

不同诱导处理后水稻悬浮细胞的活性氧变化与有关酶系的关系

曾富华^{1,2} 易克² 徐向丽² 王海华³

(¹ 湛江师范学院应用生命科学技术研究所, 广东湛江 524048; ² 湖南农业大学生物技术系, 湖南长沙 410128; ³ 湘潭师范学院生物系, 湖南湘潭 411201)

摘要:以水稻 (*Oryza sativa* L.) 感病品种浙辐 802 为材料, 研究了 3 种不同因子处理后其悬浮细胞中活性氧及其一些抗病酶系的变化情况。结果表明: (1) 3 种因子均能导致 H_2O_2 的形成和积累。XOO.75-1 处理后的 H_2O_2 含量分别在 0.5 h 和 6 h 出现突增现象, 而 XOO.76-25 处理只在 0.5 ~ 1 h 达到一个峰值。推测 XOO.75-1 和浙辐 802 间的互作属于非亲和性互作, 而 XOO.76-25 与浙辐 802 间属于亲和性互作。(2) XOO.75-1 和 76-25 菌株处理后均能不同程度地增强 POD 的活性 (平均为 13.2 % 和 50.7 %), 但 SOD 的活性增强不显著, 甚至在诱导初期有降低的现象。(3) 可溶性蛋白质电泳结果表明, XOO.75-1 和 76-25 处理后 72 h 均可形成两条新增谱带 ($R_f = 0.48$ 和 $R_f = 0.72$), XOO.75-1 还可诱导形成另两条新增谱带 ($R_f = 0.53$, MW = 32.2 kD 和 $R_f = 0.69$, MW = 41.9 kD)。(4) 不同因子处理后悬浮细胞的 POD 和 SOD 发生相应变化, 表现为一些谱带的增减或强度变化。(5) SA 处理后悬浮细胞的 H_2O_2 有明显的积累效应, 而且, SA 能显著提高 POD 活性 (平均提高 32.8 %) 和 SOD 活性 (平均提高 46.7 %)。表明 SA 可能通过调节 H_2O_2 的含量诱导与植物抗性有关的防御基因表达。

关键词:水稻; 悬浮细胞; 稻白叶枯菌; 水杨酸; 防卫反应

中图分类号: S511, S432.22

Relationship between the Changes of Active Oxygen Species and Defense Enzymes in Suspension Cultured Cells Treated by Different Inducers

ZENG Fu-Hua^{1,2}, YI Ke², XU Xiang-Li², WANG Hai-Hua³

(¹ Applied Institute of Life Science, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong; ² Department of Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; ³ Department of Biology, Xiangtan Normal University, Xiangtan 411201, Hunan, China)

Abstract: Changes of active oxygen species (AOS) and some defense enzymes in suspension cultured cells of Zhefu 802 (susceptible) induced by three inducers were studied. Three factors all resulted in the accumulation of H_2O_2 in suspension cultured cells. H_2O_2 content in suspension cultured cell treated by XOO.75-1 was increased suddenly at 0.5 hour and at 6 hours after treatment, but that treated with XOO.76-25 only at 0.5 hour to 1 hour after treatment. POD activities in suspension cultured cells treated with XOO.75-1 and XOO.76-25 were both increased by 31.5 % and 49.8 % respectively. But the changes of SOD activities were not marked, even decreased at the beginning. Two new bands ($R_f = 0.48$ and $R_f = 0.72$) in SDS-PAGE diagram of soluble protein from suspension cultured cells treated with XOO.75-1 and XOO.76-25 appeared at 72 hours after the induction. In addition, two other bands ($R_f = 0.53$, MW = 32.2 kD; $R_f = 0.69$, MW = 41.9 kD) also appeared in the treatment of XOO.75-1. Some isoenzyme bands of POD and SOD in suspension cultured cells treated with three factors were increased or decreased in number, or changed in color. H_2O_2 in suspension cultured cells treated by SA was accumulated, and activities of POD and SOD increased respectively by 31.5 % and 49.8 %.

Key words: Rice; Suspension cultured cell; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; Salicylic acid; Defense response

在长期共进化过程中, 植物逐渐形成了一系列复杂而又行之有效的保护机制来抵御病原物的侵

染。现已确认, 利用生物、物理或化学因子处理, 植物将发生与动物体类似的相应反应, 产生局部或系

基金项目: 广东省科技攻关项目资助(2002A2070402)。

作者简介: 曾富华(1952-), 男, 博士, 教授, 湖南农业大学博士生导师。

Received (收稿日期): 2003-09-01, Accepted (接受日期): 2004-04-01。

统的抗性,这种抗性是植物形态结构和生理生化等方面在时间和空间上的综合表现^[1]。

近年来,国内外许多学者对植物-病原物互作的生理生化机制进行了大量的研究,发现许多诱导处理能导致植物体内活性氧的快速变化^[2~8],并产生一类“免疫蛋白”,称为致病相关蛋白(pathogenesis related protein, PRs)^[9,10],同时还证实了 SOD、POD 和 LOX 等酶与诱导抗性的关系^[4,5,11~16]。但由于以前的研究多集中在植物个体与病原物的互作体系基础上,所以结果经常受到环境的干扰。因此,笔者采用水稻悬浮细胞与病原菌互作系统,在人为控制的条件下研究了不同诱导因子处理后水稻细胞内活性氧、可溶性蛋白质以及 SOD、POX 活性及其同工酶变化情况,试图从单纯的植物细胞-病原菌互作系统上探讨植物的抗性机制。

1 材料与方法

1.1 水稻愈伤组织的培养

水稻 (*Oryza sativa* L.) 感病品种浙辐 802 由湖南农科院水稻研究所郑瑞丰先生赠送。饱满种子去壳后用 0.1 % HgCl₂ 浸泡 10 min 消毒,无菌水充分漂洗 4~5 次后,接种到无激素 MS 基本培养基上萌发。4 d 后,胚萌发,切取胚轴和胚芽鞘,分别接种到诱导愈伤组织的培养基 (MS + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + Vc 5 mg/L) 上。培养条件参照刘选明等^[17]介绍的方法。

1.2 稻白叶枯菌的培养

稻白叶枯菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, XOO.) 菌株 XOO.75-1 和 76-25 由湖南农业大学植物病理教研室提供。菌株分别接种到固体培养基上,28 ℃ 下恒温振荡培养。每隔 3 d 换一次新鲜培养液。

1.3 水稻悬浮细胞的培养和诱导处理

无菌条件下,称取适量愈伤组织,用镊子夹碎至小颗粒。加入液体培养基 (MS + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + Vc 5 mg/L) 20 mL。120 r/min, 25 ℃ 下恒温振荡培养。每隔 3 d 换一次新鲜培养液。

诱导处理分 4 组:(1) 悬浮细胞接种 XOO.75-1 (接种量为 4×10^5 cell/mL); (2) 悬浮细胞接种 XOO.76-25 (接种量为 4×10^5 cell/mL); (3) 悬浮细胞中加入水杨酸 (终浓度为 0.1 mmol/L); (4) 对照组 (CK)。

1.4 过氧化氢含量的测定

分别于接种后 0.5、1、3、6、9、12 h 取样。按沈凤

颺^[18]介绍的方法进行。

1.5 酶液的提取和同工酶鉴定

分别于接种后 12、24、48、72 h 取样。按 1:3 (W/V) 加入预冷提取缓冲液 (含 50 mmol/L, pH 7.8 Na-磷酸缓冲液, 7 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF, 6 mmol/L 抗坏血酸, 1 mmol/L EDTA Na₂, 0.1 % PVPP) 冰浴研磨匀浆。16 000 r/min 4 ℃ 下离心 20 min。上清为粗酶液。

SOD 同工酶的测定按罗广华等^[19]介绍的方法进行。

POD 同工酶的测定按孙新立等^[20]介绍的方法进行。

1.6 POD 和 SOD 活性的测定

POD 活性测定按 Braker^[21]介绍的方法进行。取已稀释 40 倍的粗酶液 10 μL, 加入 3 mL 反应介质 (含 0.1 mol/L, pH 7.0 Na-磷酸缓冲液, 20 mmol/L 愈创木酚, 20 μL H₂O₂)。在 25 ℃ 下测定 A₄₇₀。每 30 s 测定 1 次, 连续测 3 min。以每分钟增加 1 A₄₇₀ 的酶量为 1 个酶活性单位, 并将之换算成 units g⁻¹ FW。

SOD 活性的测定按 Beauchamp 和 Fridovich^[22]的方法进行, 采用 NBT 光化还原法。以每分钟抑制 NBT 光化还原 50 % 的酶量作为一个酶活性单位, 并将之换算成 units g⁻¹ FW。

1.7 可溶性蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

取上述粗酶液 150 μL, 加入变性样品缓冲液 (0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 5 % 巯基乙醇, 2 % SDS, 40 % 蔗糖, 0.05 % 溴酚蓝) 20 μL 以及甘油 40 μL 并混匀。电泳按李建武等 (1994) 介绍的方法进行。硝酸银染色按胡芝良等 (1998) 介绍的方法进行。

1.8 可溶性蛋白质含量的测定

以牛血清白蛋白 (BAS) 为标准蛋白, 采用考马斯亮蓝染色法^[25]。

2 结果与分析

2.1 诱导因子处理对水稻悬浮培养细胞 H₂O₂ 含量及其代谢和膜脂过氧化作用的影响

快速产生过氧化物和 H₂O₂ 的积累是机体觉察来自于无毒病原体的信号以后发生过敏反应的一种早期特征。本研究表明 (表 1), 细胞悬浮培养过程中的一定时期内, 对照组中 H₂O₂ 含量始终维持在一种较低的水平; 而 XOO.75-1 处理后, 浙辐 802 悬浮细胞中 H₂O₂ 很快增加, 并且具有两个明显的特征。第一, 在侵染 0.5 h 左右即有一个飞跃性突增, 随之

缓慢下降;第二,3 h左右又开始升高,到6 h左右达到最大。*XOO.76-25*和浙辐802互作过程中, H_2O_2 的积累程度较*XOO.75-1*处理低,且无其中第二个

特征峰。而SA处理则有一个明显的 H_2O_2 积累效应。

表1 不同诱导处理对水稻悬浮培养细胞中 H_2O_2 含量的影响

Table 1 Effect of different induced factors on H_2O_2 contents in suspension cultured cells of rice Zhefu 802 ($nmol\ g^{-1}FW$)

处理 Treatment	取样时间 Sampling time (h)					
	0.5	1.0	3.0	6.0	9.0	12
Control	0.7	0.4	0.5	0.5	0.3	0.6
<i>XOO.75-1</i>	2.7	1.2	3.8	5.5	3.1	0.7
<i>XOO.76-25</i>	1.9	1.1	1.2	0.8	0.6	0.9
SA	0.8	0.6	1.4	1.9	2.6	2.9

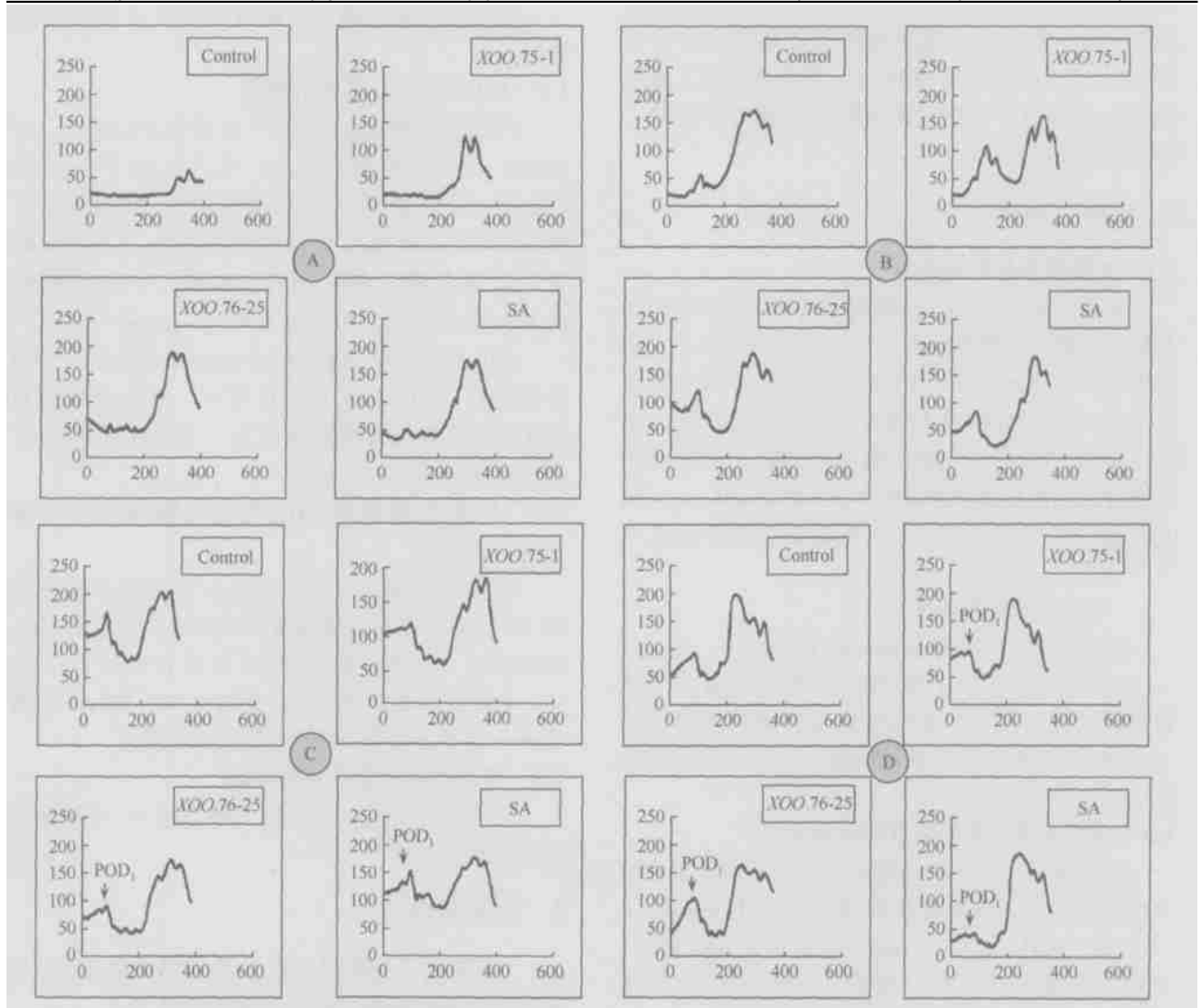


图1 不同诱导因子处理后浙辐802悬浮培养细胞中POD同工酶谱的扫描图谱

Fig. 1 Changes of POD isoenzymes in Zhefu 802 suspension cultured cells treated by different induced factors

A: 处理后12 h; B: 处理后24 h; C: 处理后48 h; D: 处理后72 h.

A: 12 h after treatment; B: 24 h after treatment; C: 48 h after treatment; D: 72 h after treatment.

2.2 不同诱导因子处理后水稻悬浮细胞中POD和SOD同工酶

POD和SOD是植物细胞内防御酶系统中的主要成员。不同因子处理后它们的同工酶谱带均发生

不同程度的变化。诱导处理后48 h和72 h, *XOO.76-25*和SA均有一条新增 POD_1 谱带出现,在72 h, *XOO.75-1*处理也新增一条 POD_1 谱带(图2); *XOO.76-25*诱导后24~72 h均新增一条 SOD_2 谱带,

SA 诱导后 48 h 也新增一条 SOD₂ 谱带, XOO. 76-25 处理后 72 h 还新增另一条 SOD₄ 谱带, 而 75-1 处理后的 SOD 同工酶谱似乎无明显增减现象, 但是,

各种因子处理后 48 h SOD₅ 谱带普遍增强。此外, 在不同因子的作用下, 还出现另一些谱带的增强或减弱(图 2)。

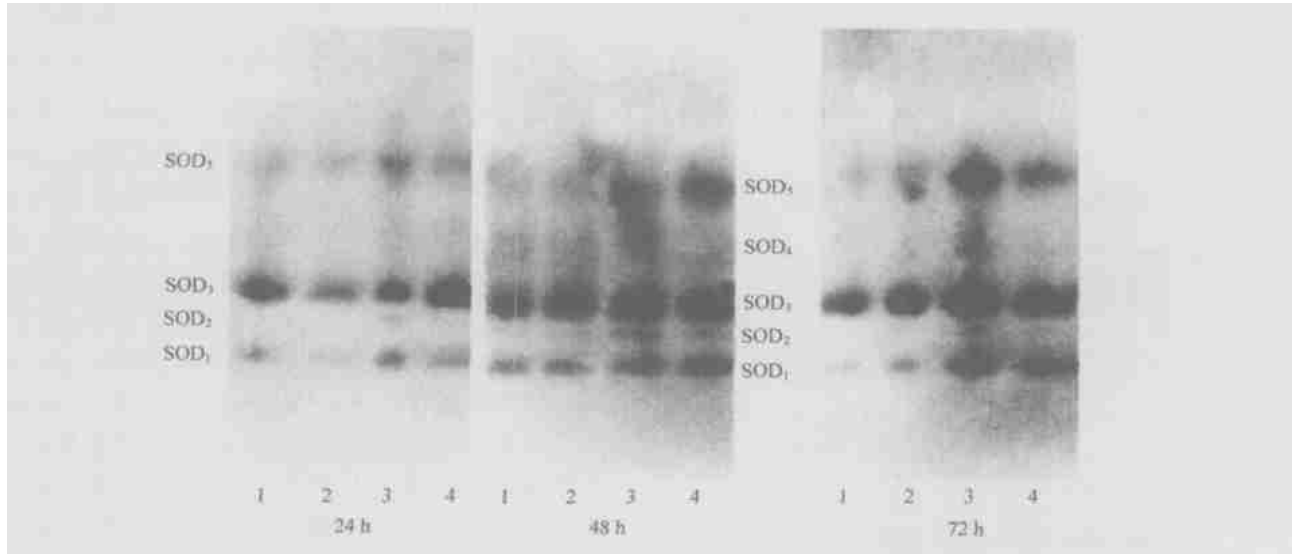


图 2 不同因子处理后悬浮细胞中 SOD 同工酶谱带的变化

Fig. 2 Changes of SOD isoenzyme bands in suspension cultured cells at 24, 48 and 72 hours after induction
1: Control; 2: XOO. 75-1; 3: XOO. 76-25; 4: SA.

2.3 不同诱导因子处理对水稻悬浮培养细胞中有关酶活性的影响

表 2、表 3 表明, 在水稻细胞在悬浮培养过程中, SOD 活性处于一个相对平衡的状态, 而 POD 活性随着培养时间的延长而缓慢增加; XOO. 75-1 处理初期, 悬浮细胞的 SOD 活性呈下降趋势, 直到 48 h 才略有升高(比对照高 3.5%), 而 POD 活性呈一直

上升趋势, 到 48 h 达到峰值(比对照高 26.7%); XOO. 76-25 处理后 SOD 活性变化的趋势同 XOO. 75-1 组, 只是在 48 h 增加的值要更高一些, 而 POD 活性呈显著增高趋势(平均增高 50.7%); SA 则具有明显的诱导 SOD 活性(平均增高 46.7%)和 POD 活性(平均增高 31.5%)的作用。

表 2 不同诱导处理对水稻悬浮培养细胞中 POD 活性的影响

Table 2 Effect induced by different inducements on POD activities in suspension cells of Zhefu 802 (units g⁻¹FW)

处理 Treatment	取样时间 Sampling time (h)				平均值 Average
	12	24	48	72	
Control	374.6 ± 5.4 (100 %)	413.0 ± 3.2 (100 %)	432.2 ± 0.4 (100 %)	453.7 ± 7.1 (100 %)	418.1 (100 %)
XOO. 75-1	426.7 ± 8.0 (113.9 %)	497.3 ± 2.1 (120.4 %)	546.3 ± 3.3 (126.7 %)	420.1 ± 0.7 (92.6 %)	472.6 (113.2 %)
XOO. 76-25	507.1 ± 4.7 (135.4 %)	659.8 ± 1.9 (159.6 %)	737.7 ± 5.5 (171.0 %)	615.2 ± 2.8 (135.6 %)	630.0 (150.7 %)
SA	448.4 ± 3.3 (119.7 %)	572.1 ± 3.7 (138.5 %)	581.3 ± 11.8 (134.8 %)	627.9 ± 4.3 (138.4 %)	557.4 (132.8 %)

表 3 不同诱导处理对水稻悬浮培养细胞 SOD 活性的影响

Table 3 Effects of different inducers on SOD activities in suspension cultured cells of Zhefu 802 (units g⁻¹FW)

处理 Treatment	取样时间 Sampling time (h)				平均值 Average
	12	24	48	72	
Control	178.9 ± 8.1 (100 %)	176.4 ± 6.3 (100 %)	176.5 ± 7.5 (100 %)	181.4 ± 3.3 (100 %)	178.3 (100 %)
XOO. 75-1	152.4 ± 4.7 (85.2 %)	144.1 ± 10.1 (81.7 %)	182.6 ± 7.9 (103.5 %)	184.8 ± 0.9 (101.9 %)	166.0 (93.1 %)
XOO. 76-25	171.1 ± 3.8 (95.6 %)	162.0 ± 3.2 (91.8 %)	197.3 ± 13.5 (111.8 %)	207.3 ± 5.6 (114.3 %)	184.4 (103.4 %)
SA	201.1 ± 4.9 (112.4 %)	287.4 ± 2.1 (162.9 %)	293.2 ± 4.2 (166.1 %)	264.8 ± 0.7 (146.0 %)	261.6 (146.7 %)

2.4 稻白叶枯菌处理后水稻悬浮细胞可溶性蛋白质的 SDS-PAGE

不同诱导因子处理后悬浮细胞的可溶性蛋白质 SDS-PAGE 谱带的变化,通过银染方法可以清楚地看到(图3),*XOO.75-1* 和 *XOO.76-25* 处理后 72 h,分别形成两条新增谱带($R_f = 0.48$ 和 0.72),*XOO.75-1* 处理诱导形成另两条新增谱带($R_f = 0.53$ 和 0.69)。

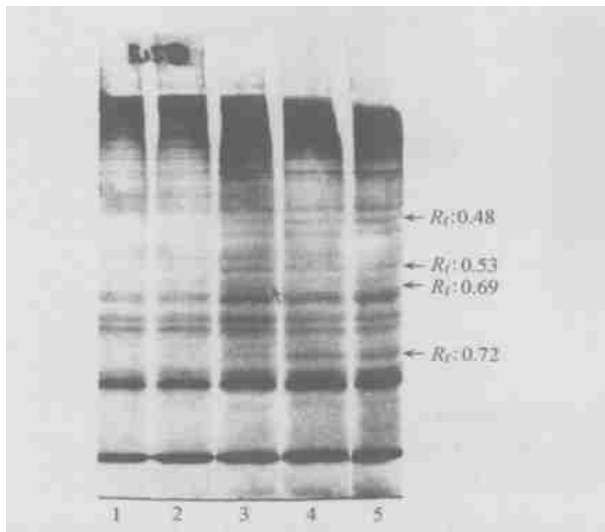


图3 不同因子处理后可溶性蛋白质 SDS-PAGE 谱带的变化

Fig. 3 The changes of SDS-PAGE bands of soluble protein in suspension cultured cells treated by different inducers

1 - 5: Control, *XOO.75-1*, *XOO.76-25*, *XOO.76-25*, *XOO.76-25*.

3 讨论

植物的免疫体系是一个复杂的网络系统,其在逆境条件下表现出来的抗病防卫反应是有层次性和时序性的^[3]。不同的植物-病原物互作体系或不同的诱导处理均导致抗性反应的产生,虽然诱导机制不尽相同,结果也不一样,但是其中信号的产生和识别、信号的传递以及信号启动防卫功能因子并使其发挥功能等应当是植物诱导防御所共同经历的几个阶段^[24]。

反应性氧迸发(oxidative burst)是植物防御反应的一个早期行为。而 H_2O_2 除作为细胞壁中氧化交联(oxidative cross-linking)作用中的底物外,同时还可作为一种可扩散的信号诱导周围细胞的防御基因表达^[25]。本实验中,*XOO.75-1* 和浙辐 802 的互作体系在两个不同的时段出现 H_2O_2 含量突增现象,*XOO.76-25* 侵染水稻细胞后,却无第二个突跃峰出现(表1)。根据前人的观点^[26,27],*XOO.75-1* 和浙辐 802 间的互作应属于非亲和性互作,而 *XOO.76-25*

和浙辐 802 间的互作应属于亲和性互作。笔者发现,*XOO.75-1* 处理后活性氧(AO)的产生比 *XOO.76-25* 处理组要早、快、持久,这似乎是为了尽快、有效地调动植物体的防御机制,其中包括抗氧化酶。POD 和 SOD 是植物体抵抗逆境胁迫的两个重要酶。SOD 可以使 $O_2^{\cdot-}$ 歧化形成 H_2O_2 和 O_2 ,从而避免细胞受到 $O_2^{\cdot-}$ 的攻击;而 POD 的作用却具有两面性,一方面,它积极参与木质素的聚合过程,又可将 H_2O_2 转化为 H_2O 和 O_2 ,从而在维持植物体内活性氧的正常水平中起作用;另一方面,它在清除 AO 过程中,往往又导致新的活性更高的自由基的产生^[2]。本实验指出,不同毒力的稻白叶枯菌及 SA 处理后,均导致水稻悬浮培养细胞的 POD 的活性上升,而且 3 个因子的诱导效率是 $76-25 > SA > 75-1$ 。植物-病原物互作后,过氧化物酶活性的变化可能是活性氧的增加破坏了膜的正常功能而造成的后果。两种不同毒力的稻白叶枯菌菌株均使悬浮细胞的 POD 活性增加,这种现象可能是病原菌侵入后,破坏了培养细胞膜的正常结构和功能而造成选择透性的提高。因为过氧化物酶不仅存在于细胞壁上参与脯氨酸转化和木质素的形成,它还存在于细胞核、线粒体、核糖体和细胞膜中行使不同的功能,所以病原菌的侵入造成膜系统的伤害,使酶与底物能够充分接触,表现为酶促反应加速。这种结果与赵羹梅等^[13]报道的一致。

SA 在植物体内的作用受到了国内外学者的广泛注意。目前公认它是一种有效的信号分子,人们认为 SA 的重要作用可能是抑制 CAT^[28]。Chen 等在烟草中鉴定出一种具有 CAT 活性的可溶性 SA 结合蛋白(SA-binding protein, SABP)^[29]。Mulpuri 等^[30]也提出了 SA 与 H_2O_2 功能的相关性以及它们在 SAR 中相互依赖性的模式图。本研究发现 SA 能够导致 H_2O_2 的持续积累,这可能有两个方面的原因,一是 SA 能通过诱导 SOD 活性使 $O_2^{\cdot-}$ 转变成 H_2O_2 ;二是 SA 的受体具有 CAT 活性,它们的结合抑制了 CAT 活性,导致 H_2O_2 的积累。从结果上看,SA 比其他两个诱导因子能更快地提高 SOD 活性,导致 $O_2^{\cdot-}$ 含量减少和 H_2O_2 的积累。这种结果与 Kiraly 等^[31]和李兆亮等^[14]报道的一致。

同工酶可以作为一种工具用于研究植物的感和抗病问题。病原物侵染植物后,会使植物组织发生特殊的代谢变化,迅速诱导出许多种新的同工酶。同工酶类型的变化是寄主对病原物侵染的一种重要

的保卫反应,反映出被侵染后代谢途径的变化情况,从而更有效地抵御病原的侵染。本实验提出,不同诱导处理均导致 POD 和 SOD 同工酶谱发生不同程度的变化,表现出谱带增多或增强。这与许多研究者的结果一致^[3,13,14]。但是,各种因子处理后的 SOD 活性和其同工酶谱带并没有体现出一种正相关性,可能是所测定的 SOD 活性是所有同工酶活性之和,而个别小谱带的增减对其影响不大的缘故。另外,不同毒力株稻白叶枯菌菌株处理后均引起可溶性蛋白质谱带增加,它们是否可称为致病相关蛋白以及有哪些功能,有待进一步研究。

References

- [1] Dong HS(董汉松). Induced Disease Resistance of Plant: Principle and Study (植物诱导抗病性:原理和研究). Beijing: Science Press, 1995 (in Chinese)
- [2] Baker CJ, Orlandi E W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, 1995, **33**:299 - 321
- [3] Zeng F-H (曾富华), Wu Y-X(吴岳轩), Luo Z-M(罗泽民). Resistance induced by biotic and abiotic inducers to rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) and its relation to active oxygen metabolism in rice seedlings. *Chinese Journal of Rice Science* (中国水稻科学), 1999, **13**(3):165 - 169 (in Chinese with English abstract)
- [4] Zeng F-H(曾富华), Wu Y-X(吴岳轩), Luo Z-M(罗泽民), Zhou P-H(周朴华). The relationship between active oxygen metabolism and induced disease-resistance of different virulent strains in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Hunan Agricultural University* (湖南农业大学学报), 1998, **24**(6): 450 - 455 (in Chinese with English abstract)
- [5] Zeng F-H(曾富华), Wu Y-X(吴岳轩), Luo Z-M(罗泽民), Zhou P-H(周朴华). The relationship between resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and membrane lipid peroxidation induced by active oxygen species and its scavenger. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2000, **33**(4): 103 - 105 (in Chinese with English abstract)
- [6] Govrin EM, Levine A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis Cinerea* *Curr Biol*, 2000, **10**(13):751 - 757
- [7] Sandermann H Jr. Active oxygen species as mediators of plant immunity: three case studies. *Biol Chem*, 2000, **381**(8):649 - 653
- [8] Barna B, Fodor M, Káraly Z. Role of active oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Manag Sci*, 2003, **59**(4):459 - 464
- [9] Cai X-Z(蔡新忠), Song F-M(宋凤鸣), Zheng Z(郑重). Pathogenesis related proteins in plants. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1995, **31**(2):129 - 136 (in Chinese)
- [10] Zeng F-H(曾富华), Wang Y-G(王永刚), Hu M-L(胡木林), Deng M-J(邓明娇). Induction and test pathogenesis-related proteins of rice. *Journal Northwest University* (Natural Science Edition) (西北大学学报·自然科学版), 2002, **32**:17 - 21 (in Chinese with English abstract)
- [11] Wu Y-X(吴岳轩), Zeng F-H(曾富华), Wang R-C(王荣臣). A preliminary study on the relationship between induced resistance to bacterial blight and defense enzymes in hybrid rice seedlings. *Acta Phytopathological Sinica* (植物病理学报), 1996, **26**(2):127 - 131 (in Chinese with English abstract)
- [12] He C-Y(何晨阳), Wang J-S(王金生). Physiological and biochemical changes during hypersensitive response in plants. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1996, **32**(2):150 - 154 (in Chinese)
- [13] Zhao G-M(赵羹梅), Zhang P-Y(张鹏宴), Jiang X-M(蒋小满). The relationship between the activity of peroxidase and resistance of corn inbred lines to head smut. *Acta Phytopathological Sinica* (植物病理学报), 1996, **26**(1):37 - 39 (in Chinese with English abstract)
- [14] Li Z-L(李兆亮), Yuan Y-B(原永兵), Ju Z-G(鞠志国), Liu C-L(刘成连), Cao Z-X(曹宗翼). Regulation of antioxidant enzymes by salicylic acid in cucumber leaves. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1998, **40**(4):356 - 361 (in Chinese with English abstract)
- [15] Higa A, Hidaka T, Minai Y, Matsuoka Y, Haga M. Active oxygen radicals induce peroxidase activity in rice blade tissues. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, **65**(8):1 852 - 1 855
- [16] Jalloul A, Montillet J L, Assigbetse K, Agnel J P, Delannoy E, Tirantaphylides C, Daniel J F, Marmey P, Geiger J P, Necole M. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J*, 2002, **32**(1):1 - 12
- [17] Liu X-M(刘选明), Zhou P-H(周朴华), Yu P(余平). The study on the induction and synchronous control of somatic embryos in hybrid rice. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1994, **20**(4): 465 - 471 (in Chinese with English abstract)
- [18] Shen F-B(沈凤飏), Ye M-B(叶茂炳), Xu L-L(徐朗莱), Zhang R-X(张荣铄). Changes of ability of scavenging active oxygen during natural senescence of wheat flag leaves. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1997, **37**(7): 634 - 640 (in Chinese with English abstract)
- [19] Luo G-H(罗广华), Wang A-G(王爱国). Gel electrophoresis of SOD in plant and its display of activity. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1983, (6):44 - 45 (in Chinese)
- [20] Sun X-L(孙新立), Cai H-W(才宏伟), Wang X-K(王象坤). A method for studying electrophoretic variation of isozymes in rice with polyacrylamide gel. *Chinese Journal Rice Science* (中国水稻科学), 1996, **10**(1):43 - 45 (in Chinese with English abstract)
- [21] Braker J M. Catalase and peroxidase in primary bean leaves during development and senescence. *Z Pflanzenphysiol*, 1980, **97**:135 - 144
- [22] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, **44**:276 - 287
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 - 254
- [24] Dong M(董敏), Liu J-Y(刘进元). The signal transduction pathways in plant disease resistance. *Chinese Bulletin of Life Sciences* (生命科学), 1998, **10**(5):227 - 228 (in Chinese with English abstract)
- [25] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rv Plant Mol Biol*, 1997, **48**:251 - 275
- [26] Keppler L D, Baker C J, Atkinson M M. Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cultured cells. *Phytopathology*, 1989, **9**(9):974 - 978
- [27] Rogers J L, Daub M E, Huang A J. Lipid peroxidation is a consequence of elicitor activity. *Plant Physiology*, 1988, **86**:547 - 553
- [28] Yu D-Q(余迪求), Cen C(岑川), Li B-J(李宝健), Fu J-R(傅家瑞). Systemic acquired disease resistance and signal transduction in plant. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1999, **41**(2):115 - 124 (in Chinese with English abstract)
- [29] Chen Z, Ricigliano J W, Klessing D F. Purification and characterization of soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:953 - 957
- [30] Mulpuri V R, Gopinadhan P, Douglas P O, Dennis P M. Influence of soluble salicylic acid on H₂O₂ metabolizing enzymes. *Plant Physiol*, 1997, **115**:137 - 149
- [31] Káraly Z, Barna B, Kecskes A, Fodor J. Down regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radic Res*, 2002, **36**(9):981 - 991