

氯仿法提取蜡梅花被片表层蜡质的研究

方子义, 赵世萍, 宋晓惜, 王倩丽, 赵凯歌, 陈龙清

(华中农业大学, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘 要:以山蜡梅、“金蓓”素心蜡梅及“扬州黄”素心蜡梅为试材, 使用扫描电子显微镜观察, 研究了氯仿加热不同时间处理对蜡梅盛开期花被片蜡质提取效果的影响。结果表明: 山蜡梅花被片蜡质提取最适条件为氯仿 60℃ 处理 30 s, 表层蜡质含量约为 1 034.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 素心蜡梅“金蓓”和“扬州黄”花被片蜡质提取最适条件均为氯仿 60℃ 处理 20 s, “金蓓”素心蜡梅花被片表层蜡质含量约为 651.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, “扬州黄”素心蜡梅花被片表层蜡质含量约为 1 057.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

关键词:氯仿法; 蜡梅; 花被片; 蜡质含量

中图分类号:Q 949.747.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0096-04

植物表层蜡质对植物起到关键的保护作用, 它是植物抵抗外界胁迫的最外层保护结构, 可减少非气孔性水分散失、抵御病虫害的侵入, 还可有效减少紫外辐射、冷冻害等环境伤害^[1-3], 因而植物表层蜡质含量是衡量植物抗逆性的重要指标。

植物表层蜡质的主要成分有脂肪族化合物、环状化合物以及甾醇类化合物等^[1]。不同物种之间蜡质的含量及成分差异较大, 从而提取植物表层蜡质的方法也各不相同。植物表皮蜡质最常用的提取方法是采用氯仿、正己烷等有机溶剂进行浸泡、提取, 氯仿提取蜡质效果优于正己烷^[4-6]。但细胞内脂溶物质也同时容易被有机溶剂所提取出, 因此在提取植物表层蜡质时应控制好浸泡时间, 一般为几秒至 1 min 左右^[7-8]。前人研究表明, 常温下氯仿或正己烷浸泡 30 s 拟南芥, 即可去除叶片上的表皮蜡质^[9], O'toole 等^[10]将水稻叶片浸泡在氯仿中 6 s, 提取到的蜡质含量仅有 0.1~1.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。周小云等^[11]通过常温法、加热法和常温加热结合法分别用氯仿、正己烷处理水稻叶片对比得出, 氯仿加热法处理去除蜡质效果最佳, 以此为基础设计该试验。

蜡梅(*Chimonanthus praecox* (L.) Link) 另名黄梅, 是中国传统名花之一, 为我国所特产, 花期 12 月至翌年

3 月, 远在展叶前开放。蜡梅素有“三耐”(耐寒、耐旱、耐剪)和“三不”(冻不死、旱不死、砍不死)之称, 具有很强的抗逆性。与蜡梅同属的山蜡梅(*Chimonanthus nitens* Oliv.) 为常绿灌木, 花期为 10~12 月, 也有较强抗寒能力。一般认为, 植物体中应对外界胁迫能力最差、外界逆境抗性最弱的为花器官, 但是蜡梅花盛开于严寒时期, 因而推测二者花被片较强的抗逆能力很可能与其表层富含蜡质有关。鉴于观赏植物花器官鲜见相关文献, 因此该研究采用不同时间处理对比氯仿加热法提取花被片蜡质, 优化蜡梅、山蜡梅花被片蜡质提取方法, 以期今后为蜡梅花被片及其它植物花被片的蜡质研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山蜡梅盛开期花被片于 2011 年 11 月 30 日采自华中农业大学园林树木学标本园; 素心蜡梅的 2 个品种“金蓓”素心蜡梅(*Chimonanthus praecox* ‘Jinbei’)和“扬州黄”素心蜡梅(*Chimonanthus praecox* ‘Yangzhou-huang’)盛开期花被片于 2011 年 12 月 29 日采自华中农业大学校园。

1.2 试验方法

根据周小云等^[11]稻叶表皮蜡质提取方法处理蜡梅花被片, 并做如下改进。处理前将近 0.2 g 的样品进行精确称取记录, 用画图法计算其表面积^[10]。将植物材料分别置于 30 mL 60℃ 氯仿中, 10、20、30、40、50、60 s 不同时间梯度处理样品, 每个处理设 3 次重复, 待提取液自然挥发后精确称重。氯仿加热处理前后重量之差为蜡质质量, 蜡质含量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) = 蜡质质量(μg) / 表面积(cm^2)。通过 JSM-6390/LV 扫描电子显微镜观察氯仿加热处理后花被片表层结构变化。

材料采集后立即按上述方法进行处理, 处理后放于

第一作者简介:方子义(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为园林植物种植资源创新及利用。E-mail:fangziyi163@126.com.

责任作者:赵凯歌(1975-), 女, 博士, 副教授, 中国花协荷花分会副秘书长, 现主要从事我国特有园林植物和新优园林植物的种质资源调查收集及分子与形态评价和离体保存与利用分子育种和常规育种手段进行园林植物资源的种质创新等工作。E-mail:zhao-kaige@mail.hzau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31272207;30800762)。

收稿日期:2013-09-10

2.5%戊二醛固定液固定通过 JSM-6390/LV 扫描电子显微镜对盛开花被片表层蜡质进行观察。

蜡梅花被片扫描电子显微镜样品制备具体操作步骤:清洗:用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)对样品进行清洗。固定:用 2.5%戊二醛前固定样品 24 h。脱水:对样品进行乙醇系列 30%-50%-70%-85%-95%-100%(2 次)逐级脱水,每级 10~15 min,脱水应干净。中间液代换:先使用醋酸(异)戊酯:乙醇=1:1 的混合液浸泡样品 10 min,再用醋酸异戊酯浸泡 10 min,期间适当轻柔摇动。临界点干燥:代换后的样品转移至样品篮,将样品篮放入预冷的 SPI SUPPLIES13200-AB 临界点干燥仪样品室内,盖好室盖后注入液体二氧化碳,以浸没样品为标准,先升温至 15℃加热 10 min,再升温至 35℃使其气化,待液体全气化后将气慢慢放尽。粘贴样品:用导电胶粘贴固定样品。使用日本 NTC JFC-1600 离子溅射仪镀膜后对其入镜观察。

2 结果与分析

2.1 氯仿热处理对山蜡梅、“金萼”素心蜡梅以及“扬州黄”素心蜡梅盛开花被片表层蜡质提取效果影响

不同时间梯度 60℃氯仿热处理山蜡梅、“金萼”素心蜡梅以及“扬州黄”素心蜡梅盛开花被片后,发现处理时间的长短对蜡质提取结果有一定影响。

由表 1 可知,30 s 处理结果与 10、20、40 s 相比差异显著。结合实际称量结果,30 s 时提取蜡质含量最大,认为 30 s 为山蜡梅最佳热处理时间。

表 1 氯仿热处理对山蜡梅盛开花被片表层蜡质提取效果

Table 1 Effects of hot chloroform treatments on the extraction of petal surface wax of *C. nitsens* Oliv

处理时间 Treatment time/s	蜡质含量 Wax content/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
10	674.33±50.88 cB
20	804.66±38.22 bcAB
30	1 034.33±99.77 aA
40	778.00±43.33 bcAB
50	923.66±17.77 abA
60	923.33±77.55 abAB

由表 2 可知,各处理结果之间差异不显著。结合实际称量结果,20 s 处理时蜡质提取含量最大,认为 20 s 为“金萼”素心蜡梅最佳热处理时间。

由表 3 可知,各处理结果之间差异不显著。结合实际称量结果,20 s 处理时蜡质提取含量最大,认为 20 s 为“扬州黄”素心蜡梅最佳热处理时间。

由表 1~3 可知,山蜡梅花被片处理 30 s 时,蜡质测得含量达到峰值 1 034.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,在此之后蜡质测得含量减小,随着处理时间的延长,在 50~60 s 时蜡质测得含量又达到一个新的峰值 923.33~923.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。素

心蜡梅的 2 个品种同时表现出此类现象,即在处理 20 s 时,“金萼”和“扬州黄”花被片蜡质测得含量别达到峰值 651.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 1 057.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,随后又进入蜡质测得含量较小阶段,在 60 s 处理后蜡质测得含量分别达到另一峰值 643.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 1 207.00 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。山蜡梅处理数据分析结果具有显著差异,而素心蜡梅的 2 个品种处理数据结果均不具有显著差异,这可能与物种间差异具有较大相关性。

表 2 氯仿热处理对“金萼”素心蜡梅盛开花被片表层蜡质提取效果

Table 2 Effects of hot chloroform treatments on the extraction of petal surface wax of *C. praecox* ‘Jinbei’

处理时间 Treatment time/s	蜡质含量 Wax content/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
10	563.33±84.22 aA
20	651.33±48.88 aA
30	632.33±19.77 aA
40	586.33±26.33 aA
50	597.66±68.88 aA
60	643.66±89.55 aA

表 3 氯仿热处理对“扬州黄”素心蜡梅盛开花被片表层蜡质提取效果

Table 3 Effects of hot chloroform treatments on the extraction of petal surface wax of *C. praecox* ‘Yangzhouhuang’

处理时间 Treatment time/s	蜡质重量 Wax content/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
10	1 023.00±76.00 aA
20	1 057.33±49.22 aA
30	598.00±92.00 aA
40	778.00±35.33 aA
50	927.00±86.66 aA
60	1 207.00±45.33 aA

2.2 山蜡梅、“金萼”素心蜡梅以及“扬州黄”素心蜡梅盛开花被片氯仿热处理后表层结构变化

不同时间梯度 60℃氯仿热处理山蜡梅、“金萼”素心蜡梅以及“扬州黄”素心蜡梅盛开花被片后,对各花被片下表皮结构进行了扫描电子显微镜观察,发现处理前后存在一定差异(图 1~3)。

由图 1~3 可知,通过扫描电子显微镜观察结果可知,随时间延长,氯仿高温处理山蜡梅 30 s,素心蜡梅 20 s 时,花被片表层蜡质已接近完全去除,所以蜡质测得含量达到一个峰值。但延长处理时间导致去除的蜡质或其它物质又重新粘附、聚集到花被片表层,所以导致蜡质测得含量下降,当处理时间达到 60 s 时,花被片表层被高温的氯仿充分处理,甚至损坏,表层细胞结构遭到破坏,溶剂能快速进入细胞内进而导致细胞内部蜡质层分、脂类物质等胞内物质释放,导致处理前后称取之差增大。

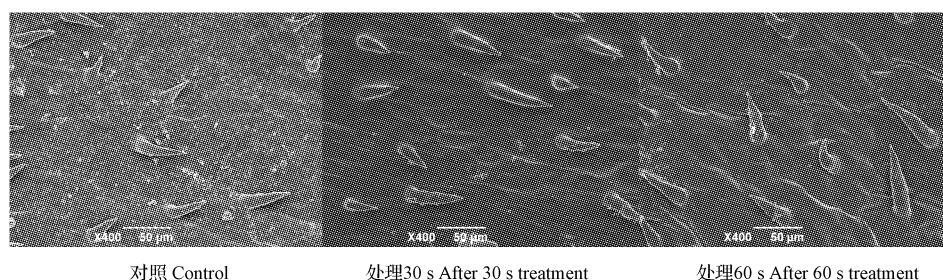


图1 山蜡梅下表皮层观察结果

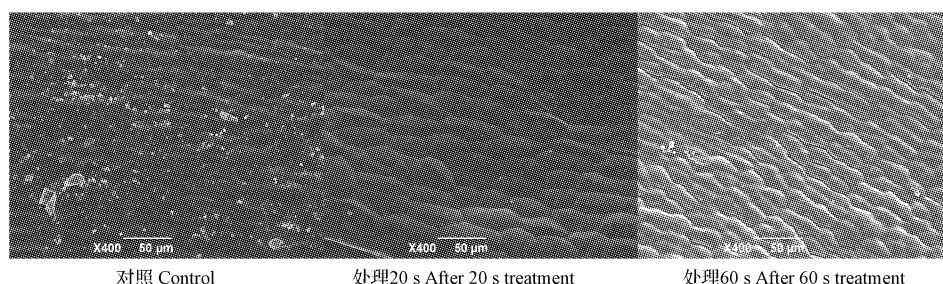
Fig. 1 The SEM results of the lower epidermis of *C. nitens* Oliv

图2 “金蓓”素心蜡梅花被片下表层观察结果

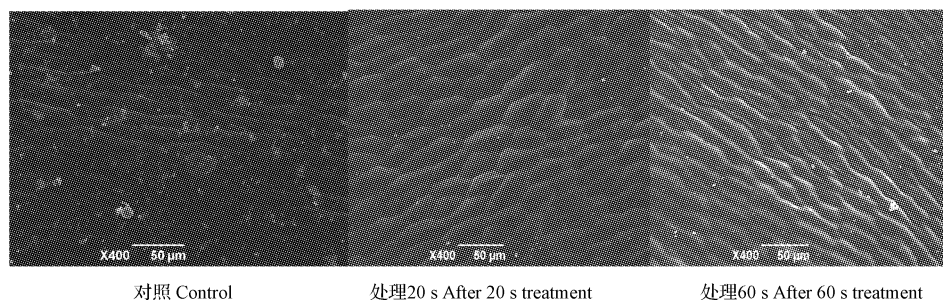
Fig. 2 The SEM results of the lower epidermis of *C. praecox* 'Jinbei'

图3 “扬州黄”素心蜡梅花被片下表层观察结果

Fig. 3 The SEM results of the lower epidermis of *C. praecox* 'Yangzhouhuang'

因此认为,虽然 60℃氯仿处理花被片 60 s,山蜡梅和素心蜡梅花被片蜡质测得含量达到一个新的峰值,但是提取到的很可能是含有细胞内脂类等其它物质并非纯净的表层蜡质。短时间加热处理花被片表层蜡质,能够使表层蜡质快速、充分溶于氯仿有机溶剂中,可有效避免长时间处理导致细胞内部脂类释放。与前人研究植物叶片等结果相比,为得到准确的蜡质含量,蜡梅花被片表层蜡质氯仿加热萃取时间应控制在 30 s 内,这是植物花器官表层提取蜡质的合理时间。

山蜡梅盛花期花被片表层蜡质含量约为 1 034.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,“金蓓”素心蜡梅盛花期花被片表层蜡质含量约为 651.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,“扬州黄”素心蜡梅盛花期花被片表层蜡质含量约为 1 057.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,这说明蜡梅不同种之间盛花期花被片表层蜡质含量有所差异,同种不同品种之间盛花期花被片表层蜡质含量也不同,这和

前人的研究结果相一致,有研究表明,不同植物表层含有的蜡质含量大不相同,同一植物不同组织含量也不相同,即使同一组织不同时期表层蜡质的含量也有较大区别^[12-14]。同时,植物蜡质提取物会因组织的成熟度的不同而有差异,Chikaraishi 等^[15]发现槭树科不同品种间新、老叶片合成的蜡质产物在含量和组成上有较大差异。

3 讨论与结论

该试验结果表明,山蜡梅盛花期花被片表层蜡质有效去除的条件为 60℃氯仿处理 30 s,氯仿热处理时间梯度对蜡梅盛花期花被片表层蜡质有效去除影响差异不大。花器官相对于植物叶片蜡质提取的时间较短,原因在于花器官是植物体中极为脆弱的部分,长时间的高温氯仿处理对于花器官细胞结构伤害较大。为进一步验证蜡质提取的效果,后续试验将采用透射电子显微镜和

花被片横切后扫描电子显微镜观察进行验证,将使用气-质谱联方法检测蜡质成分与各组分含量,并对蜡梅花被片表层蜡质的提取方法做进一步优化。

已有众多研究者证明植物表皮蜡质含量对抗旱性、抗逆性起到积极作用^[16-20]。相对于周小云^[11]测定水稻叶片表层蜡质含量为 49.99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,雒珺瑜等^[21]研究不同棉花品种(系)叶片不同龄期表层蜡质得到的最高蜡质含量 20.87 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 等已测得植物表层蜡质含量相比,蜡梅盛开期花被片表层蜡质含量非常高,如此高的蜡质含量对于蜡梅花被片超强的抗胁迫能力是一个很好的解释,为研究蜡梅冬季开花机理和观赏植物、作物的抗性提供了条件。同时,该试验结论也为植物花器官表层蜡质的提取提供了参考依据。

参考文献

- [1] Kolattukudy P E. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. G Kerstiens, ed, Plant Cuticles [M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1996: 83-108.
- [2] Mariani C, Wolters M. Complex waxes [J]. Plant Cell, 2000, 12 (10): 1795-1798.
- [3] Siebera P, Schordereta M, Rysera U, et al. Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusion [J]. Plant Cell, 2000, 12 (5): 721-737.
- [4] Chen X, Goodwin S M, Boroff V L, et al. Cloning and characterization of the WAX 2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production [J]. Plant Cell, 2003, 15: 1170-1185.
- [5] Zheng H Q, Rowland O, Kunst L. Disruptions of the Arabidopsis enoyl-coa reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis [J]. Plant Cell, 2005, 17 (5): 1467-1481.
- [6] Jetter R, Kunst L, Samuels A L. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer M, Müller C (eds) Biology of the plant cuticle [M]. Blackwell, Oxford, 2006: 145-181.
- [7] Rhee Y, Hlousek A, Radojicic A, Ponsamuel J, et al. Epicuticular

wax accumulation and fatty acid Elongation activities are induced during leaf development of leeks [J]. Plant Physiology, 1998, 116(3): 901-911.

- [8] Kurata T, Kawabata-Awai C, Sakuradani E, et al. The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in Arabidopsis [J]. Plant Journal, 2003, 36: 55-66.
- [9] Broun P, Poindexter P, Osborne E, et al. WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of sciences of the USA, 2004, 101: 4706-4711.
- [10] O'toole J C, Cruz R T, Shiber J N. Epicuticular Wax and Cuticular Resistance in Rice [J]. Physiol Plant, 1979, 47: 239-244.
- [11] 周小云, 陈信波, 徐向丽, 等. 稻叶表皮蜡质提取方法及含量的比较 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(3): 273-276.
- [12] Post B D. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants [J]. Annu Reviews, 1996, 47: 405-430.
- [13] Jetter R, Schaffer S. Chemical composition of the prunus laurocerasus leaf surface. dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development [J]. Plant Physiology, 2000, 126: 1725-1737.
- [14] Knight T G, Wallwork M A B, Sedgley M. Leaf epicuticular wax and cuticle ultrastructure of four Eucalyptus species and their hybrids [J]. International Journal of Plant Sciences, 2004, 165: 27-36.
- [15] Chikaraishi Y, Naraoka H. Carbon and hydrogen isotope variation of plant biomarkers in a plant-soil system [J]. Chemical Geology, 2006, 231: 190-202.
- [16] 孙吉雄. 草坪学 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 358.
- [17] 黄玲, 张正斌, 崔玉亭, 等. 小麦叶片蜡质含量与水分利用效率和产量的关系 [J]. 麦类作物学报, 2003, 23(3): 41-44.
- [18] Samdur M Y, Manivel P, Jain V K, et al. Genotypic differences and water-deficit induced enhancement in epicuticular wax load in peanut [J]. Crop Science, 2003, 43(4): 1294-1299.
- [19] 邢全, 石雷, 刘保东, 等. 蒙古莢蒾叶片解剖结构及其在城市景观和环境保护中的生态学意义 [J]. 植物学通报, 2004, 21(2): 195-200.
- [20] 张娟, 张正斌, 谢惠民, 等. 小麦叶片水分利用效率及相关生理性状的关系研究 [J]. 作物学报, 2005, 31(12): 1593-1599.
- [21] 雒珺瑜, 崔金杰, 黄群. 棉花叶片中叶绿素、蜡质含量和叶片厚度与抗绿盲蚜的关系 [J]. 植物保护学报, 2011, 8(4): 320-326.

Study on the Extraction of Waxy from the Tepals Surface of Chimnanthus by Chloroforme

FANG Zi-yi, ZHAO Shi-ping, SONG Xiao-xi, WANG Qian-li, ZHAO Kai-ge, CHEN Long-qing

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology of Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract: Taking *Chimonanthus nitens* Oliv, *Chimonanthus praecox* 'Jinbei' and *Chimonanthus praecox* 'Yangzhouhuang' as materials, the treated samples were observed by scanning electron microscope (SEM) for establishing the method of the petal surface wax extraction during their full bloom period by using hot chloroform treatments. The results showed that the treatment with chloroform of 60°C for 30 s was optimal for the petal surface wax extraction of *C. nitens* Oliv, and its petal surface wax content during the full bloom period was about 1 034.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. The treatment with chloroform of 60°C for 20 s were optimal both for the samples of *C. praecox* 'Jinbei' and of *C. praecox* 'Yangzhouhuang'. Their petal surface wax content during the full bloom period were about 651.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ extracted from *C. praecox* (L.) Link and 1 057.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ from *C. praecox* 'Yangzhouhuang'.

Key words: chloroform method; *Chimonanthus nitens*; petal; wax content