综 述 Review

脱水导致种子和花粉细胞膜变化的生物热力学研究进展

程红焱1* 宋松泉2

('中国科学院植物研究所,北京100093;²中国科学院西双版纳热带植物园,云南勐腊666303)

摘要: 膜系统是引起脱水敏感细胞的损伤和死亡的原 初位点之一, 该文综述了近年来对以下各问题以及它 们之间的关系的研究进展: (1)膜相变; (2)膜系统和生 物大分子受到的压力; (3)玻璃态的形成及其部位; (4) 造成玻璃态形成的溶质分子的大小对膜相变的影响; (5)两性物质在细胞质水相和膜脂脂相间的再分配。旨 在为如何有效地监控种子和花粉寿命和最大程度地减 少种子和花粉细胞的衰老损伤, 预测种质保存的最佳 贮藏条件和种质寿命, 以便及时更换保存样本等方面 的研究提供新的思路。

关键词:种子;花粉;膜相变;玻璃态;两性物质;
脱水
中图分类号:Q945

保存植物遗传多样性的主要方式之一是保存种 子和花粉,长期保持种子和花粉的生活力对于种 质的保存至关重要,在给定条件下如何有效地监 控种子寿命和最大程度地减少种子和花粉细胞的衰 老损伤,预测保存寿命以便及时更换保存样本的 研究是必不可少的。Ellis 和 Roberts (1980)提出的 预测种子寿命的经验公式已被广泛接受,但是并 不适合于预测在低温和低含水量情况下的种子的寿 命(Vertucci 等 1994)。近年来 Vertucci 等基于热力 学的考虑提出了解释种子贮藏性质的新学说,认 为劣变化学反应所必需的水的可用性是防止干种子 老化劣变的因素,因而水势可能是能够更好地指 示最佳贮藏条件的指标。在较低温度下贮藏的种 子的含水量并不是越低越好,随着贮藏温度的降 低,最佳含水量值提高(Vertucci 等 1994, Buitink 等 1998, Liang 和 Sun 2000)。目前种子库在 18℃ 贮藏时建议种子的含水量为 5%, Buitink 等(2000a, b,d) 观察到种子含水量保持在 7% 时种子的贮藏寿 命会更长,在0℃以下贮藏时种子不宜干燥到太 低的含水量。尽管如此,种质保存寿命的预测以 及最佳贮藏条件的确定上仍然存在争议 (Ellis 等 1990)。种子和花粉在贮藏过程中会发生许多物理 和化学变化,包括细胞完整性的破坏、酶活性的 丧失、脂质氧化和其他老化劣变反应。许多证据 表明这些变化受细胞的水分与环境温度两者的交互 作用的影响以及细胞膜是否由流动相转变为凝胶相 有直接关系,本文对近年来在种质保存中脱水引 起的细胞膜变化的研究进展作一综述。

1 膜相变温度的改变与膜结构的变化

膜相变对种子和花粉这样的低水分生物组织细胞的正常结构和功能的保持是至关重要的。例如在低温下花粉细胞膜处于凝胶相状态时,此时吸水会造成细胞膜的可见损伤甚至细胞死亡,而在较高温度下细胞膜处于流动相状态,吸水不会引起细胞膜的损伤(Hoekstra等 1997)。在种子脱水过程中,细胞膜由流动相转变为凝胶相,在吸胀回水过程中,细胞膜由凝胶相转变为流动相,如果由凝胶相转变为流动相的膜相变过程过长,种子的活力会降低。

一般认为膜系统是脱水引起脱水敏感细胞的损 伤和死亡的原初位点,种子和花粉细胞膜组分受 脱水影响的程度,体现了种子和花粉对脱水的敏 感度。电镜观察结果表明,脱水造成细胞膜结构 的变化,包括细胞膜结构蛋白被排出膜脂丰富区 域以及膜磷脂的双层排列状态变为六角形排列状 态,从而破坏了细胞膜的半透性。脱水造成膜结 构的另一种变化是磷脂从流动相变为凝胶相,同 样不利于细胞膜的渗透调节功能的执行。

细胞膜的主要成分为磷脂,有凝胶状态(凝胶 相)和液晶状态(流动相)两种存在方式,在一定温 度下两种状态会发生相互转变,转变时的临界温

中国科学院知识创新工程重要方向项目(No.KSCX2-SW-117)资助。 *E-mail:hycheng@ns.ibcas.ac.cn; Tel:010- 62591431-6049

²⁰⁰³⁻⁰⁷⁻¹⁸ 收到, 2003-11-10 接受。

度称之为相变温度(T_m)。除含水量外有许多因素 影响磷脂的相变温度(T_m),如双层磷脂中混杂的 其他组分等(McMullen 等 1994, Wolfe 和 Bryant 1999, Binder 和 Gawrisch 2001, Melanie 等 2002)。以纯磷脂在充足水分下的相变温度 T。作为 脱水引起的脂相变温度(T_m)改变的初始值(Koster等 2000)。随着水分的丢失, T_m 会从 T_o 逐渐升高 (Webb 等 1993), 当 T_m比初始值 T_o 高出 60℃时, 磷脂处于无水状态。Hoekstra 等(1992)发现花粉细 胞在脱水过程中细胞膜的 Tm 有类似的变化,即细 胞膜在失水过程中T_m会逐渐升高。在脱水过程中 磷脂Tm的升高可以量化低水分时膜上受到的水合 的物理力量对膜以及膜上大分子的作用的变化。 膜的组成、温度、水合状态以及周围溶液的成分 和状态,决定着膜脂是处于凝胶相或流动相,即 膜的相变依赖于温度的变化、膜的组分及其分布 和平衡状态、膜组份间的相互作用以及物理束缚 力等因素。

2 膜系统受到的压力变化

极度脱水(使水分含量低于 0.2 g H₂O/g DW 时) 造成膜的损伤程度与膜的组成有关。含水量较高 的细胞在刚开始脱水时失去的是细胞液里的水, 它仅引起形态的改变。当极度脱水时,双层膜之 间以及膜与蛋白质分子之间极度紧密靠近,水分 含量为 20% 时双层膜之间的距离约为 1 nm。极度 脱水导致整个细胞膜的亲水表面与大分子以及其他 超微组份之间的距离小于 1 nm。相距甚近的两个 亲水表面之间(微距离约为 1 nm)存在着强大的排斥 力,排斥力的大小随着水分子与亲水物质表面之 间距离的减小呈负指数函数增加(Rand 和 Parsegian 1989)。如果此时继续失去水分,由于水分子的 丢失,双层膜之间本应更加靠近,但因存在着巨 大的排斥力而很难再进一步靠近(Rand 和 Parsegian 1989)。

在很低的水势下,要克服这样大的排斥力需 要足够大的吸力,这样大的吸力对膜系统会造成 影响。当溶液是液态时,吸力(即负压)在所有方 向上都是等值的。负压作用在垂直于膜的方向上 会导致膜间距离的减小,作用在平行于膜的方向 上会导致膜组分在沿膜的方向上的密集。无论是 垂直和平行于膜的方向上的负压都会减小细胞膜双 层结构之间所夹着的水分体积,这种密集作用会 引起水合界面面积的减小,并在沿膜的方向上压 缩了膜组分的空间距离。这种压缩作用有利于凝 胶相的形成。与流动相相比,处于凝胶相的膜脂 分子的表面积要小一些。水分越少,水合程度越 低,流动相越容易向凝胶相转变。换言之,充 分水合的膜系统在一定温度下是处于流动相状态, 脱水产生的负压引起膜系统的压缩,从而导致在 相同温度下膜系统转变为凝胶相状态。

Wolfe 等从力学和热力学角度分析了脱水对膜 系统和生物大分子产生的压力的变化(Wolfe 和 Bryant 1999), 认为纯磷脂的相变温度 T., 随着脱 水进程逐渐升高,充分水合状态下膜间水分含量 较高,此时水势较高,脂类的相变温度为T_o。当 水分离开膜内空间时水势降低,膜压缩,此时如 果是纯脂,相变温度由 T_{o} 升高至 T_{m} 。如果是膜 间含有小分子溶质,同样的失水程度引起膜的被 压缩程度比纯脂被压缩的程度小,因而膜相变温 度 T_m(从 T_o升高的幅度)较小。如果膜间小分子的 溶液玻璃化而此时膜脂处于流动相(如小分子溶液 的玻璃化温度 Tg 高于膜相变温度 Tm 时),玻璃态 对膜产生的机械抗性能够阻止膜向凝胶相转变, 因而此时的脂类(lipid near vitrified solute)的相变温 度(T_m)会降低至T_o以下。此观点被其他学者的研 究所证实(Webb 等 1993, Koster 等 2000)。平行 于双层膜结构方向上的压力对磷脂相变温度的影响 可以用 Clausius-Clapeyron 公式表示:

$$\Delta T_{\rm m} = \frac{T_{\rm o} \Delta \alpha}{2L} II$$

 ΔT_m 为相变温度的变化值; T_o 为膜磷脂在充 分水合状态下的相变温度; $\Delta \alpha$ 为相变前后磷脂 分子表面积的变化; L为相变的焓值; Π 为受到 的平行于双层磷脂层方向的压力(Wolfe 和 Bryant 1999, Koster 等 2000)。

图1中的B1和B2显示了小分子溶质对膜相变的热力学效应。A1和A2表示膜/水(不含小分子溶质)系统;B1和B2表示膜/水/小分子溶质(含小分子溶质)系统;膜间小的颗粒表示二糖;膜间和小分子溶质之间的空白处代表水分。在恒定

温度下,当脱水发生时,膜片层处于流动相状态 (A1),随着水分的丢失,膜片层在膜平面方向上 收缩,形成凝胶相(A2),此时磷脂分子的面积减 小,膜变得更为致密。而同样处于流动相的膜片 层(B1)由于小分子溶质的渗透压效应和体积效应 (体积效应指双层膜结构之间的溶质分子自身的体 积使得在脱水过程中双层膜结构之间可以保持一定 的距离,只有在很低的含水量下膜双层结构之间 紧密靠近时,溶质分子才会有体积效应),从而

减小了膜之间即相距甚微的两个亲水表面之间存在 着的强大排斥力(Bryant 和 Wolfe 1992, Wolfe 和 Bryant 1999)。渗透压效应指膜片层之间高浓度溶 质的存在能够在低水分状态下减小膜片层之间的溶 液对膜片层的压力,有助于防止膜系统从流动相 向凝胶相转变。膜片层随着水分的丢失,在膜平 面方向上收缩的程度减小,磷脂分子之间的距离 较大,双层膜之间也由于小分子溶质占据一定的 体积而相距较远,因此失水后(B2)仍然保持流动 相(Bryant 等 2001)。

129



图1 低含水量条件下细胞膜相玻璃态溶质分子大小的热力学效应的模式图

Fig.1 Schematic illustration of the thermodynamic effect of small and large solutes vitrification on membrane phase at low hydration A1: Lipid(high hydration); A2:Lipid(low hydration); B1: Lipid/small solutes(high hydration); B2: Lipid/small solutes(low hydration); C1: Lipid/large solutes(high hydration); C2: Lipid/large solutes(low hydration).

3 玻璃态的形成及其形成位置对膜相变的 影响

水溶液能固化为冰晶和玻璃态两种固态形式。 如果溶液粘稠度很高而且降温速度又非常快,则 冰晶难以生长或没有充分的时间生长,水溶液就 进入玻璃态。当水溶液失水时,溶液浓度增加的 同时粘度也增加,当粘度增至大约10¹⁴ Pa/s 时溶 液开始玻璃化,所形成的固体状态称为玻璃态。 在玻璃态的体系中分子的扩散速率降低,但水分 子由于其分子量低和体积小,而具有较大的可移 动性,因此水分还可以继续丢失。

生物组织脱水形成玻璃态的现象已被肯定, 脱水时玻璃态的形成是降低贮藏过程中衰老劣变反 应速率的主要因素(Leopold 等 1994)。玻璃态是一 种粘滞的热力学不稳定固态,低温和低含水量下 生物组织容易发生玻璃化(Buitink等1998)。玻璃 态是一种非平衡体系,在同一个多相异质样品中 可能同时含有玻璃态和非玻璃态两个区域(Slade 和 Levine 1995)。在玻璃态区域,所有需要物质转 化和扩散的过程(如蛋白质的糖化过程),其反应 速率被显著地减缓。玻璃态的细胞质的高粘滞性 阻止了细胞质中溶质分子的扩散,从而减缓了化 学组分和结构上的老化劣变反应(Sun 1997),因而 玻璃态可以稳定失水状态下蛋白质等生物大分子 (Sun 和 Davidson 1998),提高种子和花粉的耐贮 藏性(Sun 1997, Buitink 等 1998)。

玻璃态是亚稳定的固态,可以支撑一定的机 械压力。玻璃态具有对膜的稳定作用,作用的大 小取决于玻璃态形成的位置。只有当玻璃化发生

在双层膜之间或膜与其他亲水的超微结构物质之间 时,才会对膜相变有显著影响。Koster 等 (1994) 发现在脱水过程中,当磷脂双层结构之间的糖溶 液发生玻璃化时,磷脂的相变温度 T... 降低到初始 值T。以下,如1-棕榈酰-2-油酰基-磷脂酰胆碱 (POPC)的相变温度(T_m)从-3℃(T_o)降至-25℃。 Zhang 和 Steponkus (1996)证实了 Koster 的结果, 并提出处于玻璃态的溶液的机械抗性的大小决定相 变温度 T_m 降至 T_o 以下的降幅,即 T_m 低于 T_o 的程 度大到会造成刚性很高的情况下,发生下面的事 情。小分子离开膜时造成膜面积的紧缩,处于玻 璃态的溶液的刚性使得膜面积较难紧缩,这将不 利于凝胶相的形成。当温度降低到 T。以下时, 如 果没有玻璃态的形成,细胞膜将由流动相向凝胶 相转变。但是当玻璃态形成后,玻璃态的刚性可 以抵抗来自于平行于膜表面方向上的压力,即使 温度低于T_o, 脂类物质仍然保持流动相状态 (Zhang 和 Steponkus 1996, Koster 等 2000)。如 果温度继续降低到玻璃态的刚性不足为膜脂层面积 紧缩的障碍时,细胞膜由流动相转变为凝胶相。 膜双层结构之间形成玻璃态,构成了在平行于膜 表面方向上的紧张状态,致使T_m降至T_o以下 (Zhang 和 Steponkus 1996, Wolfe 和 Bryant 1999, Koster 等 2000)。Clausius-Clapeyron 公式可以用来 量化由于膜双层结构之间的玻璃化造成对膜结构的 横向压力(II)(Koster 等 2000)。

有一种观点认为在脱水过程中糖类物质对膜磷 脂相变的作用,是糖溶液的玻璃化能阻止T_n的升 高,推断糖的玻璃化温度 T_e 与其阻止 T_m 升高的能 力有必然的联系(Oliver 等 1998)。Crowe 等却认 为在脱水过程中,限制T_m升高的是糖类物质的渗 透压效应和体积效应,与玻璃化无关。糖类物质 T_g 的高低与其能够保持 T_m 在 T_o 水平的能力之间没 有直接的关联,只有当 T_m 下降至 T_o 以下时, T_m 的下降才与溶液的玻璃化有关。关于糖溶液的玻 璃化对磷脂T_m的影响,由于不同的学者在研究中 采用了不同的相变温度的参考点而有不同的甚至相 互矛盾的观点和看法(Crowe 等 1998, Oliver 等 1998)。Wolfe 等建议统一T_m和T_o的定义:T_m为 脂类物质在天然的非纯合状态的相变温度, T。表 示纯的脂类物质在完全水合状态下的相变温度 (Wolfe 和 Bryant 1999, Koster 等 2000)。

Zhang 和 Steponkus(1996) 提出,当膜双层结 构之间的溶液发生玻璃化时,玻璃态的刚性会导 致膜很难在面积上延展,当膜的磷脂层处于凝胶 态时,膜的延展比处于流动态时难。温度的升高 有利于膜面积的延展,这种情况下膜相变需要较 高的温度,*T*_m会高于*T*_o,更有利于膜保持在凝胶 相;当膜磷脂层处于流动相时,如果膜片层间溶 液发生玻璃化,膜相变温度*T*_m会低于*T*_o,会有 利于膜磷脂层维持在流动相(Wolfe 和 Bryant 1999, Koster 等 2000)。因此,可以说膜片层间溶液的 玻璃化有利于膜磷脂层保持在当时所处的状态。

以上讨论的都是玻璃化发生在靠近膜表面的区域(可以称之为微溶液体积区域)时的情况,如果 溶液的玻璃化发生在主体溶液(bulk solution)里, 即溶液体积的长宽高均大于 1~2 nm(亲水性物质表 面之间距离),则对膜的直接影响很小,但会影 响脱水组织中的某些其他反应过程,如减缓某些 化学反应的速率(Karmas 等 1992, Slade 和 Levine 1995)。

4 膜片层之间溶质分子的大小对膜相变的 影响

在脱水过程中膜片层间的溶液发生玻璃化将有 助于稳定膜系统,这种对膜的稳定作用的强弱取 决于溶质分子的大小。溶质为聚合物等大分子 时,脱水导致大分子从膜之间和其他超微结构之 间排出(Rand 和 Parsegian 1989),所以多聚大分子 玻璃化不会发生在膜间区域,而是发生在主体溶 液(bulk solution)区域,因而对膜相变的影响很 小,既不会阻止磷脂的 T_m 升高到 T_o 以上,也不 会使得 T_m 降低到 T_o 以下(Wolfe 和 Bryant 1999, Koster 等 2000)。有些学者(Crowe 等 1996,1998; Oliver 等 1998)认为,在脱水时像葡萄糖苷和羟乙 基淀粉这样的多聚大分子溶液的玻璃化不能将磷脂 的 T_m 降低到 T_o 以下,在脱水过程中 T_m 降至 T_o 是 由于小分子糖类物质的存在造成的。

在脱水研究的模式系统中,可溶性糖能阻止 膜脂由流动相转变为凝胶相(Koster 等 1994, 2000; Crowe 等 1996)。已有许多实验证实,小 分子溶质如葡萄糖、蔗糖、海藻糖和山梨醇糖的 存在,能够减缓因细胞脱水引起的膜相变温度的 升高(Koster 等1994, 2000; Zhang 和 Steponkus 1995; Crowe 等 1996)。溶质浓度的增加引起渗透压的增 加,渗透压越高,水势(Ψ)负值越大,产生的吸 力也越强,即产生的负压越强,膜之间水分丢失 也越难。细胞质中小分子溶质对膜相变的影响取 决于小分子溶质的溶液是否形成玻璃态。膜间含 水量随水势和膜间小分子溶质与膜脂分子的数量比 而变化。小分子溶质的增加提高了溶液的渗透压 $(\Pi), 使得水势(\psi)负值更大。当 <math>\Pi + \psi = 0,$ 膜 间受力为零,与膜相距大于亲水性物质之间距离 (1~2 nm)的主体溶液将与膜共同组成一个平衡体 系。随着 Ψ 越趋向于负值, 膜间水分丢失得越 多,膜间空间就越小,此时分子体积较小的溶质 分子可以保留在膜内空间,使得膜间溶液保持一 定的渗透压,从而能够保持一定的水分,与没有 小分子溶质存在时的膜内空间相比,膜间空间也 较大(Wolfe 1987)。

图1中的B1、B2以及C1、C2表示低水分 含量下分子大小不同的溶质玻璃化对膜系统的影 响,B1和B2显示了小分子溶质(二糖分子)的情况; C1和C2显示了大分子溶质(分子量约为40000的 多聚分子)的情况。膜间和小分子溶质之间的空白 处是水分。假定温度恒定,水势接近零时(高水 合情况下),小分子(B1)和大分子(C1)都可以进入 双层膜之间。细胞脱水时水势越来越趋于负值, 膜间空间减小,多聚大分子逐渐从膜双层结构中 排出(C2),小分子仍然保留在原来的位置上 (B2)。当水分含量和温度都足够低时, 玻璃化发 生,如果小分子溶液发生玻璃化(B2),玻璃态将 阻止膜由液晶态向凝胶态转变。如果是排出两层 膜夹层之外的大分子溶液发生玻璃化(C2), 玻璃 化对膜相变几乎没有直接的影响(Bryant 等 2001).

存在于双层膜间的小分子溶液的玻璃化有降低 磷脂相变温度的重要作用,溶质的这种作用是不 同于单纯的渗透压效应和体积效应,与溶液发生 玻璃化的温度(T_g)也有关系(Wolfe 和 Bryant 1999, Koster 等 2000)。Crowe 等(1998)认为在脱水过程 中二糖酰胺(如海藻糖酰胺和蔗糖酰胺)能够使二棕 榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl-phosphatidylcholine, DPPC)的 T_m 降至 T_o 以下,这并不是糖溶液玻璃化

的结果, 而是这些糖分子插入到毗邻的脂分子之 间的结果。根据这一看法,插入到膜双层磷脂分 子之间的二糖酰胺的分子体积须在一定的大小以 上,才能阻止脂类由液晶相(流动相)向凝胶相的 转变。Crowe 等 (1998) 提出,像葡萄糖这样的 单糖酰胺,由于其分子体积比二糖酰胺小,即使 插入到脂类分子之间也达不到像二糖酰胺那样插入 脂类双层结构而使膜面积延展的程度,也就不能 够降低脱水状态下 DPPC 的 T_m 。不同于 Crowe 的 观点, Koster 等(1994)认为单糖(如葡萄糖)与二糖 (如海藻糖)都可以通过在脂双层之间形成玻璃态而 使得脂类的相变温度降低至 T。以下,只不过是要 看组成脂双层的 T_{o} 是否低于葡萄糖溶液的 T_{g} 。正 如二糖酰胺能够使得脱水的 DPPC 的 T_m 降到 T_o以 下是由于糖在流动相的磷脂双分子层之间形成玻璃 态一样,如果葡萄糖在流动相的双层结构之间能 够形成玻璃态(如葡糖糖的T。高于脂类的T。时),也 可以将磷脂的T_m降低到T_o以下。近来的研究结果 证明以上的事实确实存在:对于1-油酰-2-棕榈 酰-磷脂酰胆碱(1-oleoyl-2-palmitoylphosphatidylcholine, OPPC), 含水量低于 0.5 g $H_{2}O/g$ DW 时,葡萄糖溶液发生玻璃化的温度(T_{s}) 高于 OPPC 的相变温度(T_0 为−5℃),此时葡萄糖 分子插入到由 OPPC 组成的磷脂双层结构中。葡 萄糖溶液发生玻璃化时,由 OPPC 组成的磷脂 T_m 下降为-30℃,这意味着由 OPPC 组成的磷脂在 -30℃以上均会保持流动相。然而,对于二棕榈 酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl-phosphatidylcholine, DPPC),由于其 T_0 为42℃,而葡萄糖溶液的 T_a 低于 42℃,则即使插入到由 DPPC 组成的磷脂双 分子层中的葡萄糖发生玻璃化,也不会降低由 DPPC 组成的磷脂的相变温度,其 T_m 会保持在 42℃以上(Koster 等 2000c)。这就是膜系统的相变 与膜的磷脂组分和膜间溶液的T_g之间的关系。

除了溶质分子的大小以外,溶质的溶解度也 很重要。在脱水过程中,只有当溶质保持溶解状 态时才能形成玻璃态。有些溶质在高浓度下形成 结晶,使得溶液浓度降低,玻璃态将很难形成, 溶质通过渗透压效应降低脂类物质相变温度的影响 也会减小(Koster 等 1996)。在膜间区域,尽管溶 液浓度很高,只要没有结晶存在,就不会影响玻 璃态的形成。

5 两性物质在细胞质水相和膜磷脂脂相中 的重新分配

种子和花粉在脱水过程中,细胞内两性物质 从细胞质水相进入膜磷脂的脂相;反之,回水过 程中两性物质又从脂相回到水相。种子或花粉在 吸胀期间细胞内的物质会不可避免地发生短暂的渗 漏,可能是由于在回水过程中两性物质在细胞质 水相和膜磷脂脂相中的重新分配,降低了细胞膜 的选择透性。对脂质体的研究表明,脱水时两性 自旋探针进入双层磷脂层, 回水时会引起短暂渗 漏。从花粉中提取出的两性物质也会产生相同的 特征。Golovina 等 (1998)利用电子顺磁共振波谱 技术(electron paramagnetic resonance spectroscopy, EPRS)分析了香蒲(Typha latifolia)的花粉在脱水和 回水过程中,两性物质硝基氧自旋探针在细胞中 的转相效应。花粉细胞处于水合状态时,探针主 要出现在水相;花粉细胞脱水时,探针脱离水相 而进入脂相; 当花粉细胞脱水至含水量低于0.4 gH2O/gDW时,探针从水相中彻底消失,而回 水至含水量为 0.4 g H₂O/g DW 以上时探针又重新 在水相中出现。在香蒲花粉脱水和回水过程中探 针分子在水相和脂相中的重新分配,可以解释细 胞膜的暂时性渗漏, 膜渗漏在花粉的吸水过程中 由高到低的变化规律与两性物质逐渐在水相中出现 的规律是一致的。

Buitink 等以吸胀的豌豆(Pisum sativum)和黄瓜 (Cucumis sativa)种子分别作为淀粉类和油类种子 的代表类型为研究材料,用已经开始萌动的种子 作为脱水敏感体系,用PEG 渗调处理过的种子作 为耐脱水体系,研究脱水敏感性不同的组织中两 性物质在脱水过程中的两相中的再分配。他们通 过研究发现,脱水过程中对脱水敏感的胚轴细胞 在含水量还没有大幅度下降时,两性物质就已经 开始进入脂相,细胞粘滞度的提高也发生在含水 量较高时,细胞粘滞度控制脱水过程中两性物质 在两相间的再分配(Buitink 等 2000c, Leprince 等 2000)。

两性分子从细胞质这样的异质胶体中分离进入 膜脂相的分子机制是复杂的。Rowe等(1998)利用 极性不同的两性自旋探针进行了电子顺磁波谱分 析,结果表明这些自旋探针的波谱特征随周围环 境中的改变而不同,而且发现不同极性的分子在 含水量降到不同的水平时进入脂相。

种子和花粉在吸胀开始时发生物质渗漏,但 随着吸水的进程物质渗漏量逐渐减少,而其他植 物组织的细胞则会继续渗漏,即对脱水更敏感。 但在低温下或水分含量极低的情况下,种子和花 粉的吸胀渗漏持续的时间要长一些。花粉和种子 在脱水至一定程度时,细胞膜由流动相转入凝胶 相,如果花粉细胞在花粉吸胀之前保持一定的含 水量,细胞膜已经处于流动相,在花粉吸胀期间 就不会发生由凝胶相转变为流动相的相变过程, 膜渗漏就较少。但是即使细胞膜始终保持在流动 相状态,在吸水过程中也会发生一定程度的膜渗 漏,但这种渗漏是短暂的,通常不会影响花粉的 萌发, 仅仅会造成一些活力的降低(Hoekstra 等 1992, Tetteroo 等 1996), 活力的降低与膜的相 变无关。膜渗透性的提高可能缘于与膜表面和膜 内某些糖类物质的出现。Crowe 等(1992)报告脱水 过程中能产生大量的双糖, 双糖与膜磷脂的极性 头部之间形成的氢键对于细胞的耐脱水性至关重 要,氢键使磷脂分子之间保持一定的空间距离, 此距离可以阻止脱水引起的T_m的升高,从而使得 膜的液晶态得以保持。

糖类和脂类物质相互之间可能有特别的关系。 Crowe 等 (1996)报告在无水或接近无水的状态下, 糖类物质与膜极性集团以及其他膜生物大分子之间 形成氢键。纯的磷脂在脱水至 0.02 g H₂O/g DW 以下, T_m将比T_o升高30℃, 而糖类物质的存在 将限制 T_m的升高(Koster 等 2000)。在接近无水状 态下(水分含量接近0gH2O/gDW)糖类物质与膜 之间的氢键具有维持T_m在T_o水平的功能。在水分 含量为 0.05~0.2 g H₂O/g DW 时,如果没有糖类 物质存在,T_m将升高。双层膜之间缺少溶质时在 脱水过程中T_m逐渐升高的事实,可以解释双层膜 之间溶质的存在限制 T_m 升高的事实(Bryant和 Wolfe 1992, Wolfe 和 Bryant 1999)。根据这一 模式,膜保持接近于充足水分含量时的物理状态 的基础是糖类物质与极性分子之间的相互作用, 而且这种作用随着糖浓度的增加而加强。但是, 即使干组织中所有的糖分子都与磷脂形成氢键也不

足以保护膜系统,因而认为还有其他物质参与和 膜相变相关的物理和化学过程(Hoekstra 等 1997)。

除了糖类物质以外,黄酮醇被认为是另一种 能够阻止脱水引起的膜相变温度T_m升高的物质。 黄酮醇的两性特征使它能在脱水过程中从处于水相 的细胞质进入处于脂相的细胞膜脂区域,从而阳 止细胞膜凝胶相的形成。枥皮黄酮(quercetin)是一 种黄酮醇,具有很强的抗氧化作用 (Terao 等 1994),在花粉干物质中含量高达 0.2%~1% (Ylstra 等 1992, Vogt 和 Taylor 1995),可以在脱水时以 30℃ 的降幅降低棕榈酰油脂脂质体(palmitoyl-oleoyl PC liposome)的膜相变温度(Hoekstra 等 1997)。此现 象发生在枥皮黄酮:磷脂的摩尔比为1:10的情 况下。枥皮黄酮插入到脂质体膜的非极性区域, 打乱了此区域内酰基链原有的有序排列。这种紊 乱在重新吸水时会造成暂时性的膜渗漏。 Golovina 等(1998)认为尽管两性物质在脱水过程中 从水相进入脂相的行为会引起吸胀渗漏,但却有 利于种子和花粉的细胞忍耐水分的丢失,是种子 和花粉耐脱水的关键性物质。细胞内的许多两性 物质具有抗氧化性,有助于维持膜的流动性。与 硝基氧自旋探针具有类似作用的内源两性物质有苯 酚、类黄酮和生物碱(Hoekstra 等 1997, Golovina 等1998)。这类物质在干种子、花粉和复苏植物 中大量存在 (Golovina 等1998, Oliver 等1998, Shirley 1998),而且都是有效的抗氧化剂(Saija 等 1995, Rice-Evans 和 Miller 1996, Rice-Evans 等 1997), 脱水过程中此类具有抗氧化活性的两性物 质从细胞质中进入膜系统,可以防止脱水引起的 氧化损伤。这也可以从保护膜系统抵御氧化劣变 的角度解释为什么种子、花粉和复苏植物与其他 组织和细胞相比具有较高的耐脱水性。

离子通过与电荷的作用与膜结合,除此以外 其他与膜系统紧密结合的可溶性物质通过范德华力 或氢键与膜相互作用。水分与膜系统之间的作用 包括了以上所有类型。按照水分替代学说,细胞 膜在失去水分时,在含水量低时某些物质可以替 代水分子通过氢键与极性大分子结合,从而避免 细胞膜由于水分的丧失导致的不可逆伤害,在无 水或接近无水状态下起到稳定膜系统的作用。两 性物质在脱水过程中由细胞质水相进入膜脂相, 提高了细胞对脱水的耐性,这些事实佐证了水分 替代学说(Crowe 等 1996; Oliver 等 1998, 2000)。

6 结束语

在种子和花粉的种质保存中温度和含水量是两 个最为关键的因素。近几年国外已经开始利用老 化速率动力学的研究手段,采用EPR、ST-EPRS、极性分子探针标记等技术从力学和热力学 角度研究温度和含水量与种质老化速率的关系, 试图提出更为合理的预测水分和温度对种质寿命影 响的动力学模型,以上研究已经成为细胞生物学 和热力学交叉领域的研究热点,对于种质保存的 研究具有重要的理论和应用意义。国内这方面的 工作几乎还未开展(程红焱等1996,汪晓峰等 1999),希望国内热力学和生物学研究者们尽快开 展此领域的联合研究。

参考文献

- Binder H, Gawrisch K(2001). Dehydration induces lateral expansion of polyunsaturated 18:0-22:6 phosphatidylcholine in a new lamellar phase. *Biophys J*, **81**: 969-982
- Bryant G, Wolfe J(1992). Interfacial forces in cryobiology and anhydrobiology. Cryo-Letters, 13: 23-36
- Bryant G, Koster KL, Wolfe J (2001). Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Sci Res*, **11**: 17–25
- Buitink J, Claessens MMAE, Hemminga MA, Hoekstra FA (1998). Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollens. *Plant Physiol*, **118**: 531-541
- Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA(2000a). Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiol*, **122**: 1217– 1224
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA(2000b). Molecular mobility in the cytoplasm: An approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Plant Biology*, 97(5): 2385-2390
- Buitink J, Leprince O, Hoekstra FA (2000c). Dehydrationinduced redistribution of amphiphilic molecules between cytoplasm and lipids is associated with desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol*, **124**:1413-1426
- Buitink J, van den Dries IJ, Hoekstra FA, Alberda M, Hemminga MA(2000d).High critical temperature above Tg may contribute to the stability of biological systems. *Biophys J*,

79(2):1119-1128

- Cheng HY(程红焱), Zheng GH(郑光华), Qin H(秦 红), Tao KL(陶嘉龄), Zhou MD(周明德)(1996). Water thermodynamic analysis on seed desiccation tolerance and its ultradrying storage effects. *Sci Agr Sin* (中国农业科 学), **29**(6): 65-73(in Chinese)
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992). Anhydrobiosis. Annu Rev Physiol,54: 570-599
- Crowe LM, Reid DS, Crowe JH(1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J*, **71**:2087-2093
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM(1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. Annu Rev Physiol, 60:73-103
- Ellis RH, Roberts EH(1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annu Bot*, **45**:13-30
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH, Tao K-L (1990). Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. Ann Bot, **65**:493-504
- Golovina EA, Hoekstra FA, Hemminga MA (1998). Drying increases intracellular partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase: impact on membrane permeability and significance for desiccation tolerance. *Plant Physiol*,118: 975-986
- Hoekstra FA, Crowe JH, Crowe LM (1992). Germination and ion leakage are linked with phase transitions of membrane lipids during imbibition of *Typha latifolia* pollen. *Physiol Plant*,84:29-34
- Hoekstra FA, Wolkers WF, Buitink J, Golovina EA, Crowe JH, Crowe LM (1997). Membrane stabilization in the dried state. *Comp Biochem Physiol*, **117A**:335-341
- Karmas R, Buera MP, Karel M (1992). Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. J Agr Food Chem, 40:873-879
- Koster KL, Webb MS, Bryant G, Lynch DV(1994). Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2oleoyphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behaviour of the phospholipid. *Biochim Biophys Acta*, **1193**:143-150
- Koster KL, Sommervold CL, Lei YP (1996). The effect of storage temperature on the interactions between dehydrated sugars and phosphatidylcholine. J Thermal Anal, 47:1581-1596
- Koster KL, Lei YP, Anderson M, Martin S,Bryant G(2000). Effects of vitrified and non-vitrified sugar on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transition. *Biophys* J, 78:1932-1946
- Leopold AC, Sun WQ, Bernal-Lugo I(1994). The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci Res*, 4: 267–274

Leprince O, Harren FJM, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA

(2000). Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. *Plant Physiol*, **122**: 597-608

- Liang YH, Sun WQ(2000). Desiccation tolerance of recalcitrant *Theobroma cacao* embryonic axes: the optimal drying rate and its physiological basis. *J Exp Bot*, **352**: 1911– 1919
- McMullen TP, Lewis RN, McElhaney RN(1994). Comparative differential scanning calorimetric and FTIR and ³¹P-NMR spectroscopic studies of the effects of cholesterol and androstenol on the thermotropic phase behavior and organization of phosphatidylcholine bilayer. *Biophys J*, **66**:741–752
- Melanie MT, Hincha DK, Estrada SD, Wolkers WF, Crowe LM (2002). A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys J*, 82: 874-881
- Oliver AE, Hincha DK, Crowe LM, Crowe JH (1998). Interactions of arbutin with dry and hydrated bilayers. *Biochim Biophys Acta*,**1370**:87-97
- Oliver L, Harrren FJM, Buitink J,Alberda M,Hoekstra FA (2000). Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germination radicles. *Plant Physiol*, **122**:597–608
- Rand RP, Parsegian VA (1989). Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*,**988**:351-376
- Rice-Evans CA, Miller NJ (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*, 24:790-795
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 2: 152-159
- Rowe ES, Zhang F, Leung TW, Parr JS, Guy PT (1998). Thermodynamics of membrane partitioning for a series of n-alcohols determined by titration calorimetry: role of hydrophobic effects. *Biochemistry*, **37**:2430-2440
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 19:481-486
- Shirley BW (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci Res*, 8:415-422
- Slade L,Levine H(1995). Glass transition and water-food structure interactions. Adv Food Nutr Res, **38**:103-269
- Sun WQ (1997). Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at T-Tg and the plasticization effect of water on storage stability. *Ann Bot*,

79:291-297

- Sun WQ, Davidson P (1998). Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: effects of phase separation and crystallization. *Biochim Biophys Acta*, **1425**:235-244
- Terao J, Piskula M, Yao Q (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Arch Biochem Biophys,308:278-284
- Tetteroo FAA, de Bruijn AY, Henselmans RNM, Wolkers WF, van Aelst AC (1996). Characterization of membrane properties in desiccation- tolerant and -intolerant carrot somatic embryos. *Plant Physiol*, **111**:403-412
- Vertucci CW, Roos EE, Crane J (1994). Theoretic basis of protocols for seed storage.III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. Ann Bot, 74: 531-540
- Vogt T, Taylor LP (1995). Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophytespecific flavonol diglycosides. *Plant Physiol*, **108**:903– 911
- Wang XF(汪晓峰), Zheng GH(郑光华), Yang SJ(杨世杰), Jing XM(景新明)(1999). Plasma membrane

fluidity of seeds after ultradrying storage. Chin Sci Bull(科 学通报), 44(7): 733-739 (in Chinese)

- Webb MS, Hui SW, Steponkus PL(1993). Dehydration-induced lamellar-to-hexagonal-II phase transition in DOPE/DOPC mixtyres. *Biochim Biophys Acta*,**1145**:93-104
- Wolfe J (1987). Lateral stresses in membranes at low water potential. Aust J Plant Physiol, 14:311-318
- Wolfe J, Bryant G (1999). Freezeing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology, 39:103– 129
- Ylstra B, Touraev A, Benito Moreno RM, Stöger E, van Tunen AJ, Vicente O, Mol JNM, Heberle-Bors E (1992). Flavonols stimulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol*,100:902-907
- Zhang J, Steponkus PL (1995). Effects of sugar on the dehydration-induced increase in the T_m of DPPPC dehydrated over a continuum of osmotic pressures. Cryobiology, 32:60A
- Zhang J, Steponkus PL (1996). Proposed mechanism for depression of the liquid-crystalline-to-gel phase transition temperature of phospholipids in dehydrated sugarphospholipid mixtures. Cytobiology, 33:21A

Research Perspective in Bio-Thermodynamics of Seed and Pollen Cell Membrane Changes Induced by Desiccation

CHENG Hong-Yan^{1*}, SONG Song-Quan²

(¹Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China)

Abstract: Membranes are considered one of the primary sites of lethal damage to cells that are not desiccation tolerant. This paper reviews recent research work about membrane characteristic and behavior changes in state during seed and pollen desiccation in the following aspects: (1) membrane phase transition, (2) dehydrationinduced stress and strains in membrane and macromolecules, (3) glassy-state formation and its effects on membrane depending on the position, (4) different role on membrane phase transition of different size of the glass-forming solutes,(5) changes of intracellular distribution of amphiphilic substances during dehydration and rehydration. This paper is aimed to enlighten new research ways to find optimum storage conditions for germplasm conservation of seeds and pollens for long duration by minimizing cell injury.

Key words: seed; pollen; membrane phase transition; vitrification; amphiphilic solute; desiccation

^{*}E-mail:hycheng@ns.ibcas.ac.cn