

## 研究报告

# 用流式细胞仪研究秋茄叶柄薄壁细胞大小及叶绿素含量与海水盐度的关系

叶庆华 陈海鹏 吴韩志 黄河清 邵寒娟 张 黎

( 厦门大学生命科学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门, 361005 )

**摘 要** 采用快速离析方法和流式细胞仪研究了红树植物秋茄成熟叶柄薄壁细胞的大小和叶绿素含量与海水盐度之间的关系。结果表明,海水盐度为 0.8%~2.0%时,随着盐度的升高,叶柄薄壁细胞大小和单位体积叶绿素含量的变化趋势与叶肉细胞一致。海水盐度为 0.8%~1.0%时,随着盐度升高,向有利于提高光合作用强度的方向发展;海水盐度在 1.0%~2.0%之间时,随着盐度的升高,向加强生理干旱适应性方向发展。海水盐度高于 2.0%时,叶柄薄壁细胞的大小和单位体积薄壁组织叶绿素含量随盐度的变化趋势与叶肉细胞不同,原因尚待进一步研究。实验结果表明,借助快速离析方法,使用流式细胞仪研究器官细胞相关特性是可行的,为从形态学角度研究红树植物耐盐机理提供了可能,扩大了流式细胞仪的应用领域。

**关键词** 秋茄 叶柄薄壁细胞 叶绿素 流式细胞仪 盐度

## 1 前 言

红树植物是一类生长于热带亚热带海岸潮间带特有的木本植物,在海堤防护、水体净化等方面起着重要的作用<sup>[1]</sup>。红树植物生长环境的最大特点是盐分高,研究盐度对红树植物的影响不仅具有重要的理论意义,对植物引种驯化、耐盐植物选育等也起着重要的指导作用。

近年来,不少科研工作者从生长、能量代谢、气体代谢、元素平衡、膜脂过氧化<sup>[2]</sup>、水分代谢等不同角度<sup>[3-10]</sup>,研究了红树植物的抗盐生理生态。植物器官组织的生理功能与其形态结构密切相关。生理生化方面的改变往往在形态结构上有所表现。但从形态结构的角度研究红树植物对盐生环境适应性的工作还做得很少,而且多集中在用解剖学方法研究不同生长环境下茎的次生木质部<sup>[11,12]</sup>形态结构的差别。对植物器官内活组织生理生态和生理形态的研究更少。

流式细胞仪是当代激光、流体力学、光学和计算机等科学发展的产物。它可以对生物微粒进行多种物理、生物学特性的测量,在人体病理学和藻类生理生态研究方面得到广泛应用<sup>[13-15]</sup>,但用于高等植物器官内活组织的生理生态和生理形态研究尚未见报导。

笔者以我国红树植物中分布最广的优势种秋茄 (*Kandelia candel*) 叶为对象,采用快速解离的方法,用流式细胞仪研究了不同盐度条件下叶柄薄壁细胞大小及其叶绿素的含量,探讨了盐度对叶柄薄壁细胞结构和生理功能的影响,取得了理想的结果。这项研究旨在继用流式细胞仪研究秋茄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<sup>[16]</sup>之后,再次从形态学角度为细胞形态结构与环境相适应的论点提供证据,并检验方法步骤的可行性,扩大流式细胞仪在植物学研究领域中的应用范围,开辟研究高等植物器官内活组织中细胞生理生态和生理形态的新途径。

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30200031)。

作者简介: 叶庆华,男,1945年9月出生,副教授,主要从事环境形态和生理形态等到方面的植物学研究。

## 2 实验部分

### 2.1 样品来源

秋茄叶样品,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,至龙海角尾镇琼头村沿岸秋茄林为止,在沿途潮间带随机选取7个采样点,分别采集秋茄树冠外围枝条。将采回的枝条贮存在冰箱内(温度3~5℃)备用。

### 2.2 盐度测定

在采样的同时,用New S-100盐度计(日本科学株式会社)检测各采样点退潮时滞留在林下滩涂洼地中的海水盐度。7个采样区的海水盐度分别为2.5%、2.3%、2.0%、1.8%、1.0%、0.8%。

### 2.3 游离细胞液制备

分别选取五个生长正常的枝条,摘取它们的第三对叶片,切取其叶柄并剖成两半。用20%铬酸和20%浓硝酸(1:1, V/V)离析液,在37℃恒温条件下离析6h,直至叶柄基本离析为止(解离时间不宜过长,否则会破坏细胞形态和细胞内的叶绿素,影响实验结果)。滤去离析液,再用15%蔗糖溶液洗净离析液,将游离细胞液置于15%的蔗糖液中,在3~5℃温度下保存备用。每个盐度分别做3次重复实验。

### 2.4 细胞大小及叶绿素含量测定

测定前,先用孔径为70μm 纱绢过滤细胞液。收取滤液,用XL型流式细胞仪(Coulter Epics公司)同步测定细胞大小及叶绿素含量。在氩离子440nm光源激发下,每个样品约计算10000个细胞,共测定21个样品的滤液,得到以图1和图2为代表的结果及一系列相关数据。

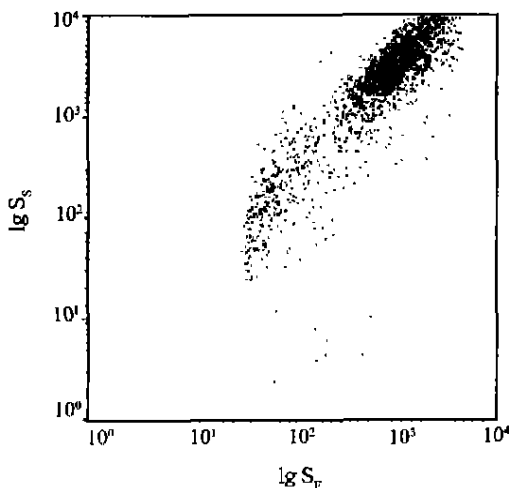


图1 细胞大小

根据流式细胞仪的测量原理,球状体的前向散射值( $S_F$ )和侧向散射值( $S_S$ )均与球状体外径的平方( $r^2$ )近似呈线性关系,球状体的体积 $V$ 正比于外径的立方( $r^3$ )。游离的薄壁细胞多呈球状,因此细胞体积的相对大小可用下式计算:

$$V = (S_F^{3/2} + S_S^{3/2})/2$$

式中  $V$  ——细胞体积相对大小

$S_F$  ——前向散射值

$S_S$  ——侧向散射值

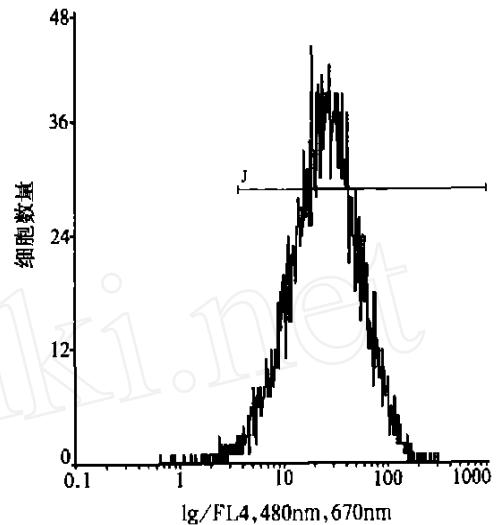


图2 叶绿素的相对含量

采用FL4滤光片,480nm激发,670nm处荧光强度

## 3 结果与讨论

### 3.1 叶柄薄壁细胞大小与海水盐度关系

不同海水盐度条件下,叶柄薄壁细胞体积的相对大小如图3所示。海水盐度在0.8%~1.0%时,细胞体积随盐度升高而减小,但单位体积中的细胞

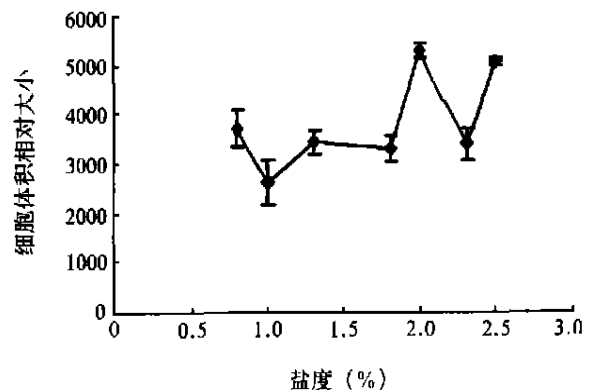


图3 不同海水盐度下叶柄薄壁细胞的体积

数增加,细胞总表面积随之增加,提高了光合作用的速率,有利于植物体生长。盐度从1.0%上升到2.0%,叶柄薄壁细胞体积随着盐度的升高而逐渐增大,单位体积细胞数目减少,总表面积随之减少,光合作用减弱。随着细胞增大,细胞内的液泡也增大<sup>[16]</sup>,细胞保持水分的能力提高,朝着抵抗生理干旱、加强抗盐能力的方向发展。当盐度在2.0%~2.3%之间时,细胞体积随着盐度升高而变小;盐度高于2.3%时,细胞体积随着盐度升高而增大,与叶肉细胞形态变化不同。盐度高于2.3%时,叶肉细胞体积随盐度升高而减小<sup>[16]</sup>。这可能是由于叶柄主要完成支持输导功能,而叶片主要完成光合作用,详细机理尚需进一步研究。

### 3.2 细胞叶绿素含量与海水盐度关系

叶柄薄壁细胞叶绿素相对含量与海水盐度的关系见图4。

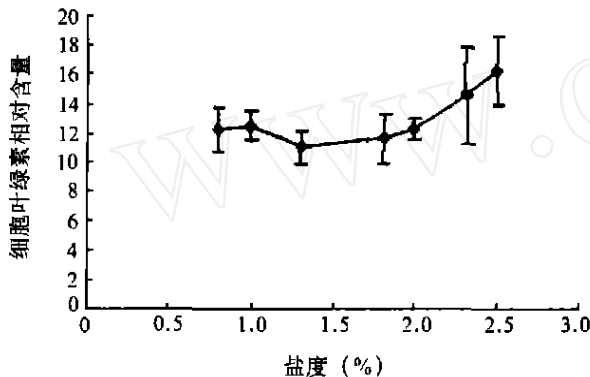


图4 不同海水盐度下叶柄薄壁细胞叶绿素的相对含量

图4表明,盐度在0.8%~1.0%时,细胞叶绿素相对含量略有增加,在1.0%左右有一较高值;1.0%~1.3%时略有下降;海水盐度在1.3%~2.3%时,细胞叶绿素相对含量随海水盐度升高而增加的规律与叶肉细胞叶绿素相对含量的变化<sup>[16]</sup>基本相同。海水盐度在0.8%~1.3%和高于2.3%时,薄壁细胞叶绿素相对含量随着海水盐度升高而变化的规律,与叶肉细胞叶绿素相对含量的变化规律<sup>[16]</sup>正好相反。这是否与叶柄和叶片完成的主要功能不同有关,尚待进一步研究。

### 3.3 单位体积叶绿素含量与海水盐度关系

用叶绿素相对含量与其体积相对值的比,计算出各种盐度条件下单位体积薄壁细胞叶绿素的相对含量,结果见图5。

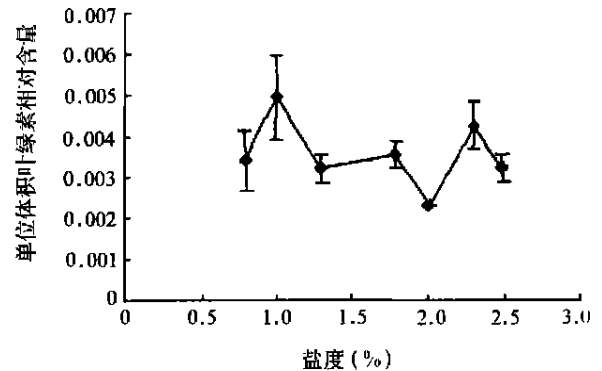


图5 不同海水盐度下单位体积叶绿素相对含量

图5表明,当海水盐度在0.8%~1.0%时,单位体积叶柄薄壁细胞内叶绿素含量随盐度的升高而增加,1.0%时叶绿素含量达到最大值;海水盐度在1.0%~2.0%时,随盐度升高,单位体积叶绿素含量逐渐减少,盐度为2.0%时达到最小值;超过2.0%后又逐渐上升,到2.3%时,达到次大值,然后随着盐度的升高,单位体积细胞内叶绿素含量逐渐降低。

方差检验表明,每两个相近盐度下生长的秋茄成熟叶柄薄壁细胞,单位体积叶绿素含量之间的差异显著或极显著。因此盐度为0.8%~1.0%时,随着海水盐度升高,由于细胞体积缩小,单位体积细胞数增多,单位体积细胞表面积增大,叶绿素总量增加,提高了光合作用强度,于是植物朝着有利于生长的方向发展。盐度高于1.0%时,随着海水盐度的升高,细胞体积增大,单位体积内细胞数减少,叶绿素总量相应减少,光合作用逐渐减弱,不利于生长。然而细胞体积增大,液泡也增大<sup>[14]</sup>,有利于贮水;同时细胞数减少,单位体积细胞的表面积也减少,降低了蒸腾面积,叶柄薄壁细胞朝着适应抗盐性的方向发展。

海水盐度为1.0%时,细胞最小,单位体积所含细胞最多,因此虽然细胞内叶绿素含量不是最高,但单位体积的叶绿素相对含量最高,光合作用表面积最大,光合作用产物最多,净生产量也最高,生长最好,从而证明海水盐度为1.0%时,秋茄生长最好<sup>[16]</sup>。

海水盐度超过2.0%时,随海水盐度升高,单位体积细胞中叶绿素含量也逐渐增加,这是因为细胞通过液胞化适应盐生环境,从而影响到叶柄输导和支持功能,在长期自然选择下,改变了适应方式,如加大原生质体的水势,细胞逐渐变小,单位体积包含的细胞数增多,因此单位体积细胞的叶绿素相对含量又呈增

加的趋势。

海水盐度大于 2.3 % 时,虽然细胞的叶绿素相对含量呈增加的趋势,但由于细胞增大的速度远大于叶绿素相对含量增加速度,导致单位体积细胞叶绿素相对含量逐渐下降。

秋茄叶柄单位体积薄壁细胞叶绿素相对含量随着海水盐度变化的趋势,与单位体积叶肉组织叶绿素相对含量与海水盐度的关系<sup>[16]</sup>基本一致(高盐度 2.0 % ~ 2.5 % 时除外),说明形态结构与功能是相适应的。

利用快速离析法和流式细胞仪可以研究秋茄成熟叶片叶肉细胞和叶柄薄壁细胞的大小、细胞内叶绿素含量与海水盐度的关系,在生理生态和生理形态研究中得到用一般解剖学方法无法得到的结果,使研究器官内活组织细胞的大小、细胞内叶绿素等物质的含量成为可能,为从形态学角度研究植物耐盐机理和形态结构与环境的关系开辟了新的途径,同时扩大了流式细胞仪的应用领域。

#### 参考文献

- 1 Tomlinson P B. The Botany of Mangroves. Cambridge: Cambridge University Press, 1986: 121 - 127
- 2 马建华,郑海雷等. 厦门大学学报(自然科学版),2002,41

- (3):354 - 358
- 3 王文卿,叶庆华等. 应用生态学报,2001,12(1): 8 - 12
- 4 Lin G H, Sternberg L D L. J Exp Bot, 1993, 44(258): 9 - 16
- 5 Naidoo G, Rogalla H, Vonwillert D J. Hydrobiologia, 1997, 352:39 - 47
- 6 李银鹏,林鹏. 应用生态学报,2000,11(2): 177 - 180
- 7 Krauss K W, Allen J A. Aquatic Botany, 2003, (77): 311 - 324
- 8 郑文教,林鹏. 厦门大学学报(自然科学版), 1990,29(5): 575 - 579
- 9 黄薇,林栖风,李冠一,赵文明. 海南大学学报(自然科学版),2002,20(4):328 - 331
- 10 马建华,郑海雷等. 生命科学研究,2001,5(3):175 - 179, 226
- 11 黄庆昌,黄桂玲. 植物学通报,1991,8(3):41 - 44
- 12 Sun Q, Lin P. Hydrobiologia, 1997, 352:61 - 66
- 13 Graeme V C. Immuno Methods, 2000, 243: 3 - 12
- 14 Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe von C G. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24: 429 - 448
- 15 林波海,周宏伟等. 现代科学仪器,2002,(5): 25 - 28.
- 16 叶庆华,吴韩志等. 海洋科学,2003,27(8):67 - 71.
- 17 叶庆华,吴韩志等. 实验生物学报,2003,36(2): 77 - 81

收稿日期:2004 - 02 - 16

**Study on the relationship between cell size and chlorophyll content of *Kandelia candel petiolar parenchyma* cell and sea water salinity by flow cytometry.** Ye Qinghua, Chen Haipeng, Wu Hanzhi, Huang Heqing, Shao Hanjuan, Zhang Li (School of Life Sciences, Education Ministry Key Lab. for Cell Biol and Tumor Cell Eng., Xiamen University, Xiamen, 361005)

The cell size and chlorophyll content of petiolar parenchyma cell of *kandelia candel* growing in seawater with different salinity in north bank of Jiulong River in Xiamen have been studied by using flow cytometry and fast isolation method. When seawater salinity is in the range of 0.8 % ~ 2.0 %, the direction of change of cell size and chlorophyll content is the same as mesophyll cell with the rise of salinity. In the range of 0.8 % ~ 1.0 %, the salinity is favorable for photosynthesis. In the range of 1.0 % ~ 2.0 %, the cell will change toward the direction of strengthening fitness for physiological drought. When the salinity is above 2.0 %, the change of cell size and chlorophyll content is different from that of mesophyll cell. The experimental results show that it is feasible to study characteristics of organic cells with flow cytometry and fast isolation method, offering possibility to study salinity endurance mechanism of mangrove morphologically.

### 《分析仪器》承办国内外广告业务,欢迎客户联系刊登。

编辑部地址:北京海淀区温泉北京分析仪器研究所 邮编:100095 传真:(010)62451377

联系人:岳刚 苏延佩 电话:(010)62403151