

利用微型离心管提取分析天然橡胶主要成分 聚异戊二烯方法的建立

张 君^{1,2,3}, 雍婧姣^{1,2,3}, 路国栋^{1,2,3}, 安迎瑞^{1,2,3}, 张 虹^{1,2,3},
郎思睿^{1,2,3}, 陈 任^{1,2,3*}

(1. 宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021;
3. 宁夏大学 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘 要:为建立一种快速、准确的从少量样品中提取、分析天然橡胶主要成分聚异戊二烯含量的方法,在已采用索氏提取器提取的基础上,进一步探讨采用 2 mL 微型离心管的方法提取分析材料(0.5 g 以下)中的聚异戊二烯含量。从分别利用微型离心管与索氏提取器提取 4 种样品分析材料,即顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅的提取得率和分子量分布看,2 种提取方法的差别不大,再通过每次提取时利用顺式聚异戊二烯标准品建立标准曲线校正,采用 2 mL 微型离心管微量提取分析测定植物植株、组织材料或真菌子实体、菌丝体中的顺式或反式-1、4-聚异戊二烯橡胶含量的方法可行、结果可信。

关键词:天然橡胶;聚异戊二烯;微型离心管提取;索氏提取器提取;提取得率;分子量分布

中图分类号:S718.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2023)02-0223-06

Establishment of A Microtube Extraction Method for Natural Rubber Basic Ingredient Polyisoprene Analysis

ZHANG Jun^{1,2,3}, YONG Jing-jiao^{1,2,3}, LU Guo-dong^{1,2,3}, AN Ying-rui^{1,2,3}, ZHANG Hong^{1,2,3},
LANG Si-rui^{1,2,3}, CHEN Ren^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China; 3. Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

Abstract: In order to establish a rapid, accurate analysis method for the content test of polyisoprene, the basic ingredient in natural rubber that extracted from a small quantity of sample, based on the previous method by Soxhlet extractor, the extraction and analysis of polyisoprene from sample (less than 0.5 g) in 2 mL microtube was further discussed. Four kinds of samples, *cis*-polyisoprene standard, *Lactarius volemus* fruiting body, *Periploca sepium* branch and *Eucommia ulmoides* winged perianth, were extracted by microtube and Soxhlet extractor respectively. No significant differences were found in extraction rate and molecular weight distribution between the two methods. In addition, the content of polyisoprene could be corrected by the standard curve established by *cis*-polyisoprene standards during each extraction. The 2 mL microtube extraction method is feasible and reliable to analyze the content of *cis*-or *trans*-1,4-polyisoprene in plant plantlet, tissue materials or fungi fruiting bodies, mycelia.

Key words: natural rubber; polyisoprene; microtube extraction method; Soxhlet extraction method; extraction rate; molecular weight distribution

收稿日期:2022-08-10 修回日期:2022-11-06

基金项目:国家自然科学基金目(31960065);宁夏回族自治区重点研发计划(重大)重点项目(2019BFG02011)。

第一作者:张 君。研究方向:植物生物学。E-mail:1340131221@qq.com

* 通信作者:陈 任,博士,教授。研究方向:植物分子生物学与基因工程。E-mail:chenren511@163.com

天然橡胶作为工业四大原料之一,在国计民生和国家安全中占有重要的地位,其主要成分为1,4-聚异戊二烯(1,4-polyisoprene)。在生产上几乎全部通过割取巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)韧皮部乳管,从乳汁中提炼。我国是世界天然橡胶消费大国,近年来的年消费量均在600万t以上。由于巴西橡胶树是典型的热带雨林树种,耐寒性较差,喜好高温高湿、光照足且降水均匀的天然生长环境,因此其生长生产主要集中在越南、印度尼西亚、泰国等热带、亚热带地区,是典型的资源约束性产业。而我国适宜天然橡胶生长的区域有限,主要分布在海南、云南等地区,平均年产胶能力为 $1\text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ ^[1]。因此,我国的天然橡胶生产无法自给自足,对原料需求量的80%以上依赖进口^[2-3]。随着工业经济发展,解决天然橡胶资源已经成为了当前刻不容缓的关键问题^[4]。

虽然随着技术的进步,化学合成橡胶在性能方面越来越趋于完善,但仍然无法完全替代天然橡胶。美国、欧洲、日本等天然橡胶需求较大的国家,同样面临着不具备种植巴西橡胶树的天然环境,多年前就开始大力支持研发银胶菊(*Parthenium argentatum*)、俄罗斯蒲公英(*Taraxacum koksaghyz*, 别名橡胶草)等被关注的天然橡胶生产替代植物^[5]。我国也开展了俄罗斯蒲公英基因转化以及基因组测序、表达分析^[6]等研究,同时,对我国特有的孑遗树种杜仲(*Eucommia ulmoides*)开展了种质资源收集、多倍体育种、栽培、反式橡胶改性和加工以及基因组测序等研究^[7]。本研究团队多年来对杠柳(*Periploca sepium*)、多汁乳菇(*Lactarius volemus*)的转录组、基因组、蛋白质组进行了深入分析,在分离鉴定天然橡胶生物合成关键基因,培育替代植物或微生物生产高产量和高分子量的天然橡胶方面取得了重大进展^[8-11]。这些研究已经显露出其市场前景,对补充、替代目前以巴西橡胶树为唯一生产天然橡胶的这种典型的约束性资源将起到重要的促进作用。

在开展遗传改良培育天然橡胶生产替代植物或微生物的科研过程中,经常需要评价不同种质资源、不同株系或不同组织之间天然橡胶的主要成分聚异戊二烯含量的差异,数量较多而且在培育的早期阶段(如基因转化幼苗、菌丝体等)所能提供的材料通常较少,提取分离比较困难,定量分析误差比较大需要研发一种快速、少量、准确的检测方法。一般来说,从不同组织中提取天然橡胶主要包括3个过程:细胞壁的去除、胶的提取和纯化。其中细胞壁的去除方法包括机械破壁、超声辅助、酸或碱浸泡处理、

微生物发酵或生物酶解等,常用以上1种或多种方法结合的形式进行预处理。由于天然橡胶是长链的非极性烷烃聚合物,在非极性溶剂中具有良好的溶解性,因此氯仿、甲苯、石油醚等有机溶剂的萃取是比较理想的方法^[12-13]。目前,从植物材料中提取天然橡胶,特别是从杜仲材料中,用于在生产上大规模分离、提取反式-天然橡胶的方法报道较多^[13-18],而用于少量材料定量分析的提取方法报道甚少^[19-20],基本上沿用传统的索氏提取法^[21-22];对于提取物主要成分聚异戊二烯含量的定量分析方法,虽然有傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)或近红外光谱(fourier transform-near infrared spectroscopy, FT-NIR)^[19-20, 23-24]、裂解气相色谱-质谱(pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry, PyGC-MS)^[19, 22, 25]、核磁共振谱(nuclear magnetic resonance, NMR)^[26-27]等方法报道,但是重量分析法(gravimetric method)^[21, 28]仍不失为最简便的方法。重量分析法无需高昂的分析仪器,但需要精准的测定和校正方法,以纠正偏差;而其他方法不仅需要特殊的精密仪器,而且制样过程十分费时费力,不适合用于分析样品数量太多的定量测定^[29]。

本研究在原先采用索氏提取器提取的基础上^[21],进一步探讨采用2 mL微型离心管(样品0.5 g以下)的方法提取分析材料中的聚异戊二烯含量,通过标准品建立标准曲线校正提取得率、利用凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)分析分子量分布检验提取的完整性,为少量、简便、准确分析测定植物植株、组织材料或真菌子实体、菌丝体中的天然橡胶含量提供技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

所用材料为顺式聚异戊二烯标准品(CAS 104389-31-3,天然橡胶提取物)(美国Aldrich, 431257)、多汁乳菇子实体(湖南林科院谈著明教授鉴定)、杠柳枝条(本实验室提供)、杜仲果翅(西北农林科技大学苏印泉教授提供)。

所用试剂为氢氧化钠(西陇化工,分析纯)、无水乙醇(天津富宇精细化工,分析纯)、氯仿(美国Meridian,色谱纯);仪器为电子天平(美国奥豪斯, CP224C)、索氏提取器(银川伟博鑫生物科技, 250 mL)、水浴锅(天津泰斯特仪器, TK-98-II)、旋转蒸发仪(美国Eppendorf, Concentrator 5301)、真空干燥箱(上海一恒科学仪器, DZF-6021)、超声波清洗器(宁波新芝生物科技, SB5200)、凝胶渗透色谱仪(日本东曹, HLC-8320GPC)等。

1.2 方法

1.2.1 材料准备 用于建立标准曲线的材料,用电子天平准确称取顺式聚异戊二烯标准品 100 mg,溶于 2 mL 氯仿中配制成 50 mg/mL 母液,通过逐步稀释的方法,得到 6 种不同质量浓度梯度的标准品溶液,质量浓度依次为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 mg · mL⁻¹。这 6 种标准品溶液各取 1 mL 置于 2 mL 的微型离心管中,使用旋转蒸发仪将溶剂彻底蒸发,各离心管内的顺式聚异戊二烯标准品质量分别为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 mg。

用于样品分析的 4 种材料,即顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅,用液氮辅助充分研磨后,同样用电子天平分别称取 25、400、100、400 mg 置于 2 mL 的微型离心管内用于微型离心管提取;称取 0.5、10、1、10 g 置于烧杯中用于索氏提取器提取。

1.2.2 微型离心管提取 上述置于 2 mL 微型离心管内用于建立标准曲线的 6 种标准品材料以及用于微型离心管提取的 4 种样品分析材料,按照本试验原先采用索氏提取的方法步骤^[21],分别加入 10% 的氢氧化钠溶液 1 mL,沸水浴处理过程中振荡数次,1 h 后用去离子水冲洗沉渣至中性后,40 ℃低温烘干;加无水乙醇冲洗沉渣数次去除小分子物质,40 ℃低温烘干;加入 2 mL 有机溶剂氯仿后超声萃取(频率 40 Hz,功率 80%,温度 25 ℃)1 h,4 000 r/min 离心数次,收集提取液至新的微型离心管中。用 0.45 μm 有机滤膜过滤,真空干燥后得到精制的聚异戊二烯,精确称量。

1.2.3 索氏提取器提取 用于索氏提取器提取的 4 种样品分析材料,同样按照本试验原先采用索氏提取的方法步骤,分别加入 10% 的氢氧化钠溶液 30 mL,沸水浴处理过程中振荡数次,1 h 后用去离子水冲洗沉渣至中性后,40 ℃低温烘干;然后将样品装到滤纸筒后置于索氏提取器中,加入 150 mL 无水乙醇,进行沸水浴处理 6 h 去除小分子物质,40 ℃低温烘干;继续将烘干后的样品装到滤纸筒后置于索氏提取器中,加入 150 mL 氯仿,80 ℃水浴处理 6 h。利用旋转蒸发仪将提取液蒸干,加入 5 mL 氯仿润洗数分钟后,将提取液转移至离心管中,4 000 rpm 离心数次,收集提取液。真空干燥后得到精制的聚异戊二烯,精确称量。

1.2.4 聚异戊二烯提取得率计算与校正 材料中的聚异戊二烯提取得率计算方法如下:

$$x = w_1 / w_0 \times 100\%$$

式中: x 为聚异戊二烯实际提取得率(%); w_1 为聚异戊二烯提取精制后的实际提取质量(g); w_0 为样

品的质量(g)。

2 mL 微型离心管提取材料后,根据 6 种顺式聚异戊二烯标准品作成的标准曲线(如 $y = ax + b$; a , b 为常数),将聚异戊二烯提取得率 x 值代入,得到聚异戊二烯提取得率的校正值 y 。

1.2.5 分子量分布分析 将 4 种样品分析材料顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅,采用微型离心管、索氏提取器提取得到的精制聚异戊二烯,以及 1 份没有经过任何提取的顺式聚异戊二烯标准品,分别称取 20 mg,加入 10 mL 氯仿(流动相),在密封和遮光条件下充分溶解后,通过微孔(0.45 μm)有机滤膜过滤,配制成 2 mg/mL 的样品溶液。利用凝胶渗透色谱仪进行分子量及分布分析。

分子量标准品为 TSKgel standard Polystyrene (日本东曹,0006476;分子量 $5.89 \times 10^2 \sim 1.11 \times 10^6$ 12 种),用电子天平准确称取每种分子量标准品 20 mg,加入氯仿,与上述同样方法配制成 1 mg/mL 标准溶液。凝胶渗透色谱分析条件为本实验室确定的方法^[10,21],即系统:日本东曹 HLC-8320GPC Eco-SEC WorkStation;色谱柱:PL gel MIXED-B(10 μm,7.5 × 300 mm);流动相:氯仿;流速:0.8 mL/min;柱温:40 ℃;检测器:示差折光检测器(RI);进样量:样品溶液 70 μL(2 mg/mL),分子量标准溶液 10 μL(1 mg/mL);洗脱时间:30 min。

根据凝胶渗透色谱分子量标准品曲线以及样品的保留时间,从仪器系统中导出每个样品的数均分子量(\bar{M}_n)、重均分子量(\bar{M}_w)、分子量分布指数(\bar{M}_w/\bar{M}_n)以及微分分子量分布数据,在 Excel 中绘制成分子量分布曲线图。

2 结果与分析

2.1 微型离心管提取顺式聚异戊二烯标准品的提取得率和标准曲线的建立

6 种顺式聚异戊二烯标准品,质量分别为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 mg,采用 2 mL 微型离心管提取,经氢氧化钠碱性溶液处理、乙醇处理、有机溶剂氯仿超声萃取后干燥得到的聚异戊二烯,质量上有所变化。质量较多的 50、25 mg 标准品,提取后的质量略有损失,分别为 43.07、22.13 mg;而质量较少的 3.125、1.562 5 mg 标准品,提取后的质量有些增加,分别为 3.20、1.84 mg,提取得率在 86.13%~117.76%(表 1)。

将微型离心管提取前后的 6 种顺式聚异戊二烯标准品质量量,作成标准曲线, $y = 1.172\ 9x - 0.595\ 4$,拟合优度的 R^2 值达到了 0.999 7,说明标

准曲线对观测值的拟合程度较好(图 1)。该标准曲线可用于 2 mL 微型离心管提取样品分析材料时,对聚异戊二烯提取率的校正。

2.2 微型离心管与索氏提取器提取样品分析材料的聚异戊二烯提取率比较

将顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅 4 种样品分析材料,同样采用 2 mL 微型离心管提取聚异戊二烯,利用上述建立的标准曲线 $y=1.172\ 9x-0.595\ 4$,计算各样品聚异戊二烯提取率的校正值,该值与索氏提取器提取的聚异戊二烯提取率无显著差异,4 种样品分析材料采用微型离心管、索氏提取器提取的聚异戊二烯,校正后提取率分别为 96.54%、0.61%、0.75%、4.82%与 96.53%、0.62%、0.73%、4.80%(表 2)。

表 1 微型离心管提取顺式聚异戊二烯标准品的提取率

Table 1 Extraction rate of *cis*-polyisoprene standard extracted by microtube method

标准品质量/mg	50.00	25.00	12.50	6.25	3.13	1.56
实际提取质量/mg	43.07±1.66	22.13±0.34	11.39±0.50	6.07±0.12	3.20±0.31	1.84±0.08
实际提取率(%)	86.13±3.32	88.53±1.35	91.15±4.00	97.07±1.92	102.40±9.78	117.76±5.33

注:数据为平均值±标准误, $n=3$ 。

表 2 微型离心管和索氏提取器提取样品材料的提取率

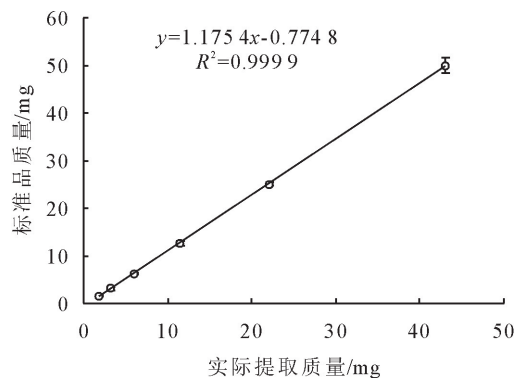
Table 2 Extraction rate of polyisoprene extracted from several samples by microtube and Soxhlet methods

	微型离心管提取				索氏提取器提取			
	标准品	多汁乳菇	杠柳枝条	杜仲果翅	标准品	多汁乳菇	杠柳枝条	杜仲果翅
样品质量/mg	25.00	397.13	444.00	95.50	50.00	10 137.23	10 309.90	996.33
实际提取质量/mg	22.13±0.34	2.70±0.12	3.53±0.28	4.65±0.08	43.73±1.30	56.46±3.14	68.09±0.41	43.30±0.34
校正提取质量/mg	24.13±0.38	2.42±0.13	3.35±0.32	4.60±0.09	48.27±1.45	62.49±3.51	75.48±0.46	47.79±0.38
校正提取率(%)	96.54±1.51	0.61±0.03	0.75±0.03	4.82±0.14	96.53±2.90	0.62±0.03	0.73±0.01	4.80±0.05
\bar{M}_n	6 677	32 896	35 601	177 137	7 752	34 982	41 077	182 092
\bar{M}_w	44 035	82 263	103 560	767 054	58 054	74 139	108 543	728 819
\bar{M}_w/\bar{M}_n	6.60	2.50	2.91	4.33	7.49	2.12	2.64	4.00

注:数据为平均值±标准误, $n=3$; \bar{M}_n ,数均分子量; \bar{M}_w ,重均分子量; \bar{M}_w/\bar{M}_n ,分子量分布指数。

2.3 微型离心管与索氏提取器提取样品分析材料的聚异戊二烯分子量分布比较

将 4 种样品分析材料顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅采用 2 mL 微型离心管和索氏提取器提取的聚异戊二烯,以及 1 份没有经过任何提取的顺式聚异戊二烯标准品,利用凝胶渗透色谱仪进行分子量分布分析。结果显示,采用 2 mL 微型离心管和索氏提取器提取,或者没有经过任何提取的顺式聚异戊二烯标准品,3 条分子量分布曲线基本吻合(表 2、图 2A);杜仲果翅采用 2 mL 微型离心管和索氏提取器提取后,2 条分子量分布曲线也基本吻合(表 2、图 2D),说明 2 种方法提取的聚异戊二烯分子量大小及分布无显著差异。而多汁乳菇子实体和杠柳枝条采用 2 mL 微型离心管提取,比索氏提取器提取得到的聚异戊二烯,



注:数据为平均值±标准误, $n=3$ 。

图 1 微型离心管提取顺式聚异戊二烯标准品的标准曲线

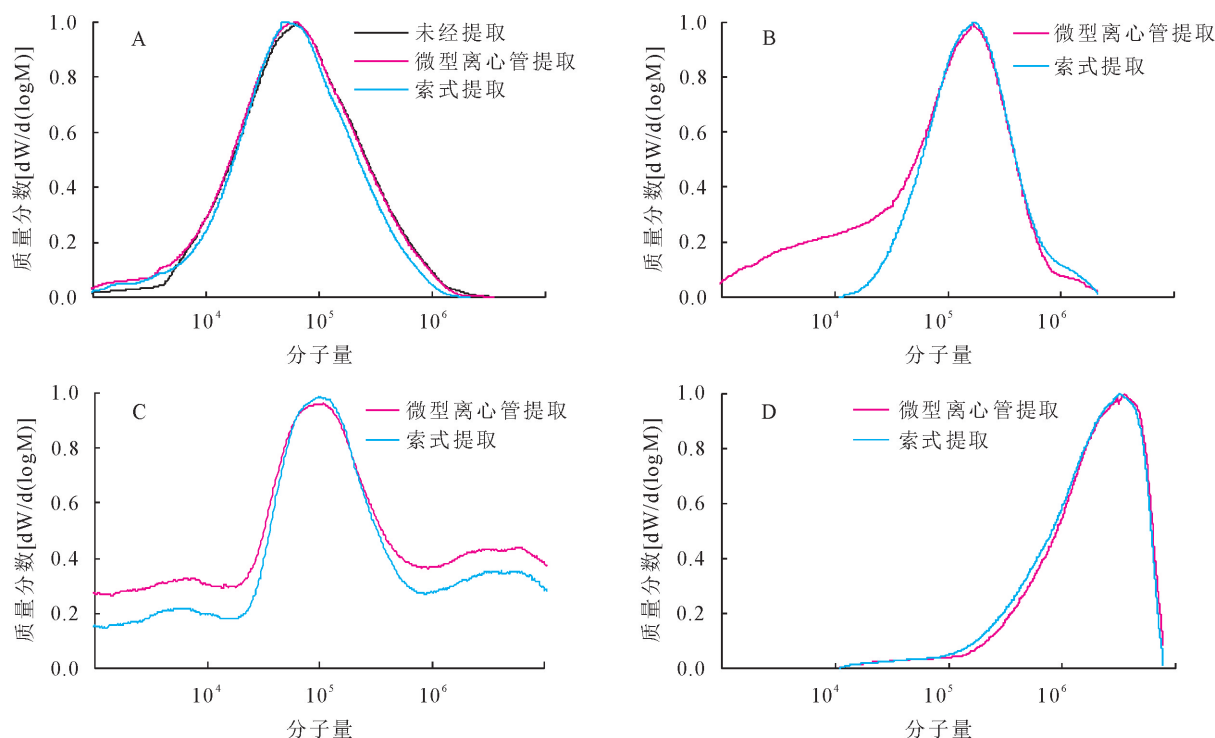
Fig. 1 Standard curve of *cis*-polyisoprene standard extracted by microtube method

分子量分布稍宽一些,特别是低分子部分 $10^3 \sim 10^4$,说明聚异戊二烯含量比较低的样品,采用 2 mL 微型离心管的提取更加充分,低分子量的聚异戊二烯也可以提取到(表 2、图 2B、图 2C)。

3 结论与讨论

本研究分别利用微型离心管与索氏提取器提取顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅 4 种样品分析材料,并通过每次提取时利用顺式聚异戊二烯标准品建立标准曲线校正,分析比较两种方法的提取率和分子量分布情况,得到以下结论。

(1)本研究建立的利用 2 mL 微型离心管从少量材料中提取分析天然橡胶的主要成分聚异戊二烯的方法,与索氏提取器提取相比,更加快速、简便。



注: A. 顺式聚异戊二烯标准品; B. 多汁乳菇子实体; C. 杠柳枝条; D. 杜仲果翅。

图2 微型离心管与索氏提取器提取样品分析材料的聚异戊二烯分子量分布

Fig. 2 Molecular weight distribution of polyisoprene extracted from several samples by microtube and Soxhlet methods

目前从植物或者微生物不同株系、不同组织等少量材料提取分析天然橡胶的主要成分聚异戊二烯含量的报道较少,基本上沿用传统的索氏提取法,利用溶剂回流和虹吸原理,使样品分析材料连续不断地被溶剂抽提萃取,通常需要10 h以上^[21-22];利用索氏提取器需要的样品分析材料较多,一般需要数克以上,而且其冷凝管、提取器、回收烧瓶等部件会残留一部分提取物质,对于材料较少(0.5 g以下)、数量较多(上百个样品)的样品分析,不太实用。该2 mL微型离心管提取方法是在原先采用索氏提取器的基础上^[21],将<0.5 g的样品材料置于2 mL的微型离心管内,仍然用氢氧化钠碱性溶液沸水浴处理,溶解材料中的角质层、细胞壁纤维等。随后采用乙醇处理,分离叶绿素、色素等醇溶性小分子物质,使沉淀物逐渐转为白色,最后再利用低极性的有机溶剂氯仿配合超声波进行溶解、分离、萃取,得到精制的聚异戊二烯。由于所用材料少,从预处理到充分萃取结束,均在1个微型离心管内进行,只需2~3 h,而且提取物质也不易流失或残留到其他提取器部件上。

(2) 利用2 mL微型离心管提取分析天然橡胶的主要成分聚异戊二烯的含量,可以通过每次提取时利用顺式聚异戊二烯标准品建立的标准曲线得到有效校正。

由于2 mL微型离心管提取方法所用的样品材

料少,在氢氧化钠碱性溶液处理、乙醇处理、有机溶剂氯仿萃取过程中,聚异戊二烯流失或者在提取过程中有机溶剂萃取不充分,都会对测定结果造成比较大的误差。我们将不同质量的顺式聚异戊二烯标准品材料,与样品分析材料同时进行氢氧化钠处理、氯仿萃取,建立标准曲线。从6种顺式聚异戊二烯标准品的提取结果看,提取得率介于86.13%~117.76%,质量多的标准品,提取后的质量略有损失;而质量较少的标准品,可能前处理时有些物质残留,或者萃取后干燥不易彻底,提取后的质量有些增加,这方面的提取得率误差,在每次提取时可以通过制作标准曲线得到校正。

(3) 利用2 mL微型离心管提取分析天然橡胶的主要成分聚异戊二烯,可以通过凝胶渗透色谱进行分子量分布分析来判断提取方法是否充分。

由于聚异戊二烯是由异戊二烯单元(isoprene unit, C_5H_8)聚合形成的,分子量分布在 $10^3 \sim 10^6$ 的混合物^[30],所以对从分析样品提取到的聚异戊二烯进行凝胶渗透色谱分子量分布分析,可以判断提取方法是否得当。提取越充分,则分子量分布就越宽,提取得率也越高。从分别利用2 mL微型离心管与索氏提取器提取4种样品分析材料,即顺式聚异戊二烯标准品、多汁乳菇子实体、杠柳枝条、杜仲果翅的提取得率和分子量分布看,2种提取方法的差别不大,说明采用2 mL微型离心管微量提取分析植

物或者微生物材料中的聚异戊二烯含量的方法可行、结果可信。

天然橡胶的主要成分 1,4-聚异戊二烯,因异戊二烯单元的聚合方式不同,分为顺式(*cis*-)和反式(*trans*-)2 种同分异构体^[31-32]。本研究选择的样品分析材料多汁乳菇子实体和杠柳枝条为顺式 1,4-聚异戊二烯,而杜仲果翅为反式 1,4-聚异戊二烯,具有代表性。该研究可用于测定植物植株、组织材料或真菌子实体、菌丝体中的顺式或反式-1,4-聚异戊二烯橡胶含量,特别是分析材料较少、数量较多的样品。

参考文献:

- [1] 刘少军,张京红,李伟光,等. 中国橡胶树主产区产能能力分布特征研究[J]. 西北林学院学报,2018,33(3):137-143.
LIU S J,ZHANG J H,LI W G,*et al.* Characteristics of rubber potential productivity in Chinese main rubber plantation areas [J]. Journal of Northwest Forestry University,2018,33(3):137-143. (in Chinese)
- [2] 吴春太,李维国,黄华孙. 近年来国内外橡胶树种质资源与育种方法研究新进展 [J]. 西北林学院学报,2013,28(2):118-124,146.
WU C T,LI W G,HUANG H S. Research progresses on *Hevea* germplasm resources and breeding methods[J]. Journal of Northwest Forestry University,2013,28(2):118-124,146. (in Chinese)
- [3] 金华斌,田维敏,史敏晶. 我国天然橡胶产业发展概况及现状分析[J]. 热带农业科学,2017,37(5):98-104.
- [4] 刘锐金,莫业勇,杨琳,等. 我国天然橡胶产业战略地位的再认识与发展建议[J]. 中国热带农业,2022,104(1):13-18.
- [5] VAN BEILEN J B,POIRIER Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber[J]. Trends in Biotechnology,2007,25:522-529.
- [6] LIN T,XU X,RUAN J,*et al.* Genome analysis of *Taraxacum koksaghyz* rosin provides new insights into rubber biosynthesis[J]. National Science Review,2018,5:78-87.
- [7] WUYUN T N,WANG L,LIU H M,*et al.* The hardy rubber tree genome provides insights into the evolution of polyisoprene biosynthesis[J]. Molecular Plant,2018,11:429-442.
- [8] CHEN R,GYOKUSEN M,NAKAZAWA Y,*et al.* Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Periploca sepium* Bunge [J]. Plant Biotechnology,2010,27(2):173-181.
- [9] IEDA T,NAKAMURA T,INOUE Y M,*et al.* Rubber transferase activity and rubber particle sizes derived from *Lactarius* mushrooms[J]. Sian Journal of Chemistry,2013,25(9):5185-5188.
- [10] 刘祥. 杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯生物合成关键基因 *PsIPPI* 和 *PsCPT* 的克隆及功能分析[D]. 银川:宁夏大学,2017.
- [11] 路国栋,刘祥,刘慧,等. 杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯生物合成关键基因 *PsIPPI* 和 *PsCPT* 的克隆及功能分析[J]. 基因组学与应用生物学,2022,41(5):1079-1090.
LU G D,LIU X,LIU H,*et al.* Cloning and functional identification of the key genes *PsIPPI* and *PsCPT* for *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis in *Periploca sepium* [J]. Genomics and Applied Biology,2022,41(5):1079-1090. (in Chinese)
- [12] WEI X,PENG P,PENG F,DONG J. Natural polymer *Eucommia ulmoides* rubber;a novel material[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2021,69(13):3797-3821.
- [13] 谢玲,张学俊,季春,等. 杜仲胶提取与规模化生产现状及其产业发展面临的问题[J]. 生物化学工程,2021,55(4):34-41.
XIE L,ZHANG X J,JI C,*et al.* Current situation in extraction and large-scale production of *Eucommia ulmoides* gum and its development issues[J]. Biomass Chemical Engineering,2021,55(4):34-41. (in Chinese)
- [14] 张学俊,周礼红,张国发,等. 杜仲叶和皮中杜仲胶提取的研究[J]. 贵州工业大学学报:自然科学版,2001,30(6):11-14.
ZHANG X J,ZHOU L H,ZHANG G F,*et al.* Extraction of gutta-percha from the bark and the leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. Journal of Guizhou University of Technology: Natural Science Edition,2001,30(6):11-14. (in Chinese)
- [15] 陆志科,谢碧霞,杜红岩. 杜仲胶提取方法的研究[J]. 福建林学院学报,2004,24(4):353-356.
- [16] 张学俊,王庆辉,宋磊,等. 不同温度条件下溶剂循环溶解-析出提取杜仲胶[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(6):1062-1066.
- [17] 丁奋霞. 利用微生物发酵提取杜仲胶的研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学,2011.
- [18] 贺扬洁,季春,陶茜,等. 用复配酶生物酶解提取原生态杜仲胶丝工艺研究[J]. 合成橡胶工业,2020,43(4):280-285.
- [19] TAKENO S,BAMBA T,NAKAZAWA Y,*et al.* Quantification of *trans*-1,4-polyisoprene in *Eucommia ulmoides* by fourier transform infrared spectroscopy and pyrolysis-gas chromatography massspectrometry[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2008,105:355-359.
- [20] LIU G S,ZHANG X,ZHANG T X,*et al.* Determination of the content of *Eucommia ulmoides* gum by variable temperature fourier transform infrared spectrum [J]. Polymer Testing,2017,63:582-586.
- [21] 刘祥,刘淑瑛,虎娟,等. 超声波辅助 3 种溶剂分析测定杜仲胶含量[J]. 热带作物学报,2017,38(4):723-727.
LIU X,LIU S Y,HU J,*et al.* Eucommia-rubber analysis from *Eucommia ulmoides* Oliver using three solvents assisted sonication [J]. Chinese Journal of Tropical Crops,2017,38(4):723-727. (in Chinese)
- [22] CHEN R,NAKAZAWA Y,HARADA Y,*et al.* Overexpression of isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance *trans*-polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. BMC Biotechnology,2012,12:78.
- [23] MARINHO J R D,MONTTEIRO E E C. Analysis of natural *cis*- and *trans*-polyisoprene mixtures by near-infrared spectrophotometry [J]. Polymer Testing,2000,19:667-672.
- [24] TAKENO S,BAMBA T,NAKAZAWA Y,*et al.* A high-throughput and solvent-free method for measurement of natural polyisoprene content in leaves by fourier transform near infrared spectroscopy [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2008,106:537-540.

闽西青冈木材结构特征研究方面的空白,为闽西青冈这一特有乡土树种的保护、发展及其木材合理利用提供基础理论依据,丰富了木材识别鉴定的基础理论,具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 刘茂松,洪必恭. 中国壳斗科的分布格局类型分析[J]. 南京林业大学学报,1999,23(5):18-22.
LIU M S, HONG B G. The analysis of distribution pattern of fagaceae in China[J]. Journal of Nanjing Forestry University, 1999, 23(5): 18-22. (in Chinese)
 - [2] 成俊卿. 中国木材志[M]. 北京:中国林业出版社,1992.
 - [3] 周伟,夏念和. 我国壳斗科植物资源——尚待开发的宝库[J]. 林业资源管理,2011(2):93-96,100.
 - [4] 李志辉,李柏海,祁承经,等. 我国南方珍贵用材树种资源的重要性及其发展策略[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(11):1-8.
LI Z H, LI B H, QI C J, et al. Studies on importance of valuable wood species resources and its development strategy[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(11): 1-8. (in Chinese)
 - [5] 赵寿云. 不同基质对闽西青冈扦插生根的影响[J]. 安徽农学通报,2019,25(9):60-61.
 - [6] 卫梅,谢燕燕,陈剑峰,等. 闽西青冈组培苗生根培养及其内源激素含量变化的测定[J]. 宜春学院学报,2016,38(9):90-94.
 - [7] 卫梅. 闽西青冈组织培养体系的建立及其机理研究[D]. 福州:福建农林大学,2016.
 - [8] 邱坚,郭梦麟. 木材显微技术[M]. 北京:木材显微技术,2016:57-61.
 - [9] 黄广华,金浩,陈瑞英,等. 交趾黄檀和奥氏黄檀木材解剖构造比较[J]. 西北林学院学报,2020,35(6):228-233,312.
HUANG G H, JIN H, CHEN R Y, et al. Comparison of Wood Anatomical Structures between *Dalbergia cochinchinensis* and *Dalbergia oliveri*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(6): 228-233, 312. (in Chinese)
 - [10] 黄广华,陈瑞英,陈居静. 巴里黄檀木材解剖构造、颜色及接触角研究[J]. 西北林学院学报,2019,34(2):234-239.
HUANG G H, CHEN R Y, CHEN J J. Anatomical structural, color and contact angle of *Dalbergia bariensis* wood[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2019, 34(2): 234-239. (in Chinese)
 - [11] 陈家宝,盛佳乐,齐文玉,等. 黄槿木材结构特征的分析[J]. 西北林学院学报,2020,35(1):257-260,267.
CHEN J B, SHENG J L, QI W Y, et al. Analysis of structure characteristics for *Hibiscus tiliaceus* wood [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(1): 257-260, 267. (in Chinese)
 - [12] 刘一星,赵广杰. 木材学[M]. 北京:中国林业出版社,2012.
 - [13] IAWA COMMITTEE. IAWA list of microscopic features for hardwood identification[J]. IAWA Bulletin New Series, 1989, 10(3):219-332.
 - [14] 解庆,刘志红. 桦木科 8 树种木材解剖特征比较[J]. 东北林业大学学报,2021,49(11):100-104.
XIE Q, LIU Z H. Comparison on wood anatomy of eight species (Betulaceae)[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2021, 49(11): 100-104. (in Chinese)
 - [15] 陈居静. 六种酸枝类木材结构特征及相关属性的研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
-
- (上接第 228 页)
- [25] TAKENO S, BAMBA T, NAKAZAWA Y, et al. High-throughput and highly sensitive analysis method for polyisoprene in plants by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74: 13-17.
 - [26] MARINHO J R D, MONTEIRO E E C. Structural characterization of wild rubbers, microstructure of the rubber extracted from ficus elastica by ^{13}C -NMR[J]. Polymer Testing, 2000, 19: 429-434.
 - [27] CASTIGNOLLES P, GRAF R, PARKINSON M, et al. Detection and quantification of branching in polyacrylates by size-exclusion chromatography (SEC) and melt-state ^{13}C NMR spectroscopy[J]. Polymer, 2009, 50: 2373-2383.
 - [28] PENG J N, SU Y Q, SUN Q S, et al. Content and molecular-weight distribution of EU rubber from *Eucommia ulmoides* leaves [J]. Forest Products Journal, 2007, 57: 65-67.
 - [29] GUO T, LIU Y, WEI Y, et al. Simultaneous qualitation and quantitation of natural *trans*-1,4-polyisoprene from *Eucommia ulmoides* Oliver by gel permeation chromatography (GPC) [J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1004: 17-22.
 - [30] TANGPAKDEE J, TANAKA Y, WITIYSUWANNAKUL R, et al. Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis* [J]. Phytochemistry, 1996, 42: 353-355.
 - [31] ASAWATRERATANAKUL K, ZHANG Y W, WITITSUWANNAKUL D, et al. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding *cis*-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis* [J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270: 4671-4680.
 - [32] NAKAZAWA Y, BAMBA T, TAKEDA T, et al. Production of *Eucommia*-rubber from *Eucommia ulmoides* Oliv. (hardy rubber tree)[J]. Plant Biotechnology, 2009, 26: 71-79.