

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.01.021

吴琼, 黄龙全, 张剑韵. 烟草 VB₆ 吡哆胺-丙酮酸转氨酶的部分纯化与表征[J]. 广西植物, 2013, 33(1):118-121

Wu Q, Huang LQ, Zhang JY. Purification and enzymatic characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase from the Tobacco[J]. *Guihaia*, 2013, 33(1):118-121

烟草吡哆胺-丙酮酸转氨酶的部分纯化与表征

吴琼¹, 黄龙全¹, 张剑韵^{2*}

(1. 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学 生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 通过冷冻干燥、DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱层析、Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析、SP 葡聚糖凝胶 C-25 阳离子交换柱层析等分离纯化技术, 对烟草吡哆胺-丙酮酸转氨酶进行分离纯化。采用苯肼衍生化方法检测活性, 并对其基本酶学性质进行分析。结果显示: 该酶被纯化了 92.34 倍; 最适温度为 70 °C, 最适 pH 为 9.0。在 pH7.0~9.0 内稳定且热稳定性较好, 80 °C 保温 3 h 仍有 51.55% 的酶活力; 在最适反应条件下, 测得反应底物吡哆胺和丙酮酸的 K_m 值分别为 6.337 mmol · L⁻¹ 和 0.867 mmol · L⁻¹。该结果为进一步研究烟草体内 VB₆ 代谢机制奠定了基础。

关键词: 烟草; 吡哆胺-丙酮酸转氨酶; 纯化; 性质分析

中图分类号: Q945.14 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)01-0118-04

Purification and enzymatic characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase from the Tobacco

WU Qiong¹, HUANG Long-Quan¹, ZHANG Jian-Yun^{2*}

(1. College of Tea & Food Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The pyridoxamine-pyruvate aminotransferase was purified from the tobacco leaf by freeze-drying, DEAE Sephadex Fast Flow ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration and SP Sephadex C-25 ion exchange chromatography. The enzymatic activity and properties were investigated with phenyl hydrazine method. The results showed that 92.34-fold purification was obtained; the enzyme had an optimum temperature at 70 °C and pH at 9.0, and it was stable at pH7.0-9.0; the enzyme had good thermal stability which remained about 51.55% of its activity after being treated at 80 °C for 3 h; under optimal conditions, the K_m values for pyridoxamine and pyruvate were 6.337 mmol · L⁻¹ and 0.867 mmol · L⁻¹. The results provided basis for the metabolic mechanism of VB₆ in tobacco plants.

Key words: tobacco; pyridoxamine-pyruvate aminotransferase; purification; properties

维生素 B₆ (VB₆) 是一类吡啶化合物的总称, 2-甲基-3-羟基-5-羟甲基吡啶是它们共同的母体, 吡啶环第四碳位被羟甲基、氨基、甲酰基取代后分别形成吡哆醇 (Pyridoxine, PN)、吡哆胺 (Pyridoxamine,

PM) 和吡哆醛 (Pyridoxal, PL), 三者相应磷酸酯形式为磷酸吡哆醇 (Pyridoxine-5'-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺 (Pyridoxamine-5'-phosphate, PMP) 和磷酸吡哆醛 (Pyridoxal-5'-phosphate, PLP), 这些化合

* 收稿日期: 2012-04-17 修回日期: 2012-06-07

基金项目: 安徽省自然科学基金重点项目 (KJ2010A116)

作者简介: 吴琼 (1986-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 从事烟草 VB₆ 代谢方面的研究, (E-mail) zhuanxuanling@126.com。

* 通讯作者: 张剑韵, 博士, 教授, 从事维生素学研究, (E-mail) jianyun218@yahoo.com.cn。

物可以相互转化(Wen,1997)。PLP可作为细胞信号传导的调节分子,对一些细胞膜上的离子通道具有调节作用(Havaux *et al.*,2009;Choi *et al.*,2009);在植物根的发育中,也可保护植物免受高盐、紫外线、渗透压等一些环境胁迫因子的影响(Naotaka *et al.*,1999)。丙酮酸是糖代谢途径中最重要的中间产物,是多种氨基酸、维生素及其它一些有用物质的重要前体,吡哆胺-丙酮酸转氨酶(EC 2.6.1.30, pyridoxamine-pyruvate aminotransferase,简称PPAT)以PM和丙酮酸为底物生成PL和L-丙氨酸。PPAT在VB₆代谢途径中对PM的合成和VB₆降解具有重要意义(Wada *et al.*,1962;Nelson *et al.*,1986)。编码PPAT的基因首次在固氮共生根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099中被鉴定、克隆(Yoshikane *et al.*,2006),但对植物体内PPAT研究的文献则相对较少。烟草是重要的经济作物之一,本文以烟草为研究对象,对其体内的PPAT进行初步分离纯化和部分酶学性质研究,为深入研究植物体内VB₆代谢途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

烟草鲜叶(实验室栽培,品种为云烟21),盐酸吡哆胺、盐酸吡哆醛购于美国Sigma公司,高氯酸、苯甲基磺酰氟(PMSF)、以丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、盐酸苯肼、甘油等购自上海生物工程公司(Sangon)。

1.2 方法

1.2.1 烟草PPAT酶活性的测定 烟草转氨酶的活力检测参照Yoshikane *et al.* (2006)的方法。反应体系为1.5 mL,其中包括0.1 mol·L⁻¹硼酸/KOH(pH9.0)缓冲液;3 mmol·L⁻¹丙酮酸、3 mmol·L⁻¹PM;酶液。37℃水浴震荡反应2 h后添加0.3 mL的3 mol·L⁻¹高氯酸终止反应。8 000 r/min离心15 min,弃去沉淀加入1 mL蒸馏水与0.2 mL苯肼,60℃反应20 min,410 nm下测定吸光度。对照为先加入3 mol·L⁻¹高氯酸将酶液灭活。

酶活力单位(U)定义为:37℃下,每分钟每毫克蛋白催化生成的PL的纳摩尔数。配置不同浓度的PL溶液,苯肼反应后在410 nm处测定吸光值做出标准曲线。

1.2.2 蛋白质浓度的测定 蛋白质浓度测定采用

Bradford(1976)的方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.3 烟草鲜叶PPAT的分离纯化 称取烟草鲜叶片150 g,按1:3的比例加入预冷的缓冲液I(5 mmol·L⁻¹硼酸/KOH,pH8.5,0.1 mmol·L⁻¹PMSF、0.05%巯基乙醇、50%甘油)于搅拌机中搅拌20 min。4℃、8 000 r·min⁻¹离心20 min,弃去沉淀,上清即粗酶液。然后将酶液于-50℃下进行冷冻干燥浓缩并将浓缩的酶液于4℃冰箱中保存(汪家政等,2000)。将浓缩液上样于DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换柱(柱长300 mm,直径20 mm),用缓冲液II(5 mmol·L⁻¹硼酸/KOH,pH8.5)平衡后将酶液上柱,以缓冲液II和NaCl溶液(0.6 mol·L⁻¹)进行连续梯度洗脱,流速2.0 mL·min⁻¹,收集活性峰溶液放入透析袋中,4℃下在缓冲液I中透析,每4 h更换一次透析液。将透析后的溶液经聚乙二醇(20 000)浓缩,上样于Sephadex G-100凝胶柱(柱长500 mm,直径20 mm)中,用缓冲液II进行洗脱,流速0.5 mL·min⁻¹,5 mL/管。收集活性峰溶液放入透析袋中,经聚乙二醇(20 000)浓缩后上样于SP葡聚糖凝胶C-25离子交换柱(柱长600 mm,直径12 mm),以缓冲液II和NaCl溶液(0.6 mol·L⁻¹)进行连续梯度洗脱,流速0.5 mL·min⁻¹,检测蛋白质含量与酶活性,收集活性峰溶液,透析浓缩后于4℃保存。

1.2.4 pH值对烟草PPAT酶活性的影响 配制pH7.0~13.0的缓冲体系,除硼酸/KOH缓冲液pH不同外其他反应条件相同,测定酶在不同pH值条件下的活力。以酶活力最大者为100%,计算相对酶活力。反应体系1.5 mL,其中添加酶液,3 mmol·L⁻¹PM,3 mmol·L⁻¹丙酮酸,0.1 mol·L⁻¹硼酸/KOH缓冲液(pH7.0~13.0)于37℃下反应2 h测定酶活。另用上述pH范围的硼酸/KOH缓冲液与酶液混合放置3 h后,于37℃反应2 h检测剩余酶活,以初始酶活为100%。

1.2.5 温度对烟草PPAT酶活性的影响 测定20~100℃不同温度下的酶活力,研究不同温度对酶活力的影响。除反应温度不同外其他反应条件相同,缓冲液硼酸/KOH(pH9.0)。以酶活力最大者为100%,计算相对酶活力。另将酶液在各温度条件下保温3 h后取出,于37℃反应2 h检测剩余酶活,以初始酶活为100%。

1.2.6 酶促反应时间与烟草PPAT酶活性的关系 分别设置不同的反应时间,除反应时间不同外其他

反应条件相同。缓冲液 pH9.0, 于 37 °C 反应不同时间后检测酶活。以酶活力最大者为 100%, 计算相对酶活力。并以时间和相对活力作图。

1.2.7 化学试剂对烟草 PPAT 酶活性的影响 检测不同化学试剂对烟草鲜叶中 PPAT 酶活性的影响 (Yoshikane *et al.*, 2006), 向酶活反应中分别添加不同浓度的化学试剂(10 mmol · L⁻¹ 的 PLP、PMP、羟胺; 1 mmol · L⁻¹ 的苯胍、硼氢化钠), 于 37 °C, 缓冲液 硼酸/KOH(pH9.0) 条件下反应 2 h 检测酶活。

1.2.8 烟草 PPAT 酶学动力学参数的测定 在最适反应条件 (pH9.0, 37 °C) 下, 分别以不同浓度的

PM/丙酮酸为底物。采用双倒数法 Lineweaver-Burk(1934), 以底物浓度的倒数 1/[S] 为横轴, 测得酶活力的倒数 1/V 为纵轴作图, 计算烟草 PPAT 的 K_m 值及 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 烟草体内 PPAT 的初步分离纯化

烟草 PPAT 通过冷冻干燥、DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱层析、Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析和 SP Sephadex C-25 阳离子交换柱

表 1 烟草 PPAT 分离纯化

Table 1 Purification of PPAT from tobacco

纯化 Purification	总蛋白质含量 (mg) Total protein	总活力 (U) Total activity	比活力 (U/mg) Specific activity	纯化倍数 Purification times	回收率 (%) Yield
粗提液	189.84	32.82	0.17	1	100
浓缩酶	28.05	34.80	1.24	7.17	14.78
DEAE Sepharose F. F	6.86	27.58	4.02	23.27	3.61
Sephadex G-100	2.08	22.81	10.99	63.56	1.09
SP Sephadex C-25	0.98	15.70	15.96	92.34	0.52

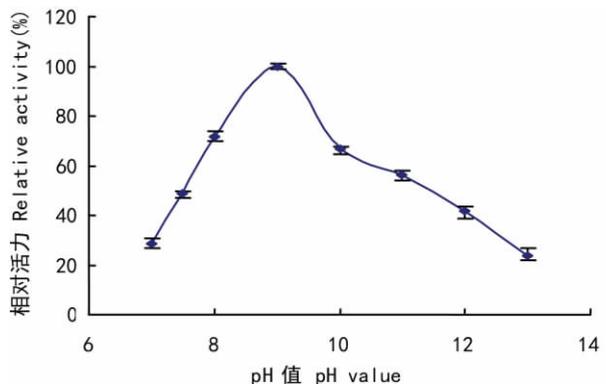


图 1 pH 对 PPAT 活性的影响

Fig. 1 Effects of pH on the catalytic activity of the tobacco PPAT

层析分离纯化后, 所得到的纯化倍数等见表 1。

2.2 酶学性质

2.2.1 pH 对烟草 PPAT 酶活性的影响 烟草 PPAT 的最适反应 pH 为 9.0, pH8.0~10.0 时该酶有较高的酶活力, 随 pH 升高活性逐渐降低, pH13.0 时, 酶活力只有峰值的 23.76% (图 1)。酶液于 pH7.0~13.0 的硼酸/KOH 缓冲液中放置 3 h 后取出, 于 37 °C 反应 2 h 检测剩余酶活。结果表明, pH7.0~9.0 范围内酶活力较为稳定, 3 h 后残留活力仍在 90% 以上。而 pH10~13.0 范围内酶

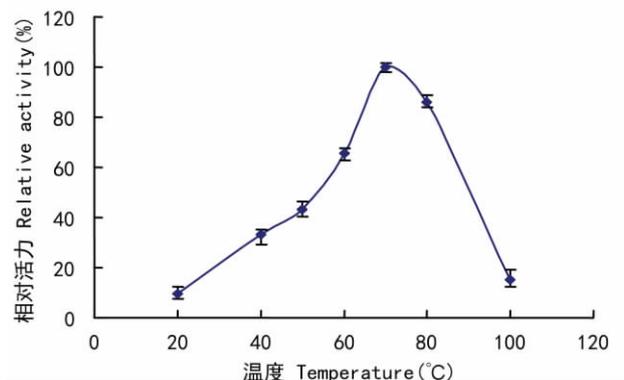


图 2 温度对 PPAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of temperature on the catalytic activity of the tobacco PPAT

活力下降较大, 分别下降了 11.27%、14.07%、36.61% 和 51.43%。

2.2.2 温度对烟草 PPAT 酶活性的影响 随着反应温度的升高, 烟草 PPAT 活性逐步升高, 70 °C 时酶活性达到最高, 继续升高反应温度, 活性逐步降低 (图 2)。酶液在各温度条件下保温 3 h 后, 于 37 °C 反应 2 h 检测剩余酶活。结果表明, 在 20~50 °C 保温 3 h 后, 残留酶活力仍在 90% 以上。60 °C、70 °C 下保温 3 h 后酶活力下降较大, 分别下降了 21.02%、31.93%。80 °C 下保温 3 h 后残留酶活力

仍有 51.55%。

2.2.3 酶促反应时间和 PPAT 酶活性的关系 在反应前 360 min 内,烟草 PPAT 活性与时间存在较好的线性关系,随着反应时间的延长,斜率变小,反应曲线趋于平缓(图 3)。

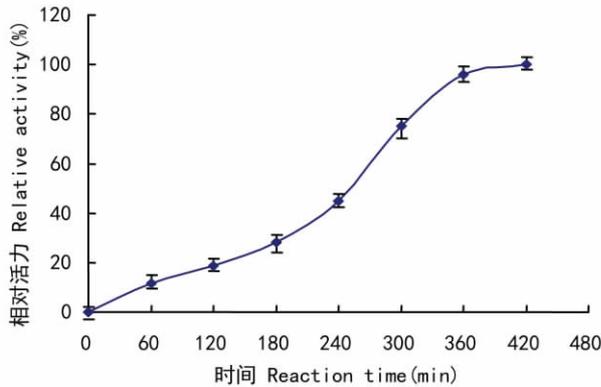


图 3 酶促反应时间和 PPAT 的关系

Fig. 3 Relation between reaction time and the catalytic activity of the tobacco PPAT

表 2 化学试剂对纯化后烟草 PPAT 活性的影响

Table 2 Effects of some chemical reagents on the activity of the purified PPAT from the tobacco

试剂 Reagent	OD ₄₁₀ nm (纯化酶)
+空白	0.180±0.001
+PLP(10 μmol·L ⁻¹)	0.183±0.0015
+PMP(10 μmol·L ⁻¹)	0.182±0.0055
+羟胺(10 mmol·L ⁻¹)	0.182±0.006
+苯肼(1 mmol·L ⁻¹)	0.189±0.001
+硼氢化钠(1 mmol·L ⁻¹)	0.177±0.0025

表 3 烟草 PPAT 与 PMP 和丙酮酸的反应

Table 3 Reaction of the tobacco PPAT between PMP and pyruvate

处理 Treatment	OD ₄₁₀ nm (粗酶)	OD ₄₁₀ nm (纯化酶)
E+空白	0.005±0.001	0.005±0.001
E+PMP	0.024±0.003	0.018±0.001
PMP+丙酮酸	0.066±0.001	0.052±0.001
E+PMP+丙酮酸	0.091±0.003	0.066±0.002

2.2.4 化学试剂对烟草 PPAT 酶活性的影响 检测不同的化学试剂对烟草鲜叶中 PPAT 酶活性的影响,结果如表 2 所示。PLP、PMP 既不能促进也不能抑制烟草转氨酶的活性;苯肼、硼氢化钠、羟胺几种典型的 PLP-依赖型酶抑制剂也不能使烟草 PPAT 的活性钝化,另外,粗提液与纯化酶液在丙酮酸、PMP 存在的情况下,并不能发生转氨作用使 PL 的量增加(表 3)。

2.2.5 烟草 PPAT 的酶反应动力学参数测定 在 pH9.0,37 °C 条件下,烟草 PPAT 分别以不同浓度的 PM/丙酮酸为底物进行反应。采用双倒数法 Lineweave-Burk 测得 PM 及丙酮酸的 K_m 值为 6.337、0.867 mmol·L⁻¹。V_{max} 值分别为 0.041、0.017 μmol·min⁻¹·mg⁻¹。

3 结论与讨论

烟草 PPAT 通过冷冻干燥、离子交换层析、凝胶过滤层析等分离纯化方法,纯化了 92.34 倍。烟草 PPAT 的最适 pH 为 9.0,与假单胞菌属中 PPAT 最适 pH 相似(Wada *et al.*, 1962),且在 pH7.0~9.0 的范围内酶活力较为稳定、放置 3 h 后残留活力仍在 90% 以上,表明该酶具有良好的酸碱稳定性;烟草 PPAT 的最适温度为 70 °C,这与 Yoshikane *et al.* (2006) 从大肠杆菌中纯化的重组 PPAT 的最适温度相同,且酶液在 80 °C 放置 3 h 后残留酶活力仍有 51.55%,该酶具有较好的耐热性。研究发现烟草遭遇病原体侵染后体内的 VB₆ 含量增加,PLP、PL 和 PN 是烟草 VB₆ 的主要存在型(Zeng *et al.*, 2011),PPAT 能够催化 PM 和 PL 之间的转氨作用,在 VB₆ 代谢途径中涉及到 PM 的合成及 PN 的降解途径。烟草 PPAT 良好的酸碱稳定性及较好的耐热性,有利于维持烟草体内 VB₆ 含量的动态平衡及植物对不良环境的适应。

PLP、PMP 既不能促进也不抑制烟草 PPAT 的活性;苯肼、硼氢化钠、羟胺几种典型的 PLP-依赖型酶抑制剂也不使烟草 PPAT 的活性钝化。PLP-依赖性转氨酶很多,但能像 PLP-依赖性转氨酶一样催化反应的 PLP-非依赖性转氨酶却很少,PPAT 利用 VB₆ 的化合物作为反应底物而不是作为辅酶(Nelson *et al.*, 1986)。烟草 PPAT 以丙酮酸、PM 为底物的 K_m 值分别为 6.337、0.867 mmol·L⁻¹。本文为进一步研究植物体内 VB₆ 代谢途径提供依据。

参考文献:

- 汪家政,范明. 2002. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社:61-62
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Analyt Biochem*, 2:248-254
- Choi EY, Cho YO. 2009. Effect of vitamin B6 deficiency on antioxidant status in rats with exercise-induced oxidative stress (下转第 125 页 Continue on page 125)

量不算高,但实际情况是由于样品采集时间和采集方法的原因造成的。由于野生大豆的炸荚特性,采集时多数豆荚是没有成熟的青荚,其种子成熟度不够,直接影响了其蛋白质的含量值。因此,野生大豆材料的采集应分多次采集成熟度较高的豆荚。另外,测试结果没有反映出粗蛋白质含量与材料生长所在地理位之间的相关性,还需要作进一步研究。栽培大豆是我国主要的油料及粮食作物,作为其近缘种的野大豆具有许多优良性状,因此在作物育种上可利用野大豆培育优良的栽培大豆品种。同时,野大豆营养价值高,又是牛、马、羊等各种牲畜喜食的牧草,因此对我国丰富的野大豆种质资源,必须加强保护和开发利用。

本研究测定了 8 个桐柏野生大豆样品的粗蛋白质含量,对比两种测试方法,统计分析测试结果一致,为今后大量进行类似检测采用消化—分光光度法这一更加简便可行的方法提供了依据。同时,8 个野大豆样品粗蛋白质含量的数据显示,仅有 2 个样品高于全国野大豆蛋白质含量的平均值,据此反思取样方法,探讨并提出了针对野生大豆材料的特性应采取的取样措施。

参考文献:

- 中华人民共和国国家标准(GB2905-82). 1985. 谷类、豆类作物种子粗蛋白质测定法(半微量凯氏法)[J]. 农业测试分析, 2(2):63-65
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 2009. GB/T5511-2008/ISO20483:2006. 谷物和豆类氮含量测定和粗蛋白质含量计算(凯氏法)[S]. 北京:中国标准出版社
- 中华人民共和国卫生部. 2010. GB5009.5-2010. 食品中蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社
- 陈辉,刘振林,张忠义. 2004. 凯氏定氮法测定牛奶中蛋白质的不确定度分析[J]. 中国卫生检验杂志, 14(3):373-374
- 郭颖娜,孙卫. 2008. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 河北化工, 31(4):36-38
- 曹坎涛. 2011. 蛋白质测定方法改进[J]. 河北化工, 34(10):26-27
- Du XF(杜先锋), Zhang YA(张延爱). 1997. Aooroach to the quantitatove determination of protein content in food-stuffs(食品中蛋白质之氮定量方法的比较与研究)[J]. J Anhui Norm Univ; Nat Sci Edit(安徽师大学报·自然科学版), 20(1):63-65
- Huang RS(黄仁术). 2008. Resources value and cultivation techniques of Glycine soja(野大豆的资源价值及其栽培技术)[J]. Res Dev & Market(资源开发与市场), 24(9):771-772
- Li N(李宁). 2006. The comparison on various methods for determining different proteins(几种蛋白质测定方法的比较)[J]. J Shanxi Agric Univ(山西农业大学学报), (2):132-134
- Lin Z(林智). 2010. The determination of the protein content in food(食品中蛋白质含量的测定)[J]. Contemp Chem Ind(当代化工), 39(2):224-226
- Ma D(马丹). 2008. Kjeldahl determination of protein content(凯氏定氮法测定食品中蛋白质含量)[J]. Metrol & Meas Techniq(计量与测试技术), 35(6):57-58
- Meng T(孟滕), Meng FW(孟凡文), Zhang D(张达), et al. 2008. Analysis of some quality characteristics in soybean mutants(大豆突变新品系部分品质性状的分析)[J]. Guihaia(广西植物), 28(3):382-385
- Natarajan SS, Xu CP, Bae HH, et al. 2006. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis[J]. J Agric Food Chem, 54(8):3 114-3 120
- Wang ZY, Song FB, Cai H, et al. 2012. Over-expressing GsGST14 from Glycine soja enhances alkaline tolerance of transgenic *Medicago sativa*[J]. Biol Plant, 56(3):516-520
- Xu G(徐刚), Yao YA(姚银安). 2009. Application of proteomics technology on researches of adaptation mechanisms of plants to adverse stresses(蛋白质组学在研究植物响应逆境机理上的应用)[J]. Guihaia(广西植物), 29(3):372-376
- Zhang SM(张生明). 2010. In the Qinghai Province hhllessbarley straw stalk the protein contentdetermines(青海省青稞秸秆中蛋白质含量的测定)[J]. Sci&Technol Inf(科技信息), (13):12-13
- [J]. Nutr Res Pract, 3(3):208-211
- Havaux M, Brigitte K, Agnieszka S. 2009. Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress[J]. BMC Plant Biol, 9(130):1-22
- Lineweaver H, Burk K. 1934. The determination of enzyme dissociation constants[J]. Am Chem, 56(3):658-666
- Naotaka H. 1999. The role of band 3 protein in oxygen delivery by red blood cells[J]. Ind J Clin Biochem, 14(1):49-58
- Nelson M, Snell E. 1986. Enzymes of vitamin B₆ degradation. Purification and properties of 5-pyridoxic-acid oxygenase from *Arthrobacter* sp. [J]. Biol Chem, 261(32):15 115-15 120
- Sakai A, Denslow, Amanda A, et al. 2005. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 during plant defense responses[J]. PMPP, 66:244-255
- Wada H, Snell EE. 1962. Enzymatic transamination of Pyridoxamine. II. Crystalline pyridoxamine-pyruvate transaminase[J]. Biol Chem, 237:133-137
- Wen QB(温其标). 1997. Analysis of B6 vitamers in cereals by high performance liquid-phase chromatography(应用高效液相色谱分析谷物中的维生素 B₆) [J]. J S Chin Univ Tech; Nat Sci Edit(华南理工大学学报·自然科学版), 25(11):99-102
- Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, et al. 2006. Molecular cloning, expression and characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase[J]. Biochem, 396:499-507
- Zeng HB(曾海彬), Zhang JY(张剑韵), Huang LQ(黄龙全). 2011. Analysis of vitamin B₆ vitamers in tobacco plants by high performance liquid chromatography(采用高效液相色谱技术分析烟草内的维生素 B₆ 化合物) [J]. Guihaia(广西植物), 31(5):695-698

(上接第 121 页 Continue from page 121)