

## 贵州苏铁种子钙形态特性分析

罗在柴<sup>1</sup>, 王传明<sup>2</sup>, 潘德权<sup>1</sup>, 于曙明<sup>1</sup>

(1. 贵州省林业科学研究院, 贵阳 550005; 2. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558003)

**摘要:** 通过测定贵州苏铁新鲜成熟种子中不同组织中总钙和不同形态类型钙物质含量, 探索贵州苏铁种子发育过程中对钙的储存形式和分布规律。结果表明贵州苏铁新鲜成熟种子中总钙含量为外种皮>中种皮>胚; 钙主要集中在外种皮并且主要以 HCl 钙形态存在, 其含量高达 470.8 mg/kg, 占外种皮钙形态的 56.3%, 以及组织和整个种子的 24.6% 和 11.4%, HCl 钙形态在种子胚的发育过程中主要起到源和库的作用; 中果皮和胚主要积累的是水溶性的有机钙, 含量分别为 70.2 mg/kg 和 70.6 mg/kg, 对参与种子的结构和胚的发育起到积极作用。另外, 贵州苏铁种子中可溶性蛋白质和可溶性糖含量与外种皮高钙含量和高钙形态含量密切相关, 而大分子物质的积累对促进贵州苏铁适应高钙质环境具有积极意义。

**关键词:** 钙形态; 种子; 贵州苏铁

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0653-05

## Analysis on the different characteristic of calcium in the seed of *Cycas guizhouensis*

LUO Zai-Qi<sup>1</sup>, WANG Chuan-Ming<sup>2</sup>, PAN De-Quan<sup>1</sup>, YU Shu-Ming<sup>1</sup>

(1. Guizhou Academy of Forestry, Guiyang 550005, China; 2. Qianan Medical College for Nationalities, Duyu 558003, China)

**Abstract:** The total calcium and the content of characteristic of calcium variation in different tissues of fresh ripe seeds of *Cycas guizhouensis* are determined, then the store mechanism and the distribute regularity of calcium in *C. guizhouensis* seeds during its growth are explored. The results showed that the total calcium in fresh ripe seeds of *C. guizhouensis* were decreased with the order: epispem>mesocarp>embryo; the mainly variation of calcium HCl-calcium in epispem, which are 470.8 mg/kg, accounted for 56.3% in emisperm, 24.6% in tissue, and 11.4% in entire seed, respectively, it's play important roles of fountain and warehouse during the growth of embryo; the mainly calcium variation in mesocarp and embryo was organic soluble calcium, which are 70.2 mg/kg in mesocarp and 70.6 mg/kg in embryo, and the organic soluble calcium have position function in building the structure of seeds and in the growth of embryo. Additionally, the content of soluble protein and soluble sugar in the seeds of *C. guizhouensis* had closely relation to the higher calcium content and higher calcium variation content, and the accumulation of characters of macromolecules had position significance for the *C. guizhouensis* to adapt the higher calcium environment.

**Key words:** Calcium froms; seed; *Cycas guizhouensis*

贵州苏铁自兰开敏和邹荣福(1983)初次报道, 1984年被列入我国第一批珍稀濒危植物名录, 属世界珍稀濒危植物残遗物种。作为苏铁属中的1个种, 主要分布在贵州望谟、兴义及广西、云南等南盘

江狭小地段, 该区是我国喀斯特地质地貌发育最为典型的核心区, 区内土层贫瘠, 干旱缺水, 土壤钙质含量高, 严酷的自然环境孕育了丰富的植物物种资源, 并且该区植物物种在长期演化过程中相互之间

收稿日期: 2008-01-25 修回日期: 2008-12-25

基金项目: 国家林业局重点科学技术研究计划专项(2006-33); 贵州省自然科学基金(20072041)[Supported by the Key Science and Technology Program of State Forestry Administration(2006-33); the Natural Science Foundation of Guizhou(20072041)]

作者简介: 罗在柴(1978-), 男(布依族), 贵州都匀人, 硕士, 主要从事林木种质资源保育工作, (E-mail)luozaiqi@163.com.

形成了对喀斯特环境特征的遗传适应性(廖颖等, 2001; 罗在柒等, 2006)。

钙既具有营养功能, 又具有信使功能, 是植物必需的营养元素, 在植物生长发育和植物对环境响应系统中起协调作用(Hepler, 2005)。不同植物物种体内钙在不同器官和组织中含量不同, 一般在0.1%~5.0%之间。在植物体细胞内, 钙主要以果胶钙、钙调素蛋白和肌醇六磷酸钙等形式存在, 植物液泡中含大量的草酸钙、柠檬酸钙和苹果酸钙等有机钙(Hirschi, 2004)。对植物体稳定细胞壁和膜结构以及液泡内阴阳离子的渗透调节等起积极作用。因此, 植物生理缺钙导致顶芽、侧芽和根尖等分生组织发生卷曲和畸形, 叶缘开始变黄并坏死等症状, 严重影响种子或果实的美观和品质(White & Broadley, 2003)。龙明华(2005)研究不同钙素水平对厚皮甜瓜叶片光合作用和保护酶活性的影响, 结果表明缺钙胁迫下的光合抑制主要是由于非气孔限制引起, 而高钙胁迫下的光合抑制主要是由于气孔限制引起。刘剑锋(2007)研究了不同时期于果实的不同部位引入 $^{45}\text{Ca}$ 后各个部位放射性比活及钙分配比率变化规律。马建军(2007)采用逐级提取的方法分析了果实中不同形态的钙在果实发育期含量变化及分布, 探明钙在欧李果实中含量变化和不同组织中的分布特性, 为揭示欧李高钙的机理提供材料。

贵州苏铁是中国苏铁的特有种, 作为珍稀古老基因物种, 对研究贵州植物的起源和演化、种子植物的区系和贵州地史与古气候的变迁等都具有重要的科学价值。目前, 贵州苏铁研究在形态解剖特征(艾素云等, 2006)、细胞学(陈训等, 1990)和分子生物学(屈良鹤, 1991)(Xiao, 2004)等方面开展的科研工作。我们拟通过测定贵州苏铁野生居群新鲜成熟种子中不同钙形态的存在部位和含量, 以期对植物钙质营养供需理论奠定基础, 进一步为贵州苏铁种质保存和栽培抚育提供技术指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

贵州苏铁(*Cycas guizhouensis*)新鲜成熟种子采自贵州省兴义则戎, 保鲜带回实验室供试。

### 1.2 方法

将野外采集的种子带回实验室并及时剥离外种皮, 再用钳子剥开坚硬的中种皮, 收集分开的外种皮、

中种皮及胚和胚乳, 材料杀青后烘至恒重, 经高速粉碎机粉碎, 60目过筛备用。全钙测量按照7887-87植物枯枝落叶层的消解法进行消解, 用原子吸收分光光度法进行测定, 即将样品精确称量0.1~0.2g使用浓硝酸:高氯酸=3:1消解, 5%的硝酸定溶, 1%的硝酸锶原子吸收分光光度计, 波长422.7nm测量。

种子中各种Ca化学形态的提取参照Ohat等(1970)的方法改进, 所用的5种提取液依次是80%乙醇、蒸馏水、1mol/L NaCl、2%醋酸和0.6%盐酸。提取的主要组分是硝酸钙和氯化钙(简称为Eth钙)、水溶性有机酸钙( $\text{H}_2\text{O}$ 钙)、果胶酸钙(NaCl钙)、磷酸钙和碳酸钙(HAC钙)、草酸钙(HCl钙), 剩下的残渣中主要成分是硅酸钙(简称为残渣钙), 测定顺序为 $\text{H}_2\text{O}$ 钙、HCl钙、NaCl钙和HAC钙, 具体操作步骤是各形态钙的样品依次加入相应的提取液5mL, 定溶至50mL, 超声波1h, 150r/min床提取1h, 10000r/min离心10min, 然后用下一种提取液按上述步骤提取, 每一种提取液提取的溶液均定容到100mL, 四种提取液提完后将剩下的残渣转入洁净的坩埚中, 干灰化, 连同上述提取的溶液钙均用原子吸收测定。可溶性糖、可溶性蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝G-250染色法)参照文献(李合生, 2000)进行, 实验结果取其平均值。

实验作3次重复, 样品溶液中钙采用3200型原子吸收分光光度计测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 贵州苏铁种子不同组织中总钙含量及分析

在贵州苏铁新鲜成熟种子中, 总钙含量4141.0mg/kg, 占种子重量的4.14%。其中外种皮总钙含量1913.0mg/kg, 其次为中种皮, 含量1608.0mg/kg, 含量最低的是胚, 为620.0mg/kg(图1)。在外源环境富集钙离子的条件下, 为了维护系统钙的平衡, 在种子成长发育过程中有外源钙逐渐向植物体入渗运输的趋势。

### 2.2 贵州苏铁种子不同组织中多种钙形态含量及分析

贵州苏铁种子四种钙形态中, 外种皮 $\text{H}_2\text{O}$ 钙含量高于中种皮和胚, 数值分别为210.3、70.2、70.6mg/kg; HCl钙含量外种皮明显高于胚和中种皮, 分别为470.8、9.9、29.8mg/kg; NaCl钙含量也是外种皮明显高于胚和中种皮, 分别为116.8、20.8、9.2mg/kg; HAC钙含量高低依次为: 外种皮38.4mg/

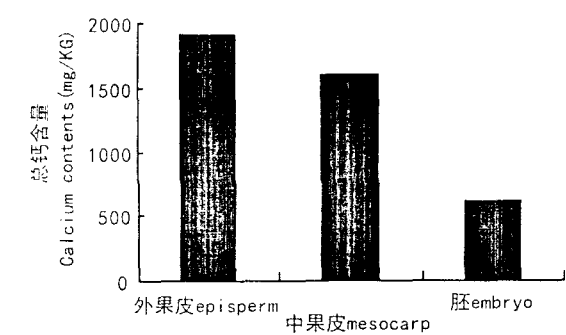


图 1 贵州苏铁种子不同组织中总钙含量  
Fig. 1 Calcium contents in different parts of *Cycas guizhouensis* seed

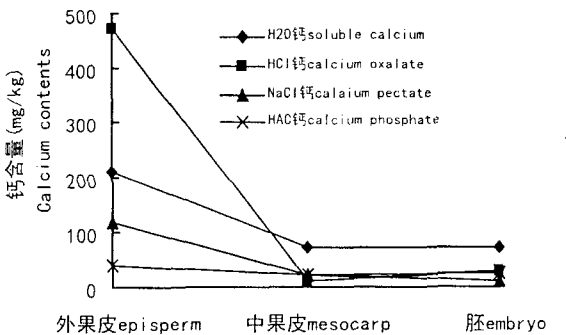


图 2 贵州苏铁种子不同组织钙形态含量及分布  
Fig. 2 Variation of calcium contents in different parts of *Cycas guizhouensis* seed

表 1 贵州苏铁种子不同组织钙形态含量表  
Table 1 Variation of calcium contents in different parts of *Cycas guizhouensis* seed

| 钙形态含量 (mg/kg) | H <sub>2</sub> O 钙 | HCl 钙 | NaCl 钙 | HAC 钙 | 合计    | 占组织总钙百分率 | 占果实总钙百分率 |
|---------------|--------------------|-------|--------|-------|-------|----------|----------|
| 外种皮           | 210.3              | 470.8 | 116.8  | 38.4  | 836.3 | 43.71    | 20.20    |
| 中种皮           | 70.2               | 9.9   | 20.8   | 21.1  | 122.0 | 7.59     | 2.95     |
| 胚             | 70.6               | 29.8  | 9.2    | 24.3  | 133.9 | 21.6     | 3.23     |

kg,胚 24.3 mg/kg,中种皮 21.1 mg/kg(图 1)。

四种钙形态总量指标中,外种皮总量高于胚和中种皮,依次为 936.3、133.9、122.0 mg/kg,合计总量为 1 092.2 mg/kg,占总钙含量的 26.38%。数据表明贵州苏铁新鲜成熟果实中钙主要集中在外种皮,并且主要以 HCl 钙形态存在,含量高达 470.8 mg/kg,分别占外种皮、组织和整个果实的 56.3%、24.6%和 11.4%。各种钙形态分别占组织和种子钙总量的 43.71%和 20.20%,21.60%和 3.23%以及 7.59%和 2.96%(表 1)。

2.3 贵州苏铁种子不同组织中可溶性蛋白质和糖含量及分析

贵州苏铁种子中可溶性糖的含量依次为中种皮、胚和外种皮,可溶性总蛋白的含量依次为胚、中种皮和外种皮。可溶性蛋白质外种皮含量丰富,为 1 027.29 mg/kg,明显高于胚和中种皮含量的 259.43 mg/kg 和 181.63 mg/kg(图 3)。种子中可溶性糖含量外种皮和胚含量相当,分别为 26.5 mg/kg 和 26.0 mg/kg,中种皮由于其坚韧的质地故含量仅为 3.26 mg/kg,数据结果与实际相符,对种子后熟营养供给提供充足的养分(图 4)。研究结果显示,贵州苏铁新鲜成熟种子中钙形态含量与可溶性糖和可溶性蛋白质相关分析结果表明,外种皮钙形态、可溶性糖和可溶性蛋白质丰富含量,再次证明了外种

皮在种子胚的发育过程中主要起到源和库的作用。

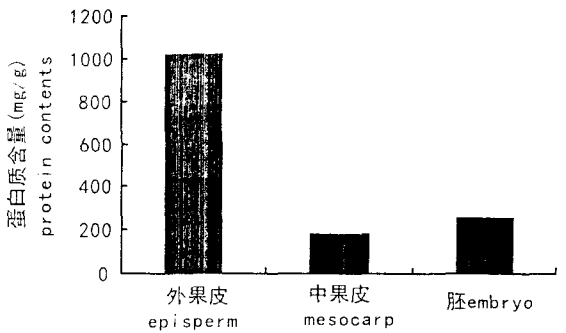


图 3 贵州苏铁种子不同组织中可溶性蛋白质含量  
Fig. 3 The protein contents in different parts of *Cycas guizhouensis* seed

3 讨论

贵州苏铁作为古老孑遗物种,在漫长的地质气候复杂变化过程中,在物种长期演化和进化过程中逐步进化变异适应环境幸存至今,尤其是当前喀斯特环境特性已经从基因型水平深入到物种遗传背景,喀斯特高钙环境特征同时对植物物种在生长发育过程中显现出物种的特异性和优越性,同时物种也进化到依赖环境优势的物质资源,比如高钙特性等。周卫(1999)采用田间试验并结合<sup>45</sup>Ca 示踪及

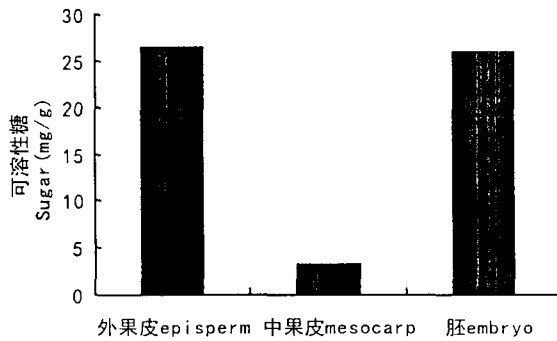


图4 贵州苏铁种子不同组织中可溶性糖含量

Fig. 4 Sugar contents in different parts of *Cycas guizhouensis* seed

植株分析等方法研究苹果幼果钙素吸收特性及激素对其过程的调控方式。董彩霞(2004)在营养液中加入钙及在花期、幼果期分别向花、叶、幼果喷施 20 mg PL 萘乙酸(NAA)+0.5%  $\text{CaCl}_2$  混合液能够显著增加果实钙含量,各种施钙措施显著增加了果实 Vc 含量,降低了可滴定酸度,改善了果实品质。周卫(1999)采用田间试验并结合 $^{45}\text{Ca}$ 示踪及植株分析等方法研究苹果幼果钙素吸收特性及激素对其过程的调控方式。董彩霞(2004)在营养液中加入钙及在花期、幼果期分别向花、叶、幼果喷施 20 mg PL 萘乙酸(NAA)+0.5%  $\text{CaCl}_2$  混合液能够显著增加果实钙含量,各种施钙措施显著增加了果实 Vc 含量,降低了可滴定酸度,改善了果实品质。

### 3.1 各种钙形态在种子中的比重及其存在形式及适应高钙环境的特性

贵州苏铁种子胚总钙含量高于中种皮和外种皮,外种皮无机钙含量高于中种皮和胚,胚草酸钙含量明显高于中种皮和外种皮,外种皮果胶钙含量明显高于中种皮和胚,外种皮磷酸钙含量高于胚及中种皮。贵州苏铁新鲜成熟种子中钙主要集中在外种皮,主要以 HCl 钙形态存在,含量高达 470.8 mg/kg,分别占外种皮、组织和整个种子的 56.3%、24.6%和 11.4%。贵州苏铁之所以能正常生长发育并实现种属繁衍,说明贵州苏铁对高钙喀斯特环境已适应,并表现出相应的适应特征,在种子发育过程中,植物体需要大量的外援钙才能满足种子的正常发育。贵州苏铁单株结实最高可在 700 粒以上,野外调查采摘 78 株得到平均结实量 121.8 粒,平均千粒重 1 145.35 g,最大质量 15.0 g。本实验表明,高钙的环境与植物体间已形成自然耦合系统,

保证种子的质量,并出现了钙水平体系的平衡,满足种子发育的需要。喀斯特地区生长发育的适生树种,在种子发育过程中通过增加外源钙能促进植株的生长发育,尤其促进种子发育、萌发生长和提高抗性(关军锋等,2001)。喀斯特植物物种与环境之间协同进化并形成统一和谐体系。

### 3.2 各种钙形态与可溶性糖、可溶性蛋白的含量的相关分析

种子成熟期水溶性钙的积累明显高于其它形态钙的积累,表明活性钙形态组分对贵州苏铁种子钙吸收积累贡献最大,因此,细胞质中的钙主要与蛋白质、糖类等大分子相结合,并行使功能。钙在树体各器官中主要以活性钙形态存在, $\text{Ca}^{2+}$ 通过  $\text{Ca}^{2+}$ 通道内进入细胞质(尚忠林,2003;Hetherington and Brownlee,2004),并通过  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 和  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向流动蛋白外流以保持胞质内低  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度(Shigaki and Hirschi,2006)。为了应对植物生长发育和响应环境信号, $\text{Ca}^{2+}$ 由质膜、液泡膜和内质网的  $\text{Ca}^{2+}$ 通道进入胞质,导致胞质  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度迅速增加,产生钙瞬变钙振荡,传递到钙信号靶蛋白,如钙调素、钙依赖型蛋白激酶和钙调素磷酸酶 B 类蛋白等,引起特异生理反应(Bothwell and Ng,2005;张和臣等,2007)。At-TPC1 过量表达或反义表达对胞质  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的增加和减少都是由蔗糖诱导的质膜去极化引起的(Furui-chi 等,2001)。实验说明钙在作为营养构建物质和行使信号传递过程中始终与蛋白质密不可分,而在果实膨大期更多的转化为非活性钙组分而作为渗透调节物质,不同植物种类间存在很大差别,主要渗透调节物质可能就是钙离子,因此种子发育期活性钙组分的吸收与积累可能是与高含量的蛋白质和糖类物质间密不可分,并形成贵州苏铁生长发育过程中适应高钙特性环境的重要生理特征,这一推断尚有待今后发现更充分的证据。

### 参考文献:

- 兰开敏,邹荣福. 1983. 贵州一种新苏铁[J]. 植物分类学报,21(2):209-210
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 高等教育出版社
- Ai SY(艾素云),Huang YY(黄玉源),Wu YH(伍映辉). 2006. Study on anatomy of the root of *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae)(贵州苏铁根的解剖学研究)[J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究),28(2):149-156
- Bothwell JHF,Ng CKY. 2005. The evolution of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in photosynthetic eukaryotes[J]. New Phytol,166:21-38

- Chen X(陈训), Wu HM(巫华美). 1990. Karyotype analysis of *Cycas guizhouensis* (贵州苏铁核型分析)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 7(8): 45—48
- Dong CX(董彩霞), Zhou JM(周健民), Fan XH(范晓晖). 2004. Effects of different ways of casupplements on the cacontent and forms in mature fruits of tomato(不同施钙措施对番茄果实钙含量和钙形态的影响)[J]. *Plant Nutrition Fertilizer Sci* (植物营养与肥料学报), 10(1): 91—95
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto SA. 2001. Putative twopore channel AtTPC1 mediates  $\text{Ca}^{2+}$  flux in Arabidopsis leaf cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 42: 900—905
- Guan JF(关军锋), Li GM(李广敏). 2001. The relationship between  $\text{Ca}^{2+}$  and drought resistance in plants( $\text{Ca}^{2+}$  与植物抗旱性的关系)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 18(4): 473—478
- Hepler PK. 2005. Calcium, a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*, 17: 2 142—2 155
- Hetherington AM, Brownlee C. 2004. The generation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 401—427
- Hirschi KD. 2004. The calcium conundrum, both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol* 136: 2 438—2 442
- Liu JF(刘剑锋), Peng SA(彭抒昂), Cheng YQ(程云清). 2007. Studies on calcium transportation and its movement in pear fruit (梨果各部分(皮、肉、核)钙运转动态的研究初报)[J]. *Guihaia* (广西植物), 27(2): 240—243
- Liao Y(廖颖), Wu BH(伍炳华). 2001. The acquirement of stress response characteristics and signal transduction in plants(植物抗逆性的获得与信号传导)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 37(1): 71—75
- Long MH(龙明华), Tang XF(唐小付), Yu WJ(于文进). 2005. Effects of different calcium levels on photosynthesis and protective enzyme activities of melon leaves(不同钙素水平对厚皮甜瓜叶片光合和酶活性的影响)[J]. *Guihaia* (广西植物), 25(1): 77—82
- Shang ZL(尚忠林), Sun DY(孙大业). 2002. Calcium channels in plant cells(植物细胞内的钙通道)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 38(6): 625—630
- Luo ZQ(罗在柒), Yi Y(乙引). 2006. Study on the physiological adaptability of *Taxiphyllum taxiramenum* fleisch under water stress(喀斯特适生植物鳞叶蕨水分生理适应性研究)[J]. *Guizhou Fore Sci Tech* (贵州林业科技), 34(3): 29—32
- Ma JJ(马建军), Zhang LB(张立彬), Yu FM(于凤鸣). 2007. Contents and distribution of different forms of calcium in *Prunus humilis* (野生欧李果实中不同形态钙的含量及分布)[J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 34(3): 755—759
- Ohat Y, Yamamoto K, Deguchi M. 1970. Mhemical fractionation of calcium in the fresh leaf blade and influences of deficiency or over supply of calcium and age of leaf on the content of each calcium fraction[J]. *Soil Manure Japan*, 41: 19—26
- Qu LH(屈良鹤), Yu XQ(余小强), Shi SH(施苏华), et al. 1991. Molecular evidence for the status of the cycad *Cycas revoluta* in seed-plant evolution(苏铁种子植物进化中的位置: 分子生物学证据)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报(自然科学版)), 3(1): 72—75
- Shigaki T, Hirschi KD. 2006. Dicerse functions and molecular properties emerging for CAX cation/ $\text{H}^{+}$  exchangers in plants [J]. *Plant Biol*, 8: 419—429
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants[J]. *Ann Bot*, 92: 487—511
- Xiao LQ, Ge XJ, Gong X. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) [J]. *Annals Bot*, 94: 133—138
- Zhang HC(张和臣), Yin WL(尹伟伦), Xia XL(夏新莉). 2007. The Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  Signal Transduction under Abiotic Stresses in Plants(非生物逆境胁迫下植物钙信号转导的分子机制)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 24: 114—122
- Zhou W(周卫), Wang H(汪洪), Zhao LP(赵林萍). 1999. Study on characteristics of calcium uptake by young fruit of apple (*Malus pumila*) and its regulation by hormone(苹果幼果钙素吸收特性与激素调控)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 32(3): 52—58

(上接第 602 页 Continue from page 602)

- banding in cytological research of Pinaceae(荧光显带在松科植物细胞学研究中的应用)[J]. *World Fore Res* (世界林业研究), (3): 18—22
- Xu XF(徐秀芳), Zhang HY(张海洋), Yuan QH(袁秋红), et al. 2004. Studies on chromosome of three types of *Solanum nigrum* in China(中国龙葵复合种三类型的染色体数目研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 24(6): 544—545
- Yang DK(杨德奎), Zhou JY(周俊英), Miao MS(苗明升), et al. 1996. A study chromosome of *Solanum nigrum* (龙葵的染色体研究)[J]. *Shandong Sci* (山东科学), 9(1): 70—71
- Yang YN(杨永年), Zhang HY(张海洋), Wu GY(吴国宜). 1994. The cytological analyses and studies of geographic distribution in *Solanum nigrum* complex of China(中国龙葵复合种细胞学分析和地理分布的研究)[J]. *Bull Bot Res* (植物学研究), 14(2): 205—213
- Zhang HY(张海洋), Jiang XJ(姜祥君), Dong XW(董锡文), et al. 1999. Numerical taxonomic studies on *Solanum nigrum* in China(中国龙葵数值分类研究)[J]. *Bull Bot Res* (植物学研究), 19(2): 127—131
- Zhang HY(张海洋), Xu XF(徐秀芳), Zhang JF(张菊芬). 2004. Nutrition ingredient and exploitation of *Solanum nigrum* (龙葵的营养成分及其开发利用)[J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 23(1): 44—46