

# 葡萄糖对杜氏盐藻 3-磷酸甘油脱氢酶活性的影响

魏娟, 吕芳芳, 唐欣昀\*, 张海生, 曹媛媛, 赵良侠

(安徽农业大学 生命科学学院, 合肥 230036)

**摘要:** 杜氏盐藻是一种抗渗透能力强的单细胞绿藻, 甘油在其渗透调节过程中具有重要作用。葡萄糖对杜氏盐藻细胞数量的增加效果不明显, 但对盐藻细胞内甘油积累有显著促进作用, 在 0~15 g/L 范围内葡萄糖的浓度与胞内甘油积累显著相关( $R^2=0.9604, P=0.01$ ); 葡萄糖浓度达到 15 g/L 时, 胞内甘油积累量达到最高值 7.80 pg/cell, 是对照的 1.88 倍, 胞内甘油积累量与葡萄糖的消耗量极显著相关( $R^2=0.9982, P=0.01$ )。葡萄糖对盐藻细胞内总蛋白、3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)酶活和比活都有显著影响, 在 15 g/L 葡萄糖时这 3 个值达到最大值, 分别是对照的 1.354、4.384、3.229 倍。数据显示葡萄糖浓度在 15 g/L 时细胞内蛋白质含量增加不多, 但 GPDH 酶活和比活却大幅度增加; 葡萄糖导致的渗透压的变化可能诱导新的同工酶的合成。

**关键词:** 杜氏盐藻; 葡萄糖; 甘油; 3-磷酸甘油脱氢酶

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)04-0556-05

## Effects of glucose on activities of Glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Dunaliella salina*

WEI Juan, Lü Fang-Fang, TANG Xin-Yun\*, ZHANG Hai-Sheng, CAO Yuan-Yuan, ZHAO Liang-Xia

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

**Abstract:** *D. salina* is the single-cell green alga with strong anti-osmosis ability, and glycerol has the very important role in the process of osmosis regulation. Glucose(Glu) had weak effect on the increase of cell density of *D. salina*, but could obviously promote the accumulation of intracellular glycerol(Gly) of the alga, and the effect linearly correlated remarkably with intracellular Gly concentration( $R^2=0.9604, P=0.01$ ), when the concentration of glucose was between 0—15 g/L. Upon Glu being 15 g/L, the accumulation of intracellular Gly reached maximal value of 7.80 pg/cell, which was 1.88 times of the control treatment. Intracellular Gly concentration linearly correlated remarkably with the consumption of Glu( $R^2=0.9982, P=0.01$ ). Glu could clearly increase the intracellular protein content, activity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH), and the total amount of intracellular protein, activity of GPDH, specific activity of GPDH reached maximal values, which were 1.354, 4.384 and 3.229 times of that of control treatment, respectively, when the concentration of Glu was at 15 g/L. Data indicated that, when Glu being at 15 g/L, the amount of intracellular protein just increased slightly, while the activity and the specific activity of GPDH increased very dramatically; the change of osmotic pressure resulted by Glu might induced the synthesis of some new isoenzymes.

**Key words:** *Dunaliella salina*; glucose; glycerol; glycerol-3-phosphate dehydrogenase

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)具有极强的渗透调节能力, 在含 0.5~5 mol/L NaCl 的培养液中都能生

长, 甚至在潮湿有光的盐晶体表面也能生存(Chitlaur & Pick 等, 1989)。甘油是杜氏盐藻的主要渗透调节

收稿日期: 2007-12-12 修回日期: 2008-03-05

基金项目: 安徽省自然科学基金(2006KJ173B, 2007jq1052)[Supported by Natural Science Foundation of Anhui Education Department (2006KJ173B, 2007jq1052)]

作者简介: 魏娟(1982-), 女, 安徽合肥人, 硕士, 从事微生物制药方面的工作。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: tangxinyun@21cn.com)

物质(陈志等,1991,1992),该藻细胞内有一条专门的调节渗透压的代谢途径,即甘油循环代谢途径(Benamotz & Aron,1983;Gimmler & Meller,1981;Haus & Wegmann,1984),对外界盐浓度变化做出迅速反应,调节胞内甘油浓度以使细胞内外达到渗透平衡。在甘油代谢过程中有 3 个酶起到重要作用:二羟丙酮还原酶、二羟丙酮激酶和 3-磷酸甘油脱氢酶(GP-DH);其中依赖于  $\text{NAD}^+$  的 GPDH 酶能催化 3-磷酸甘油和磷酸二羟丙酮之间的平衡反应,是甘油代谢途径中的第一个关键酶。3-磷酸甘油脱氢酶广泛存在于动物、植物和微生物的细胞中。

为弥补光自氧营养时能源和碳源的不足,藻类能利用一些有机物进行混养生长(张义明,1999)。异养转化不仅可以提高藻类的生长效率、降低其生产的成本,而且还有利于藻细胞内某些代谢产物的积累(缪晓玲等,2003)。较高的葡萄糖浓度能够提高微生物细胞内的甘油含量(孙俊楠等,2006),克鲁氏假丝酵母中甘油的合成不仅受到盐浓度的调控,同时也受到葡萄糖的诱导(王正祥等,2000)。对盐藻及其他微生物在不同盐浓度条件下胞内甘油含量变化及甘油代谢主要酶活性变化过程已有大量报道,但对于葡萄糖是否可以诱导盐藻胞内甘油的大量合成、是否对甘油代谢途径中的关键酶 3-磷酸甘油脱氢酶具有调控作用还缺乏相关研究。本实验以杜氏盐藻为材料,研究葡萄糖对其生长、胞内甘油及 GPDH 酶活性的影响,为进一步揭示盐藻甘油代谢机理提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 盐藻的培养

杜氏盐藻藻种为中国科学院青岛海洋所秦松博士馈赠,经本实验室纯化并保存。采用改良的 Johnson 培养基(陈志等,1992)培养杜氏盐藻;葡萄糖添加量分别为 0、5、10、15、20 g/L;光照强度为  $60 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光暗比为 14 h : 10 h,温度  $27^\circ\text{C}$ ,接种初始密度为  $2.2 \times 10^5$  个/mL。

### 1.2 盐藻细胞密度的测定

采用分光光度法在 430 nm 测定藻液的 OD 值,然后根据显微计数法所确定的细胞密度与 OD430 值之间的函数关系计算盐藻细胞密度,取 3 次平行处理测定其平均值。

### 1.3 胞内甘油的测定

按照 Ben-Amotz & Avron(1978)的方法并稍做修改。取 5 mL 的藻液,经 3 000 rpm 离心 15 min,去上清,加蒸馏水离心洗涤一次,去上清;在沉淀藻泥中加入 1.5 mL 蒸馏水和 0.2 mL 三氯甲烷,8 000 g 离心 20 min 去除蛋白质沉淀。取  $30 \mu\text{L}$  上清液,加蒸馏水至 0.2 mL,再加高碘酸钠试剂 0.2 mL,摇匀后室温静置 5 min,再加 2.5 mL 乙酰丙酮试剂(乙酰丙酮 : 异丙醇 = 1 : 99),迅速摇匀, $42^\circ\text{C}$  恒温水浴 20 min,410 nm 测 OD 值,根据绘制的甘油标样标准曲线计算样品中的甘油含量,取 3 个平行处理的平均值。

### 1.4 酶的粗提

取培养 12 d 的藻液在  $4\ 500 \times g$  离心收集,得鲜重约 5 g,加 20 mL 缓冲液(Tris-HCl,50 mmol/L;  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ,5 mmol/L; DTT,1 mmol/L; pH7.6)。冰浴超声破碎,超声功率 200 W,每次作用时间 8 s,间隔 30 s,共作用 10 次。 $4^\circ\text{C}$   $40\ 000 \times g$  离心 30 min,取上清液作为粗提液(张学武等,1999)。

### 1.5 酶活性的测定

磷酸二羟丙酮(DHAP)还原的反应液中包括 50 mmol/L HEPES 缓冲液(pH7.6)、0.4 mmol/L DHAP、0.16 mmol/L NADH、5~50  $\mu\text{L}$  酶液(视酶活力高低加适当体积),总体积 1 mL。反应以加入辅酶开始,反应温度为  $25^\circ\text{C}$ ,用分光光度计在 340 nm 处测定单位时间内 OD 值的变化,取 3 个平行处理的平均值。在上述条件下,反应中每分钟还原 1  $\mu\text{mol}$  DHAP 的酶量为一个酶活单位(U)(张学武等,1999)。

### 1.6 蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝法测定蛋白质含量(李琳等,1980)。以牛血清白蛋白为标准蛋白,取 3 个平行处理的平均值。

### 1.7 还原糖测定

还原糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(沈力钧,2002)。

## 2 结 果

### 2.1 葡萄糖盐藻生长及单个细胞内甘油积累的影响

在培养液中分别添加浓度 0、5、10、15、20 g/L 葡萄糖,将盐藻培养 12 d 后,测定藻细胞密度及甘油含量,结果如图 1。

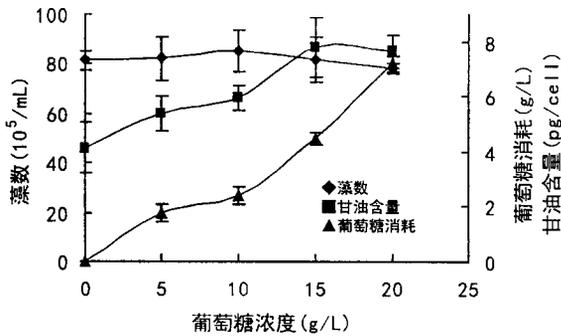


图1 葡萄糖对盐藻生长及胞内甘油含量的影响  
Fig. 1 Effect of glucose on the growth and the intracellular glycerol content of *D. salina*

由图1可以看出,葡萄糖对盐藻细胞内甘油积累有明显的促进作用,在0~15 g/L范围内葡萄糖的浓度与胞内甘油积累显著相关( $y=0.2306x+4.0995, R^2=0.9604$ ),葡萄糖浓度达到15 g/L时,胞内甘油积累量达到最高值,为7.799 pg/cell,较对照提高了88.2%;继续增加葡萄糖浓度却不利于甘油的增加。葡萄糖对盐藻细胞数量的增加和胞内甘油积累的影响不一致。低浓度的葡萄糖虽然能够促进杜氏盐藻的生长,但效果不明显,当葡萄糖浓度为10 g/L时,盐藻细胞密度达最大,为 $85.23 \times 10^5$ 个/mL,仅比对照提高了4.77%,葡萄糖浓度大于15 g/L却导致盐藻细胞数下降。

图2显示盐藻对葡萄糖的利用情况(葡萄糖浓度15 g/L)。随着细胞数量的增加,培养液中的甘油浓度稳定增加,葡萄糖浓度明显下降,甘油浓度与葡萄糖浓度极显著负相关( $r=-0.879, P=0.01$ ),与葡萄糖的消耗极显著相关(图1,  $r=0.9982, P=0.01$ )。显然,盐藻细胞可以利用葡萄糖合成甘油,进行异养生长。

## 2.2 葡萄糖对盐藻蛋白质含量的影响

在不同浓度的葡萄糖培养液中蛋白质的浓度变化如图3所示。从图3可看出在浓度为0~15 g/L范围内葡萄糖对细胞水溶性蛋白含量有一定促进效应( $R^2=0.8962$ )。葡萄糖15g/L的培养液中藻体内蛋白质积累量比其它处理高,最高达到87.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,较对照提高了36.3%。葡萄糖浓度达20 g/L时,藻体生长不旺盛,蛋白质积累量相对较低,且低于无葡萄糖的培养液中的蛋白质含量。

## 2.3 葡萄糖对盐藻 GPDH 酶活性的影响

葡萄糖对藻体内 GPDH 酶活的影响如图3所示。在 pH7.6 时 GPDH 催化磷酸二羟丙酮还原为

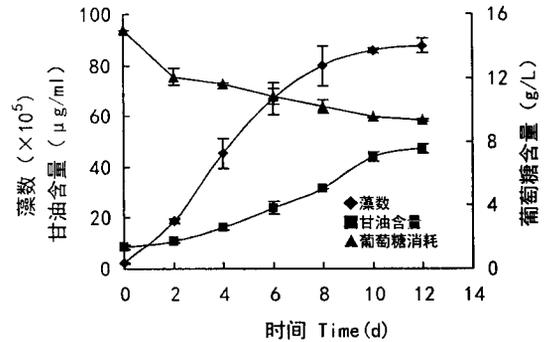


图2 盐藻的生长和对葡萄糖的利用  
Fig. 2 The growth of *D. salina* and glucose consumption

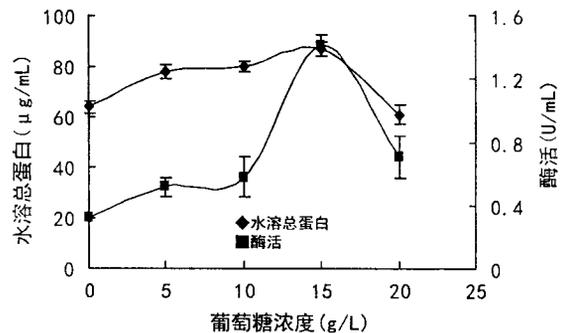


图3 葡萄糖对盐藻 GPDH 酶活性和胞内蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effects of glucose on activities of GPDH and intracellular protein content of *D. salina*

3-磷酸甘油,不同葡萄糖浓度处理的盐藻胞内的 GPDH 酶活性的大小也有明显差异。从图中可以看出,GPDH 酶活性的变化趋势与盐藻胞内甘油含量的变化相似,都是当葡萄糖浓度达到15 g/L时达到最大,此时的酶活为1.415 U/mL,是对照的4.398倍。

## 2.4 葡萄糖对盐藻单个细胞 GPDH 酶活和总蛋白的影响

将以上数据重新处理,以单个细胞的 GPDH 酶活、总蛋白及比活(酶活/蛋白质)表达,并与对照(无葡萄糖)相比较,结果见表1。从表1可看出,当葡萄糖浓度为15 g/L时,单个细胞内的甘油积累量最大,为7.80 pg/cell,此时的 GPDH 酶活也达到最高,为0.275  $\mu\text{U}/\text{cell}$ ,是对照的4.384倍。与此同时,单个细胞的蛋白含量及比活也相应提高,分别是对照的1.354和3.229倍。而在5 g/L和10 g/L葡萄糖处理的样品中,尽管甘油的含量在逐渐增加,

但平均每个细胞蛋白质含量、酶活的差异却不显著, 只是比活稍有增加。

### 3 讨论

葡萄糖在经磷酸化和醛缩酶的作用下分解成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮, 前者经脱羧反应进入三羧酸循环或 EMP 途径, 后者在  $\text{NAD}^+$  依赖性 GPDH 酶催化下还原为 3-磷酸甘油, 此为进入甘油合成分支途径中的第一步酶促反应。细胞  $\text{NAD}^+$  依赖性 GPDH 酶活水平将直接决定葡萄糖分解代谢过程中向甘油合成方向的物质流分配量, 由此也决定甘油的生成水平。从本实验数据可看出采用葡萄糖对盐藻进行异养培养, 对于盐藻的细胞数量没有明显影响, 且浓度稍高即产生抑制作用; 但葡萄糖对盐藻甘油的积累具有明显作用, 在 0~15 g/L 范

围内葡萄糖浓度与甘油的积累呈线性相关, 但达到 20 g/L 这种效果下降。本数据显示盐藻可以直接利用葡萄糖进行异养生长、积累甘油。孙俊楠等 (2006) 报道, 在缺乏无机碳、葡萄糖浓度为 20% 时, 盐藻体内甘油、蛋白质含量均达最高值, 但该文没有比较不同处理间的差异程度, 且所用葡萄糖的浓度液大大高于本文设计的浓度, 其中差异有待进一步的研究。Fujii (1991) 采用不同无机离子模拟改变渗透压均可诱导 *Dunaliella tertiolecta* 合成甘油。盐藻可以忍受较高浓度的 NaCl, 本文数据显示葡萄糖可以诱导杜氏盐藻提高细胞内甘油的含量, 但稍高浓度的葡萄糖即对盐藻的生长产生不利的影响; 而盐藻可以利用葡萄糖进行异养生长, 因此高浓度葡萄糖对盐藻生长抑制的原因可能与异养条件有关, 显然盐藻对 NaCl 和葡萄糖这两种不同物质引起的渗透压变化的耐受机制可能是不一样的, 需要设计

表 1 葡萄糖对单个细胞甘油含量、GPDH 酶活性及总蛋白的影响

Table 1 Effects of glucose on glycerol, protein content and activities of GPDH of single cell of *D. salina*

	葡萄糖浓度 Glucose concentration (g/L)				
	0	5	10	15	20
甘油含量 Glycerol (pg/cell)	4.144±0.123	5.403±0.106	5.968±0.431	7.800±0.362	7.663±0.321
实验/对照 Experiment/control	1.000	1.304	1.440	1.882	1.849
酶活 Activity of GPDH ( $\mu\text{U}/\text{cell}$ )	0.063±0.001	0.097±0.010	0.099±0.017	0.275±0.009	0.158±0.025
实验/对照 Experiment/control	1.000	1.574	1.649	4.384	2.549
总蛋白 Protein (pg/cell)	12.52±0.605	14.83±0.890	13.82±0.319	16.94±0.725	13.64±0.554
实验/对照 Experiment/control	1.000	1.187	1.104	1.354	1.090
比活 Specific activity of GPDH (U/mg protein)	5.042±0.197	6.617±1.062	7.208±1.415	16.29±1.238	11.54±1.387
实验/对照 Experiment/control	1.000	1.307	1.439	3.229	2.308

深入的研究来揭示这种差别。

葡萄糖对盐藻细胞内 GPDH 酶活、蛋白质及比活的影响都在 15 g/L 时达到最大值, 并在 10~15 g/L 之间产生较大的变化, 这种变化与葡萄糖和甘油的浓度的变化幅度不成比例。在 10 g/L 葡萄糖样品中 GPDH 酶活、蛋白质及比活 3 个值分别是对照的 1.649、1.104、1.439 倍, 而在 15 g/L 葡萄糖样品中这 3 个值分别是对照的 4.384、1.354、3.229 倍, 可以看出细胞内蛋白质含量增加不多, 但 GPDH 酶活和比活却大幅度增加。推测可能有 3 种因素导致了细胞内甘油的大量积累: ①较高浓度的葡萄糖产生了较大的渗透压, 杜氏盐藻要依靠体内的甘油含量来调节藻体内部与外部的渗透压变化, 葡萄糖浓度增加导致 GPDH 酶活性提高, 促进甘油的合成; ②葡萄糖浓度的持续上升, 特别在 15 g/L 葡萄糖时, 诱导新的蛋白质(同功酶)的合成(总蛋白是

对照的 1.354 倍); ③新的同功酶具有较高的活性, 导致细胞内比活的大幅度提高(3.229 倍), 总酶活提高 4.384 倍。由此就出现葡萄糖对 GPDH 酶总量的提高影响不大, 但显著提高 GPDH 相对酶活的现象。在 20 g/L 葡萄糖处理的样品中也存在类似的情况, 虽然由于高浓度葡萄糖的抑制效应, 细胞数量、总蛋白比对照还要低, 但酶活、比活却均是对照的 2.549 和 2.308 倍。

盐藻参与渗透调节的 GPDH 存在 3 个同功酶(白林含等, 1995), 分别参与高渗条件下甘油、甘油酯和甘油磷酸酯的合成, 但尚没有定量分析同功酶的活性、含量与渗透压变化关系的报道; 研究认为由于渗透压的变化引起该酶的激活, 进而导致甘油浓度上升, 而该酶的激活与培养液中渗透调节剂的种类无关。Sadka 等 (1991) 认为在渗透压的变化过程中没有新的蛋白质的合成, 但有证据表明新的蛋白

质合成受其他生理条件调节(Sadka等,1989),并且分离提纯出高盐诱导的150 kD和60 kD的蛋白质。酿酒酵母和产甘油假丝酵母中也存在高渗透胁迫诱导GPDH酶的高效表达(Ben-Amotz & Avron,1978; Sadka等,1989)。本文数据表明由葡萄糖导致的高渗条件在杜氏盐藻中可能诱导了新的蛋白质(GP-DH酶)的合成,需要详细的实验来分析葡萄糖对杜氏盐藻GPDH酶活性的调控和诱导机理。

### 参考文献:

- 李琳,焦新之. 1980. 应用蛋白染色剂考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质的方法[J]. 植物生理学通讯,6:52-56
- 沈力钧. 2002. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,173
- Bai LH(白林含), Zhou JM(周冀明), Zhang ZQ(张兆清), et al. 1995. The studies on osmoregulation and isoforms of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by polyamidigel disclectrophoresis of *Dunaliella salina* (杜氏盐藻渗透调节与三磷酸甘油脱氢酶同工酶的电泳分析)[J]. *J Sichuan Univ(Nat Sci Edi)*(四川大学学报·自然科学版),32(6):738-742
- Ben-amotz A, Avron M. 1983. On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*[J]. *Plant Physiol*,72:593-597
- Ben-Amotz A, Avron M. 1978. On the mechanism of osmoregulation in *Dunaliella*//Caplan SR, Ginzburg M(eds). *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press,529-541
- Chen Z(陈志), Jiao XZ(焦新之). 1992. Regulative mechanism of *Dunaliella salina* and its industrial potentiality(杜氏盐藻渗透调节机制的研究及其工业应用前景)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),28:88-93
- Chen Z(陈志), Jiao XZ(焦新之), Liu H(刘虹). 1991. The plasma membrane  $H^+$ -ATPase during the osmoregulation of the alga *Dunaliella salina* under hypertonic stress(杜氏盐藻质膜ATPase在渗透调节中的可能作用)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报),17(4):333-341
- Chitlaur E, Pick U. 1989. Selection and characterization of *Dunaliella salina* mutants defective in haloadaptation[J]. *Plant Physiol*,91:788-794
- Fujii S. 1991. The growth and intracellular ionic composition of *Dunaliella tertiolecta* in Magnesium-rich media[J]. *Plant and Cell Physiol*,32(4):549-554
- Gimmler H, Miller E. 1981. Salinity-dependent regulation of starch and glycerol metabolism in *Dunaliella parva* [J]. *Plant Cell Environ*,4:367-375
- Haus M, Wegmann K. 1984. Glycerol-3-phosphosphate dehydrogenase(E.C. 1. 1. 8) from *Dunaliella tertiolecta* 1. Purifications and kinetic properties[J]. *Physiol Plant*,60
- Miao XL(缪晓玲), Wu QY(吴庆余). 2003. Exploitation of biomass renewable energy sources of microalgae(微藻生物质可再生能源的开发利用)[J]. *Renewable Energy*(可再生能源),3:13-16
- Sadka A, Himmelhoch S, Zamir A. 1991. A 150-kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*[J]. *Plant Physiol*,95:22-31
- Sadka A, Lers A, Zamir A, et al. 1989. A critical examination of the role of de novo protein synthesis in the osmotic adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella*[J]. *Febs Letter*,244:93-98
- Sun JN(孙俊楠), Zhang JA(张建安), Yang MD(杨明德), et al. 2006. Effects of glucose concentration on the cultivation of *Dunaliella salina* (葡萄糖对杜氏盐藻生长特性影响的研究)[J]. *Renewable Energy*(可再生能源),4:38-41
- Wang ZX(王正祥), Zhuge J(诸葛健), Cao Y(曹钰), et al. 2000. The key enzymes of metabolisms of glycerol in candida glycerol-genesis(产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究)[J]. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报),40(2):180-187
- Zhang XW(张学武), Liu CX(刘承宪). 1999. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina* (盐生杜氏盐藻甘油 3-磷酸脱氢酶的分离纯化及其特性的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),41(3):290-295
- Zhang YM(张义明). 1999. Estimation of heterotrophic growth fraction in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* (钝顶螺旋藻在混合营养培养中异养生长能力的估算)[J]. *J Guizhou Univ Tech*(贵州工业大学学报),28(2):71-74
- “Gouqi”(关于中药现代化中的物种鉴定问题——基于枸杞分类和生产问题的讨论)[J]. *Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin*(西北植物学报),23(7):1 077-1 083
- Wu ZY(吴征镒), Wang JX(王锦秀), Tang YC(汤彦承). 2006. Huma should be *Linum usitattissimum*, not *Sesamum indicum* with special reference to the source of confusion of names for traditional Chinese medicine and the writtern time and author of Shen Nung Pen TS'ao Ching(胡麻是亚麻,非脂麻辨——兼论中草药名称混乱的根源和《神农本草经》的成书年代及作者)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报),45(4):458-472
- Xue CY, Ho TN, Li DZ. 2002a. Megasporogenesis and female gametogenesis development of the Tibetan medicine “Zang Yin Chen”-*Swertia mussotii*[J]. *Guihaia*,22(3):249-25
- Xue CY(薛春迎), Ho TN(何廷农), Li DZ(李德铎). 2002b. Floral nectaries in *Swertia*; anatomy and morphology(獐牙菜属植物花蜜腺形态及解剖学)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究),24(3):359-369
- Xue CY, Li DZ, Lu JM, et al. 2006. Molecular authentication of traditional Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii*(Gentianaceae)[J]. *Planta Med*,70:1 223-1 226
- Yang HL(杨慧玲), Liu JQ(刘健全). 2005. Seed germination of *Swertia mussotii*, an important application in Tibetan folk medicine(重要藏药川西獐牙菜种子萌发的研究)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究),27(3):295-300
- Zhao ZZ, Li TYS. 2004. Hongkong commonly confused Chinese Medicines[M]. Hong Kong: Chinese Medicine Merchants Association Ltd

(上接第 555 页 Continue from page 555)