

利用溴化钠和溴化氢代替溴素染色橡胶树乳管的染色方法研究

郑硕恒^{1,2}, 杜晓愚³, 史敏晶³, 杨署光³, 吴绍华³,
田维敏¹, 张华^{2*}, 张世鑫^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 西藏农牧大学 资源与环境学院, 西藏 林芝 860000; 3. 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/海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海口 571101)

摘要: 传统的碘-溴染色 (I_2-Br_2) 显示乳管细胞的方法, 虽然准确且高效, 但是 I_2-Br_2 染色剂的主成分溴素 (Br_2) 是一种危险化学品, 被严格管控, 使得 I_2-Br_2 染色方法的应用受到极大限制。为了寻求效果相似且更安全的染色试剂, 该文采用溴化钠 ($NaBr$) 和溴化氢 (HBr) 代替 Br_2 配制不同染色剂, 对橡胶树萌条树皮和叶柄进行染色, 使用光镜技术对树皮和叶柄横切片进行观察, 以筛选出染色最佳的染色剂配方。结果表明: (1) $NaBr$ 可以代替 Br_2 配制染色剂对乳管进行染色, 其中 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} NaBr + 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} I_2$ 的乙酸溶液的染色效果较好, 并且使用稀释的冰乙酸作为溶剂能够使 $NaBr$ 溶解更充分, 染色效果更好。(2) HBr 可以代替 Br_2 配制染色剂对乳管进行染色且较低浓度的 HBr 就能使乳管染色, 染色效果较好的配方为 $6.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} HBr + 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} I_2$ 的乙酸溶液。该研究结果认为使用更安全实惠的 $NaBr$ 和 HBr 可以替代 Br_2 配制染色剂, 用于橡胶树乳管细胞的形态结构研究。该文提供的橡胶树乳管细胞染色的新试剂, 可为产胶植物的乳管生物学研究提供技术支持。

关键词: 巴西橡胶树, 乳管, 光镜技术, 溴化钠, 溴化氢

中图分类号: Q944

文献标识码: A

Staining method of laticifers in *Hevea brasiliensis* bark and petiole using sodium bromide ($NaBr$) and hydrogen bromide (HBr) instead of bromine (Br_2)

ZHENG Shuoheng^{1,2}, DU Xiaoyu³, SHI Minjing³, YANG Shuguang³, WU Shaohua³,
TIAN Weimin¹, ZHANG Hua^{2*}, ZHANG Shixin^{1*}

(1. *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan, China*; 2. *College of Resources and Environment, Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, Xizang, China*; 3. *Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Cultivation and Physiology of Tropical Crops, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China*)

Abstract: The iodine-bromine (I_2-Br_2) staining method is accurate and efficient for revealing the microstructure of laticifer. However, the main component of I_2-Br_2 staining agent, bromine (Br_2), has strong pungent odor and highly corrosive. It is classified as a precursor to toxic chemicals and a hazardous chemical, subject to strict control, which greatly limits the application of the I_2-Br_2

基金项目: 云南省重大科技专项计划项目 (202402AE09001901); 国家自然科学基金 (31800577); 中国科学院先导 B 项目 (E4XDB21B01)。

第一作者: 郑硕恒 (1995—), 硕士, 研究方向为橡胶树乳管生物学研究, (E-mail) 1269711791@qq.com。

***通信作者:** 张世鑫, 博士, 副研究员, 研究方向为橡胶树高产抗逆育种和乳管生物学研究, (E-mail) zhangshixin_1@xtbg.ac.cn; 张华, 副教授, 研究方向为植物学, (E-mail) 54yalao@163.com。

staining method. To seek a similar but safer staining reagent, this study used sodium bromide (NaBr) and hydrogen bromide (HBr) to replace Br₂, to prepare different staining agents for staining the bark and petioles of rubber tree shoots. Light microscopy was used to observe the cross-sections of the bark and petioles to screen for the best staining agent formula. The results were as follows: (1) NaBr could replace Br₂ to prepare staining agents for laticifer, and the staining effect of 0.5 mol·L⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L⁻¹ I₂ in acetic acid solution was better. Moreover, using diluted glacial acetic acid as the solvent could make NaBr dissolve more thoroughly and improve the staining effect. (2) HBr could also replace Br₂ to prepare staining agents for laticifer, and a lower concentration of HBr could stain laticifer. The best staining agent formula was 6.25 mmol·L⁻¹ HBr + 0.2 mol·L⁻¹ I₂ in acetic acid solution. The results indicated that the safer and more economical NaBr and HBr could be used to replace Br₂ to prepare staining agents for the study of the morphology and structure of laticifer in rubber tree. The new staining reagents provided in this paper can provide technical support for the study of laticifer in rubber-producing plants.

Key words : *Hevea brasiliensis*, laticifer, optical microscopy technique, sodium bromide, hydrogen bromide

乳管细胞是天然橡胶合成和贮存的主要场所，对橡胶树乳管结构的研究可追溯到 20 世纪初，随着光镜技术和电镜技术的发展，乳管细胞的显微结构和超微结构得到了很好的解析（Fay et al., 1967；田维敏等，2015）。近些年，随着其他产胶植物研究的深入，笔者发现在其他产胶植物的乳管细胞学研究中，使用的染色方法多种多样，但是显示出乳管细胞准确性不佳。

目前，显示橡胶树、杜仲、橡胶草、橡皮树、猫屎瓜等产胶植物中乳管细胞较准确的方法，还是基于 1965 年史自强和胡正海报道的碘-溴染色法（I₂-Br₂）。碘-溴染色的原理是用溴素（Br₂）使橡胶变性，碘（I₂）使橡胶着色，冰乙酸减少 Br₂ 的卤化作用使 I₂ 更容易渗透组织染色；使用 I₂-Br₂ 溶液处理，可以使组织中所含的橡胶变成不溶于二甲苯、失去弹性、棕色的变性橡胶，经石蜡切片后，在光学显微镜下观察，乳管细胞中含有的橡胶成分被染成棕褐色，能够精确地区分乳管细胞与其他细胞的形态差异（史自强和胡正海，1965）。本研究团队显示橡胶树乳管细胞的方法是郝秉中和吴继林基于该方法改进而来（郝秉中，1982；Hao & Wu, 2000），其中 I₂-Br₂ 染色天然橡胶的原理相同。该方法的优点是乳管细胞含有的天然橡胶能够被碘-溴染成棕褐色，与其他细胞的颜色和形态差异明显，经过长时间保存都不褪色。而且 I₂-Br₂ 染色能够使木质化严重的树皮、树根软化，更易切片。然而，该方法也存在诸多的缺点：（1）Br₂ 属于第二类易制毒危险化学品和第八类危险化学品，具有强烈的刺激性气味和强腐蚀性，有毒，在购买、储存、使用和运输过程中均受到《危险化学品安全管理条例》严格管控，而且试剂价格和运输成本昂贵。目前，随着危化品管理的愈加规范和严格，国内大部分城市禁止使用 Br₂ 且很难购买到，这在很大程度上限制了 I₂-Br₂ 染色法在产胶植物乳管细胞学研究中的应用。（2）Br₂ 和冰乙酸会导致组织膨胀甚至破坏，不太适用于草本植物和幼嫩组织的染色处理。（3）I₂-Br₂ 染色的实验步骤，需要在 60~65 °C 高温下操作，存在安全隐患。所以，目前的产胶植物乳管细胞学研究，需要寻求一种替代 Br₂ 的染色剂方案或者其他的染色方法。

Br₂ 及溴化物在印染工业中有广泛的应用（孙小虹，2024），溴化钠（NaBr）和溴化氢（HBr）是常用的溴化物。NaBr 为印染工业中常用的溴化剂，价格便宜，利于大批量材料的染色处理。溴化氢（HBr）是溴和氢的化合物，溴化氢的水溶液为氢溴酸，在医药、染料、香料等工业中应用十分广泛。溴化氢能够在加热条件下可以释放 Br 分子，起到印染的作用（Nobute et al., 2010）。本文采用溴化钠（NaBr）和溴化氢（HBr）代替溴素（Br₂）及碘化

钾 (KI) 代替碘 (I₂) 来配制不同配方的染色剂, 对橡胶树萌条树皮和叶柄进行染色并制成石蜡切片, 使用光镜技术对不同染色剂配方染色的橡胶树萌条树皮和叶柄横切片进行观察, 期望获得可以替代 Br₂且适合乳管细胞学研究的染色剂配方, 为产胶植物的乳管细胞学的研究提供技术储备和理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 无性系热研 7-33-97 的一年生萌条, 种植在橡胶研究所海南儋州的橡胶树增殖苗圃内。选取健壮且长势相同的橡胶树一年生萌条植株, 切取第一伸长单位 (EU1) (Hao & Wu, 2000; 张世鑫等, 2011) 未做任何处理的树皮 (带部分木质部) 和稳定期叶片的小叶柄基部 (肉质) 进行染色实验, 每个染色处理取 3 个样品做生物学重复。

1.2 光镜技术制片方法

本研究中橡胶树萌条树皮和叶柄的光镜技术制片方法采用本研究团队常用的橡胶树树皮石蜡切片方法 (郝秉中和吴继林 1982; Hao & Wu, 2000; Zhang & Tian, 2015; Chao et al., 2023)。基本的实验步骤如下: 使用锋利的单面刀片切取橡胶树萌条树皮和小叶柄, 立即将其分割成 4 mm × 4 mm 的小块, 置于 80%乙醇固定液中抽气; 室温固定 24 h; 乙醇系列脱水 (80%、95%、100%); 冰乙酸过渡后, 参照文献中的染色方法使用 I₂-Br₂ 或 NaBr 和 HBr 替代 Br₂的染色剂染色 36 h (60 °C); 冰乙酸脱去材料表面多余染色剂, 乙醇脱水, 正丁醇透明, 石蜡过渡和包埋; 切片厚度 16 μm, 45 °C展片并烘片后; 经过二甲苯脱蜡, 乙醇脱水, 使用固绿染色剂 (浓度为 1%, 使用 95%乙醇配制) 进行衬染, 乙醇脱去材料表面多余固绿染色剂, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 待二甲苯挥发殆尽, 使用光学显微镜镜检并拍照。

1.3 碘-溴染色剂配制方法

传统碘-溴染色剂 (I₂-Br₂), 为含有 0.2 mol·L⁻¹ 碘单质 (I₂) 和 25 mmol·L⁻¹ 溴素 (Br₂) 的乙酸溶液。I₂-Br₂ 染色剂配制方法: 先将 25 g 的 I₂ (购于广州化学试剂厂, 货号: IA02-AR-250G) 溶于 500 mL 冰乙酸 (购于广州化学试剂厂, 货号: CB39-GR-0.5L) 中, 磁力搅拌器搅拌并 65 °C加热助溶; 待 I₂完全溶解后, 加入 2 mL 的 Br₂[购于重庆川东化工(集团)有限公司, 货号: AR500g], 混匀备用。其中, I₂的质量体积比为 5% (m/V), Br₂的体积比为 0.4% (V/V)。

1.4 新型染色剂配制方法

本研究中采用 NaBr 和 HBr 代替 Br₂、KI 代替 I₂、水或稀释的 80%乙酸代替冰乙酸, 来配制不同配方的染色剂。由于 NaBr 溶解后能够释放出来的 Br 分子有限, 参考 I₂-Br₂染色剂中 25 mmol·L⁻¹ Br₂ (0.4%) 的浓度, 本实验中设置 4 个较高浓度的 NaBr, 分别是 3 mol·L⁻¹ NaBr、2 mol·L⁻¹ NaBr、1 mol·L⁻¹ NaBr 和 0.5 mol·L⁻¹ NaBr。而 HBr 溶解后, 能够释放出较多的 Br 分子, 我们直接使用相同或者略低浓度的 HBr 代替 Br₂配制染色剂, 参考 25 mmol·L⁻¹ Br₂(0.4%)的浓度, 设置 HBr 的浓度为 25 mmol·L⁻¹ HBr(0.4%)、18.75 mmol·L⁻¹ HBr(0.3%)、12.5 mmol·L⁻¹ HBr (0.2%) 和 6.25 mmol·L⁻¹ HBr (0.1%) 4 个浓度。参考 I₂-Br₂染色剂中 0.2 mol·L⁻¹ 的 I₂ (5%) 的浓度, 设置 3 个 KI 浓度, 分别是 0.4 mol·L⁻¹ KI (10%)、0.2 mol·L⁻¹ KI (5%) 和 0.1 mol·L⁻¹ KI (2.5%)。

各种染色剂配方的配制方法如下。(1) NaBr + I₂ + 乙酸染色剂: 先将 0.2 mol·L⁻¹ 的 I₂ 溶于 500 ml 冰乙酸溶液中, 并于 65 °C加热助溶, 待 I₂完全溶解后, 分别加入 4 个浓度的 NaBr, 配成染色剂溶液。(2) NaBr + KI + 乙酸染色剂: 先将 3 个浓度的 KI 溶于 500 mL 冰乙酸溶液中, 并于 65 °C加热助溶, 待 KI 完全溶解后, 再加入 1 mol·L⁻¹ NaBr 待其完全溶解,

配成染色剂溶液。(3) HBr + I₂+乙酸染色剂: 先将 0.2 mol·L⁻¹ 的 I₂溶于 500 mL 冰乙酸溶液中, 并于 65 °C加热助溶, 待 I₂完全溶解后, 分别加入 4 个浓度 HBr, 配成染色剂溶液。

(4)以 I₂-Br₂染色剂浓度为参考, 将 HBr(25 mmol·L⁻¹)、I₂(0.2 mol·L⁻¹)、Br₂(25 mmol·L⁻¹)、NaBr(1 mol·L⁻¹)、KI(0.4 mol·L⁻¹)加入 500 mL 冰乙酸中, 配成单一成分的染色剂作为对照组染液。

此外, 对上述染色剂中染色效果较好的配方, 使用稀释的乙酸或水代替冰乙酸作为溶剂来配制染色剂进行染色实验, 观察溶剂对这些染色剂配方的影响, 以及对这些染色效果较好的配方, 在室温条件下(30 °C)进行染色处理, 观察温度对这些染色剂配方的影响。

1.5 染色效果和组织完整性评价

对不同染色剂染色橡胶树萌条树皮和叶柄的光镜制片, 使用 Leica DMLB 荧光显微镜进行拍照, 按照相同放大倍数的照片进行比较(张世鑫等, 2011; 张世鑫等, 2018)。以传统的 I₂-Br₂染色结果为阳性对照, 以单一成分配制的染色剂的染色结果作为对照组, 来比较不同染色剂对橡胶树萌条树皮和叶柄乳管细胞和其他组织的染色情况和切片中的组织完整性。

2 结果与分析

2.1 NaBr 染色的结果

本文使用了 40 余种染色剂配方(表 1)进行橡胶树萌条树皮和叶柄的染色实验。使用传统的 I₂-Br₂染色方法作为对照组, 对橡胶树萌条 EU1 树皮和稳定期叶片的小叶柄基部进行光镜制片, 使用 I₂-Br₂染色剂(配方 1)染色和固绿衬染, 获得了较好的横切片。图 1 结果显示, 在橡胶树萌条 EU1 树皮的横切片中, 经过显微镜放大, 可以看到只有初生乳管细胞内的天然橡胶被染成棕褐色(图 1 中红色箭头所示), 并且这些初生乳管细胞较均匀地分布在树皮的初生韧皮部内, 其细胞形态和颜色与其他类型细胞差异明显。整个树皮横切片的组织结构都很好, 从外到内分别为表皮、皮层、初生韧皮纤维、初生韧皮部、次生韧皮部、维管形成层、次生木质部等组织(图 1: A)。在橡胶树萌条小叶柄基部的横切片中, 经过显微镜放大, 可以看到分布于叶柄维管束外侧的韧皮部内的乳管细胞, 其中的天然橡胶被染成棕褐色(图 1 中红色箭头所示), 其细胞形态和颜色与其他类型的细胞有明显差异。整个叶柄横切片的组织结构较好, 从外到内分别为表皮、基本组织、维管束(韧皮部-束中分生组织-木质部)、髓等组织(图 1: B)。然而, 由于橡胶树乳管的膨压很大, 采样时切口处流出的胶乳很多, 并在切口处聚集, 导致胶乳浸入木质部直径较大的螺纹导管细胞中, 经 I₂-Br₂染色, 可以观察到部分的螺纹导管细胞因浸入胶乳而被染成棕褐色(图 1: C 中黄色箭头所示), 而在正常状态下, 树皮和叶柄样品的木质部导管细胞中是没有胶乳的。

使用 NaBr 替代 Br₂配制染色剂, 对橡胶树萌条树皮和叶柄的染色实验, 结果发现: 第一组染色剂配方 3、4、7 中的 NaBr 浓度太高, NaBr 在乙酸溶液里面不能完全溶解, 只能勉强配制出配方 5(含有少量沉淀)和配方 6 的染色剂。由于冰乙酸做溶剂的溶解度有限, 我们尝试着用水稀释冰乙酸, 使用配制 80%乙酸来代替冰乙酸作为溶剂, 来配制配方 3-6 的染色剂。发现 80%乙酸中的 NaBr 溶解度要好一些, 能够配制出配方 8(含有少量沉淀)和配方 9-10 的染色剂。将 8 种配方(3-10)与配方 1 相比较, 发现配方 4 和 5 及配方 7-9 染色的树皮和叶柄样品, 其横切片中乳管细胞与其他组织的细胞可明显区分。乳管细胞中的橡胶可以被染成棕褐色, 其他细胞被固绿染成的宝蓝色也很明显, 而且组织完整性好, 跟对照配方 1 染色结果基本相同。就乳管细胞被染成棕褐色的深浅程度而言, NaBr 浓度高(图 2: A、B、E、F)的染色效果要优于 NaBr 浓度低(图 2: C、D、G、H)的染色剂。可见, NaBr 能够替代 Br₂用于橡胶树萌条树皮和叶柄中乳管细胞的染色。

表 1 染色剂配方与染色效果汇总表
Table 1 Summary of staining formulæ and staining effects

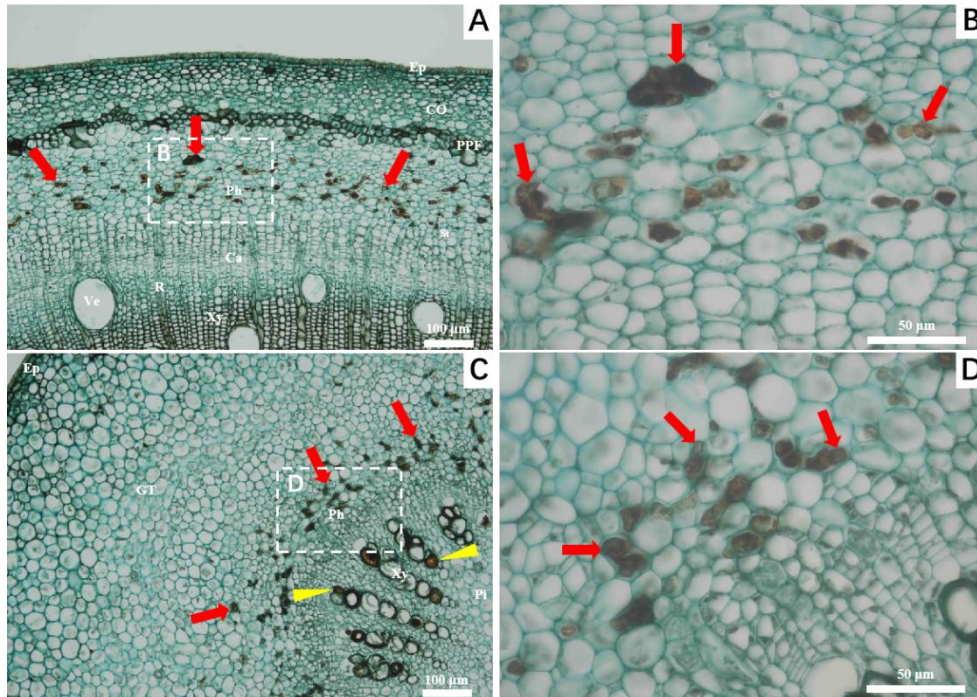
组别 Group	编 号 No.	染色剂配方 Staining formulæ	温度 Temperature (°C)	效果 Effect	备注 Note
阳性对照 Positive control	1	25 mmol·L ⁻¹ Br ₂ +0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++++	图 1、图 3、图 4 Fig. 1, Fig. 3, Fig. 4
		25 mmol·L ⁻¹ Br ₂ +0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	2	25 mmol·L ⁻¹ Br ₂ +0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	30	++	图 3: a、b Fig. 3: a, b
		25 mmol·L ⁻¹ Br ₂ +0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	3	3 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	无 None	—
		3 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
4	2 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	无 None	—	
	2 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid				
一组 Group one	5	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++++	图 2: A、B Fig. 2: A, B
		1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	6	0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++++	图 2: C、D Fig. 2: C, D
		0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	7	3 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80%乙酸	65	无 None	—
		3 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80% acetic acid			
	8	2 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80%乙酸	65	++++	图 2: E、F Fig. 2: E, F
		2 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80% acetic acid			
	9	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80%乙酸	65	++++	图 2: G、H Fig. 2: G, H
		1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80% acetic acid			
	10	0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80%乙酸	65	++++	—
		0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + 80% acetic acid			
	11	1 mol·L ⁻¹ NaBr +0.4 mol·L ⁻¹ KI +冰乙酸	65	-	—
		1 mol·L ⁻¹ NaBr +0.4 mol·L ⁻¹ KI + acetic acid			
	12	1 mol·L ⁻¹ NaBr +0.2 mol·L ⁻¹ KI +冰乙酸	65	-	—
		1 mol·L ⁻¹ NaBr +0.2 mol·L ⁻¹ KI +acetic acid			
	13	1 mol·L ⁻¹ NaBr +0.1 mol·L ⁻¹ KI +冰乙酸	65	-	—
		1 mol·L ⁻¹ NaBr +0.1 mol·L ⁻¹ KI + acetic acid			
14	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI +水	65	-	—	
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + water				
15	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ KI +水	65	-	—	
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ KI + water				
16	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.1 mol·L ⁻¹ KI +水	65	-	—	
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.1 mol·L ⁻¹ KI + water				
17	0 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+	—	
	0 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid				
18	0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++	—	

	0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	19 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	20 25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++	—
	25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	21 0 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++	图 3: E、F
	0 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 3: E, F
	22 0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++	图 3: G、H
	0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 3G, H
	23 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++	图 3: I、J
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 3: I, J
	24 0 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	30	++	图 3: e、f
	0 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 3: e, f
	25 0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	30	+	图 3: g、h
	0.5 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 3: g, h
三组	26 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	30	++	图 3: i、j
Group three	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 3: i, j
	27 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.05 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	65	+	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.05 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			
	28 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.1 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	65	+	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.1 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			
	29 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	65	+	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			
	30 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.05 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	30	-	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.05 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			
	31 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.1 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	30	-	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.1 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			
	32 1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	30	-	—
	1 mol·L ⁻¹ NaBr + 0.4 mol·L ⁻¹ KI + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			
	33 6.25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++++	图 4: C、D
	6.25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 4: C, D
	34 12.5 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++++	图 4: E、F
	12.5 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 4: E, F
	35 18.75 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++++	图 4: G、H
	18.75 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 4: G, H
四组	36 25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	+++++	图 4: I、J
Group four	25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 4: I, J
	37 1.0 mol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++	—
	1.0 mol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			
	38 25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +水	65	++	图 4: K、L

		25 mmol·L ⁻¹ HBr + 0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + water			Fig. 4: K, L
	39	0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ +冰乙酸	65	++++	图 4: M、N
		0.2 mol·L ⁻¹ I ₂ + acetic acid			Fig. 4: M, N
	40	0.4 mol·L ⁻¹ KI +冰乙酸	65	-	图 4: O、P
		0.4 mol·L ⁻¹ KI+ acetic acid			Fig. 4: O, P
对照	41	25 mmol·L ⁻¹ Br ₂ +冰乙酸	65	+	图 4: Q、R
Control		25 mmol·L ⁻¹ Br ₂ + acetic acid			Fig. 4: Q, R
	42	1 mol·L ⁻¹ NaBr +冰乙酸	65	-	图 4: S、T
		1 mol·L ⁻¹ NaBr + acetic acid			Fig. 4: S, T
	43	25 mmol·L ⁻¹ HBr +冰乙酸	65	+	—
		25 mmol·L ⁻¹ HBr + acetic acid			

注：无表示没有结果，-表示乳管细胞未染上色，+至++++表示乳管细胞染色效果越好。

Note: None shows no result, - shows that laticifers were not stained, and + to ++++ show that the staining effects of laticifers are better and best.

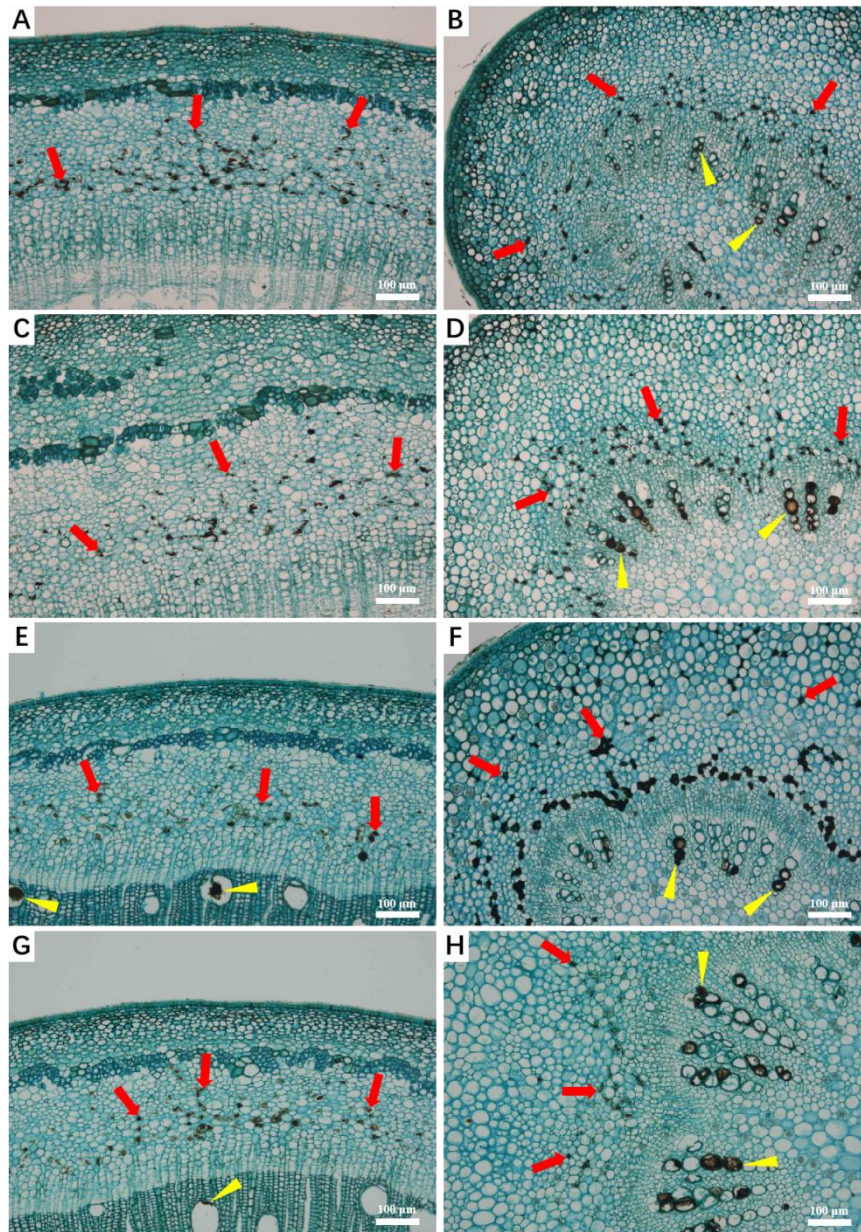


A、B. 橡胶树萌条 EU1 树皮的横切片；**C、D.** 橡胶树叶片小叶柄基部的横切片。白色虚线框为放大部分，红色箭头为染成棕褐色的乳管细胞，黄色箭头为被胶乳污染的导管细胞。**Ca.** 形成层；**CO.** 皮层；**EP.** 表皮；**GT.** 基本组织；**Ph.** 韧皮部；**Pi.** 髓；**PPF.** 初生韧皮纤维；**R.** 射线；**St.** 筛管；**Ve.** 导管；**Xy.** 木质部。

A,B. Cross-sections of the bark in the EU1 of rubber tree shoots; **C,D.** Cross-sections of the petiole in rubber tree shoots. White dashed boxes indicate enlarged areas, red arrows indicate the brownish-brown laticifer cells, yellow arrows indicate vessel cells contaminated with latex. **Ca.** Cambium; **CO.** Cortex; **EP.** Epidermis; **GT.** Ground tissue; **Ph.** Phloem; **Pi.** Pith; **PPF.** Primary phloem fibers; **R.** Rays; **St.** Sieve tubes; **Ve.** Vessels; **Xy.** Xylem.

图 1 I₂-Br₂染色橡胶树萌条树皮和叶柄的横切片

Fig. 1 Cross-sections of the bark and petiole dyed with I₂-Br₂ staining in rubber tree shoots



红色箭头为染成棕褐色的乳管细胞，黄色箭头为被胶乳污染的导管细胞。

Red arrows indicate the brownish-brown laticifer cells, yellow arrows indicate vessel cells contaminated with latex.

图 2 NaBr+I₂ 溶液染色橡胶树萌条树皮和叶柄的横切片

Fig. 2 Cross-sections of the bark and petiole dyed with NaBr+I₂ staining in rubber tree shoots

2.2 使用 NaBr 和 KI 替代 Br₂和 I₂染色的结果

在组织化学定位研究中，常使用碘-碘化钾 (I₂-KI) 来染色淀粉和蛋白质 (徐璐等, 2025)，而 I₂-Br₂ 染色剂中的 I₂ 可以对天然橡胶进行染色。为了探索 KI 是否能够替代 I₂ 对橡胶树乳管细胞进行染色，我们设置了 3 种浓度的 KI 的配方 11-13 染色处理。结果发现，第二组染色剂配方 11-13 染色的树皮和叶柄横切片中，均没有观察到被染成棕褐色的乳管细胞，以及被胶乳浸入污染的螺纹导管，并且叶柄中的维管束的边界也不清楚。由上述结果可知，KI 并不能直接代替 I₂ 作为染色剂，所以配制乳管细胞染色剂时，需要保留了能够对天然橡胶染色的 I₂ (史自强和胡正海, 1965)。

我们将 I₂ 重新加到染色剂体系中，设置了 3 个浓度 NaBr 配制染色剂配方 17-19，以探究 NaBr+KI 和 I₂ 的染色效果。结果发现，在加入 I₂ 后，不含 NaBr 的配方 17 染色的橡胶树萌条树皮和叶柄的横切片中，很少有被染成棕褐色的乳管细胞和被胶乳浸入污染的螺旋导管细胞，而随着 NaBr 浓度的增加，配方 18 和 19 染成棕褐色的乳管细胞和螺旋导管细胞数量越多，颜色也越深。可见，在 NaBr + KI + I₂ + 乙酸的染色剂的体系中，NaBr 应该是起到跟 Br₂ 卤化变性组织同样的作用，促进了 I₂ 对天然橡胶的染色作用。

2.3 溶剂对染色效果的影响

冰乙酸是重要的有机酸之一，是制药、染料、农药及其他有机合成的重要原料，在形态学研究中有多种应用（马小玲和章英才，2025）。冰乙酸常作为形态学实验的固定液成分，冰乙酸可以快速穿透细胞，与细胞内的蛋白质发生作用，使其沉淀、固定，并维持染色体结构的完整性，增强染色体的嗜碱性，以达到优良染色效果（葛立鑫等，2024）。冰乙酸具有很强的腐蚀性，能够对生物组织、织物、金属等材料产生腐蚀作用（万琛等，2010）。在橡胶树树皮形态结构的早期研究中，针对橡胶树成龄大树的树皮材料中含有大量的石细胞，质地坚硬、切片困难等问题，就是利用了高温处理下 I₂-Br₂ 染色剂中的冰乙酸的腐蚀作用和 Br₂ 的卤化作用，将橡胶树大树的树皮软化，使得后续的切片过程更加顺利。恰恰相反，如果使用 I₂-Br₂ 染色剂和高温处理橡胶树幼嫩组织或橡胶草、莴苣等草本材料，会使幼嫩组织发生严重破损或者溶解（本研究团队未发表资料）。所以，我们探索使用了水或者稀释的乙酸来代替冰乙酸作为溶剂，配制 NaBr + I₂ 的染色剂，进行树皮和叶柄样品的染色处理（65 °C，36 h）。结果显示，使用 80 % 乙酸做溶剂配制的染色剂配方 6-9，发现不仅能够溶解更多的 NaBr，而且 80 % 乙酸配制的染色剂（图 2：E-H）要比冰乙酸的染色效果（图 2：A-D）要更好一些。从前文可知，KI 无法代替 I₂ 直接配制染色剂，所用使用水做溶剂的染色剂配方 14-16 与乙酸做溶剂的配方 11-13 进行比较，但均未能使乳管细胞被染成棕褐色，所以无法区分水和乙酸在作为溶剂上的差异。但是，在类似的染色剂配比中，乙酸作溶剂的染色剂配方 12 是能够将乳管细胞染成棕褐色的，而水作溶剂的配方 29 却只能将少量乳管细胞染成浅棕褐色。可见，冰乙酸或者稀释的乙酸作为溶剂是配制染色剂不可或缺的。

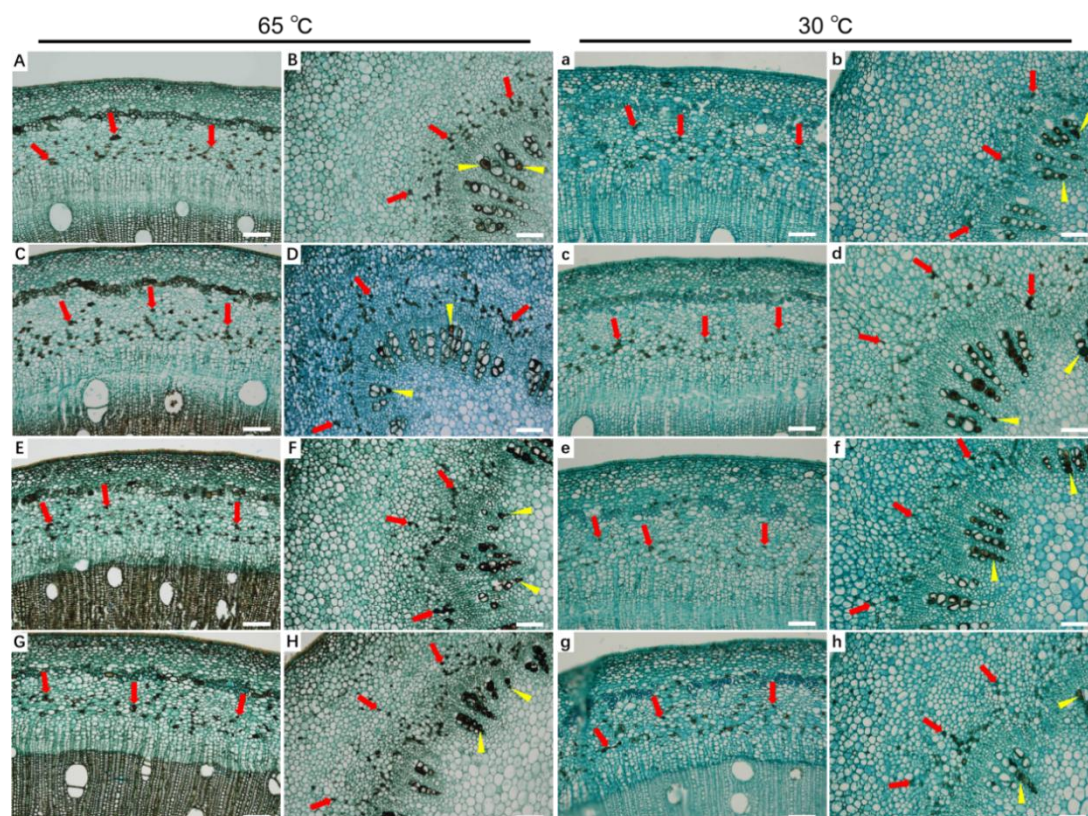
2.4 温度对染色效果的影响

由于 Br₂ 和冰乙酸都具有强刺激性气味和强腐蚀性作用，在 65 °C 高温条件下，强刺激性气味和强腐蚀性的效果更甚，这使得高温条件下操作实验的危险性增大。在高温催化下，I₂-Br₂ 染色剂会使幼嫩组织发生破损或者溶解，而得不到理想的实验效果（本团队未发表资料）。为了探索更安全且组织形态完整性更好的方法，我们尝试在室温条件下（30 °C），使用不同的染色剂配方进行树皮和叶柄样品的染色实验，结果如下。

（1）在 65 °C 条件下，配方 1 染色树皮和叶柄样品的横切片中，乳管细胞和被胶乳浸入的螺旋导管细胞都被染成深棕褐色，细胞数量也比室温条件下染色处理的横切片多（图 3：A、B）且木质部薄壁细胞也能被染成棕褐色；在 30 °C 条件下，配方 2 的形成层组织的完整更好、细胞破损更少、固绿衬染的蓝色更鲜艳，但是我们主要观察的对象——乳管细胞和被胶乳浸入的螺旋导管细胞，只能被染成浅的棕褐色，效果稍差（图 3：a、b）。

（2）针对 2.1 的实验结果中证实有较好染色效果的 NaBr + I₂ 染色液，比较了配方 21-23 在 65 °C 高温和配方 24-26 在 30 °C 室温条件下的染色情况。在 65 °C 条件下，配方 21（图 3：E、F）、配方 22（图 3：G、H）和配方 23（图 3：I、J），可以将树皮和叶柄的乳管细胞和被胶乳浸入的螺旋导管细胞染成棕褐色且木质部薄壁细胞也被染成棕褐色。而在 30 °C 条件下，配方 24-26（图 3：e-j）却只能将乳管细胞和被胶乳浸入的螺旋导管细胞染成浅棕褐色，而且被染成浅棕褐色的细胞数量也要少一些，但是，其木质部薄壁细胞未被染成棕褐色，固绿衬染的蓝色更鲜艳（图 3：e-j）。可见，在 65 °C 条件下含胶乳的乳管细胞染色效果更好，但在 30 °C 条件下染色更均匀，细胞形态完整更好且固绿衬染的效果更理想。

(3) 我们又尝试将 2.3 中的 $\text{NaBr} + \text{KI} + \text{I}_2 + \text{水}$ 的染色剂配方, 进行高温和室温条件下的染色比较。结果发现, 在 65°C 条件下, 配方 27-29 可以将树皮和叶柄的乳管细胞和被胶乳浸入的螺纹导管细胞都染成浅棕褐色, 但是被染成棕褐色的细胞数量要明显少于乙酸配制的染色液; 但是, 其木质部薄壁细胞未被染成棕褐色, 固绿衬染的蓝色更鲜艳。在 30°C 条件下, 配方 30-32 的染色结果中, 均没有观察到被染成棕褐色的乳管细胞, 以及被胶乳浸入污染的螺纹导管, 而且维管束组织的边界也不清楚; 但是, 其切片的组织完整性较好, 固绿衬染的蓝色更鲜艳。可见, 在室温条件下, 天然橡胶染色较浅, 乳管细胞的染色效果较差, 但乙酸的腐蚀和 I_2 卤化作用弱一些, 组织和细胞的完整性确实要稍好一些。而温度对水做溶剂配制染色剂的染色效果影响不大, 水做溶剂配制染色剂的染色效果依旧不理想。



红色箭头为染成棕褐色的乳管细胞, 黄色箭头为被胶乳污染的导管细胞。标尺=100 μm 。

Red arrows indicate the brownish-brown laticifer cells, yellow arrows indicate vessel cells contaminated with latex. Bars =100 μm .

图 3 不同温度条件下染色橡胶树萌条树皮和叶柄的横切片

Fig. 3 Cross-sections of the bark and petiole dyed at different temperature in rubber tree shoots

2.5 HBr 的染色结果

溴化氢 (HBr) 是溴和氢的化合物, HBr 的水溶液为氢溴酸, HBr 能够在加热条件下释放 Br 分子, 起到印染的作用。使用 4 种浓度的 HBr 的染色剂配方 33-36 对橡胶树萌条树皮和叶柄进行染色处理。发现如下结果:

(1) 与对照配方 1 染色的树皮和叶柄样品 (图 4: A、B) 对比, 在配方 33 (图 4: C、D)、配方 34 (图 4: E、F)、配方 35 (图 4: G、H) 和配方 36 (图 4: I、J) 等染色剂染色的树皮和叶柄样品横切片中, 都能够清晰地观察到被染成棕褐色的乳管细胞和被胶乳浸入的螺纹导管细胞, 而且木质部也能够被染成棕褐色, 组织完整性较好。

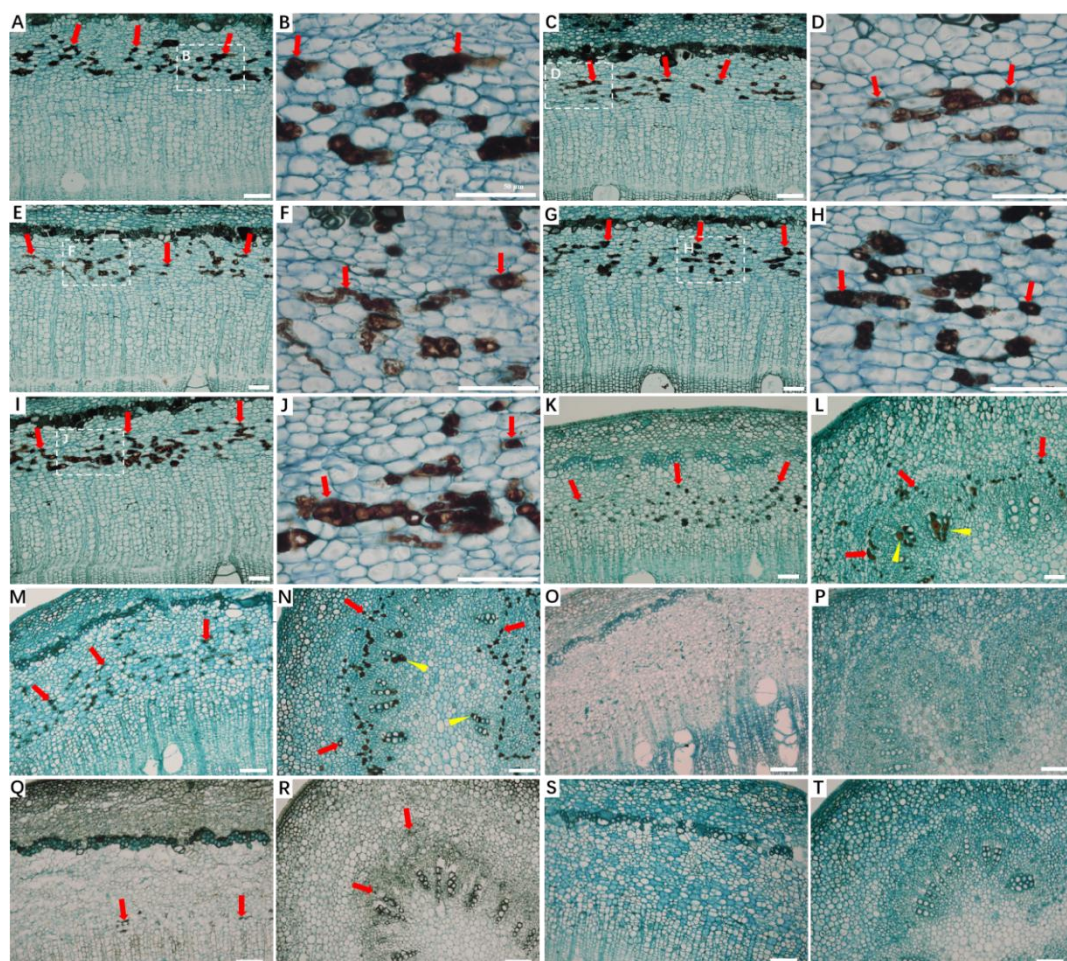
(2) 我们还尝试使用高浓度的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBr (约 40 倍的 Br_2 浓度) 的配方 37 染色, 发现树皮的乳管细胞能够被染色棕褐色, 但颜色较浅, 并且树皮各组织存在明显的离析现象, 细胞轮廓不清晰, 染色效果并不理想; 在叶柄的横切片中, 乳管细胞染色和组织的完整性要好一些, 但颜色较浅, 是比对照配方 1 染色的对照组染色效果差的。

(3) 我们还尝试使用水作溶剂配制 HBr 染色剂, 发现在配方 38 染色树皮和叶柄样品的横切片中, 都能够清晰地观察到被染成棕褐色的乳管细胞和被胶乳浸入的螺纹导管细胞, 但是被染成棕褐色的细胞数量要略少 (图 4: K、L)。

可见, HBr 可以代替 Br_2 作为染色剂进行树皮和叶柄样品的染色, 并且 HBr 染色剂还可使用水做溶剂进行配制染色剂。

2.6 染色剂单一成分的染色结果

为了探究 NaBr (HBr) + I_2 + 乙酸染色剂中的哪种成分起主导作用, 我们又对染色剂中的单一成分 I_2 、KI、 Br_2 、NaBr 和 HBr 分别配制乙酸溶液, 对树皮和叶柄样品进行染色实验。图 4 结果显示, 配方 39 中单一成分 I_2 对树皮和叶柄样品的染色效果, 相对是最好的, 乳管细胞和被胶乳浸入污染的螺纹导管细胞均被染成棕褐色, 而且木质部薄壁细胞未被染成棕褐色, 细胞轮廓清晰, 组织形态完整 (图 4: M、N)。配方 40 中单一成分 KI (图 4: O、P) 和配方 42 中单一成分 NaBr (图 4: S、T) 均不能将乳管细胞染成棕褐色, 但配方 42 结果中的薄壁细胞轮廓清晰和固绿衬染的颜色鲜艳, 整体效果要优于配方 40。配方 41 中单一成分 Br_2 (图 4: Q、R) 和配方 43 中单一成分 HBr 的染色效果都较差, 虽然少量的乳管细胞被染成浅棕褐色, 但是薄壁细胞有破损且细胞轮廓不清晰, 切片中组织的完整性不好。可见, 染色剂中将天然橡胶染成棕褐色的主要成分是 I_2 , 而 NaBr 是起卤化作用的, 这与 I_2 - Br_2 染色天然橡胶的基本原理是相同的 (史自强和胡正海, 1965)。



白色虚线框为放大部分, 红色箭头为染成棕褐色的乳管细胞, 黄色箭头为被胶乳污染的导管细胞。标尺=100 μm 。

Dashed boxes indicate enlarged areas, red arrows indicate the brownish-brown laticifer cells, yellow arrows indicate vessel cells contaminated with latex. Bars=100 μm .

图 4 HBr 和染色剂单一成分染色橡胶树萌条树皮和叶柄的横切片

Fig. 4 Cross-sections of the bark and petiole dyed with HBr and single component of stains in rubber tree shoots

3 讨论

传统 $\text{I}_2\text{-Br}_2$ 染色技术结合石蜡切片与光学显微镜观察, 可清晰显示产胶植物的乳管细胞在组织中的分布、细胞形态及天然橡胶着色的特征。但是, 受限于 $\text{I}_2\text{-Br}_2$ 染色剂中主要成分 Br_2 为易制毒危化品属性, 而受到严格管控, 导致 $\text{I}_2\text{-Br}_2$ 染色方法的使用受限。近年来, 产胶植物乳管细胞学研究中, 学者们使用安全且更易购买的替代染色剂 (如油红 O 染色) 进行乳管细胞的染色。虽然油红 O 能够大致显示乳管细胞位置和轮廓, 实验中使用也方便, 还降低实验操作风险, 但是油红 O 是一种很强的脂溶性染料, 能够能与组织和细胞中的脂类强烈反应, 使组织内的脂类呈现橘红色, 在工业上主要用于油脂、水、肥皂、蜡烛、橡胶、塑料制品的着色。学者们主要采用震动切片结合油红 O 对幼嫩的橡胶草根的乳管细胞进行染色, 能够大致反映出橡胶草根中乳管细胞的位置和含胶量的多少, 但是使用油红 O 染色的橡胶草根的表皮、木质部等组织 (没有乳管细胞) 也显示为橙红色 (Lin et al., 2021; Chao et al., 2023; Wu et al., 2023; Xu et al., 2025)。而且, 我们也使用油红 O 染色对橡胶树萌条树皮和叶柄进行染色, 其表皮和部分薄壁细胞也是橙红色的 (本团队未发表资料), 说明油红 O 并不能作为天然橡胶染色和显示乳管细胞的专一染色剂。

乳管细胞割胶后流出的白色胶乳, 通过石蜡切片的有机溶剂浸洗而变为无色透明, 如果不通过染料对其染色, 在光镜下很难辨认出乳管细胞的位置和轮廓。苏丹 III、苏丹 IV、阿里坎拿、溴化法、氯化法、油溶黄、油溶蓝等染色, 可以使乳管细胞着色, 但材料中的脂肪、树脂及角质化、木栓化的细胞壁也往往能染上类似的颜色, 或者所染的颜色在切片的保存中容易褪去 (史自强和胡正海, 1965)。史自强和胡正海发明了 $\text{I}_2 + \text{Br}_2 +$ 冰乙酸染色液, 可以专一性对含有橡胶的植物组织进行染色, 克服了橡胶染色、橡胶变性和保存褪色等问题, 而且效果很好, 该染色方法一直沿用至今。由于 Br_2 有刺激性气味和强腐蚀性, 属于易制毒危险化学品, 其生产、储存、使用、经营、运输受到安监部门和公安机关的严格监管。而且在乳管细胞学研究时使用 $\text{I}_2\text{-Br}_2$ 染色存在较大的安全风险, 寻求更为安全的染色方法或染色试剂进行替代, 已是当务之急。本实验购置的 Br_2 为重庆川东化工 (集团) 有限公司产品, 货号: AR500 g, 危化品采购合同价格为每 500 mL 280 元 (总体积 500 mL, 包括了上层约 1/5 用于封闭溴素的水和下层 4/5 的溴素且不包含危化品运输费)。由于危化品的运输需要专门的危化品运输途径, 费用很高, 所以使用 Br_2 作为染色剂的成本很高 (每瓶的总价为每 500 mL 650~850 元)。而 NaBr 和 HBr 不属于危化品, 安全性好、易于购买与运输且价格实惠, NaBr 的采购价格为每 500 g 22.8 元, HBr 的采购价格仅为每 500 mL 75 元 (报价来自于科研采购管理平台, <https://www.cassbuy.com/>), 远低于 Br_2 的价格。本研究提供的 NaBr 和 HBr 代替 Br_2 配制染色剂能够对橡胶树萌条树皮和叶柄进行染色, 是当前解决乳管细胞染色问题的有效且经济的手段。

综上所述, $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaBr} + 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ I}_2 +$ 乙酸染色液和 $6.25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HBr} + 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ I}_2 +$ 乙酸染色液的配方, 对橡胶树萌条的树皮和叶柄样品的染色效果较好。不仅乳管细胞和被胶乳浸入的螺纹导管细胞都能够被染成棕褐色, 而且切片的组织完整性好, 细胞轮廓清晰。本文利用 NaBr 和 HBr 可以替代 Br_2 配制的染色剂用于橡胶树乳管细胞的染色, 不

仅安全、节约成本，还能为产胶植物的乳管细胞学的研究提供良好的技术支持。

参考文献:

- CATELBLANQUE L, BALAGUER B, MARTI C, et al., 2016. Novel insights into the organization of laticifer cells: a cell comprising a unified whole system [J]. *Plant Physiology*, 172(2): 1032-1044.
- CHAO JQ, WU SH, SHI MJ, et al., 2023. Genomic insight into domestication of rubber tree [J]. *Nature Communications*, 14(1):4651.
- FAY DE, SANIER C, HEBANT C, 1989. The distribution of plasmodesmata in the phloem of *Hevea brasiliensis* in relation to laticifer loading [J]. *Protoplasma*, 149: 155-162.
- GAO J, CHENG H, 2024. The rubber tree that changed the world in 150 years [J]. *Scientia Sinica(Vitae)*, 54: 1744-1751. [高静, 程汉, 2024. 橡胶树改变世界的 150 年 [J]. *中国科学:生命科学*, 54(10): 1744-1751.]
- GE LX, ZHANG SX, JIANG Y, et al., 2024. Study on morphological structure and ergastic substance of different nutrient organs in *Paeonia ludlowii* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 40 (16): 72-82. [葛立鑫, 张世鑫, 蒋毅, 等, 2024, 大花黄牡丹营养器官的形态结构和后含物研究 [J]. *中国农学通报*, 40 (16): 72-82.]
- GOMEZ JB, 1982. Anatomy of *Hevea* and its influence on latex production[M]. Kuala Lumpur: Malaysia Rubber Research and Development Board.
- HAO BZ, WU JL, 1982. Effects of wound (tapping) on laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 24(4): 388-391, 408. [郝秉中, 吴继林, 1982. 创伤(割胶)对巴西橡胶树乳管分化的影响 [J]. *植物学报*, 24(4): 388-391+408.]
- HAO BZ, WU JL, 2000. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid [J]. *Annals of botany*, 85(1): 37-43.
- LI Q, WEI Y, 2024. Review of rubber futures market in 2023 and outlook for 2024 [J]. *China Rubber Science and Technology Market*, 22(2): 65-73. [李青, 魏宇, 2024. 2023 年橡胶期货市场回顾及 2024 年展望 [J]. *橡胶科技*, 22(2): 65-73.]
- LIN T, XU X, DU HL, et al., 2021, Extensive sequence divergence between the reference genomes of *Taraxacum kok-saghyz* and *Taraxacum mongolicum* [J]. *Science china life sciences*, 65(3): 515-528.
- MA XL, ZHANG YC, 2025. An improved steedman's wax sectioning method for plant tissues of *Ziziphus jujuba*, *Bulletin of Botanical Research*, 45(1): 139-147. [马小玲, 章英才, 2025. 一种枣植物组织改良的 Steedman's wax 石蜡切片方法 [J]. *植物研究*, 45(1): 139-147.]
- METCALFE CR, 1967. Distribution of latex in the plant kingdom [J]. *Economic Botany*, 21: 115-127.
- NOBUTE T, HIRASHIMA SI, TADA N, et al., 2010. Facile aerobic photo-oxidative syntheses of α , α -dibromoacetophenones from aromatic alkynes with 48% aq HBr [J]. *Tetrahedron Letters*, 51, 4576-4578.
- SHI MJ, TIAN WM, ZHANG SX, et al., 2024. Structure characteristics, differentiation, and development of laticifer in rubber-producing plants [J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 54: 1781-1797. [史敏晶, 田维敏, 张世鑫, 等, 2024. 产胶植物乳管的结构特征及其分化和发育 [J]. *中国科学:生命科学*, 54(10): 1781-1797.]
- SHI ZQ, HU ZH, 1965. Section preparation method for rubber-containing plant tissues [J]. *Acta Botanica Sinica*, 13(2): 179-183. [史自强, 胡正海, 1965. 植物含橡胶组织的制片方法 [J]. *植物学报*, 13(2): 179-183.]

- SUN XH, 2024. Status and future prospect of bromine industry in China [J]. *Geology of chemical minerals*, 46(9): 267-272. [孙小虹, 2024. 中国溴素行业现状及未来展望 [J]. *化工矿产地质*, 46(9): 267-272.]
- TIAN WM, SHI MJ, TAN HY, et al., 2015. Structure and development of bark in *Hevea brasiliensis* [M]. Beijing: Science Press: 52-75 [田维敏, 史敏晶, 谭海燕, 等, 2015. 橡胶树树皮结构与发育 [M]. 北京: 科学出版社: 52-75.]
- TIAN WM, SHI MJ, YU FY, et al., 2003. Localized effects of mechanical wounding and exogenous jasmonic acid on the induction of secondary laticifer differentiation in relation to the distribution of jasmonic acid in *Hevea brasiliensis* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 45(11): 1366-1372.
- WAN S, 2010. Safety management of chemical reagents in chemical analysis laboratories [J]. *Physical Testing And Chemical Analysis Part b: Chemical Analysis*, 46 (6): 690-691. [万琛, 2010, 化学分析实验室中化学试剂的安全管理 [J]. *理化检验(化学分册)*, 46 (6): 690-691.]
- WU JL, HAO BZ, TAN HY, 2002. Wound-induced differentiation in *Hevea brasiliensis* shoots mediated by jasmonic acid [J]. *Journal of Rubber Research*, 5(1): 53-63.
- WU SH, ZHANG SX, CHAO JQ, et al., 2023. Differential miRNA expression profiling reveals a correlation between *hbr-miR156* and laticifer differentiation in rubber trees [J]. *Industrial Crops and Products*, 192: 116067.
- XU L, YAO HD, CHEN SQ, et al., 2025. Morphological anatomy and environmental adaptability of the leaves of *Nerium oleander* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 33(3): 343-351. [徐璐, 姚贺东, 陈随清, 等, 2025. 夹竹桃叶的形态解剖学及其环境适应性意义 [J]. *热带亚热带植物学报*, 33(3): 343-351.]
- XU TC, LI YM, LIU X, et al., 2025. Rubber biosynthesis drives the biogenesis and development of rubber particles, the rubber-producing organelles [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 23(6): 2303-2316.
- ZHANG SX, LIU NT, YANG SG, et al., 2018. Early evaluation method of secondary laticifer differentiation ability in *Hevea brasiliensis* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 39(7):1266-1275. [张世鑫, 刘宁涛, 杨署光, 等, 2018. 巴西橡胶树次生乳管分化能力的早期评价方法研究 [J]. *热带作物学报*, 39(7): 1266-1275.]
- ZHANG SX, LIU SB, TIAN WM, 2011. Effect of vascular cambium activity on secondary laticifer differentiation induced by mechanical wounding in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32(6): 1037-1041. [张世鑫, 刘世, 田维敏, 2011. 形成层活动对机械伤害诱导巴西橡胶树次生乳管分化的影响 [J]. *热带作物学报*, 32(6): 1037-1041.]
- ZHANG SX, TIAN WM, 2015. Cross talk between cytokinin and jasmonates in regulating the secondary laticifer differentiation in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. *Journal of Rubber Research*, 18(1): 38-48.
- ZHANG SX, WU SH, CHEN YY, et al., 2015. Analysis of differentially expressed genes associated with coronatine-induced laticifer differentiation in the rubber tree by subtractive hybridization suppression [J]. *PLoS ONE*, 10(7): e0132070.
- ZHANG SX, WU SH, TIAN WM, 2016. The secondary laticifer differentiation in rubber tree is induced by trichostatin A, an inhibitor of histone acetylation [J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 3(4): 357-362.

