

SNP 与 K^+ 、 Ca^{2+} 互作促进白桦悬浮细胞中 白桦酯醇累积的初步研究

黄雅婷, 詹亚光, 马明媚, 范桂枝*

(东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: [目的] 探究一氧化氮供体硝普钠(SNP)对白桦悬浮细胞中 K^+ 、 Ca^{2+} 和白桦酯醇累积的影响及外源 K^+ 、 Ca^{2+} 与 SNP 互作对白桦酯醇累积的影响。[方法] 利用高效液相色谱法、原子吸收光谱法及比色法分别测定白桦酯醇、 K^+ 及 Ca^{2+} 含量。[结果] SNP 处理对白桦悬浮细胞中 K^+ 、 Ca^{2+} 的累积存在浓度和时间效应, 其中 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理 12 h 时 K^+ 含量最高, 是对照组的 1.47 倍, 而 Ca^{2+} 含量在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理 96 h 时最高, 是对照组的 1.50 倍。 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 与不同浓度 KCl 共同处理后, 白桦酯醇含量高于单独 SNP 与 KCl 处理, 其中, SNP 与 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 共同处理时, 白桦酯醇的积累量最大, 是单独 SNP 处理 1.72 倍, 是单独 KCl 处理 2.33 倍。 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 与不同浓度 CaCl_2 互作处理后, 白桦酯醇含量高于单独 SNP 与 CaCl_2 处理, 其中, SNP 与 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 共同处理时, 白桦酯醇的积累量最大, 是单独 SNP 处理 2.75 倍, 是单独 CaCl_2 处理 2.18 倍。[结论] SNP 处理诱导了白桦悬浮细胞中 K^+ 和 Ca^{2+} 的合成和白桦酯醇的累积, SNP 分别与 K^+ 或 Ca^{2+} 互作可以更好的促进白桦悬浮细胞中白桦酯醇的累积, 同时推测 SNP 诱导的 K^+ 、 Ca^{2+} 在一定程度上介导了白桦酯醇的累积。

关键词: 白桦悬浮细胞; 白桦酯醇; 硝普钠; 钾; 钙

中图分类号: S792.153

文献标识码: A

Synthesis of Betulin in Suspension Cells of Birch Induced by Interactions of Sodium Nitroprusside (SNP) and K^+ or Ca^{2+}

HUANG Ya-ting, ZHAN Ya-guang, MA Ming-mei, FAN Gui-zhi

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To clarify the effect of sodium nitroprusside (SNP) on content of K^+ and Ca^{2+} and synthesis of betulin in suspension cells of birch and whether accumulation of betulin was induced by the interactions of SNP and K^+ or Ca^{2+} . [Methods] The content changes of betulin, K^+ and Ca^{2+} were analyzed by HPLC, atomic absorption spectroscopy and chemical colorimetry, respectively. [Results] The contents of K^+ and Ca^{2+} and synthesis of betulin were influenced by the treatment concentration and time of SNP. The highest contents of K^+ and Ca^{2+} were 1.47 and 1.50 times that of the control after adding $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP for 12 hours and $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP for 96 hours, respectively. The synthesis of betulin after adding $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP with different concentrations of KCl was higher than that treated by SNP and KCl alone. The highest content of betulin was 1.72 and 2.33 times that of the contents of SNP and KCl alone when treated by SNP with $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl. The synthesis of betulin after adding $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP with different concentrations of CaCl_2 was higher than that treated by SNP and CaCl_2 alone. The highest content of betulin was 2.75 and 2.18 times that of SNP and CaCl_2 alone when treated by SNP with $0.1 \text{ g} \cdot$

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070531)。

作者简介: 黄雅婷, 硕士在读, 主要研究方向: 细胞工程, 电话: 18804503623 E-mail: 18804503623@163.com。

* 通讯作者: 范桂枝, 副教授, 博士, 主要研究方向: 生物工程, 电话: 13115308699. E-mail: gz325@126.com

L⁻¹ CaCl₂. [Conclusion] SNP promoted the contents of K⁺ and Ca²⁺ and synthesis of betulin in suspension cells of birch and the synthesis of betulin was better when treated by interactions of SNP and K⁺ or Ca²⁺. It is surmised that K⁺ and Ca²⁺ mediated the synthesis of betulin in suspension cells of birch induced by SNP.

Keywords: suspension cells of birch; Betulin; sodium nitroprusside (SNP); potassium; calcium

白桦酯醇(Betulin)为羽扇豆烷型结构的五环三萜类化合物,其分子式为R = CH₂OH。近年来的研究表明,白桦酯醇具有抗肿瘤、降脂、利胆和保肝等作用^[1-2],同时因其在抗肿瘤和抗HIV等方面具有靶向作用性更强、几乎无不良反应等特点^[3-4],有望成为本世纪新型药物之一。因此,对白桦酯醇的深入研究,尤其是如何提高其质量和数量上的研究具有重要意义。

以细胞全能性为基础建立起来的植物细胞培养技术为植物有用物质的生产提供了一条新途径,而利用诱导子诱导植物培养细胞以促使细胞快速、大量合成有用次生物质为提高有用物质产量提供了一种新手段。为此,本研究室建立了白桦的快繁体系和悬浮培养体系,并筛选到了高产白桦酯醇的细胞系^[5-6],同时发现真菌诱导子、腐胺、过氧化氢、水杨酸、一氧化氮等均可以促进白桦悬浮细胞中白桦酯醇等三萜类物质的合成^[7-12]。

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是一种亲脂性的不稳定小分子,在动植物的多种生理活动中发挥着重要作用^[13-16]。近来的研究表明,NO可调控次生代谢产物的积累,在信号调控网络中起潜在的分子开关作用,并对NO调控次生代谢物合成的信号机理有了较深入的了解^[17]。NO作为诱导子除了调控信号网络外,还通过哪种形式调控次生代谢物的合成还不清楚。为此,本实验以产白桦酯醇的悬浮细胞系为实验材料,通过外源添加NO供体硝普钠(SNP)分析白桦悬浮培养体系中K⁺和Ca²⁺含量和白桦酯醇的累积量,同时分析SNP与K⁺或Ca²⁺互作对白桦酯醇积累的影响,试图从钾、钙营养生理方面揭示NO刺激次生代谢物合成的机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)母树为东北林业大学白桦强化种子园5~7年生嫁接优树(接穗30年生),由詹亚光教授(东北林业大学生命科学学院)鉴定,取白桦母树产生的组培苗的茎诱导白桦愈伤组织。

白桦酯醇含量采用Waters公司的高效液相色谱仪分析,AA800型原子吸收光谱仪及UV—2800紫外分光光度计分别测定K⁺及Ca²⁺含量, HY—6A双层振荡器培养白桦悬浮细胞。硝普钠及白桦酯醇标品分别购自Sigma试剂公司及北京世纪奥科生物技术有限公司,钙试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 白桦悬浮细胞培养 将白桦愈伤组织接种于B₅液体培养基中,附加0.1 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.01 mg·L⁻¹ TDZ,蔗糖浓度为20 g·L⁻¹, pH为5.5~6.0。100 mL摇瓶中盛有50 mL培养液,每瓶接种鲜质量6 g的愈伤组织,每隔7 d继代1次,培养温度为25~27℃,光照强度为2 000 lx,光照16 h·d⁻¹,摇床转速为130 r·min⁻¹。

1.2.2 硝普钠(SNP)处理 将SNP溶液添加到培养8 d的白桦悬浮培养体系中,使SNP终浓度分别为0.1、1和5 mmol·L⁻¹,对照组加入等体积无菌水。SNP处理6、12、24、48和96 h后取样测定K⁺和Ca²⁺含量,每个处理样品3次重复。

1.2.3 SNP分别与KCl、CaCl₂处理 将SNP、KCl、SNP与KCl、CaCl₂、SNP与CaCl₂溶液分别添加到培养8 d的白桦悬浮培养体系中,处理12 h后取样测定白桦酯醇含量,其中SNP终浓度为1 mmol·L⁻¹, K⁺终浓度分别为0.1、0.5、1和5 g·L⁻¹, Ca²⁺终浓度分别为0.05、0.1、0.2和0.6 g·L⁻¹,对照组加入等体积无菌水,每个处理样品3次重复。

1.2.4 白桦酯醇的提取与测定 利用回流法提取白桦酯醇:准确称取0.5 g白桦悬浮细胞烘干样品(每个处理样品重复测定3次),加入盐酸-无水乙醇溶液(配比为1:4)25 mL及少量沸石混匀,90℃水浴回流3 h,冷却过滤后加入20 mL蒸馏水,80℃水浴蒸去乙醇。冷却后,用20 mL乙醚分别萃取三次,合并上清提取液,40℃水浴蒸干,再用1 mL甲醇溶液复融,最后用0.22 μm有机滤膜过滤,作为供试样品。

白桦酯醇含量测定采用高效液相色谱法:检测条件:HiQ sil C18V 4.6 mm×250 mm色谱柱;灵敏

度 16AUFS; 流动相乙腈体积与水体积比 9:1; 柱温 25℃; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 进样体积 20 μL; 检测波长 210 nm。白桦酯醇保留时间合适、峰形好且与其他组分完全分离(见图 1 白桦酯醇标品及检测样品液相图), 适合用于定量分析。

以白桦酯醇为标品作标准曲线, 以质量浓度 (Y) 为纵坐标, 吸光值 (A) 为横坐标, 得回归方程 $Y = 0.000\ 000\ 3X + 0.003$ ($R^2 = 0.999\ 6$), 在 2.0 ~ 8.0 g · L⁻¹ 范围内具有良好的线性关系。

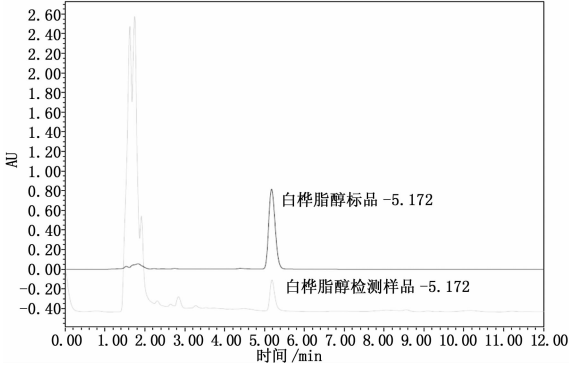


图 1 白桦酯醇标品及白桦酯醇检测样品色谱

1.2.5 K⁺ 含量的测定 样品制备及测定^[18-19]: 称取 0.2 g 烘干至恒质量的白桦悬浮细胞样品, 加入 5 mL 硝酸、1 mL 过氧化氢, 加盖密封后置于微波消解仪内, 按照陈伟华等^[18] 消解程序进行消解, 消解完毕且温度降低至 60℃ 后, 将消解液移入 50 mL 容量瓶并定容。采用火焰分光光度计(原子吸收光谱)测定 K⁺ 含量。

1.2.6 Ca²⁺ 含量的测定 Ca²⁺ 含量采用南京建成有限公司生产的试剂盒进行测定。测定原理为 Ca²⁺ 在碱性溶液中与甲基百里香酚蓝(MTB)结合, 生成蓝色络合物, 通过比色与同样处理的钙标准品进行比较, 计算 Ca²⁺ 含量。

2 结果与分析

2.1 SNP 对白桦悬浮细胞中 K⁺ 含量的影响

将 0.1、1 和 5 mmol · L⁻¹ SNP 添加到培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中处理 6 ~ 96 h 后, 白桦悬浮细胞中 K⁺ 含量变化趋势如图 1 所示。1 mmol · L⁻¹ SNP 处理后白桦悬浮细胞中 K⁺ 含量呈增加趋势, 处理 12 h 时含量最高, 为对照组的 2.09 倍。而 0.1 和 5 mmol · L⁻¹ SNP 处理后, K⁺ 含量维持在对照水平或低于对照。进一步进行方差分析(见表 1)发现, 白桦悬浮细胞中 K⁺ 含量的变化与 SNP 处理时间 ($Sig < 0.05$)、SNP 处理时间及处理浓度交互作用

($Sig < 0.05$) 显著相关, 而与 SNP 处理浓度 ($Sig > 0.05$) 相关不显著。

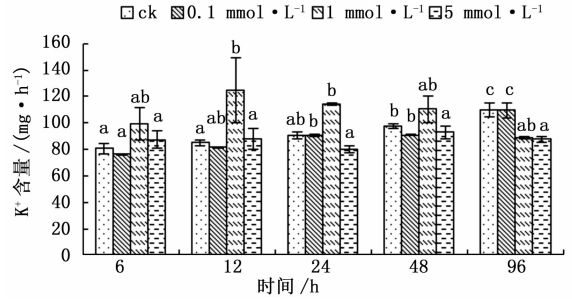


图 2 不同浓度 SNP 处理 6 ~ 96 h 后对白桦悬浮细胞中 K⁺ 含量的影响

表 1 K⁺ 含量与 SNP 处理时间及处理浓度方差分析

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	17 138.385a	19	902.020	2.277	0.014
截距	490 920.994	1	490 920.994	239.418	0.000
SNP 处理时间	4 937.492	4	1 234.373	3.116	0.025
SNP 处理浓度	280.068	3	93.356	0.236	0.871
SNP 处理时间 * SNP 处理浓度	11 920.825	12	993.402	2.508	0.015
误差	15 843.599	40	396.090		
总计	523 902.978	60			
校正的总计	32 981.984	59			

2.2 SNP 对白桦悬浮细胞中 Ca²⁺ 含量的影响

除 0.1 mmol · L⁻¹ SNP 处理 12 h 和 24 h 外, 0.1、1 和 5 mmol · L⁻¹ SNP 诱导白桦悬浮细胞 6 ~ 96 h, 白桦悬浮细胞中的 Ca²⁺ 含量呈增加趋势(图 3)。其中, SNP 处理 96 h 后白桦悬浮细胞中的 Ca²⁺ 含量累积最高, 0.1、1 和 5 mmol · L⁻¹ SNP 诱导处理分别是对照组的 1.20 倍、1.30 倍和 1.49 倍。进一步进行方差分析(见表 2)发现, 白桦悬浮细胞中 Ca²⁺ 含量的变化与 SNP 处理时间 ($Sig < 0.05$) 及 SNP 处理浓度 ($Sig < 0.05$) 显著相关, 而与 SNP 处理浓度及处理时间交互 ($Sig > 0.05$) 相关不显著。

表 2 Ca²⁺ 含量与 SNP 处理时间及处理浓度方差分析

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	955.810a	19	50.306	4.437	0.000
截距	13 285.757	1	13 285.757	171.794	0.000
SNP 处理时间	576.488	4	144.122	12.711	0.000
SNP 处理浓度	201.154	3	67.051	5.914	0.002
SNP 处理时间 * SNP 处理浓度	178.167	12	14.847	1.310	0.251
误差	453.519	40	11.338		
总计	14 695.085	60			
校正的总计	1 409.328	59			

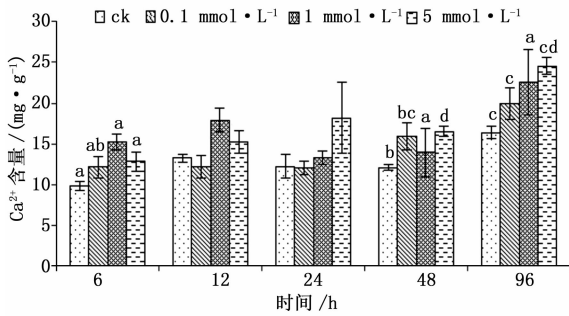


图3 不同浓度SNP处理6~96 h对白桦悬浮细胞中Ca²⁺含量的影响

2.3 SNP与KCl处理对白桦悬浮细胞干重和白桦酯醇积累的影响

分别将0.1、0.5、1和5 g·L⁻¹ KCl添加到1 mmol·L⁻¹ SNP处理的白桦悬浮细胞体培养体系中诱导12 h后,分析SNP与KCl处理对白桦悬浮细胞干重和白桦酯醇积累的影响(见表3)。研究发现,SNP、KCl、SNP和KCl共处理12 h后白桦悬浮细胞的干重影响维持在对照组水平,而白桦酯醇含量却变化很大。其中1 mmol·L⁻¹ SNP单独处理促进了白桦酯醇的累积,是对照组的1.55倍。0.1~5 g·L⁻¹ KCl处理后白桦酯醇含量呈先增后降的趋势,其中1 g·L⁻¹ KCl处理后白桦酯醇的累积量最高,为对照组的1.45倍。SNP与KCl共同处理时白桦酯醇累积量最高的组合为SNP与0.1 g·L⁻¹ KCl,是SNP单独处理的1.72倍,是KCl单独处理的2.33倍。

表3 SNP与不同浓度的KCl处理对白桦悬浮细胞干质量和白桦酯醇含量及产量的影响

处理方法	干质量/(g·L ⁻¹)	白桦酯醇含量/(mg·g ⁻¹)	白桦酯醇产量/(mg·L ⁻¹)
ck	13.70±0.50	7.24±0.04	99.28±0.55
0.1 g·L ⁻¹ KCl	13.80±0.28	8.26±0.95	114.02±15.27
0.5 g·L ⁻¹ KCl	13.60±0.14	9.32±1.12	126.79±13.73
1 g·L ⁻¹ KCl	13.90±2.19	10.48±0.41	145.76±6.06
5 g·L ⁻¹ KCl	14.00±1.41	6.87±0.07	96.18±10.62
1 mmol·L ⁻¹ SNP	14.78±0.46	11.22±1.60	165.83±5.94
SNP+0.1 g·L ⁻¹ KCl	14.10±0.14	19.25±0.53	271.45±4.83
SNP+0.5 g·L ⁻¹ KCl	14.40±0.71	17.63±1.71	253.91±18.14
SNP+1 g·L ⁻¹ KCl	14.80±0.14	8.56±0.66	126.72±10.98
SNP+5 g·L ⁻¹ KCl	13.20±0.49	9.20±0.28	121.49±8.44

2.4 SNP与CaCl₂处理对白桦悬浮细胞干质量和白桦酯醇积累的影响

分别将0.05、0.1、0.2和0.6 g·L⁻¹ CaCl₂溶液加入到1 mmol·L⁻¹ SNP处理的白桦悬浮细胞培养

体系中诱导12 h后,分析SNP与CaCl₂处理对白桦悬浮细胞干质量和白桦酯醇积累的影响(见表4)。结果表明,SNP、CaCl₂、SNP和CaCl₂共处理对白桦悬浮细胞干质量无显著影响。CaCl₂单独处理可促进白桦酯醇的累积,其中0.6 g·L⁻¹ CaCl₂处理时白桦酯醇的累积最大,是对照组的3.36倍。SNP与CaCl₂共同处理时,白桦酯醇累积量显著增加,呈先升后降的趋势,当SNP与0.1 g·L⁻¹ CaCl₂共处理时,白桦酯醇累积量最大,是SNP单独处理的2.75倍,是CaCl₂单独处理的2.18倍。

表4 SNP与不同浓度的CaCl₂处理对白桦悬浮细胞干质量和白桦酯醇含量及产量的影响

处理方法	干质量/(g·L ⁻¹)	白桦酯醇含量/(mg·g ⁻¹)	白桦酯醇产量/(mg·L ⁻¹)
ck	13.90±0.98	7.28±0.13	101.15±3.28
0.05 g·L ⁻¹ CaCl ₂	13.64±0.28	13.26±0.05	180.85±1.38
0.1 g·L ⁻¹ CaCl ₂	14.04±0.50	14.19±0.15	199.20±2.11
0.2 g·L ⁻¹ CaCl ₂	15.00±0.28	13.93±0.74	208.90±10.44
0.6 g·L ⁻¹ CaCl ₂	14.85±2.33	24.46±1.92	363.30±10.41
1 mmol·L ⁻¹ SNP	14.78±0.46	11.22±1.60	165.83±5.94
SNP+0.05 g·L ⁻¹ CaCl ₂	16.75±1.48	16.65±1.69	278.96±16.83
SNP+0.1 g·L ⁻¹ CaCl ₂	15.70±0.14	30.87±2.95	484.65±44.87
SNP+0.2 g·L ⁻¹ CaCl ₂	14.55±0.35	9.62±1.71	139.95±23.75
SNP+0.6 g·L ⁻¹ CaCl ₂	14.50±1.83	8.79±2.37	127.50±39.88

3 讨论

在植物组织培养生产药用次生代谢物的研究中,利用诱导子诱导植物培养细胞以促使细胞快速、大量合成有用次生物质已成为人们普遍重视的方法。在诱导子的作用机制方面,目前研究得还不透彻,一般认为诱导子加入细胞培养体系后会在三个水平上发生变化:(1)生理生化水平,诱导子介导植物细胞后依次发生信号识别、信号转导等^[20-21]; (2)基因水平,诱导子的加入导致某些基因的在转录和翻译水平发生变化,甚至影响某些代谢酶数量变化^[22]; (3)次生代谢水平,诱导子的加入导致目的产物的含量与分布发生变化^[22]。其中,在生理生化方面的研究较多,但没有明确的答案。但上述反应最终受培养体系中营养物质的约束,而诱导后营养物质的变化动态与次生代谢物产生的关系报道较少。

K⁺和Ca²⁺是植物必需的营养元素,在物质组成和代谢过程中发挥重要的作用,如果缺乏会引起物质组成和代谢的紊乱,进而引起植物品质、生物量和产量的下降。在植物细胞培养生产次生代谢物合

成、诱导子促进次生代谢物合成中, K^+ 和 Ca^{2+} 除了作为维持细胞正常生长的必需元素外, 是否与诱导子互作影响次生代谢物积累的报道较少, 尤其是 K^+ 。

NO 是介导植物次生代谢物合成的一种必需的信号分子, 在黄酮、异黄酮、紫杉醇等的合成中具有重要的调节作用^[23-24]。同样, 我们前期的研究发现, NO 供体 SNP 促进了白桦三萜的合成^[12]。在本研究中我们发现, SNP 处理后白桦悬浮细胞中 Ca^{2+} 含量呈增加趋势, 与文章报道一致^[25-27]。 Ca^{2+} 作为信号分子可促进次生代谢物的合成^[28-29], 那么, SNP 与 Ca^{2+} 互作是否能进一步促进白桦酯醇的合成是未知的。我们将不同浓度的 $CaCl_2$ 添加到 SNP 处理的白桦悬浮培养体系中, 发现 SNP 与 $CaCl_2$ 互作处理可进一步增加白桦酯醇的含量, 其中 SNP 与 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} CaCl_2$ 共处理时, 白桦酯醇累积量最大, 是 SNP 单独处理的 2.75 倍, 是 $CaCl_2$ 单独处理的 2.18 倍。由此推测, SNP 诱导的 Ca^{2+} 介导了白桦酯醇的合成。

本实验室前期研究发现外源施加 KCl 可提高白桦幼苗中三萜含量和三萜合成关键酶基因的表达^[30]。本研究进一步明确了 KCl 促进了白桦悬浮细胞中白桦酯醇的累积(一种五环三萜)。同时, 本实验发现 SNP 处理对白桦悬浮细胞中 K^+ 含量的影响存在时间和浓度效应, 其中 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理后白桦悬浮细胞中 K^+ 含量呈增加趋势, 在处理 12 h 时含量最高, 为对照组的 2.09 倍。那么, SNP 与 K^+ 互作是否能进一步促进白桦酯醇的合成? 因此, 我们将不同浓度的 KCl 添加到 SNP 处理的白桦悬浮培养体系中, 发现 SNP 与 KCl 互作处理可进一步增加白桦酯醇的含量, 其中 SNP 与 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 共处理时, 白桦酯醇累积量最大, 是 SNP 单独处理的 1.72 倍, 是 KCl 单独处理的 2.33 倍。由此推测, SNP 诱导的 K^+ 介导了白桦酯醇的合成。

4 结论

综上所述, 外源 SNP 可以促进白桦悬浮细胞中 Ca^{2+} 、 K^+ 和白桦酯醇的积累, 且 SNP 分别与 $CaCl_2$ 或 KCl 互作处理可进一步增加白桦酯醇的含量。但是, 现有研究发现 NO 可通过增加细胞内钙浓度来抑制内向钾电流, 从而抑制气孔开放^[31], 即 NO 对内向钾电流的作用需要胞内钙的参与, 因此我们推测 SNP 促进白桦酯醇合成中 Ca^{2+} 可能介导 NO 对细胞

吸收和利用 K^+ 的作用, 该推测仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 范桂枝, 詹亚光, 王博, 等. 激素配比对白桦悬浮细胞中三萜积累的影响[J]. 农业科学与技术, 2008, 2(12): 1-4.
- [2] 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, (6): 610-614.
- [3] Zhou J, Huang L, Hachey D L, *et al.* Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral Gag protein in immature HIV-1 particles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(51): 42149-42155.
- [4] Wen Z, Martin D E, Bullock P, *et al.* Glucuronidation of anti-HIV drug candidate bevirimat: identification of human UDP-glucuronosyltransferases and species differences[J]. *Drug metabolism and disposition*, 2007, 35(3): 440-448.
- [5] 王博, 范桂枝, 詹亚光, 等. 不同碳源对白桦愈伤组织生长和三萜积累的影响[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 97-99.
- [6] 王博, 范桂枝, 詹亚光. 不同培养基类型和植物生长调节剂配比对白桦愈伤组织中三萜积累的影响[J]. 林业科学, 2008, 44(10): 153-158.
- [7] 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, 4: 463-467.
- [8] 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.
- [9] 翟俏丽, 范桂枝, 詹亚光. 真菌诱导子促进白桦悬浮细胞三萜的积累[J]. 林业科学, 2011, 47(6): 42-47.
- [10] 孙美玲, 李晓灿, 王晓东, 等. H_2O_2 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.
- [11] 马明媚, 詹亚光, 王晓东, 等. 腐胺与过氧化氢交互调控白桦三萜合成的初步研究[J]. 中草药, 2013, 44(20): 2916-2922.
- [12] 王晓东. PAs, NO 和 H_2O_2 在真菌促进白桦三萜合成中的对话研究[D]. 东北林业大学, 2012.
- [13] Pedrosa M C, Magalhaes J R, Durzan D. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(347): 1027-1036.
- [14] Klessig D F, Durner J, Noad R, *et al.* Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(16): 8849-8855.
- [15] 汪涛, 刘宇, 黄群山, 等. 一氧化氮对动物生殖机能的影响[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2): 27-30.
- [16] 王秀娟, 杨舒黎, 李帅, 等. 一氧化氮在动物低氧适应中的生理和分子机制[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(5): 62-65.
- [17] 徐茂军. 一氧化氮: 植物细胞次生代谢信号转导网络可能的关键节点[J]. 自然科学进展, 2008, 17(12): 1622-1630.
- [18] 陈伟华, 鲍峰伟, 张晓静, 等. 微波消解-连续流动火焰光度法测定烤烟中的钾含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2010, (2): 120-122.
- [19] YC/T217-2007. 烟草及烟草制品钾的测定[S].

- [20] Castielli O, Cerda BD, Navarro JA, *et al.* Proteomic analyses of the response of cyanobacteria to different stress conditions. *FEBS Lett*, 2009, 583: 1753 – 1758.
- [21] Lee K, Bae DW, Kim SH, *et al.* Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. *J Plant Physiol*, 2010, 167: 161 – 168.
- [22] Zhang HX, Lian CL, Shen ZG. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Ann Bot*, 2009, 103(6): 923 – 930.
- [23] Modolo L V, Cunha F Q, Braga M R, *et al.* Nitric Oxide Synthase-Mediated Phytoalexin Accumulation in Soybean Cotyledons in Response to the *Diaporthe phaseolorumf. sp. meridionalis* Elicitor [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1288 – 1297.
- [24] 徐茂军,董菊芳,朱睦元. NO参与真菌诱导子对红豆杉悬浮细胞中PAL活化和紫杉醇生物合成的促进作用[J]. *科学通报*, 2004, 49(7): 667 – 672.
- [25] Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, *et al.* Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(8): 1369 – 1376.
- [26] Wang Y, Chen T, Zhang C, *et al.* Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca²⁺ and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes[J]. *New Phytologist*, 2009, 182(4): 851 – 862.
- [27] Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, *et al.* Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(19): 11116 – 11121.
- [28] 刘连成,董娟娥,张婧一,等. Ca²⁺对丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(11): 1359 – 1369.
- [29] 余朝阁,周娜,李天来,等. 钙对化学诱抗剂诱导番茄叶片酚类物质含量的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2014, 45(1): 6 – 10.
- [30] 姬晓明. 钾肥对白桦三萜合成关键酶基因表达的影响[D]. 东北林业大学, 2013.
- [31] 薛绍武,杨频,何奕昆. 一氧化氮对拟南芥保卫细胞内向钾通道的作用[J]. *科学通报*, 2008, 8: 009.

(责任编辑:张 研)