

## 白桦酯醇对白桦悬浮细胞生长生理的影响

王勃, 姜洋, 詹亚光, 范桂枝\* (东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** 以白桦悬浮细胞为试材, 将 0.1~5.0  $\mu\text{mol/L}$  白桦酯醇添加到培养 7 d 的白桦细胞悬浮培养体系中处理 12 h~14 d, 采用比色法分析白桦悬浮细胞活力、丙二醛和 NO 含量等, 解析白桦酯醇对白桦悬浮细胞生长生理的影响。结果表明, 不同浓度白桦酯醇处理 12 h~14 d, 白桦悬浮细胞鲜重、活力、pH 和电导率与同期对照相比无显著差异, 其最大值分别在处理后 14 d、7 d、14 d 和 12 h; 与同期对照相比, 白桦酯醇处理后白桦悬浮细胞中 MDA 含量、超氧化物歧化酶活性和过氧化物酶活性及其基因表达水平基本呈增加趋势, 在处理 14 d 时达最大值; 除 1.0 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  白桦酯醇处理显著增加了白桦悬浮细胞中 NO 含量外, 其他处理下 NO 和亚硝基硫醇含量与对照相比未产生显著影响。可见 0.1~5.0  $\mu\text{mol/L}$  白桦酯醇对白桦悬浮细胞生长未产生显著影响。

**关键词** 白桦酯醇; 白桦悬浮细胞; 细胞活性; 生长生理

**中图分类号** S718 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2022)10-0001-05

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.10.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Effects of Betulin on Suspension Cell Growth Physiology of *Betula platyphylla*

WANG Bo, JIANG Yang, ZHAN Ya-guang et al (College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract** With birch suspension cells used as testing materials, betulin of 0.1~5.0  $\mu\text{mol/L}$  was added into the culture system of suspension cells of *Betula platyphylla* for culturing 7 d to the treatment which lasted 12 h~14 d. Colorimetric method was applied to analyzing the cell viability, malondialdehyde and NO content of the suspension cells of *Betula platyphylla*, etc., which helped to dissect and analyze the effects of betulin on the growth and physiology of suspension cells of *Betula platyphylla*. The results showed that after treatment with different concentrations of betulin for 12 h to 14 d, there was no significant difference in fresh weight, viability, pH and electrical conductivity of the suspension cells of *Betula platyphylla* compared with the control in the same period, and the maximum values were at 14 d, 7 d, 14 d and 12 h after treatment, respectively. Compared with the control in the same period, the MDA content, superoxide dismutase activity, peroxidase activity and gene expression levels in the suspension cells of *Betula platyphylla* after betulin alcohol treatment basically showed an increasing trend, and reached the maximum value at 14 days of treatment. Except for the treatment of 1.0 and 5.0  $\mu\text{mol/L}$  betulin significantly increased the NO content in the suspension cells of *Betula platyphylla*, the content of NO and nitrosothiol under other treatments had no significant effect compared with the control. It could be seen that 0.1~5.0  $\mu\text{mol/L}$  betulin had no significant effect on the growth of the suspension cells of *Betula platyphylla*.

**Key words** Betulin; Suspension cells of *Betula platyphylla*; Cell viability; Growth physiology

萜类、酚类和含氮化合物等次生代谢物是由生物产生的非细胞生命活动或生物正常生长发育所必需的小分子化合物, 它的合成和分布一般具有种属、组织部位和生长发育时期的特异性<sup>[1]</sup>。植物产生的次生代谢物是其长期适应生存环境中与生物或非生物因素相互作用的结果, 它被人类开发用于食品加工、医药、农药和化工等领域<sup>[2]</sup>。目前对植物次生代谢物生物合成、运输和累积的研究发现, 植物细胞能够产生多样的特异性代谢产物, 并能够将其中一些代谢产物在细胞中积累至极高的浓度, 如在专门的细胞类型中积累, 或者将其螯合在细胞的液泡中<sup>[3-4]</sup>。然而, 植物细胞中产生的次生代谢物对细胞自身的生长和生理等功能有何影响还不清楚。

白桦酯醇为羽扇豆烷型结构的三萜类化合物, 它主要存在于酸枣仁、天门冬、石榴树皮和叶、白桦树皮和叶、罗勒、柿蒂和大枣等植物中, 特别是在白桦树皮中含量高达 132.45~257.11 mg/g<sup>[5]</sup>。东北林业大学森林生物工程实验室建立了产白桦酯醇的白桦悬浮细胞培养体系, 但其含量仅为白桦树皮中的 1% 左右<sup>[6]</sup>。同时研究发现, 真菌诱导子、水杨酸、NO 和多胺等生物或非生物诱导子均可以显著提高白桦悬浮细胞中白桦酯醇等三萜物质的累积, 含量由约 1.0 mg/g 提高到

约 20 mg/g, 同时发现 NO 是介导上述诱导子促进白桦酯醇等三萜物质合成的一种重要信号分子<sup>[7-12]</sup>。因此, 笔者以白桦悬浮细胞作为研究试材, 研究外施白桦酯醇对白桦悬浮细胞生长和生理的影响, 以期解析次生代谢物对细胞自身的生长和生理功能等影响奠定基础。

#### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 白桦悬浮细胞, 白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 组培苗茎段诱导获得白桦愈伤组织, 将愈伤组织接种于 B5 液体培养基中获得白桦悬浮细胞, 每 7 d 继代一次。

#### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料处理。** 试验共设 5 个处理, 即白桦酯醇浓度分别为 0 (对照)、0.1、0.5、1.0、5.0  $\mu\text{mol/L}$ 。供试白桦悬浮细胞在无菌条件下培养 7 d, 向培养基中加入白桦酯醇, 分别处理 12 h、7 d 和 14 d。每个处理使用 3 瓶细胞, 每组中每个处理重复 3 次。

**1.2.2 pH 和电导率测定。** 收集白桦悬浮细胞后置于 50 mL 离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。分别利用 pH 计和电导率仪进行测定。

**1.2.3 细胞活力测定。** 参照氯化三苯四氮唑 (TTC) 法<sup>[13]</sup>, 精确称取 0.20 g 白桦悬浮细胞后, 加入 2.5 mL 磷酸缓冲液和 2.5 mL 0.4% TTC 后室温暗处理 14 h, 去上清后用 5 mL 蒸馏水清洗细胞 3 次, 去上清, 加入 5 mL 95% 乙醇脱色处理, 冷却后于 485 nm 处测定吸光度。

**1.2.4 丙二醛 (MDA) 含量测定。** 参照《植物生理生化实验原理和技术》<sup>[14]</sup> 中试验方法, 精确称取 2.00 g 白桦悬浮细胞

**基金项目** 黑龙江省自然科学基金项目 (C2016005); 国家自然科学基金面上项目 (32171829)。

**作者简介** 王勃 (1995—), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 研究方向: 森林生物工程。\* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事植物细胞工程相关研究。

**收稿日期** 2021-11-16

后,加入 5 mL 蒸馏水研磨。将 5 mL 0.5 mol/L 硫代巴比妥酸 (TBA) 溶液和待测研磨液置于 10 mL 离心管中,沸水浴 10 min,冷却后 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。分别测定 450、532 和 600 nm 处吸光度,根据公式计算白桦悬浮细胞中 MDA 含量:MDA 含量= $[6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}] \times$  提取液体积/(测定液体积 $\times$ 鲜重)。

**1.2.5 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性测定及基因表达。**

**1.2.5.1 酶粗提取液的制备。**参照刘英甜等<sup>[11]</sup>试验方法,精确称取 1.00 g 白桦悬浮细胞于预冷研钵中,加入 4 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)及少量交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)充分研磨,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液为酶粗提液。

**1.2.5.2 SOD 活性测定。**将 0.3 mL 酶粗提液和 0.3 mL 提取液分别加入测定管和对照管中,同时分别加入 1.5 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)、0.3 mL 130 mmol/L 蛋氨酸(现用现配)、0.3 mL 750 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝(现用现配)、0.3 mL 100  $\mu$ mol/L 乙二胺四乙酸二钠和 0.3 mL 20  $\mu$ mol/L 核黄素。反应 20 min,将对照组置于黑暗中,试验组于自然光下,反应 20 min 后测定 560 nm 处吸光度。

**1.2.5.3 POD 活性测定。**将 0.5 mL 酶粗提液、3.9 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)、1.0 mL 2% 过氧化氢溶液、20  $\mu$ L 0.05 mol/L 愈创木酚混合均匀后立即测定 470 nm 处吸光度,1 min 后再次测定 470 nm 处吸光度。

**1.2.5.4 基因表达分析。**采用北京全式金生物技术有限公司 qPCR SuperMix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR,对 *SOD*、*POD* 基因表达量进行分析。基因表达量的计算方法参照 Livak 等<sup>[15]</sup>方法,以白桦内参基因 *TU* 为内标参照,目的基因的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta CT}$ <sup>[15]</sup> 来表示。*BpSOD* 上下游引物分别为 F: ACAGTCAGGGTGTCTCAGTGGGA 和 R: CAGCAGGATTGAAATGTGGC;*BpPOD* 上下游引物分别为 F: AGGAACTTAGGCACATCG 和 R: AGATGCTCTCATGTGGTC。

**1.2.6 NO 含量测定。**NO 含量采用 NO 试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)进行测定。利用 Griess 法检测细胞中 NO 含量,将白桦悬浮细胞培养液 4 ℃ 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,分别在空白管和测定管中加入提取液和样品 400  $\mu$ L 后,加入试剂混匀,室温静置 15 min 后在 550 nm 下测定吸光度。

**1.2.7 亚硝基硫醇(SNO)含量测定。**参照黄雅婷等<sup>[16]</sup>方法,精确称取 4.00 g 白桦悬浮细胞置于预冷研钵中,加入 6 mL 0.1 mol/L pH 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液,充分研磨后,4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min,分别取 2 mL 上清液于 2 个离心管中,试验组加 1 mL 试剂 III 40 ℃ 水浴避光反应 5 min;对照组加入 1 mL 试剂 I 40 ℃ 水浴避光反应 5 min,试验组和对照组再同时加入 1 mL 试剂 II 40 ℃ 水浴避光反应 5 min,测定 540 nm 处吸光度。

## 2 结果与分析

**2.1 白桦酯醇对白桦悬浮细胞生长的影响** 将 0.1、0.5、1.0

和 5.0  $\mu$ mol/L 白桦酯醇分别添加到培养 7 d 的白桦悬浮培养体系中处理 12 h、7 d 和 14 d,其外观表型如图 1 所示,白桦悬浮细胞的颜色随着培养时间的增加由浅绿色变为翠绿色最后变为浅黄色,其固液比例也基本相同;TTC 法分析白桦悬浮细胞活力如图 2 所示,不同浓度的白桦酯醇处理与同期对照基本相同且无显著差异,在处理的第 7 天时细胞活力达最大值,为 1.64~1.69;白桦悬浮细胞的鲜重随着处理时间的增加呈现增加趋势,在处理的第 14 天时达最大值,为 38.8~40.1;不同浓度的白桦酯醇处理与对照之间鲜重无显著差异(图 3)。

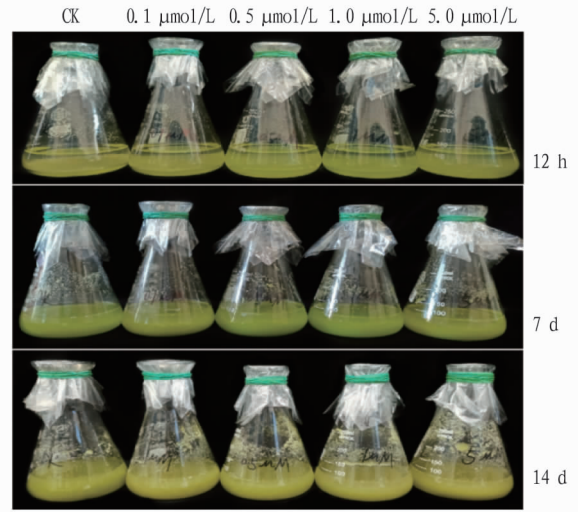
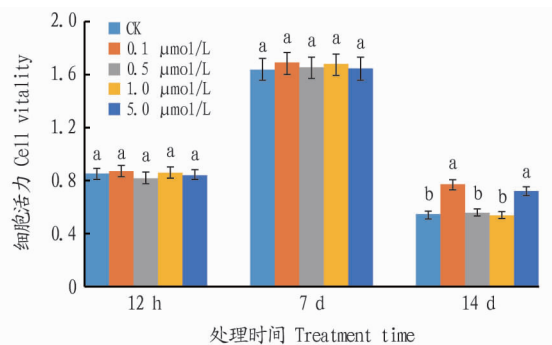


图 1 白桦酯醇对白桦悬浮细胞形态的影响

Fig.1 Effect of betulin on the morphology of suspension cell of *B. platyphylla*



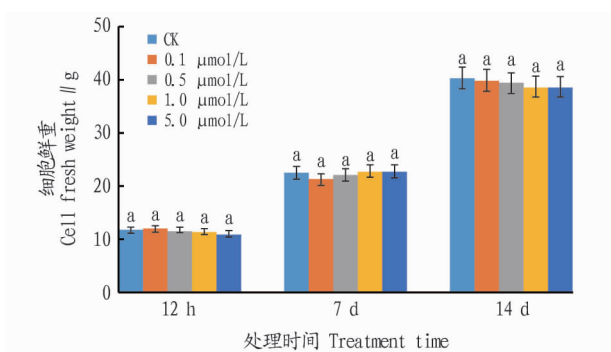
注:不同小写字母表示同一处理时间不同浓度间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same treatment time ( $P < 0.05$ )

图 2 白桦酯醇对白桦悬浮细胞活力的影响

Fig.2 Effect of betulin on the viability of suspension cell of *B. platyphylla*

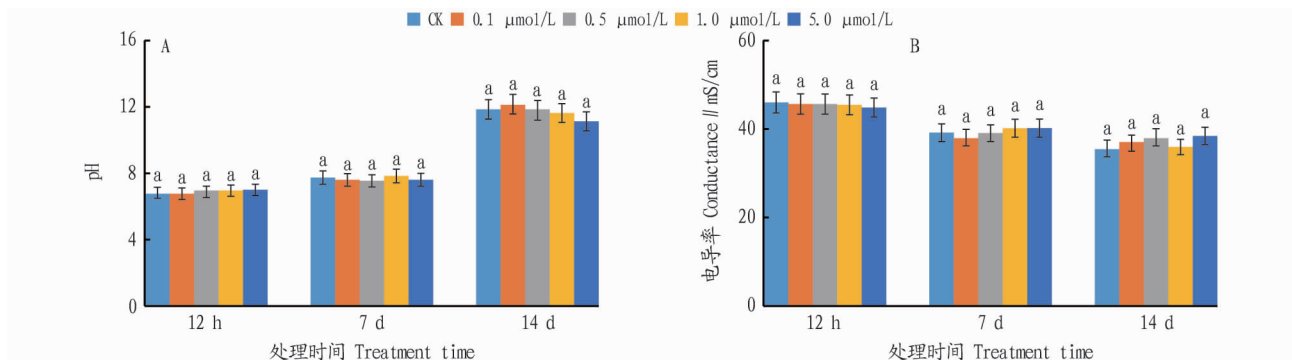
**2.2 白桦酯醇对白桦悬浮细胞培养液 pH 和电导率的影响** 从不同浓度的白桦酯醇处理后白桦悬浮细胞培养液 pH 变化(图 4A)可以看出,随着处理时间的延长 pH 呈增加趋势,在处理的第 14 天达最大值,为 11.1~12.1,同期处理与对照之间无显著差异;如图 4B 所示,电导率随着白桦酯醇处理时间的延长呈现降低趋势,在白桦酯醇处理的第 14 天达最小值,为 35.2~38.1,同期处理与对照之间也无显著差异。上



注:不同小写字母表示同一处理时间不同浓度间差异显著( $P<0.05$ )  
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same treatment time ( $P<0.05$ )

图3 白桦酯醇对白桦悬浮细胞鲜重的影响

Fig.3 Effect of betulin on the fresh weigh of suspension cell of *B.platyphylla*

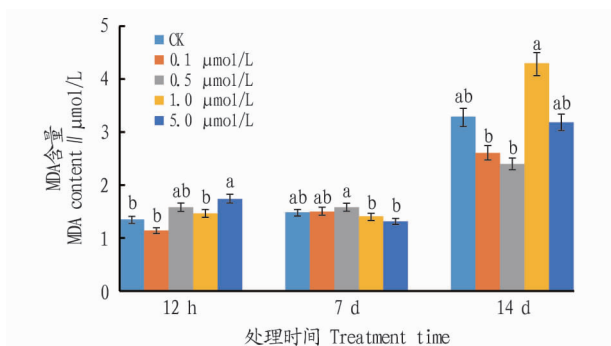


注:不同小写字母表示同一处理时间不同浓度间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same treatment time ( $P<0.05$ )

图4 白桦酯醇对白桦悬浮细胞培养液 pH(A) 和电导率(B) 的影响

Fig.4 Effects of betulin on pH (A) and conductivity (B) of cell culture medium of *B.platyphylla*



注:不同小写字母表示同一处理时间不同浓度间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same treatment time ( $P<0.05$ )

图5 白桦酯醇对白桦悬浮细胞中 MDA 含量的影响

Fig.5 Effect of betulin on MDA content of suspension cell of *B. platyphylla*

## 2.5 白桦酯醇处理对白桦悬浮细胞中 NO 和 SNO 含量的影响

从不同浓度白桦酯醇处理白桦悬浮细胞 7 d 后细胞培养液中 NO 含量(图 7A)可以看出,0.1 和 0.5  $\mu\text{mol/L}$  白桦酯醇处理下 NO 含量与同期对照相比无显著差异,1.0 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$

述结果表明白桦酯醇对细胞培养液 pH 和电导率未产生影响。

## 2.3 白桦酯醇对白桦悬浮细胞中 MDA 含量的影响

TBA 法分析白桦悬浮细胞中 MDA 含量结果如图 5 所示,不同浓度的白桦酯醇处理 14 d 时,白桦悬浮细胞中 MDA 含量平均比处理 12 h 和 7 d 时分别高出 104.25% 和 103.19%。

## 2.4 白桦酯醇对 SOD 和 POD 活性及其基因表达的影响

从图 6 可以看出,不同浓度的白桦酯醇处理下白桦悬浮细胞中 SOD 活性及其基因表达基本呈现增加趋势,其中处理 14 d 时白桦悬浮细胞中 SOD 活性及其基因表达平均比处理 12 h 分别增加了 148.29%、352.19%。不同浓度的白桦酯醇处理下白桦悬浮细胞中 POD 活性及其基因表达变化趋势与 SOD 基本相似,但变化幅度不同;白桦酯醇处理 14 d 时白桦悬浮细胞中 POD 活性及其基因表达平均比处理 12 h 分别增加了 136.25% 和 393.96%。

白桦酯醇处理下 NO 含量显著增加,分别比同期对照增加了 159.87% 和 178.95%。SNO 是 NO 与含巯基的硫醇结合形成的,生物体内 SNO 含量很大程度上代表着体内结合态 NO 含量。不同浓度白桦酯醇处理下白桦悬浮细胞中 SNO 含量无显著差异(图 7B)。

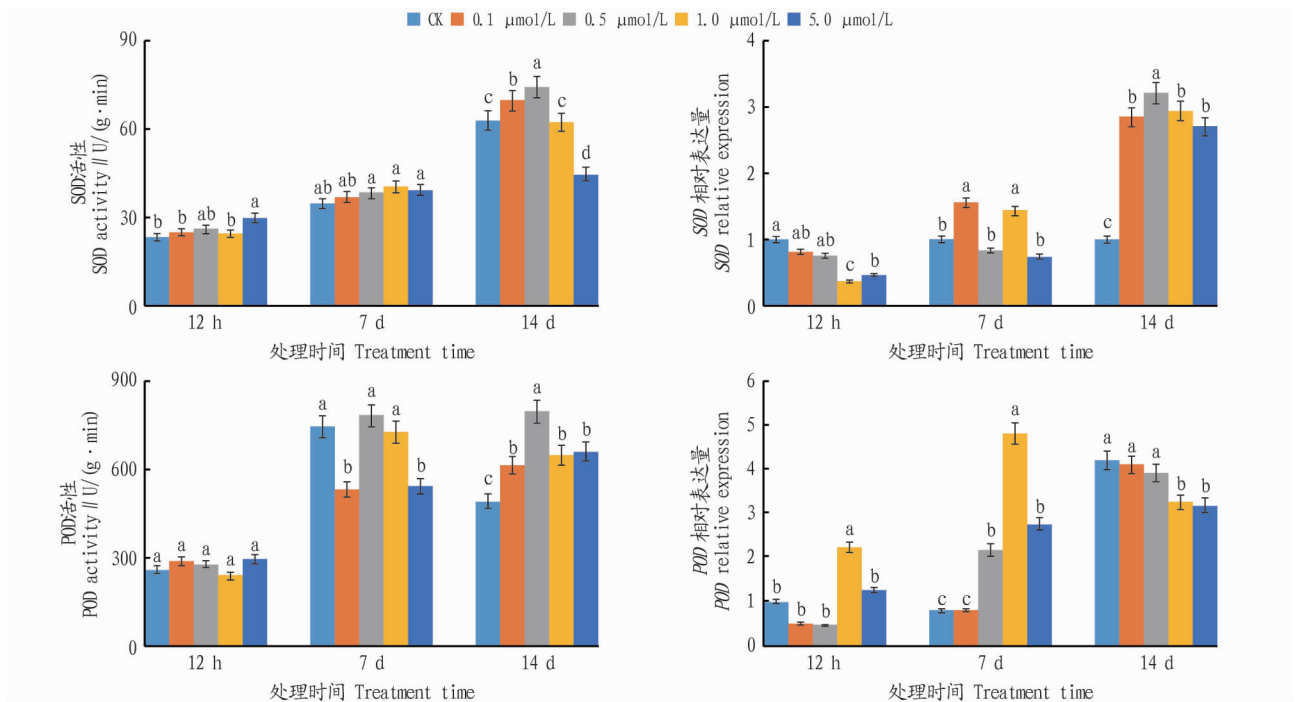
## 3 讨论与结论

次生代谢物是植物长期适应生态环境的结果,在植物受到外界刺激引起过敏反应时,次生代谢物会累积增强自身抵抗力。此外,它还可以影响自身或邻近植物的生长发育<sup>[17]</sup>,如人参皂苷粗提液对西洋参早期生长产生抑制作用;鼠尾草叶片中的挥发性萜类物质会导致黄瓜根尖细胞中脂质小体的积累、线粒体等细胞器数目下降以及细胞器外膜的破裂;倍半萜内酯混合物银胶菊碱在低浓度下抑制其幼苗的生长<sup>[18-20]</sup>。但是次生代谢物影响自身或邻近植物生长发育的机制还未完全揭示,尤其从细胞水平上。

白桦酯醇室温下微溶于水,易溶于乙醇等有机溶剂<sup>[21]</sup>。白桦悬浮培养液不同于普通自来水,它里面不仅添加细胞生长所需营养成分,还有细胞自身培养过程中分泌或代谢的一些物质。为了确定白桦酯醇的最大溶解浓度,该研究通过向

培养第7天的白桦悬浮细胞培养液中不断添加白桦酯醇,以能溶解且培养1 d后不再析出为标准,确定其最大溶解浓度为 $5.0\ \mu\text{mol/L}$ 。因此,该研究将 $0.1\sim 5.0\ \mu\text{mol/L}$ 白桦酯醇分

别添加到培养7 d的白桦悬浮细胞培养体系中解析其对白桦悬浮细胞生长生理的影响。

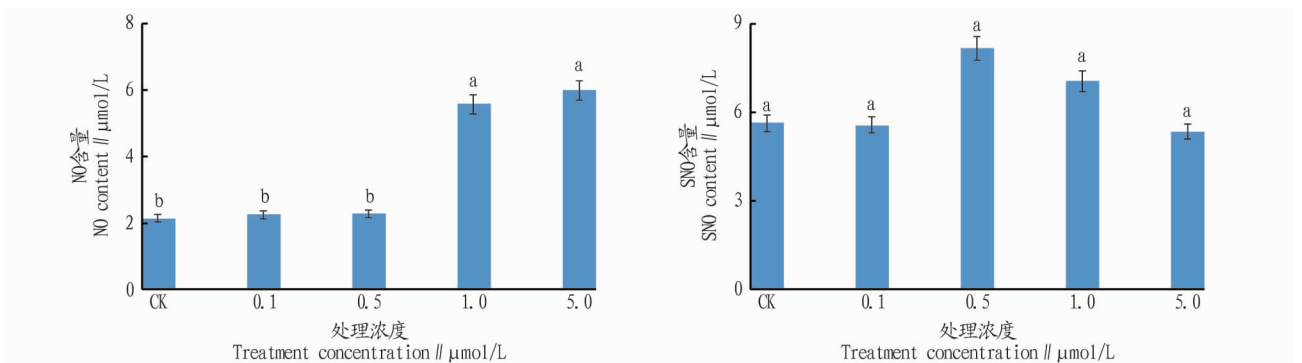


注:不同小写字母表示同一处理时间不同浓度间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same treatment time ( $P < 0.05$ )

图6 白桦酯醇对SOD和POD活性及其基因表达的影响

Fig.6 Effects of betulin on the activity and gene expression of SOD and POD



注:不同小写字母表示同一处理时间不同浓度间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations at the same treatment time ( $P < 0.05$ )

图7 不同浓度白桦酯醇对白桦悬浮细胞中NO(A)和SNO(B)含量的影响

Fig.7 Effects of betulin on contents of NO (A) and SNO(B) in suspension cells of *B.platyphylla*

范桂枝等<sup>[22]</sup>研究发现,在1个培养周期内(24 d),白桦悬浮细胞培养过程中三萜的产量与细胞生物量是相耦合的,随着生物量的增加三萜产量呈增长趋势。白桦悬浮细胞在第12天比生长速率达到最高,三萜合成速率和比合成速率在第9天达到最高值。鉴于此,该试验将白桦酯醇添加时间选在其累积高峰前期添加。研究发现, $0.1\sim 5.0\ \mu\text{mol/L}$ 白桦酯醇处理12 h~14 d,白桦悬浮细胞的外观颜色、细胞活力和鲜重以及培养液的pH和电导率与同期对照相比均无显著差异。由此推断, $0.1\sim 5.0\ \mu\text{mol/L}$ 白桦酯醇对白桦悬浮细胞的生长不产生影响。

在正常生长发育和应激条件下,活性氧(ROS)均会在植物细胞的线粒体和叶绿体等细胞器中产生<sup>[23-24]</sup>,ROS包括单线态氧( $^1\text{O}_2$ )、超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )。过量的ROS对细胞有很强的毒害作用,它会打破细胞内氧化还原平衡;而适量的ROS对植物生长代谢是有利的,可作为关键信号分子激活第二信使、转录因子和改变酶活性来调控植物的生长发育<sup>[25-26]</sup>。SOD能够催化 $\text{O}_2^-$ 歧化生成 $\text{O}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,POD将 $\text{H}_2\text{O}_2$ 还原为 $\text{H}_2\text{O}$ ,二者均是植物体内的保护酶;MDA是膜质过氧化的最终分解产物,其含量可以反映植物受伤害的程度<sup>[27-28]</sup>。该试验考察白桦

酯醇处理下上述指标发现,白桦酯醇处理下 MDA 含量、SOD 和 POD 活性及其基因表达水平基本呈增加趋势,且与同期对照相比存在显著差异。由此可见,白桦酯醇对白桦悬浮细胞中 ROS 水平产生了影响。由于白桦酯醇添加后 SOD 等活性增加,可以推断白桦酯醇可以提高白桦悬浮细胞的抗氧化能力,并且它对白桦悬浮细胞活力未产生负面影响。

NO 是植物体内具有信号转导作用和生物活性的分子,同时 NO 可以改变次生代谢途径中催化酶的活力或者活化次生代谢途径中特定酶基因,从而提高次生代谢物产量。如 NO 促进了黄芩苷、金丝桃素和葛根素在悬浮细胞中的积累<sup>[29-31]</sup>。同样,东北林业大学森林生物工程实验室前期也证实 NO 可以促进白桦酯醇等三萜的合成<sup>[32]</sup>。该研究发现,低浓度的白桦酯醇对 NO 未产生显著影响,高浓度的白桦酯醇显著提高了 NO 含量。考察 NO 在植物体内的次级产物 SNO 发现,白桦酯醇对 SNO 产生影响不显著。综上推断,白桦酯醇可以改变白桦悬浮细胞中 NO 的累积,其促进效应存在浓度关系,而 SNO 未随之增加还需进一步探究。

### 参考文献

- [1] MRID R B, BENMRID B, HAFSA J, et al. Secondary metabolites as biostimulant and bioprotectant agents: A review [J/OL]. Science of the total environment, 2021, 777 (1) [2021-04-25]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146204>.
- [2] RAMAKRISHNA A, RAVISHANKAR G A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants [J]. Plant signaling behavior, 2011, 6 (11): 1720-1731.
- [3] SHITAN N, YAZAKI K. Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2020, 1862 (12): 1-10.
- [4] DE BRITO FRANCISCO R, MARTINOIA E. The vacuolar transportome of plant specialized metabolites [J]. Plant cell physiology, 2018, 59 (7): 1326-1336.
- [5] 范桂枝, 詹亚光. 白桦酯醇的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39 (10): 1591-1594.
- [6] 尹静, 詹亚光, 李新宇, 等. 不同树龄白桦的不同器官及其组培苗诱导的愈伤组织中白桦酯醇和齐墩果酸的分布和含量变化 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45 (6): 610-614.
- [7] 菅端. NO 介导白桦三萜合成的蛋白质巯基亚硝基化初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- [8] 李春晓. MEJA 和 SA 对白桦幼树三萜合成调控及 FPS 基因克隆 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- [9] 刘英甜, 王晓东, 周文洋, 等. 多胺介导真菌诱导子促进白桦三萜积累的初步研究 [J]. 中草药, 2014, 45 (5): 695-700.
- [10] 李晓灿, 詹亚光, 王晓东, 等. 多胺对白桦悬浮细胞生长和三萜积累的影响 [J]. 中草药, 2013, 44 (4): 463-467.
- [11] 刘英甜, 周文洋, 孙菲菲, 等. 腐胺对白桦悬浮细胞蔗糖代谢和三萜积累影响的初步研究 [J]. 中草药, 2014, 45 (17): 2534-2540.
- [12] 王紫晴, 李飞洁, 郭玉婷, 等. 硫化氢对白桦悬浮细胞中多胺和次生代谢物积累的影响 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2017, 41 (6): 26-32.
- [13] 孙美玲, 李晓灿, 王晓东, 等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导真菌诱导子促进白桦酯醇积累 [J]. 林业科学, 2013, 49 (7): 57-61.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  [J]. Methods, 2001, 25 (4): 402-408.
- [16] 黄雅婷, 菅端, 詹亚光, 等. 白桦悬浮细胞 S-亚硝基硫醇比色和荧光测定方法的初步优化 [J]. 植物生理学报, 2016, 52 (7): 1110-1116.
- [17] FERNANDEZ C, MONNIER Y, SANTONJA M, et al. The impact of competition and allelopathy on the trade-off between plant defense and growth in two contrasting tree species [J]. Frontiers in plant science, 2016, 7: 1-14.
- [18] 张秋菊, 张爱华, 雷锋杰, 等. 人参皂苷粗提液对西洋参早期生长的化感效应 [J]. 西北植物学报, 2011, 31 (3): 576-582.
- [19] 张秋菊, 张爱华, 孙晶波, 等. 植物体中萜类物质化感作用的研究进展 [J]. 生态环境学报, 2012, 21 (1): 187-193.
- [20] PICMAN J P, PICMAN A K. Autotoxicity in *Parthenium hysterophorus* and its possible role in control of germination [J]. Biochemical systematics and ecology, 1984, 12 (3): 287-292.
- [21] MOODLEY K, RAREY J, RAMJUGERNATH D, et al. Experimental solubility for betulin and estrone in various solvents within the temperature range  $T = (293.2 \text{ to } 328.2) \text{ K}$  [J]. Journal of chemical thermodynamics, 2016, 98: 42-50.
- [22] 范桂枝, 翟俏丽, 于海娣, 等. 白桦细胞悬浮培养产三萜及其营养成分消耗的动态 [J]. 林业科学, 2011, 47 (1): 62-67.
- [23] BLOKHINA O, FAGERSTEDT K V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: Origin and redundant regulatory systems [J]. Physiologia plantarum, 2010, 138 (4): 447-462.
- [24] SPEIJER D, HAMMOND M, LUKE S J. Comparing early eukaryotic integration of mitochondria and chloroplasts in the light of internal ROS challenges: Timing is of the essence [J]. mBio, 2020, 11 (3): e00955-e00920.
- [25] FAROOQ M A, NIAZI A K, AKHTAR J, et al. Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses [J]. Plant physiology and biochemistry, 2019, 141: 353-369.
- [26] CONSIDINE M J, FOYER C H. Stress effects on the reactive oxygen species (ROS)-dependent regulation of plant growth and development [J]. Journal of experimental botany, 2021, 72 (16): 5795-5806.
- [27] 陈娇, 袁德保, 谭琳, 等. NO 处理对采后芒果抗氧化酶系统的影响 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (26): 9164-9166.
- [28] 王超, 侍福梅. 活性氧与一氧化氮在逆境胁迫下的相互关系 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (5): 1903-1904, 1908.
- [29] 徐茂军, 董菊芳, 朱睦元. NO 通过水杨酸 (SA) 或者茉莉酸 (JA) 信号途径介导真菌诱导子对粉葛悬浮细胞中葛根素生物合成的促进作用 [J]. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2006, 36 (1): 66-75.
- [30] 徐茂军, 董菊芳, 张新波. NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在介导热激诱导发金丝桃细胞合成金丝桃素中的信号互作 [J]. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2008, 38 (7): 643-653.
- [31] 张进杰, 徐茂军. NO 和茉莉酸甲酯对黄芩悬浮细胞生长及黄芩苷合成的影响 [J]. 植物学通报, 2006, 23 (4): 374-379.
- [32] 刘莹. 外源 NO 对白桦 (*Betula platyphylla*) 悬浮细胞三萜合成信号调控机制 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.