

## 橡胶树树皮细胞木质素显示方法的比较分析

史敏晶<sup>1</sup>, 张世鑫<sup>1</sup>, 丁欢<sup>1</sup>, 蒋毅<sup>1,2</sup>, 田维敏<sup>1\*</sup>

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南海口 571101; 2. 西藏农牧学院, 西藏林芝 860000

**摘要:** 巴西橡胶树是最重要的人工栽培产胶植物, 树干割胶是当前从橡胶树乳管组织中获取天然橡胶的唯一途径。割胶后的排胶特性直接决定胶乳的产量, 但其排胶机理目前尚不完全清楚。橡胶树树皮的膨压是乳管排胶的主要初动力, 而细胞壁的主要成分木质素含量的高低与膨压密切相关。目前关于橡胶树树干树皮细胞中木质素含量的研究较少, 缺乏通过形态结构研究分析木质素含量高低的研究。以橡胶树 RY8-79 和 PR107 成龄树树皮为研究材料, 制备石蜡切片, 分别以 Wiesner 反应方法、Mäule 反应方法以及番红染色结合荧光显色的方法对树皮组织中的木质素进行了染色定位分析。研究表明: 光镜明场下, Wiesner 反应方法和 Mäule 反应方法能显色薄壁细胞壁中的木质素成分, 但颜色浅淡, 很难区分不同品系之间的差异; 番红染色后能观察到薄壁细胞中浅紫红色的木质素成分, 但不同组织以及不同品系之间同样很难区分; 番红显色后结合 546 nm 绿光激发则能观察到木质素组织明显的红色荧光, 不同细胞类型和不同品系之间差异明显, RY8-79 薄壁细胞中木质素荧光明显弱于 PR107, 表明该品系中木质素的含量低于 PR107。碘-溴染色显示次生乳管的结果表明, 次生乳管分布的位置和木质素显色较深尤其是荧光强的部位一致。由此推测乳管及其周围的细胞中木质素含量较高, 这一现象在 PR107 中尤其明显。此外, Wiesner 反应和 Mäule 反应不仅需要间苯三酚、盐酸和高锰酸钾 (KMnO<sub>4</sub>) 等危险化学试剂, 而且反应时间不好把控, 切片容易从载玻片上脱落以及细胞壁易破损; 而番红染色结合荧光观察所用试剂则是安全无毒的且细胞结构完整。综合比较不同的方法, 番红染色结合荧光显色是当前最适合橡胶树树皮组织细胞中木质素显色的方法, 不仅能清晰区分木质素含量的高低, 而且安全、简便易操作。

**关键词:** 巴西橡胶树; 木质素; 番红染色; 薄壁细胞; 荧光

中图分类号: S794.1 文献标识码: A

## Comparison of Different Staining Methods for Lignin in Bark of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

SHI Minjing<sup>1</sup>, ZHANG Shixin<sup>1</sup>, DING Huan<sup>1</sup>, JIANG Yi<sup>1,2</sup>, TIAN Weimin<sup>1\*</sup>

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation and Physiology of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Linzhi, Tibet 860000, China

**Abstract:** Rubber tree is the most important cultivated rubber-producing plant, and the tapping of trunk is the only way to obtain natural rubber from the laticifer in the bark currently. The characteristics of latex flow after tapping determine the latex yield, but the mechanism of latex flow is not yet completely clear. The turgor pressure of bark is the main initial driving force for latex flow, and the content of lignin, as the main component of cell wall, is closely related to the turgor pressure. At present, the study on the lignin content in bark of rubber tree is deficiency, among which the analysis

收稿日期 2023-02-02; 修回日期 2023-04-04

基金项目 海南省基金创新团队项目 (No. 320CXTD442); 国家自然科学基金项目 (No. 31870590); 现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-33-YZ1)。

作者简介 史敏晶 (1974—), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 植物形态结构和发育。\*通信作者 (Corresponding author): 田维敏 (TIAN Weimin), E-mail: wmtian@163.com。

of lignin content by morphological structure is lack. Using the bark of RY8-79 and PR107 mature tree as the research materials, paraffin sections were prepared, and the lignin in the bark was stained and localized by Wiesner reaction, Mäule reaction, and safranin staining combined with fluorescence, respectively. The results showed that both Wiesner reaction and Mäule reaction could stain the lignin component of the parenchyma cell wall, but difficult to distinguish different strains and tissues for the light color. The light purplish red of lignin in the parenchyma cell could be observed after safranin staining, but it was also difficult to distinguish different tissues and strains. The obvious red fluorescence of lignin tissue could be observed after safranin staining combined with 546 nm green light excitation, and there was significant difference among different cell types and strains. The lignin fluorescence of parenchyma cell in RY8-79 was significantly weaker than that in PR107, indicating that the content of lignin in RY8-79 was lower than that in PR107. Iodine-bromine staining showed that the distribution of secondary laticifer was consistent with the distribution of lignin with strong fluorescence, indicating that the lignin content of secondary laticifer and its surrounding parenchyma cells increased significantly, especially in PR107. In addition, Wiesner and Mäule reaction needed dangerous chemical reagents such as phloroglucinol, hydrochloric acid and potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ), respectively, and the reaction time was not easy to control for slices falling off from slides and cell wall damage. By comparison, the reagents used for safranin staining combined with fluorescence observation were safe and non-toxic, and the structure of cell in bark could maintain intact easily. According to the comprehensive analysis of different methods, for the excellent clarity of lignin as well as safety and simplicity of operation, safranin staining combined with fluorescence observation is the most suitable method for lignin location in parenchyma cell of rubber tree bark.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.; lignin; safranin staining; parenchyma cell; fluorescence

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.10.011

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg., 以下简称橡胶树) 是最重要的人工栽培多年生产胶植物, 为世界所需天然橡胶的主要来源<sup>[1]</sup>。橡胶树树皮中的乳管作为天然橡胶合成和储存的特异组织, 与天然橡胶的生产息息相关。割胶是当前从橡胶树乳管组织中获取天然橡胶的唯一途径, 割胶后橡胶树乳管的排胶速度和排胶时间直接决定着胶乳的产量。因此, 割胶后的排胶机理一直受到研究者的极大重视<sup>[2-5]</sup>。

橡胶树成熟乳管的封闭性结构和特殊的内含物导致了完整的乳管内部存在极高的膨压, 高达 10~15 个大气压<sup>[6-7]</sup>, 割胶后开放的割口压力与外界大气压相同, 因此由外到内逐步增加形成一个压力梯度, 这一压力梯度驱动胶乳向外涌流, 形成了胶乳外排初始阶段的主动动力。可见, 橡胶树的膨压与排胶密切相关。已有研究表明, 细胞壁的弹性在维持细胞膨压中具有重要作用<sup>[8-9]</sup>, 弹性越好能维持的膨压也越高; 细胞壁的硬度和刚性越大, 则膨压越低<sup>[10-11]</sup>, 而细胞壁的结构特征决定其弹性和刚性、硬度。细胞壁作为植物细胞最重要的特征结构, 也是最早被观察到的细胞结构, 在很长的一段时间内被认为是一成不变的简单结构, 随着科学的发展其作为一个高度动态变化的复杂网络结构才被认识到<sup>[12]</sup>。植物化学分析表明, 纤维素、半纤维素、果胶质和木质素等构成

了细胞壁的主要成分, 并在不同物种、组织、细胞类型中含量和结构都有差别<sup>[13]</sup>。木质素作为植物体中仅次于纤维素的第二大有机物质, 其在细胞壁中含量的高低被证明对植物木材细胞的弹性和硬度有显著影响<sup>[14]</sup>, 进而影响膨压<sup>[15]</sup>。晁金泉等<sup>[16]</sup>研究发现排胶通畅的橡胶树无性系 RY8-79 的树皮内层木质素的含量低于排胶凝滞的无性系 PR107, 而 AN 等<sup>[17]</sup>证明 RY8-79 的膨压明显高于 PR107, 可见在橡胶树树皮中木质素含量的高低与膨压之间存在关联。目前, 对橡胶树树皮组织木质素的定位研究缺乏, 寻找一种简单、直观显示树皮中木质素的方法对于分析其膨压的高低, 以及比较不同品系木质素含量差异与排胶特性之间的关系都具有重要的意义。

植物木质素的显示方法目前主要有组织化学染色、荧光显微镜技术、共聚焦拉曼显微镜以及透射电镜等<sup>[18-24]</sup>, 其中组织化学染色简单、快捷, 所以在木质素定位分析中应用较为广泛<sup>[25]</sup>。本研究以 RY8-79 和 PR107 成龄橡胶树树皮为研究材料, 采用石蜡切片结合木质素组织化学染色, 比较分析了 Wiesner 反应方法(间苯三酚法)、Mäule 反应方法(高锰酸钾染色法)以及番红染色结合荧光显示木质素的方法, 旨在探寻一种适合定位分析橡胶树树皮木质素的方法, 为研究橡胶树排胶膨压以及种质鉴定分析提供技术支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 选取种植于中国热带农业科学院儋州南辰农场（海南儋州宝岛新村）7 年生的 RY8-79 和 PR107 成龄健康橡胶树各 3 株，于树高 1.5 m 处用打孔器采集树皮，单面刀片分割成 0.5 cm×1.0 cm 左右的组织小块，80%（V/V）酒精固定备用。

1.1.2 主要试剂和仪器 制备石蜡切片所需的乙醇、正丁醇、冰醋酸、二甲苯为国产分析纯；高锰酸钾购自国药集团；木质素染色液（间苯三酚法）购自上海源叶生物科技有限公司；石蜡为生物组织切片专用，光学显微镜为德国 Leica DMLB 型。

### 1.2 方法

1.2.1 光学显微切片的制备 用于木质素染色的树皮材料分割后经 80%（V/V）酒精固定 24 h，乙醇梯度脱水，正丁醇透明，石蜡包埋，具体方法参照常规石蜡切片方法。用于显示乳管的树皮材料则经 80%（V/V）酒精固定 24 h，乙醇梯度脱水后，需碘-溴冰醋酸试剂 60 ℃处理 36 h，然后乙醇脱水后经正丁醇透明并石蜡包埋，具体方法参见史自强等<sup>[26]</sup>的方法并稍作修改。石蜡切片厚度 10~20 μm。

1.2.2 Wiesner 反应 即盐酸-间苯三酚染色法，染色步骤主要是：切片材料经二甲苯脱蜡和酒精梯度复水后，滴加溶于 95%乙醇的 2%间苯三酚（A 液）数滴，孵育几分钟后加入等量的 12%盐酸（B 液），封片，在显微镜可见光下观察拍照。

1.2.3 Mäule 反应 即高锰酸钾（KMnO<sub>4</sub>）染色法，染色步骤主要是：切片材料经二甲苯脱蜡和酒精梯度复水后，用 0.5% KMnO<sub>4</sub>（W/V，水剂）染色 5 min，蒸馏水漂洗后加入 12%盐酸（V/V）浸泡 1 min，然后用 29%氨水（V/V）封片，显微镜可见光下观察拍照。

1.2.4 番红染色反应 切片材料二甲苯脱蜡后酒精梯度复水，1%番红水溶液（W/V，水剂）染色 2 h，蒸馏水漂洗 5 min，75%酒精漂洗 5 min，50%甘油封片。荧光显微镜下，分别于可见光和 546 nm 绿色荧光激发光源下观察成像。

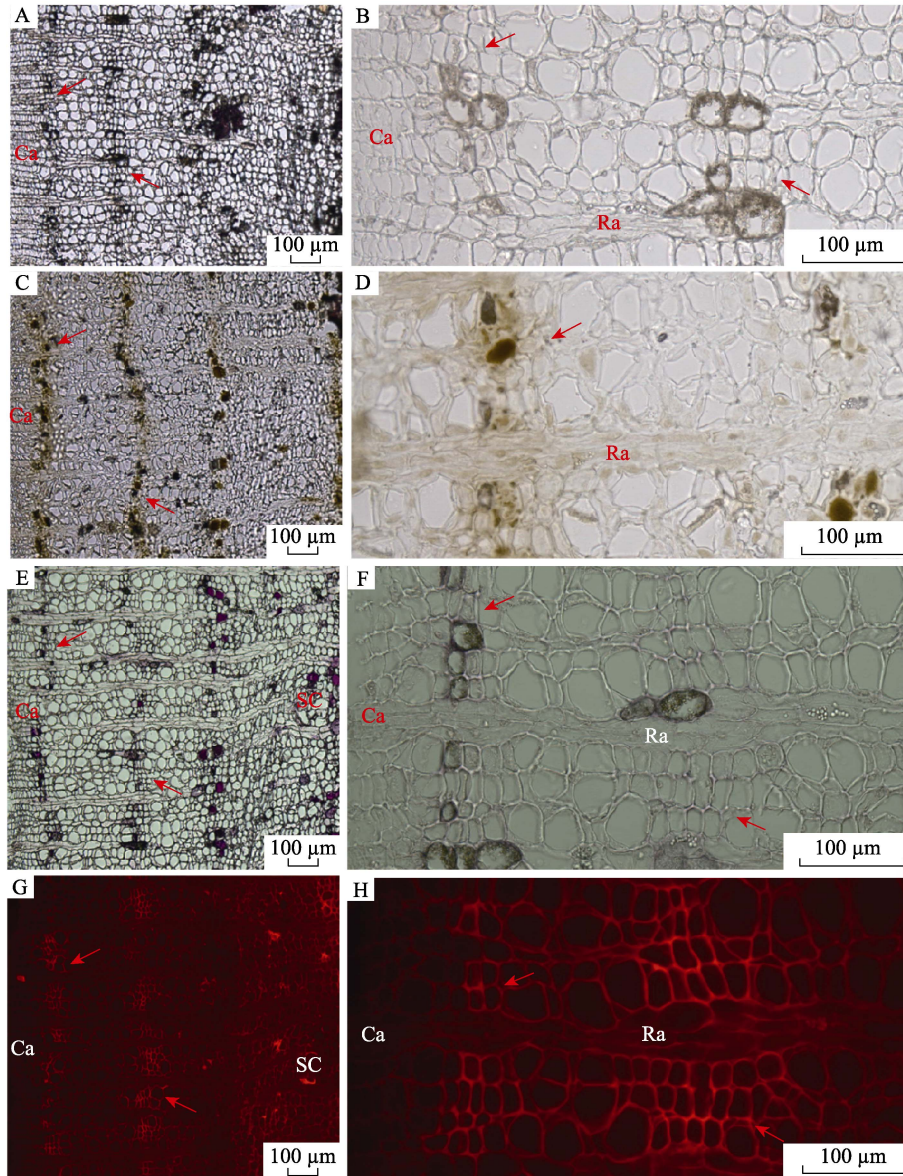
1.2.5 固绿染色 经碘-溴染色处理后的切片材料二甲苯脱蜡后固绿染色 1 h，中性树胶封片，光

学显微镜 Leica DMLB 下观察乳管的位置并成像。

## 2 结果与分析

### 2.1 橡胶树无性系 PR107 树皮不同染色方法木质素定位分析

橡胶树无性系 PR107 的树皮组织在不同的木质素染色方法下显示结果有差异。Wiesner 正反应颜色为红色，但在橡胶树 PR107 的树皮组织中显色不明显，尤其在形成层区、水囊皮和黄皮层这些软树皮中呈现红色的木质素基本不可见，仅在靠近形成层和水囊皮的中部有 2 列颜色相对较深的区域，但也无红色显示（图 1A）。对颜色较重的区域放大观察，也未见明显的红色呈现（图 1B）。这些结果表明，Wiesner 显色反应对橡胶树树皮薄壁组织的染色效果较差，同时也说明这些部位木质素沉积较少。Mäule 染色木质素正反应为姜黄色，树皮中在靠近形成层和水囊皮中部有 2 列颜色相对较深的区域，主要表现为黄褐色（图 1C）。由放大图可知，不同类型细胞染色有一定的区别，同一细胞内染色深的部位主要定位在细胞角隅处，除了细胞壁外，细胞的内含物也有染色；射线作为典型的薄壁细胞，染色相较有次生加厚的筛管更为明显（图 1D）。可见，在橡胶树中这种染色方法的特异性不是很强，其他物质也能被染色从而对木质素的定位存在干扰。另外，Mäule 染色导致细胞结构不清晰，可能是染色过程中使用的强酸和强氧化剂对细胞组织存在破坏作用。番红染色的明场观察，切片中有少许部位被染成淡紫红色，在靠近形成层和水囊皮中部有 2 列颜色相对较深的区域（图 1E）。局部放大结果表明，这 2 列相对深色区域在细胞壁尤其是角隅处有较明显的紫红色（图 1F）。番红染色后利用绿光激发，在荧光显微镜下观察到清晰的红色荧光，红色荧光分布的强弱与可见光下 3 种方法染色深浅部位基本一致，且不同类型细胞红色荧光区分明显（图 1G~图 1H）。在低倍镜和高倍镜下形成层区域红色荧光都极弱，基本为背景色；射线细胞的荧光明显弱于筛管等维管组织；石细胞中含大量木质素，荧光极强，符合已知细胞类型对应的木质素含量的常识。荧光显示的结果中，具有明显荧光的部位均为细胞壁，尤其是角隅处，细胞内含物中无染色干扰，可见番红结合荧光显示效果好且特异性好。



A~B: Wiesner 反应染色; C~D: Mäule 反应染色; E~F: 番红染色可见光观察; G~H: 番红染色绿光激发的荧光结果。

Ca: 形成层区; Ra: 射线; SC: 石细胞。箭头示显色较深的组织。

A~B: Section stained with Wiesner reagent; C~D: Section stained with Mäule reagent; E~F: Section stained with safranin and viewed by light microscopy; G~H: Section stained with safranin and viewed by fluorescence microscopy under green light excitation. Ca: Cambium; Ra: Ray; SC: Stone cell. The arrows show the deeper tissue of staining.

图 1 PR107 树皮不同木质素染色方法比较分析

Fig. 1 Comparison of different staining methods for lignin in bark of PR107

## 2.2 橡胶树无性系 RY8-79 不同染色方法木质素定位分析

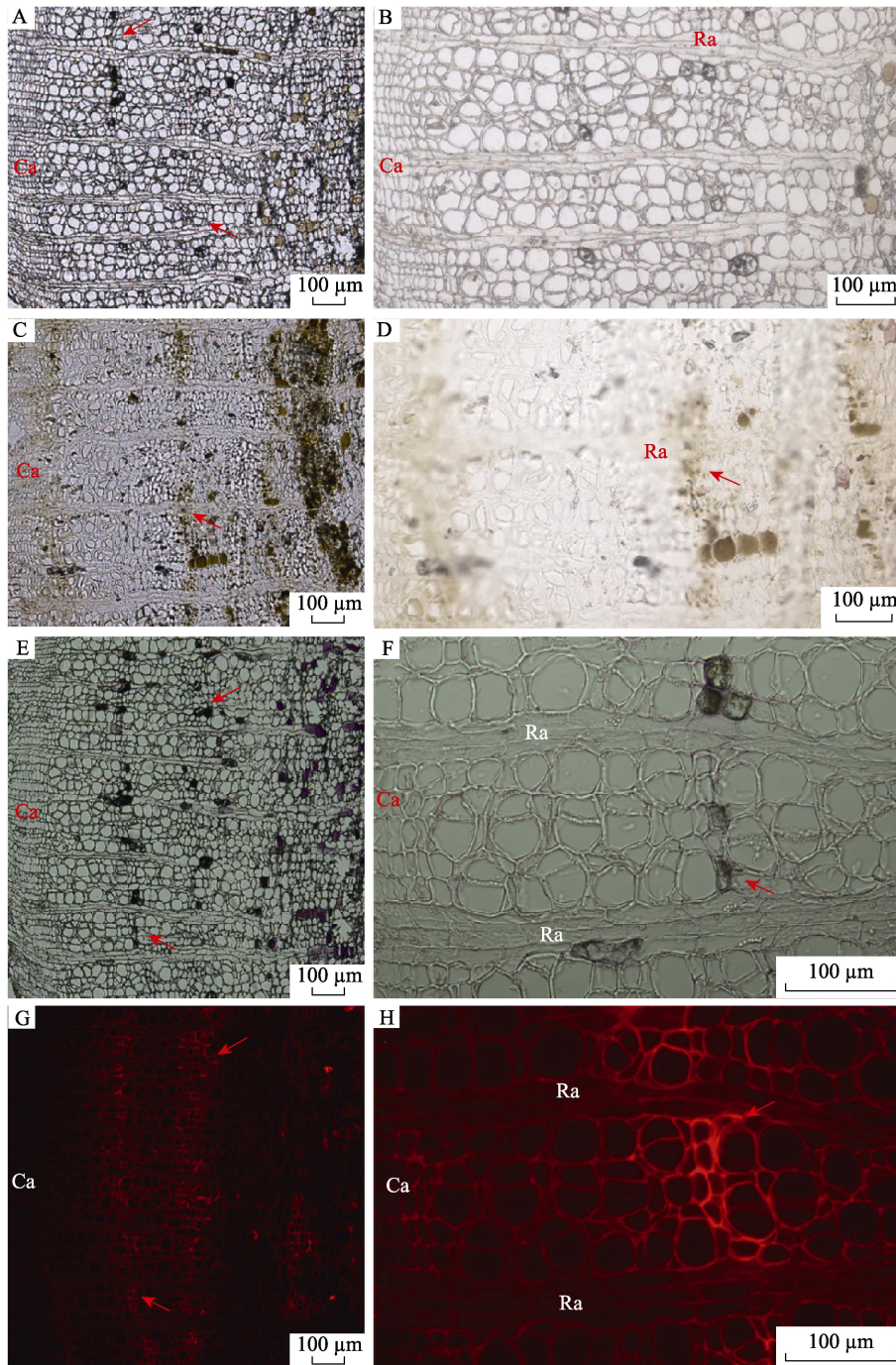
橡胶树无性系 RY8-79 的树皮组织在 Wiesner 中显色不明显, 在形成层区、水囊皮和黄皮层等软树皮中未观察到明显的木质素阳性染色 (图 2A)。对颜色略重的区域放大观察, 不同的细胞类型之间未见明显的染色差异 (图 2B), 这些结果表明 RY8-79 的树皮组织对 Wiesner 的显色反应较差且木质素沉积少。Mäule 染色后软树皮中有几

列黄褐色颜色相对较深的区域 (图 2C), 但放大后未观察到细胞壁等处有明显染色 (图 2D)。另外, 细胞内含物也有强烈染色, 从而对木质素的定位存在干扰。番红染色可见光观察发现, 切片中染色极浅 (图 2E), 局部放大结果表明, 组织细胞壁及其角隅处均无明显的紫红色 (图 2F)。相同的组织切片经绿光激发后, 在荧光显微镜下可观察到有强弱区分的红色荧光, 其红色荧光强的位置与可见光下 3 种方法染色较深的部位基本一致 (图

2G~图 2H)。

由可见光明场下 3 种木质素显示方法的结果可知, 无论 PR107 还是 RY8-79, 染色深的部位在不同显色方法中基本一致, 表明该区域的确是木质素含量较高的组织。但染色整体都偏浅淡, 不

同类型细胞差异不明显, 表明在橡胶树树皮薄壁细胞中木质素含量不高。强荧光的组织部位与可见光下染色深的部位基本一致, 但荧光下不同类型细胞之间可以观察到较明显的差异, 且荧光清晰, 能很好地显示木质素在不同位置的含量高低,



A~B: Wiesner 反应染色; C~D: Mäule 反应染色; E~F: 番红染色可见光观察; G~H: 番红染色绿光激发的荧光结果。

Ca: 形成层区; Ra: 射线; SC: 石细胞。箭头示显色较深的组织。

A~B: Section stained with Wiesner reagent; C~D: Section stained with Mäule reagent; E~F: Section stained with safranin and viewed by light microscopy; G~H: Section stained with safranin and viewed by fluorescence microscopy under green light excitation. Ca: Cambium; Ra: Ray; SC: Stone cell. The arrows show the deeper tissue of staining.

图 2 RY8-79 树皮不同木质素染色方法比较分析

Fig. 2 Comparison of different staining methods for lignin in bark of RY8-79

结合其良好的特异性，番红染色后荧光观察是最适合橡胶树树皮组织细胞的木质素定位的方法。

PR107 和 RY8-79 是 2 种具有不同排胶特性的种质，木质素荧光在 PR107 中明显强于 RY8-79，可见 PR107 的木质素含量明显高于 RY8-79。

### 2.3 橡胶树无性系 PR107 和 RY8-79 中乳管列的分布

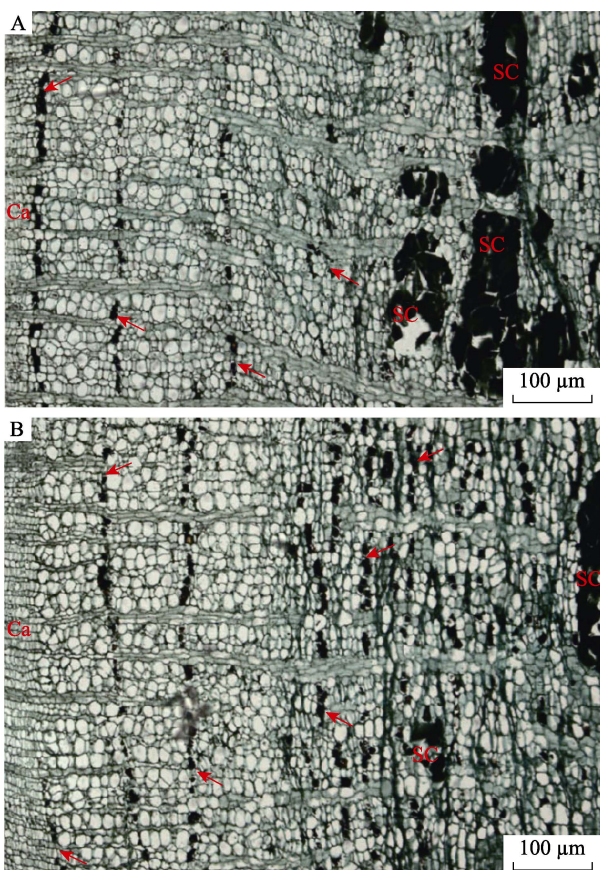
经碘-溴染色后，次生乳管列中的天然橡胶显示为黑褐色，与其他组织细胞存在明显区别（图 3）。PR107 树皮组织中可以观察到形成层外侧一列明显的乳管，水囊皮中也有一列乳管，黄皮层中的一列连贯性略差的乳管，其他靠近砂皮层的乳管因分散而不能形成明显的列状；石细胞较多，形成石细胞列（图 3A）。RY8-79 在形成层外侧仅见一小段乳管列，水囊皮中有 2 列乳管，黄皮层中乳管较多，但排列较杂乱；石细胞数量少（图

3B)。将 PR107 和 RY8-79 中乳管列的分布与木质素的定位进行比较分析，发现乳管列所在的区域木质素含量较高，二者表现出高度的重合。在每个乳管列分布的区域，PR107 通常有多层细胞表现出较强木质素荧光（图 1H），而 RY8-79 普遍仅一列细胞表现较强荧光（图 2H）。

### 3 讨论

木质素是构成植物细胞壁的主要成分之一，其在细胞壁中含量的高低被证明与植物细胞的弹性和硬度有关，并影响膨压<sup>[14-15]</sup>。橡胶树乳管内部膨压高达 10~15 个大气压，割胶后由外到内形成的压力梯度是胶乳外排的初始主动力。膨压对于橡胶树排胶至关重要，但目前橡胶树中关于膨压的研究较少，而膨压大小与木质素含量高低的关系目前尚不清楚。晁金泉等<sup>[16]</sup>通过乙酰溴法测定得出 RY8-79 树皮内层木质素含量低于 PR107，而 AN 等<sup>[17]</sup>证明 RY8-79 的膨压高于 PR107，由此推测橡胶树树皮中木质素含量的高低与膨压大小可能呈负相关。乙酰溴法测定木质素含量需要用到高氯酸等危化管制试剂，并且方法比较繁琐，利用染色方法对橡胶树树皮组织中的木质素进行定位研究则能更为直观地显示树皮中木质素含量的高低，但目前缺乏这方面的研究。

通过比较 Wiesner 反应方法（间苯三酚法）、Mäule 反应方法（高锰酸钾染色法）以及番红染色结合荧光显示木质素等几种组织化学染色方法，发现橡胶树树皮染色较深的部位在几种方法中是一致的，表明这些位置木质素的含量的确高于其他的部位。整体来看，橡胶树软树皮中细胞木质素染色是很浅的，表明在软树皮中木质素总体含量不高。针对木质素含量不高的这些薄壁组织，染色方法的灵敏度对于区分不同组织或者不同种质木质素含量高低显得尤为重要。本研究结果表明番红染色结合荧光定位木质素的效果是最好的，不同组织之间能观察到明显的差异。其中，形成层区作为分生组织，细胞正在分化发育中，次生细胞壁的合成弱，木质素含量应最低，在荧光下观察，形成层区的确荧光最弱。PR107 中木质素的荧光明显强于 RY8-79，表明 PR107 中的木质素含量高于 RY8-79，这一结果与晁金泉等<sup>[16]</sup>测定的结果一致。另外，Wiesner 反应方法（间苯三酚法）和 Mäule 反应方法（高锰酸钾染色法）



A: PR107 树皮中的乳管分布; B: RY8-79 树皮中的乳管分布。  
箭头示乳管细胞。Ca: 形成层区; SC: 石细胞。

A: Distribution of secondary laticifer of PR107; B: Distribution of secondary laticifer of RY8-79. Ca: Cambium; SC: Stone cell.  
The arrows show the laticifer cells.

图 3 PR107 和 RY8-79 树皮中的次生乳管细胞分析

Fig. 3 Analysis of secondary laticifer in bark of PR107 and RY8-79

相较番红染色, 染色过程中需要用到管制药品间苯三酚和强氧化剂  $\text{KMnO}_4$ , 以及具有腐蚀性的强酸试剂盐酸和刺激性试剂氨水, 这些试剂不仅对操作人员有毒副作用, 而且对显微镜尤其是物镜头也有一定的损伤。经比较分析, 番红染色结合荧光显示木质素是目前适合橡胶树树皮组织分析的一种简便、安全的方法。本方法的建立不仅有利于通过研究木质素含量差异从而分析橡胶树的排胶特性, 对于橡胶树种质的鉴定也有参考价值。

本研究通过比较树皮中乳管列的位置和强木质素荧光的部位, 首次发现木质素含量高的位置与乳管列分布的位置高度吻合, 这一特征在 PR107 和 RY8-79 中都存在, 由此推测在软树皮中主要是乳管细胞及其周围的细胞木质素含量较高, 这可能与保护高膨压的乳管有关。相对 PR107, RY8-79 中膨压更高, 但周围细胞木质素含量偏低, 这也可能是生产中 RY8-79 更容易爆皮流胶的原因之一。

橡胶树树皮中分布大量石细胞<sup>[1, 27]</sup>, 作为一种典型的木质化加厚的厚壁组织, 史敏晶等<sup>[27]</sup>研究认为石细胞的分布具有品系特征, 且发现 PR107 的石细胞分布明显高于 RY8-79, 而本研究的定位分析表明软树皮中 PR107 的木质素分布也高于 RY8-79, 薄壁细胞中的木质素含量高低是否与石细胞多少之间有对应关系也值得进一步分析。石细胞由于其特殊的结构特征, 容易识别, 如果能建立石细胞数量和木质素含量之间的相关关系, 那么, 通过石细胞的多少间接分析木质素含量高低对于大规模、快速鉴定和筛选木质素含量高低的品系则具有重要的意义。

## 参考文献

- [1] 田维敏, 史敏晶, 谭海燕, 吴继林, 郝秉中. 橡胶树树皮结构与发育[M]. 北京: 科学出版社, 2015.  
TIAN W M, SHI M J, TAN H Y, WU J L, HAO B Z. Bark structure and development of *Hevea brasiliensis*[M]. Beijing: Science Press, 2015. (in Chinese)
- [2] 罗明武, 邓柳红. 巴西橡胶树产胶与排胶机制研究进展[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 127-130.  
LUO M W, DENG L H. Advances in mechanisms of latex regeneration and latex flow of *Hevea brasiliensis*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2006, 42(9): 127-130. (in Chinese)
- [3] 史敏晶, 丁欢, 田维敏. 巴西橡胶树排胶机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, 38(9): 56-65.  
SHI M J, DING H, TIAN W M. The latex flow mechanism in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): a review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(9): 56-65. (in Chinese)
- [4] 郭冰冰, 代龙军, 杨洪, 赵溪竹, 王立丰. 橡胶树排胶机理与调控研究进展[J]. 热带作物学报, 2022, 43(4): 754-768.  
GUO B B, DAI L J, YANG H, ZHAO X Z, WANG L F. Research progress on mechanism and regulation of latex flow in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(4): 754-768. (in Chinese)
- [5] D'AUZAC J, JACOB J L, CHERSTIN H. Physiology of rubber tree latex[M]. Florida: CRC Press, 1989.
- [6] ARISZ W H. Over de factoren dre het interlocien van de latex bepalen bih *Hevea brasiliensis*[J]. Arch Rubbercult, 1918(2): 357.
- [7] ARISZ W H. Physiology van het tappen[J]. Arch Rubbercult, 1928(12): 347.
- [8] STADELMANN E J. The derivation of the cell wall elasticity function from the turgor potential[J]. Journal of Experimental Botany, 1984, 35: 859.
- [9] ROBERT J J, JOE B Z. Alteration of cell-wall water content and elasticity in douglas-fir during periods of water deficit[J]. Plant Physiology, 1987, 83(2): 418-422.
- [10] CHEN L Y, SHI D Q, ZHANG W J, TANG Z S, LIU J, YANG W C. The *Arabidopsis* alkaline ceramidase TOD1 is a key turgor pressure regulator in plant cells[J]. Nature Communication, 2015, 16(6): 6030.
- [11] STEUDLE E. Water deficits: plant responses from cell to community[M]. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1993: 5-36.
- [12] 张保才, 周奕华. 植物细胞壁形成机制的新进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(6): 544-556.  
ZHANG B C, ZHOU Y H. Plant cell wall formation and regulation[J]. Scientia Sinica Vitae, 2015, 45(6): 544-556. (in Chinese)
- [13] BURTON R A, GIDLEY M J, FINCHER G B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls[J]. Nature Chemical Biology, 2010, 6(10): 724-732.
- [14] 王传贵, 江泽慧, 费本华, 余雁, 张双燕. 化学成分对木材细胞壁纵向弹性模量和硬度的影响[J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(3): 107-110.  
WANG C G, JIANG Z H, FEI B H, YU Y, ZHANG S Y. Effects of chemical components on longitudinal MOE and hardness of wood cell wall[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2012, 34(3): 107-110. (in Chinese)
- [15] ZHANG W, WEI R, CHEN S, JIANG J, LI H, HUANG H, YANG G, WANG S, WEI H, LIU G. Functional characterization of CCR in birch (*Betula platyphylla*×*Betula pendula*)

- through overexpression and suppression analysis[J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, 154(2): 283-296.
- [16] 晁金泉, 陈月异, 杨署光, 田维敏. 巴西橡胶树 *HbCCoAOMT* 基因克隆及其表达分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(12): 1-7.
- CHAO J Q, CHEN Y Y, YANG S G, TIAN W M. Cloning and expressional analysis of *HbCCoAOMT* in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(12): 1-7. (in Chinese)
- [17] AN F, CAHILL D, ROOKES J, LIN W, KONG L. Real-time measurement of phloem turgor pressure in *Hevea brasiliensis* with a modified cell pressure probe[J]. *Botanical Studies*, 2014, 55(1): 19.
- [18] LION C, SIMON C, HUSS B, BLERVACQ A S, TIROT L, TOYBOU D, SPRIET C, SLOMIANNY C, GUERARDEL Y, HAWKINS S. BLISS: a bioorthogonal dual-labeling strategy to unravel lignification dynamics in plants[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(3): 326-338.
- [19] 贺新强, 王幼群, 胡玉熹, 林金星. 毛竹茎纤维次生壁形成过程的超微结构观察[J]. 植物学报, 2000, 42(10): 1003-1008.
- HE X Q, WANG Y Q, HU Y X, LIN J X. Ultrastructural study of secondary wall formation in the stem fiber of *Phyllostachys pubescens*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(10): 1003-1008. (in Chinese)
- [20] GIERLINGER N, SCHWANNINGER M. Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(4): 1246-1254.
- [21] FREUDIGER C W, MIN W, SAAR B G, LU S, HOLTOM G R, HE C, TSAI J C, KANG J X, SUNNEY X X. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1857-1861.
- [22] SAAR B G, FREUDIGER C W, REICHMAN J, MICHAEL STANLEY C, HOLTOM G R, SUNNEY XIE X. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1368-1370
- [23] XIA Y, CHEN T Y, WEN J L, ZHAO Y, QIU J, SUN R. Multi-analysis of chemical transformations of lignin macromolecules from waterlogged archaeological wood[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 407-416.
- [24] 杨淑敏, 刘杏娥, 尚莉莉, 马建锋, 田根林, 江泽慧. 竹材木质素特性及表征方法研究进展[J]. 材料导报, 2020, 34(4): 7177-7182.
- YANG S M, LIU X E, SHANG L L, MA J F, TIAN G L, JIANG Z H. The characteristics and representation methods of lignin for bamboo[J]. *Materials Reports*, 2020, 34(4): 7177-7182. (in Chinese)
- [25] 邓建华, 管梦灵, 刘美芹. 高粱茎秆中木质素分布的显微技术研究[J]. 植物学研究, 2014(3): 188-194.
- DENG J H, GUAN M L, LIU M Q. Study on microscopy techniques for identifying lignin distribution in the stem of sorghum[J]. *Botanical Research*, 2014(3): 188-194. (in Chinese)
- [26] 史自强, 胡正海. 植物含胶组织的制片方法[J]. 植物学报, 1965, 13(2): 179-182.
- SHI Z Q, HU Z H. A histological method for rubber-bearing tissues of plants[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1965, 13(2): 179-182. (in Chinese)
- [27] 史敏晶, 李言, 王冬冬, 田维敏. 巴西橡胶树树皮厚壁组织结构 and 发育研究[J]. 热带作物学报, 2016, 37(2): 311-316.
- SHI M J, LI Y, WANG D D, TIAN W M. Development and structure of sclerenchyma in bark of rubber tree[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(2): 311-316. (in Chinese)