

信息与资料 **Information and Data****橡胶树死皮病的形成及其机制**

覃宝祥 胡新文 邓晓东 郭建春*

中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口571101

Mechanism and Formation of Tapping Panel Dryness Symptom in *Hevea*

QIN Bao-Xiang, HU Xin-Wen, DENG Xiao-Dong, GUO Jian-Chun*

Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, State Key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

提要 橡胶树死皮病为一复杂的生理综合症, 对其发病机制至今仍缺乏了解。文章主要从活性氧诱发胶乳原位凝固、核酸与蛋白质代谢失调两个方面阐述橡胶树死皮病的发生机制。

关键词 橡胶树; 死皮病; 活性氧; 分子机制

橡胶树死皮病(tapping panel dryness, TPD)的症状为割线排胶减少或完全停排, 它既可以自发产生, 也可以通过各种内外因素诱导产生。自从1877年巴西发生橡胶树死皮病以来, 给橡胶生产带来了严重的危害。随着上世纪70年代高产无性系及乙烯刺激提高胶乳产量技术的推广, 橡胶树死皮病的发病率和严重度都呈逐年上升趋势。一些早熟高产品系的发病率可高达30%以上^[1]。最新统计资料表明: 以橡胶树死皮病平均发病率为10%计, 全球天然橡胶的损失可达 5×10^5 t, 价值折合约4.8亿美元。我国因橡胶树死皮每年损失的干胶约 4×10^4 t, 价值人民币3亿多元^[2]。因此, 对于橡胶树死皮病的研究不仅在理论上而且在生产实践中都有重要意义。了解橡胶树死皮病的形成及其分子机制是治理橡胶树死皮病的前提, 本文就橡胶树死皮病的发病机制及其分子基础的研究进展作一简述。

1 橡胶树死皮形成的各种假说

橡胶树死皮病的成因十分复杂。围绕橡胶树死皮病的病因和发病机制, 人们曾分别从病理、生理、遗传、环境因子、土壤和生物化学等方面进行了探索与研究, 得出了一些假说, 刘志昕和郑学勤^[3]将这些假说主要归纳为:

(1) 树皮有效水分波动和胶乳极度稀释致病说。Sharples和Lambourne^[4]、Frey-Wyssling^[5]认为, 过度排胶促进的水分向乳管系统运输可引起

树皮内水分发生不正常波动, 胶乳极度稀释, 从而导致死皮。

(2) 病原微生物致病说。人们曾一度怀疑死皮是由于病原菌如细菌、病毒或类菌原体的侵染所致^[6]。但至今人们尚未曾分离出导致死皮的病原体^[5], 而且将死皮的芽嫁接在健康树的树皮上, 也没有观察到死皮侵染至其它部位的现象^[7]。所以现在把橡胶树死皮病归因为一种生理综合症。

(3) 局部性严重创伤反应说。Rands^[8]认为割胶是一种反复的机械创伤, 这种局部创伤引起组织产生和分泌的黄色树脂(类似于植物经创伤后分泌的“伤胶”)会在乳管壁中沉积导致胶乳排放受阻从而引发死皮。

(4) 贮备物质消耗殆尽与营养亏缺说。Paranjothy等^[9]从强割后的胶树以及木质部组织中发现淀粉都已消失的现象, 推测死皮由于过度排胶引起贮备物质消失殆尽所致。因此他们认为, 树冠生长中心和胶乳再生中心两者竞争养分, 以致树皮处于“饥饿状态”而死皮。

(5) 乳管衰老假说。Chua^[10]发现死皮树树皮中氮含量和可溶性蛋白质含量低于正常产胶树, 据此推测, 死皮与蛋白质和核酸流失过多有关, 而

收稿 2005-09-05

资助 国家自然科学基金(30160096)。

*通讯作者(E-mail: Jianchunguo@163.com, Tel: 0898-66890635)。

核酸与蛋白质的过度流失会破坏同化过程的平衡, 导致乳管衰老和机能丧失, 最终引发死皮。

(6) 乳管壁透性降低致病说。Bealing和Chua^[11]比较了强割胶树与常规强度割胶胶树的胶乳和树皮的养分, 观察到胶乳中磷、镁、钙等无机成分, 含氮量和碳水化合物随着割胶强度的增大而降低, 而树皮中这些成分在常规强度割胶和强度割胶之间则没有什么差异, 因此推测, 可能是强割所流失的养分由于乳管壁透性降低而不能从周围树皮组织中得到补充, 乳管壁木栓化导致乳管壁透性降低到临界点, 从而引起死皮的发生。

(7) 遗传及环境影响说。Pushpades^[12]分析土壤、叶片及胶乳时, 发现营养不平衡者易感死皮病。Sivakumaran等^[1]指出, 在较干旱的地区和较贫瘠的土壤上, 高产无性系如PB235、PB260的死皮病感染率较高。范思伟和杨少琼^[13]在田间实验中发现, 不同品系的橡胶树对死皮的敏感度不同。因此他们认为死皮似乎是某些无性系的特征, 和遗传有很大关系。

(8) 防护机制和保护反应说。Wycherley^[14]认为死皮是一种防止同化物质更多消耗的保护机制; 许文献和校现周^[15]认为死皮是橡胶树对强烈创伤的一种保护反应。

(9) 黄色体破裂说。Paranjothy^[16]认为强割易造成离子不平衡和低的渗透势, 从而破坏黄色体而触发死皮发生。

(10) 自由基假说。Chrestin^[17]认为, 死皮是由于有毒的过氧化活性与清除活性之间失去平衡引起黄色体破裂所致。

2 橡胶树死皮病的病因和解剖学特征

通常认为橡胶树死皮病的病变起源于乳管(类似于动物的血管, 由活细胞组成, 是胶乳产生和贮藏的场所)。当乳管被切断时, 由于乳管内膨压的影响, 乳管即排胶。开割橡胶树的产胶和排胶之间是一个双向反馈系统(产胶 \rightleftharpoons 排胶), 但在强割、强乙烯刺激或两者相结合采割的情况下, 这一系统的动态平衡会打破, 系统即维持产胶 \rightarrow 排胶的单向性, 结果产生过度排胶现象, 从而引起乳管细胞原位自毁而死皮^[18]。因此, 人们推测死皮的起因是强割、强乙烯刺激或两者相结合采割结果所引起的过度排胶^[19]。而解剖学的研究表

明: 胶乳原位凝固(胶乳在乳管中凝固)和拟侵填体(近乳管的薄壁细胞外突增生)的形成是橡胶树死皮病特有的症状。迄今, 人们对此问题的共识是: 橡胶树死皮病的核心是胶乳的原位凝固, 且胶乳的原位凝固在先, 拟侵填体形成在后, 死皮病形成后期, 拟侵填体继续增生, 细胞壁木质化, 并聚集丹宁, 引起近乳管的薄壁细胞变形增长, 从而破坏外层乳管的结构, 最终产胶功能丧失。由此看来, 死皮的成因似乎表现在胶乳原位凝固和产胶功能衰竭两个方面。

总之, 橡胶树死皮病可能是一种复杂的生理综合症——一种由强割或强乙烯刺激引起过度排胶, 进而导致胶乳原位凝固和产胶功能衰竭、乳管细胞原位自毁而死皮的现象。

3 活性氧与橡胶树死皮病的关系

D'Auzac和Chrestin^[20]认为, 乳管细胞内活性氧代谢失调时, 黄色体膜破裂, 最终导致胶乳(为乳管细胞的细胞质)原位凝固和产胶功能衰竭而死皮。从而揭示了氧化迸发诱导橡胶树死皮的机制。

橡胶树乳管细胞内, 存在着一种特殊的细胞器——黄色体, 其膜上存在NAD(P)H氧化酶, 此酶能利用NAD(P)H消耗 O_2 生成 O_2^- , 而 O_2^- 在超氧化物歧化酶(SOD)的催化下歧化为 H_2O_2 ; 在铁盐存在的情况下, O_2^- 和 H_2O_2 发生反应生成 $\cdot OH$ 。细胞质中过氧化物酶可催化 H_2O_2 将酚类物质氧化成毒性更强的醌类物质。在一般的植物细胞中, 活性氧产生的部位是叶绿体和线粒体, 但由于乳管细胞中黄色体的比重大于叶绿体和线粒体, 因此其对乳管细胞内活性氧的产生很重要^[17, 20]。而活性氧具有很强的氧化能力, 对许多生物功能分子有毒害作用。它既能启动膜脂发生过氧化反应, 也能对酶促清除系统中的过氧化氢酶(CAT)、非酶促保护系统成分如硫醇类化合物产生氧化损伤作用; 而且 H_2O_2 还能慢慢钝化细胞中Cu, Zn-SOD, 从而降低乳管细胞保护系统的效能^[21], 导致有毒的过氧化活性与清除活性之间的平衡消失, 引发乳管细胞内活性氧代谢失调、黄色体膜破裂。活性氧对橡胶树死皮病的影响主要表现在两个方面: (1) 诱发黄色体破裂, 凝固因子释放, 胶乳原位凝固; (2) 诱发胶乳核酸与蛋白质

代谢失调, 导致产胶功能衰竭。其机制分别表述如下:

3.1 胶乳原位凝固的机制 活性氧通过氧化黄色体膜上的类脂, 导致黄色体膜破裂, 凝固因子释放, 胶乳原位凝固而死皮。Gidrol 等^[22]证明胶乳黄色体中的主要蛋白橡胶朊(hevein, 又称橡胶蛋白, 它是一种小分子橡胶单链蛋白质, 也是一种胶乳凝固因子, 存在于乳管细胞的黄色体内)具有使胶乳原位凝固的作用。他们发现, 这种橡胶粒子表面有一种 22 kD 的膜蛋白, 含有 Glc-NAc 糖基, 其上有与 Glc-NAc 糖基结合的两个受体位点。当黄色体破裂时, 它与橡胶粒子表面 22 kD 的膜蛋白结合, 形成多价的桥, 使橡胶粒子聚集在一起, 从而导致胶乳的原位凝固。这项研究结果与 Chrestin^[17]的氧自由基理论结合起来, 可初步解释橡胶树胶乳原位凝固的成因, 即强割或强乙烯刺激激活黄色体膜上的 NAD(P)H 氧化酶, 造成活性氧激增, 通过黄色体膜的脂质过氧化破坏膜结构, 使黄色体破裂, 黄色体内的凝固因子——橡胶蛋白即释放出来, 胶乳原位凝固, 从而导致乳管早期堵塞, 胶乳排放受阻。

3.2 核酸与蛋白质代谢失调的机制 由于胶乳中的核酸调控着胶乳的再生过程, 而胶乳中的蛋白质则是胶乳的重要成分, 所以核酸与蛋白质代谢失调将会导致产胶功能衰竭。活性氧诱发核酸与蛋白质代谢失调的一个主要途径是通过氧化黄色体膜上的类脂, 使黄色体膜破裂, 诱发释放 RNase 和蛋白水解酶, 最终导致核酸(RNA)裂解和蛋白质水解。曾日中^[23]报道, 死皮树胶乳的 RNase 活性大于健康树, 胶乳的核酸含量与 RNase 活性之间呈负相关。这表明死皮树胶乳核酸含量下降在很大程度上归因于 RNase 活性的增强。实验证明, 60℃ 热处理并不引起死皮树胶乳 RNase 活性显著下降; 酸化-碱化反应亦不导致健康树胶乳 RNase 活性增强。这说明死皮树胶乳 RNase 活性增强并不是酶结构改变的结果。由于橡胶树死皮与黄色体膜脂质过氧化降解导致的黄色体破裂有关, 所以他们认为 RNase 活性增强与核酸(RNA)裂解是由于黄色体破裂和 RNase 从黄色体中释放造成的。范思伟和杨少琼^[13]的研究也证实: 死皮发生发展过程中, 蛋白水解酶的活性明显增强, 导致蛋白

质代谢以水解代谢为主。

此外, 活性氧还通过以下途径诱发核酸与蛋白质代谢之间的失调: (1) 对胶乳中的核酸与蛋白质产生氧化损伤作用^[24]。许文献和校现周^[15]证实, 死皮树胶乳的硫醇和抗坏血酸等自由基清除剂的含量显著下降; 而曾日中^[23]则认为, 这种自由基含量的下降能够导致核酸含量的下降。(2) 通过引起乳管壁木栓化使乳管壁透性降低到临界点, 从而阻碍与核酸、蛋白质合成代谢相关的蔗糖、无机磷等营养物质的运输, 最终导致核酸与蛋白质合成水平下降^[11, 23]。

4 结束语

氧化迸发所介导的橡胶树死皮机制对从分子水平上阐明橡胶树的死皮机制有十分重要的意义。综合已有关于橡胶树死皮机制的假说和前面所述及的内容可以看到, 这些假说之间并不是相互对立和互为矛盾的, 而是相互补充、互为依据的。尽管引起死皮病的各种原因不相同, 但它们之间存在着共同机制。如果是通过氧化跃变产生的活性氧, 它可作为信号分子在胞间或胞内传递信息。它们或是作为引发活性氧产生的诱导因素, 或是表现为活性氧对细胞产生的毒害作用。此外, 死皮是一种由多种因素联合调控的机制, 它涉及到复杂的信号转导和基因调控过程, 且信号分子间存在着相互扩大和抑制的复杂调控机制, 这就解释了死皮为什么有时只在某些情况下出现、而有时则可以恢复、有时却不可恢复的现象。这种解释也可消除死皮的发生为什么是多因、多机制的疑惑, 使各种假说都得到合理的解释和统一。

近年来, 随着分子生物学和相关基因工程技术在橡胶树生理生化研究中的应用, 橡胶树死皮病分子机制的研究取得了初步的进展。如刘志昕和郑学勤^[3]提出“橡胶树死皮病是一种细胞程序性死亡”的观点, 认为橡胶树死皮病是一种通过氧化跃变产生信号分子转导和一系列基因表达调控, 激发细胞程序性死亡而表现出的防卫机制。而 Chen 等^[25]采用 mRNA 差异显示技术(differential display reverse transcript PCR, DDRT-PCR)分离和克隆了一个死皮相关基因 *HbMyb1*。他们进一步研究发现, *HbMyb1* 产物和拟南芥 *Myb* 基因相关转录激活因子同源性高达 59%, 而一般认为类

Myb 基因是有抑制细胞凋亡功能的。Northern 杂交表明, *HbMyb1* 在健康树中的表达远高于其在死皮树中的表达, 因此他们推测 *HbMyb1* 产物很可能是细胞程序性死亡的负调控因子。但这还只是一种推测, 还需用 *HbMyb1* 基因直接转化橡胶树技术作进一步验证。

虽然目前细胞程序性死亡机制已经成为研究橡胶树死皮的前沿阵地和热点, 但对于各种内外因素如何诱导激活黄色体膜上的 NAD(P)H 氧化酶以及活性氧如何启动死皮的信号转导途径机制仍然缺乏了解, 因此, 对橡胶树黄色体 NAD(P)H 氧化酶基因的克隆及其表达调控的研究也就显得十分必要。这方面的研究应以选择克隆橡胶树黄色体 NAD(P)H 氧化酶基因为突破口, 在此基础上, 通过 5' 缺失表达分析法对其调控序列进行研究, 找出启动子、增强子、乙烯反应区等; 同时, 利用酵母单杂交系统和 DNase I 足迹法对反式作用因子及其 DNA 结合区进行研究。这样, 为弄清伤诱导或乙烯诱导引发氧进、诱导死皮病的上游信号转导做一些重要的开创性工作, 为最终弄清橡胶树死皮病的成因、解决死皮病问题打下基础。

参考文献

- Sivakumaran S, Leong SK, Ghouse M et al. Influence of some agronomic practices on tapping panel dryness in *Hevea* trees. In: International Rubber Research and Development Board Workshop on Tapping Panel Dryness. Hainan, China: Hainan Press, 1994. 26
- 廖建和, 陈达益. 二十一世纪我国天然橡胶应用展望. 热带作物研究, 1996, (3): 1~5
- 刘志昕, 郑学勤. 橡胶树死皮病的发生机理和假说. 生命科学研究, 2002, 6(1): 82~85
- Sharples A, Lambourne J. Field experiments relating to brown bast disease of *Hevea brasiliensis*. Malayan Agr J, 1924, 12: 190~343
- Frey-Wyssling A. Investigation on the dilution reaction and the movement of the latex of *Hevea brasiliensis* during tapping. Archf Rubber Cult, 1932, 16: 285
- Taysum HH. Yield increase by the treatment of *Hevea brasiliensis* with antibiotics. Proc Nat Rubb Conf, Kuala Lumpur, 1960. 132~138
- 李志云. 强割与橡胶树死皮病的关系. 热带作物科技, 1982, 5: 12~16
- Rands RD. Brown bast disease of plantation rubber, its cause and prevention. Archf Voor De Rubbercultuur In Nederlandsch-Indie, 5e Jaargang, 1921, 5: 224~275
- Paranjothy K, Gomez JB, Yeang HY. Physiological aspects of brown bast development. Proceedings of International Rubber Conference 1975. 1976, 181~202
- Chua SE. Physiological changes in *Hevea* trees under intensive tapping. J Rubber Res Inst Malaya, 1967, 20(2): 100~105
- Bealing FJ, Chua SE. Output, composition and metabolic activity of *Hevea* latex in relation to tapping intensity and the onset of brown bast. J Rubb Res Inst Malaya, 1972, 23(3): 204~231
- Pushpades MV. Brown bast and nutrition: a case study. Rubb Board Bull, 1975, 12(3): 83~88
- 范思伟, 杨少琼. 强割和排胶过度引起的死皮是一种特殊的局部衰老病害. 热带作物学报, 1995, 16(2): 15~22
- Wycherley PR. *Hevea*: long flow, adverse partition and storm losses. The Planter, 1975, 51(586): 6~13
- 许文献, 校现周. 橡胶死皮树过氧化物酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶的研究. 热带作物学报, 1988, 9(1): 31~36
- Paranjothy K. Brown bast and exploitation of dry trees. In: RRIM Training Manual on Tapping, Tapping Systems and Yield Stimulation of *Hevea*. Malaya: Rubb Res Inst, 1980. 55~65
- Chrestin H. Biochemical aspects of bark dryness induced by overstimulation of rubber trees with ethrel. In: D'Auzac J, Jacob JL, Chrestin H (eds). Physiology of Rubber Tree Latex. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1989. 345~381
- 许文献, 魏小弟, 校现周等. 刺激割胶制度对橡胶树死皮病发生的生理效应. 热带作物学报, 1995, 16(2): 9~14
- 范思伟, 杨少琼. 橡胶树死皮的概念、假说和发病机理. 热带作物研究, 1991, 15: 73~80
- D'Auzac J, Chrestin L. Study of an NADH-quinone-reductase producing toxic oxygen from *Hevea* latex. Int Rubb Conference, Kuala Lumpur, 1985. 102~112
- 蔡磊, 校现周. 橡胶树乳管细胞内活性氧的产生与清除. 华南热带农业大学学报, 2000, 6(1): 31~34
- Gidrol XH, Chrestin H, Tan HL et al. Hevein, a lectin like protein from *Hevea brasiliensis* involved in the coagulation of latex. J Biol Chem, 1994, 269(12): 9278~9283
- 曾日中. 巴西橡胶树胶乳核酸含量与产量及死皮关系的研究. 热带作物学报, 1997, 18(1): 10~15
- 张文玲, 魏丽勤, 王林嵩等. 活性氧对生物大分子的氧化性损伤. 河南师范大学学报(自然科学版), 2000, 28(4): 69~71
- Chen SC, Peng SQ, Huang GX et al. Association of decreased expression of a *Myb* transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis*. Plant Mol Biol, 2002, 51(1): 51~58