

小麦抗条锈病过敏性坏死反应中的活性氧代谢

龙书生^{1,2}, 曹远林², 李亚玲¹, 康振生¹

(1 西北农林科技大学 植物保护学院与陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨陵 712100;

2 中国科学院 生物物理研究所, 北京 100101)

【摘要】 **【目的】**探讨活性氧在植物抗病菌侵染反应中的作用。**【方法】**以小麦洛夫林 13 为供试植物, 条锈病菌单孢菌系 CY23-2、CY25-8 和 CY29-3 为供试病菌, 从小麦与条锈病菌之间典型的过敏性坏死反应(HR)中, 探讨活性氧的积累、保护酶系活性变化和原生质膜的透性改变与过敏性坏死反应(HR)的关系。**【结果】**不亲和条锈病菌 CY23-2 和 CY25-8 侵染可引起小麦叶片内 2 个活性氧的积累高峰, 分别出现在接种后第 2 天和接种后第 5~6 天。亲和条锈病菌 CY29-3 的侵染只引起 1 个活性氧积累高峰, 出现时间与不亲和互作的第 2 个活性氧高峰期一致。不亲和互作中, 小麦叶片上产生过敏性坏死反应只出现在第 1 次活性氧突增之后, 表明第 1 次活性氧突增与 HR 的产生有关; 伴随着小麦叶片中强度极高活性氧的突增, 叶片细胞原生质膜遭到破坏, 细胞内物质外渗, 细胞不久死亡。表明高强度活性氧突增会导致细胞的死亡; 对 2 种互作体系中可清除活性氧的酶系(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶)活性分析可知, 接种后第 2 天活性氧突增的主要成分是 H_2O_2 , 接种后第 6 天活性氧突增的主要成分是 O_2^- 。**【结论】** H_2O_2 是 HR 发生的主要信号物, 超氧阴离子 O_2^- 等在细胞死亡中起着关键的作用。

【关键词】 小麦条锈病; 过敏性坏死反应; 活性氧; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 过氧化物酶

【中图分类号】 S435.121.4⁺2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0125-06

Metabolism of reactive oxygen species in the process of hypersensitive response of wheat to stripe rust

LONG Shu-sheng^{1,2}, CAO Yuan-lin², LI Ya-ling¹, KANG Zheng-sheng¹

(1 College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

Abstract: **【Objective】** This study was to understand what roles reactive oxygen species (ROS) played in the defence responses for plants to cope with pathogenic infections. **【Method】** With wheat variety Lovrin13 and three different clones of wheat stripe rust strains, namely CY23-2, CY25-8 and CY29-3, as test strains, changes of ROS, activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), enzymes that are known to detoxify ROS in plant, and permeability of cell plasma membrane were investigated in the process of hypersensitive response of wheat to stripe rust. **【Result】** The time course of ROS detected by ESR showed that avirulent or incompatible rust strains (CY23-2 and CY25-8) could cause two peaks of ROS production in wheat leaves inoculated with the strains. The first peak occurred on the second day after inoculation whereas the second peak happened on the sixth day after inoculation. However, only one single peak of ROS production was observed on the sixth day after inoculation with virulent or compatible strain, CY29-3. HR, occurred in the incompatible interaction system, associated only with the

* [收稿日期] 2009-03-10

[基金项目] 高等学校学科创新引智计划项目(No. B07049)

[作者简介] 龙书生(1964—), 男, 陕西靖边人, 副研究员, 在读博士, 主要从事玉米病害研究。E-mail: longss@163.com

[通信作者] 康振生(1957—), 男, 四川安岳人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物免疫学与分子病理学研究。

E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

early oxidative burst of ROS. This implicated that early oxidative burst could mediate the occurrence of HR. Accompanied with a big amount of ROS produced in the infected wheat leaves, cell plasma membrane could be damaged, substances in cell leaked out and cell died soon. This indicated that strong ROS could cause cell death. The activities of the three enzymes implied that H_2O_2 ought to be the major component of ROS two days after inoculation, and O_2^- could be the major component of ROS six days after inoculation.

【Conclusion】 Our study results suggested that H_2O_2 was the signaling substance in HR of wheat to incompatible rust strains and O_2^- played a major role in the process of plant cell death.

Key words: wheat stripe rust; hypersensitive response; ROS; SOD; CAT; POD

现代生物化学证据表明,植物过敏性坏死反应(Hypersensitive response, HR)引起的受侵细胞及其邻近组织快速坏死,并不是病原菌侵染造成的直接损伤,而是植物内在基因控制的抗病反应^[1-2]。在HR晚期,可以观察到细胞核的降解和核酸酶的激活,说明在植物HR中,细胞死亡过程是一种独特的细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)途径^[1-2]。近年来,人们致力于研究植物的抗病机制及其调控,并取得了长足进展,其中发现植物活性氧(Reactive oxygen species, ROS)对植物的抗病起着重要作用。病原菌侵染可破坏寄主植物体内活性氧产生与清除之间的动态平衡,引起主要包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、单线态氧($^1\text{O}_2$)和过氧化氢(H_2O_2)等活性氧的爆发(Oxidative burst)^[3]。ROS通过非酶促和酶促方式,直接攻击膜系统中的不饱和脂肪酸,启动膜脂过氧化发生和膜蛋白间的聚合,从而破坏植物细胞膜的结构与功能^[4]。而细胞中的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)等有清除ROS的作用,使ROS维持在正常水平,防止其对细胞膜的毒害,故上述各种酶称为细胞保护酶^[5]。一方面,ROS及其相关的酶直接与植物过敏性抗病反应有关,因而被认为是植物抗病防卫反应的组成部分之一^[3];另一方面,ROS作为信号物质参与植物对病菌侵染的防御反应、细胞死亡和抗病基因表达的调控等^[6-11]。可见在植物HR中,ROS作为信号物质是明确的。但关于ROS主要组成成分 O_2^- 和 H_2O_2 在植物HR中分别所起的作用,目前还没有一个明确的结论。在小麦抗条锈病过敏性坏死反应中,存在极为典型的HR细胞死亡。本试验在前人研究的基础上,从ROS积累、原生质膜的透性改变及保护酶系活性变化动态等方面,探讨ROS的产生变化及其与HR细胞死亡的关系、ROS产生的酶机理,探明小麦与条锈病菌互作中HR细胞死亡的调控手

段,以期揭示小麦HR细胞死亡的生理及分子机制,为提高小麦的抗病能力以及获得高产稳产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦品种为洛夫林13,供试条锈病菌为单孢菌系CY23-2、CY25-8、CY29-3,均由本实验室提供。CY23-2和CY25-8与洛夫林13之间的相互作用是不亲和互作(incompatible interaction),洛夫林13对其分别表现免疫和高抗;而CY29-3与洛夫林13之间的相互作用是亲和互作(compatible interaction),洛夫林13对其表现感病。

1.2 试验处理

取洛夫林13种子若干于培养皿中,加适量自来水冲洗后,浸泡24 h,中途冲洗换水1~2次。待干种子充分吸水后,在室温下保湿催芽18 h。用镊子挑选萌发一致的种子,播于直径10 cm的陶土小花盆,每盆20~30粒种子。

在接种前,预先将保存的条锈病菌CY23-2、CY25-8和CY29-3,用40℃温水活化5 min后敲开管口,置于具滤纸片的培养皿中,在滤纸上加适量蒸馏水后,于10℃、黑暗条件下保湿水化10 h。于小麦第一叶片平展期以涂抹法接种,于接种后0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 和8 d取样。对照处理以无菌水代替条锈病菌涂抹小麦叶片。每处理设置3个重复,每重复取样5~6个叶片。

1.3 ROS的测定

取小麦叶片0.25 g加入1 mL pH 7.4的0.1 mol/L PBS缓冲液(含0.32 mol/L蔗糖、10 mmol/L HEPES、0.1 mmol/L EDTA、5 mmol/L 巯基乙醇),在冰浴中研磨,4℃、12 000 r/min离心20 min,吸取上清液235 μL ,加入0.5 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、0.3 mol/L N-叔丁基苯硝酮(Phenyl N-tert-Butylnitrone, PBN)和10 mmol/L CaCl_2 各5

μL , 37℃水浴反应 1 h, 用 200 μL 乙酸乙酯抽提, 在 BRUKE 型 ER200D-SRC 顺磁仪(electron spin resonance, ESR)上测定 ROS, 调制频率 100 kHz, 调制幅度 3.2 G, 中心磁场 3 385 G, 扫宽 400 G, 扫描时间 200 s, 增益 5×10^5 。

1.4 细胞保护酶的提取及活性测定

1.4.1 酶液的提取 取 0.5 g 小麦叶片, 按 1 : 5 (m/V) 的比例加入预冷的提取液[含 10 g/L 聚乙烯吡咯烷酮和 15 mmol/L 巯基乙醇 50 mmol/L pH 6.0(SOD 用 pH 7.8) 磷酸钠缓冲液], 冰浴研磨匀浆, 4℃、12 000 g 下离心 15 min, 上清液即为酶粗提液, 用于相关酶活性的测定。

$$\text{SOD 活性}/(\text{U/g}) = \frac{\text{OD}_{560\text{对照}} - \text{OD}_{560\text{样品}}}{50\% \text{OD}_{560\text{对照}}} \times \frac{\text{样品稀释倍数}}{\text{样品质量}}。$$

1.4.3 CAT 活性的测定 反应液体积为 3 mL(含 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸钠缓冲液和 15 mmol/L H_2O_2)。在 25℃下加入 150 μL 酶液混匀, 反应 2 min 后, 于 240 nm 测定吸光度(OD_{240})。以 1 min 下降 1 个 OD_{240} 为 CAT 活性单位。

1.4.4 POD 活性的测定 反应液体积为 3 mL(含 10 mmol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲液、体积分数 0.25% 愈创木酚、100 mmol/L H_2O_2)。加入 60 μL 酶液混匀, 25℃下反应 5 min 后于 470 nm 测定吸光度(OD_{470})。以 1 min 增加 1 个 OD_{470} 为 POD 活性单位。

1.5 细胞质膜相对透性的测定

称取 0.2 g 鲜样, 用无离子水冲洗 3 次, 剪碎放入具塞试管, 并加入 10 mL 无离子水, 使叶片完全浸没在水中。将试管放于真空干燥器内, 开动真空泵抽气减压 10 min, 然后缓慢放入空气恢复常压, 使水渗入细胞间隙, 有利于细胞内电介质渗出。取出试管, 在室温下保持 30 min 并多次振荡。用 DDS-307 型电导率仪测定试管中外渗液的电导率 E_1 ; 然后将试管置于沸水浴中 10 min, 冷却后测定溶液总电导率 E_2 ; 无离子水电导率为 E_0 。细胞质膜相对透性(P)按下式计算:

$$P/\% = \frac{E_1 - E_0}{E_2 - E_0} \times 100\%。$$

2 结果与分析

观察发现, 不亲和互作小麦叶片在接种后 24 h 开始出现 HR 褪绿斑, 96~120 h HR 斑的数量不再增加, 且褪绿斑变成了枯死斑, 叶面上出现典型的 HR 反应。CY23-2 在小麦洛夫林 13 上产生极少很

1.4.2 SOD 活性的测定 反应液总体积为 3 mL(含 50 mmol/L pH 7.8 磷酸钠缓冲液、13 mmol/L 蛋氨酸、75 $\mu\text{mol/L}$ 氮蓝四唑(NBT)、2 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素和 0.1 mmol/L EDTA)。取 4 支试管, 2 支为对照管, 另外 2 支为测试管, 对照管中加入 100 μL 50 mmol/L pH 7.8 磷酸钠缓冲液, 测试管中加入 100 μL 酶液后, 置于 25℃、4 000 lx 日光灯下, 光化学反应 20 min, 然后黑暗中终止反应, 以 NBT 反应液为空白调零, 于 560 nm 处测定吸光度(OD_{560})。SOD 活性单位定义为能引起反应初速度(指不加酶提取液时)半抑制时的酶用量, 按下列公式计算:

小的 HR 斑, 有些在生长后期恢复正常, HR 斑上不产生夏孢子堆; CY25-8 在小麦洛夫林 13 上产生较多的 HR 斑, 但不产生夏孢子堆。亲和互作的小麦叶片在接种 CY29-3 后, 早期不出现褪绿斑, 至 96 h 后出现褪绿斑, 其上产生大量较大的夏孢子堆, 但褪绿斑周围无枯死反应。

2.1 小麦抗条锈病过敏性坏死反应中 ROS 的时间进程

ROS 反应性极强, 具有极高的氧化还原活性, 能与细胞中众多生物分子发生反应, 在生物体内存在时间较短。应用 ESR 自旋捕捉技术可瞬时捕捉 ROS 的存在^[12], 用 PBN 捕捉 ROS 自由基的标准图谱见图 1。图 1 中位于 2.009~1.990 的三重峰高度总值即为 ROS 的相对浓度^[13]。

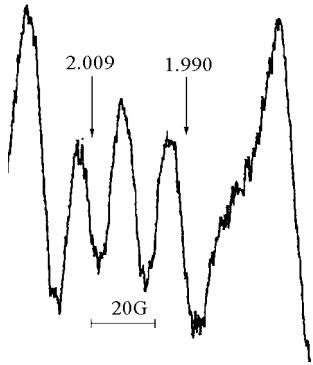


图 1 应用 ESR 技术通过 PBN 捕捉的小麦叶片中 ROS 的标准图谱

Fig.1 Spectrum of ROS spin trapped by PBN in wheat leaves detected with ESR

小麦品种洛夫林 13 接种 3 种不同致病力条锈病菌单孢菌系后, 引发的活性氧时间进程见图 2。

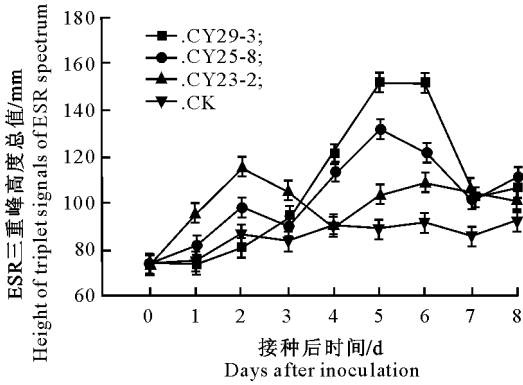


图 2 接种 3 种不同条锈病菌后小麦叶片内活性氧的变化
Fig. 2 Time course of ROS in wheat leaves inoculated with three different rust strains

从图 2 可以看出,在 3 个小麦与条锈病菌互作体系中,接种后 8 d 内 ROS 的变化趋势完全不同。不亲和互作 CY25-8 和 CY23-2 体系中 ROS 出现 2 个峰,而亲和互作 CY29-3 体系中只有 1 个峰。不亲和互作 CY25-8 和 CY23-2 体系的 ROS 在接种后迅速升高,于第 2 天达到第 1 个峰值;而亲和互作 CY29-3 体系的 ROS 接种后 2 d 变化不大,第 3 天后急速上升,于 5~6 d 达到峰值。不亲和互作 CY25-8 和 CY23-2 体系的 ROS 峰值远小于亲和互作 CY29-3 体系。虽然 2 个不亲和互作体系在条锈病菌侵染后,ROS 都出现了 2 个峰,但变化趋势有所不同。品种表现免疫的 CY23-2 侵入后,第 1 个峰高于第 2 个峰;而品种表现高抗的 CY25-8 侵染后,第 1 个峰低于第 2 个峰,且其第 2 个峰出现的时间早于 CY23-2。

对于不亲和互作体系而言,接种后第 2 天正是出现 HR 的时间,接种后第 5 天、第 6 天是坏死斑不

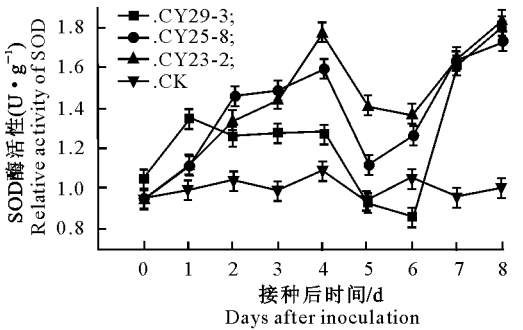


图 3 接种不同条锈病菌后小麦叶片 SOD 活性的变化
Fig. 3 Activity of SOD in wheat leaves inoculated with three different rust strains

由图 4 可见,亲和互作 CY29-3 体系的 CAT 活性在接种后迅速升高,并于第 2 天达到一个峰值,之后 CAT 活性迅速下降,在第 5 天达到最低值后逐渐

再增加的时间。对于亲和互作体系而言,第 5~6 天则是病斑产生时间。可见,ROS 积累高峰期与小麦叶片细胞坏死是同步的。

2.2 小麦抗条锈病过敏性坏死反应中与 ROS 相关酶性活的变化

SOD、CAT 和 POD 都是植物膜脂过氧化酶促防御系统中重要的保护酶。SOD 在细胞保护酶系统中的作用是清除 O_2^- 等活性氧,同时产生歧化产物 H_2O_2 ;CAT 和 POD 在保护酶系统中主要是起到酶促降解 H_2O_2 的作用。

2.2.1 SOD 活性 由图 3 可见,接种条锈病菌后,小麦叶片中 SOD 活性在不同互作体系中有不同的变化趋势。亲和互作 CY29-3 体系中的 SOD 活性,在第 1 天迅速升高后略有下降并保持平稳,到第 4 天急剧下降,第 6 天到达一个谷值,且低于对照,之后 SOD 活性急剧升高。与 ROS 的变化比较可见,在亲和互作体系中的 SOD 活性变化与 ROS 积累相反。不亲和互作 CY25-8 和 CY23-2 体系中的 SOD 活性在接种后逐渐升高,并均在第 4 天上升到一个峰值,之后迅速下降,分别在第 5、6 天达到最低值,之后又迅速升高。与 ROS 的变化比较可见,不亲和互作体系的 ROS 在出现第一个峰值时,其 SOD 活性相对较高,表明此时具有较高活性的 SOD,并没有抑制 ROS 的积累。

从图 3 中还可以看出,在接种后第 1 天,亲和互作体系的 SOD 活性较不亲和互作体系高 1 倍以上。

2.2.2 CAT 活性 接种条锈病菌后,小麦叶片中 CAT 活性在不同互作体系中具有不同的变化趋势,结果见图 4。

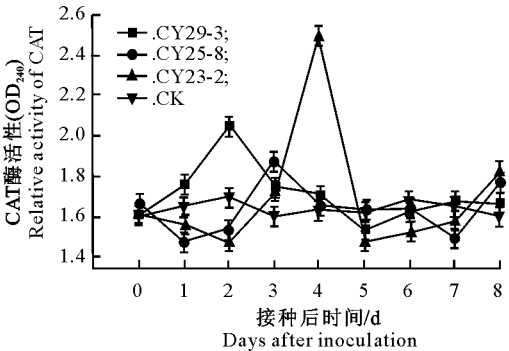


图 4 接种不同条锈病菌后小麦叶片 CAT 活性的变化
Fig. 4 Activity of CAT in wheat leaves inoculated with three different rust strains

恢复到与对照相近的水平。与 ROS 的变化比较,在亲和互作体系中 CAT 的活性变化与 ROS 的积累相反。不亲和互作 CY25-8 和 CY23-2 体系的 CAT 活

性,在接种后较对照逐渐降低,这说明在不亲和互作前期,植物体内降解 H_2O_2 的能力下降,有利于 H_2O_2 的积累;之后 2 个不亲和互作体系中 CAT 活性变化趋势不同。在小麦品种洛夫林 13 上表现免疫的 CY23-2,在接种后第 3 天,CAT 活性迅速上升并于第 4 天达到一个较高的峰值,然后急剧下降,在第 5 天达到最低值后恢复到与对照相近的水平;在小麦品种洛夫林 13 上表现高抗的 CY25-8,在接种后第 2 天,CAT 活性开始上升并于第 3 天达到一个较低的峰值后下降,在第 4 天后恢复到与对照相近的水平。

2.2.3 POD 活性 接种条锈病菌后,小麦叶片中 POD 活性在不同互作体系中发生不同的变化趋势,结果见图 5。从图 5 可以看出,在取样时间内,亲和互作 CY29-3 体系的 POD 活性出现 2 个峰值,而不亲和互作体系只有 1 个峰值,且其峰值远高于亲和互作体系。与 ROS 的变化比较,无论是亲和互作体系还是不亲和互作体系,POD 活性的变化与其 ROS

的变化没有对应关系。

2.2.4 细胞质膜相对透性 接种条锈病菌后,小麦叶片细胞质膜相对透性的变化见图 6。从图 6 可以看出,亲和互作 CY29-3 体系小麦叶片细胞质膜的相对透性,在接种后第 2 天持续增加,于第 6 天达到 100%。这与小麦叶片被条锈病菌侵染后大多细胞被破坏相吻合。在不亲和互作体系中,CY25-8 和 CY23-2 2 个体系的小麦叶片细胞质膜相对透性出现了不同的变化。虽然 2 个体系的小麦叶片细胞质膜相对透性均在接种后升高并在第 2 天达到一个峰值(高抗反应的峰值高于免疫反应),但此后的变化趋势不同。接种 CY23-2 小麦叶片的细胞质膜相对透性逐渐恢复正常(略高于对照);而接种 CY25-8 小麦叶片的细胞质膜相对透性于第 3 天下降到最低值,第 4 天又开始升高并于第 5 天稳定在 80% 左右。这与叶片被条锈病菌侵染后细胞破坏的严重程度相吻合。

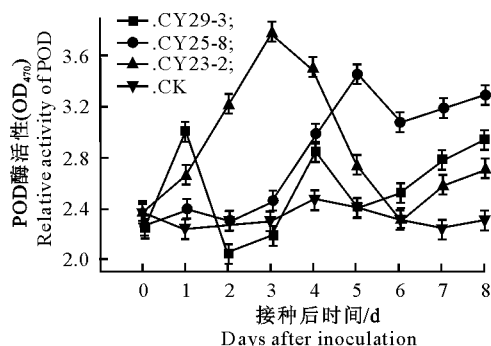


图 5 接种不同条锈病菌后小麦叶片 POD 活性的变化

Fig. 5 Activity of POD in wheat leaves inoculated with three different rust strains

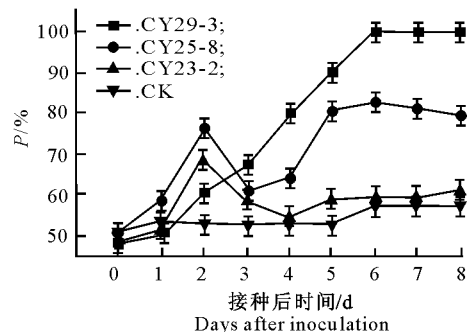


图 6 接种不同条锈病菌后小麦叶片细胞质膜相对透性的变化

Fig. 6 Relative permeability of cell plasma membrane in wheat leaves inoculated with three different rust strains

3 讨论

本研究利用小麦品种洛夫林 13 与具有不同致病力条锈病菌单孢锈菌 CY29-3、CY25-8 和 CY23-2 之间的不同互作表现,从条锈病菌侵染小麦叶片后引起的活性氧积累、保护酶系活性动态变化及原生质膜的透性改变等方面,探讨了活性氧的产生变化及其与 HR 细胞死亡的关系。结果表明,不同互作关系在条锈病菌侵染后,活性氧积累、保护酶系活性变化动态及原生质膜的透性改变是不同的。(1)由不亲和条锈病菌 CY23-2 和 CY25-8 侵染引起小麦叶片内活性氧的积累有 2 个高峰期,这与 Lamb 等^[14]的研究结果类似。其中第 1 次活性氧突增出现在接种后的第 2 天,与此时叶片上产生 HR 斑的

时间一致;第 2 次活性氧突增出现在接种后第 5~6 天,未引起 HR 反应的亲和互作体系中也在此时出现了活性氧突增。不亲和互作第 1 次活性氧突增的强度不高,不足以导致细胞死亡,但只有其出现才能产生 HR,因此第 1 次活性氧突增应该是作为信号分子诱导了防卫基因的表达。这与 Lamb 等^[14]、Levine 等^[7]、Jabs^[15]提出的活性氧作为信号分子启动了植物的抗病反应相一致。

(2)无论小麦因为感病而叶片被破坏或是因抗病而产生大量 HR 斑,都有强度极高的活性氧突增产生。伴随着小麦叶片中强度极高的活性氧的突增,叶片细胞原生质膜遭到破坏,细胞内物质外渗,细胞不久死亡。这表明高强度活性氧的突增,会导致细胞死亡。这与 Tiwari 等^[16]、Suharsono 等^[17]、

Kawasaki 等^[18]和 Bethke 等^[19]的结论一致。

(3) 尽管 SOD、CAT 和 POD 都有清除 ROS 的功能,但在不同的互作体系和不同的时间,其作用和功能是不同的。在不亲和互作条锈病菌侵染小麦后的前期,SOD 活性升高而 CAT 活性下降,超氧阴离子 O_2^- 等被歧化为 H_2O_2 ,而 H_2O_2 不被降解。在此时活性氧突增中, H_2O_2 是活性氧积累的主要形式。这也进一步证实大多数研究者认为 H_2O_2 是植物抗病信号物质的结论^[20-22]。在亲和互作条锈病菌侵染小麦后的前期,SOD 和 CAT 活性均较高,无活性氧的积累。但无论是在 CY25-8 引起的不亲和互作,还是由 CY29-3 引起的亲和互作的后期,SOD 活性均降低,此时在活性氧突增中, O_2^- 所占的比例必然增高。从接种叶片的症状可见,此时细胞的死亡加剧,由此可推测,超氧阴离子 O_2^- 在细胞死亡中起着关键作用。因此,接种条锈病菌后第 1 天,亲和互作的 SOD 活性比不亲和互作的高 1 倍多可以解释为,亲和互作前期 SOD 活性高, O_2^- 全部被歧化为 H_2O_2 (之后又被高活性的 CAT 降解),叶片中没有 O_2^- 的积累,叶片中不会出现细胞死亡;而在不亲和互作前期 SOD 活性较低,叶片中有 O_2^- 积累,细胞会死亡,于是 HR 斑在接种后 24 h 开始出现。这与 Jabs 等^[6]在病原菌诱导拟南芥突变体 *lsd1* 的失控性细胞死亡(runaway cell death)依赖于 O_2^- 的结论类似。

(4) 有研究者发现,POD 活性与活性氧爆发有关^[23]。但本研究发现,POD 对小麦 HR 中 ROS 爆发的调控作用不大。实际上,POD 活性变化与小麦 HR 斑中木质素的异常积累有密切关系^[24],活性氧爆发的激发子能诱导细胞壁木质化^[25]。细胞壁木质化可阻止病原菌入侵。

虽然本研究证实, H_2O_2 在小麦锈菌引起的过敏性坏死反应中起信号分子作用,但有关其产生部位、作用部位、运输方式、受体及下游反应等都有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response [J]. *Nature*, 2001, 411: 848-853.

[2] Danon A, Delorme V, Mailhac N, et al. Plant programmed cell death: A common way to die [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2000, 38(9): 647-655.

[3] John J G, Gary J L. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. *Plant Physi-*

ol, 2000, 124(1): 21-29.

[4] Van Camp W, Van Montagu M, Inze D. H_2O_2 and NO : redox signals in disease resistance [J]. *Trends Plant sci*, 1998, 3(9): 330-334.

[5] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 73-96.

[6] Jabs T, Dietrich R A, Dangl J L. Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide [J]. *Science*, 1996, 273: 1853-1856.

[7] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, et al. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response [J]. *Cell*, 1994, 79(4): 583-593.

[8] Vranová E, Inzé D, Breusegem F V. Signal transduction during oxidative stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 1227-1236.

[9] Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, et al. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5818-5823.

[10] Delledonne M, Zeier J, Marocco A, et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 3454-3459.

[11] De Pinto M C, Tommasi F, De Gara L. Changes in the antioxidant systems as part of the signalling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells [J]. *Plant Physiol.*, 2002, 130: 698-708.

[12] Cao Y L, Guo P, Xu Y C, et al. Simultaneous detection of NO and ROS by ESR in biological system [J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 396: 77-83.

[13] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 35-49.

Zhao B L. Oxygen free radicals and natural antioxidants [M]. Beijing: Science Press, 2002: 35-49. (in Chinese)

[14] Lamb C J, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251-275.

[15] Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 57(3): 231-245.

[16] Tiwari B S, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(4): 1271-1281.

[17] Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, et al. The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13307-13312.