

细胞质玻璃化与种子耐藏性的关系

杨学军*, 喻方圆

南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037

Relationship between Cytoplasmic Vitrification and Seed Storability

YANG Xue-Jun*, YU Fang-Yuan

College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

摘要: 文章介绍了细胞质玻璃化与种子耐藏性关系方面的研究进展, 包括以下几个问题: (1) 玻璃化状态的基本特征; (2) 玻璃化对细胞的保护作用; (3) 影响种子玻璃化转变的因素; (4) 细胞质玻璃化与种子耐藏性的关系。

关键词: 细胞质玻璃化; 种子贮藏; 劣变反应

保持种子的播种品质和保存种质资源, 特别是种质资源的长期保存, 均须选择经济高效的贮藏策略, 以期在节省成本的情况下取得最好的贮藏效果。影响种子耐藏性的关键因子是种子含水量和贮藏温度。因此, 种子含水量和贮藏温度一直是研究种子耐藏性的重点, 在这个领域的相关报道很多(Ellis 和 Roberts 1980a, b; Ellis 等 1989; Vertucci 1990; Vertucci 和 Roos 1993a; Vertucci 等 1994; Buitink 等 1998a, 1998b, 2000a)。在研究种子寿命与贮藏温度及种子含水量的关系中, Ellis 和 Roberts (1980a, b) 根据大麦(*Hordeum vulgare*) 种子中的研究结果, 提出预测种子寿命的改进活力方程, 该方程可以预测含水量在 5%~25% 的范围内和贮藏温度在 -20~40 之间的任何种批大麦种子在贮藏任何时间后的生活力百分数。这一方程定量地描述了种子含水量和贮藏温度对种子贮藏寿命的作用规律, 在种子研究中得到广泛的应用, 对种子贮藏实践有指导意义。

尽管 Ellis 和 Roberts 的种子活力方程很有价值, 但此方程只是一个基于有限资料的经验公式, 没有对种子老化的机制做出解释。在实际应用中, 其种子活力方程还存在一些问题: (1) 此种活力方程的应用是受条件限制的, 在低温和低含水量的情况下, 此种活力方程的预测可靠性会受影响(Vertucci 1990; Vertucci 和 Roos 1993; Vertucci 等 1994); (2) 此种种子活力方程中, 温度和含水量被看作是 2 个独立的变量(Roberts 和 Ellis 1989)。然而, 有关的理论研究(Vertucci 和 Roos 1993a, b) 和实验数据(Vertucci 和 Roos

1993a, b; Vertucci 等 1994) 都表明, 温度和含水量对种子老化的影响存在交互作用; (3) 不同种的种子, 其活力方程存在较大差异。因此, 依照种子活力方程所制订的种子贮藏策略, 其贮藏效果可能不是最佳的。

近年来, 一些研究者认为, 要透彻地解释含水量与贮藏温度对种子耐藏性的作用机制, 必须研究种子细胞质分子运动(cytoplasmic molecular mobility)与种子老化的关系。已有研究表明, 细胞质分子运动是影响种子和花粉贮藏稳定性的关键因子, 细胞质分子运动的快慢决定种子和花粉老化的速率(Leopold 等 1994; Buitink 等 1998a, b; Buitink 等 2000b)。众所周知, 高温和高湿会导致种子老化, 而高温高湿首先是导致细胞质分子运动加速(Buitink 等 1998a)。因此, 研究细胞质分子运动规律与种子老化的关系将有可能在深层次上揭示种子老化的机制。

与细胞质分子运动有关的一个问题是细胞质玻璃化状态的形成。所谓玻璃化, 是指溶液在一定条件下形成的粘滞度近似于固体的状态。玻璃化状态通常在低温或干燥的条件下形成。研究表明, 在干燥状态下的生物组织会玻璃化(Leopold 等 1994; Buitink 等 1996)。细胞质玻璃化状态的形成将显著提高其粘滞性, 高的粘滞性会大大降低细胞内有害化学反应的发生, 减缓细胞质化学组成和结构的变化, 从而延缓种子老化进程

收稿 2006-11-28 修定 2007-03-12

资助 国家自然科学基金(30271076)。

* E-mail: xjyang_jx@126.com; Tel: 025-85427403

(Leopold 等 1994; Buitink 等 1998b)。而一旦细胞质玻璃化状态融化后, 其粘滞性不符合通常的阿雷纽斯(Arrhenius)粘度公式规律(Roos 1995), 即细胞质粘滞性会迅速降低, 分子运动大大加快, 从而导致种子老化加速。因此, 在不同含水量和贮藏温度下, 细胞质玻璃化状态的熔点是影响种子耐藏性的临界点, 对这一要点的掌握与否将直接关系到种子贮藏的成败。种子细胞质玻璃化状态的形成功能条件及其与种子耐藏性的关系已成为研究热点, 有关报道很多, 现就这方面的研究进展作一介绍。

1 玻璃化状态的基本特征

玻璃化状态是一种亚稳态, 它具有不结晶和易碎的固态形式, 同时又有液态的分子无序性和物理特征(Franks 等 1991), 即体系以一种极粘滞的超冷冻液体形式存在, 因而玻璃化状态也称为无定形固体(Franks 1994)。Poole 等(1997)总结各种物质玻璃化过程, 提出液体也具多态性的理论, 认为一种多组分溶液(流动态)若在一定条件下蒸发失水后, 浓度会逐渐增加, 进而形成一种固态液体的状态即玻璃化状态(Poole 等 1997; Sun 和 Leopold 1994)。玻璃化状态的主要特征是其超高粘度, 体系粘度很高, 因而相对稳定(Williams 1994)。

玻璃化转变是指体系中由于成分或温度的变化引起凝聚液体的粘着力和扩散、流动的热力之间平衡的改变(Williams 1994), 这一转变点所对应的温度称为玻璃化转变温度(T_g)。在玻璃化转变前后, 体系中一系列物理和力学性质发生显著的不连续变化: 当体系处在低于或等于该物质的 T_g 值时就会形成玻璃化状态, 此时溶液由于其粘度极大而不能流动和扩散, 分子链处于粘滞状态, 只有较小的侧链和支链等能够运动, 分子运动能量低而几乎无活动和扩散。相反, 如果温度高于 T_g 值时, 体系处于液态, 粘度降低, 自由体积增大, 各种受分子扩散运动控制的变化反应加快(李春胜和王金涛 2006)。当水溶液失水时, 如果水溶液粘度很高并且降温速度非常快, 冰晶难以形成或没有充分时间形成, 水溶液就可以进入玻璃化状态。进入玻璃化状态时, 水分子不发生重排, 不产生结构和体积的变化, 可减轻机械损伤

和溶液效应的损伤。玻璃化状态形成时, 自由体积不断缩小, 达到玻璃化状态时自由体积达到最低值, 此时没有足够的空间来进行分子链构象的调整, 因而发生玻璃化转变是温度引起自由体积变化的结果, 而自由体积正是水分扩散过程和化学反应能力的控制因素, 在玻璃化状态下化学反应能力达到最低值(Sapru 和 Labuza 1993)。

2 细胞质玻璃化对细胞的保护作用

低温和低含水量下生物组织容易形成玻璃化状态(Buitink 等 1998a), 而生物细胞质玻璃化对细胞具有保护作用, 主要表现为: 由于玻璃化时细胞有很高的粘度, 可有效抑制分子扩散, 显著减缓有害化学反应, 各种生物降解过程受抑制; 细胞内的自由体积减小, 因而细胞结构的裂解得到防止; 在 T_g 值以下时体系中没有热转换, 因而可以忍耐极端的温度变化, 防止细胞成分结晶; 防止无序化的溶质过分集中, 从而可避免离子强度或 pH 的剧烈变化和细胞质成分的结晶(Leopold 1991); 这样细胞内大分子成分亲水位点的界面上氢键可得到保护, 但在重新吸水时它又可逆地溶解成液态, 而不会产生吸胀损伤。

玻璃化状态的形成对生物膜也具有保护作用。首先, 玻璃化状态的形成构成了平行于膜表面方向上的聚合力, 致使脂类的相变温度(T_m)降至初始温度(T_0)以下, 因而可以阻止膜发生相变(Zhang 和 Steponkus 1996; Wolfe 和 Bryant 1999; Koster 等 2000)。Oliver 等(1998)在研究脱水过程中糖类物质对膜磷脂相变的作用时发现, 糖溶液的玻璃化能阻止 T_m 的升高; Koster 等(1994)也观察到细胞在脱水过程中, 磷脂双层结构之间的糖溶液发生玻璃化会降低磷脂的 T_m 。但 Crowe 等(1998)则提出相反的观点, 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, 与玻璃化的形成没有关系。其次, 处于玻璃化状态时膜的延展性会降低, 因此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(Wolfe 和 Bryant 1999; Koster 等 2000)。同时玻璃化状态可以支撑一定的机械压力, 因而可以抵抗来自于平行于膜表面方向上的压力, 于是低温的效应减小, 脂类物质维持在流动相状态, 所以可以起稳定细胞膜的作用(Zhang 和 Steponkus

1996; Koster 等 2000)。这种稳定作用与玻璃化形成的位置有关, 如果玻璃化发生在膜内或近膜的微小区域内时, 才会对膜相变直接起作用; 而如果玻璃化发生在细胞主体溶液里, 这时玻璃化就通过减缓脱水组织中的某些化学反应的速率, 而对膜的相变间接产生影响(Karmas 等 1992; Slade 和 Levine 1995)。第三, 玻璃化的形成还可防止细胞质中结晶的形成, 保护细胞中的结构水(Bruni 和 Leopold 1991), 因而细胞膜维持在液晶态, 从而防止细胞质发生渗漏。

可见, 玻璃化状态时, 细胞的粘度高, 自由体积减小, 可以稳定细胞及亚细胞结构, 保护细胞内的各种生理生化过程。同时, 细胞膜内和近膜区域发生玻璃化, 可以稳定细胞膜的结构, 防止膜相变的发生, 从而维持膜对细胞的保护作用。

3 影响种子玻璃化转变的因素

3.1 水分含量 水分含量是影响体系 T_g 值的主要因素。水的 T_g 值极低, 为 -135 , 它是玻璃化的一种强力增塑剂; 增加体系中的含水量, 会增大自由体积, 为溶质的分子链运动提供所需空间, 致使分子链能够通过转动和位移而调整构象从而发生结构变化和化学反应; 水分子还会破坏聚合链间的氢键, 致使其刚性降低而柔性增强; 同时, 水还可减弱分子间极性基团的相互作用力, 因而分子链获得更大的活动性和堆砌性, 致使 T_g 值的降低(李春胜和王金涛 2006)。Vanhel 和 Blond (1999) 研究的结果表明, 每增加 1% 的水, T_g 值降低 5~10。

Gordon-Taylor 公式通常用于解释无定形体系的 T_g 值与玻璃化状态时的成份和水(增塑剂)的质量分数之间的关系, 公式如下:

$$T_g = (W_1 T_{g1} + k W_2 T_{g2}) / (W_1 + k W_2)$$

式中: k 是塑化常数; W_1 和 W_2 分别是成玻璃化状态溶液和水的质量分数; T_{g1} 和 T_{g2} 分别是成玻璃化状态成份和水的 T_g 值。战希臣等(2006)采用膨胀计法测定玉米(*Zea mays*)、番薯(*Ipomoea batatas*)、荞麦(*Fagopyrum esculentum*)及豌豆(*Pisum sativum*) 4 种植物淀粉的 T_g 值和考察不同水质量分数对玻璃化转变温度的影响, 并用 Gordon-Taylor 方程建立了 4 种淀粉的水质量分数与 T_g

值之间的数学关系式 $T_g = (-135M + kT_g') / (M + k)$ (式中: T_g 为淀粉玻璃化转变温度, M 为淀粉的干基含水率, T_g' 为淀粉中干物质的玻璃化转变温度, k 为拟合系数), 得出 T_g 值随着水质量分数的增加而降低的关系, 以及二者之间的定量表达式, 其预测值与实验测量值比较接近; 并用自由体积理论解释水作为增塑剂而影响淀粉玻璃化温度的, 因为水可增加体系的自由体积和降低体系的粘度, 与升温的作用一样, 水的增塑作用可增加处于玻璃化状态的淀粉无定形区分子链的活动性, 所以 T_g 值降低。

3.2 碳水化合物 碳水化合物是促进玻璃化状态形成的有效物质(Roos 1995), 它与生物组织内玻璃化状态的形成有关系(Koster 1991)。可溶性糖可促进细胞内含物的玻璃化, 低聚糖不仅提高细胞质的 T_g 值, 而且能够抑制种子脱水期间蔗糖的结晶, 致使生物组织在较高温度范围内进入玻璃化状态(Koster 和 Leopold 1988), 从而避免脱水对细胞的伤害。碳水化合物玻璃化状态的特点是其一一旦融化后, 粘度即急剧下降, 这一变化不符合阿雷纽斯粘度公式, 且在 T_g 值以上的 30 范围内分子运动是急剧增加的(Roos 1995; Champion 等 1997)。

高浓度糖及其它生物大分子是种子成熟干燥过程中细胞质粘度增高的主要原因, 也是种子玻璃化状态形成的原因(Williams 和 Leopold 1989), 可能正是这些糖分的积累, 从而可保证玻璃化状态的形成, 防止细胞的结构和成分发生变化, 而种子一旦吸水仍能够重新开始代谢活动。Caffrey 等(1991)指出, 葡萄糖与低聚糖占种子干物质的 10%~20%, 这些糖的混合物在抑制细胞内的结晶形成过程中起作用。Roos (1995)指出, 糖分促使玻璃化状态的形成是保证种子长期保存的主要因素, 玻璃化状态的高粘度及其伴随的低分子可保持蛋白质的稳定性、阻止脂质小体溶化、降低化学反应速率(如褐变反应)。Sun 和 Leopold (1995) 研究加速大豆(*Glycine max*)种子老化结果表明, 由于有玻璃化状态的存在, 大豆种子的糖水解产物渗漏明显受抑制。玉米胚中蔗糖占干重的 17%, 棉子糖占 3%; 在低含水量和相关温度范围内, 占总干重 20% 的糖分具有极强的形成玻璃

化的趋势(Williams 和 Leopold 1989)。宽叶香蒲(*Typha latifolia*)花粉中的主要可溶性糖是蔗糖(约占干重的25%),它是形成玻璃化状态的主要物质(Buitink 等2000b)。黄雪梅等(2006)认为,黄皮(*Clausena lansium*)胚轴在高浓度蔗糖作用下由不耐脱水变为较耐脱水,这可能与蔗糖的渗入和构成玻璃化的良好物质基础有关。

有人在食品的研究中也发现,碳水化合物对 T_g 值的影响很大;几种糖类的 T_g 值由高到低的顺序为:乳糖>麦芽糖>蔗糖>葡萄糖(李春胜和王金涛2006)。Caffrey 等(1991)的实验表明,低聚糖的存在可抑制非还原性二糖在干燥时的结晶;但也有实验表明,低聚糖存在与否并不影响二糖的结晶,无低聚糖存在时蔗糖与还原性糖混合物在干燥状态也可进入玻璃化状态,可溶性糖的存在本身即可导致玻璃化,而低聚糖的存在只是提高可溶性糖混合物的 T_g 值(李春胜和王金涛2006)。从耐脱水的花生(*Arachis hypogaea*)胚轴中提取的可溶性糖及热稳定蛋白均有较高的 T_g 值,因此低聚糖的存在可使种子或胚轴在较高温度范围内进入玻璃化状态,从而可避免脱水对细胞的伤害(Bruni 和 Leopold 1991; Koster 1991)。

3.3 蛋白质及其它高分子物质 Buitink 等(1998a, 1999)用旋转探针技术研究大苞凤仙花(*Impatiens balsana*)和甜椒(*Capsicum annum*)种子中低聚糖与种子寿命的关系时发现,由于温度升高导致的玻璃化状态的融化只会略微加剧细胞质内分子运动的,但相同的温度则显著加剧非晶体糖分子的运动,因此认为低聚糖不会影响细胞内玻璃化状态的稳定性。Buitink 等(2000a)以饱和转化顺磁波谱法(ST-EPR)、核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)和傅立叶转换红外光谱(FT-IR)技术进一步研究的结果表明,是蛋白质而不是糖在细胞内玻璃化状态的形成中起作用。Taylor 等(1995)在研究韭葱(*Allium porrum*)、洋葱(*Allium cepa*)、甘蓝(*Brassica oleracea*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)和甜椒种子老化时观察到,干种子中的氨基酸含量随着种子老化而缓慢增加,吸胀的韭葱、洋葱和甘蓝种子的浸泡液中氨基酸含量随着种子老化而大量增加,但这并不能解释是由于种子内贮藏蛋白质分解导致玻璃化状态稳定性的降低,进而加剧种子

老化,还是由于玻璃化状态的丧失导致蛋白质分解的原因。但很明显,糖分并不是参与细胞内玻璃化状态形成的唯一组分。

蛋白质的 T_g 值都相对较高,热处理后的蛋白 T_g 值明显降低,而且加入蛋白质可以在很大程度上改变玻璃化状态体系的特性(Sun 和 Leopold 1997; Wolkers 等1998)。Wolkers 等(1998)认为蛋白质中的氨基酸可以显著地改变糖分的特性,从而影响 T_g 值。Magoshi 等(2002)用差示扫描量热仪(DSC)、热重量分析法(TG)、热膨胀法、X射线衍射法和红外光谱法研究水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和大豆中蛋白质热力学特性的结果表明,从水稻、小麦和大豆中提取的无定形的醇溶谷蛋白的 T_g 值分别是160、172和150,而结晶则出现在196、205和199;而它们的热降出现在228、250和270。

聚合物体系的化学组成和分子量是影响 T_g 值的主要因素,因而在体系中加入一定种类和数量的高分子物质可以提高体系 T_g 值。Buitink 等(2000b)报道,宽叶香蒲花粉的玻璃化融化的分子运动和糖类的不同,表明花粉中除糖类以外还有其它分子参与了玻璃化的形成。Slade 和 Levine (1991)指出, T_g 值与种子中的多元醇含量几乎呈线性的变化,多元醇含量越高, T_g 值也越高。

3.4 内含物的平均分子量 对低分子量的高聚物来说,其平均分子量越大,分子结构越坚固,分子自由体积越小,体系粘度越高,因而 T_g 值也越高;但是对于分子量超过某一临界值(临界分子量)的高聚物来说, T_g 值不再依赖于分子量,而是趋于一个常数(李春胜和王金涛2006)。Roos 和 Karel (1991)测量不同葡萄糖值(DE值)的麦芽糊精在不同水分含量时 T_g 值的结果表明,在相同的水分含量下,麦芽糊精的 T_g 值随着DE值的增大(即分子量减小)而降低;但对不同种类的淀粉而言,支链淀粉的分子侧链越短和量越多,则增塑效果越强, T_g 值也相应越低;此项研究还观察到淀粉的结晶区虽不参与玻璃化转变,但能限制淀粉主链的活动,因此 T_g 值随着淀粉结晶度的增大而增大。

詹世平等(2006)采用相对粘度法、膨胀计法与DSC法测定淀粉同系物的相对粘度和 T_g 值时,

借助 Fox 和 Flory 模型 $T_g = T_g^0 - K_g/M_n$ (式中: M_n 是数均分子量; T_g^0 是相应于高分子链聚合度 (\bar{DP}) 无穷大时的 T_g ; K_g 是一实验常数), 建立了淀粉同系物的相对粘度和 T_g 值之间的定量关系式 $T_g = 136.2 - 38.5/[\eta]$ (式中 $[\eta]$ 为特性粘度); 并用此种关系式, 间接预计淀粉同系物分子量对 T_g 值影响的结果表明, T_g 值随着分子量的增加而增加, 当分子量增加到一定程度后, T_g 值增加而趋于平缓。

3.5 内含物的溶质特性 体系中溶质的溶解度和结晶性质是决定溶液特征的主要因素, 因而会影响玻璃化转变。人们在生物膜的研究中发现, 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作用, 并且溶质的这种作用是不同于单纯的渗透压效应和体积效应的, 它与溶液发生玻璃化的温度也有关系(Wolfe 和 Bryant 1999; Koster 等 2000)。Koster 等(1996)的实验还表明, 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而不结晶时才能形成玻璃化状态, 在膜间区域, 尽管溶液浓度很高, 只要没有结晶存在, 就不会影响玻璃化状态的形成。

从以上的分析可以看出, 种子细胞质玻璃化状态的形成是多种因素综合作用的结果, 其中水分含量决定着细胞内自由体积的大小, 可能是影响玻璃化转变的最主要因素。而碳水化合物、蛋白质和其它高分子物质是通过影响细胞内溶液的特性(特别是溶液的粘度)对玻璃化产生作用的; 由于种子细胞内含物的种类多种多样, 这些因素之间可能也是相互作用的。

4 细胞质玻璃化与种子贮藏的关系

Williams 和 Leopold (1989)最早发现干玉米种子的细胞质是以玻璃化状态存在的, 玉米种子玻璃化可以发生在胚的脂类和非脂类成份中, 在含水量为 $0.12 \text{ g (H}_2\text{O)} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)时, 常温下就有玻璃化现象, 并且 T_g 值有随着种子含水量下降而升高的趋势; 因此他们认为干燥种子一般以玻璃化状态的形式存在, 而玻璃化状态是种子劣变的生物物理学障碍。为了证实细胞质玻璃状态与种子贮藏寿命的关系, Sun 等(1994)研究大豆、豌豆和玉米种子细胞质玻璃化状态与 Ellis 和 Roberts (1980a, b)的种子活力方程之间的关系时发现,

如果细胞质玻璃化状态消失, 种子的老化速率即加快, 说明种子细胞质玻璃化状态的形成是保持种子寿命的关键所在。Sun 和 Leopold (1993)对大豆加速老化的实验也验证了这一点。Sun (1997)进一步研究大豆、豌豆和玉米种子细胞质玻璃化状态发现种子长期贮藏所要求的温度都接近或低于 T_g 值, 表明种子长期贮藏须有玻璃化状态的存在。据 Sacandé 等(1998)报道, 印度苦楝 (*Azadirachta indica*)在 20% 和 75% 相对湿度(RH)下, 其子叶和胚轴都不处于玻璃化状态, 种子寿命最高只有 6 个月; 而在 20% 和 50% RH 下的种子组织即处于玻璃化状态, 其寿命可延长至 2 年以上。

脱水时玻璃化状态的形成是降低贮藏过程中老化劣变反应速率的主要因素(Leopold 等 1994), 种子贮藏中的劣变与玻璃化状态向液态转变有关, 种子劣变速率受玻璃化转变的动力学控制。种子在贮藏中会持续老化直至最后丧失发芽能力, 导致种子老化的原因可能是以自由基为介质的脂质过氧化、细胞完整性破坏、蛋白质降解、细胞膜结构破坏、酶活性降低、非酶促反应和遗传物质的完整性受到破坏所致(Priestley 1986; Wettaufer 和 Leopold 1991; Smith 和 Berjak 1995)。种子在干燥状态下的存活与玻璃化有密切关系(Burke 1986), 在长期贮藏中, 由于温度和含水量都很低, 种子细胞质可能处于玻璃化状态, 粘度很高且分子运动速率很低, 因而可以稳定细胞的结构和抑制许多贮藏中的劣变反应(Bruni 和 Leopold 1991; Williams 和 Leopold 1989; Sun 和 Leopold 1993, 1994, 1997; Leopold 等 1994; Leprince 和 Walters-Vertucci 1995; Sun 等 1994, 1998b; Buitink 等 1998a, 2000a)。玻璃化状态的存在可以降低贮藏中的种子和花粉的老化速率(Sun 1997); Buitink 等(1998a)的花粉老化试验证实了这一点, 即当贮藏温度或含水量上升时, 种子由玻璃化状态融化成液态, 粘度下降引起分子运动速率上升, 种子的内部物理和化学反应都加速。在一定的含水量和贮藏温度范围内, 分子运动速率是花粉和种子老化速率的直接表征(Buitink 等 1999, 2000b)。细胞膜是有害反应最可能伤害的部位(Van Bilsen 和 Hostra 1993), 细胞质的粘度是抑制

膜成分运动的主要因素,因而可以影响老化反应的进行;劣变过程中的自由基产生和糖类水解也可以由于贮藏中的玻璃化而有效地得到抑制(Sun和Leopold 1995, 1997)。杨晓泉等(1998)发现花生胚轴中的可溶性糖在干燥条件下可与热稳定蛋白(沉降系数2S)结合,并以玻璃化的形式消除此种蛋白的干燥结晶现象,从而避免由脱水导致的蛋白质变性,促使胚轴或种子在较高温度下进入玻璃化状态,因而种子能够抵御脱水的伤害。大豆胚轴的 T_g 值在老化过程中下降,最后种子组织失去进入玻璃化状态的能力,活力就随之下降(Sun和Leopold 1993, 1994)。

种子的 T_g 值是含水量作用的结果,而种子是否处于玻璃化状态由种子含水量与贮藏温度综合决定。Sun (1997)认为,玻璃化对种子贮藏的作用有三:(1)细胞质玻璃化降低脱水过程中分子结构和细胞结构的变化,可以稳定生物结构;(2)玻璃化时的粘度高可以固化细胞成分,防止有害化学反应的发生和扩散,以及结构化学位点的改变;(3)玻璃化的形成能有效防止胞质结晶和pH值突变对种子的伤害。Sun (1997)研究玉米、豌豆和大豆种子老化的加速和物理学模型的计算结果证实,种子长期储藏的最高温度与 T_g 值具有一致性,两者呈显著正相关,即 T_g 值越高,种子的耐藏性越好,而且一旦种子丧失玻璃化状态后,劣变就会迅速发生,因此认为种子玻璃化状态的发现对人们进一步认识种子耐藏性和活力有一定的意义,玻璃化状态在种子贮藏过程中对其活力的维持很重要,可能是优化种子贮藏条件中的最主要因素。

4.1 含水量与种子玻璃化及耐藏性 正常性种子在贮藏过程中的劣变主要由水分的物理状态和特性决定,水分状态转换热容的变化与种子活力变化关系密切。种子内的降解反应可能受水分的化学势和化学反应得到水的能力控制(Vertucci和Roos 1993b),水分同样可以在玻璃化状态的粘度形成中起作用,水对细胞质玻璃化的增塑作用可能会引起不同含水量种子相对耐藏性的改变。种子中水分的增塑作用对玻璃化状态的影响与耐藏性有密切联系,因为它可以引起 T_g 值的下降。从某种意义上说,种子贮藏时的最适含水量系指体系中的流动性达到最小,同时又有足够的水分来维持它

的保护作用(Vertucci和Farrant 1995)。流动性是决定种子老化速率的因素;一旦流动性达到最低,种子老化的速率将依赖于水分的保护作用[包括防止液相转变(Leprince等1993;Vertucci和Farrant 1995)、保护蛋白质分子间的相互作用(Dizdaroglu 1991)、抑制自由基对细胞成分的攻击(Vertucci和Farrant 1995)]。在最适含水量以上时种子含水量的减少随着含水量下降会降低水相的流动性,致使种子粘度上升而形成玻璃化状态,种子耐藏性即上升。

低含水量的生物体内形成玻璃化状态有利于其耐脱水性的提高,低含水量的玉米种子胚轴中玻璃化会有效的抑制分子运动,因而脱水对种子的存活有利(Williams和Leopold 1989)。Buitink (1998a)研究不同贮藏温度下豌豆种子最适含水量的结果表明,种子贮藏时的最适含水量随着温度而变化,种子的寿命与细胞质内分子流动性呈显著负相关,水分含量降低,分子的运动性即降低,分子运动性最小时的含水量与耐藏性最大时的含水量非常接近。Leprince和Walters-Vertucci (1995)对种子贮藏于极低含水量时玻璃化状态的作用有怀疑,他们在极低含水量时并未观察到玻璃化状态的转变。尽管种子中的结晶和玻璃化状态之间发生分离是可能的(Sun和Leopold 1997),但这不能说在极低含水量时细胞质的玻璃化状态就会消失,很有可能是在极低含水量下,玻璃化转变时的热容变化已下降至DSC检测的极限(Leopold等1994)。

有研究证实,含水量有一个极限值,超过此含水量时再降低含水量不会增加种子寿命(Ellis等1990),而且对种子活力和生活力可能还起负作用(Vertucci和Roos 1993a;Vertucci等1994)。一些过于干燥的种子其老化速率会增加,表面上看起来在极低含水量时的玻璃化状态与耐藏性没有什么关系,然而值得注意的是水分除了在种子细胞质玻璃化中起增塑作用以外可能还有其它的作用。有人对干燥的生物体内水分状态研究的结果表明,水分本身也是生物结构中的重要成分(Bruni和Leopold 1992);除去这种结构水后,生物结构的稳定性会降低,因而威胁到干种子存活(Sun和Leopold 1997)。在极低含水量时的种子老化加

剧,可能是由于玻璃化状态的保护作用可为结构水的过度失去所产生的脱水伤害而抵消。由此看来,脱水作用可能有两个方面,脱水会使 T_g 值上升而形成玻璃化,从而引起保护作用的增强;但过度脱水会引起结构水的丧失而降低大分子的稳定性,例如糖的玻璃化溶液中干燥蛋白质的结构稳定性会在含水量低于5%~8%时会受到破坏(Bell等1995)。

Buitink等(2000b)以极性自旋分子探针(polar spin probe),采用顺磁波谱法(EPR)测定不同含水量和温度时的宽叶香蒲的花粉细胞质分子运动速率的结果表明,宽叶香蒲花粉含水量为 $0.06 \text{ g (H}_2\text{O)} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)时的分子运动速率最小,如果继续降低含水量,则分子运动速率上升,分子运动速率最小值时的含水量随温度的下降而提高,与老化的模型相一致;他们认为,可能是在分子运动速率最低值以下除去细胞质玻璃化体系的水分会形成空腔,从而为分子运动提供更多自由运动的空间,引起分子运动速率上升进而加速老化,另外从组织中移去结构水会引起大分子结构完整性的丧失,从而引起老化加快(Sun等1997)。Buitink等(1999)在花生胚轴的研究中也得到与此一致的结果。

4.2 温度与种子玻璃化及耐藏性 Sacandé等(2000)认为,考虑种子贮藏的最适含水量时不能撇开温度,降低含水量并不能代替低温的作用。种子在玻璃化状态时尤其是在低温贮藏条件下,生理代谢活动极微,例如在玻璃化状态时脂质过氧化通常受到抑制(Karmas等1992),这样便可以最大程度的延长种子寿命。有研究表明, T_g 值与种子长期贮藏所要求的最高温度相一致,贮藏温度过于低于 T_g 值时,种子中劣变反应可能会受到更大程度的抑制,因而种子的耐藏性增大。Sun等(1994)研究大豆、豌豆和玉米种子细胞质玻璃化状态与Ellis和Roberts(1980a)的种子活力方程之间的关系时发现,用Ellis和Roberts(1980a,b)的种子活力方程计算不同含水量种子贮藏一定时期后的最高温度时得到的结果与相应含水量下的种子贮藏一定时期的细胞质玻璃化形成时的温度高度吻合。

贮藏温度在 T_g 值附近变化时,种子内经历着玻璃化状态转变,种子活力的丧失速率与 $T-T_g$ 值之间呈正相关;贮藏温度保持恒定时,由于水的

增塑作用,含水量不同会引起 T_g 值的变化, $T-T_g$ 值也会变动,从而引起种子活力发生变化。 $T > T_g$ 时,玻璃化状态即会消失,玻璃化状态的丧失会大大降低细胞质的粘度,因而增加种子细胞内的分子运动,这时自由体积的增大与最终引起种子死亡的劣变反应速率常数直接相关,从而引起种子中的劣变反应加速进行(Sun和Leopold 1994)。Buitink等(2000b)报道,温度提高会加速宽叶香蒲花粉细胞内的分子运动,老化速率也增大。在 T_g 以下(即 $T-T_g < 0$)时,花粉中的分子运动速率也有随着温度的增加而呈线性增加的趋势;但温度上升到 T_g 以上时,分子运动虽不像糖类玻璃化状态那样急剧增加,而是随着温度的增加仍然呈线性增加的趋势,但是比低于 T_g 时的曲线要陡。因而温度升高引起花粉中玻璃化状态的融化不会引起细胞质分子运动的急剧上升,这对花粉在自然条件下生存是具有生态学意义的,因为即使环境条件变化引起玻璃化状态的消失也不会引起分子运动速率的急剧增加,这样,由不利环境所引起的花粉老化在很大程度上受到抑制。但温度在接近 T_g 变化时花粉老化速率即与温度的线性关系发生显著变化,表明玻璃化状态的消失仍然会引起花粉老化的动力学变化。绿豆(*Vigna radiate*)种子胚轴含水量增加时 T_g 值则下降,含水量小于 $0.08 \text{ g (H}_2\text{O)} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)时,胚轴在常温下就处于玻璃化状态,低于和高于 T_g+40 ($T-T_g=40$)时种子老化的动力学明显不同,低于 T_g+40 时,由 $T-T_g$ 作用引起的种子老化速率常数缓慢增加,高于 T_g+40 时种子老化即加快;种子贮藏于高于 T_g+40 且 $T-T_g$ 相同时,贮藏温度对种子老化的作用比含水量更重要,温度低于 T_g 时[含水量 $< 0.08 \text{ g (H}_2\text{O)} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)]即发生脂质过氧化、糖类水解几乎完全受抑制,含水量在 $0.10 \sim 0.16 \text{ g (H}_2\text{O)} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)范围内,脂质发生过氧化、糖类水解和Amadori反应(由于葡萄糖的醛基和蛋白质的氨基结合引起的一系列非酶促反应)随着 $T-T_g$ 值的增大而增加,含水量 $> 0.16 \text{ g (H}_2\text{O)} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)时,脂质过氧化随着 $T-T_g$ 值的增大而增加;Maillard反应(由于醛或还原糖的羰基与蛋白质的氨基结合引起的一系列非酶促反应)的速率也表现出相同的趋势(Murthy等2003)。

综合上述研究可以看出, 细胞质处于玻璃化状态时, 可减缓贮藏中的种子老化劣变, 对种子贮藏是有利的。低含水量时种子细胞质于玻璃化状态, 可以提高种子耐藏性; 但含水量过低, 水分对细胞的保护作用会丧失, 同时由于过度失去结构水也会降低生物大分子结构的稳定性, 反而会降低耐藏性。种子细胞质玻璃化还与贮藏温度有关, 种子贮藏所要求的温度与细胞质玻璃化转变温度相一致。含水量和贮藏温度是综合决定种子细胞质是否处于玻璃化状态, 是种子贮藏中最主要的因素。

5 结语

综上所述, 种子细胞质玻璃化与种子耐藏性有密切关系, 细胞质玻璃化受种子中贮藏物质的成分和比例的影响, 其间关系是相当复杂, 应深入研究。具体来说, 以下几个方面的研究可能很重要: (1) 影响种子细胞质玻璃化转变温度的因素, 特别是种子内贮藏物质的种类、数量与玻璃化转变温度的关系; (2) 细胞质玻璃化转变与种子老化过程中有关劣变反应的关系; (3) 扩大种子细胞质玻璃化转变的物种研究范围, 特别是生产应用中急需解决的问题的研究。

参考文献

- 黄雪梅, 宋松泉, 傅家瑞(2006). 在蔗糖预培养诱导耐脱水性过程中黄皮胚轴的水分状态 and 可溶性蛋白含量的变化. 植物生理与分子生物学学报, 32 (2): 245~251
- 李春胜, 王金涛(2006). 论玻璃化转变温度与食品成分的关系. 食品研究与开发, 27 (5): 32~34
- 杨晓泉, 姜孝成, 傅家瑞(1998). 花生种子耐脱水力的获得及与膜透性、水分状态的关系. 中山大学学报(自然科学版), 37 (1): 78~82
- 詹世平, 陈淑花, 刘华伟, 李卓, 陈理, 张欣华(2006). 分子量对淀粉玻璃化转变温度的影响. 食品工业科技, 27 (3): 55~57, 60
- 战希臣, 陈淑花, 詹世平, 张欣华(2006). 含水量对淀粉玻璃化转变特性的影响. 精细化工, 23 (4): 397~399
- Bell LN, Hageman MJ, Muraoka LM (1995). Thermally induced denaturation of lyophilized bovine somatotropin and lysozyme as impacted by moisture and excipients. J Pharm Sci, 84: 707~712
- Bruni F, Leopold AC (1991). Glass transitions in soybean seed: relevance to anhydrous biology. Plant Physiol, 96: 660~663
- Bruni F, Leopold AC (1992). Pools of water in anhydrobiotic organisms. A thermally stimulated depolarization current study. Biophys J, 63: 663~672
- Buitink J, Claessens MMAE, Hemminga MA, Hoekstra FA (1998a). Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seed and pollen. Plant Physiol, 118: 531~541
- Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA (1999). Characterization of molecular mobility in seed tissues: an electron paramagnetic resonance spin probe study. Biophys J, 76: 3315~3322
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000b). The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen: interpretation based on cytoplasmic mobility. Plant Cell Environ, 23: 967~974
- Buitink J, van den Dries IJ, Hoekstra FA, Alberda M, Hemminga MA (2000a). High critical temperature above T_g may contribute to the stability of biological systems. Biophys J, 73: 1119~1128
- Buitink J, Walters C, Hoekstra FA, Crane J (1998b). Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water content: interpretation on the basis of water activity and glass concepts. Physiol Plant, 103: 145~153
- Buitink J, Walters-Vertucci C, Hoekstra FA, Leprince O (1996). Calorimetric properties of dehydrating pollen (analysis of a desiccation-tolerant and an intolerant species). Plant Physiol, 111: 235~242
- Burke MJ (1986). The glass state and survival of anhydrous biological systems. In: Leopold AC(ed). Membranes, Metabolism and Dry Organism. New York: Cornell University Press, 358~364
- Caffrey M, Fonseca V, Leopold AC (1991). Lipid-sugar interactions: relevance to anhydrous biology. Plant Physiol, 86: 754~758
- Champion D, Herve H, Blond G, Le Meste M, Simatos D (1997). Translational diffusion in sucrose solutions in the vicinity of their glass transition temperature. J Phys Chem B, 101: 10674~10679
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. Annu Rev Physiol, 60: 73~103
- Dizdaroglu M (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. Free Radical Biol Med, 10: 225~242
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1989). A comparison of the low-moisture content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity in twelve species. Ann Bot, 63: 601~611
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1990). Moisture content and the longevity of seeds of *Phaseolus vulgaris*. Ann Bot, 66: 341~348
- Ellis RH, Roberts EH (1980a). Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann Bot, 45: 13~30
- Ellis RH, Roberts EH (1980b). The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.). Ann Bot, 45: 31~37
- Franks F (1994). Long-term stabilization of biologicals. Bio/Technol, 12: 253~256
- Franks F, Hatley RHM, Mathias S (1991). Materials science and the production of shelf-stable biologicals. Biol Pharm, 4: 38~42, 55
- Karmas R, Buera MP, Karel M (1992). Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. J Agric

- Food Chem, 40: 873~879
- Koster KL (1991). Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol*, 96: 302~304
- Koster KL, Lei YP, Anderson M, Martin S, Bryant G (2000). Effects of vitrified and non-vitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transition. *Biophys J*, 78: 1932~1946
- Koster KL, Leopold AC (1988). Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol*, 88: 829~832
- 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, Webb MS, Bryant G, Lynch DV (1994). Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behaviour of the phospholipid. *Biochim Biophys Acta*, 1193: 143~150
- Leopold AC (1991). Coping with desiccation. In: Alschner RG, Cumming JR (eds). *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. New York: Wiley-Liss Inc, 57
- Leopold AC, Sun WQ, Bernal-Lugo I (1994). The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci Res*, 4: 267~274
- Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD (1993). The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci Res*, 3: 231~246
- Leprince O, Walters-Vertucci C (1995). A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. *Plant Physiol*, 109: 1471~1481
- Magoshi J, Becker MA, Han Z, Nakamura S (2002). Thermal properties of seed proteins. *J Thermal Anal*, 70: 833~839
- Murthy UM, Kumar PP, Sun WQ (2003). Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J Exp Bot*, 54 (384): 1057~1067
- Oliver AE, Hinch DK, Crowe LM, Crowe JH (1998). Interactions of arbutin with dry and hydrated bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 1370: 87~97
- Poole PH, Grande T, Angell CA, McMillan PF (1997). Polymorphic phase transitions in liquids and glasses. *Science*, 275 (5298): 322~323
- Priestley DA (1986). *Seed Aging: Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil*. New York: Comstock Publication, 304
- Roberts EH, Ellis RH (1989). Water and seed survival. *Ann Bot*, 63: 39~52
- Roos Y (1995). *Phase Transitions in Foods*. London: Academic Press Ltd, 190
- Roos Y, Karel M (1991). Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnol Prog*, (7): 49~53
- Sacandé M, Buitink J, Hoekstra FA (2000). A study of water relations in neem (*Azadirachta indica*) seed that is characterized by complex storage behaviour. *J Exp Bot*, 51 (344): 635~643
- Sacandé M, Hoekstra FA, Van Pijlen JG, Groot SPC (1998). A multifactorial study of conditions influencing neem (*Azadirachta indica*) seed storage longevity. *Seed Sci Res*, 8: 473~482
- Sapru V, Labuza TP (1993). Glassy state in bacterial spores predicted by polymer glass-transition theory. *J Food Sci*, 58 (2): 445~448
- Slade L, Levine H (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 30: 115~360
- Slade L, Levine H (1995). Glass transitions and water-food structure interactions. *Adv Food Nutr Res*, 38: 103~269
- Smith MT, Berjak P (1995). Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: Kigel J, Galili G (eds). *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker Inc, 701~746
- Sun WQ (1997). Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at $T > T_g$ and the plasticization effect of water on storage stability. *Ann Bot*, 79: 291~297
- Sun WQ, Davidson P, Chan HS (1998). Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *Biochim Biophys Acta*, 1425: 245~254
- Sun WQ, Irving TC, Leopold AC (1994). The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol Plant*, 90: 621~628
- Sun WQ, Koh DCY, Ong CM (1997). Correlation of modified water sorption properties with the decline of storage stability of osmotically-primed seeds of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Seed Sci Res*, 7: 391~397
- Sun WQ, Leopold AC (1993). The glassy state and accelerated aging of soybeans. *Physiol Plant*, 89: 767~774
- Sun WQ, Leopold AC (1994). Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. *Ann Bot*, 74: 601~604
- Sun WQ, Leopold AC (1995). The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiol Plant*, 94: 94~105
- Sun WQ, Leopold AC (1997). Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp Biochem Physiol*, 117: 327~333
- Taylor AG, Lee SS, Beresniewicz MM, Paine DH (1995). Amino acid leakage from aged vegetable seeds. *Seed Sci Technol*, 23: 113~122
- Van Bilsen DGJL, Hoekstra FA (1993). Decreased membrane integrity in aging *Typha latifolia* L. pollen: accumulation of lysolipids and fatty acids. *Plant Physiol*, 101: 675~682
- Vanhal I, Blond G (1999). Impact of melting conditions of sucrose on its glass transition temperature. *J Agric Food Chem*, (47): 4285~4290
- Vertucci CW (1990). Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. *Biophys J*, 58: 1463~1471

- Vertucci CW, Farrant JM (1995). Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J, Galili G (eds). *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker Inc, 235~271
- Vertucci CW, Roos EE (1993a). Seed moisture content, storage, viability and vigour (correspondence). *Seed Sci Res*, 1: 277~279
- Vertucci CW, Roos EE (1993b). Theoretical basis of protocols for seed storage . The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Sci Res*, 3: 201~213
- Vertucci CW, Roos EE, Crane J (1994). Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. *Ann Bot*, 74: 531~540
- Wettaufer SH, Leopold AC (1991). Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol*, 97: 165~169
- Williams RJ (1994). Methods for determination of glass transitions in seeds. *Ann Bot*, 74: 525~530
- Williams RJ, Leopold AC (1989). The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol*, 89: 977~981
- Wolfe J, Bryant G (1999). Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39: 103~129
- Wolkers WF, Van Kilsdonk MG, Hoekstra FA (1998). Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. *Biochim Biophys Acta*, 1425: 127~136
- Zhang J, Steponkus PL (1996). Proposed mechanism for depression of the liquid-crystalline-to-gel phase transition temperature of phospholipids in dehydrated sugar-phospholipid mixtures. *Cytobiology*, 33: 21