

外源茉莉酸对大豆中异戊烯黄酮 Glyceollins 及其前体 Glycinol 累积的影响^{*}

乞永艳¹ Arnaud Bovy² Ric de Vos² 唐益雄³

(1. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 2. Plant Research International, P. O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, The Netherlands; 3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 以中黄 13 号大豆种子为材料, 取生长 8 天的健康子叶, 在其表面挖出约 2×2mm 的伤口, 将 50 μ l 不同浓度的茉莉酸溶液和 1mM 的硝酸银溶液滴在伤口处, 黑暗中(25 $^{\circ}$ C)保温不同时间后取样, 经甲醇提取, 用高压液相色谱(HPLC)测定其中异戊烯化异黄酮 glyceollins 及其前体 glycinol 的累积情况。结果显示, 健康子叶中没有 glyceollins 和 glycinol 的累积, 1mM 硝酸银比茉莉酸具有更强的诱导 glyceollins 和 glycinol 累积的能力, glyceollins 的累积与茉莉酸浓度呈负相关。在各种处理中, glyceollin I、II、III 所占比例分别为: 50%~80%、10%~40% 和 10%~20%, 但是 glyceollin 三种异构体的比例随保温时间的延长而有所变化, glyceollin I 比例逐渐下降, glyceollin II 所占比例逐渐升高, 在 1mM 硝酸银处理的子叶中表现更为明显。

关键词 大豆; 子叶; 茉莉酸; Glyceollins; Glycinol; 高压液相色谱

中图分类号 S 565. 101 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)04-0269-06

植物抗毒素(phytoalexins)是植物在遭遇微生物侵染或非生物诱导因子作用时而产生的一类次生代谢物, 是一类低分子量的抗生素^[1]。Glyceollins 是大豆中主要的植物抗毒素, 当大豆在生物(如大雄疫霉或其细胞壁提取物)^[2]或非生物(如 CuSO₄、AgNO₃、HgCl₂、紫外线照射等)激发子作用下会大量累积^[3, 4]。Glyceollins 有 4 种异构体, 其分配比例依器官、组织及诱导因素不同而不同^[5~7]。Glycinol 是 glyceollins 的前体^[8], 当大豆子叶经 CuCl₂、紫外线照射处理时可积累^[9, 10]。研究 glyceollins 及其相关因素的重要意义不仅仅因为它是一种植物抗毒素, 其积累与真菌、细菌、病毒、线虫病以及大豆植食性害虫的抗性有很大关系; 更重要的意义在于它是一种异戊烯化(prenylated)的异黄酮。自然情况下, 异戊烯化(异)黄酮只分布在极少数甚至是亲缘关系很远的植物家族中, 如啤酒花^[11]、白羽扇豆^[12]等植物中。随着对异黄酮生理、生化作用研究的逐渐深入, 异戊烯化(异)黄酮以其更强的抗氧化能力和抗

癌作用正在成为科学家研究的热点^[13, 14]。茉莉酸(Jasmonic acid, JA)是一类高效的植物内源性激素, 在植物中广泛存在并具有广谱的生理效应^[15, 16]。未见关于茉莉酸诱导 glyceollins 产生的报道, 为了更好地研究各类激发子对 glyceollins 产生的影响, 选用茉莉酸处理大豆子叶, 测定其中异戊烯化异黄酮及其前体的变化情况, 并与硝酸银诱导的情况进行对比。

1 材料和方法

1.1 试验材料

大豆选用中黄 13(中作 975), 由中国农业科学院作物品种栽培研究所提供。茉莉酸标样购自美国 Sigma 公司, 溶解在 0.1%乙醇中; 硝酸银购自 Sigma 公司, 溶解在超纯水中; Glycinol、glyceollins(三种异构体的混合物)标准品为 Ebel, J. 教授(De

^{*} 收稿日期: 2005-04-28

项目资助: 荷兰瓦赫宁根大学“交叉研究和教育基金”项目, 项目名称: 植物雌激素-有健康保护作用的植物次生代谢物-植物中黄酮异戊烯转移酶基因的分离。

作者简介: 乞永艳(1970-), 女, 博士研究生, 研究方向生物活性物质及其应用, E-mail: piaoliang-hao@163.com; 电话: 010-82111099, 13911879594, 传真: 010-88871902

partment of Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany) 惠赠, 溶解在 100% 色谱纯甲醇中, 其它试剂均为色谱纯。

1.2 试验方法

1.2.1 植物材料的准备

精选的大豆种子用 0.75% NaClO 消毒处理 10min, 清水冲洗 3 遍, 播种在灭菌的湿润蛭石上,

表 1 试验组别的设置
Table 1 Treatments design

组别 Groups	样品处理 Treatments	文中所用简称 Abbreviations used
1	健康子叶	H
2	子叶表面有伤口, 伤口内不滴加任何溶液	W
3	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 超纯水	W+H ₂ O
4	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 0.1% 乙醇	W+0.1% EtOH
5	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 10 μ M 茉莉酸	W+10 μ M JA
6	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 20 μ M 茉莉酸	W+20 μ M JA
7	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 40 μ M 茉莉酸	W+40 μ M JA
8	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 50 μ M 茉莉酸	W+50 μ M JA
9	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 100 μ M 茉莉酸	W+100 μ M JA
10	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 1mM 茉莉酸	W+1mM JA
11	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 10mM 茉莉酸	W+10mM JA
12	子叶表面有伤口, 伤口内滴入 50 μ l 1mM 硝酸银	W+1mM AgNO ₃

1.2.2 Glyceollins and glycinol 的提取

将 1.2.1 中获得的植物材料在液氮中充分研磨, 按照 0.1g 鲜重加入 1ml 色谱纯甲醇的比例提取, 密闭、避光超声波振荡 15min。8000 rpm 离心 10min, 吸取上清液, 经 0.45 μ m 微孔膜过滤, 转移至 1ml 色谱专用小瓶中封口, 4℃保存待测。

1.2.3 Glyceollins and glycinol 的测定

采用 Waters 600 Controller; Waters 2695 Separations Module; Pharmacia LKB HPLC column Oven 2155, Waters TM 996 型光电二极管系统检测器 (Photodiode Array Detector), Millennium 32 数据处理软件。柱子为 luna 3 μ C18(2) (150' 4.60mm) (美国 Phenomenex 公司); 柱温: 40℃; 采用二元流动相, A 液为 0.1% 三氟乙酸, B 液为 100% 乙腈, 流速为 1 ml/min。梯度洗脱: 20min 内 A 由 95% 降至 75%, 随后 20min 内 A 由 75% 降至 10%, 持续 7min, 最后 7min 内 A 由 10% 升至 95%, 运行时间为 54min, 扫描波长: 240 – 600nm, 检测波长: 280nm, 进样量 10 μ l。样品根据标准品的保留时间定性, 根据标准峰面积定量 (glyceollin 量以 3 个异

于组培间中发芽并生长 8 天 (25℃, 每日 16h 光照)。切下健康的子叶, 在子叶表面挖约 2 \times 2mm 的伤口, 于伤口内分别滴入 50 μ l 不同浓度的 JA 溶液 (见表 1); 25℃黑暗中保温不同时间, 收获后迅速放入液氮冷冻, 贮存于 -70℃备用; 试验重复 2 次, 测定结果取平均值。

构体的总和计)。

2 结果与分析

在高压液相色谱 (HPLC) 谱图上 (图 1) 清晰地分离出了 glyceollins 的三种异构体, 其流出顺序依次为 glyceollin II, II 和 I, 相对应的保留时间分别为 31.112min、31.449min 和 31.609min; glycinol 的保留时间为 16.429min。

2.1 茉莉酸浓度和保温时间对 glyceollins 累积的影响

从图 2 可以看出, 正常健康的子叶在所观察的 48h 内没有检测到 glyceollins, 2 \times 2mm 伤口这一机械损伤刺激了 glyceollins 的累积, 但是在最初的 12h 内没有检测到, 之后逐渐产生, 其浓度随保温时间的延长而升高。Wound+H₂O 与 wound+0.1% EtOH 刺激产生 glyceollins 的情况类似, 均比单纯的伤口刺激更强烈地诱导 glyceollins 的累积。

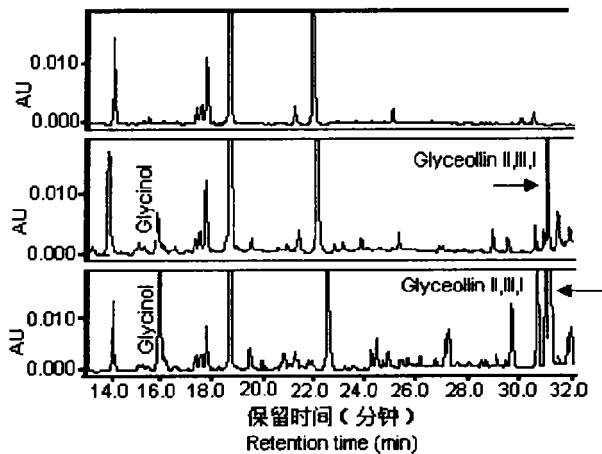


图1 茉莉酸和硝酸银处理的子叶的 HPLC 谱图

A: H(健康子叶); B: W + 1m M AgNO₃; C: W + 10^μM 茉莉酸

Fig. 1 HPLC profiles of cotyledons treated by jasmonic acid and silver nitrate

A: Health cotyledons; B: W + 1m M AgNO₃; C: W + 10^μM jasmonic acid

硝酸银是研究非生物激发子对 glyceollins 累积作用时常用的试剂, 图3的结果显示, 硝酸银的作用明显地强于试验中所使用的几种浓度的茉莉酸。茉莉酸浓度与 glyceollins 的累积呈显著负相关, 在 10^μM ~ 100^μM 范围内, 茉莉酸能够刺激 glyceollins 的累积; 累积浓度从高到低依次是经过下列浓度茉莉酸溶液处理的样品: 10^μM > 20^μM > 40^μM > ≈ 50^μM > 100^μM > 。而当茉莉酸浓度升高为 1mM 和 10mM 时, 可能不但不能刺激 glyceollins 的累积, 反而会加速 glyceollins 的分解, 因为此时 glyceollins 的浓度明显低于对照值。

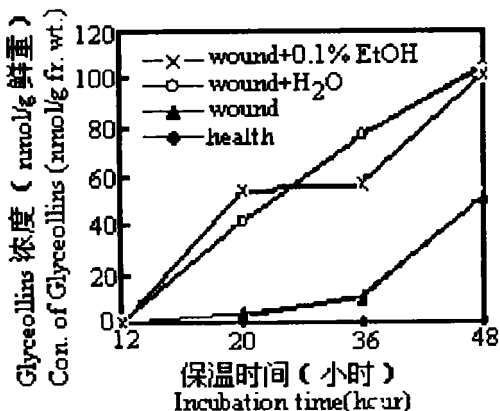


图2 对照样品中 glyceollins 浓度随时间的变化

Fig. 2 Time course of glyceollins in control samples

用茉莉酸处理的样品与对照相同, 在保温的第 12h 时均未检测到 glyceollins, 但是 1mM 硝酸银处理的样品保温第 12h 时 glyceollins 的浓度为 17nmol/g 鲜重, 表明硝酸银能够比茉莉酸更快地诱导 glyceollins 的累积。之后, 10^μM ~ 100^μM 茉莉酸和 1mM 硝酸银处理的样品中 glyceollins 的浓度

随着保温时间的延长而逐渐增加, 但是经硝酸银处理的样品中 glyceollins 浓度增加量明显高于茉莉酸处理的样品。10^μM ~ 100^μM 茉莉酸处理的样品中 glyceollins 浓度在 36h 时达到最大, 之后则随着时间的延长而降低。

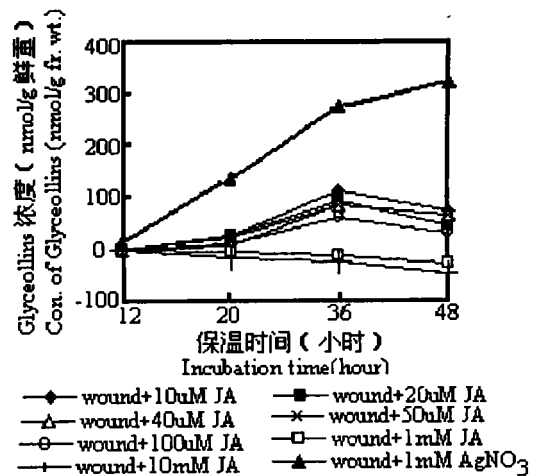


图3 茉莉酸和硝酸银诱导的 glyceollins 的积累

Fig. 3 Accumulation of glyceollins induced by JA and AgNO₃

* 图3中所用的值为各浓度茉莉酸处理值减去其对照(W + 0.1% 乙醇)后的值, 硝酸银处理值减去对照(W + H₂O)后的值。

* The value of glyceollins concentration in control was subtracted from the plotted values. W + 0.1% EtOH is the control of W + JA and W + H₂O is the control of A + AgNO₃.

2.2 茉莉酸浓度和保温时间对 glyceollins 3 种异构体比例的影响

总体来讲, 用茉莉酸或硝酸银处理的子叶中以 glyceollin I 为主(50% ~ 80%), 其次为 glyceollin II (10% ~ 40%), glyceollin III 所占比例最少(10% ~

20%)。随着保温时间的延长, 三种异构体的比例在不断发生变化, 在各种处理中 glyceollin II 随着保温时间的延长所占比例逐渐增加; 除 1mM 硝酸银和 100 μ M 茉莉酸处理的样品中 glyceollin III 所占比例

比较稳定外, 其他处理中 glyceollin III 所占比例随时间延长而降低; 至于 glyceollin I, 各种处理中其所占比例均下降, 尤以 1 mM 硝酸银处理的样品下降最快(表 2)。

表 2 试剂浓度和保温时间对 glyceollins 三种异构体比例的影响(%)

Table 2 Effect of concentrations of jasmonic acid and incubation time on the ratio of 3 glyceollin isomers

不同处理 Treatments	保温时间(小时) Incubation time(hour)		
	20h	36h	48h
	I : II : III	I : II : III	I : II : III
W+H ₂ O	73.5 : 13.5 : 13.1	72.9 : 21.2 : 5.85	63.67 : 20 : 16
W+0.1% EtOH	64.5 : 11.2 : 24.2	70.2 : 20.2 : 9.5	67.7 : 25.5 : 6.86
W+10 μ M JA	70.5 : 16.4 : 13.1	66.56 : 26.87 : 6.56	65.9 : 26.7 : 7.46
W+20 μ M JA	75.0 : 15.5 : 9.5	66.83 : 26.76 : 6.56	57.7 : 33.1 : 9.2
W+40 μ M JA	75.0 : 10.6 : 14.2	70.83 : 21.3 : 7.85	62.2 : 31.6 : 6.2
W+50 μ M JA	68.6 : 16.8 : 14.6	67.86 : 25.02 : 7.789	60.3 : 32.2 : 7.4
W+100 μ M JA	78.7 : 3.8 : 7.5	74.74 : 17.63 : 7.63	52.7 : 37.08 : 10.1
W+1mM JA	81.58 : 7.3 : 11.1	56.08 : 27.45 : 16.46	48.9 : 41.3 : 9.7
W+10mM JA	80.8 : 12.2 : 6.97	65.4 : 22.5 : 12.1	53.3 : 39.7 : 7.0
W+1mM AgNO ₃	73.8 : 20.15 : 6.0	63.81 : 28.96 : 7.22	54.99 : 38.5 : 6.5

2.3 茉莉酸浓度和保温时间对 glycinol 累积的影响

对于健康的和只有伤口而未滴入任何溶液的子叶, 在所观察的 48h 内未检测到 glycinol, 表明健康子叶中未有 glycinol 的累积; 同时, 简单的机械损伤在 48h 内也不会诱导 glycinol 的累积。在其它所有试剂处理的子叶中, 保温 12h 的样品均未检测到 glycinol, 而保温 20h 的样品中都检测到了 glycinol, 表明这些溶液(甚至是 H₂O)的刺激不同程度地诱导了 glycinol 的累积, 且随着保温时间的延长而增加。

与 glyceollins 的累积情况类似, 1mM 硝酸银处理的子叶中 glycinol 比试验中所用的任何浓度的茉莉酸处理的样品中 glycinol 都高, 表明 1mM 硝酸银比它们具有更强的诱导 glycinol 累积的能力。对于不同浓度的茉莉酸而言, glycinol 累积量由高到低依次是经过下列浓度处理的子叶: 40 μ M>20 μ M \approx 50 μ M>1mM>10 μ M。从图 4(以激发子处理样品的峰面积减去各自相应对照的峰面积来比较 glycinol 相对变化趋势)可以看出, 10mM 的茉莉酸溶液抑制了 glycinol 的累积, 其中 glycinol 量明显低于对照(W+0.1% EtOH)。另外, 发现经 10 μ M 这样低浓度的茉莉酸处理的子叶中 glycinol 的量也很低(但是高于对照), 综合分析 glyceollins 和 glycinol 随茉莉酸浓度改变的情况, 我们认为表面看似都很低的 glycinol 的累积原因可能不同。

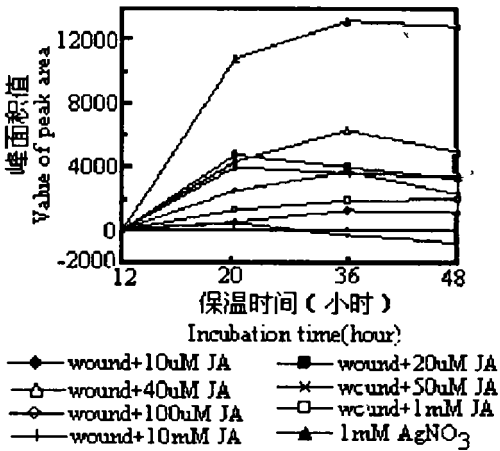


图 4 茉莉酸和硝酸银诱导的 glycinol 的累积
Fig 4 Accumulation of glycinol induced by JA and AgNO₃

3 讨论与结论

3.1 综合分析非生物激发子茉莉酸和硝酸银对 glyceollins 和 glycinol 累积的影响可以看出, 1mM 的硝酸银比试验中所使用的各种浓度的茉莉酸都具有更强、更快的诱导能力, 刺激子叶累积多量的 glyceollins 和 glycinol。

3.2 本试验所用的中黄 13 号大豆健康子叶中没有 glyceollins 和 glycinol 的累积。简单的机械伤口能够刺激植物产生少量的植物抗毒素 glyceollins, 但

是没有检测到 glycinol 在其中的累积。而对于不同浓度外源茉莉酸的刺激, 植物表现出不同的反应。茉莉酸作为植物的信号分子, 是一种植物生长调节物质, 很低的浓度就可以发挥其生理作用, 浓度高了反而会抑制其作用的发挥。因此, 从 glyceollins 累积的结果分析来看也可以证明这一点, 10^{-6} M 茉莉酸处理的子叶中 glyceollins 累积量最高, 在 10^{-6} M ~ 100^{-6} M 范围内, glyceollins 的累积与浓度呈负相关; 当浓度扩大 100 倍 (1 mM) 或 1000 倍 (10 mM) 时, glyceollins 累积甚至低于对照。适当浓度的外源茉莉酸刺激激活了植物的防御反应体系, 导致植物抗毒素的累积, 如 10^{-6} M 茉莉酸处理有可能加速了异戊烯化反应的进行, 使得中间物 glycinol 很少积累, 很快被异戊烯化形成 glyceollins; 而高浓度的茉莉酸本身有可能杀死了植物细胞, 使植物没有机会表现出对外界刺激的反应, 因此, glycinol 和 glyceollins 这些植物抗毒素的浓度就很低, 甚至低于对照处理。

3.3 在试验所观察的 0 ~ 48h 内, glyceollins 和 glycinol 的累积量一直呈现逐渐增加的趋势, 在今后研究中需进一步延长观察时间, 以更加全面地考察大豆子叶对外源茉莉酸刺激的反应。

3.4 大豆子叶中以 glyceollin I 为主, glyceollin II 和 III 所占比例较少。但是, 在受到外源茉莉酸或硝酸银作用时随着保温时间的延长三者的比例逐渐发生变化, 较为明显的是经 1 mM 硝酸银处理的子叶中 glyceollin I 所占比例下降较快, 而 glyceollin II 增加的幅度也较大。说明 glyceollin 几种异构体之间的比例不是固定不变的, 关于影响它们变化的原因也是值得进一步研究和探讨的, 这对于大豆体内异黄酮代谢途径的调控是十分有用的。

参 考 文 献

- 1 Darviall A. G., Albersheim, P. Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants [J]. Ann. Rev. Plant Physiol. 1984, 35: 243 - 275
- 2 Ayers A. R., Ebel J., Finelli F., et al. Host - pathogen interactions IX quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Plant Physiology 1976, 57: 751 - 759
- 3 Bhattacharyya M. K., Ward E. W. B. Temperature - induced susceptibility of soy bean to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycines*: phenylalanine ammonia - lyase and glyceollin in the host; growth and glyceollin I sensitivity of the pathogen [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1987, 31: 407 - 419
- 4 Moesta P., Grisebach H. Effects of biotic and abiotic elicitors on phytoalexon metabolism in soybean [J]. Nature, 1980, 286: 710 - 711.
- 5 Hahn, M. G., Bonhoff, A., Grisebach, H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soy bean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* [J]. Plant Physiology, 1985, 77: 591 - 601.
- 6 Ingham, J. L., Keen, N. T., Mulheirn, L. J., et al. Inducibly - formed isoflavonoids from leaves of soybean [J]. Phytochemistry, 1981, 20: 795 - 798
- 7 Ward E. W. B., Lazarovits G., Unwin C. H., et al. Hypocotyl reactions and glyceollin in soybean inoculated with zoospores of *phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Phytopathology, 1979, 69(9): 951 - 954
- 8 Welle, R., Grisebach, H. Induction of phytoalexin synthesis in soybean; enzymatic cyclization of prenylated pterocarpan to glyceollin isomers [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, 263(1): 191 - 198
- 9 Lyne R. L., Mulheirn L. J. Minor pterocarpinoids of soybean [J]. Tetrahedron letter. 1978: 3127 - 3128
- 10 Weinstein I. I., Hahn M. G., Albersheim P. Host - pathogen interactions XVIII. Isolation and biological activity of glycinol, a pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans [J]. Plant Physiology, 1981, 68: 358 - 363
- 11 Stevens J. F., Ivancic M., Hsu V. L., et al. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus* [J]. Phytochemistry, 1997, 44(8): 1575 - 1585
- 12 Laflamme, P., Khoufi, H., Gulick, P., et al. Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin [J]. Phytochemistry, 1993, 34(1): 147 - 151.
- 13 Miranda C. L., Aponso, G. L. M., Stevens J. F., et. al. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinine reductase in mouse Hepa lc7 cells [J]. Cancer Letters, 2000, 49: 21 - 29
- 14 Miranda, C. L., Stevens J. F., Ivanov, V., et. al. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 3876 - 3884
- 15 Gross D., Parthier B. Novel natural substances acting in plant growth regulation [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 1994, 13: 93 - 114
- 16 Greelman R. A., Mullet J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants; Regulation during development and response to biotic and abiotic stress [C]. Proceedings National Academy Sciences U. S. A., 1995, 92: 4114 - 4119

EFFECTS OF EXOGENOUS JASMONIC ACID ON THE ACCUMULATION OF GLYCEOLLINS AND GLYCINOLLN *GLYCINE MAX* [L.] MERRI.

Qi Yongyan¹ Arnaud Bovy² Ric de Vos² Tang Yixiong³

(1. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081;

2. Plant Research International, P. O. Box 16, 6700 AA, Wageningen, the Netherlands;

3. Biotechnology Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

Abstract Health cotyledons were detached from 8-day-old soybean seedlings (Zhonghuang No. 13). A section of tissue, approximately 2×2mm was cut from the concave surface. 50 μ l jasmonic acid or silver nitrate solution was dripped into the wound and incubation in the dark at 25 °C. Glyceollins and glycinol were extracted by methanol and analyzed by HPLC. The results show that there is no accumulation of glyceollins and glycinol in health cotyledons. Silver nitrate acts much stronger than jasmonic acid to induce the accumulation of glyceollins and glycinol. The accumulation of glyceollins is in inverse proportion to the concentration of jasmonic acid. The percent of 3 glyceollin isomer is 50%~80%, 10%~40% and 10%~20% for glyceollin I, II and III, respectively. During the incubation, the ratio of glyceollin I decreases and that of glyceollin II increases. It can be obviously observed in samples treated by silver nitrate.

Key words *Glycine max* [L.] Merri; Cotyledons; Jasmonic acid; Glyceollins; Glycinol; High press liquid chromatography (HPLC)

成 果 简 介

“高光效大豆品种选育及高光效的光合生理基础”研究成果 2005 年荣获黑龙江省科技进步一等奖。

由黑龙江省农业科学院大豆研究所和中国科学院植物研究所共同完成的“高光效大豆品种选育及高光效的光合生理基础”成果, 2004 年 11 月 19 日通过黑龙江省农委组织的专家组进行的成果鉴定, 认为该项研究是既有育种实用价值, 又有理论意义的创新科研成果, 在国内居领先水平, 在把光合理论与育种实践相结合方面达到国际先进水平。主要研究内容及创新点如下:

1 选育出高光效大豆品种黑农 39、黑农 40、黑农 41, 区域试验结果比对照增产 10.2%–17.5%, 生产试验比对照增产 11.39%–19.10%。在省内外累计推广 126 万公顷, 取得了显著的经济效益和社会效益。

2 在国内率先建立了高光合速率的高产育种体系, 通过对比叶重的间接选择和光合速率的直接测定, 提高了光合效率和产量水平。

3 通过生理、生化和解剖学研究, 发现大豆叶片及荚皮具有类似 C₄ 途径, 提出了光合碳同化酶系活性高效表达促进光能高效转换的生理机制。

4 本项成果共发表 14 篇学术论文, 其中在 SCI 系统中收录 6 篇, 在 CAB 系统中收录 4 篇, 在 SciSearch 中检索到共被引用 20 次。

杜维广 满为群

黑龙江省农业科学院大豆研究所