

一氧化碳对白桦悬浮细胞生长和三萜累积的影响

姜 洋, 孙菲菲, 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: 目的 分析外源一氧化碳(CO)对白桦悬浮细胞生长和三萜累积的影响。方法 在白桦悬浮细胞培养的第 8 天添加 5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 CO 供体高铁血红素处理 0.25~8 d, 采用高效液相色谱法、比色法和实时荧光定量 PCR 方法分析白桦三萜含量及其合成关键酶基因的表达。结果 除 20 和 30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 2 d 后显著降低白桦悬浮细胞干质量外, CO 处理未对白桦悬浮细胞干质量产生显著影响。除 30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理提高 pH 值和丙二醛含量外, CO 处理未对 pH 值和丙二醛含量产生显著影响。CO 处理不同程度地增加了三萜、白桦酯醇和齐墩果酸含量, 其中, 30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 1 d 时三萜积累量达最大值, 为同期对照的 1.3 倍; 10 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 4 d 时白桦酯醇含量达最高值, 为对照的 1.5 倍; 10 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 2 d 时齐墩果酸含量达最高值, 为对照的 4.2 倍。三萜合成关键酶 FPPS、LUS、CAS1、CAS2 和 β -AS 基因的实时荧光定量 PCR 检测结果进一步证实了 CO 对白桦三萜累积的促进作用。结论 CO 处理促进了白桦悬浮细胞中三萜的合成。

关键词: 白桦; 悬浮细胞; 一氧化碳; 三萜; 白桦酯醇; 齐墩果酸

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3681-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.025

Effect of carbon monoxide on growth and triterpenoid production in *Betula platyphylla* suspension cells

JIANG Yang, SUN Fei-fei, ZHAN Ya-guang, FAN Gui-zhi

College of Life Sciences of Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To analyze the effect of carbon monoxide (CO) on the growth of *Betula platyphylla* suspension cells and triterpenoid production. **Methods** CO donor hematin of 5, 10, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$ were added to eight-day-old *B. platyphylla* suspension cells, and the change of triterpenoid content and gene expression of FPPS, LUS, CAS1, CAS2, and β -AS related to the triterpenoid synthesis were analyzed by chemical colorimetry, high performance liquid chromatography and real-time PCR, respectively. **Results** CO treatment did not have a significant effect on dry weight of *B. platyphylla* suspension cells except for 2—8 d at 20 $\mu\text{mol/L}$ and 30 $\mu\text{mol/L}$ CO treatment. CO treatment also did not have a significant effect on pH value and malondialdehyde content except for 30 $\mu\text{mol/L}$ CO treatment. CO treatment significantly increased the content of triterpenoid, betulin and oleanolic acid. the content of triterpenoid, betulin and oleanolic acid were the highest after 1 d at 30 $\mu\text{mol/L}$ CO treatment, 4 d at 10 $\mu\text{mol/L}$ CO treatment and 2 d at 10 $\mu\text{mol/L}$ CO treatment, which was 1.3, 1.5, and 4.2 times of the control, respectively. Triterpenoid production in *B. platyphylla* suspension cells induced by CO was further confirmed by key enzyme genes of FPPS, LUS, CAS1, CAS2, and β -AS related to the triterpenoid synthesis by RT-PCR. **Conclusion** CO treatment could effectively enhance the triterpenoid production in *B. platyphylla* suspension cell culture.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; suspension cells; carbon monoxide; triterpenoid; betulin; oleanolic acid

目前, 次生代谢产物的低产现象仍是制约细胞培养植物天然产物技术产业化应用的核心问题之一。植物体内的次生代谢物质的生物合成容易受外界因素的影响, 而细胞内部的信号转导系统是介导

外界因子诱发植物次生代谢产物合成的桥梁和纽带^[1-3]。研究发现, Ca^{2+} 、活性氧(ROS)、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、硫化氢(H_2S)、一氧化氮(NO)以及多胺等植物体内的主要信号分子(途

收稿日期: 2019-02-09

基金项目: 中央高效基本科研业务专项资金项目(2572017EA05); 中央高效基本科研业务专项资金项目(2572018CJ02); 黑龙江自然科学基金资助项目(C2016005)

作者简介: 姜 洋, 硕士研究生, 现从事植物细胞工程领域的研究。E-mail: 1640987808@qq.com

*通信作者 范桂枝 E-mail: gzf325@126.com

径) 不仅参与植物细胞次生代谢的信号调控, 而且不同信号途径之间可以通过共催化、互抑制、共协调等作用介导次生代谢物的合成^[4-8]。因此, 寻找有效促进次生代谢物积累的诱导子和探讨植物细胞中与次生代谢产物合成有关的信号转导机制, 将有助于揭示植物次生代谢的调控规律, 对解决植物细胞次生代谢产物低产等问题具有重要的理论和实践意义。

近年来, 植物抗逆 (包括抗病) 反应等信号转导机制研究取得了很大的进展, 揭示了一些新的气体信号分子 NO、H₂S 和一氧化碳 (CO) 及其信号转导机制^[9-10], 这将有助于揭示植物次生代谢信号调控。CO 被作为继 NO 之后的第 2 种内源性气体信号因子, 与 NO 有惊人的相似之处^[10], 而 NO 在植物次生代谢信号转导网络中起潜在的分子开关作用^[1], CO 与 NO 的关系如何? CO 能否调控植物次生代谢物? 此方面的研究还很少报道。

本研究的前期研究表明, 白桦酯醇和齐墩果酸等三萜物质可以在白桦 *Betula platyphylla* Suk. 愈伤组织中积累^[11-13], 并且白桦三萜的累积受 NO 和 H₂S 调控^[6,13]。CO 是否具有同类信号分子的功能还未证实。因此, 本研究将 CO 供体高铁血红素添加到产三萜白桦悬浮培养体系中, 采用高效液相色谱和实时荧光定量技术分析 CO 对白桦三萜积累的调控作用, 本研究的开展将丰富调控次生代谢物的诱导子/信号分子。

1 材料与仪器

白桦母树取自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), 外植体取自其诱导的组培苗, 由东北林业大学詹亚光教授鉴定为白桦 *Betula platyphylla* Suk.。

HY-6A 双层振荡器; 丙二醛和三萜含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性采用 UV-2800 紫外分光光度计测定; 白桦酯醇 (批号 Y25D8C51396, 质量分数 ≥ 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 齐墩果酸 (批号 117B022, 质量分数 ≥ 98%, 北京索莱宝科技有限公司); Waters 高效液相色谱仪 (Waters 公司); pH 测试计 (上海雷磁公司)。

2 方法

2.1 白桦悬浮细胞制备

用白桦组培苗茎段进行愈伤组织诱导, 使用 NT 固体培养基, 附加 0.1 mg/L 6-苄基腺嘌呤

(6-BA) 和 0.01 mg/L 苯基噻二唑脲 (TDZ), 蔗糖 20 g/L, 琼脂 5.3 g/L, pH 6.0~6.5。每 20~25 天继代 1 次, 多次继代后将松散愈伤组织接入不加琼脂的 NT 液体培养基中悬浮培养, 250 mL 摇瓶中盛有 90 mL 培养液, pH 5.5~6.0, 每瓶接种 4 g 鲜质量的愈伤组织, 每隔 15 天继代 1 次, 培养温度为 25~27 °C, 光照强度为 2 000 lx, 光照 16 h/d, 摇床转速为 120 r/min。

2.2 外源 CO 的添加

将 5、10、20、30 μmol/L CO 供体高铁血红素分别添加到培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中, 在处理 0.25~8 d 后取样测定 pH 值、丙二醛含量、SOD 和 CAT 酶活性、白桦三萜含量及其关键酶基因表达。对照 (CK) 加入等体积的无菌水, 每种处理重复 3 次。添加的氯高铁血红素溶液采用无菌的 0.45 μm 微孔滤膜进行过滤除菌。

2.3 pH 值测定

将白桦悬浮细胞培养液用滤纸进行滤过收集, 放入 10 mL 离心管内 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于 pH 值测定。将 pH 计电极使用标准缓冲液进行校正, 然后进行细胞培养液 pH 测定。

2.4 丙二醛含量测定

参照赵世杰等的方法^[14]。精确称取 0.2 g 白桦悬浮细胞, 加入 1 mL 的 TCA 提取液冰浴下研磨成浆, 转入 5 mL 离心管中, 再用 1 mL TCA 提取液将研钵冲洗干净, 合并洗涤液到离心管中。摇匀后用低温离心机 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。利用紫外分光光度计测定上清液在 450、532、660 nm 处的吸光度 (*A*) 值。根据 *A* 值测定丙二醛含量。

$$\text{丙二醛含量} = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$$

2.5 SOD 和 CAT 活性测定

称取 1.00 g 新鲜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 PVPP 充分研磨后, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为酶粗提液^[15]。

2.5.1 SOD 活性测定 向 10 mL 离心管中加入 1.5 mL 50 mmol/L PBS (pH 7.8)、0.3 mL 130 mmol/L Met (现用现配)、0.3 mL 100 μmol/L EDTA-Na₂、0.3 mL 750 mmol/L 四唑氮蓝 (现用现配)、0.3 mL 20 μmol/L 核黄素和 0.3 mL 酶粗提液 (对照用提取缓冲液代替), 反应 20 min, 暗对照置于黑暗中反应 20 min。暗对照调零, 测定 560 nm 处 *A* 值, 计算 SOD 活性。

SOD 总活性=(光对照 A 值-样品 A 值)×酶液总体积/(光对照 A 值×0.5×样品质量×样液体积)

2.5.2 CAT 活性测定 向 10 mL 离心管中加入 1.5 mL pH 7.8 50 mmol/L PBS、1.0 mL 去离子水和 500 μ L 酶液(对照加入 500 μ L 0.1 mol/L pH 7.8 的 PBS), 0.3 mL 0.1% H_2O_2 , 混匀后立刻测定 240 nm 处的吸光度, 记 1 min 内 A 值变化用以计算 CAT 酶活性。

CAT 活性=1 min 内 A 值差值×酶液总体积/酶液体积×提取酶液时样品质量×0.1

2.6 白桦酯醇和齐墩果酸含量的提取和测定

取 0.500 g 白桦悬浮细胞干样于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 25 mL 提取液(浓盐酸-无水乙醇 2:8)与少量沸石, 90 °C 回流 3 h, 待冷却后用滤纸过滤, 取滤液加入等量去离子水于蒸发皿中, 置于 80 °C 水浴蒸发至皿内液体为原来的一半时取出, 用乙醚进行萃取, 每次取 20 mL 乙醚于分液漏斗中, 每个样品萃取 3 次, 最后合并上层液体(乙醚层), 置于蒸发皿中, 40 °C 水浴蒸干, 用 1 mL 甲醇复溶, 过 0.45 μ m 滤膜后备用^[11]。色谱条件: 色谱柱 HiQ sil C₁₈ V (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相乙腈-水(90:10); 检测波长 210 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积 20 μ L。用白桦酯醇和齐墩果酸对照品制作标准曲线, 分别以白桦酯醇和齐墩果酸质量浓度为横坐标(X), A 值为纵坐标(Y), 得到白桦酯醇和齐墩果酸回归方程分别为 $Y=1\times 10^7 X-0.0164$, $r^2=0.9987$ 和 $Y=9.6\times 10^8 X-0.0166$, $r^2=0.9979$, 在 0.2~1.2 mg/mL 内线性关系良好。

2.7 三萜类化合物的提取和测定

三萜类物质含量用紫外分光光度法测定^[6]。将收获的白桦细胞烘干、研磨, 称取 0.1 g 样品加入 4 mL 95%乙醇浸泡过夜, 70 °C 水浴提取 1 h, 10 kHz 超声提取 40 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 移取 100~200 μ L 上清, 70 °C 水浴蒸干。加入 200 μ L 新配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 800 μ L 高氯酸, 摇匀, 70 °C 水浴 15 min, 流水冷却至室温, 加醋酸乙酯定容至 5 mL, 用 1 cm 比色皿测定 551 nm 处的吸光度值。以白桦酯醇为对照品作标准曲线定量, 得回归方程为 $Y=0.0871 X+0.0002$, $r^2=0.9995$ (Y 表示三萜质量浓度, X 为 A 值), 线性范围为 0.02~0.10 mg。

2.8 三萜合成关键酶基因表达分析

利用改良的 CTAB 法提取白桦悬浮细胞中的 RNA, 采用 TaKaRa 试剂公司的反转录试剂盒, 以消化后 1 μ g RNA 为模板。实时荧光定量 PCR 检测采用

TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒, 采用双封闭法 TransStart TopTaq 新型热启动酶、SYBR Green I 荧光染料。反应体系为 10 μ L, 具体反应体系与 PCR 条件参照说明书。相关引物序列见表 1。基因表达量的计算参照文献方法^[11], 以 TU 基因为内标参照, 目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来表示。

表 1 白桦三萜合成关键酶基因的引物序列

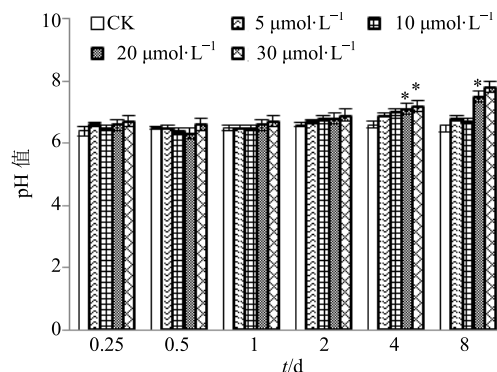
Table 1 Primer sequences of key enzyme genes of triterpenoid biosynthesis in *B. platyphylla*

基因名称	引物序列 (5'→3')
FPPS	正向: CCGCGGATCTCTGTCAATTGA 反向: CCAAGGGTGCAGGCAAGAAAT
LUS	正向: ATGGGGGATTGCTACACCTACG 反向: GTCCACACCTTGCTTTGGCTTGA
CAS1	正向: CAGATGGCTCTTGGTATGGATC 反向: AACATAGCCCATCCAGTATTGAC
CAS2	正向: TCCTATCCCTGGTTGGAGTTG 反向: GATACCAAAGCAATCATTGAAG
β -AS	正向: CTGCTCAGTTTCTTCAAGTC 反向: TTGCCCATGCAGTATGTACC
TU	正向: TCAACC GCCTTGTCTCTCAGG 反向: TCAACC GCCTTGTCTCTCAGG

3 结果与分析

3.1 CO 处理对白桦悬浮细胞培养液 pH 值的影响

将 5、10、20、30 μ mol/L 的 CO 供体高铁血红素添加到培养 8 d 的白桦悬浮培养体系中处理 0.25~8 d 后分别取样测定 pH 值, 结果如图 1 所示, 除 20 μ mol/L 和 30 μ mol/L CO 处理 4 d 和 8 d 时培养液的 pH 值分别比同期对照显著提高了 13.6%和 18.2%外, CO 处理对培养液 pH 值未产生显著影响。



*表示与同期对照相比达显著水平 ($P<0.05$), 下同

* refers to a significant level compared with control group ($P<0.05$), same as below

图 1 CO 处理对白桦悬浮细胞培养液 pH 值的影响

Fig. 1 Effect of CO on pH value in suspension cells of *B. platyphylla*

3.2 CO 处理对白桦悬浮细胞中丙二醛含量的影响

丙二醛含量对 CO 处理的响应如图 2 所示, 除 30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 0.25~8 d 时分别比同期对照显著提高 17.6%~36.03% 外, 5~20 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理未对丙二醛含量产生显著影响。

3.3 CO 处理对白桦悬浮细胞中 SOD 和 CAT 酶活性的影响

CO 处理不同程度地增加了白桦悬浮细胞中 SOD 和 CAT 酶活性 (图 3), 其中 SOD 酶活性在不同浓度 CO 处理 4 d 时达到最大值, 分别为同期对照组的 1.6、

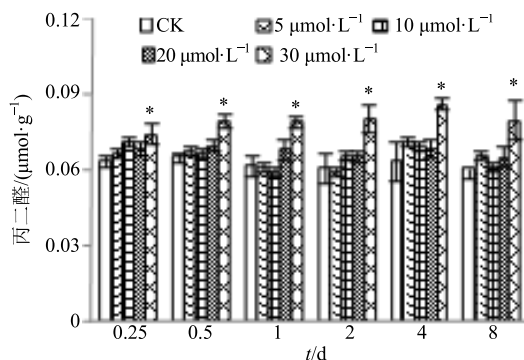


图 2 CO 处理对白桦悬浮细胞中丙二醛含量的影响
Fig. 2 Effect of CO on malondialdehyde content in suspension cells of *B. platyphylla*

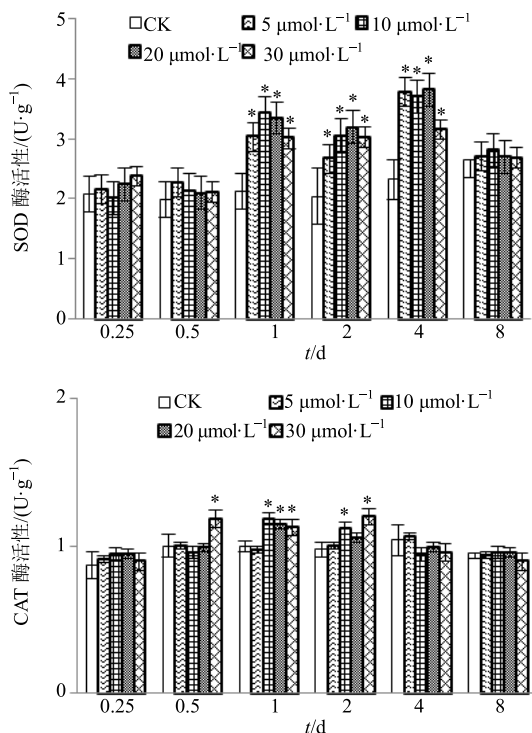


图 3 CO 处理对白桦悬浮细胞中 SOD 和 CAT 酶活性的影响
Fig. 3 Effect of CO on SOD and CAT enzyme activity in suspension cells of *B. platyphylla*

1.6、1.6 及 1.4 倍; 而 CAT 酶活性在 30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 2 d 时达最大值, 分别为同期对照的 1.2 倍。

3.4 CO 处理对白桦悬浮细胞干质量的影响

如图 4 所示, 与同期对照相比, 5~10 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理的 0.5~8 d 内对干质量累积无显著性影响; 而 20~30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 0.5~8 d 内, 随着 CO 处理时间的增加干质量累积呈下降趋势, 其中 CO 处理 4~8 d 时显著低于同期对照水平。

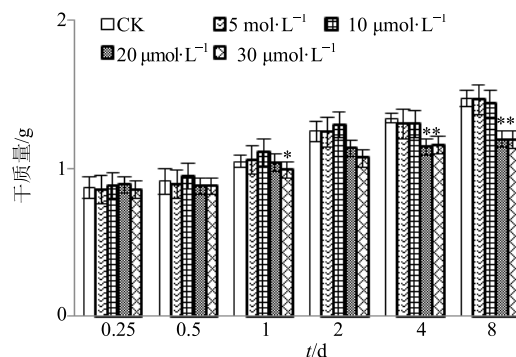


图 4 CO 处理对白桦悬浮细胞干质量累积的影响
Fig. 4 Effect of CO on dry weight of suspension cells of *B. platyphylla*

3.5 CO 处理对白桦悬浮细胞中三萜含量及其关键酶基因表达的影响

如图 5 所示, CO 处理增加了白桦悬浮细胞中白桦酯醇、齐墩果酸、总三萜含量和关键酶基因的表达水平。其中, 30 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 1 d 时三萜积累量达到所有处理中最大值, 为同期对照组的 1.3 倍; 10 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 4 d 时白桦酯醇含量达最高值, 为同期对照的 1.5 倍; 10 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理 2 d 时齐墩果酸含量达最高值, 为同期对照组的 4.2 倍。同样, 白桦三萜合成关键酶基因 FPPS、LUS、 β -AS、CAS1 和 CAS2 对 CO 处理的响应趋势与三萜含量相同, 均呈增加趋势。

4 讨论

CO 是植物中新发现的气体信号分子, 在植物体内主要由血红素加氧酶催化产生, 并应答多种激素处理和环境胁迫因子对植物的刺激^[9]。最近的研究表明, CO 参与植物不定根、侧根及根毛的发育^[10,16], 并在植物耐受病害、盐害、渗透、重金属、紫外辐射和营养元素缺乏等胁迫中起重要的调节作用^[17-19]。次生代谢物的累积也是植物响应环境胁迫因子的方式^[20]。CO 和次生代谢物质累积均是植物逆境下的表征, 二者是否有关联? 仅见本实验室前期研究发现, CO

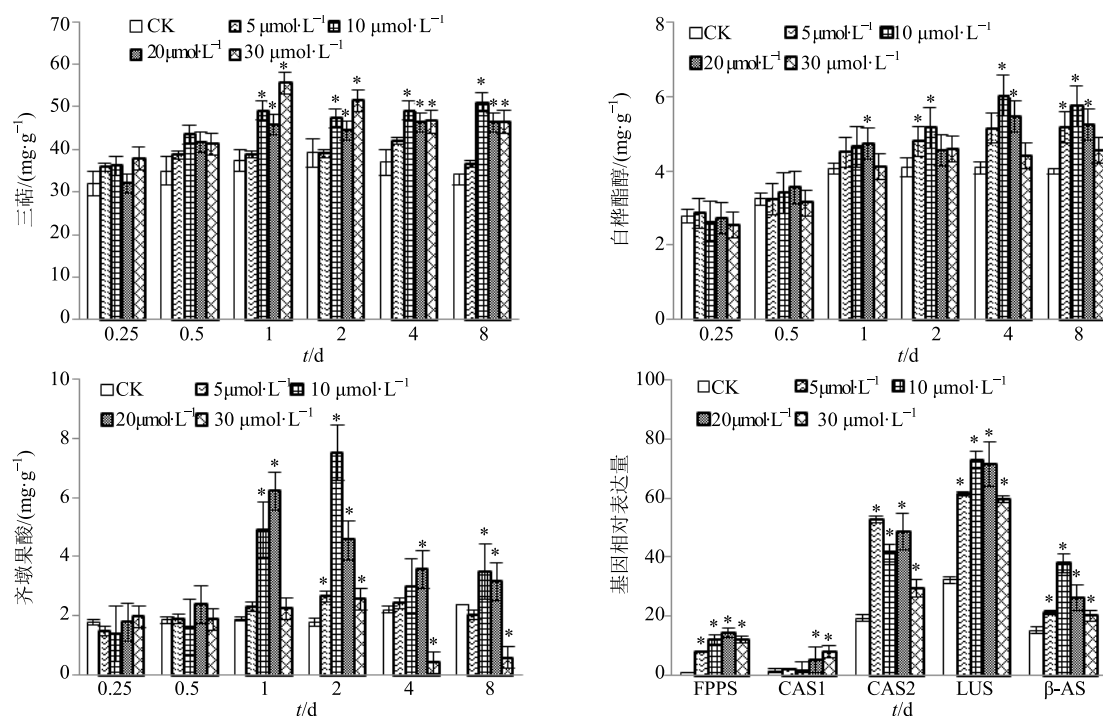


图 5 CO 处理对白桦悬浮细胞中三萜含量及其关键酶基因表达的影响

Fig. 5 Effect of CO on triterpenoid content and its key enzyme gene expression in suspension cells of *B. platyphylla*

处理提高了筋骨草中蜕皮甾酮的累积^[21]。为了进一步证实 CO 与次生代谢物的关系,本研究分析了不同浓度 CO 处理 0.25~8 d 后白桦悬浮细胞中白桦酯醇、齐墩果酸和总三萜含量的变化,研究发现,CO 处理显著提高了白桦悬浮细胞中白桦酯醇、齐墩果酸和总三萜含量,且增加幅度存在浓度和时间效应。同样,白桦三萜合成关键酶基因 FPPS、LUS、 β -AS、CAS1 和 CAS2 对 CO 处理的响应趋势与三萜含量相同,基本呈现显著增加趋势。由此可见,CO 促进了白桦三萜的合成。

分析不同 CO 浓度处理对白桦悬浮细胞干质量、pH 值、丙二醛、SOD 和 CAT 酶活性的影响发现,低浓度 CO 处理对上述指标未产生显著影响维持在对照水平,高浓度尤其是高于 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理一定时间范围内降低了白桦悬浮细胞的干质量、增加 pH 值、丙二醛、SOD 和 CAT 酶活性。由此可见,CO 对白桦悬浮细胞生长的影响也存在浓度效应,高于 20 $\mu\text{mol/L}$ CO 处理后细胞的酸碱度、膜脂过氧化程度增加进而降低了细胞的生长速度。

另外,本研究室采用同一批白桦悬浮细胞系类比较发现,NO、 H_2S 和 CO 3 种气体信号分子对白桦悬浮细胞培养体系的影响基本相同,均可以在一定浓度和时间范围内促进白桦三萜的合成。同时,研

究发现, H_2S 和 CO 均可以诱导 NO 的产生, H_2S 和 CO 关系以及三者间的关系如何,是否存在共催化、互抑制、共协调关系,特别是三者间的相互作用能否进一步提高次生代谢物的累积还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 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]. 中国细胞生物学学报, 2009, 31(5): 651-657.
- [2] 罗杰, 王勇, 郑亚洁, 等. 植物天然产物与合成生物学 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(8): 1345-1347.
- [3] Gu L, Zheng Y M, Lian D H, et al. Production of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*: Elicitation strategy and signal transduction [J]. *Process Biochem*, 2018, 69(6): 22-32.
- [4] 邢建永, 王康才, 汤兴利, 等. Ca^{2+} 对悬浮培养半夏类原球茎生长及次生代谢物累积的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 376-379.
- [5] Girija A, Devakumar L J P S, Vijayanathan M, et al. Nitric oxide as a bioactive molecule in the regulation of chalcone synthase during jasmonic acid mediated defense signaling in ginger [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2017, 128(3): 715-721.
- [6] 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, 2017, 41(6): 26-32.
- [7] 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.
- [8] Murcia G, Fontana A, Pontin M, *et al.* ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine [J]. *Phytochemistry*, 2017, 135(3): 34-52.
- [9] He H Y, He L F. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses [J]. *Nitric Oxide*, 2014, 42(11): 40-43.
- [10] 关艳龙. 一氧化氮及一氧化碳参与植物逆境响应的机理研 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2014.
- [11] Fan G, Nie T, Huang Y, *et al.* GSNOR deficiency enhances betulin production in *Betula platyphylla* [J]. *Trees*, 2018, 32(3): 847-853.
- [12] Fan G Z, Nin T T, Fan J S, *et al.* Exogenous feeding of fructose and phenylalanine further improves betulin production in suspended *Betula platyphylla* cells under nitric oxide treatment [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1035.
- [13] Fan G Z, Liu Y T, Wang X D, *et al.* Cross-talk of polyamines and nitric oxide in endophytic fungus-induced betulin production in *Betula platyphylla* plantlets [J]. *Trees*, 2014, 28(2): 635-641.
- [14] 赵世杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进 [J]. 植物生理学报, 1994, 30(3): 207-210.
- [15] 丁海东, 刘慧, 陈一, 等. H_2O_2 和 MAPK 介导油菜素内酯诱导番茄抗氧化防护酶 SOD 和 CAT 的信号途径 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(10): 1010-1016.
- [16] Guo K, Kong W W, Yang Z M. Carbon monoxide promotes root hair development in tomato [J]. *Plant Cell Environment*, 2009, 32(8): 1033-1045.
- [17] 张春平, 周立鑫, 周慧, 等. 外源一氧化碳供体高铁血红蛋白对盐胁迫下黄连幼苗光合参数及叶绿素荧光特性的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 262-272.
- [18] 崔为体, 刘锐涛, 林玉婷, 等. 一氧化碳: 植物气体信号分子的新成员 [J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(5): 87-92.
- [19] 吴亭亭, 徐晟, 孙永刚, 等. 外源一氧化碳对铁胁迫下的离体水稻叶片氧化伤害的缓解作用 [J]. 植物生理学报, 2010, 46(2): 120-124.
- [20] Zaynab M, Fatima M, Abbas S, *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 124(11): 198-202.
- [21] 孙菲菲, 李春雪, 范桂枝. 外源 CO 对筋骨草 β -蜕皮甾酮积累的影响 [J]. 草业科学, 2015, 32(9): 1438-1443.