

不同氮素形态培养下荞麦叶片中草酸积累的变化

刘拥海¹, 俞乐¹, 彭新湘²

(1. 肇庆学院 生物系, 广东 肇庆 526061; 2. 华南农业大学 生命科学学院, 广州 510642)

摘要: 用 1/5 浓度 Hoagland(pH6.0) 营养液培养荞麦幼苗 3 d 后, 取其中一部分继续用此营养液(硝态氮); 另一部分用硫酸氨和氯化钙取代硝态氮(氨态氮)的营养液, 均培养至荞麦第一片真叶完全展开。结果表明, 以氨态氮为唯一氮源培养荞麦时, 植株叶片中草酸含量显著下降。进一步研究表明, 氨态氮培养下荞麦根中及根分泌草酸的速率也显著下降, 结果排除了叶片中草酸含量的下降是由于叶片中草酸向其根系转运或是因为根分泌草酸速率的差异造成的, 而可能与其草酸代谢改变有关。氨态氮培养下叶片中与草酸代谢相关的有机酸含量以及相关酶活性也显著下降, 这可能意味着荞麦叶片草酸形成积累可能与相关有机酸代谢有关。

关键词: 氨态氮; 荞麦; 草酸

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)04-0616-06

Changes on leaf oxalate content in buckwheat growing under different nitrogen forms

LIU Yong-Hai¹, YU Le¹, PENG Xin-Xiang²

(1. Department of Biology, Zhaoqing College, Zhaoqing 526061, China; 2. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seedling were pretreated for 3 d with 1/5 Hoagland culture solution, before the buckwheat seedling cultured to expanded primary leaves under hydroponic condition with ammonia nitrogen or nitrate nitrogen as the only nitrogen source, then oxalate content was determined in leaves, roots and root exudates. The results showed the oxalate content was very significantly decreased in buckwheat leaves when ammonia was used as the sole nitrogen source, so was in the root and its exudating rate. This implies that the oxalate decrease by ammonia results from the metabolic change rather than the change in transport to the root and in the exudating rate. The leaves had much less some organic acids, activities of several enzymes involved in oxalate metabolism when the plant grew under ammonia nitrogen, indicating these organic acids level involved in oxalate metabolism may be one of the factors controlling oxalate content. Based on the present data, it is concluded that oxalate accumulation in buckwheat leaves is closely related to some organic acids metabolism.

Key words: ammonia nitrogen; buckwheat; oxalate

草酸作为一种最简单的二元羧酸, 普遍存在于植物界中, 并且在漫长的进化过程中并无淘汰的趋势 (Zindler-Frank, 1976; 彭新湘等, 1992)。草酸不仅在调节植物细胞内 Ca^{2+} 浓度、pH 值等生理过程中起作用; 而且在植物抵抗环境胁迫过程中也起重要作用

(Ma, 2000; Ma 等, 1998; Zheng 等, 1998; 刘拥海等, 2004c)。不同的营养条件培养可改变植物组织中草酸的含量 (Libert 等, 1987), 因此一旦能有效地控制植物草酸的形成分泌, 一方面为进一步确立草酸的各种生理功能提供更为直接的证据, 另一方面可能由此改

收稿日期: 2005-12-19 修回日期: 2006-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(30070453); 广东省自然科学基金(010300)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070453); Natural Science Foundation of Guangdong Province(010300)]

作者简介: 刘拥海(1972-), 男, 湖南邵东人, 副教授, 博士, 从事植物生理与细胞生物学教学与科研工作。

善植物的抗逆性直接为生产服务。本文以荞麦(草酸积累型植物)为研究材料,深入研究了不同氮素形态培养对荞麦叶片中草酸积累的影响,这可为进一步调控植物草酸的代谢奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

荞麦(*Fagopyrum esculentum* M.),品种美国荞由山西省农业科学院小杂粮研究所提供。

1.2 荞麦硝态氮与氨态氮培养

种子用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min,用自来水与蒸馏水冲洗干净,浸种 24 h,将其点播于盛有蛭石的瓦钵里,待子叶长出后移栽至新的瓷盆中(每盆 15 株,用气泵间隙供气,在网室中自然光下培养),用 1/5 浓度 Hoagland(pH6.0)营养液培养 3 d 后,取其中一部分继续用此营养液(为硝态氮);另一部分用硫酸氨和氯化钙取代硝态氮的营养液(为氨态氮),均培养 7 d 至荞麦第一片真叶完全展开。

1.3 根系分泌物的收集

参考俞乐等(2002)的方法。植株经 1/5 浓度 Hoagland(pH6.0)营养液预培养 3 d,分别在氨态氮与硝态氮下继续培养 7 d(气泵间隙供气)后,在第 11 d 早上 9 点开始收集分泌物:用蒸馏水将植株的根冲洗干净后,轻轻甩去水分,将根放入 150 mL 含有 CaCl_2 0.5 mmol/L (pH6.0)的溶液中,避光收集分泌物 6 h。收集液经一层纱布过滤,滤液转入 250 mL 烧杯中,60 °C 恒温水浴浓缩至干,用 2 mL HCl 0.5 mol/L 将浓缩物溶解,再用 8 mL 蒸馏水分次洗涤,合并溶解液,经小漏斗过滤,滤液直接过阳离子交换柱(2 cm×10 cm, Amberlite IR-120 PLUS),接着用 5 mL 蒸馏水洗柱,用浓缩管收集流出液,流出液真空浓缩至干后,用 1 mL 流动相将浓缩物溶解,溶解液转入 1 mL 指形管,12 000×g 离心 10 min,以上清液作为待测样品。

1.4 有机酸含量测定

参考俞乐等(2002)的方法。称取第一片真叶和根各 0.5 g,加 2 mL 盐酸 0.5 mol/L 和少量石英砂充分研磨,匀浆后倒入试管中,在沸水浴中加热 15~20 min,中间摇动几次,冷却后再加入 2 mL 蒸馏水静置过夜。次日,用小漏斗过滤,再用 1 mL 蒸馏水洗试管及残留物,合并滤液,摇匀后定容到 5 mL,进样前稀释适当倍数后取 1 mL 过 0.45 μm 微孔滤膜,弃去前

0.5 mL,收集后 0.5 mL,再在 12 000 ×g 离心 10 min,以上清液作为待测样品。仪器及色谱条件:Waters 高压液相色谱(510 型)。在 220 nm 波长处检测(Shmadzu SPD-6A);固定相为 C_{18} 柱(5 μm ,4.6 mm×250 mm);流动相为 0.5% KH_2PO_4 (含 0.5 mmol/L 四丁基硫酸氢氨(TBA),pH 为 2.0);进样量为 5~10 μL ;流速为 1 mL/min。

1.5 抗坏血酸含量测定

参考 Takahama 等(1992)的方法稍加改进。称取第一片真叶 0.5 g 用 2 mL 提取液(2% 偏磷酸含 EDTA 2 mmol/L)在冰浴中研磨,匀浆后转入离心管中,10 000×g 冷冻离心 10 min,以上清液作为抗坏血酸待测液。

1.6 游离氨基酸含量测定

将 3 个 0.5 g 样品(第一片真叶),用 6 mL 4% 的磺基水杨酸充分研磨,在室温下放置 2 h 后,匀浆液经 10 000 ×g 离心 20 min,取上清液上日立 835-50 型高速氨基酸自动分析仪分析。测定条件:离子交换柱规格为 2.6 mm×150 mm,交换树脂型号为 No. 2619(52051),柱温为 53 °C,泵流速为 0.225 mL/min,泵压力为 90 kg/cm,洗脱液为 IPH-1、2、3、4,分析时间为 72 min,进样体积为 50 μL 。

1.7 草酸代谢相关酶活性测定

异柠檬酸裂解酶活性测定参考 Dixon 等(1959)的方法。丙氨酸-乙醛转氨酶活性测定参考 Ichiyama 等(2000)的方法。抗坏血酸氧化酶活性测定参考 Wilmalasena 等(1994)的方法。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性测定参照施教耐等(1979)的方法。苹果酸脱氢酶活性测定参考 Gross(1977)的方法。

1.8 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定参照 Bradford(1976)的方法,标准蛋白为牛血清蛋白。

2 结果与分析

2.1 不同氮素形态培养下荞麦叶片中草酸含量的差异

荞麦幼苗移栽后,分别用氨态氮与硝态氮培养至第一片真叶完全展开后取样分析。结果显示,与硝态氮相比,氨态氮培养下荞麦叶片中草酸含量显著下降(图 1)。

2.2 不同氮素形态培养下荞麦叶片中草酸含量的动态变化

为进一步确认不同氮素形态培养对荞麦叶片中

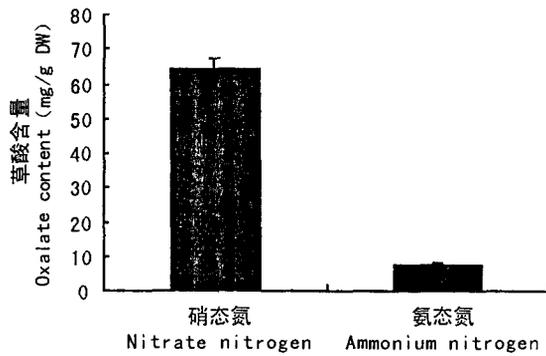


图1 不同氮素形态培养下荞麦叶片中草酸含量
Fig. 1 Oxalate content in leaves of buckwheat growing under different nitrogen forms

草酸积累的影响。本文进一步检测了氨态氮与硝态氮培养下荞麦叶片中草酸含量的动态变化。结果表明:用硝态氮预培养3 d,再处以不同氮素形态培养,处理4 d后叶片中草酸含量已有显著差异,随时间延长,硝态氮培养下的叶片草酸含量继续上升,而氨态氮培养下草酸含量持续下降,二者差距不断加大(图2)。

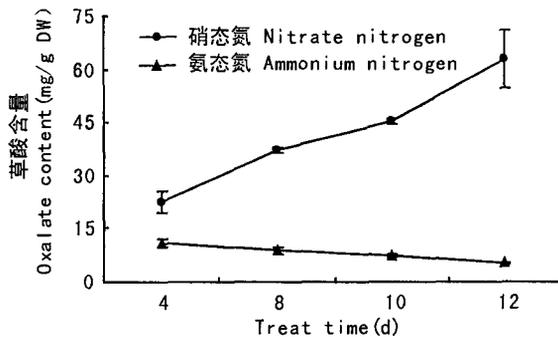


图2 不同氮素形态培养下荞麦叶片中草酸含量的动态变化

Fig. 2 Dynamic change of oxalate content in leaves of buckwheat growing under different nitrogen forms

2.3 不同氮素形态培养下荞麦根中草酸含量及根系草酸分泌速率的变化

荞麦分别用氨态氮与硝态氮培养10 d至第一片真叶完全展开后取样分析。结果显示,与硝态氮相比,氨态氮培养下荞麦根中的草酸含量以及根系草酸分泌速率均显著下降,分别降低了81%和87%(表1)。

2.4 不同氮素形态下荞麦叶片中与草酸代谢相关的有机酸含量的变化

同位素示踪试验表明柠檬酸、苹果酸以及抗坏血酸可能与植物草酸形成有关(Morton等,1964;

Franceschi, 1987; Horner等, 2000; Kostman等, 2001)。为此测定了不同氮素形态培养下荞麦叶片中几种与草酸代谢相关的有机酸含量。结果显示,与硝态氮相比,氨态氮培养下叶片中苹果酸、柠檬酸以及氧化型抗坏血酸含量均显著降低,只有还原型抗坏血酸含量二者差异不大(表2)。

表1 不同氮素形态培养下荞麦根中草酸含量及根系草酸分泌速率

Table 1 Content and exudation rate of oxalate in buckwheat growing under different nitrogen forms

项目 Item	硝态氮 Nitrate nitrogen	氨态氮 Ammonia nitrogen
草酸含量 Oxalate content(mg/g DW)	24.7±1.4	4.7±0.87
分泌速率 Exudation rate(g·g ⁻¹ DW·h ⁻¹)	33.0±6.0	4.2±0.44

表2 不同氮素形态培养下荞麦叶片中与草酸代谢相关的有机酸含量(单位:mg/g DW)

Table 2 Content of some organic acids involved in oxalate metabolism in leaves of buckwheat growing under different nitrogen forms

有机酸 Organic acid	硝态氮 Nitrate nitrogen	氨态氮 Ammonia nitrogen
柠檬酸 Citrate	0.67±0.044	0.16±0.014
苹果酸 Malate	5.75±0.17	1.34±0.41
还原型抗坏血酸 Reduced ascorbate	0.041±0.012	0.035±0.0013
氧化型抗坏血酸 Oxidized ascorbate	2.22±0.069	0.34±0.042

2.5 不同氮素形态下荞麦叶片中与草酸代谢相关的酶活性的变化

为进一步探讨不同氮素形态培养对荞麦叶片中草酸代谢相关酶活性的影响,测定了叶片中草酸相关酶活性。结果表明:与硝态氮相比,氨态氮培养下叶片中丙氨酸-乙醛酸转氨酶(AGAT)、抗坏血酸氧化酶(AAO)活性比硝态氮分别提高了85%、62%;苹果酸脱氢酶(MDH)活性差异不大;但异柠檬酸裂解酶(ICL)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)活性分别降低了49%、16%(表3)。

2.6 不同氮素形态培养下荞麦叶片中游离氨基酸含量的变化

为了探讨植物草酸代谢与氮代谢之间的关系,测定了不同氮素形态培养下荞麦叶片中主要游离氨基酸的含量。结果见表4:与硝态氮相比,氨态氮培养下叶片的甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸含量低于硝态氮,只有硝态氮的21%、75%、62%;但丝氨酸含量

却远高于硝态氮,是硝态氮的 4.1 倍。

表 3 不同氮素形态培养下荞麦叶片中与草酸代谢相关的酶活性 (nmol 底物 · min⁻¹ mg⁻¹ 蛋白质)
Table 3 Activities of several enzymes probably related to oxalate metabolism in leaves of buckwheat growing under different nitrogen forms

酶 Enzyme	硝态氮 Nitrate nitrogen	氨态氮 Ammonia nitrogen
异柠檬酸裂解酶 Isocitrate dehydrogenase	1.73±0.16	0.88±0.16
苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	323.55±7.16	306.69±1.11
抗坏血酸氧化酶 Ascorbate oxidase	6.62±1.44	10.71±3.14
丙氨酸-乙醛酸转氨酶 Alanine:glyoxylate aminotransferase	5.45±0.087	10.08±0.20
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase	38.39±0.48	32.11±2.32

表 4 不同氮素形态培养下荞麦叶片中游离氨基酸含量 (单位: mg/g DW)

Table 4 Free amino acid content in leaves of buckwheat growing under different nitrogen forms

氨基酸 Amino acid	硝态氮 Nitrate nitrogen	氨态氮 Ammonia nitrogen
天门冬氨酸 Asp	1.17	0.56
丝氨酸 Ser	1.17	4.81
脯氨酸 Pro	0.16	0.28
丙氨酸 Ala	1.63	1.01
异亮氨酸 Ile	0.056	0.19
酪氨酸 Tyr	0.17	0.40
赖氨酸 Lys	0.19	0.72
精氨酸 Arg	1.85	11.84
半胱氨酸 Cys	0.18	0.32
苏氨酸 Thr	2.41	4.13
谷氨酸 Glu	2.71	2.02
甘氨酸 Gly	1.24	0.26
缬氨酸 Val	0.14	0.41
亮氨酸 Leu	0.096	0.045
苯丙氨酸 Phe	0.20	0.65
组氨酸 His	0.04	0.18
甲硫氨酸 Met	0.072	0.20
色氨酸 Trp	ND	ND
氨 NH ₃	0.10	2.02

ND: undetectable(未检测到)

3 讨论

氮素是植物生长的主要限制因子,高等植物一般通过根系从土壤中吸收硝态氮或氨态氮,硝态氮吸收后需要被还原成氨态氮才能被植物所利用(Liu

等,2000)。有些植物以氨态氮为唯一氮源时,生长发育会受到抑制,如玉米、甜菜、番茄等(Magalhães等,1989;Raab等,1994)。但也有一些植物对氨态氮为唯一氮源时不太敏感,如水稻等(Magalhães等,1989;Troelstra等,1995)。研究表明,氨态氮为唯一氮源时植物生长受抑的主要原因可能是细胞内 pH 调控的混乱和游离氨的毒害(Barker等,1966;Goyal等,1982;Claussen等,1995)。本文研究由于预先用硝态氮(1/5 浓度 pH6.0 的 Hoagland 营养液)培养 3 d 后再处以氨态氮,氨态氮培养下叶片中游离氨虽积累较多(表 4),但从表型上看并未见到荞麦植株有伤害症状。

前人研究表明,不同的营养条件可能改变植物组织中草酸的含量(Libert等,1987),如马铃薯在硝态氮和氨态氮条件下培养,其叶片中内源草酸含量差异很大,前者占其组织干重的 2.7%,而后者不过 0.3%,相差 8 倍(Clark,1936);此外,以氨态氮为唯一氮源培养菠菜(草酸积累型植物)与甜菜时其草酸含量显著下降;当提高硝态氮水平时植物组织中草酸积累就增加(Libert等,1987)。本文以氨态氮为唯一氮源培养荞麦时,发现植株叶片中草酸含量也显著降低(图 1),进一步研究发现,植株经硝态氮预培养 3 d,再处以硝态氮与氨态氮培养 4 d 后,叶片中草酸含量即有显著差异,随时间延长,硝态氮培养下的叶片草酸含量继续上升,而氨态氮培养下草酸含量持续下降,二者差距不断加大(图 2)。因此也再次证实植物在氨态氮下培养总是与其低草酸含量相关。

而在以硝态氮为氮素的营养液中生长的菠菜适当增加氨态氮水平可减少草酸的积累(Libert等,1987)。这对于营养学家试图降低草酸含量研究提供了新思路,因为草酸对人体是有害的,它是关节炎的引发因子,腐蚀人的器官,毒害神经系统,引起肾功能衰竭等。另外草酸钙为尿结石的主要成分,而人和大部分动物缺少降解草酸的机制,长期食用高草酸含量的食物会导致结石病,所以应尽量控制可食部分的草酸含量。

草酸在植物组织中的水平应该受其合成、分解、转运及分泌等因素影响。一般认为草酸是一种代谢副产物,形成以后即积累于液泡或由根直接分泌出体外,不再有其他代谢反应(彭新湘等,1992)。本文研究表明荞麦植株处以氨态氮培养时,荞麦根中草酸含量及根分泌草酸速率也显著降低(表 1),因此

可以排除叶片中草酸含量的下降是由于叶片中草酸向其根系转运或者是因根分泌草酸速率的差异所造成的,而可能与其草酸代谢改变有关。已有证据表明植物中草酸合成可能与乙醇酸代谢、抗坏血酸代谢、三羧酸循环等过程有关(Franceschi, 1987; Horner 等, 2000; Kostman 等, 2001)。但目前仅有由乙醛酸到草酸的转化途径已获得酶学证据,而其它几种可能途径的生化机理尚一无所知。前人研究已证实乙醛酸在乙醇酸氧化酶催化作用下生成草酸(Richardson 等, 1961; Havir, 1983),由乙醛酸氧化生成可能是植物叶片中草酸合成的限速步骤之一,其反应速率高低可能导致不同植物叶片中草酸含量差异(刘拥海等, 2004a, d)。但也有研究者认为,植物在黑暗条件下或愈伤组织中同样也能积累草酸;此外,高光呼吸的 C_3 植物中有的草酸含量并不高,而在很弱甚至没有光呼吸的 C_4 植物中却能形成大量草酸(Zindler-Frank, 1976; Franceschi, 1987),这说明光呼吸乙醇酸途径并非形成草酸的唯一来源。前人研究显示某些植物中抗坏血酸可能是草酸合成的有效前体(Yang 等, 1975; Franceschi, 1987; Horner 等, 2000; Kostman 等, 2001)。Nuss 等(1978)认为抗坏血酸可能在光下或暗中通过 C_2/C_3 裂解生成草酸,在草酸含量高的植物中有 22%~50% 的标记量出现在草酸中,而在低草酸含量的植物中,只有 2%~19% 的转化量,表明在草酸积累型植物中可能更易利用抗坏血酸形成草酸。本文结果显示硝态氮培养的荞麦叶片中还原型与氧化型抗坏血酸含量均高于氨态氮下培养(表 2),由此看来荞麦叶片中草酸合成也可能与抗坏血酸含量有关。但用抗坏血酸和几种与抗坏血酸合成有关的代谢物饲养麦根后发现它们对叶片中草酸积累影响较小(刘拥海等, 2004b)。此外,氨态氮培养下荞麦叶片中异柠檬酸裂解酶活性显著低于硝态氮下培养(表 3),意味着该酶也可能与荞麦叶片中草酸形成有关;但用异柠檬酸饲养麦根,结果叶片中草酸含量没有明显变化,并且用三羧酸循环的抑制剂丙二酸对荞麦草酸积累也没有明显影响(刘拥海等, 2004b)。

在过氧化物体中,乙醛酸转氨酶与乙醇酸氧化酶竞争底物乙醛酸,那么乙醛酸转氨酶活性直接影响叶片中草酸合成,而氨基供体的浓度可能直接影响转氨酶活性(Noguchi 等, 1981; Yokota 等, 1985)。氨态氮培养下荞麦叶片中甘氨酸含量降低了 79%(表 4)。甘氨酸含量似乎与草酸积累有某种

平行关系或相关性,有待进一步证实。甘氨酸水平应受控于它的合成或下游反应,但氨态氮培养下丙氨酸-乙醛酸氨基转移酶活性显著升高(表 3),而甘氨酸含量反而降低,看来甘氨酸水平受控于其下游反应的可能性较大。氨态氮培养下荞麦叶片中丝氨酸大量积累(表 4),可能是氨态氮促进了甘氨酸脱羧反应。

参考文献:

- Baker CJL. 1954. The determination of oxalate in fresh plant materials[J]. *Analytic*, **77**:340-344
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**:248-254
- Clark HE. 1936. Effect of ammonium and of nitrate nitrogen on the composition of the tomato plant[J]. *Plant Physiol*, **11**:5-24
- Claussen W, Lenz F. 1995. Effect of ammonium and nitrate on net photosynthesis, flower formation, growth and yield of eggplants (*Solanum melongena*) [J]. *Plant and Soil*, **171**:267-274
- Dixon H, Kornberg HL. 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle[J]. *J Biochem*, **72**:39-56
- Franceschi VR. 1987. Oxalic acid metabolism and calcium oxalate formation in *Lemna minor* [J]. *Plant Cell Environ*, **10**:397-406
- Goyal SS, Huffaker RC, Lorenz OA. 1982. Inhibitory effects of ammoniacal nitrogen on growth of radish plants. II. Investigation on the possible causes of ammonium toxicity to radish plants and its reversal by nitrate[J]. *J Am Soc Hort Sci*, **107**:130-135
- Gross GG. 1977. Cell wall-bound malate dehydrogenase from horseradish[J]. *Phytochemistry*, **16**:319-321
- Havir EA. 1983. Evidence for the presence in tobacco leaves of multiple enzymes for the oxidation of glycolate and glyoxylate [J]. *Plant Physiol*, **71**:874-878
- Horner HT, Kausch AP, Wagner BL. 2000. Ascorbic acid, a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture[J]. *J Plant Sci*, **161**(1):861-868
- Ichiyama A, Xue XX, Oda T, et al. 2000. Oxalate synthesis in mammals: properties and subcellular distribution of serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase in the liver[J]. *Mol Urol*, **4**(4):333-340
- Kostman TA, Tarlyn NM, Loewus FA, et al. 2001. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occur within individual calcium oxalate crystal idioblasts[J]. *Plant Physiol*, **125**:634-640
- Libert B, Franceschi VR. 1987. Oxalate in crops plants[J]. *J Agr Food Chem*, **35**:926-938
- Liu PW, Neumann G, Bangerth F, et al. 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco[J]. *J Exp Bot*, **51**(343):227-237
- Liu YH(刘拥海), Peng XX(彭新湘), Yu L(俞乐). 2004a. Difference in oxalate content between buckwheat and soybean leaves an its possible cause(荞麦与大豆叶片中草酸含量差异

- 及其可能的原因[J]. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), **30**(2):201-208
- Liu YH(刘拥海), Yu L(俞乐), Peng XX(彭新湘). 2004b. Effect of some factors on oxalate content in buckwheat seedling (不同因子对荞麦中草酸含量的影响)[J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), **12**(5):464-466
- Liu YH(刘拥海), Yu L(俞乐). 2004c. Relationship on the difference of soybean cultivars in Al tolerance and organic acids (大豆耐铝性品种差异及其与有机酸的关系)[J]. *Guihaia* (广西植物), **24**(6):554-557
- Liu YH(刘拥海), Yu L(俞乐). 2004d. Studies on purification and characters of glycolate oxidase between buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and soybean (*Glycine max*) leaves (荞麦与大豆叶片乙醇酸氧化酶的纯化和性质比较研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **24**(2):184-187
- Ma JF. 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants[J]. *Plant Cell Physiol*, **41**:383-390
- Ma Zhong, Miyasaka SC. 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al[J]. *Plant Physiol*, **118**:861-865
- Magalhães JR, Huber DM. 1989. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture[J]. *Fertil Res*, **21**:1-6
- Morton RK, Wells JRE. 1964. Isocitrate lyase and the formation of α -keto- γ -hydroxyglutaric acid in *Oxalis*[J]. *Nature*, **201**:477-479
- Noguchi T, Hayashi S. 1981. Plant leaf alanine; 2-oxoglutarate aminotransferase. Peroxisomal localization and identity with glutamate; glyoxylate aminotransferase[J]. *Biochem J*, **195**:235-239
- Nuss RF, Loewus FA. 1978. Further studies on oxalic acid biosynthesis in oxalate-accumulating plants[J]. *Plant Physiol*, **61**:590-592
- Peng XX(彭新湘), Li MQ(李明启). 1992. Oxalate and its metabolism (植物中的草酸及其代谢)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **28**(2):93-96
- Raab TK, Terry N. 1994. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiol*, **105**:1159-1166
- Richardson KE, Tolbert NE. 1961. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase[J]. *J Biol Chem*, **235**:1280-1284
- Shi JN(施教耐), Wu MX(吴敏贤), Zha JJ(查静娟). 1979. Studies on plant phosphoenolpyruvate carboxylase (植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的研究)[J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **5**(3):225-235
- Takahama U, Oniki T. 1992. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate[J]. *Plant Cell Physiol*, **33**(4):379-387
- Troelstra SR, Wagenaar R, Smant W. 1995. Nitrogen utilization by plant species from acid heathland soils. I. Comparison between nitrate and ammonium nutrition at constant low pH[J]. *J Exp Bot*, **46**:1103-1112
- Wimalasena K, Dharmasena S. 1994. Substrate specificity of ascorbate oxidase; unexpected similarity to the reduction site of dopamine β -mono-oxygenase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **203**(3):1471-1476
- Yang JC, Loewus FA. 1975. Metabolic conversion of L-ascorbate to oxalic acid in oxalate-accumulating plants[J]. *Plant Physiol*, **56**:283-285
- Yokota A, Kitaoka S, Miura K. 1985. Reactivity of glyoxylate with hydrogen peroxide and simulation of the glycolate pathway of C_3 plants and *Euglena*[J]. *Planta*, **165**:59-67
- Yu L(俞乐), Peng XX(彭新湘), Yang C(杨崇), et al. 2002. Determination of oxalic acid in plant tissue and root exudates by reversed phase High Performance Liquid Chromatography (反相高效液相色谱法测定植物组织及根分泌物中草酸)[J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), **30**(9):1119-1122
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. I. Aluminum-induced specific secretion of oxalic acid from root tips[J]. *Plant Physiol*, **117**:745-751
- Zindler-Frank E. 1976. Oxalate biosynthesis in relation to photosynthetic pathway and plant productivity: a survey [J]. *Z Pflanzenphysiol*, **80**(1):1-13.