

用流式细胞仪研究秋茄叶肉细胞大小和叶绿素含量与海水盐度的关系^{*}

叶庆华 吴韩志 彭兴跃 王文卿

(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

摘要 采用离析的方法,应用流式细胞仪研究福建九龙江河口北岸不同地段秋茄(*Kandelia candel*)成熟叶片的叶肉细胞大小和叶绿素含量与海水盐度之间的关系。结果表明:叶肉细胞的大小和细胞内叶绿素含量与海水盐度的关系都呈倒“Z”字形,单位体积叶肉组织叶绿素含量与海水盐度的关系呈“N”字形。其中海水盐度为10时,秋茄单位体积叶肉组织叶绿素含量最高,细胞表面积、光合面积最大;海水盐度8~10时,随着盐度升高,单位体积叶肉组织叶绿素含量、细胞表面积向有利于提高光合强度方向发展;海水盐度在10~23时,随着盐度的升高,单位体积叶肉组织叶绿素含量、细胞表面积逐渐减小,朝提高抗盐性方向发展。从形态学的角度为阐明红树植物耐盐机理提供了资料。

关键词 秋茄(*Kandelia candel*),叶肉细胞,叶绿素,流式细胞仪,盐度

中图分类号 Q942.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)08-0067-05

红树林是热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落,是一类珍贵的自然资源,生长于高盐的潮间带环境中^[1]。秋茄(*Kandelia candel*)是我国红树植物中分布最广的主要优势种之一。它和其他红树植物一样,在长期的进化过程中,已经特化出一套有别于陆生植物的抗盐机制。近年来,许多科研工作者从生长、气体代谢、元素平衡、膜脂过氧化、水分代谢等多角度研究了红树植物的抗盐生理生态^[1~10]。植物器官组织的生理功能与其形态结构是相辅相成的。生理生化方面的改变往往在形态结构上有所反映。但从形态结构的角度来研究红树植物对盐生环境的适应性还比较少,且多集中在其茎的次生木质部^[11,12]。本文通过离析的方法,利用流式细胞仪研究不同盐度生态条件下叶肉细胞大小及其内部的叶绿素含量,探讨盐度对叶肉组织结构的影响,从而从形态结构方面阐明红树植物耐盐的机理^[13,14]。

1 材料与方法

1.1 材料

秋茄成熟叶片采自福建九龙江河口北岸,以厦门海沧镇海堤纪念碑外侧河岸为起点,逆流而上,直至龙海角尾镇琼头村沿岸秋茄林为止,沿途在潮间带随机选取了7个点进行采样。分别采集秋茄树冠外围枝

条。将采回的枝条贮于冰箱内(温度3~5℃)保存备用。

1.2 分析方法

1.2.1 盐度的测定 采样的同时用日产的New S-100盐度计测得各点退潮时滞留在林下滩涂洼地的海水盐度。

1.2.2 组织细胞解离 分别选取2个生长正常的枝条,摘取它们的第3对成熟叶,切取3块近叶柄端(叶基)宽0.5 cm的叶片,再以中脉为中线,视叶片宽度不同切成0.5 cm×0.2 cm~0.5 cm×0.6 cm的小块。用20%铬酸和20%浓硝酸离析液在37℃恒温条件下离析4 h,直至叶片已基本离析为止。滤去离析液,再用15%蔗糖液冲洗直至完全洗去剩余的离析液,并置于15%的蔗糖液中,3~5℃保存。每个盐

^{*} 国家自然科学基金项目30200031号。

第一作者:叶庆华,出生于1945年,副教授,研究方向:植物生态,目前从事红树植物胎生现象的适应意义的研究。通讯地址:厦门大学生命科学院,电话:0592-2185162, E-mail: qhye@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:2003-02-27;修回日期:2003-06-13

度分别做 3 个重复。

1.2.3 细胞大小及叶绿素含量测定 测定前,先用孔径为 $70\ \mu\text{m}$ 纱绢过滤。收取滤液用 XL 型流式细胞仪 (Coulter Epics 公司) 同步测定叶肉细胞大小及叶绿素含量。在氩离子 $440\ \text{nm}$ 光源激发下,每个样品计算 10 000 左右个细胞。21 个样品滤液测定后分别可得到以图 1、2 为代表的结果及一系列的相关数据。

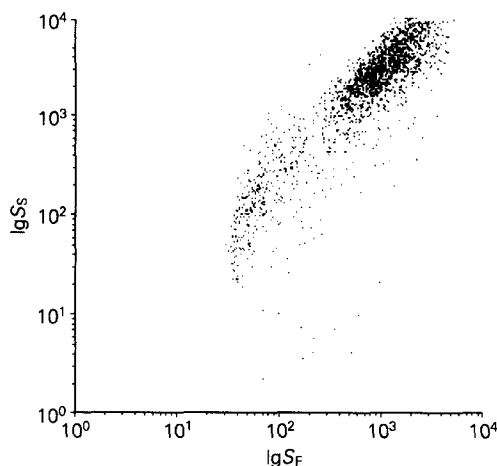


图 1 叶肉细胞大小
Fig. 1 Mesophyll cell size

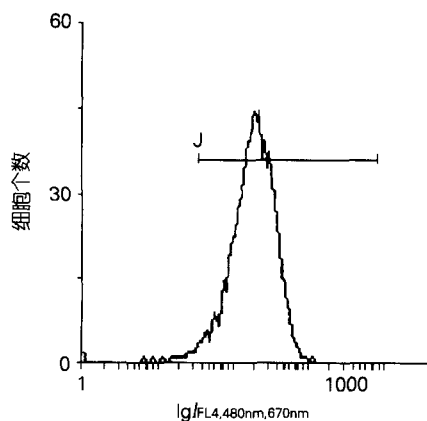


图 2 叶绿素的相对含量
Fig. 2 The relative chlorophyll content

$\lg/FL4,480\ \text{nm},670\ \text{nm}$ 即采用 FL4 滤光片, $480\ \text{nm}$ 激发, $670\ \text{nm}$ 处荧光强度

根据流式细胞仪的应用原理,即对球体来讲,前向散射值 (S_F) 或侧向散射值 (S_s) 分别与球体外径的

平方 (r^2) 呈一定的线性关系,又因为体积 V 正比于 r^3 ,游离的薄壁细胞多呈球状,因此可以用各自的 $(S_F^{3/2} + S_s^{3/2})/2$ 来表示所测叶肉细胞体积 V 的相对大小。

2 结果

2.1 样地生境海水盐度变化情况

对样地退潮时滞留海水的分析结果表明,九龙江北岸 7 个研究样区的海水盐度从河口的海沧至龙海琼头村各点的盐度分别为 25, 23, 20, 18, 13, 10 和 8。

2.2 叶肉细胞大小与海水盐度的关系

应用流式细胞仪测得的 S_F 或 S_s 值,代入公式 $(S_F^{3/2} + S_s^{3/2})/2$ 中,分别计算得不同海水盐度下叶肉细胞体积 V 的相对大小 (如图 3)。从图中可以看出:海水盐度为 8~10 时,随着海水盐度的升高叶肉细胞体积逐渐变小;而海水盐度在 10~23 时,叶肉细胞随着海水盐度升高体积反而变大;海水盐度超过 23 时,叶肉细胞随着盐度的升高而变小。

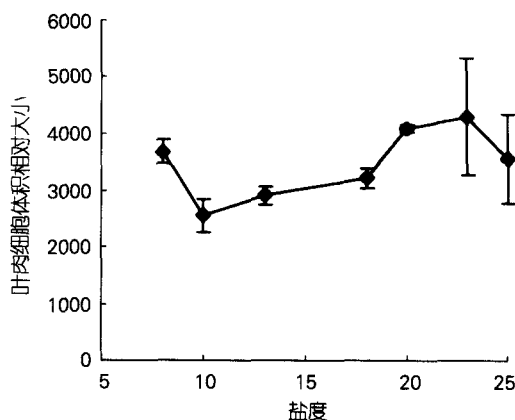


图 3 不同海水盐度下的叶肉细胞相对体积
Fig. 3 The relative volume of mesophyll cell in different seawater salinity

2.3 叶肉细胞叶绿素相对含量与海水盐度的关系

叶肉细胞叶绿素相对含量与盐度的关系见图 4。从图中可以看出海水盐度在 8~10 时,叶肉细胞内叶绿素相对含量呈下降趋势,在 10 左右有一最低点,10~23 时呈上升趋势。海水盐度大于 23 时,盐度继续升高,细胞内叶绿素含量又有下降的趋势。

2.4 单位体积叶肉组织叶绿素相对含量与海水盐度的关系

用各盐度下叶绿素相对含量与 V 的相对值的比

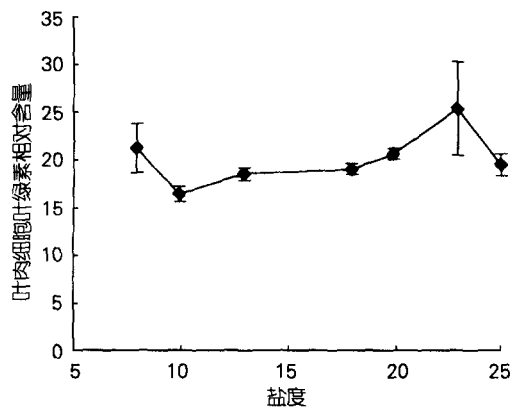


图4 不同海水盐度下秋茄成熟叶片的叶肉细胞叶绿素相对含量

Fig.4 The relative chlorophyll content in mesophyll cell of the mature leaves of *Kandelia candel* growing under different salinity

推算出各盐度下单位体积叶肉组织的叶绿素相对含量(如图5)。从图中可以看出,当海水盐度在8~10时,单位体积叶肉组织叶绿素含量随盐度的上升而增大,在10时达到最大,在10~23时,随盐度的增加而逐渐减小,在23时达到最小,超过23以后又逐渐上升。

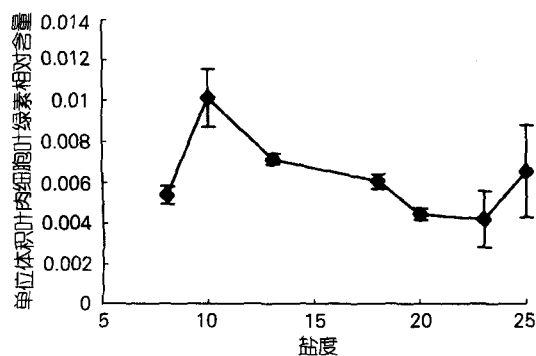


图5 不同海水盐度下单位体积叶肉组织叶绿素相对含量

Fig.5 The chlorophyll comparatively content in unit volume of mesophyll tissue in different seawater salinity

上述结果是利用离析和流式细胞仪的方法获得的,是过去运用常规的解剖学方法所无法得到的。

3 讨论

3.1 叶肉细胞大小与海水盐度的关系

图3显示海水盐度在8~10时,单个细胞体积随盐度的增加而减小,因此相同大小叶肉组织中的细胞数反而增加了,总表面积也就随之增加,叶肉组织是光合作用的主要场所,表面积的增加也就提高了光合作用的速率,于是,植物体就朝着有利于生长的方向发展。当盐度在10~23时,随着盐度的上升,单个细胞体积逐渐增大,这样同一体积的叶肉组织中细胞数目就减少了,那么总表面积随之减少,光合面积也就减少了。同时,随细胞增大,细胞内的液泡增大了^[15],这样叶肉组织保持水分的能力却提高了,也就是朝着抵抗生理干旱、加强抗盐能力的方向发展。当盐度超过23以后,单个叶肉细胞体积又减小,是因为细胞的耐盐能力超出了所能忍受的范围,基粒与基质片层膨胀、模糊,细胞膜皱缩等内部结构解体的趋势^[16]。

3.2 叶肉细胞叶绿素含量与海水盐度的关系

图4表明了叶肉细胞内叶绿素相对含量与海水盐度之间呈倒“Z”形关系。当海水盐度在10~23时,叶肉细胞内叶绿素相对含量随海水盐度的增大而增大。这与郑文教^[17]、沈瑞池^[18]等关于秋茄幼苗抗盐生理的研究所述的其茎、叶及总生物量在基质盐度为0~15以内起促进作用,基质盐度为20以上则起抑制作用的规律基本一致。但是,在海水盐度为8~10时,叶肉细胞内叶绿素相对含量随海水盐度的增加而减少,和海水盐度大于23时,叶肉细胞内叶绿素相对含量随海水盐度的增加也随之减少的现象却与前人的研究不同。这可能是成熟植株与幼苗在抗盐生理特性上的差异造成的。或许是图3所示的叶肉细胞体积和叶绿素含量随盐度变化的不同所引起的。这些都有待于进一步地研究。

3.3 单位体积叶肉组织叶绿素含量与海水盐度的关系

图5表明单位体积叶肉组织叶绿素含量与海水盐度呈“N”形关系。因此可以得出海水盐度为8~10时,随着海水盐度的升高,虽然单个细胞叶绿素含量有所减少,但由于细胞体积的缩小,单位体积细胞数增多,单位体积叶肉组织的细胞表面积跟着扩大,导致单位体积叶肉组织的叶绿素总量增加,体现了盐度的升高对提高光合强度有利,于是,植物体就朝着有利于生长的方向发展;盐度高于10后,随着海水盐度

的升高,虽然细胞内叶绿素含量逐渐增加,但由于细胞体积增大,单位体积叶肉组织叶绿素总量反而减少,标志着随单位体积叶肉组织内细胞数的逐渐减少,光合表面积在逐渐减少,不利于生长。由于细胞体积增大,液泡加大^[15],有利于贮水,同时细胞体积增大、细胞数的减少,单位体积叶肉组织的细胞表面积也减少,从而降低了蒸腾面积,叶肉组织正朝着适应抗盐性的方向发展;而海水盐度为 10 时,尽管此时细胞最小,单一细胞所含的叶绿素也最低,但由于单位体积叶肉组织的叶绿素相对含量最高,因此此时单位体积叶肉组织中所含的细胞最多,即光合表面积最大,光合产物最多,净生产量也最高,生长最好。从而证明了海水盐度为 10 时秋茄生长最好^[18]。

当海水盐度超过 23 时,虽然海水盐度的升高使细胞逐渐变少,单一细胞内叶绿素含量也变少,单位体积叶肉组织中叶绿素含量逐渐增加与海水盐度为 8~10 时变化相似。秋茄却越来越生长不好的原因,是过高的盐度使叶肉细胞内的叶绿体基粒与基质片层膨胀逐渐加剧,基粒与基质片层之间的界线更加模糊,以至解体^[16],叶绿素增加是这种现象的补偿反应。而整体光合强度越来越低。这一结果同时又为讨论中 3.2 部分出现的海水盐度在 8~10 时,单个叶肉细胞内叶绿素相对含量随海水盐度的增加而减少,和海水盐度大于 23 时,单个叶肉细胞内叶绿素相对含量随海水盐度的增加也随之减少的现象与前人的研究不同的原因提供了答案。

赵可夫等在对耐盐植物滨藜的研究中发现,在基质盐度低于 75 mmol/L 时,随基质盐度的升高,叶片的干质量逐渐增加,当基质盐度为 75 mmol/L 时达到一个最高值,基质盐度超过 75 mmol/L 后又逐渐下降^[19]。显然 75 mmol/L 的海水盐度就是滨藜的较适生长盐度。这与上述秋茄随着海水盐度变化出现的生长规律相似。仅因为它们种类不同,最适生长盐度不同。

秋茄和木榄同为拒盐植物,叶片的结构都为等面叶,即在上下栅栏组织中间是 10~13 层胞间隙发达的疏松肥厚的海绵组织。秋茄的叶柄结构也与木榄相似,所以应有相同性质。从木榄叶柄导管分子的研究发现,在低盐条件下,随着海水盐度的提高,木榄叶柄导管分子的形态朝着有利于加快水分运输的方向发展,而在高盐环境下,导管分子的形态朝着增加水分运输的安全性方向发展^[20]。这与秋茄叶片在海水盐度低于 10 时,随着盐度升高,叶肉细胞大小和叶绿素

含量等向有利于生长方向发展;海水盐度超过 10 时,随着盐度的升高,细胞大小和叶绿素含量等向加强生理干旱适应性方向发展也相吻合。

致谢: 本实验得到邵寒娟老师的大力支持,特此致谢。

参考文献

- 1 Tomlinson P B. The Botany of Mangroves. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 121-127
- 2 黄庆昌,黄桂玲. 中国红树植物的营养器官结构与生态适应的研究(Ⅲ)茎. 植物学通报, 1991, 8(3): 41-44
- 3 王文卿,叶庆华,王笑梅,等. 盐胁迫对木榄幼苗各器官热值、能量积累及分配的影响. 应用生态学报, 2001, 12(1): 8-12
- 4 缪绅裕,陈粤英,王厚麟. 盐度和光因子对大亚湾木榄种胚萌根的影响. 广州师范学院学报(自然科学版), 2000, 21(5): 4-7
- 5 李银鹏,林鹏. 盐度对木榄幼苗某些金属元素累积的影响及钙的效应. 应用生态学报, 2000, 11(2): 177-180
- 6 马建华,郑海雷,张春光,等. 盐度对秋茄和桐花树幼苗蛋白质、H₂O₂ 脂质过氧化作用的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 354-358
- 7 Lin G H, Sternberg L D L. Effects of salinity fluctuation on photosynthetic gas exchange and plant growth of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). J Exp Bot, 1993, 44(258): 9-16
- 8 Sobrado M A, Ball M C. Light use in relation to carbon gain in the mangrove *Avicennia marina*, under hypersaline conditions. Austr J Plant Physiol, 1999, 26(3): 245-250
- 9 Juck C H, Mohd S. Traditional uses of the mangrove ecosystem in Malaysia. Faridabad: Thomson Press (India) Ltd., 1986. 16-17
- 10 Naidoo G, Rogalla H, Vonwillert D J. Gas exchange responses of a mangrove species, *Avicennia marina*, to waterlogged and drained conditions. Hydrobiologia, 1997, 352: 39-47
- 11 Medina E, Francisco M. Osmolality and delta C-13 of leaf tissues of mangrove species from environments of contrasting rainfall and salinity. Estuarine Coastal and Shelf Science, 1997, 45(3): 337-344
- 12 Sun Q, Lin P. Wood structure of *Aegiceras corniculatum* and its ecological adaptations to salinities. Hydrobiologia, 1997, 352: 61-66
- 13 Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von C G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24: 429-448

- 14 Graeme V C. Instrumentation for flow cytometry. J Immuno Methods, 2000, 243: 3-12
- 15 叶庆华,曾定,陈振端. 植物生物学. 厦门:厦门大学出版社,2002. 30-31
- 16 叶庆华,林鹏. 海滩盐度对两种红树叶肉超微结构影响的研究. 见:范航清、梁士楚主编. 中国红树林研究与管理. 北京:科学出版社,1995. 65-70
- 17 郑文教,林鹏. 盐度对秋茄幼苗的生长和水分代谢的效应. 厦门大学学报(自然科学版), 1990, 29(5): 575-579
- 18 沈瑞池,林鹏. 盐度对两种红树幼苗生长的影响. 亚热带植物通讯,1991, 20(20): 31-53
- 19 Zhao K F, Rana M. Effect of turgor and salinity on the growth of barley and saltbush. Chin J Bot, 1992, 4(1): 34-42
- 20 叶庆华,吴韩志,王文卿,等. 海水盐度对木榄叶柄导管分子形态特征的影响. 实验生物学报,2003,36(2): 77-81

STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN CELL SIZE AND CHLOROPHYLL CONTENT OF *Kandelia candel* LEAVES AND SEAWATER SALINITY BY FCM

YE Qing-Hua WU Han-Zhi PENG Xing-Yue WANG Wen-Qing
(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Received: Feb., 27, 2003

Key Words: *Kandelia candel*, Mesophyll cell, Chlorophyll, FCM, Salinity

Abstract

We study the mesophyll cell size and chlorophyll content in the mature leaves of *Kandelia candel* growing under different seawater salinity in north bank of Jiulong river in Xiamen, Fujian, China by method of isolation and flow cytometry (FCM). The results showed that the curve shape of the relationship mesophyll cell size and chlorophyll content in different salinity of seawater is like the reversed shape of "Z", and that of chlorophyll content in unit volume in different salinity of seawater is "N". In 10 salinity of seawater, the value of chlorophyll content in unit volume is the highest; the surface area of cells and photosynthesis area is the largest. The best growth status of *K. candel* is under this salinity. When seawater salinity is 8-10, the value of chlorophyll content in unit volume and the surface area of cells as salinity going higher are more adequate to increase photosynthesis. When seawater salinity is 10-23, the value of chlorophyll content and the surface area of cells are progressively reduced and lower and more adequate to resist salt. It provides some information to study the salinity enduring mechanism of mangrove by morphologic method.

(本文编辑:刘珊珊)