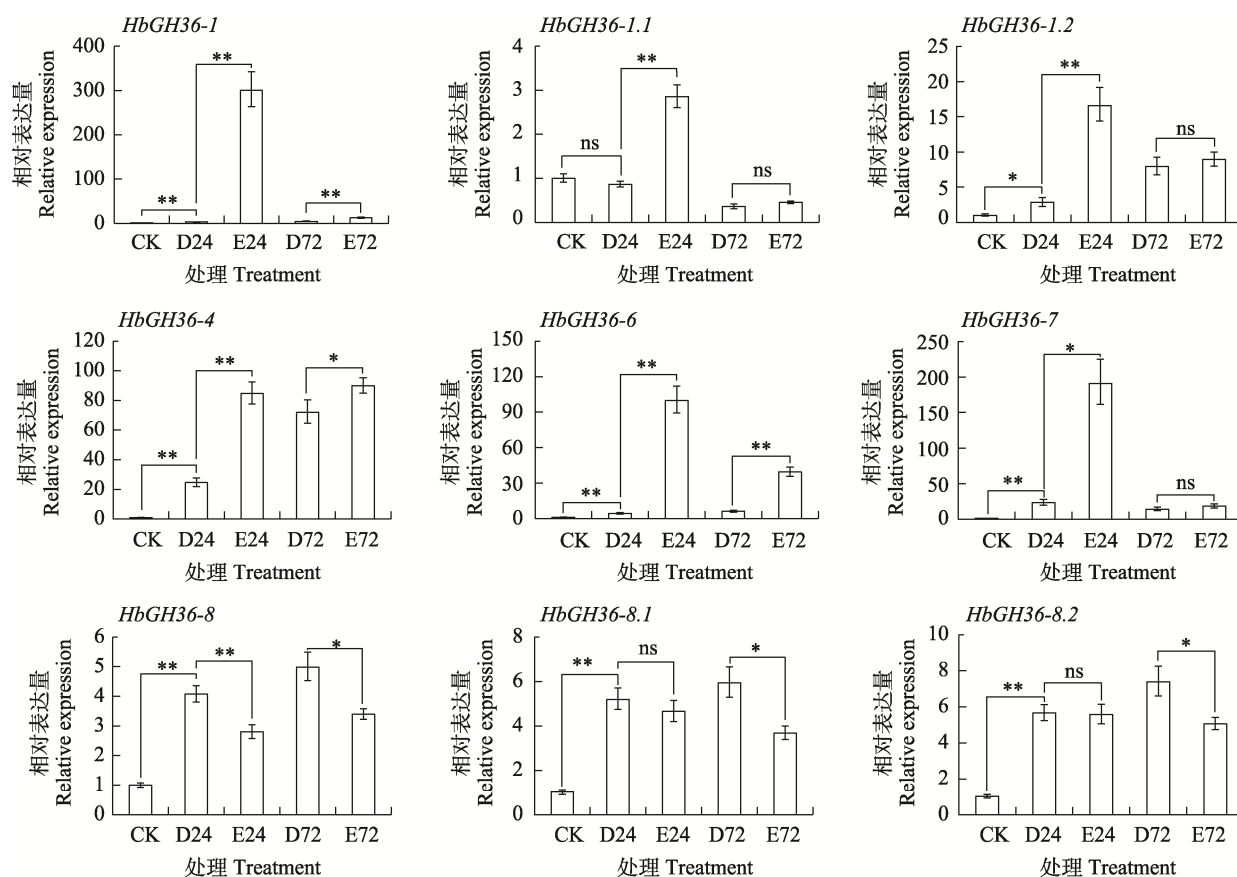


图 2 巴西橡胶树 HbGH36 家族与 AtGH36 家族系统进化分析
Fig. 2 Phylogenetic analysis of HbGH36 family and AtGH36 family



ns 表示无显著差异, *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$).

ns indicates not significant, * indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 3 HbGH36s 响应割胶和乙烯刺激在巴西橡胶树胶乳中的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of HbGH36s gene in rubber latex of *Hevea brasiliensis* in response to tapping and ethylene stimulation

结合系统进化树分析结果,发现处于同一进化分支上的 HbGH36-1 和 HbGH36-4 的表达模式存在差异。HbGH36-1 的 2 种剪接形式对割胶刺激均无响应,但 HbGH36-1.2 响应乙烯刺激的反应相对更明显,2 种剪接形式的 HbGH36-8 均对乙烯刺激无响应。

2.4 巴西橡胶树胶乳不同组分中 HbGH36 蛋白响应割胶和乙烯刺激的 Western Blot 分析

巴西橡胶树胶乳经高速离心 ($40\,000\times g$, $4\,^{\circ}\text{C}$, 30 min) 后由上到下分为 3 个组分,分别为橡胶粒子 (RP)、C 乳清 (CS) 和黄色体 (LO)。Western blot 分析 (图 4) 发现, HbGH36-1 的兔血清多克隆抗体杂交后分别在分子量 87、95 kDa 处出现目标条带。经蛋白分子量预测, HbGH36-1.1 的蛋白理论分子量为 86.8 kDa, HbGH36-1.2 的蛋白理论分子量为 94.8 kDa, 因此认为分子量 87 kDa 处条带变化可显示 HbGH36-1.1 蛋白的积累量变化趋势,分子量 95 kDa 处条带变化可显示 HbGH36-1.2

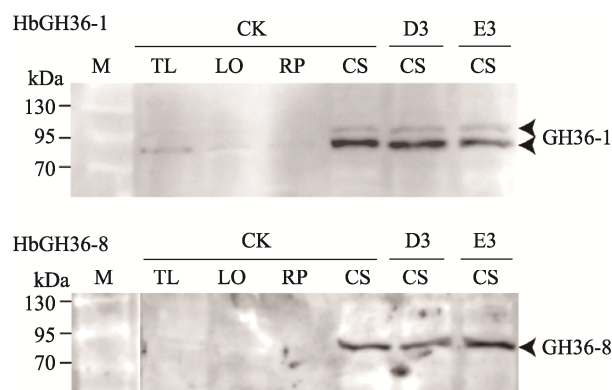


图 4 巴西橡胶树胶乳不同组分中 HbGH36 蛋白响应割胶和乙烯刺激的 Western Blot 分析

Fig. 4 Western Blot analysis of HbGH36 protein in different components of *H. brasiliensis* latex in response to tapping and ethylene stimulation

蛋白的积累量变化趋势。而 HbGH36-8 仅在分子量 86 kDa 处出现目标条带。经蛋白分子量预测, HbGH36-8.1 的表达蛋白理论分子量为 86.1 kDa, HbGH36-8.2 的表达蛋白理论分子量为 78.8 kDa,

因此认为分子量 86 kDa 处条带变化可显示 HbGH36-8.1 蛋白的积累量变化趋势。

Western blot 结果表明，HbGH36-1 和 HbGH36-8 主要在 CS 组分中积累，并且 HbGH36-1.1 和 HbGH36-1.2 响应乙烯刺激积累量略减少，而 HbGH36-8 响应乙烯刺激积累量略增加。这一变化规律与其基因在相同处理过程中的表达水平变化规律相反。*HbGH36-1* 基因转录水平的上调可能是对乙烯刺激的快速初始响应，通过短时间内积累 mRNA 为蛋白合成储备模板，以保障机体对信号的及时感知。这种基因表达与蛋白积累在时间上的不一致，一方面可能源于基因转录与蛋白合成、积累过程本身存在的时空差：转录产物 mRNA 的积累与蛋白的最终稳态积累并非同步发生；另一方面，蛋白质作为生命功能的直接执行者，其表达水平需受到更精细的调控，例如，通过泛素化降解等翻译后调控机制，在转录启动的基础上限制 HbGH36-1 蛋白的过量积累，从而避免其对胶乳正常功能造成干扰。

3 讨论

3.1 巴西橡胶树响应割胶和乙烯刺激后，GH36 家族成员基因表达水平存在差异

本研究中，对巴西橡胶树割胶和乙烯刺激后，在胶乳中共发现 5 个具有 RafS/StaS 活性的 HbGH36s 响应割胶和乙烯刺激差异表达。Raf 和 Sta 在细胞中的积累能够通过调节细胞渗透压提升细胞完整性，增加植株整体的耐干旱和盐胁迫水平。研究发现，玉米中 *RafS* 基因家族的 *ZmRAFS* 是保护植物免受非生物胁迫的关键基因，该基因的过表达增强了植物的干旱胁迫耐受性^[20]。猕猴桃的 *RafS*（*AcRFS4*）转录水平因盐胁迫而显著增加，*AcRFS4* 在拟南芥中的过量表达证明该基因增强了 Raf 的积累和植株对盐胁迫的耐受性^[21]。盐胁迫同样影响了不同蒲公英品种间 GH 家族中重要酶编码基因的表达水平，二者间存在萜类代谢物、泛醌生物合成代谢物和丙酮酸代谢物含量的实质性差异，进而表现出不同的盐胁迫的耐受性^[22]。芝麻有 5 个不同基因型的 *RafS* 和 2 个不同基因型的 *StaS* 响应干旱胁迫后上调表达，但对低温胁迫的基因表达水平变化不明显^[23]。表明芝麻中 *RafS* 和 *StaS* 更多地参与了明显改变植物细胞渗透压的干旱胁迫调控。在菜豆响应干旱胁迫

早期，其根部检测到 *RafS* 基因 *PvRS2* 显著上调，而在初生叶片中则发现 *StaS* 基因 *PvSS* 显著上调^[24]，表明虽然 *RafS* 和 *StaS* 都参与了植物干旱胁迫调控但存在组织差异，可能存在各自特有的调控机制。巴西橡胶树的割胶是切开位于巴西橡胶树韧皮部的乳管，且不破坏维管形成层的情况下使得胶乳流出的过程，属于非生物胁迫，在排胶过程中乳管细胞的渗透压发生变化。本研究发现 *HbGH36-4*、*HbGH36-6*、*HbGH36-7* 和 *HbGH36-8* 响应割胶刺激高水平表达，但每个基因家族成员响应刺激后的表达模式存在差异，其中 *HbGH36-4* 和 *HbGH36-7* 表达量增加得更为明显，可能在巴西橡胶树乳管细胞的抗逆境胁迫调节过程中发挥更为重要的功能。

3.2 HbGH36s 在巴西橡胶树的割胶和乙烯刺激过程中参与 Raf/Sta 的代谢调控

植物体内的 *RafS*/*StaS* 可能通过调控乙烯信号通路参与植物响应低温胁迫调控。在一项针对棉花 *RafS* 家族的全基因组的鉴定和表达分析研究中发现，*RafS* 基因启动子区中的各种顺式元件与植物激素反应元件和非生物胁迫反应元件相关，预测大多数 *RafS* 基因参与植物激素反应^[25]。乙烯信号通路参与调控植物响应冷胁迫的过程，正调控小麦、葡萄等植物的耐冷性^[26-27]，负调控藜苜蓿等植物的低温耐受性^[28]。表明乙烯信号通路在不同植物对冷胁迫的反应中发挥不同作用。乙烯反应因子（ERFs）是乙烯信号通路的下游调控因子，调节信号下游应激反应基因的表达^[29]。一项针对番茄的研究发现，低温胁迫导致其体内 RFOs 的积累从而诱导 ERF 转录以进一步促进内源乙烯的生物合成，并因此调节下游的防御反应以增强番茄植物的耐寒性^[30]。巴西橡胶树乙烯反应因子 *HbERF-IXc5* 已被证实可以提高植株的耐寒性^[31]，外源乙烯刺激同样可以促进胶乳中 ERF 的表达和积累^[17]。巴西橡胶树糖基水解酶 36 家族的 8 个基因中有 5 个在胶乳中表达，其中 *HbGH36-1*、*HbGH36-4*、*HbGH36-6* 和 *HbGH36-7* 响应外源乙烯刺激在乳胶中有显著表达差异，可能参与乙烯信号通路的调控代谢。其中 *HbGH36-1* 在乙烯刺激早期表达水平显著提高，相较 *HbGH36-1.1* 剪接形式，*HbGH36-1.2* 剪接形式可能存在更为显著的调控模式。

4 结论

割胶和外源乙烯刺激是巴西橡胶树天然橡胶生产过程中重要的非生物胁迫过程。在此过程中, 具有 RafS/StaS 活性的糖基水解酶 36 家族中 5 个成员响应割胶和乙烯刺激差异表达。*HbGH36-4*、*HbGH36-6*、*HbGH36-7* 和 *HbGH36-8* 响应割胶刺激高水平表达, 其中 *HbGH36-4* 和 *HbGH36-7* 表达量变化更为明显; *HbGH36-1*、*HbGH36-4*、*HbGH36-6* 和 *HbGH36-7* 响应外源乙烯刺激高水平表达, *HbGH36-6* 在乙烯刺激后的高水平表达持续了相对较长时间。巴西橡胶树胶乳不同组分的 Western Blot 证实, *HbGH36-1* 和 *HbGH36-8* 在胶乳的 CS 组分中表达, 割胶和外源乙烯刺激后, 与基因水平变化相比蛋白水平的变化相对滞后。这些结果表明, *HbGH36s* 在巴西橡胶树的割胶和乙烯刺激过程中参与 Raf/Sta 的代谢调控, 可能通过调节乳管细胞的渗透压参与排胶过程中胶乳稳定性的调控。

参考文献

- [1] HENRISSAT B, BAIRIOCH A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 316(2): 695-696.
- [2] NAUMOFF D G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76(6): 622-635.
- [3] SONALI S, SRITAMA M, PAPRI B, MAJUMDER A L. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 656.
- [4] PETERBAUER T, RICHTER A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds[J]. *Seed Science Research*, 2001, 11: 185-197.
- [5] VAN DEN ENDE W, VALLURU R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(1): 9-18.
- [6] VALLURU R, VAN DEN ENDE W. Myo-inositol and beyond-emerging networks under stress[J]. *Plant Science*, 2011, 181(4): 387-400.
- [7] KARNER U, PETERBAUER T, RABOY V, JONES D A, HEDLEY C L, RICHTER A. myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(405): 1981-1987.
- [8] WANG S, HE P J, WANG Z J, ZHANG H D, MENG S D, QI M F. Galactinol synthase 4 influences plant height by affecting phenylpropanoid metabolism and the balance of soluble carbohydrates in tomato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2025, 220: 109484.
- [9] NÄGELE T, HEYER A G. Approximating subcellular organisation of carbohydrate metabolism during cold acclimation in different natural accessions of *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(3): 777-787.
- [10] NISHIZAWA A, YABUTA Y, SHIGEOKA S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(3): 1251-1263.
- [11] PETERS S, EGERT A, STIEGER B, KELLER F. Functional identification of *Arabidopsis* AT3G57520 as an alkaline α -galactosidase with a substrate specificity for raffinose and an apparent sink-specific expression pattern[J]. *Plant Cell Physiology*, 2010, 51(10): 1815-1819.
- [12] KNAUPP M, MISHRA K B, NEDBAL L, HEYER A G. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles[J]. *Planta*, 2011, 234(3): 477-486.
- [13] EGERT A, KELLER F, PETERS S. Abiotic stress-induced accumulation of raffinose in *Arabidopsis* leaves is mediated by a single raffinose synthase (RS5, At5g40390)[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 218.
- [14] GANGL R, BEHMÜLLER R, TENHAKEN R. Molecular cloning of *AtRS4*, a seed specific multifunctional RFO synthase/galactosylhydrolase in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 789.
- [15] GANGL R, TENHAKEN R. Raffinose family oligosaccharides act as galactose stores in seeds and are required for rapid germination of *Arabidopsis* in the dark[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1115.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [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, SHI M J, LU X L, MA R F, WU C G, GUO A P, PENG M, TIAN W M. A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS[J]. Proteome Science, 2010, 8: 35.
- [20] LI T, ZHANG Y M, LIU Y, LI X D, HAO G L, HAN Q H, DIRK L M A, DOWNIE A B, RUAN Y L, WANG J M, WANG G Y, ZHAO T Y. Raffinose synthase enhances drought tolerance through raffinose synthesis or galactinol hydrolysis in maize and Arabidopsis plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(23): 8064-8077.
- [21] YANG J, LING C C, LIU Y Y, ZHANG H M, HUSSAIN Q, LYU S, WANG S H, LIU Y S. Genome-wide expression profiling analysis of kiwifruit GolS and RFS genes and identification of AcRFS4 function in raffinose accumulation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 8836.
- [22] FENG W, MENG R, CHEN Y, LI Z J, LU X L, WANG X P, WU Z. Preliminary analysis of the salt-tolerance mechanisms of different varieties of dandelion (*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) under salt stress[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2025, 47(6): 449.
- [23] YOU J, WANG Y Y, ZHANG Y J, DOSSA K, LI D H, ZHOU R, WANG L H, ZHANG X R. Genome-wide identification and expression analyses of genes involved in raffinose accumulation in sesame[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4331.
- [24] DE KONING R, WILS G E, KIEKENS R, VUYST L D, ANGENON G. Impact of drought and salt stress on galactinol and raffinose family oligosaccharides in common bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. AoB Plants, 2023, 15(4): plad038.
- [25] CUI R F, WANG X G, MALIK W A, LU X K, CHEN X G, WANG D L, WANG J J, WANG S A, CHEN C, GUO L X, CHEN Q J, YE W W. Genome-wide identification and expression analysis of Raffinose synthetase family in cotton[J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(1): 356.
- [26] YU X M, GRIFFITH M, WISEMAN S B. Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves[J]. Plant Physiology, 2001, 126(3): 1232-1240.
- [27] REN C, FAN P G, LI S H, LIANG Z C. Advances in understanding cold tolerance in grapevine[J]. Plant Physiology, 2023, 192(3): 1733-1746.
- [28] ZHAO M G, LIU W J, XIA X Z, WANG T Z, ZHANG W H. Cold acclimation-induced freezing tolerance of *Medicago truncatula* seedlings is negatively regulated by ethylene[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 152(1): 115-129.
- [29] 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.
- [30] LIU Y D, ZHANG L, MENG S D, LIU Y F, ZHAO X M, PANG C P, ZHANG H D, XU T, HE Y, QI M F, LI T L. Expression of galactinol synthase from *Ammopiptanthus nanus* in tomato improves tolerance to cold stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(1): 435-449.
- [31] 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.