

水杨酸对白桦悬浮细胞中齐墩果酸积累及防御酶活性的影响

任春林, 尹 静, 潘亚婕, 詹亚光*, 李春晓, 赵 微

东北林业大学生命科学学院, 东北林业大学林木遗传育种与生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 研究水杨酸(SA)对白桦悬浮细胞生长、齐墩果酸积累及防御酶活性的影响。**方法** 在白桦悬浮培养第7、10、13、15天, 分别添加不同质量浓度(10、25、50、100、250 mg/L)的SA, 进行细胞生长、齐墩果酸量及抗逆酶活性分析。**结果** 添加低质量浓度SA(10~25 mg/L)对细胞活力和生长量影响不大, 高质量浓度的SA(100~250 mg/L)处理可显著抑制细胞活力和生长, 但可促进齐墩果酸的积累, 在第7天添加250 mg/L SA后齐墩果酸量最高, 达1.71 mg/g(干质量), 是对照的3.1倍; 而第7天添加50 mg/L SA后齐墩果酸的产量为0.473 mg, 比对照提高了42.04%。悬浮培养第7天添加50 mg/L SA, 过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)两种酶活性分别在0~24 h和0~48 h比对照显著提高, 而PAL活性在SA处理12 h后始终高于对照。**结论** 适宜浓度的SA可刺激白桦细胞防御酶活性提高, 并促进白桦悬浮细胞中齐墩果酸的积累。

关键词: 白桦; 悬浮培养; 水杨酸; 齐墩果酸; 防御酶活性

中图分类号: R282.23

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)05-0972-06

Effects of salicylic acid on accumulation of oleanolic acid and defense enzyme activity in suspension cells of *Betula platyphylla*

REN Chun-lin, YIN Jing, PAN Ya-jie, ZHAN Ya-guang, LI Chun-xiao, ZHAO Wei

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Nation, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To study the effects of salicylic acid (SA) on cell growth, oleanolic acid (OA) accumulation, and the activity of defense enzyme in the suspension cells of *Betula platyphylla*. **Methods** The cell growth, OA accumulation, and the activity of defense enzyme were studied after adding SA (10, 25, 50, 100, and 250 mg/L) to the suspension culture of *B. platyphylla* on the day 7, 10, 13, and 15. **Results** Under low concentration of SA (10–25 mg/L), cell viability and callus growth of *B. platyphylla* had few change and were significantly inhibited under high concentration of SA (100–250 mg/L), but the accumulation of OA increased significantly and the content of OA reached top at 1.71 mg/g (dry weight) with 250 mg/L SA on day 7 of the cell culture, which was 3.1 times of the control group; When 50 mg/L SA was applied to the cell culture, the production of OA reached 0.473 mg, which was 42.04% higher than that of the control. When it was added on day 7, the activities of CAT and SOD enzymes increased significantly in 0–24 and 0–48 h, respectively. The PAL activity was always higher than the control after 12 h. **Conclusion** The suitable concentration of SA can increase the activity of defense enzyme and the production of OA in the suspension cells of *B. platyphylla*.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; suspension cultivation; salicylic acid (SA); oleanolic acid (OA); defense enzyme activity

白桦中含有重要次生代谢产物白桦三萜, 是极具开发潜力的抗肿瘤、抗艾滋病毒类先锋药物^[1-3]。研究报道齐墩果酸三萜成分除了具有保肝、护胃、强心、抗心律失常、降血糖、调血脂、抗高血压的

生物活性外, 还具有抗炎、抗病毒、免疫调节、抑制血小板聚集和抗氧化等多种药理作用, 齐墩果酸对动物无明显毒性作用, 可将其作为抗氧化剂应用于食品工业中^[4]。以往有在大枣、竹节参、刺五加

收稿日期: 2011-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070531); 黑龙江省自然科学面上基金项目(C201110); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(DL12CA04); 东北林业大学研究生论文资助项目

作者简介: 任春林(1986—), 女, 内蒙古盟人, 在读硕士, 主要研究方向为植物细胞工程。E-mail: renchunlin1211@163.com

*通讯作者 詹亚光 Tel: (0451)82191752 E-mail: yaguangzhan@126.com

及龙牙櫟木中检测出齐墩果酸的报道^[5-8], 但关于白桦及其白桦组织中进行齐墩果酸的研究鲜见报道。

水杨酸(salicylic acid, SA)是系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)的重要诱导因子, 也是植物受病原菌侵染后活化一系列防卫反应的信号传导途径中的重要组成成分, SA对多种次生代谢产物的合成具有诱导作用, 被认为是非常有效的诱导子。对细胞培养中多种次生代谢产物紫杉醇、喜树碱、异黄酮、甘草皂苷、葛根素等的合成及其相应产物关键酶基因具有积极的诱导和促进作用^[9]。

苯丙氨酸裂解酶(PAL)是植物防卫反应的一个重要的生理生化指标, 是连接初级代谢和苯丙烷代谢的酶, 也是苯丙烷途径中的第一个酶和关键酶。在植物次生代谢途径中苯丙烷途径是植物抗病原侵染的重要代谢途径, 该途径可以形成植保素、木质素、生物碱和酚类等抗病次生代谢物质^[10], 但PAL与三萜物质合成、积累的关系尚不清楚。另外, 植物细胞对诱导子, 如SA、MJ或真菌等处理的重要的早期应答是氧迸发, 并伴随着活性氧数量的增加, 研究证实H₂O₂是介导真菌和SA等诱导子促进次生产物合成的主要信号分子^[11]。而植物的氧自由基清除系统中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性与多种次生代谢产物合成与积累有密切关系^[12-13]。本研究以白桦悬浮培养细胞为对象, 研究不同浓度水杨酸对白桦细胞生长、齐墩果酸合成及其防御酶活性的影响, 以期明确SA诱导白桦细胞中三萜类化合物积累最优条件, 同时探讨防御酶系与白桦三萜合成之间的关系, 为利用细胞工程规模化生产齐墩果酸等白桦三萜类化合物技术体系建立及调控机制的研究奠定基础。

1 材料

选择生长状态良好的白桦 *Betula platyphylla* Suk. 组培苗茎段为外植体, 由东北林业大学生命科学学院詹亚光教授鉴定, 筛选生长快、分散性好的白桦愈伤组织。水杨酸购买于Sigma公司, 齐墩果酸对照品购买于中国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 白桦悬浮细胞的培养

将其多次继代后转移至液体培养基悬浮培养。经过6代以上的转接, 建立稳定的悬浮培养细胞体系。继代周期为15 d。细胞接种量为3 g于100 mL

液体培养基中。

2.2 培养条件

固体培养基: NT培养基+0.1 mg/L 6-BA+0.01 mg/L TDZ 诱导愈伤组织, 蔗糖 20 g/L、琼脂粉 5.3 g/L、pH 值为 6.0~6.5。液体培养基为不加琼脂粉的固体培养基。固体愈伤组织继代周期为 25 d, 液体培养继代周期为 15 d, 培养基均以 121 °C 高压蒸气灭菌 20 min, 培养温度为 24~26 °C, 光照强度为 2 000 lx, 光照时间 16 h/d, 湿度为 40%~50%, 摇床转速 120 r/min。

2.3 水杨酸诱导处理

取水杨酸 0.100 g, 以 95%乙醇溶解后, 无菌水定容至 50 mL, 配制成 2 mg/mL 母液, 0.45 μm 滤膜滤过除菌。在悬浮培养的第 7、10、13、15 天分别添加 10、25、50、100、250 mg/L 的 SA, 每个处理重复 3 次, 同时设立对照组。SA 处理 7 d 后收获细胞, 测定细胞鲜质量及细胞活力, 60 °C 烘干至恒质量, 测干质量及齐墩果酸量。

2.4 细胞活力测定

采用 TTC 法^[14] 测定细胞活力, 细胞培养及诱导处理方法同“2.3”项。取悬浮培养的白桦细胞, 抽滤除去培养基。每个离心管中加入 200 mg (鲜质量) 白桦细胞, 2.5 mL 0.4% TTC 溶液, 并加入 2.5 mL、0.1 mol/L、pH 为 7.0 的磷酸缓冲溶液混匀, 静置于 25 °C 暗处 13~16 h, 细胞会变成红色。然后去上清液, 加入 5 mL 蒸馏水洗涤细胞, 重复 3 次。加入 5 mL 95%乙醇, 置 60 °C 水浴中 30 min, 期间轻轻摇动试管 1~2 次, 静置于室温下至细胞完全无色。取上清液, 在分光光度计上于 485 nm 处测吸光度(A)值, 重复测定 3 次, 同时设平行对照组。

2.5 齐墩果酸的测定

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 2.5 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加 95%乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 得对照品溶液。

2.5.2 供试品溶液的制备 采用改进的超声波醇法^[15]提取齐墩果酸。称取 0.2 g 干燥的白桦细胞样品, 加入 95%乙醇 4 mL, 于室温过夜浸提, 然后在强度为 10 kHz 下的超声波超声 40 min, 取上清液, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.5.3 色谱条件 用 Waters 公司 600-717-2487 色谱系统, HiQ sil C₁₈V 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-水 (8:2), 检测波长 210 nm,

体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 ℃。

2.5.4 线性关系的考察 精密吸取质量浓度为 0.1 mg/mL 的齐墩果酸对照品溶液 1、2、3、4、5 mL, 分别置于 5 mL 容量瓶中, 加 95%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 10 μ L 进样, 测定其峰面积积分值。以质量浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 齐墩果酸回归方程为 $Y=1\,216\,650X+1\,599$, $r=0.999\,7$ 。结果表明, 齐墩果酸在 0.2~1.0 μ g 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5.5 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液, 重复进样 5 次, 测定齐墩果酸峰面积积分值, 其 RSD 为 0.32%。

2.5.6 稳定性试验 分别精密吸取同一份供试品溶液, 于 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h 进样, 测定齐墩果酸峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 0.57%。

2.5.7 重复性试验 取同一样品 5 份, 按样品测定方法分别测定齐墩果酸量, 计算得 RSD 为 0.98%。

2.5.8 样品测定 精密称取不同处理的干燥白桦细胞样品, 按“2.5.2”项所述供试品溶液制备方法, 及“2.5.3”项所建立的色谱条件进样分析。重复 3 次, 取平均值。色谱图见图 1。

2.6 防御酶活性的测定

PAL 和 SOD 活性的测定参照陈建勋等^[16]方法。CAT 活性的测定参照 Stellmach Bruno 等^[17]的方法。

3 结果与分析

3.1 SA 对白桦悬浮细胞生长的影响

在白桦悬浮培养第 7、10、13、15 天, 分别添加不同质量浓度 (10、25、50、100、250 mg/L) 的

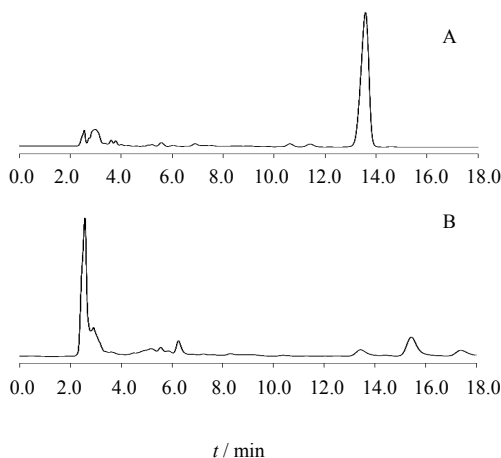


图 1 齐墩果酸对照品 (A) 和样品 (B) 溶液的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of OA reference substance (A) and sample solution (B)

SA, 结果显示, 除低质量浓度 (10 mg/L) SA 对细胞干质量的积累影响不显著外, 在悬浮培养的不同时期添加 50、100、250 mg/L 的 SA 诱导子均抑制了细胞生长, 而且随 SA 质量浓度提高, 干质量降低显著 (图 2), 如在第 7 天加入 100 mg/L 和 250 mg/L SA, 干质量分别比对照降低了 48.68% 和 53.64%。

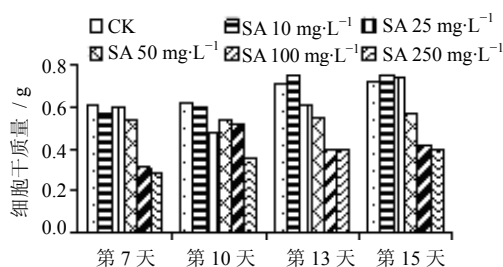
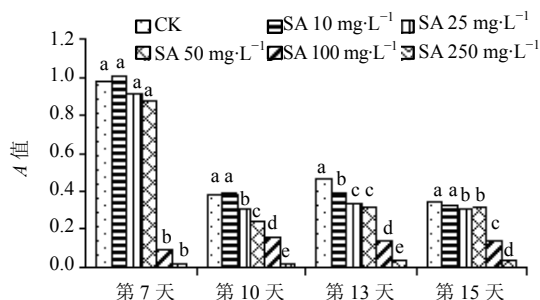


图 2 水杨酸对白桦悬浮细胞生长的影响
Fig. 2 Effects of SA on growth of suspension-cultured cells of *B. platyphylla*

SA 对白桦悬浮细胞活力的影响分析表明, 随 SA 质量浓度增加, 细胞活力呈降低趋势。低质量浓度 SA (10~50 mg/L) 的加入, 对细胞活力影响不大, 且以悬浮培养第 7 天对细胞活力的抑制程度最小, 因此时正值白桦细胞生长对数期, 活力旺盛, 抵抗力最强; 而高质量浓度 SA 处理, 可对细胞造成严重的破坏, 以 250 mg/L SA 处理最为显著, 细胞活力几乎为 0, 说明高质量浓度的 SA 可引起细胞过早衰老和死亡 (图 3)。

3.2 SA 对悬浮培养细胞中齐墩果酸量的影响

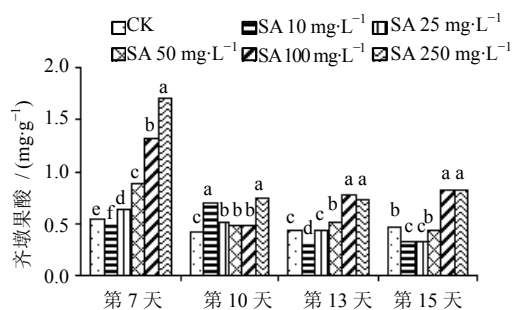
培养第 7 天添加 SA 后, 仅低质量浓度 (10 mg/L) 处理对齐墩果酸量影响不显著, 其他处理均表现齐墩果酸量随 SA 质量浓度的增大而显著提高 (图 4),



小写字母相同者表示在 0.05 水平差异不显著

Same lowercase letters indicate no significant at 0.05 level

图 3 SA 诱导子对白桦悬浮细胞活力的影响
Fig. 3 Effects of SA on cell viability of suspension-cultured cells of *B. platyphylla*



小写字母相同者表示在 0.05 水平差异不显著
Same lowercase letters indicate no significant at 0.05 level

图 4 SA 对白桦悬浮细胞中齐墩果酸量的影响

Fig. 4 Effects of SA on OA in suspension-cultured cells of *B. platyphylla*

经 SA 25、50、100、250 mg/L 处理后, 齐墩果酸量依次分别比对照增加了 15.85%、61.96%、137.57%、209.73%。而第 10、13、15 天进行 SA 处理, 虽较高质量浓度的 SA 可在一定程度上促进齐墩果酸量的积累, 但显著低于第 7 天处理, 其中增长率最高的为在第 13 天添加 100 mg/L SA, 比对照增长了 78.56% (图 4)。同时也发现第 10 天后再进行 SA 处理, 虽一定程度上可诱导次生物质的积累, 但不

如悬浮培养中期 (第 7 天) 处理效果好, 原因可能是随着培养时间延长, 培养基中营养成分逐渐消耗殆尽 (一般悬浮培养周期为 15 d), 细胞生长进入停滞期, 细胞初生代谢和次生代谢产物开始降解, 并伴随衰老和死亡, 此时再进行 SA 处理, 更加剧对细胞的诱导伤害, 从而更加不利于齐墩果酸积累。

3.3 SA 对悬浮培养细胞中齐墩果酸产量的影响

分析表明, 培养 7 d 添加 50 mg/L 和 250 mg/L 的 SA 后细胞中齐墩果酸的产量 (齐墩果酸量×干质量) 均较高, 第 7 天添加 50 mg/L SA 后齐墩果酸的产量为 0.473 mg, 比对照提高了 42.04%。在第 7 天添加 250 mg/L SA 后齐墩果酸的产量为 0.478 mg, 比对照提高了 43.54%。而在第 13 天及第 15 天添加 SA 后齐墩果酸的产量均降低, 这主要是由于 SA 的加入虽一定程度上促进了三萜量的积累, 但对细胞鲜质量增长的显著抑制导致齐墩果酸产量降低, 见表 1。综合细胞生长、活力及齐墩果酸产量结果, 最终确定 50 mg/L SA 在细胞悬浮培养第 7 天加入最有利于 NT 培养基中白桦悬浮细胞的齐墩果酸产量积累。

表 1 不同质量浓度 SA 处理下细胞中齐墩果酸产量变化

Table 1 Changes of OA production in cells with SA treatments at different concentration

处 理	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	齐墩果酸产量 / mg			
		第 7 天	第 10 天	第 13 天	第 15 天
CK (对照)	—	0.333 dD	0.300 bB	0.311 aA	0.343 aA
SA	10	0.330 dD	0.416 aA	0.228 dD	0.255 bB
	25	0.377 cC	0.234 dD	0.265 cC	0.249 bB
	50	0.473 aA	0.265 cC	0.280 bB	0.247 bB
	100	0.406 bB	0.251 cC	0.291 bB	0.325 aA
	250	0.478 aA	0.260 cC	0.292 bB	0.334 aA

小写字母相同者表示在 0.05 水平差异不显著, 大写字母相同者表示在 0.01 水平差异不显著
Same lowercase and uppercase letters indicate no significance at 0.05 and 0.01 level, respectively

3.4 SA 处理下白桦细胞中防御酶活性变化

悬浮培养的第 7 天添加 50 mg/L 的 SA, 在不同时期取样, 测定抗逆相关酶 PAL、CAT、SOD 的活性变化。结果 (图 5) 表明, 加入 SA 后 0~6 h, 悬浮细胞中 PAL 活性低于对照处理, 而 12~120 h, PAL 活性显著提高且始终高于对照; 这一点与 MeJA 处理下表现结果类似^[18]。加入 SA 后 0~24 h, CAT 活性始终显著高于对照, 且在 24 h 达到最大, 而此后 36~72 h, 低于对照。加入 SA 后 0~48 h, SOD 活性始终显著高于对照, 且在 6 h 达到最大, 而后在 72~120 h 显著低于对照。说明在 SA 处理早期,

SA 引起的高浓度 H_2O_2 的产生使得氧自由基清除酶 CAT、SOD 的活性明显提高。可见, 加入 SA 后, 可诱导 PAL、CAT 和 SOD 的活性提高, 但表现时期不同。

4 讨论

SA 作为诱导子处理刺激培养物合成次生代谢产物的效果受添加浓度、时间及培养细胞所处的生理状态等因素的影响。不同植物材料合成次生代谢产物不同, 结果表现不尽相同。Ballica 提出诱导子在细胞生长到达指数生长期之前加入效果是最好的, 只有处于一定生长时期的细胞才能更有效地接

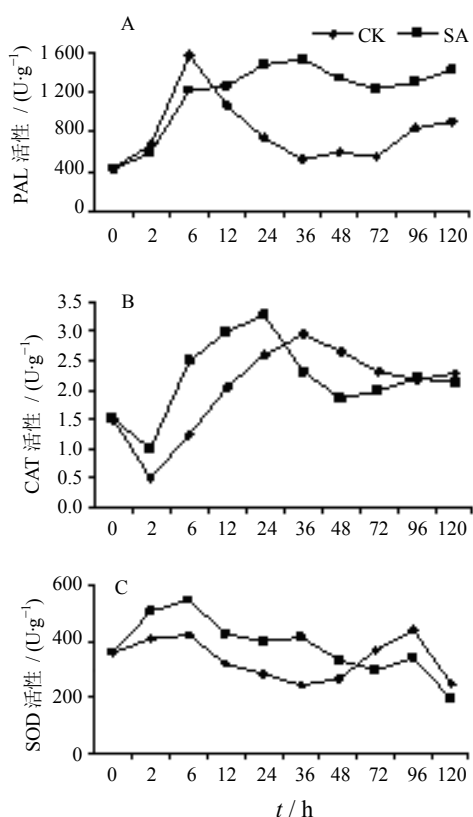


图 5 SA (50 mg·L⁻¹) 对白桦悬浮细胞防御酶 (PAL、SOD、CAT) 活性的影响

Fig. 5 Effects of SA (50 mg·L⁻¹) on activities of defense enzyme (PAL, SOD, and CAT) in suspension-cultured cells of *B. platyphylla*

收诱导信号^[12,19-22]。在本研究中, 白桦悬浮培养周期为 15 d, 而选择培养第 7 天 (指数生长初期) 添加 250 mg/L SA, 可使齐墩果酸量提高 2.1 倍, 但由于高质量浓度的 SA 严重抑制细胞生长量, 致使齐墩果酸产量与第 7 天进行 50 mg/L SA (比对照提高 42.04%) 处理接近, 所以综合生长量、细胞活力、齐墩果酸产量及诱导子成本, 选择悬浮培养第 7 天进行 50 mg/L SA 处理较合理。由此可见, 不同植物材料次生产物积累对 SA 添加的最适宜的时间和浓度差异较大, 这可能与使用的植物材料、悬浮培养细胞接种密度、生长状态及培养基成分的差异有关。

当植物受到胁迫时, 植物的抗氧化系统通过增加抗氧化酶活性或增加特定化合物的量起到关键的保护作用。H₂O₂ 与细胞的信号转导有关, 它能作为胞内的第二信使激活抗病途径中的防御相关基因, 刺激次生代谢物的合成和积累, 但过多的 H₂O₂ 对细胞会产生毒害作用。在抗氧化酶中, SOD 构成了

清除活性氧的第一道防线, 而且其是超氧化物的主要清除剂, 酶促反应的结果是形成 H₂O₂, 然后 H₂O₂ 又通过 CAT 的作用转化为 H₂O 和 O₂。在红豆杉^[20]、喜树^[21]和丹参^[12]中 SA 处理提高了 SOD 的活性。另外, 有证据显示 SA 在烟草^[23]、黄瓜^[24]和水稻^[25]中会降低 CAT 活性, 但是在牧草^[26]、小麦^[27]和丹参^[12]中实际上提高了 CAT 的活性。杨英等^[28]的研究认为甘草细胞悬浮体系中添加 10 mg/L SA 在促进甘草细胞的生长和甘草黄酮总量增加的同时可导致细胞中 H₂O₂ 量升高, 引起细胞 PAL、CAT 和 POD 活性的增强。

本研究结果显示, SA 刺激了白桦悬浮细胞防御应答体系的响应, 加入 SA 后, 可诱导 PAL、CAT 和 SOD 的活性升高, 但表现时期不同。SOD 在 SA 处理早期活性显著高于对照, 在 6 h 就达到最高, 48 h 后低于对照水平。而 CAT 在 SA 处理 0~24 h 也表现被强烈的诱导, 在 24 h 达到最高, 此后降低; PAL 在 SA 处理 12 h 后一直高于对照, 且一直持续到 120 h。3 种防御酶活性高峰出现在处理的不同时间, 这说明 3 种酶相互协调及补充, 以维持细胞内 H₂O₂ 保持相对的稳定和平衡, 一方面可通过清除活性氧降低对细胞造成的伤害, 同时又可完成介导 SA 诱发萜类代谢相关基因的表达, 这可能也是次生代谢产物积累的一个重要原因。

参考文献

- [1] Pisha E, Chai H, Lee I, *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 1046-1051.
- [2] 李 薇, 李 岩, 金雄杰. 白桦三萜类物质的抗肿瘤作用及其对免疫功能的增强效应 [J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(9): 485-487.
- [3] 李 岩, 金雄杰, 谢湘林, 等. 白桦三萜类物质抗黑色素瘤 B16、S180 肉瘤作用及其机制的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(3): 279-281.
- [4] 汤华成, 张东杰, 赵 蕾. 功能性食品因子齐墩果酸研究进展 [J]. *食品科技*, 2007(9): 16-18.
- [5] 胡 芳, 赵智慧, 刘孟军. HPLC 法测定不同枣品种果实中白桦酯酸、齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(5): 434-438.
- [6] 袁 丁, 何毓敏, 鲁科明, 等. 竹节参中总皂苷和三萜苷元齐墩果酸的测定 [J]. *华西药理学杂志*, 2008, 23(6): 692-694.
- [7] 张海丰, 孙 健, 滕 坤, 等. HPLC 法同时测定刺五加果实中齐墩果酸和熊果酸的含量 [J]. *中国药物警*

- 戒, 2010, 7(12): 708-710.
- [8] 谭朝阳, 袁宏佳. HPLC 法测定龙芽楸木药材中齐墩果酸的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(1): 46-47.
- [9] 尹玲莉, 侯晓杰. 植物抗性信号分子——水杨酸研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 338-342.
- [10] Zhao J, Davis L, Verpoort R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites [J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23: 283-333.
- [11] 徐茂军. 药用植物细胞次生代谢产物合成信号转导机制研究进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(5): 651-657.
- [12] Dong J, Wan G, Liang Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture [J]. *J Biotechnol*, 2010, 148: 99-104.
- [13] Solecka D, Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold [J]. *Physiol Plant*, 2003, 119: 253-262.
- [14] 刘 华, 梅兴国. TTC 法测定红豆杉细胞活力 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 537-539.
- [15] 张 泽, 孙 宏. 高效液相色谱法测定白桦树皮中白桦酯醇的含量 [J]. 林产化学与工业, 2004, 24(1): 61-63.
- [16] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006.
- [17] Stellmach B 著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [18] 尹 静. 白桦三萜合成调控及其关键酶基因表达研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [19] 卞爱华, 高文远, 王 娟. 不同诱导子对甘草悬浮培养细胞中甘草酸积累的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(22): 1690-1693.
- [20] 梅兴国, 张舟宁, 苏湘鄂, 等. 水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用 [J]. 生物技术, 2000, 10(6): 18-20.
- [21] 于 放, 张冬艳, 白凤武, 等. 水杨酸对喜树细胞次级代谢的诱导作用 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(1): 70-73.
- [22] 徐亮胜, 薛晓锋, 付春祥, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 402-406.
- [23] Dat J F, Lopez D H, Foyer C H, *et al.* Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2000, 156: 659-665.
- [24] Shi Q H, Zhu Z J. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber [J]. *Environ Exp Bot*, 2008, 63: 317-326.
- [25] Shim I S, Momose Y, Yamamoto A, *et al.* Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants [J]. *Plant Growth Regul*, 2003, 39: 285-292.
- [26] He Y, Liu Y, Cao W, *et al.* Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass [J]. *Crop Sci*, 2003, 45: 988-995.
- [27] Agarwal S, Sairam R K, Srivastava G C, *et al.* Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes [J]. *Biol Plantarum*, 2005, 49: 541-550.
- [28] 杨 英, 何 峰, 季家兴, 等. 外源水杨酸对悬浮培养甘草细胞中甘草黄酮积累的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 504-506.