

文章编号:1000-8551(2005)03-175-06

离体培养条件对平贝母生物碱含量的影响

李 云¹ 梁庆丰² 曹孜义² 钱永强¹

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院,教育部林木花卉遗传育种重点实验室,北京 100083;

2. 甘肃农业大学农学院,甘肃 兰州 730071)

摘 要:以平贝母试管苗为材料,通过测定生物量增殖倍数、折干率、生物碱含量等指标,对基本培养基种类、培养方式、培养周期、植物生长调节剂种类及配比、蔗糖浓度、病毒唑用量等可能影响平贝母生物碱产量的因素进行研究。结果表明,以LS为基本培养基,附加5%蔗糖,固体培养周期为60d时,利于提高鳞茎生物碱含量及生物碱产量;液体培养基虽有利于平贝母鳞茎增殖与子贝的分化,但不利于增加生物碱产量;植物生长调节剂对刺激培养物生长有显著促进作用,其中以BA1.0 mg/L与NAA0.5 mg/L组合为佳;5mg/L病毒唑能明显提高鳞茎的增殖倍数。试验最佳离体培养基为LS+BA1.0mg/L+NAA0.5 mg/L+病毒唑5mg/L+5%蔗糖;培养60d生物碱产量可达1.62mg/L。

关键词:平贝母;离体培养;生物碱

EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON THE ALKALOID YIELD OF

Fritillaria ussuriensis MAXIM FROM BULB *in vitro*

LI Yun¹ LIANG Qing-feng² CAO Zi-yi² QIAN Yong-qiang¹

(1. Key Lab. for Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, MOE;
School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083;

2. Agricultural college, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, 730071)

Abstract: Factors (including culture media, culture methods, time, plant growth regulators, sucrose concentration in the medium as well as ribavirin) influencing the alkaloid yield of *Fritillaria ussuriensis* Maxim from bulb *in vitro* were investigated by evaluation of the bulb growth, the alkaloid content, the ratio of dry weight and fresh weight (DW/FW), the alkaloid yield, etc. The result showed that LS solid medium was better than others on the yield of the alkaloid. The highest yield of 1.62 mg/L was achieved from LS solid medium with 1.0 mg/L BA, 0.5 mg/L NAA, 5mg/L ribavirin as well as 5mg/L sucrose after culture 60 d. The yield and the content of alkaloid had no significant increase on the LS liquid medium with the same condition as the solid one, however, liquid culture stimulated the bulb propagation.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim; culture *in vitro*; alkaloid

贝母为百合科(Liliaceae)贝母属(*Fritillaria* L.)植物的鳞茎,在我国已有2000多年的药用历史,为重要的中药材^[1]。但贝母类商品药材野生资源逐年减少,而其有性繁殖周期长,无性繁殖系数低,人工栽培条件苛刻,难以满足市场需求^[2]。平贝母为我国东北长白山区特有的药用贝母,是目前国内四大药用

收稿日期:2004-07-20

基金项目:农业部“948”项目“植物快速繁殖用生物反应器及配套技术(201044)”

作者简介:李云(1963-),男,博士,副教授,从事林木育种和生物技术方面研究和教学工作。Email:yunli@bjfu.edu.cn

商品贝母之一。但其一年内两季休眠,且生长慢、繁殖难^[3],加之过度采挖,自然蕴藏量锐减,已被《中国珍稀濒危植物红皮书》定为渐危种^[4]。为了解决保护自然资源和生态环境与开发平贝母的药用价值之间的矛盾,需要另辟途径。其中利用离体培养平贝母生产生物碱,不仅可提高平贝母利用率,增加平贝母生物碱产量,同时也可有效保护平贝母野生资源,具有极大的社会效益和经济效益。为此,本文对平贝母离体培养途径、培养条件等可能影响生物碱产量的因素进行研究,以期能提高药用生物碱的含量,为进一步大规模生产应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

平贝母鳞茎干药材购自长春市药材市场。以平贝母鳞茎为外植体建立无菌培养体系。

1.2 试验方法

以再生鳞茎作为外植体接种到预先称重的培养基(pH5.8)上,鳞茎(尽量保持原培养平贝母丛生小鳞茎状态)或愈伤组织切成直径约0.5cm的小块在培养皿中混匀,以保证每瓶鳞茎或愈伤组织无差异。培养温度为(21±2),光强2000lx,光照时间12h/d。

试验采用单因子对比及完全随机区组试验设计,测定项目为培养基中鳞茎干物质产量、折干率、鳞茎总生物碱含量和每升培养基可增总生物碱产量等指标。

1.2.1 基本培养基对生物碱产量的影响

试验对MS、B₅、LS、N₆四种基本培养基进行了选择(均附加KT1.0 mg/L, NAA0.5 mg/L),每种培养基接种20瓶,60d时收获,测定。

1.2.2 培养方式对生物碱产量的影响

在LS固体培养基中培养,每10d随机取样20瓶,共培养80d取样8次,同步测定。

液体培养基成分与固体培养基相同,区别仅在于不加琼脂。培养材料接种在装有10ml培养基的50ml三角瓶中,30d时补加10ml液体培养基(以防止初始培养时过多液体培养基淹没鳞茎组织)。培养30d时开始取样,每10d随机取20瓶,共培养80d取样6次,同步测定。

1.2.3 培养周期对生物碱产量的影响

在LS固体培养基中培养20d时开始取样,每10d随机取20瓶,共培养80d取样7次,同步测定。

1.2.4 植物生长调节剂对生物碱产量的影响

试验以LS为基本培养基,共设4组处理。各处理添加生长调节剂浓度配比组合为:A. KT1.0 mg/L + NAA0.5 mg/L; B. KT1.0 mg/L + IAA0.5 mg/L; C. BA1.0 mg/L + NAA0.5 mg/L; D. BA1.0 mg/L + IAA0.5 mg/L。将平贝母鳞茎按上述材料与方法接种,每种培养基接种20瓶,培养60d收获。通过测定培养物增殖倍数、折干率、生物碱含量等指标筛选出适合平贝母生长及提高生物碱产量的生长调节剂配比。

1.2.5 蔗糖浓度对鳞茎增殖和生物碱产量的影响

在LS培养基中添加不同浓度的蔗糖,浓度分别为2%、3%、4%、5%、6%,共5组,每组培养20瓶。60d后,对培养物生长量和生物碱产量进行测定。

1.2.6 病毒唑对平贝母鳞茎生长及生物碱产量的影响

将不同浓度(0、5、10或50 mg/L)病毒唑在无菌状态下分别添加到LS培养基中,共4组,每组接种20瓶。60d后,对平贝母鳞茎生物碱产量进行测定。

1.2.7 平贝母总生物碱含量的测定方法

样品制备:参考张兆瑞^[5]的方法,精密称取平贝母样品粉末(过3号筛)2g于50ml容量瓶中,加0.1%盐酸乙醇液适量摇匀,定容至50ml,冷浸48h,去初滤液,取续滤液备用。以贝母甲素(北京市药检所提供)为标准样品,同法制备标准样品溶液。

波长选择:用UV2201紫外分光光度计,在300~500nm波长范围内对样品及标准样品溶液进行扫

描。结果表明平贝母样品和标准样品溶液的最大吸收波长同为 423nm,故选择测定波长为 423nm。

标准样品溶液线性范围试验:称取贝母甲素标准样品 9.9771mg,溶于 50ml 容量瓶中,配成约 0.1% 的盐酸乙醇溶液。分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 于分液漏斗中,423nm 波长测定吸收度值(y 值),除空白外(以氯仿为空白)每一组设置两管平行。计算得回归方程为: $y = 0.1530 + 0.7912x$ ($R^2 = 0.9995$)。贝母甲素浓度在 2.6 ~ 13 $\mu\text{g/L}$ 范围内与吸收度值存在良好的线性相关。

试验证明当平贝母样品提取液加样量为 0.4ml 时,其所测 OD 值均落在曲线的线性范围内,因此所有样品的加样量均为 0.4ml,以贝母甲素为标准样品,则所测样品的总生物碱含量计算如下:

$$\text{总生物碱含量}(\%) = \frac{(\text{吸收度} - 0.1530) \times 9.9771}{0.7912 \times 0.4 \times 2 \times 1000} \times 100\%$$

1.2.8 样品超声波处理及稳定性试验

超声波处理对生物碱含量的影响:将 3 个样品置于超声波发生器中超声处理 30min,每个样品重复 2 次,测定生物碱含量,发现处理与对照差异极不显著。故本试验在样品处理时均省去超声波处理程序。

稳定性试验:取曲线的线性范围试验允许取样量(0.2 ~ 0.8ml)的氯仿层溶液在室温下放置不同时间测定其吸收度,观察稳定性。试验结果表明,放置 70min 内所测定数据变化不大,而 70min 后随放置时间增加吸收度值增大,这一结果与徐建峰^[7]相同。故确定样品测定的时间范围为 50 ~ 70min。

2 结果与分析

2.1 影响平贝母鳞茎增殖和生物碱产量的因素

2.1.1 基本培养基对生物碱产量的影响

将培养物接种到不同培养基中,培养 60d,测定影响平贝母生物碱产量的各项指标,结果见表 1。

由表 1 可知,培养物折干率在 4 种培养基上差别不大,均在 17.8% ~ 19.1%。B₅ 培养基有利于平贝母鳞茎增殖,其增殖倍数较 MS、LS 和 N₆ 培养基分别高 19.90%、24.39% 和 14.83%。而 LS 培养基上鳞茎生物碱含量分别高出 MS、B₅ 和 N₆ 培养基 35.77%、47.62% 和 37.78%。且 LS 培养基上鳞茎生物碱产量最高达到 1.23 mg/L,比 B₅ 培养基高出 15.0%,因此以生产平贝母生物碱为目的时,LS 培养基要优于 B₅ 培养基。

2.1.2 液体培养与固体培养对生物碱产量的影响

液体培养基对平贝母子贝的分化及生长速度有很大的促进作用^[6]。本试验研究了平贝母鳞茎在液体培养基上培养 30 ~ 70d 鳞茎生长和生物碱含量的变化。

由图 1A、B 曲线可以看出,液体培养 30 ~ 40d 时,鳞茎增殖最快,而在固体培养中,鳞茎增殖高峰期为培养 50 ~ 60d 时,比液体培养推迟 20d。调查还发现鳞茎在接入液体培养基 2d 后,即有子贝产生。由 C、D 曲线可知,培养物随培养时间延长,其折干率在固、液两种培养基中均无明显变化,但在固体培养基上始终高于液体培养基,说明液体培养虽然促进了子贝分化,但固体培养基更利于鳞茎干物质积累,因此,对于生产生物碱来说,固体培养优于液体培养。

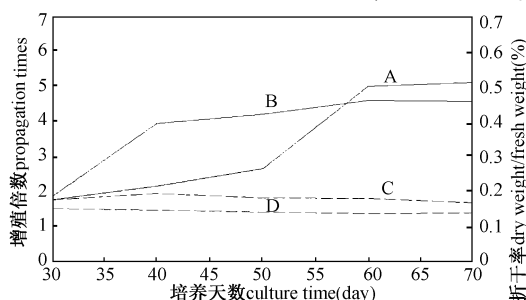


图 1 液体培养与固体培养鳞茎增殖倍数与折干率的变化

Fig. 1 The comparison of bulb growth and DW/FW between liquid and solid culture

A. 为固体培养基上平贝母鳞茎增殖倍数的变化曲线; B. 为液体培养基上平贝母鳞茎增殖倍数的变化曲线; C. 为固体培养基上生长平贝母鳞茎的折干率; D. 为液体培养基上生长平贝母鳞茎的折干率。

A and C mean the change curves of propagation times of the bulb and the ratio of DW/FW (%) in solid culture respectively. B and D mean the change curves of propagation times of the bulb and the ratio of DW/FW (%) in liquid culture respectively.

2.1.3 培养周期对平贝母鳞茎生物碱产量的影响

表 1 基本培养基对鳞茎生长及生物碱含量的影响

Table 1 Effect of the basic media on bulb growth and the content of alkaloid

培养基 medium	增殖倍数 propagation times	鲜重 fresh weight (g/L)	折干率 DW/FW (%)	生物碱含量 content of alkaloid (%)	生物碱产量 yield of alkaloid (mg/L)
MS	4.870 ±0.229 ^A	39.25	18.2	0.137	0.98
B ₅	5.839 ±0.336 ^C	44.90	18.9	0.126	1.07
LS	4.694 ±0.225 ^A	34.70	19.1	0.186	1.23
N ₆	5.085 ±0.267 ^B	37.80	17.8	0.135	0.91

注：图中大写字母表示 0.01 显著水平；增殖倍数 = 增殖后鲜重/增殖前鲜重；生物碱产量 = 鲜重 × 折干率 × 生物碱含量。

Note: The capital letters in the table mean significant different at 1 % level; propagation times = fresh weight after culture 60d/fresh weight before culture in medium; yield of alkaloid = fresh weight × (DW/FW) × content of alkaloid.

表 2 培养周期对平贝母生长及生物碱产量的影响

Table 2 Effect of the different culture time on bulb growth and the yield of alkaloid

培养天数 culture time (d)	增殖倍数 propagation times	折干率 DW/FW (%)	干重产量 dry weight (g/L)	生物碱含量 content of alkaloid (%)	生物碱产量 yield of alkaloid (mg/L)
20	1.157 ±0.0638	18.74	0.39	0.145	0.06
30	1.768 ±0.1156	17.67	1.33	0.128	0.17
40	2.147 ±0.1477	19.42	3.13	0.107	0.34
50	2.673 ±0.1542	18.33	3.82	0.132	0.51
60	5.013 ±0.4697	18.06	7.11	0.139	0.99
70	5.116 ±0.3878	16.88	7.39	0.132	0.98
80	5.013 ±0.3054	16.73	8.75	0.123	1.08

表 2 可看出,培养材料随培养天数增加,增殖倍数迅速提高,但增殖速度在各培养阶段差异较大;其中在 50~60d 鳞茎生长最快,增殖倍数为 2.34,70d 以后生长逐渐减慢。其折干率在培养 60d 内为 17.67%~19.42%,变化不大,培养 60d 之后折干率明显下降,到 80d 时降至最低值为 16.73%,说明培养 60d 之前是培养物干物质积累最佳时期。以每升培养基所得生物碱量计算,培养 30~40d,生物碱仅增加 0.164mg,40~50d 增加 0.170mg,50~60d 生物碱增加量达到高峰,净增 0.483mg,60d 以后生物碱几乎不再增加,故平贝母鳞茎组织培养以 60d 为适宜采收期。

2.1.4 植物生长调节剂对生物碱产量的影响

植物生长调节剂种类及其浓度配比直接影响培养物的生长与代谢。培养物在含不同植物生长调节剂组合的培养基中培养 60d,测定影响生物碱产量的各项指标,见表 3。

表 3 植物生长调节物质对平贝母鳞茎增殖倍数及生物碱产量的影响

Table 3 Effect of the different combination of the plant growth regulators on bulb growth and the yield of alkaloid

处理 treatment	激素配比 combinations (mg/L)	增殖倍数 propagation times	折干率 DW/FW (%)	生物碱含量 content of alkaloid (%)	生物碱产量 yield of alkaloid (mg/L)
A	KT1.0 + NAA0.5	4.870 ±0.229 ^{aA}	18.2	0.137	0.98
B	KT1.0 + IAA0.5	4.760 ±0.222 ^{aA}	18.9	0.131	1.46
C	BA1.0 + NAA0.5	5.119 ±0.306 ^{abA}	17.1	0.142	1.55
D	BA1.0 + IAA0.5	4.811 ±0.267 ^{aA}	19.4	0.140	1.52

注：图中小写字母与大写字母分别表示 0.05 与 0.01 水平的差异显著性。

Note: The small and capital letters in the table mean significant difference at 5 % and 1 % levels, respectively.

表 3 数据表明,C 组合对鳞茎增殖有明显促进作用,其增殖倍数较 A、B、D 组合分别高 5.11%、7.54%、6.40%。而生物碱含量及折干率在 4 种培养基中差别不大,分别在 0.131%~0.142%及 17.1%~19.4%范围内。说明要获得较高产量的生物碱,应选鳞茎增殖快的处理组合。可见 C 组合为本试验最佳外源激素配比,即 BA1.0 mg/L + NAA0.5 mg/L。C 与 A 组合或 D 与 B 组合相比,即当 NAA 或 IAA

用量相同时,BA 比 KT 更有利于生物碱产量增加;而 A 与 B 组合或 C 与 D 组合相比,即当 BA 或 KT 用量相同时,NAA 和 IAA 对生物碱产量影响无规律可循。

2.1.5 蔗糖浓度对鳞茎增殖和生物碱产量的影响

蔗糖不仅提供培养基中的碳源,而且维持细胞的渗透压。其浓度在很大程度上影响着培养物的生长。培养物在含不同蔗糖浓度的培养基中培养 60d 时,调查平贝母鳞茎增殖倍数、生物碱含量及生物碱产量,结果如图 2。

由 B 曲线看出,在含 4 %、5 %蔗糖的培养基中培养物生长速率均最大,增殖倍数为 5.6 左右。而由 A、C 曲线可知,在含蔗糖 5 %的培养基中生物碱产量及其含量均最大,分别为 1.62 mg/L 及 0.181 %。可知,利于平贝母鳞茎生物碱积累的最适蔗糖浓度为 5 %。

2.1.6 病毒唑浓度对平贝母生物碱产量的影响

培养 30d 发现,在添加不同浓度病毒唑的培养基上鳞茎生长有明显差异,随病毒唑浓度的增加,生长明显增强。60d 收获时的增殖倍数统计结果(图 3)表明,添加 50mg/L 病毒唑的增殖倍数最低,而添加 10mg/L、5mg/L 病毒唑的增殖倍数均显著高于对照,其中以添加 5mg/L 病毒唑的增殖倍数最高。在 60d 培养期内发现,随培养时间的延长,在含 50 mg/L 病毒唑的培养基上鳞茎出现枯黄直到停止生长。说明,低浓度病毒唑对平贝母鳞茎生长有促进作用,但高浓度病毒唑对平贝母鳞茎生长有负作用。

3 讨论

液体悬浮培养因分散性好,生长迅速,培养周期短的优点而倍受研究者的青睐。紫草素、人参、烟草、长春花及银杏等植物利用悬浮培养生产次生代谢产物技术已经成熟,并部分进入产业化^[9~12]。本试验发现,相比固体培养,平贝母鳞茎液体培养显著地促进子贝增殖率,但鳞茎干物质积累较低。因此,对于平贝母生物碱的生产,固体培养基优于液体培养基。

Zenk 等^[13]培养长春花时增加蔗糖浓度,吲哚生物碱的积累也随之增加。甜叶悬钩子的愈伤组织在相同培养条件下,甜茶甙的含量在蔗糖浓度 7 %时为 5 %时的 2 倍^[14]。本试验也发现平贝母增殖倍数和生物碱含量随外源蔗糖浓度增加而提高,当添加浓度为 5 %时达最大。病毒唑是一种强的单磷酸次黄嘌呤核苷(IMP)脱氢酶抑制剂,它不仅作为一种抗生素在植物组织培养的培养物除菌方面应用较为广泛^[15],而且病毒唑对组织培养的丛生芽诱导也有较好的促进作用。谭丰苹等^[8]将病毒唑用于暗紫贝母鳞茎组织培养中发现,病毒唑能显著提高组培暗紫贝母小鳞茎的增殖倍数。本试验结果也证明了这一点,同时还发现,高浓度的病毒唑对平贝母鳞茎的生长有负作用。

在培养基中增加特定产物的已知前体或诱导子可以提高次生代谢产物含量^[16],利用诱导子提高植物培养细胞中目的产物含量的研究近十几年来一直是国内外研究的热点。在辣椒及红豆杉细胞培养中加入特定产物前体或诱导子均可明显提高次生代谢产物的含量^[17~20]。因此,为进一步提高生物碱产量,有必要对平贝母生物碱单体进行分类后,在培养过程添加特定产量前体或诱导子。

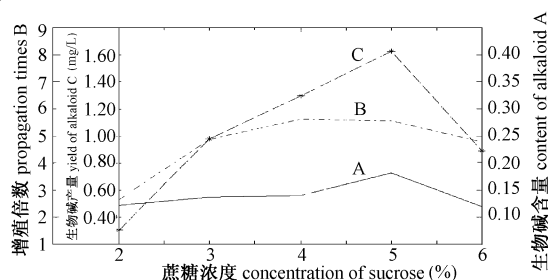


图2 不同蔗糖浓度对平贝母鳞茎增殖及生物碱影响

Fig. 2 Effect of the different sucrose concentration on bulb growth and the alkaloid

A. 为不同蔗糖浓度对平贝母生物碱含量的影响曲线; B. 为不同蔗糖浓度对平贝母鳞茎增殖倍数影响曲线; C. 为不同蔗糖浓度对平贝母生物碱产量的影响曲线。

A, B and C mean the change curves of the content of alkaloid, the propagation times of the bulb and the yield of alkaloid in different sucrose concentration, respectively.

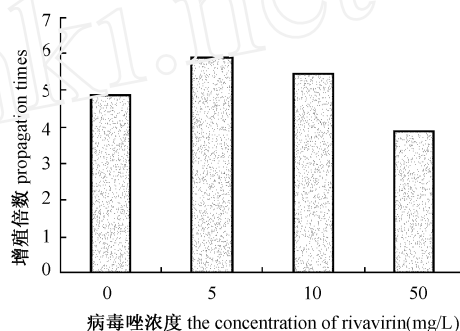


图3 病毒唑对增殖倍数的影响

Fig. 3 Effect of ribavirin on bulb growth

朱丹妮等^[21]对组培及野生川贝鳞茎微量元素含量进行定性对比,发现有益元素在组培川贝鳞茎中的含量比野生鳞茎高,且有害元素含量有所降低,平贝母与川贝母同为贝母属植物,推测他们具有相似性,其鳞茎培养也有可能成为提供新药源的重要途径。

参考文献:

- [1] 朱四易. 中国贝母属植物研究. 西安: 西北大学出版社, 1995, 15: 212 ~ 222
- [2] 蔡朝晖, 李萍, 高山林. 中药贝母的组织培养研究概况. 中草药, 1998, 29: (4) 274 ~ 277
- [3] 唐巍, 吴绛云. 平贝母体细胞胚胎发生的研究. 作物学报, 1993, 19(2): 188 ~ 189
- [4] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物红皮书. 北京: 科学出版社, 1995
- [5] 张兆瑞, 葛莉, 马莹, 等. 平贝母总生物碱含量的测定. 中国中药杂志, 1993, 18(8): 478 ~ 479
- [6] 周宝钧. 平贝母鳞茎组织培养的研究. 植物生理学通讯, 1983, (1): 11
- [7] 许建峰. 高山红景天愈伤组织颗粒悬浮培养生产红景天甙动力学与过程调控. 大连理工大学博士学位论文, 1998
- [8] 谭丰苹, 高山林. 生长调节物质对组培暗紫贝母小鳞茎生长的影响. 植物资源与环境, 1999, 8(1): 9
- [9] Furuya T, Yoshikawa T, et al. Studies of the culture conditions for *Panax ginseng* cells in jar fermentor. Journal of Natural Products, 1984, 47: 70 ~ 75
- [10] Hashimoto T. Bioreactors for the large-scale culture of plant cells. In: Bajaj Y. P. S. ed., Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. Springer-verlag, 1988, 104 ~ 122
- [11] Han Jian, Dai Jun-gui, et al. Biotransformation of artemisin by *Catharanthus roseus* and *Ginkgo biloba* cell suspension cultures. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34 (2): 166 ~ 168
- [12] Dai Jun-gui, Gong Zhuo, et al. Biotransformation of gastrodin by cell suspension cultures of *catharanthus roseus*. Acta Botanica Sinica, 2002, 44 (3): 377 ~ 378
- [13] Schlattmann J E, Koolhaas C M A, et al. The role of glucose in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cell cultures. Biotechnolog and Bioengineering, 1995, 47(5): 525 ~ 534
- [14] 王雷, 王蜀秀. 培养基对甜叶悬钩子愈伤组织生长及甜菜甙产生的影响. 生物工程学报, 1991, 7(2): 188 ~ 191
- [15] Leifert C, Cassells A C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In vitro Cellular & Developmental Biology. Columbia: Mar/Apr 2001, 37(2): 133 ~ 138
- [16] Ditttrich H, Kitchan T M, et al. The jasmonate precursor 12-oxophytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. FEBS Lett., 1992, 309(1): 33 ~ 36
- [17] Hirasuna TJ, Pestchanker LJ, et al. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 44(2): 95 ~ 102
- [18] 李家儒, 管志勇, 刘曼西, 等. Cu^{2+} 对红豆杉培养细胞中紫杉醇形成的影响. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 117 ~ 120
- [19] Mirjalili N, Linden J C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidate*: ethylene interaction and induction models. Biotechnology progress, 1996, 12(1): 110 ~ 118
- [20] 苗志奇, 未作君, 元英进. 水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究. 生物工程学报, 2000, 16(4): 509 ~ 512
- [21] 朱丹妮, 高山林. 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究. 中国药科大学学报, 1992, 23(2): 118 ~ 121

(上接第 221 页)

- [1] 鲁如坤. 土壤磷素化学研究进展. 土壤学进展, 1990, 18(6): 1 ~ 5
- [2] 刘建玲, 张凤华. 土壤磷素化学行为及影响因素研究进展. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 36 ~ 45
- [3] 韩俊杰, 马保国, 韩宝坤, 等. 麦稻轮作高产条件下施磷对土壤速效磷及作物产量的影响. 河北农业大学学报, 2001, 24(3): 22 ~ 26
- [4] 马保国, 韩俊杰, 杨太新, 等. 麦稻轮作高产条件下无机磷的形态转化及其生物有效性研究. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 42 ~ 45, 61
- [5] 姜东, 于振文, 李永庚, 等. 冬小麦叶茎粒可溶性糖含量变化及其与籽粒淀粉积累的关系. 麦类作物学报, 2001, 21(3): 38 ~ 41
- [6] 李永庚, 于振文, 姜东, 等. 冬小麦旗叶蔗糖和籽粒淀粉合成动态及与其有关的酶活性的研究. 作物学报, 2001, 27(5): 658 ~ 664
- [7] 张振清, 夏叔芳. 无机磷对叶片淀粉和蔗糖积累的影响. 植物生理学报, 1982, 8(4): 385 ~ 391
- [8] Doaglas C Doehlert, Steven C Haber. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate and pH. Plant Physiol., 1983, 73(4): 989 ~ 994
- [9] 王忠. 植物生理学. 北京: 中国农业出版社, 2000. 238 ~ 245
- [10] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982. 15 ~ 16
- [11] Azinzadeh M, Koochek A. Effect of different seeding rates and amount of phosphorus fertilizers on yield and yield components of dry land wheat in northern Khorasan. Agricultural Science and Technology, 1999, 13(2): 131 ~ 139