

不同温度条件下常春藤叶片磷脂变化的比较分析

沈 漫

(北京农学院植物科学技术系, 北京 102206)

摘 要: 以栽培在露地和温室的常春藤 (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) 为材料, 运用荧光偏振、薄层层析扫描、气相色谱等技术测定叶片磷脂流动性、磷脂及其脂肪酸组成配比。结果表明, 与温室栽培相比, 露地栽培的常春藤具有较高的不饱和磷脂和不饱和脂肪酸含量。在低温胁迫下, 磷脂酰胆碱 (PC) 的不饱和脂肪酸水平是影响膜脂流动性的主要因素。通过对不同温度条件下生长的常春藤的磷脂流动性、磷脂和脂肪酸组成的差异性分析, 从膜脂组成与结构的角度探讨了常绿阔叶植物的抗寒机理。

关键词: 常春藤; 磷脂; 脂肪酸; 膜脂流动性; 抗寒性

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0431-05

细胞膜的正常功能有赖于膜结构的完整性和膜脂的流动性。磷脂的脂肪酸组成能控制膜的流动性, 成为决定植物抗寒性的主要因素^[1,2]。

常绿攀援植物常春藤 (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) 原产我国华中、华南、西南、甘肃和陕西, 抗寒能力较强, 在我国温暖地区可以露地越冬, 具有较高的观赏价值。在北方, 由于气候寒冷干燥, 其观赏性多受影响, 故一般作室内盆栽、吊挂观赏。若能通过低温驯化, 提高常春藤的抗寒性, 则有可能使常春藤在北方露地越冬, 并保持良好的观赏效果。

作者以栽培在温室和露地条件下的常春藤为试材, 运用荧光偏振、薄层层析扫描、气相色谱分析等方法, 测定了叶片膜脂流动性、磷脂及其脂肪酸组成配比, 对其差异性进行了分析, 旨在从膜脂的角度探讨常绿阔叶植物的抗寒性机理。

1 材料与方法

1.1 材料

常春藤分别栽植于北京林业大学花卉研究所实验地和温室。露地栽培条件为背风疏阴的近墙处, 常规水肥管理, 植株攀援于墙面或匍匐于地面生长。以 3 个时间段划分整个越冬期, 分别在 1998 年 11 月中旬 (7℃)、1999 年 1 月中旬 (-10℃) 和 1999 年 3 月中旬 (5℃) 进行采样工作。文中所提及的露地栽培温度为当月天气预报的平均气温。栽植于温室的常春藤, 平均生长温度 20℃ (实测), 自然采光。管理措施、采样时间等同露地栽植样品。采集试材中间茎段上成熟度较为一致的功能叶片, 立即液氮速冻, 置 -40℃ 低温冰箱保存备用。

1.2 磷脂的提取与组分的定量

植物膜脂的提取、各种磷脂组分的分离与纯化分别参照 Murata 等^[3] 和 Hu 等^[4] 的方法, 试验条件同文献 [5]。各磷脂组分经薄层层析 (TLC) 分离定性后, 立即在岛津 CS-930 薄层扫描仪 (日本) 上扫描进行定量。扫描条件为: 测定波长 λ_S 650 nm, 参比波长 λ_R 480 nm, 狭缝 1.2 mm × 1.2 mm, 锯齿式扫描, 扫描速度 40 mm·min⁻¹。C-R4A 微机处理数据。

1.3 脂肪酸组成分析

参照文献 [5] 的方法进行, 略有改动。用岛津 GC-9A 气相色谱仪测定脂肪酸组成, BP-5 石英毛

收稿日期: 2002-09-18; 修回日期: 2002-12-03

基金项目: 北京市科委“科技新星计划”项目 (9558101600)

细管柱 (50 m × 0.22 mm ID, SGE 产品)。进样温度 260℃, 柱温按以下程序升温: 180℃ 保留 1 min 后, 以 4℃·min⁻¹ 升到 220℃, 再以 0.5℃·min⁻¹ 升到 230℃, 最后以 2℃·min⁻¹ 升至 260℃。高纯氮载气, 流速 25 mL·min⁻¹, 分流比 30:1, FID 检测。以样品保留时间确定不同的脂肪酸甲酯, 用峰面积归一化法定量, C-R4A 微机处理数据和谱图。根据内标珠光酸 (17:0) 计算出各种脂肪酸组分的含量。

1.4 磷脂流动性的测定

参照杨福愉等^[6]和屠亚平等^[7]方法进行。TLC 定性后, 分别刮下含各种磷脂的硅胶带, 用氯仿: 甲醇: 水 (1:2:0.8, v/v) 洗脱, 收集洗脱液, 浓缩, 溶于少量氯仿, -20℃ 保存备用。取上述制备的各种磷脂适量, 以 40 mg·mL⁻¹ 的浓度加入 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 冰浴超声波处理 10 min, 制备成脂质水合泡囊。

吸取 10 μL 2.0 mmol·L⁻¹ 荧光偏振探针 DPH (1,6-二苯基 1,3,5-己三烯, Sigma 产品) 的四氢呋喃溶液和 2 mL 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 加入试管中, 在 YKH 型液体快速混合器上旋涡振荡 15 min。吸取上述溶液 2 mL, 加入 20 μL 上述制备的样品脂质体, 室温条件下充分搅拌 15 min, 在 30℃ 恒温水浴槽中放置 20 min, 取出于室温下避光放置 2 h。30℃ 条件下在日立 F-4101 荧光光度计 (日本) 上测定荧光偏振度, 发射波长为 360 nm。膜脂流动性按文献 [8] 中公式进行计算: $LFU = (P_{max}/P - 1) / P$, 式中 P 为测定值, P_{max} 取 0.5。

2 结果与分析

2.1 磷脂相对含量与植物抗寒性

各磷脂组分经过薄层层析分离定性后, 用薄层层析扫描法进行定量, 结果列于表 1。

常春藤叶片磷脂主要组分是磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 和磷脂酰甘油 (PG)。其中以 PC 为最大组分。

表 1 不同栽培条件下常春藤叶片磷脂组成的相对含量

Table 1 Relative content of phospholipid composition from leaves of ivies growing in different condition

栽培条件 Growing condition	时 间 Time (Month)	磷脂组成与相对含量 Relative content and composition of phospholipids (%)				Σ (PC, PE)
		PI	PC	PE	PG	
露 地 Open field	11	8.67 ± 0.89 a	35.80 ± 0.88 a	27.48 ± 0.95 a	28.05 ± 1.32 a	63.28 ± 0.32 a
	1	11.58 ± 2.10 a	54.94 ± 1.54 b	26.06 ± 0.84 a	7.43 ± 1.01 b	81.00 ± 2.01 b
	3	9.89 ± 2.38 a	46.59 ± 2.18 c	22.50 ± 1.33 b	21.02 ± 3.26 c	69.09 ± 2.24 c
温 室 Greenhouse	11	13.27 ± 0.39 a	30.88 ± 1.88 a	32.14 ± 2.21 a	23.72 ± 1.07 a	63.02 ± 2.46 a
	1	14.64 ± 0.56 b	30.29 ± 0.72 a	33.75 ± 1.61 a	21.33 ± 2.19 a	64.04 ± 1.93 a
	3	8.60 ± 3.08 ab	40.26 ± 1.97 b	27.24 ± 2.00 a	23.89 ± 2.93 a	67.50 ± 3.93 a

注: 表中数据为 3 次试验结果的均值 ± 标准差; 各列中不同小写字母表示同一栽培条件越冬期内差异显著 ($P = 0.05$)。

Note: Values are means ± s.e; Different small letters in same growing condition during winter in columns indicate significant difference ($P = 0.05$).

从表 1 可见, 在 11 月至次年 1 月期间, 栽植于露地的常春藤叶片磷脂中, PC 与 PE 含量之和随温度下降而显著上升, 增加了 28.0%。次年 3 月, 随着平均气温的升高, PC 与 PE 含量之和从 81.00% 下降到 69.09%, 与 11 月时的含量接近。这主要是由于 PC 随温度变化而发生了急剧变化, 从原来的 35.80% 增加到 54.94%, 温度回升, 又降到 46.59%。而温室栽培的常春藤的磷脂含量在整个冬季的变化幅度很小。

PC、PE 为不饱和磷脂, PG 为饱和磷脂。同一季节不同栽培条件下生长的常春藤磷脂相对含量的差异性表明, 低温促进植物不饱和磷脂的合成。由此可以推测, 露地栽培的常春藤在对低温的适应过程中, 通过增加体内不饱和磷脂组分的含量, 来增强抗寒性, 维持膜脂的流动性和生物膜正常的代谢

功能以抵御零下低温持续的伤害。

2.2 磷脂的脂肪酸组成与植物抗寒性

常春藤叶片磷脂组成主要含有棕榈酸 (16:0)、十六碳烯酸 (16:1)、反式-3-十六碳烯酸 [16:1 (3t)]、硬脂酸 (18:0)、油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2)、亚麻酸 (18:3) 等脂肪酸。根据内标珠光酸 (17:0) 定量计算出各种脂肪酸组分的含量。由表 2 可见, 各种磷脂中, 除 PE 外, 其它 3 种磷脂的最大脂肪酸组分均为 18:2。富含 18:2 脂肪酸可能是常绿植物的特点, 这在其它常绿植物中也得到证实^[9]。

16:1 (3t) 是光合组织中特有的脂肪酸, 特异性存在于磷脂 PG 中。Bishop 等^[10]提出 16:1 (3t) 与饱和脂肪酸的作用相似, 因此一般将它作为饱和脂肪酸来计算。我们发现, 栽培在不同温度条件下的常春藤叶片 PG 中的 16:1 (3t) 含量差异显著, 露地栽培的常春藤, 其体内的 16:1 (3t) 含量远远低于生长在温暖条件下的常春藤, 二者之间的数值相差 1 倍之多 (表 2)。

表 2 冬季生长在不同温度下的常春藤叶片磷脂脂肪酸组成的比较

Table 2 Comparison of fatty acids in phospholipid from leaves of ivy growing at different temperatures in the winter

磷 脂 Phospholipid	温 度 Temperature (℃)	脂肪酸组成 Fatty acid composition (%)						
		16:0	16:1	16:1 (3t)	18:0	18:1	18:2	18:3
PI	- 10	32.23 ± 0.29 a	2.07 ± 0.50 a	—*	1.23 ± 0.12 a	3.43 ± 0.30 a	39.22 ± 1.30 a	21.83 ± 0.91 a
	20	36.61 ± 2.95 a	4.13 ± 0.07 b	—*	3.31 ± 0.84 a	5.39 ± 0.88 a	32.69 ± 1.84 a	17.86 ± 1.01 a
PC	- 10	18.90 ± 0.45 a	0.37 ± 0.06 a	—*	0.68 ± 0.54 a	1.98 ± 0.10 a	72.22 ± 0.87 a	5.85 ± 0.19 a
	20	23.36 ± 0.64 b	0.42 ± 0.08 a	—*	3.59 ± 0.08 b	8.23 ± 0.33 b	55.61 ± 0.16 b	8.78 ± 0.01 b
PE	- 10	29.71 ± 2.58 a	1.66 ± 0.20 a	—*	1.37 ± 0.18 a	1.69 ± 0.02 a	29.15 ± 0.65 a	36.43 ± 1.56 a
	20	28.65 ± 1.67 a	1.92 ± 0.17 a	—*	1.24 ± 0.04 a	1.82 ± 0.03 b	33.12 ± 1.06 b	33.25 ± 0.77 a
PG	- 10	28.52 ± 1.40 a	3.94 ± 0.40 a	9.53 ± 0.69 a	1.74 ± 0.18 a	8.30 ± 0.11 a	27.87 ± 0.95 a	20.10 ± 2.57 a
	20	29.61 ± 0.60 a	1.05 ± 0.03 b	19.53 ± 0.36 b	1.15 ± 0.06 b	8.99 ± 0.34 a	24.74 ± 0.10 b	14.92 ± 0.68 a

注: 表中数据为 3 次试验结果的均值±标准差; 各列中不同小写字母表示同种磷脂不同温度条件比较差异显著 ($P=0.05$); * 痕量。

Note: Values are means ± s.e. Different small letters within same phospholipid in columns indicate significant difference at different growing condition ($P=0.05$). * Trace.

将表 2 的数据经过计算, 求出不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比率 ($\sum U/\sum S$) 和脂肪酸不饱和指数 (IUFA), 综合列于表 3。

从表 3 可见, 生长在露地的常春藤叶片磷脂 PC、PG 的 $\sum U/\sum S$ 分别比生长在温室的常春藤的 $\sum U/\sum S$ 高 51.47%、53.54%。磷脂 PE 和 PI 的 $\sum U/\sum S$ 仅比温室常春藤的低 5.53% 和 17.30%。露地栽培的常春藤叶片磷脂组分的 IUFA 均比温室常春藤的要高。由此可以认为, 在不同环境下生长的同一植物, 其脂肪酸组成和配比所发生的变化, 是与植物和环境的适应性相关联的。

2.3 磷脂流动性与植物抗寒性

DPH 是研究膜脂流动性比较敏感的一种常用探针。DPH 掺入到膜脂的膜脂酸烃链区后, 介质粘度变大, 顺反异构化受到抑制, 成为全反构型, 即唯一能发荧光的构型。由于 DPH 分子长轴接近于与膜脂酸链分子长轴平行, 所以, 荧光偏振度 (P) 能很好地反映膜脂区域的微粘度, 定量地说明膜脂分子的运动情况^[6,8]。

表 3 冬季生长在不同温度下的常春藤不同测定指标的比较

Table 3 Comparison of different determination indexes of phospholipid from leaves of ivy growing at different temperatures in the winter

磷 脂 Phospho- lipid	温 度 Tempera- ture (°C)	磷脂流动性 Phospholipid fluidity	$\sum U^*/\sum S^{**}$	不饱和度 IUFA ^{***}
PI	-10	33.69±0.39 a	1.96±0.00 a	149.43±0.92 a
	20	21.30±0.40 a	2.37±0.42 a	128.50±5.40 a
PC	-10	22.00±0.27 a	4.12±0.26 a	164.34±2.24 a
	20	8.58±0.34 b	2.72±0.07 b	146.22±0.49 b
PE	-10	16.10±0.59 a	2.23±0.25 a	170.94±6.18 a
	20	14.77±0.76 a	2.35±0.18 a	169.75±3.00 a
PG	-10	10.97±0.66 a	1.52±0.12 a	128.28±6.10 a
	20	8.38±0.51 b	0.99±0.04 b	104.28±1.52 a

* $\sum U = \sum [16:1 + 18:1 + 18:2 + 18:3]$;

** $\sum S = [16:0 + 18:0 + 16:1 (3t)]$;

*** IUFA = $\sum (16:1 \times 1 + 18:1 \times 1 + 18:2 \times 2 + 18:3 \times 3)$

从表 3 可以看到,露地栽培的常春藤的主要磷脂的流动性均大于温室栽培的。尤其是磷脂 PC,露地栽培的常春藤的 PC 流动性比温室栽培的大 2.5 倍以上。前者的其它 3 种磷脂 PE、PI、PG 的流动性也分别比后者大 9.0%、58.2%、30.9%。

结合上述磷脂相对含量和脂肪酸组成的分析,我们可以假设,如果处于同样的低温胁迫下,经过低温锻炼的露地常春藤将比温室常春藤具有较强的生理调节能力来维持膜脂的流动性,从而表现出较强的抗寒性。

3 讨论

Lyons 等^[11]认为膜的流动性和膜相变与植物抗冷性密切相关。不抗冷的植物品种在一定的低温下,膜脂发生了从液晶相到凝胶相的变化,类脂和膜蛋白都失去原有的活动能力,使生物膜部分或全部丧失了功能。而低温的这种作用,在一定程度上取决于类脂的脂肪酸配比。

脂质合成的能力强似乎是植物抗寒力发育的先决条件^[12]。据此,可以设想一个抗寒的植物在低温逆境下,若要维持正常的生命活动,就必须在其膜系统含有较多的不饱和脂肪酸,以维持膜在低温下的液晶态,保持膜的流动性和正常功能。膜磷脂流动性与不饱和脂肪酸含量变化不一定具有简单的相关性,而有可能涉及在低温适应过程中为了调节膜脂流动性,膜脂脂肪酸在甘油基 C-1 位和 C-2 位上重新排列的因素^[13]。脂肪酸不饱和键含量多少是控制膜脂流动性的有关因素,但不是唯一的因素^[3,6]。

随着环境温度的下降,植物要保持膜的流动性,可能通过 3 种途径来达到:一是增加含有较多不饱和脂肪酸的类脂,如 PC、PE,从而增加总的脂肪酸不饱和度;二是不改变类脂配比,而改变类脂中脂肪酸的配比,增加其中不饱和脂肪酸的含量,如 18:2 和 18:3;三是前两种情况兼有^[3,6,14]。从前述试验结果看,可以认为露地栽培的常春藤为了维持膜脂的流动性,主要是通过增加含有较多不饱和脂肪酸的磷脂如 PC 来达到的(见表 1)。因此,抗寒植物之所以表现为抗寒力强,从膜脂结构的角度来看,原因可能有两个:一方面,抗寒植物在长期对一定温度的适应过程中,本身就具有较多的不饱和脂肪酸;另一方面,在低温逆境下,具有较强抗寒性的植物能够在膜脂中优先积累较多的不饱和脂肪酸并使之迅速参与膜的结构。所以,就植物的抗寒性而言,与其说植物抗寒性大小取决于其膜脂的不饱和度,不如说在低温适应过程中,低温使植物产生了一系列反应,包括大量合成、积累不饱和脂肪酸在内的综合变化,以维持自身的抗寒力,可能更为恰当。

参考文献:

- 1 汤章城. 植物磷脂及其作用. 植物生理学通讯, 1981, (8): 8~14
- 2 王洪春. 植物抗逆性与生物膜结构功能研究的进展. 植物生理学通讯, 1985, (1): 60~66
- 3 Murata N, Yamaya J. Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plant. *Plant Physiol.*, 1984, 74: 1016~1024
- 4 Hu Z L, Gulacar F O, Bao H, Buchs A. Composition and positional distribution of fatty acids in leaf phospholipids. *Arch. Sci. Geneve*, 1996, 49 (1): 11~20
- 5 沈 漫, 黄敏仁, 王明床, 等. 用自旋标记 ESR 波谱法研究杨树抗寒性. 林业科学, 1997, 33 (3): 212~218
- 6 杨福愉, 邢菁如, 陈文雯, 等. 抗冷与不抗冷水稻线粒体膜流动性的比较. 植物学报, 1986, 28 (6): 607~614
- 7 屠亚平, 杨福愉. 跨膜 Ca^{2+} 梯度通过调节膜脂的物理状况影响重组腺苷酸环化酶构象与活力. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24: 193~200
- 8 姜招峰, 杨世杰, 周 翔. 用荧光偏振法研究人胚肺二倍体成纤维细胞膜脂流动性. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17 (3): 238
- 9 沈 漫. 不同抗寒性的杜鹃品种叶片磷脂和脂肪酸组成差异性比较分析. 南京林业大学学报, 1997, 21 (2): 66~69
- 10 Bishop D J, Kenrick J R. Thermol properties of 1-hexadecan-og-2-trans-3-hexadecemoyl phosphatidylglycerols. *Phytochemistry*, 1987, 26 (11): 3065~3069
- 11 Lyons J M, Raison J K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant issue sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.*, 1970,

45: 386 ~ 389

- 12 Yoshida S. Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry back cell (*Morus bombycis* Koidz. cv. Goroji). *Plant Physiol.*, 1984, 76: 257 ~ 265
- 13 沈 漫, 黄敏仁, 王明麻, 等. 磷脂酰甘油分子种与杨树抗寒性关系的研究. *植物学报*, 1998, 40 (4): 349 ~ 355
- 14 Latsague M, Acevedo H. Forest-resistance and lipid composition of cold-hardened needles of Chilean conifer. *Phytochemistry*, 1992, 31 (16): 3419 ~ 3426

The Comparisons and the Analyses of Changes in Phospholipids from Leaf of Ivy Growing in Different Temperature Conditions

Shen Man

(Department of Plant Science and Technology, Beijing Agriculture College, Beijing 102206, China)

Abstract: Selected ivy (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) growing in open field and greenhouse separately as the experimental material, the fluidity and the composition of fatty acids in phospholipids isolated from the leaves were determined by fluorescence polarization, scanning thin-layer chromatography and gas chromatography methods. The results showed that ivy growing in open field in January possessed the higher level of unsaturated phospholipids (PC and PE) and fatty acids (16:1 + 18:1 + 18:2 + 18:3) than that growing in greenhouse. For ivy growing in open field, phosphatidyl-choline (PC) was the main factor to influence its membrane-lipid fluidity during it adapted to the low-temperature stress. By analyzing the differences of fluidity and composition of phospholipids from the leaves of ivy growing in different temperature conditions, the mechanism of the cold-resistance of evergreen broad-leaved plant in terms of the composition and the structure of membrane-lipids were discussed.

Key words: *Hedera nepalensis*; Phospholipids; Fatty acids; Membrane-lipid fluidity; Cold-resistance

欢迎订阅 2004 年下列期刊

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物育种栽培研究所共同主办的学术刊物。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。2004 年由双月刊改为月刊, 96 页/期, 定价: 20 元/册, 全年 240 元。可通过全国各地邮局订阅, 邮发代号: 82 - 336。也可向编辑部直接订购。编辑部地址: 北京中关村南大街 12 号中国农科院作物所《作物学报》编辑部 (邮编 100081); 电话: 010 - 68918548; 传真: 010 - 68975212; 银行汇款: 北京农行海淀北下关分理处; 帐户: 中国作物学会; 帐号: 801181 - 98; E-mail: xbzw@chinajournal.net.cn; zwx301@mail.caas.net.cn

《中国农业科学》中、英文版是中国农业科学院主办的学术性期刊。读者对象主要是国内外农业科学研究所、农业院校以及综合性大学等有关农业科学研究与管理人员。均为月刊, 大 16 开, 国内外公开发行。中文版国内邮发代号: 2 - 138, 国外代号: BM43, 每期 160 页, 定价 29 元, 全年定价 348 元。英文版国内邮发代号: 2 - 851, 国外代号: 1591M, 每期 80 页, 国内定价 20 元, 全年 240 元, 国外定价 20 美元, 全年 240 美元。编辑部地址: 北京中关村南大街 12 号; 邮政编码: 100081; 电话: (010) 68919808 68975146 68976244; 传真: 68976244; 电子邮件: zgnykx@mail.caas.net.cn; 网址: <http://www.ChinaAgriSci.com>

《中国生态农业学报》(原刊名《生态农业研究》)是由中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会主办的学术期刊, 适于国内外从事生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔、资源与环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生、管理工作者和基层从事生态农业建设的广大技术人员等阅读。大 16 开本, 每期定价 14.60 元, 全年 58.40 元, 邮发代号: 82 - 973, 全国各地邮局均可订阅, 漏订者可直接汇款至编辑部补订 (若从编辑部补订全年需另加邮资 12.00 元)。地址: (050021) 河北省石家庄市槐中路 286 号中国科学院《中国生态农业学报》编辑部; 电话: (0311) 5818007; E-mail: editor@ms.sjziam.ac.cn