

# 低温对水稻幼苗类囊体膜脂肪酸组分和膜脂过氧化的影响

王 萍<sup>1</sup> 张成军<sup>1</sup> 陈国祥<sup>1,\*</sup> 王 静<sup>1</sup> 施大伟<sup>1</sup> 吕川根<sup>2</sup> 左 敏<sup>1</sup> 刘蓉蓉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京师范大学 生命科学学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,江苏 南京 210097 ;<sup>2</sup>江苏省农业科学院 粮食作物研究所,江苏 南京 210014 ; \* 通讯联系人 ,E mail : gxchen@njnu .edu .cn)

## Effects of Low Temperature on Fatty Acid Composition of Thylakoid Membranes and Lipid Peroxidation in Leaves of Rice Seedlings

WANG Ping<sup>1</sup> , ZHANG Cheng jun<sup>1</sup> , CHEN Guo xiang<sup>1,\*</sup> , WANG Jing<sup>1</sup> , SHI Da wei<sup>1</sup> , LU Chuan gen<sup>2</sup> , ZUO Min<sup>1</sup> , LIU Rong rong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology of Jiangsu Province , College of Life Sciences , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China ; <sup>2</sup> Institute of Food Crops , Jiangsu Academy of Agricultural Sciences , Nanjing 210014 , China ; \* Corresponding author , E mail : gxchen@njnu .edu .cn)

Abstract : A newly developed super-high yielding hybrid rice Liangyoupeijiu and a traditional hybrid rice Shanyou 63 (as control) were used to study the effects of low night temperature on leaves , mainly by measuring their lipid peroxidation and fatty acid composition of thylakoid membranes with two treatment temperatures 10°C and 25 °C . In Shanyou 63 , chlorophyll content in rice leaves was decreased obviously with the duration at low temperature , whereas it did not decrease statistically in Liangyoupeijiu . For both of the two hybrids , the contents of 16 : 0 and 18 : 0 components at 10 °C were significantly decreased , but there were no marked changes when treated at 25 °C , and the contents of both 16 : 0 and 18 : 0 components in Liangyoupeijiu were higher than those in Shanyou 63 . The contents of 18 : 1 , 18 : 2 and 18 : 3 component were increased statistically in both of the two hybrids , but those treated at 25 °C increased smoothly . And the content of 18 : 3 component increased less than that of 18 : 2 . The IUFA (index of unsaturated fatty acid) of fatty acid was increased in the two hybrids , being lower in Liangyoupeijiu than in Shanyou 63 . MDA content of the two hybrids showed a similar changing pattern to O<sub>2</sub><sup>-</sup> content , but the MDA content in Liangyoupeijiu was not increased statistically . The results indicated that , Liangyoupeijiu may be not sensitive to low temperature , and it may have strong chilling resistance at the seedling stage . Under the chilling conditions , there was a close relationship between IUFA and lipid peroxidation , and both of them were associated with cold adaptation in rice , which suggested that the IUFA may be an indicator of chilling resistance . The changes in fatty acid composition and protection system on membranes were the key factor of cold adaptation , especially the latter .

Key words : rice (Oryza sativa) ; low temperature ; thylakoid ; fatty acid ; lipid peroxidation ; cold tolerance

摘 要 : 以高产杂交稻组合两优培九和常规杂交稻汕优 63 为材料 , 设 10 °C 低温和 25 °C 常温对照两个处理 , 研究了夜间低温对幼苗类囊体膜膜脂过氧化和脂肪酸组分的影响。低温处理后 , 两个组合叶片的叶绿素含量明显下降 , 但两优培九下降幅度较小。两个组合的低温处理组脂肪酸组分中的 16 : 0 和 18 : 0 含量下降 , 常温对照组的下降幅度较小 ; 而低温处理组脂肪酸组分中的 18 : 1、18 : 2 和 18 : 3 含量均上升。脂肪酸的不饱和度均呈上升趋势 , 但两优培九不饱和度整体上比汕优 63 小。低温处理下 , 两个组合的 MDA 和超氧阴离子含量都呈上升趋势 , 但两优培九 MDA 含量上升幅度远远比汕优 63 小。由结果可知 , 两优培九在苗期对低温不敏感 , 抗冷性较强。夜间低温引起叶片的类囊体膜膜脂过氧化加剧 , 脂肪酸不饱和度上升 , 这两方面的变化有着密切的关系 , 且都与杂交稻的冷适应发展有紧密的联系。

关键词 : 水稻 ; 低温 ; 类囊体 ; 脂肪酸 ; 膜脂过氧化 ; 耐冷性

中图分类号 : Q945 .78 ; S511 .01 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-7216(2006)04-0401-05

水稻是喜温作物 , 苗期和孕穗期是低温敏感期 , 低温可对水稻代谢和生理造成不可逆伤害 , 使膜透性增加 , 叶绿素合成受抑制 , 叶绿体结构遭到破坏 , 导致光合能力下降等<sup>[1]</sup> , 进而影响产量。目前对低温逆境下的水稻研究集中在细胞膜透性、活性氧清除系统、信号转导等方面。而低温对植物类囊体膜的影响是非常巨大的 , 低温不仅降低在叶绿体基质中进行的光合作用暗反应活性 , 也引起类囊体膜介导的光反应活性降低 , 使类囊体膜上的 PS II 的光能传递效率和光能转换效率降低。已有的对类囊体膜

膜脂方面的研究集中在黄瓜、玉米等植物上 , 对水稻的研究不多。

低温对膜脂的直接影响表现为改变各膜脂成分的相对含量及其脂肪酸组成 , 尤其是后者意义重大。因为脂肪酸组分的变化与膜的流动性和稳定性关系

收稿日期 : 2005-09-29 ; 修改稿收到日期 : 2006-05-09。  
基金项目 : 国家自然科学基金资助项目 (3027092) ; 教育部科学技术研究重点项目 (204049) ; 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2004143) ; 江苏省博士后科研资助计划项目。  
第一作者简介 : 王 萍 (1980 - ) , 女 , 硕士研究生。

更为密切。低温对膜脂及其脂肪酸的影响也与胁迫温度、时间及光强等因素有关。对于外界温度的变化,生物膜本身能够做出反应,改变膜脂的组成、结构和状态<sup>[2]</sup>,以改善低温下膜的流动性。而低温可能是通过膜脂过氧化作用,使其抗氧化能力下降,从而对脂肪酸造成影响的。目前这方面的研究仍存在一些争议。

本研究所用材料为新培育并在全国得到广泛种植的超级杂交稻两优培九和常规杂交稻汕优63,许多科学工作者曾在不同的层次上对它们进行过较系统的研究<sup>[3-6]</sup>,对高产杂交水稻两优培九的部分光合性状也已进行了初步的探索<sup>[7]</sup>,但对它在低温下膜脂方面的研究很少。本实验主要是研究水稻在苗期低温逆境下的膜脂过氧化及脂肪酸组成,为进一步探讨低温逆境导致杂交水稻产量下降的机理提供有用的理论依据,并为高产杂交稻培育抗冷新品种及生产的田间管理提供相关的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 幼苗的培养

杂交水稻(*Oryza sativa* L.)两优培九和汕优63种子由江苏省农业科学院粮食作物研究所提供。选健壮饱满的种子用1%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液消毒1 h。充分漂洗后,28℃下浸种36 h,然后在30℃的黑暗条件下催芽48 h。挑选发芽良好的种子播种于盛有蛭石的白瓷盘中,在LRH-250-G型培养箱中培养,培养箱温度为25℃,湿度为75%±5%,白天给予光照12 h[光强1000 mol/(m<sup>2</sup>·s)]。培养过程中,每隔2 d更换1次木村B培养液。待2叶1心时将每个组合的幼苗分成两组,一组培养温度为28℃/25℃(昼/夜),一组为28℃/10℃,28℃/25℃组作为常温对照。每隔2 d取幼苗叶1次进行各项指标的测定,共取样5次。

### 1.2 叶绿素含量的测定

根据Arnon<sup>[8]</sup>方法,用UV-754分光光度计测定叶绿素含量,单位为μg/g(基于鲜质量)。

### 1.3 类囊体膜的制备

参照Dunahay等<sup>[9]</sup>所介绍的BBY法加以改进,B<sub>1</sub>中0.4 mol/L NaCl改为0.4 mol/L蔗糖,B<sub>2</sub>中0.15 mol/L NaCl改为0.15 mol/L蔗糖,B<sub>3</sub>中20 mmol/L Hepes改为20 mmol/L Mes,所得类囊体膜悬浮液的叶绿素含量控制在2 mg/mL左右。

### 1.4 脂肪酸的提取

将备好的类囊体膜悬浮液置于玻璃管中,参照

刁丰秋等<sup>[10]</sup>的方法提取脂肪酸。

### 1.5 脂肪酸组分的色谱分析

用1890气相色谱仪和3295积分仪(均为惠普上海分析仪器有限公司产品)测定,用外标法确定保留时间,结果用归一法求得。

### 1.6 超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和丙二醛(MDA)含量测定

O<sub>2</sub><sup>-</sup>含量测定参照王爱国等<sup>[11]</sup>的方法进行,含量的表示采用Elstner等<sup>[12]</sup>的方法用A<sub>530</sub>表示。MDA含量参照赵世杰等<sup>[13]</sup>的硫代巴比妥酸(TBA)比色法,用UV-754分光光度计测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温处理对水稻幼苗叶绿素含量的影响

从图1可以看出,低温处理后叶片的叶绿素含量明显下降。两个组合变化相似,两者都是在低温处理后4~8 d出现明显下降趋势,低温处理8 d后,两优培九和汕优63的叶绿素分别下降为低温处理2 d的42.82%和47.46%;低温处理10 d后,两优培九和汕优63的叶绿素含量下降为常温对照的25.37%和17.68%。常温对照的两个杂交水稻组合在5次取样过程中,叶绿素含量逐渐上升,前3次取样变化不明显,后2次才有明显的上升。两优培九整体叶绿素含量均比汕优63低,低温处理后变化幅度也比汕优63小。

### 2.2 低温处理对MDA和超氧阴离子含量的影响

图2显示,两个组合的MDA含量均呈上升趋势,而且同品种低温处理组的含量在第4天后开始高于常温对照组,两优培九的MDA含量低于汕优

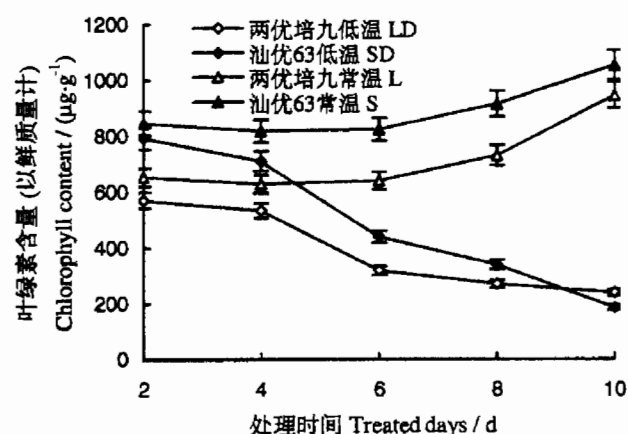


图1 水稻幼苗叶绿素含量的变化

Fig. 1. Changes in chlorophyll content of rice seedlings.

LD, Super hybrid rice Liangyoupeijiu treated at low temperature; SD, Traditional hybrid rice Shanyou 63 treated at low temperature; L, Super hybrid rice Liangyoupeijiu treated at room temperature; D, Traditional hybrid rice Shanyou 63 treated at room temperature. The same as in figures below.

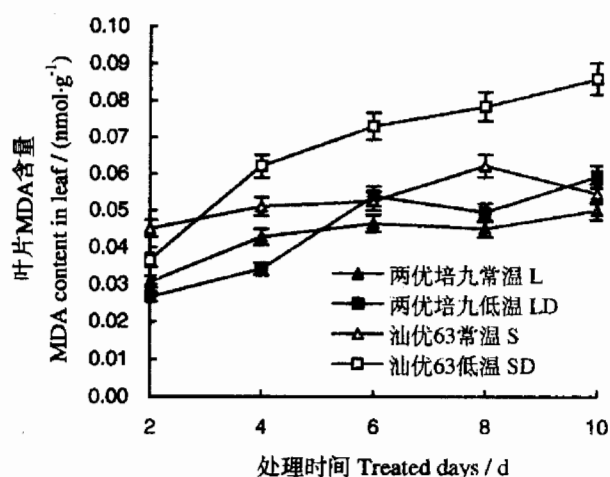


图2 水稻叶片MDA含量变化

Fig. 2. Changes in MDA content of rice leaves.

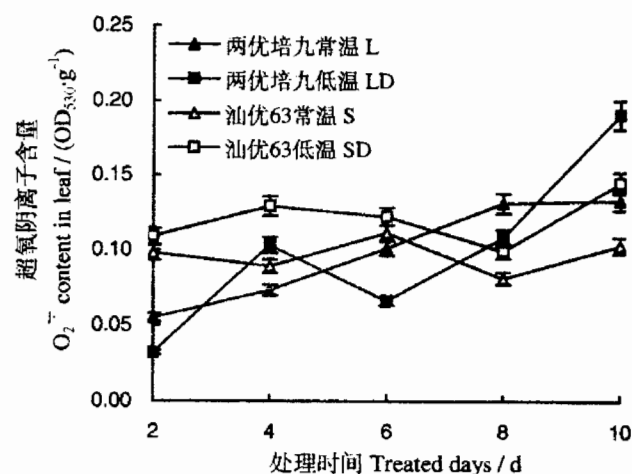


图3 水稻叶片超氧阴离子含量变化

Fig. 3. Changes in  $O_2^-$  content of rice leaves.

63。汕优63低温处理组MDA上升的幅度远远高于两优培九。

超氧阴离子含量的变化趋势同MDA一样(图3),也呈上升趋势。但汕优63的超氧阴离子含量在处理第8天时有所下降,然后再上升。两优培九低温处理组超氧阴离子含量上升的幅度高于汕优63。

### 2.3 脂肪酸中各成分含量变化

在脂肪酸各成分的摩尔分数中,16:0是较多的一种。两个组合在常温下的16:0组分含量是上升的,但上升幅度不大。而低温下,16:0组分含量则下降,两优培九低温处理第10天的16:0组分含量仅有第2天的77.0%,汕优63则是63.0%(图4)。

18:0组分在两个组合的不同处理温度下均有着相似的变化趋势,即中间阶段有所上升,然后下降。两优培九18:0组分的含量普遍比汕优63高。两优培九低温处理第10天的含量仅有第2天的36.6%,汕优63则是46.1%。

18:1组分在脂肪酸组成中的摩尔分数不是很大,总体变化趋势是在叶片生长过程中有所上升。且两优培九的含量比汕优63高。两优培九低温处理第10天的含量为第2天的157.9%,汕优63则达第2天的228.6%。可见18:1组分在膜脂脂肪酸中的比例虽然不大,但变化幅度却很大。

18:2组分在脂肪酸中的含量较为稳定,且变化趋势也一致,无论是在不同组合还是同一组合不同温度处理下都是如此。除两优培九低温处理组第4天、第6天比较高以外,总体来看是平缓上升的,低温处理组比常温对照组上升幅度大。

18:3组分作为脂肪酸中含量最高的组分,其含量的变化对植物膜的结构和功能有着重要的意义。如图4所示,在汕优63的脂肪酸中,18:3组分的摩

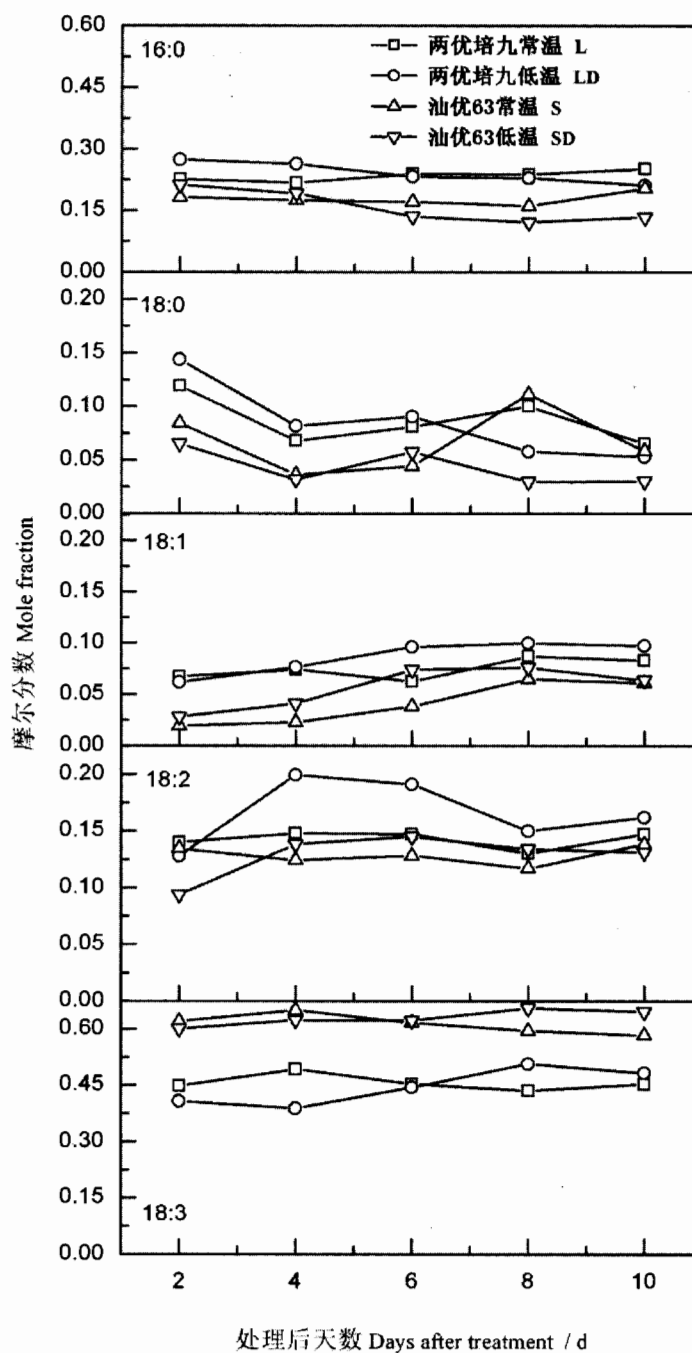


图4 水稻幼苗类囊体膜脂肪酸各成分变化

Fig. 4. Changes in the fatty acid compositions of thylakoid membrane lipid in rice seedlings.



表 1 水稻幼苗类囊体膜脂不饱和脂肪酸指数变化  
Table 1 . Changes in the index of unsaturated fatty acid of thylakoid membranes lipids in rice seedlings .

组合 Combination	处理温度 Treated temperature/	不饱和脂肪酸指数 Index of unsaturated fatty acid (IUFA)				
		2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
两优培九 Liangyoupei jiu	25	169 .13	184 .86	172 .92	165 .72	173 .65
	10	154 .26	164 .10	181 .04	192 .19	187 .06
汕优 63 Shanyou 63	25	209 .19	222 .11	214 .26	208 .43	208 .73
	10	201 .88	218 .66	223 .08	230 .90	226 .40

不饱和脂肪酸指数 = (18 :1 的摩尔分数 + 18 :2 的摩尔分数 × 2 + 18 :3 的摩尔分数 × 3) × 100。  
IUFA(index of unsaturated fatty acid) = (mole fraction of 18 :1 + mole fraction of 18 :2 × 2 + mole fraction of 18 :3 × 3) × 100 .

尔分数基本在 60% 左右 ,在两优培九中 ,其摩尔分  
数在 45 % 左右。两优培九低温处理第 10 天的含量  
上升为第 2 天的 118 .4% ,汕优 63 则上升为  
107.5%。

2.4 不饱和脂肪酸指数

两种水稻叶片类囊体膜脂中脂肪酸的主要成分  
是棕榈酸(16 :0)、硬脂酸(18 :0)、油酸(18 :1)、亚油  
酸(18 :2)和亚麻酸(18 :3) ,其中亚麻酸含量最高 ,其  
次为棕榈酸 ,亚麻酸对膜脂不饱和脂肪酸指数  
(IUFA)的变化起决定作用。如表 1 所示 ,两个材料  
常温下的不饱和脂肪酸指数变化不大 ,但汕优 63 的  
比两优培九的高 ;而低温处理的不饱和脂肪酸指数  
均呈上升趋势 ,两优培九第 10 天的不饱和脂肪酸指  
数是第 2 天的 121 .3% ,而汕优 63 是 112 .1% ,比两  
优培九的上升幅度小。

3 讨论

低温逆境下 ,活性氧在植物体内的增多 ,引起细  
胞膜的过氧化 ,且膜脂脂肪酸中的不饱和键被过氧  
化 ,造成 MDA 含量的增加<sup>[14]</sup>。林植芳等<sup>[15]</sup> 证明  
超氧阴离子和 MDA 均降低了水稻叶绿体膜脂深层  
的流动性 ,这种毒性作用既包括了直接启动膜脂的  
过氧化损伤根和叶片的作用 ,也包括了其过氧化产  
物 MDA 的次级后效应。两优培九的 MDA 含量低  
于汕优 63 ,低温下含量上升的幅度小于汕优 63 ,而  
且两优培九的叶绿素含量下降幅度比汕优 63 小 ,可  
见低温下两优培九这些指标波动较小。由对两个品  
种的两个处理温度及 5 次取样所得结果可见 ,低温  
对脂肪酸的影响也与胁迫温度、时间、品种差异等因  
素有关。但不饱和脂肪酸本身对氧化作用非常敏  
感 ,因而不饱和度的增加 ,使膜更易于受到膜脂过氧  
化的伤害<sup>[16]</sup> ,这也是一个不容忽视的负效应。

Vijayan 和 Browse<sup>[17]</sup> 认为类囊体膜脂不饱和  
脂肪酸占总脂肪酸的百分比降低时 ,有可能减慢重

新合成的 D1 蛋白装配到 PS 反应中心的速率 ,从  
而阻碍光抑制的恢复 ,进而影响到光合效率 ,最终影  
响到产量。本实验中 ,两个品种的低温处理组饱和  
脂肪酸均下降 ,不饱和脂肪酸含量则都是上升的。  
不饱和脂肪酸的增加就意味着膜流动性的升高 ,使  
膜脂产生物相变化 ,从凝胶相变为液晶相 ,膜脂的脂  
肪酸链由有序排列变为无序。脂肪酸组成发生变  
化 ,这种变化将导致膜上生化反应发生变化 ,从而引  
起光合能量利用效率发生改变<sup>[18]</sup>。由实验结果可  
知 ,低温处理组的不饱和脂肪酸指数明显上升 ,两优  
培九的不饱和脂肪酸指数整体都比汕优 63 小 ,可见  
它不易受到膜脂过氧化的伤害。

目前已证明膜脂的不饱和度对细胞膜相变温度  
有决定性作用<sup>[19]</sup> ,而不饱和度的变化与细胞耐冷性  
之间有直接关系 ,可见它与抗冷性是密切相关的。  
由实验结果可知 ,两优培九的 MDA 含量和叶绿素  
含量变化幅度均比汕优 63 小 ,不饱和脂肪酸指数变  
化幅度与汕优 63 相比差异不大 ,但整体上却比汕优  
63 低。可见在苗期 ,两优培九对低温没有汕优 63  
敏感 ,表现出较强的耐冷性。低温下植物受到伤害  
的原因是复杂的 ,与之相应的植物对冷害的适应性  
也是多方面的。膜脂脂肪酸组分的改变及膜保护系  
统的变化 ,是较为关键的两个方面 ,而膜保护系统的  
适应性变化对于克服膜脂脂肪酸组分改变的负效应  
尤为重要 ,因此在这方面再深入研究具有重大意义。

参考文献 :

[1] 王国莉 ,郭振飞 . 低温对水稻不同耐冷品种幼苗光合速率和  
叶绿素荧光参数的影响 . 中国水稻科学 ,2005 ,19(4) :381-  
383 .  
[2] Kasamo K , Kagita F , Yamanishi H , et al . Low temperature  
induced changes in the thermotropic properties and fatty acid  
composition of the plasma membrane and tonoplast of cultured  
rice ( *Oryza sativa* L . ) cells . *Plant Cell Physiol* , 1992 , 33 :  
609-616 .  
[3] 欧志英 ,林桂珠 ,彭长连 . 超高产杂交水稻培矮 64S/E32 和两

- 优培九剑叶对高温的响应. 中国水稻科学, 2005, 19(3): 249-254.
- [4] 肖 丽, 陈国祥, 魏锦城. 杂交稻汕优 63 及其亲本光系统光化学特性和多肽组成的比较. 作物学报, 1999, 25(2): 244-248.
- [5] 吕川根, 邹江石. 两个超级杂交稻与汕优 63 光合株型的比较分析. 中国农业科学, 2003, 36(6): 633-639.
- [6] 杨艳华, 陈国祥, 刘少华, 等. 外源山梨醇对盐胁迫下两优培九和武运粳 7 号光合特性及类囊体膜多肽组分的影响. 中国水稻科学, 2004, 18(3): 234-238.
- [7] 吕川根, 邹江石. 两系法亚种间杂交稻两优培九的选育与应用. 杂交水稻, 2000, 15(2): 4-5.
- [8] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1-15.
- [9] Dunahay T G, Staehelin L A, Seibert M, et al. Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen evolving photosystem from spinach. *BBA*, 1984, 764: 179-193.
- [10] 刁丰秋, 章文华, 刘友良. 盐胁迫对大麦叶片类囊体膜组成和功能的影响. 植物生理学报, 1997, 23(2): 105-110.
- [11] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 1990(6): 55-57.
- [12] Elstner E F, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 1976, 70(2): 616-620.
- [13] 赵世杰, 李德全. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 305-306.
- [14] 王 萍, 张成军, 陈国祥, 等. 低温对水稻剑叶膜脂过氧化和脂肪酸组分的影响. 作物学报, 2006, 32(4): 568-572.
- [15] 林植芳, 彭长连, 林桂珠. 光氧化作用引起几种亚热带木本植物膜损伤和 PS 失活. 植物学报, 1999, 41(8): 871-876.
- [16] van Hasselt P R, van Berko H A G. Photo oxidation damage to the photosynthetic apparatus during chilling. *Physiol Plant*, 1980, 50: 52-56.
- [17] Vijayan P, Browse J. Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiol*, 2002, 129: 876-885.
- [18] 廖飞勇, 谢 瑛, 何 平, 等. 不同光强对薇甘菊生长及光系统的影响. 生命科学研究, 2003, 7(4): 355-359.
- [19] Murata N, Ishizaki Nishizawa O, Higashi S, et al. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*, 1992, 356: 710-713.