

# 不同品种大豆叶片表皮蜡质提取后的扫描电镜观察

李娜,王丽娜,金勋,芮海英,潘红丽,金铃,李泽宇,于吉东

(黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316)

**摘要:**以抗线 11 和黑农 48 两个大豆品种的成熟叶片为材料,用氯仿和正己烷两种溶剂,采用常温法和加热法提取大豆叶片表皮蜡质,对脱蜡后的叶片进行扫描电镜观察。结果显示加热法效果好于常温法。采用常温法,两种溶剂都不能将大豆叶片表皮蜡质提取干净,仍有少量絮状或颗粒状蜡质残留,但氯仿的提取效果好于正己烷;采用加热法,两种溶剂不同处理时间均能将叶片表皮蜡质完全提取干净,处理时间对蜡质的提取结果有明显影响,加热 30 s 时叶片表皮细胞均发生不同程度的变形。通过扫描电镜观察得出以氯仿为溶剂,加热 60℃、处理时间 15 s 为大豆叶片简单可行的脱蜡方法。

**关键词:**大豆;表皮蜡质;氯仿;正己烷;扫描电镜

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.03.0540

## SEM Observation after Extraction of Epicuticular Wax on Soybean Leaves

LI Na, WANG Li-na, JIN Xun, RUI Hai-ying, PAN Hong-li, JIN Ling, LI Ze-yu, YU Ji-dong

(Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

**Abstract:** Extraction of epicuticular wax on mature soybean leaves (Kangxian 11 and Heinong 48) are studied comparatively with solution CHCl<sub>3</sub> and solution n-hexane with room-temperature method and high-temperature method. The microstructure observed by scanning electronic microscope (SEM) showed that high-temperature method was better than room-temperature method. Epicuticular wax was not completely extracted with room temperature method with both solution CHCl<sub>3</sub> and solution n-hexane, there was still a small amount of flocculent or granular waxy residue, but the extraction effect of chloroform was better than n-hexane. Epicuticular wax was completely extracted with high-temperature method with both solution CHCl<sub>3</sub> and solution n-hexane, extraction time was found significantly affecting the extracted wax quality, high-temperature treatment 30 s, leaf epidermal cells had undergone varying degrees of deformation. In the present study, 60℃, 15 s with solution CHCl<sub>3</sub> was the effective and simple extraction method for epicuticular wax on soybean leaves by SEM.

**Keywords:** Soybean; Epicuticular wax; Chloroform; n-hexane; SEM

植物蜡质层由位于角质层外的外层蜡质和深嵌在角质层中、连接表皮和细胞壁的内层蜡质两部分构成<sup>[1]</sup>,是植物应对外界环境胁迫的第一道屏障,能够防止植物体内非气孔性失水、抑制细菌滋生、防止昆虫咬食、诱导器官组织发育、抵抗辐射等逆境的影响<sup>[2-4]</sup>。不同植物,甚至同一种植物不同部位、不同生长时期及叶片的成熟度不同,表层蜡质含量和成分会有很大差别<sup>[5-6]</sup>,植物表皮蜡质主要是由脂肪族化合物、环状化合物以及甾醇类化合物等组成的不同结晶体,根据官能团的差异又分为烃类、醇类、醛类、酸类及酯类等,有机溶剂能有效提取蜡质中的化学成分;而蜡质的化学成分是决定抗逆程度的一个重要因子<sup>[7-8]</sup>,因此,有效提取植物表层蜡质是研究蜡质成分的前提,常用方法是采用

有机溶剂在常温下浸泡,溶剂主要为氯仿、正己烷或者是几种有机溶剂的混合物,为避免提取到细胞内的脂溶性成分,表皮蜡质的提取时间一般控制在几秒到几分钟之内。目前国内对植物表皮蜡质的研究多集中于小麦、水稻等禾本科植物<sup>[9-12]</sup>,对大豆表皮蜡质的研究鲜有报道。

抗线 11 为黑龙江省西部大豆产区主栽品种,黑农 48 为第二积温带大豆产区常规品种,本研究以抗线 11 和黑农 48 为试验材料,对大豆叶片表皮蜡质进行了不同试剂、不同提取方法的比较,通过扫描电镜观察表皮蜡质的提取效果,旨在找到简单高效的大豆叶片表皮蜡质的提取方法,为大豆抗逆研究奠定基础。

收稿日期:2014-06-16  
第一作者简介:李娜(1983-),女,硕士,研究实习员,主要从事生物技术研究。E-mail:linashmilu@126.com。  
通讯作者:金勋(1962-),男,博士,副研究员,主要从事植物遗传育种研究。E-mail:jinxun6268@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

抗线 11 和黑农 48 均由黑龙江省农业科学院大庆分院抗线大豆研究中心提供,取开花期第 4、5 片成熟叶片作试验材料。

氯仿;正己烷;冷冻干燥仪 ES-2030 (HITACHI);离子溅射镀膜仪 E-1010 (HITACHI);扫描电子显微镜 S-3400N (HITACHI)。

1.2 方法

1.2.1 蜡质提取 常温法:称取开花期第 4、5 片新鲜成熟叶片 1 g,立即于室温下分别置于 30 mL 氯仿或正己烷中,分别在 15、30、60 s 后马上取出。

加热法:根据两种溶剂的沸点,选择稍低于沸点的温度提取蜡质。称取开花期第 4、5 片新鲜成熟叶片 1 g,立即分别置于 30 mL 60℃ 氯仿或 67℃ 正己烷中,15、30 s 后马上取出。提取方法参考 Kwan 等和周小云等<sup>[13-14]</sup>的方法。

1.2.2 电镜观察 取同时期未处理的和经以上各种方法提取表皮蜡质后的大豆叶片,在叶脉两侧的中部将新鲜叶片切成边长约 5 mm 的小方块,立即放入盛有 2.5% 戊二醛的小瓶中固定(1.5 h),用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液清洗 4 次,每次 10 min,然后用 30%、50%、60% 和 70% 的乙醇依次梯度脱水,每次 15 min,脱水至 70% 乙醇溶液后将材料转入纯叔丁醇溶液中静置 20 min(期间更换 2 次叔丁醇溶液),最后将盛有叔丁醇溶液的小瓶放入有冰块的冰盒中(4℃),15 min 后取出,置真空干燥器中抽真空干燥,待小瓶内的冰晶挥发干后取出粘台,在离子镀膜仪中溅射镀金膜,在扫描电子显微镜上观察拍照。

2 结果与分析

2.1 氯仿提取抗线 11 和黑农 48 叶片表皮蜡质的扫描电镜观察结果

如图 1 和图 2 所示,未经处理的大豆表皮细胞形状不规则,细胞彼此嵌合排列,叶片表皮蜡质呈棒状或片状晶体,除气孔周围外,覆盖在整个叶片表面。抗线 11 和黑农 48 大豆叶片两个品种采用氯仿处理,除蜡效果差别不大,常温处理 15 s 后,叶片表皮蜡质晶体的基本结构已经被破坏成丝络状;常温处理 30 s,表皮上的丝络状蜡质晶体变成少量的不规则絮状结构;常温处理 60 s,表皮上只有少量不规则蜡质颗粒,可以清晰地看到表皮细胞的嵌合结

构;氯仿加热 60℃ 处理 15 s 和 30 s,表皮蜡质都已经完全脱掉。

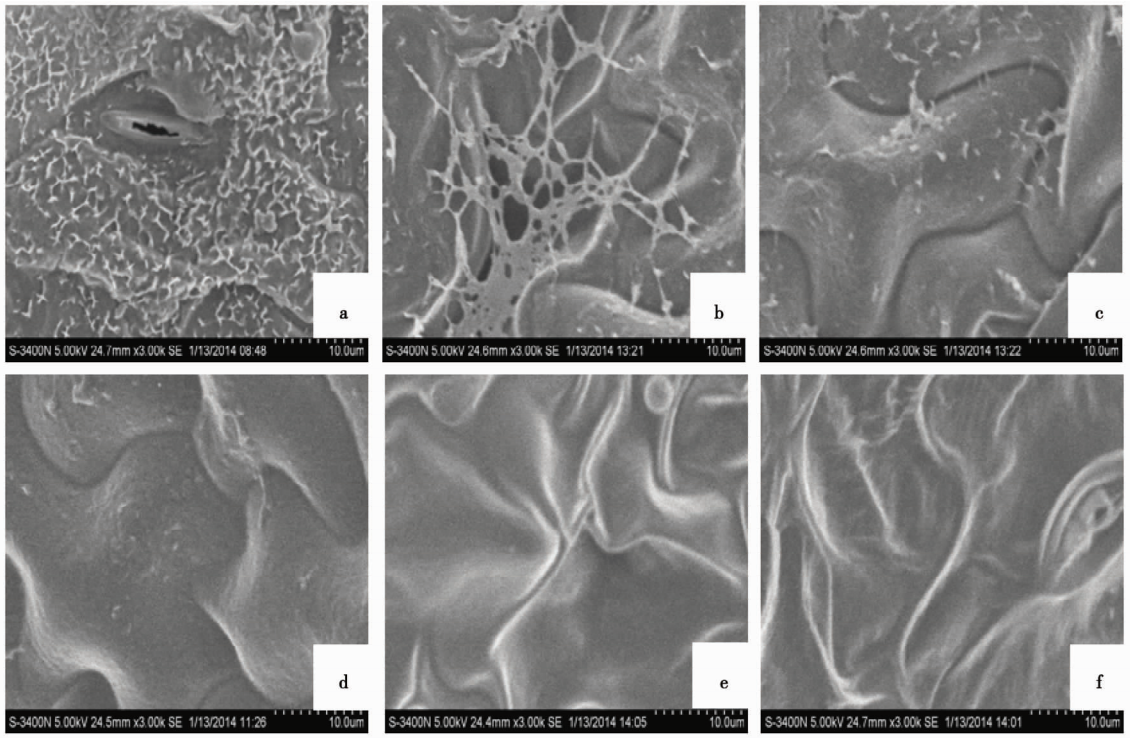
2.2 正己烷提取抗线 11 和黑农 48 叶片表皮蜡质的扫描电镜观察结果

采用正己烷常温处理抗线 11 和黑农 48 叶片 15 s 后,叶片表皮蜡质晶体排列比较整齐有规则,结构基本没有变化;常温处理 30 s,蜡质晶体的排列变得稀疏,但仍较有规则;常温处理 60 s,表皮也只出现数量不多的絮状结构,表皮细胞形状稍有变化;正己烷加热 67℃ 处理 15 s 和 30 s,表皮蜡质都已经完全脱掉(图 3 和图 4)。

利用氯仿和正己烷两种溶剂,采用不同处理时间和条件提取两个大豆品种叶片表皮蜡质,扫描电镜结果显示,加热法效果好于常温法;与黑农 48 相比,抗线 11 的表皮细胞结构似乎更紧凑,在有机溶剂中更不易变形。采用常温法,两种溶剂都不能将大豆叶片表皮蜡质去除干净,仍有少量絮状或颗粒状蜡质残留,但氯仿的提取效果好于正己烷。采用加热法,两种溶剂不同处理时间都能将叶片表皮蜡质完全提取干净;提取时间对蜡质提取效果有显著影响,高温下(氯仿 60℃ 或正己烷 67℃)提取超过 30 s,导致细胞内脂溶性成分渗出<sup>[14]</sup>。因此,本研究得出以氯仿为溶剂,加热 60℃、处理时间 15 s 为大豆叶片表皮蜡质简单可行的提取方法。

3 结论与讨论

不同植物表皮蜡质的结构、含量及成分不同,提取方法也不尽相同。王学东<sup>[15]</sup>认为亚麻叶片采用丙酮为溶剂,羊草叶片采用乙酸异戊酯为溶剂时除蜡效果最好。杨艳青<sup>[16]</sup>用扫描电镜观察苹果果实表皮蜡质的提取效果,发现采用氯仿 45 s 洗脱 3 次效果较好。周小云等<sup>[14]</sup>认为以氯仿为溶剂、60℃ 30 s 为水稻叶片表皮蜡质简单有效的提取方法。本研究参考 Kwan 等<sup>[13-14]</sup>对大豆和水稻叶片表皮蜡质的提取方法,分别设置了常温与加热两组处理,无论是抗线 11 还是黑农 48,常温法均不能将大豆叶片表皮蜡质提取干净。加热法两个处理虽然都可以把表皮蜡质去除,但处理时间越长对提取的蜡质成分影响越大,所以本研究通过扫描电镜检测,确定以氯仿为溶剂、60℃ 处理 30 s 为大豆叶片表皮蜡质简单有效的提取方法。含有蜡质的氯仿和正己烷置于通风橱内,待有机试剂自然挥发后送至西北农林大学检测蜡质成分及含量,再对检测结果做进一步分析。



a:对照;b:常温 15 s;c:常温 30 s;d:常温 60 s;e:加热 15 s;f:加热 30 s。下同。

a;CK;b:Room-temperature 15 s;c:Room-temperature 30 s;d:Room-temperature 60 s;e:High-temperature 15 s;f: High-temperature 30 s. The same below.

图 1 氯仿提取抗线 11 大豆叶片表皮蜡质后的扫描电镜观察图(3 000 ×)

Fig. 1 Microstructure of epicuticular wax on Kangxian 11 leaves extracted with chloroform(3 000 ×)

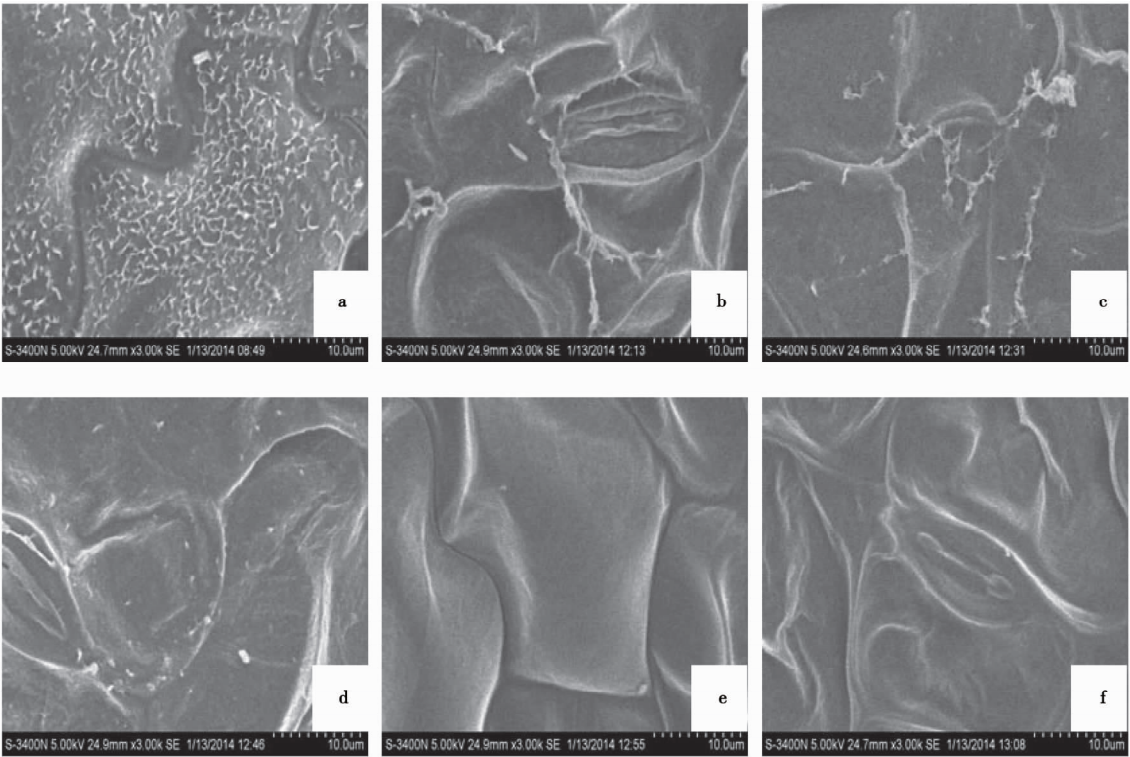


图 2 氯仿提取黑农 48 大豆叶片表皮蜡质后的扫描电镜观察图(3 000 ×)

Fig. 2 Microstructure of epicuticular wax on Heinong48 leaves extracted with chloroform(3 000 ×)



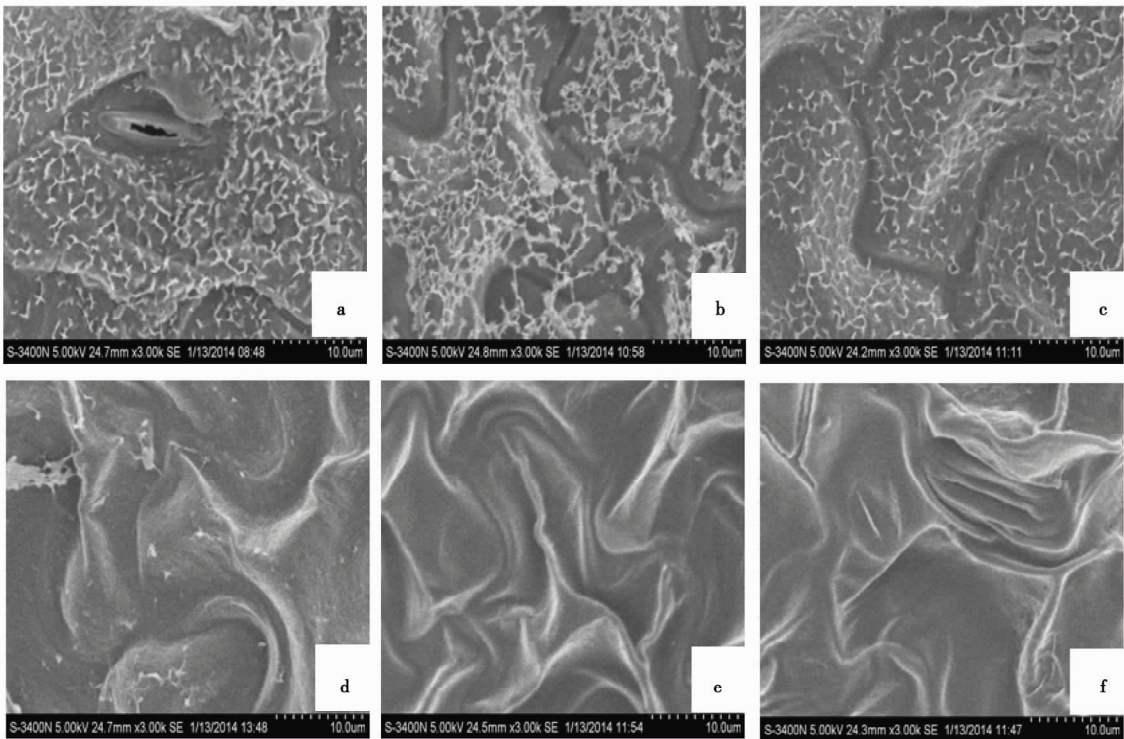


图 3 正己烷提取抗线 11 叶片表皮蜡质后的扫描电镜观察图(3 000 × )  
Fig. 3 Microstructure of epicuticular wax on Kangxian11 leaves extracted with n-hexane(3 000 × )

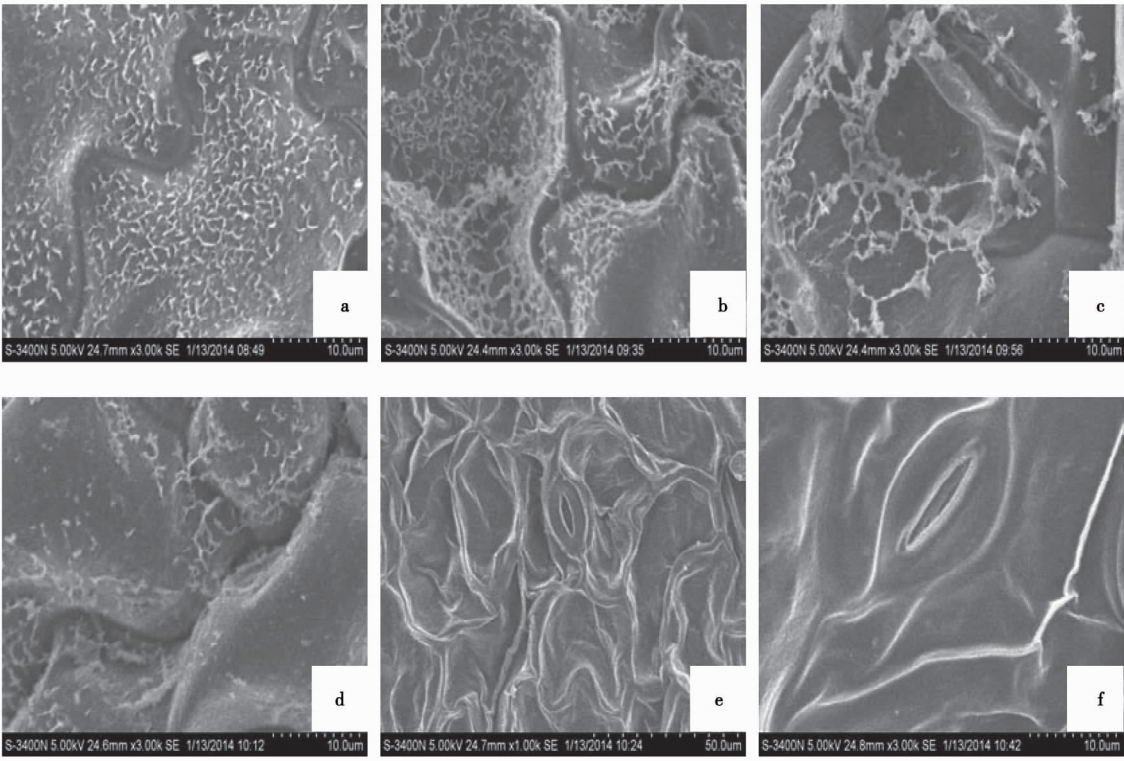


图 4 正己烷提取黑农 48 叶片表皮蜡质后的扫描电镜观察图(3 000 × )  
Fig. 4 Microstructure of epicuticular wax on Heinong48 leaves extracted with n-hexane(3 000 × )

参考文献

[1] Eglinton G,Hamilton R J. Leaf epicuticular waxes[J]. Science, 1967,156: 1322-1335.

[2] Schreiber L, Skrabs M, Hartmann K D, et al. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks[J]. Planta,2001 ,214(2) :274-282.

[3] Kunst L,Samuels A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax[J]. Progress in Lipid Research. 2003 ,42(1) :51-80.

[4] 李婧婧,黄俊华,谢树成. 植物蜡质及其与环境的关系[J]. 生态学报,2011, 31 (2) : 565-574. ( Li J J, Huang J H, Xie S

H. Plant wax and its response to environmental conditions and over-view[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(2): 565-574. )

[5] Xu S J, Jiang P A, Wang Z W, et al. Crystal structures and chemical composition of leaf surface wax depositions on the desert moss *syntrichia caninervis* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(6): 723-730.

[6] Gonzalez A, Ayerbe L. Effect of terminal water stress on leaf epicuticular wax load, residual transpiration and grain yield in barley [J]. *Euphytica*, 2010, 172(3): 341-349.

[7] 顾俊, 王飞, 张鹏, 等. 植物叶表皮蜡质的生物学功能[J]. *江苏农业学报*, 2007, 23(2): 144-148. ( Gu J, Wang F, Zhang P, et al. Biological function of epicuticular wax[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 23(2): 144-148. )

[8] 李灵之, 马杰, 向建华, 等. 植物角质层内外蜡质的差异及其与抗逆性的关系[J]. *植物生理学报*, 2011, 47(7): 680-684. ( Li L Z, Ma J, Xiang J H, et al. Composition differences of epicuticular and intracuticular wax layers and the relationship between cuticle and plant stress tolerance [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(7): 680-684. )

[9] 姬生栋, 王育水, 贾振杰, 等. 不同产量水平小麦叶片表面超微结构初探[J]. *河南农业科学*, 2003(9): 4-7. ( Ji S D, Wang Y S, Jia Z J, et al. Structure preliminary study on blade surface ultramicroscopic of spring wheat with different yield level [J]. *Henan Agricultural Sciences*, 2003(9): 4-7. )

[10] 吴杏春, 林文雄, 黄忠良. UV2B 辐射增强对两种不同抗性水稻叶片光合生理及超显微结构的影响[J]. *生态学报*, 2007, 27(2): 554-563. ( Wu X C, Lin W X, Huang Z L. Influence of enhanced ultraviolet 2B radiation on photosynthetic physiologies and ultrastructure of leaves in two different resistivity rice cultivars [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(2): 554-563. )

[11] 邵云, 姜丽娜, 李万昌, 等. 砷、铅胁迫对小麦幼苗毒害效应及叶片下表皮扫描电镜观察[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(1): 133-138. ( Shao Y, Jiang L N, Li W C, et al. Toxic effects of as and Pb to wheat seedling and scanning electron-microscopic observation on nether epidermis of leaves[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(1): 133-138. )

[12] 高臣, 刘俊渤, 常海波, 等. 硅对水稻叶片光合特性和超微结构的影响[J]. *吉林农业大学学报*, 2011, 33(1): 1-4. ( Gao C, Liu J B, Chang H B, et al. Effects of silicon on rice leaf photosynthesis and ultrastructure[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2011, 33(1): 1-4. )

[13] Kwan Su Kim, Si Hyung Park, Dong Kwan Kim, et al. Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine Max* [L.] Merr.) [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2007, 168(3): 307-316.

[14] 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. ( Zhou X Y, Chen X B, Xu X L, et al. On comparison of extraction methods of epicuticular wax and content of rice leaves [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2007, 33(3): 273-276. )

[15] 王学东, 崔琳, 向文胜. 植物叶片表面蜡质除去方法的研究[J]. *东北农业大学学报*, 1999, 30(4): 412-414. ( Wang X D, Cui L, Xiang W S, Studies method for the remdval plants leaves surface waxiness[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 1999, 30(4): 412-414. )

[16] 杨艳青. 苹果果实表皮蜡质结构观察与组分分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013. ( Yang Y Q. The structure observation and component analysis of apple fruit epicuticular wax [D]. Yangling: Northwest Agricultural and Forestry University, 2013. )

(上接第 529 页)

[3] 陈立杰, 陈井生, 魏峰, 等. 放线菌及其代谢物对植物线虫的生物防治研究进展 [C]. *中国线虫学研究(第二卷)*, 2008(2): 270-275. ( Chen L J, Chen J S, Wei F, et al. Review of the actinomycetes and metabolites against plant nematodes [C]. *Nematology Research in China*, 2008(2): 270-275. )

[4] Dicklow M B, Acosta N, Zuckerman B M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19(2): 159-173.

[5] Chubachi K, Furukawa M, Fukuda S, et al. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita* [J]. *Biocontrol Science*, 2002, 7(1): 25-29.

[6] Zeng Q, Huang H, Zhu J, et al. A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002 [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(5): 1107-1111.

[7] 陈立杰, 陈井生, 段玉玺, 等. 防治大豆胞囊线虫生防放线菌的初步筛选研究[J]. *植物保护*, 2008, 34(3): 116-119. ( Chen L J, Chen J S, Duan Y X, et al. Screening of actinomycetes against soybean cyst nematode [J]. *Plant Protection*, 2008, 34(3): 116-119. )

[8] 陈立杰, 陈井生, 董健, 等. 放线菌次生代谢产物对不同来源大豆胞囊线虫 J2 毒性的研究[J]. *大豆科学*, 2008, 27(4): 637-640. ( Chen L J, Chen J S, Dong J, et al. Toxicity of second-ary metabolites of actinomycetes on heterodera glycines J2 [J]. *Soybean Sicece*, 2008, 27(4): 637-640. )

[9] 陈立杰, 陈井生, 郑雅楠, 等. 大豆胞囊线虫生防放线菌 Snea253 的鉴定及对线虫的抑制作用[J]. *中国生物防治*, 2009, 25(1): 66-69. ( Chen L J, Chen J S, Zheng Y N, et al. Identification of the strain Snea253 and effects of metabolites of actinomycetes on mortality of soybean cyst nematode [J]. *China Biological Control*, 2009, 25(1): 66-69. )

[10] 陈井生, 陈立杰, 刘大伟, 等. 放线菌 Snea49 的种类鉴定及对胞囊线虫的活性评价大豆科学, 2010, 29(4): 663-665. ( Chen J S, Chen L J, Liu D W, et al. Identification of the strain Snea49 and evaluation for nematocidal activity against soybean cyst nematode [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(4): 663-665. )

[11] Samac D A, Kinkel L L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp [J]. *Plant and Soil*, 2001, 235(1): 35-44.

[12] Ruanpanun P, Laatsch H, Tangchitsomkid N, et al. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematocidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(6): 1373-1380.

[13] János Bérdy. Bioactive microbial metabolites [J]. *Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26.