

· 研究报告 ·

## 岩溶环境下华南忍冬气孔泌钙及其生物矿化

吴耿<sup>1,2</sup>, 付春华<sup>1,2</sup>, 黄永伟<sup>1,2</sup>, 李为<sup>1,2</sup>, 余龙江<sup>1,2</sup>, 栗茂腾<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>华中科技大学生命科学与技术学院生物技术系, 资源生物学与生物技术研究所, 武汉 430074

<sup>2</sup>华中科技大学, 分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074

**摘要** 植物对不同生长环境具有不同的适应机制。华南忍冬(*Lonicera confusa*)是生长于岩溶富钙环境下的典型植物, 它具有通过气孔泌钙方式适应富钙环境的特性。以华南忍冬为研究对象, 利用环境扫描电镜系统研究了华南忍冬气孔泌钙现象, 并对泌钙后自组装的不同生物矿化物质进行了能谱分析, 同时对比分析了能谱仪的点扫描和面扫描方式对相同物质的检测效果。结果表明: 生长于岩溶富钙环境下的华南忍冬叶片表面不同晶型的钙盐是由气孔排出后形成的; 钙盐分泌出组织后, 自组装成多种形态的晶体, 如晶沙、球晶和棱晶, 晶体中除含有较高的钙外, 还含有一定量的硫及其它元素, 推测晶体的成核物质可能是由含硫氨基酸构成的蛋白质。研究结果为相关钙盐的仿生矿化研究提供了一定的启示。能谱分析能有效用于植物表面的微区分析及植物分泌物的物质基础测定。

**关键词** 生物矿化, 泌钙, 能谱分析, 华南忍冬, 气孔

吴耿, 付春华, 黄永伟, 李为, 余龙江, 栗茂腾 (2011). 岩溶环境下华南忍冬气孔泌钙及其生物矿化. 植物学报 46, 658–664.

钙是陆地圈中大量存在的元素之一。大多数的钙在土壤中为可利用状态, 所以, 在植物生长的自然环境中钙的含量十分丰富(Barker and Pilbeam, 2006)。岩溶环境是典型的富钙环境(Yuan, 2001)。钙是植物生长发育所需的重要元素, 它不但在维持细胞壁、细胞膜及膜结合蛋白的稳定性上具有重要作用(Bush, 1995; Cortés et al., 2004; Bates et al., 2005), 而且还可作为第二信使调节植物的生长、发育和抗逆等许多重要的生理反应(孙海燕等, 2003; Schiøtt et al., 2004; 周卫和汪洪, 2007)。虽然钙在植物的很多代谢活动中都发挥重要作用(Urao et al., 1999; Kreps et al., 2002; Rentel and Knight, 2004), 但植物体中钙离子含量过高会抑制细胞壁的酸化和细胞的伸长, 从而影响植物的正常生长发育(李东林和张玉琼, 1998)。因此, 细胞液中自由钙离子的浓度一般被限制在 $10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup>量级甚至更低(Kretsinger, 1977)。已往的研究表明, 植物根部对钙离子的吸收并无明显限制(Kirkby and Pilbeam, 1984; Volk et al., 2004), 因此认为植物体采取了多种措施来应对过量的钙供应。

高等植物一般通过控制细胞内钙的分布和区划来调节来自环境中的大量钙离子与植物细胞所需的低水平钙离子间的平衡。植物中钙转运相关蛋白可将细胞质中的钙离子运输到液泡、内质网、线粒体、质体和细胞壁等部位(Pittman and Hirschi, 2003; 周卫和汪洪, 2007), 或以草酸钙等矿物质的形式存在于细胞中(Webb, 1999; Volk et al., 2004)。研究表明, 植物组织中产生的最主要的生物矿物有3种, 即草酸钙、硅石和碳酸钙, 其中草酸钙是植物中最常见且分布最广的一种生物矿物(Webb, 1999)。由于草酸钙在水中的溶解度极低, 故为植物提供了一个大容量的“钙库”(Zindler-Frank, 1976)。植物中钙盐的形成有利于调节体内存在的多余钙元素, 对植物适应富钙环境具有重要意义。

生物矿化产物的形成是新陈代谢的结果, 植物界广泛存在生物矿化现象(崔福斋, 2007)。草酸钙的生物矿化现象存在于绝大多数具有光合生理过程的物种中, 包括藻类、低等维管植物、裸子植物和被子植物等(Franceschi and Nakata, 2005)。钙盐主要沉积

收稿日期: 2011-04-25; 接受日期: 2011-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(No.30600074)、湖北省杰出青年科学基金(No.2010CDA097)、教育部留学回国人员科研启动基金(No.20091225)和华中科技大学自主创新基金(No.2011TS147)

\* 通讯作者。E-mail: limateng426@163.com

于植物体液泡和细胞壁中,特别是异化成晶的石细胞中(Foster, 1956),此外,还见于薄壁组织、维管束鞘、表皮细胞或叶肉细胞中(Pennisi and McConnell, 2001a; Hudgins et al., 2003; Franceschi and Nakata, 2005)。钙盐晶体的形态主要有5种,即方晶、针晶、簇晶、沙晶和柱晶,一般1种植物只能见到1种形态,2–3种形态同时存在的现象只在少数植物中发现(Franceschi and Nakata, 2005)。目前,对于植物相关钙晶体的研究主要集中在组织或细胞内(Pennisi and McConnell, 2001b; Zindler-Frank et al., 2001; Volk et al., 2002, 2004; White and Broadley, 2003; Mazen et al., 2004)。关于这些钙盐由植物体分泌到体外并形成不同形貌的晶体研究则相对较少。

华南忍冬(*Lonicera confusa*)隶属忍冬科,其根系发达,适应性强,在生态环境建设及水土保持中具有重要作用,我国西南岩溶地区广有栽培(Yuan, 2001)。前期研究表明,华南忍冬能以在叶片表面腺体形成过程中贮藏钙、腺毛累积钙以及气孔泌钙3种方式适应岩溶富钙环境(Wu et al., 2011),但缺乏对气孔泌钙后的钙盐矿化过程研究。本文在此基础上系统研究了气孔泌钙过程,并对泌钙后自组装的不同晶体形貌的生物矿化物质进行了能谱分析,同时对比分析了点扫描和面扫描对矿化物质的检测效果,为进一步研究植物对富钙的适应方式及生物仿生材料的制备奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 取样地点

以位于广西马山县古零镇国土资源部的岩溶动力学重点实验室弄拉观测站的华南忍冬(*Lonicera confusa* (Sweet) DC.)为实验材料,取其成熟叶片进行相关实验。弄拉观测站的地理坐标为108°19'E, 23°29'N,地貌类型为典型岩溶峰丛洼地。该观测站位于亚热带季风气候区,年平均气温19.84℃,年降雨量1756.6 mm。出露地层为泥盆系东岗岭组中段(D<sub>2</sub>d<sup>2</sup>),岩性以含泥硅质的白云岩为主。岩石中富含Ca和Mg的碳酸盐成分,此外,Al、Fe、Si、P和K等常量元素的背景值也较高。该区域土壤具有偏碱富钙的石灰土特征,其中的Ca含量比酸性土高3倍左右。弄拉观测站内,土壤A层的钙含量测定值为3.26 mg·g<sup>-1</sup>(蒋忠

诚, 2000; 曹建华等, 2003; 邓新辉和蒋忠诚, 2007)。

### 1.2 分析方法

将华南忍冬叶片清洗干净后,置于冰上,沿中脉切割成0.5 cm × 0.5 cm大小的方块,迅速投入含有2.5%戊二醛固定液的青霉素小瓶中,在瓶口插上一次性针头,然后利用真空干燥器抽真空,待叶片下沉至瓶底后放入4℃冰箱中固定24小时。吸除固定液,用浓度为0.1 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸缓冲液冲洗3次,每次20分钟。吸除缓冲液,用乙醇逐级脱水2次(乙醇浓度梯度分别为30%、50%、70%、85%、95%和100%),样品在每级停留10分钟。吸去乙醇,加入醋酸异戊酯:乙醇(1:1, v/v)混合液,浸泡20分钟,适当摇动;吸去混合液,加入纯醋酸异戊酯,浸泡20分钟,摇动,使醋酸异戊酯替代叶内乙醇。将样品从瓶中取出,放到不锈钢样品篮内的滤纸上,其中滤纸被醋酸异戊酯浸透。在HCP-2型临界点干燥仪(Hitachi HCP-2, JAPAN)上进行干燥。用双面导电胶把样品黏附于样品台上,在离子溅射仪(Gatan ALTO 2500, USA)中进行真空喷镀。然后,置于环境扫描电镜(Quanta 200型,荷兰FEI公司)下观察并拍照(邵邻相等, 2003; Pathan et al., 2008)。点扫描和面扫描参考栗茂腾等(2007)所述方法进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 气孔泌钙过程

华南忍冬在富钙环境下存在气孔泌盐现象(Wu et al., 2011),在气孔周围形成不同晶貌的钙盐晶体。泌钙过程如下:(1) 钙盐积累,钙盐积累于气孔的开口处,此时,钙盐分泌量相对较少,仅出现在填充气孔口部,呈现细小的颗粒状,其直径小于1 μm(图1A);(2) 钙盐排出并经过一定量积累后,气孔口部的钙盐开始向周边扩展(图1B);(3) 钙盐成晶,扩展至气孔周围的部分钙盐有一部分自组装成直径为1–2 μm的球状晶体(图1C),还有部分形成晶沙,积累到一定程度后形成棱晶(图1D);(4) 泌钙完成期,整个泌钙过程结束后,分泌出的钙盐形成多种晶貌,其中最多的晶体形态为棱晶(图1E)。此时,气孔开始通畅,完成泌钙过程,随着泌钙过程的结束,较多的自组装晶体积累于叶片上(图1F)。鉴于钙离子随着水分由环境进入

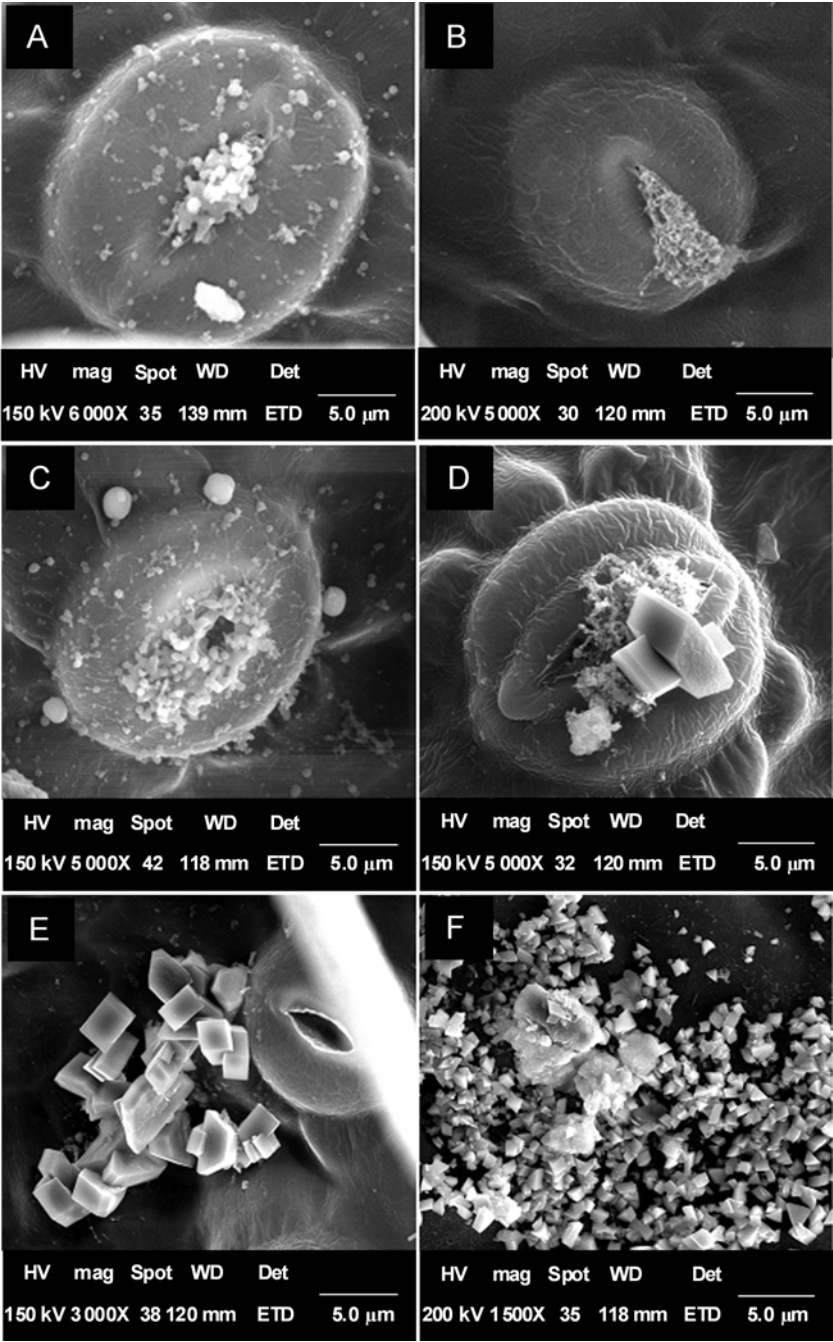


图1 华南忍冬叶片气孔的泌钙过程

(A) 钙盐积累; (B) 钙盐排出; (C) 钙盐成晶; (D) 泌钙完成; (E) 钙结晶形态; (F) 钙结晶在叶片上的积累

Figure 1 The process of calcium salt excreted by stoma of *Lonicera confusa*

(A) Calcium salt accumulation; (B) Calcium salt excretion; (C) Calcium salt crystal formation; (D) The completion of calcium secretion; (E) The form of calcium crystals; (F) Accumulation of calcium crystals in the leaves of *Lonicera confusa*

植物体内的动力主要来自植物的蒸腾作用, 所以植物对钙离子的吸收受蒸腾作用强度的影响(Bangerth,

1979; McLaughlin and Wimmer, 1999), 因此气孔泌钙的动力可能为蒸腾拉力。草酸钙是生物体中分布最

广的含钙化合物, 主要以一水合草酸钙和二水合草酸钙两种形式存在, 并且其存在形式与它们水合作用的不同密切相关。草酸钙通常为无色透明晶体, 以不同形态分布于细胞中(崔福斋, 2007)。我们推测由气孔排出的钙盐成分可能为草酸钙或碳酸钙。

2.2 不同类型晶体的能谱分析

生物矿化物质不同晶貌的形成受多种因素的调控, 有机基质在生物矿化过程中发挥着重要调控作用(崔福斋, 2007)。我们利用能谱技术对不同分泌阶段气孔分泌的不同类型晶体进行了成分分析(表1)。结果表明, 钙盐由气孔排出形成沙晶或其它晶貌的晶体时, 其中含有多重成分, 金属元素主要有Ca和Na, 非金属元素主要有C、O、S和Cl。由此推测, 球晶和方晶可能是由气孔排出的盐分结晶形成。在形成不同晶型的过程中, 其元素相对组成发生了一定的变化。当盐分从气孔刚刚排出时, C元素在盐分中的相对重量百分比高达82.72%。在形成球晶或方晶时, C元素含量显著下降, 尤其在方晶中的相对比重下降至53.63%; 其它3种元素(O、Na和Cl)在球晶或方晶中的重量百分比也呈下降趋势, 但O元素的相对变化幅度较小; Na和Cl元素的含量较少(重量百分比均小于1%), 且在方晶中, Na和Cl元素的重量百分比分别为0.09%和0.06%。由于Na和Cl元素形成的盐均为可溶性盐, 在方晶形成过程中, 可能会被叶片冷凝的水分溶解而从其表面流失。在不同晶型中, Ca和S元素的相对含量也存在显著差异, 球晶和方晶中的钙元素相对含量分别为沙晶中的3.92倍和8.17倍; 在沙晶和球晶中, S和Cl元素的相对含量并未发生显著变化, 但是方晶

中的S元素为沙晶中的10.8倍, 可推知S元素在方晶的形成中具有重要作用。

同时, 我们利用能谱面扫描技术对图1C中的球状晶体进行了元素分析, 结果与点扫描类似。视野内的4个球状晶体中扫描的点密度高于其背景, 显示视野内的4个球状晶体钙元素含量高。对C元素的检测表明, 气孔区域的含量高于其它区域, 但对其它非金属元素特别是其中含量较高的Cl、O和S元素检测发现, 其为均匀分布(图2)。

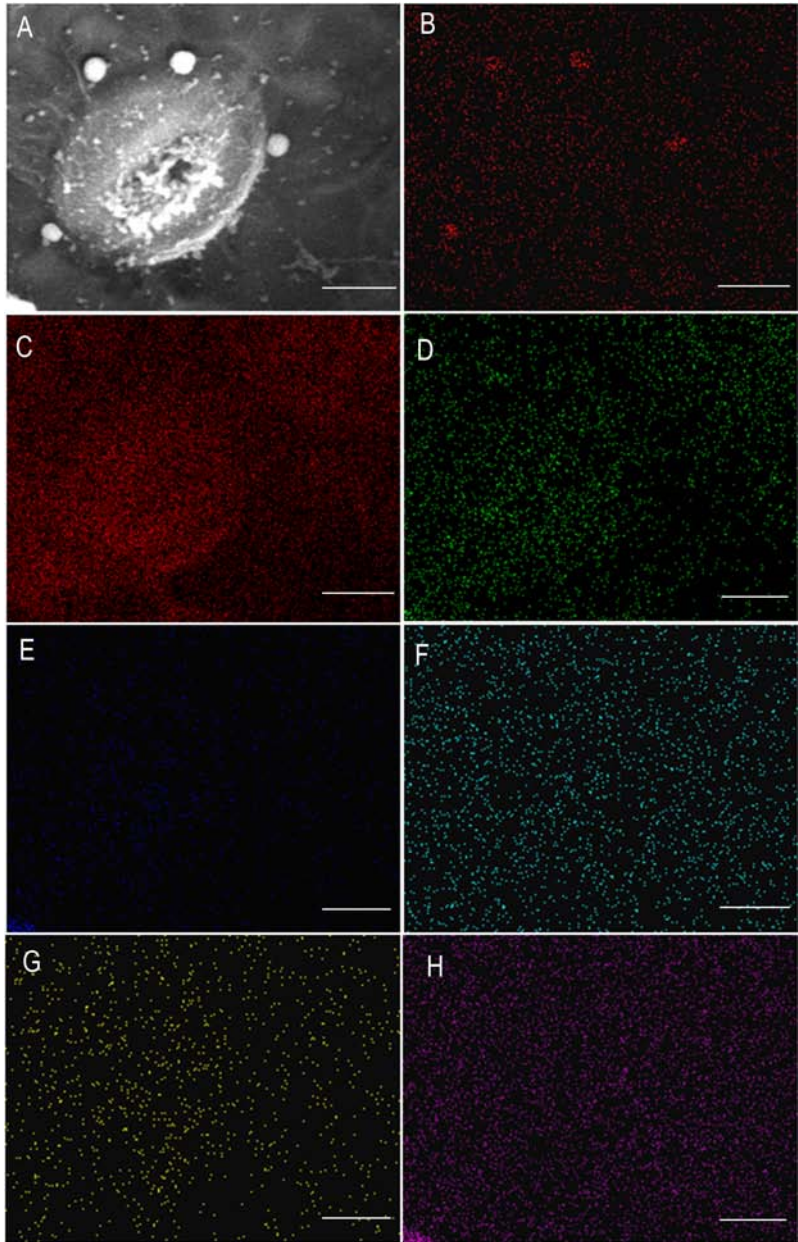
生物矿化的实质是在生物体内进行晶体生长过程。除了传统结晶学所研究的晶体生长的影响因素(过饱和度的控制、物质扩散和传输等)外, 生物矿化还需经历更多且更加复杂的化学及生物过程, 如结构互补、空间匹配和经典协同等, 而这些作用又是通过蛋白质、细胞乃至基因来实现的。生物矿化主要包括成核、生长和聚集3个阶段, 其中成核是在生物有机基底上发生的。研究表明, 当有机基底作为一个异相在溶液中存在时, 就能够在很大程度上改变甚至控制无机矿物的成核过程(崔福斋, 2007)。目前, 关于高等植物体的生物矿化形成研究主要集中在生物硅化和生物钙化两方面, 其中生物钙化主要集中在草酸钙晶体的形成方面(Franceschi and Nakata, 2005)。前人的研究表明, 植物体内的草酸钙晶体是由水溶性蛋白质构成的有机基质控制的, 这些水溶性蛋白质包括一些相对分子质量不同的多肽, 部分蛋白具有改变草酸钙晶体表面特性的作用(Jáuregui-Zúñiga et al., 2005)。另有研究发现, 水葫芦(*Eichhornia crassipes*)叶沉积的草酸钙晶体中含有特殊的钙结合蛋白, 这种蛋白对于调节晶体的形成具有重要作用, 分离获得相

表1 华南忍冬叶片气孔泌钙形成晶体的能谱(EDX)分析

Table 1 The energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis of crystal formed by stoma excreted calcium in *Lonicera confusa* leaves

Elements	Sandy crystals (Figure 1B)		Spherical crystals (Figure 1C)		Square crystals (Figure 1D)	
	Wt (%)	At (%)	Wt (%)	At (%)	Wt (%)	At (%)
C	82.72	88.39	71.99	82.44	53.63	73.24
O	11.96	9.59	14.83	12.76	10.38	10.65
Ca	2.75	0.88	10.80	3.71	22.48	9.20
S	1.23	0.49	1.21	0.52	13.30	6.81
Na	0.82	0.46	0.57	0.34	0.09	0.06
Cl	0.52	0.19	0.50	0.19	0.06	0.03

Wt: 重量百分比; At: 原子百分比 Wt: Percentage of the weight; At: Percentage of the atom



**图2** 华南忍冬叶片气孔泌钙区域的面扫描能谱(EDX)分析  
(A) 泌钙区域; (B)–(H) 利用能谱面扫描技术对泌钙区域进行Ca、C、O、Na、Cl、Mg和S元素分析。Bar=10.0 μm

**Figure 2** Analysis of the area of Ca excretion in *Lonicera confusa* leaves by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)  
(A) The area of Ca excretion; (B)–(H) Elemental analysis Ca, C, O, Na, Cl, Mg and S of the area of Ca excretion by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Bar=10.0 μm

关蛋白发现这些蛋白和钙离子具有较好的亲和性(Li et al., 2003)。晶体中出现的硫元素可能来源于成核的有机基质, 即成核蛋白。对不同分泌阶段形成晶体的

分析表明, 气孔周围形成的球晶和方晶主要成分与正处于分泌过程中的分泌物一致, 说明形成的晶体源于气孔排出的钙盐, 这种现象在华南忍冬以外的其它物

种中尚未见报道。叶片表面晶体自组装成不同形态的晶体成核物质的机制有待进一步研究。

总之, 生长于岩溶富钙环境下的华南忍冬叶片表面不同晶型的钙盐是由气孔排出后形成的。钙盐分泌出组织后, 自组装成多种形态的晶体, 如晶沙、球晶和棱晶, 晶体中除含有较高的钙外, 还含有一定量的硫及其它元素。推测晶体的成核蛋白可能由含硫氨基酸构成。本研究给相关钙盐的仿生矿化研究提供了一定的启示, 并表明能谱分析能有效用于植物表面的微区分析及植物分泌物的物质基础测定。

**致谢** 华中科技大学材料科学与工程学院李娟博士对论文提出宝贵意见, 华中科技大学分析测试中心罗慧倩老师在电镜观察及能谱分析过程中给予指导和帮助, 特此感谢。

## 参考文献

- 曹建华, 袁道先, 潘根兴 (2003). 岩溶生态系统中的土壤. 地球科学进展 **18**, 37–44.
- 崔福斋 (2007). 生物矿化. 北京: 清华大学出版社. pp. 90–103, 310–324.
- 邓新辉, 蒋忠诚 (2007). 广西弄拉森林植被的喀斯特效应. 地球与环境 **35**, 128–133.
- 蒋忠诚 (2000). 论南方岩溶山区生态环境的元素有效态. 中国岩溶 **19**, 123–128.
- 李东林, 张玉琼 (1998).  $\text{Ca}^{2+}$  对植物叶片衰老的双向调节作用. 生物学杂志 **15**(5), 8–10.
- 梁茂腾, 付春华, 刘建民, 李强, 李为, 李涛, 余龙江 (2007). 电子探针在分析农作物叶片元素含量及微区分析中的应用. 作物学报 **33**, 646–651.
- 邵邻相, 杨菊林, 郭水良 (2003). 3种香茶菜茎叶表面的扫描电镜观察. 中草药 **34**, 947–950.
- 孙海燕, 贾桂霞, 温跃戈 (2003). 钙在植物花发育过程中的作用. 植物学通报 **20**, 168–177.
- 周卫, 汪洪 (2007). 植物钙吸收、转运及代谢的生理和分子机制. 植物学通报 **24**, 762–778.
- Bangerth F (1979). Calcium-related physiological disorders of plants. *Annu Rev Phytopathol* **17**, 97–122.
- Barker AV, Pilbeam DJ (2006). Handbook of Plant Nutrition. Boca Raton: CRC Press. pp. 12–12.
- Bates S, MacCallum DM, Bertram G, Munro CA, Hughes HB, Buurman ET, Brown AJP, Odds FC, Gow NAR (2005). *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem* **280**, 23408–23415.
- Bush DS (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**, 95–122.
- Cortés JCG, Katoh-Fukui R, Moto K, Ribas JC, Ishiguro J (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Pmr1p is essential for cell wall integrity and is required for polarized cell growth and cytokinesis. *Eukaryot Cell* **3**, 1124–1135.
- Foster AS (1956). Plant idioblasts: remarkable examples of cell specialization. *Protoplasma* **46**, 184–193.
- Franceschi VR, Nakata PA (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 41–71.
- Hudgins JW, Krekling T, Franceschi VR (2003). Distribution of calcium oxalate crystals in the secondary phloem of conifers: a constitutive defense mechanism? *New Phytol* **159**, 677–690.
- Jáuregui-Zúñiga D, Reyes-Grajeda JP, Moreno A (2005). Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Sci* **168**, 1163–1169.
- Kirkby EA, Pilbeam DJ (1984). Calcium as a plant nutrient. *Plant Cell Environ* **7**, 397–405.
- Kreps JA, Wu YJ, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**, 2129–2141.
- Kretsinger RH (1977). Evolution of the informational role of calcium in eukaryotes. In: Wasserman RH, Corrandino RA, Carafoli E, Kretsinger RH, MacLennan DH, Siegel FL, eds. Calcium-Binding Proteins and Calcium Function. New York: Elsevier/North-Holland. pp. 63–72.
- Li XX, Zhang DZ, Lynch-Holm VJ, Okita TW, Franceschi VR (2003). Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiol* **133**, 549–559.
- Mazen AMA, Zhang DZ, Franceschi VR (2004). Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. *New Phytol* **161**, 435–448.
- McLaughlin SB, Wimmer R (1999). Tansley review No.104—calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytol* **142**, 373–417.
- Pathan AK, Bond J, Gaskin RE (2008). Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces—horses for courses. *Micron* **39**, 1049–1061.
- Pennisi SV, McConnell DB (2001a). Inducible calcium sinks and preferential calcium allocation in leaf primordia of *Dracaena sanderiana* Hort. Sander ex M.T. Mast.



- (Dracaenaceae). *Hortscience* **36**, 1187–1191.
- Pennisi SV, McConnell DB** (2001b). Taxonomic relevance of calcium oxalate cuticular deposits in *Dracaena* Vand. ex L. *Hortscience* **36**, 1033–1036.
- Pittman JK, Hirschi KD** (2003). Don't shoot the (second) messenger: endomembrane transporters and binding proteins modulate cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 257–262.
- Rentel MC, Knight MR** (2004). Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 1471–1479.
- Schiøtt M, Romanowsky SM, Bækgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF** (2004). A plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 9502–9507.
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K** (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743–1754.
- Volk GM, Goss LJ, Franceschi VR** (2004). Calcium channels are involved in calcium oxalate crystal formation in specialized cells of *Pistia stratiotes* L. *Ann Bot-London* **93**, 741–753.
- Volk GM, Lynch-Holm VJ, Kostman TA, Goss LJ, Franceschi VR** (2002). The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol* **4**, 34–45.
- Webb MA** (1999). Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* **11**, 751–761.
- White PJ, Broadley MR** (2003). Calcium in plants. *Ann Bot-London* **92**, 487–511.
- Wu G, Li MT, Zhong FX, Fu CH, Sun J, Yu LJ** (2011). *Lonicera confusa* has an anatomical mechanism to respond to calcium-rich environment. *Plant Soil* **338**, 343–353.
- Yuan DX** (2001). On the karst ecosystem. *Acta Geol Sin* **75**, 336–338.
- Zindler-Frank E** (1976). Oxalate biosynthesis in relation to photosynthetic pathway and plant productivity. *Z Pflanzen Physiol* **80**, 1–13.
- Zindler-Frank E, Honow R, Hesse A** (2001). Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *J Plant Physiol* **158**, 139–144.

## Calcium Salt Excreted by Stoma and Its Biomineralization in *Lonicera confusa* Under a Calcium-rich Environment

Geng Wu<sup>1,2</sup>, Chunhua Fu<sup>1,2</sup>, Yongwei Huang<sup>1,2</sup>, Wei Li<sup>1,2</sup>, Longjiang Yu<sup>1,2</sup>, Maoteng Li<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Resource Biology and Biotechnology, Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

**Abstract** Plants have several strategies to adapt to different environments. *Lonicera confusa* is a typical species in karst calcium (Ca)-rich environments; to adapt to the Ca-rich environment, it excretes calcium by leaf stoma. In the present study, the calcium-excretion process of *L. confusa* was investigated by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). We compared the different types of Ca crystals by self-assembly of secreted products with point and line-by-line scanning. Ca crystals are formed after Ca salt is excreted by stoma of *L. confusa* in the karst Ca-rich environment. Ca salt could self-assemble 3 types of crystals, prisms, ball and crystal sand. Crystals have a large amount of Ca, and sulfur (S) and other elements, which are present in certain ratio. The crystal nucleus protein is rich in S element, which is beneficial for biomineralization of Ca-related crystal and others. EDX could be effectively used for microprobe analysis of plant leaves and identifying plant-excreted products.

**Key words** biomineralization, calcium excretion, energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis, *Lonicera confusa*, stoma

**Wu G, Fu CH, Huang YW, Li W, Yu LJ, Li MT** (2011). Calcium salt excreted by stoma and its biomineralization in *Lonicera confusa* under a calcium-rich environment. *Chin Bull Bot* **46**, 658–664.

\* Author for correspondence. E-mail: limateng426@163.com

(责任编辑: 孙冬花)