

植物过氧化物酶研究进展*

田国忠¹ 李怀方² 裘维蕃²

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;

2. 中国农业大学植物保护学院植物病理系, 北京 100094)

关键词: 植物过氧化物酶; 酶结构; 分子生物学; 生理功能; 环境胁迫

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X (2001) 04-0332-13

Advances on Research of Plant Peroxidases

TIAN Guo-Zhong¹, LI Huai-Fang², QIU Wei-Fan²

(1. Research Institute of Forest Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. College of Plant Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Studies on plant peroxidases are reviewed in this paper, including enzyme types and localization, molecular structure, purification and identification and gene expression and regulation related to plant growth, development, wounding and pathogen infection etc. The physiological functions of peroxidases in plant are also discussed, which cover such as active oxygen metabolism, formation of lignin and suberin, degradation of auxin, oxidation of other compounds and responses for various environmental stresses, especially the pathogen attack.

Key words: Plant peroxidase; Enzyme structure; Molecular regulation; Physiological function; Environmental stress

过氧化物酶[peroxidase, POD, EC1.11.1.7(X)]是广泛存在于各种动物、植物和微生物体内的一类氧化酶。催化由过氧化氢参与的各种还原剂的氧化反应: $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + R$ 。植物过氧化物酶的研究可追溯到 1809 年用愈创树脂为底物进行的颜色反应。但直到一个世纪之后才开展此酶的分离和命名。已知的催化反应底物超过 200 种, 以及多种过氧化物和辅助因子。迄今被研究最深入的应首推辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)。早在 1940 年, Thorell 即用电泳方法从部分纯化的辣根组织中区分出 2 种

收稿日期: 2000-10-10, 修回日期: 2001-01-12。

* 基金项目: 国家林业局森林保护学重点实验室基金和国家自然科学基金项目(300706221)资助。

作者简介: 田国忠(1963-), 男, 副研究员, 博士。从事林木病毒和植原体病害研究。

不同的HRP,之后此酶在植物正常和应激反应代谢中发挥重要作用而受到广泛关注,并对此酶进行了大量研究,涉及酶的种类、等电点、氨基酸组成和序列、生理功能,以及基因表达和调控的分子机制等^[1-4]。迄今此酶作为一种商品化试剂也广泛用于免疫组织化学、电镜技术、酶联反应和免疫印迹等生物学研究,并成为重要的诊断试剂。

1 植物 POD 的类型划分和组织定位

按不同的标准可将植物POD划分成不同类型,根据等电点大小可分为酸性或阴离子($pI < 7.0$)中性($pI = 7.0$)和碱性或阳离子($pI > 7.0$)3种POD^[5,6];根据催化底物特性可分为愈创木酚POD、谷胱甘肽POD和抗坏血酸POD等^[7];根据植物来源不同可分为辣根POD、番茄POD、花生POD等等;根据结合状态可分为可溶态、离子结合态和共价结合态POD(或细胞壁结合态^[8,9]);根据所分离酶的生理功能则可分为木质素POD、抗坏血酸POD、伸展蛋白POD、NADH POD、IAA氧化酶、酚氧化酶、细胞色素POD和谷胱甘肽POD等;根据表达方式可分为结构组或型POD和诱导表达型POD,其中应力诱导表达POD的类型包括损伤诱导型^[10-12]、病菌诱导型^[13,14]、激素(乙烯、ABA等)诱导型^[15-17]、温度、盐胁迫等诱导型^[18]。从研究角度看,近年来多数涉及对阴离子、阳离子和中性POD的不同分子特性、生理功能、血清学关系及基因表达调控的比较研究上^[2,4]。

不同种类的POD同工酶存在明显的组织和器官专化性,其中抗坏血酸POD分别存在于叶绿体和细胞质内,二者在组成、结构、底物专化性亲和力及在纯化过程中的稳定性上有差异。木质素POD多存在于细胞壁内,许多POD可存在于细胞膜、细胞器、细胞质及质外体内。根据其组织专化性常称为线粒体POD、叶绿体(类囊体)POD、液泡POD、胞间和胞内POD等^[18,19]。

2 POD 分子结构特点

POD是一种由单一肽链与卟啉(protoheme IX)构成的血红素蛋白(hemoprotein),脱辅基蛋白分子(apoprotein)须与血红素结合才构成全酶(holoenzyme)。参与植物POD血红素的合成部位可能象动物一样是在线粒体上^[3]。HRP与氯POD(chloroperoxidase)的血红素在结构上存在差异。前者为咪唑轴配体(imidazole axial ligand),带电荷和极性结构,有利于O-O键的裂解,相对较远的卟啉铁避免了氧化转移反应,暴露的边缘促进了电子转移反应;而后者则为硫化轴配体(thiolate axial ligand),其活性反应特性介于细胞色素P-450和HRP之间^[20]。但也发现细菌的氯POD不需卟啉和金属离子即可催化产生抗真菌化合物hypohalites和peracetic acid^[21]。

多数植物POD能与碳水化合物结合成为糖基化蛋白,而植物抗坏血酸POD和真菌细胞色素cPOD及高等动物POD则无碳水化合物成分。多数HRP同工酶都含有15%~17%的碳水化合物,少数同工酶仅含有7%的碳水化合物。糖基化有避免蛋白酶降解和稳定酶蛋白构象的功效^[22]。糖基化发生位点在高尔基体上。糖基化碳水化合物的结构与相同结构和特点的酶蛋白结合会产生类似同工酶现象^[23]。

POD蛋白的分子量约为35 kD左右,约由300个左右氨基酸残基组成,其中存在酸碱催化域(acid/base catalysis domain)和血红素结合区域(ligand of heme)^[24],常含8个半胱氨酸、2个葡萄糖胺、约8个糖和2~6个糖基化位点、一个原高铁血红素(protohe-

matin) 和 2 个钙离子, N-端为吡咯烷酮羧酸, C-端为精氨酸。但抗坏血酸 POD 和细胞色素 c POD 缺少相应的半胱氨酸残基。等电点范围在 pI 3.5~10 之间。此酶钝化温度为 95~100, 时间 10 min 以上, 在酶粗提液中 POD 的热钝化温度往往与加热时间呈为非线性关系, 这与不同热稳定性的 POD 存在有关^[25]。某些同工酶在 pH 10, 甚至个别同工酶在 pH 14 时仍具有 90% 的活性。从白腐菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 分离的去磷酸化的木质素 POD 不影响以藜芦醇为底物的催化反应^[26]。

从辣根分离的 POD 含有近 30 种同工酶(或同型物), 它们是由多个基因编码的。其中培养的细胞中鉴定出至少有 5 个基因, 有 3 个基因定位于染色体上^[1]。 *psk1*、*psk2* 和 *psk3* 编码相同大小的肽链(308 氨基酸残基 aa), 氨基酸序列同源性的 91%~94%, 功能氨基酸包括 His⁴⁰, His¹⁷⁰, Tyr¹⁸⁵, Arg¹⁸³ 及二硫键合的 Cys 在这 3 种同工酶中是保守的, 但某些糖基化位点有差别。 *prxC1* 和 *prxC2* 串连在染色体 DNA 上, 每一个基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成^[1]。 *prxC2* 和 *prxC3* 分别编码 347 和 349 个 aa, *prxC1a* 和 *prxC2* 的同源性为 71%, 而 *prxC1a* 和 *prxC3* 的同源性为 66%, 并且发现这些基因与从大肠杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 的 *prx* 同源性很低, 酵母细胞色素 c *prx* 和基菌木质素 *prx* 与 HRP 的同源性也低于 30%。用 HRP cDNA 探针筛选出的拟南芥基因 *prxCa* 和 *prxEa* 也含有 4 个外显子和 3 个内含子, 其中 *prxEa* 基因的每个外显子长度与 *prxC3* 相同, 且有 89% 的氨基酸序列同源性, *prxCa* 与 *prxC1b* 同源性达 91%, 二者的氨基酸同源性为 64%, 其 mRNA 的转录信号在根部被检测到, 而在茎和叶中则不存在^[27]。 Hertig 等^[28] 的研究显示, 从小麦上分离的诱导型 POD 基因有 2 个内含子, 2 个外显子编码 312 个氨基酸的分子量为 32382 的酶蛋白, 这 2 个内含子也存在于番茄和辣根 POD 基因的相似位置上; 而来源于真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 的木质素 POD 的 5 种同工酶的 N-端氨基酸序列显示了不同基因表达产物^[26]。

对培养的花生细胞阴离子和阳离子 POD 同工酶的氨基酸组成、血红素吸收谱、专化酶活性、相对含量和血清学关系进行的分析比较显示, 二者的物理化学特性相近。 2 种 POD 的抗血清存在交叉反应现象, 说明二者至少在结构上存在部分相似性^[29]。比较抗坏血酸 POD、细胞色素 c POD 和愈伤木酚 POD 的分子结构和催化特性可以发现, 3 种酶具有类似的分子量, 都含有辅基(prosthetic group), 在近丝氨酸区域的序列同源性高。但从 Fe 含量和 EPR 光谱分析显示除了原卟啉外, 铁结合于氨基酸残基上而非硫上。具有不同等电点、底物专化性和碳水化合物含量的 HRP 和萝卜 POD 结构上仅有 49% 的同源性^[18], 但在进化上与酵母细胞色素 c POD 基因具有相同的起源。有研究发现植物 POD 与动物 POD 有完全不同的蛋白折叠方式。比较不同植物 POD 时发现, 中性和碱性 HRPc、萝卜酸性 POD、烟草酸性木质素 PODa、马铃薯块茎酸性木栓化 POD 和大麦中性至碱性 POD1 之间具有明显的同源性, 而且与真菌、酵母和细菌的 POD 也有同源性^[30, 31]。 Miller 等^[32] 的研究结果显示豌豆胞质抗坏血酸 POD 与叶绿体抗坏血酸 POD 同源性较低(30%), 与其他典型 POD 也具有较低的同源性, 但与酵母细胞色素 c POD 有 40% 同源性, 与拟南芥胞质抗坏血酸 POD 有 79% 的同源性。

由于 POD 蛋白表面区域变化很大, 因而用不同来源的 POD 或不同种类 POD 作为抗原制备的抗血清进行的血清学反应出现很大差别^[9]。用花生培养细胞的一种阳离子 POD

制备的抗血清与其阴离子 POD 无交叉血清反应^[33], 与矮牵牛阴离子 POD 也无血清反应^[34]。有研究用同源抗血清处理 POD 可抑制其酶活性^[29, 35, 36]。Lee 等^[6]用阳离子 POD C3 和阴离子 POD A3 抗血清与其它同工酶进行的比较结果显示, C1 和 C3 有一致的免疫特性, 而与阴离子 A1、A2、A_{3n}和 A3 无免疫反应; A2 与 A1 有部分免疫反应, 但与 A_{3n}和 A3 无交叉反应, 说明他们为不同的免疫簇。另外, 许多研究采用抗血清对 POD 进行组织免疫定位研究^[37, 38]。

3 酶的分离、纯化和鉴定

对于酶蛋白, POD 可以用常规酶抽提和纯化方法加以分离和纯化, 包括硫酸铵沉淀或丙酮沉淀、透析、阴离子和阳离子交换柱层析、凝胶过滤、以及各种电泳技术分离和鉴定。抽提用缓冲液多为磷酸盐、醋酸盐、Tris-Cl 或 Tris-Mes 缓冲液; pH 值范围在 5.5~7.5 之间。抽提液中常加入二硫苏糖醇(DTT)或 2-巯基乙醇、抗坏血酸等抗氧化剂, 不溶性聚乙烯吡咯烷酮可除酚类物质, 加入苯甲磺酰氟(PMSF)抑制蛋白降解, 用牛血清白蛋白(BSA)等稳定蛋白等^[39-42]。但也有研究报道抗坏血酸、二硫苏糖醇(DTT)和 2-巯基乙醇能钝化 POD 和破坏其肽链结构^[43], 其中, 抗坏血酸和 DTT 可使韩国分离的 HRP 裂解产生 30 kD、23 kD 和 18 kD 的无活性的片段。80% 饱和度的硫酸铵足以沉淀植物组织中的大部分 POD 酶蛋白, 丙酮沉淀法对 POD 酶活性影响也不大^[44, 45]。羧甲基(CM)纤维素等阳离子交换剂和 DEA E 纤维素等阴离子交换剂常被用来分离和纯化阳离子和阴离子 POD, Sephadex G 系列和 Sephacryl 系列凝胶过滤介质也被广泛用于 POD 的分离和纯化^[40, 46, 47], 此外 Mono S 柱, phenyl Superose 等也被用于此酶的纯化。用伴刀豆凝集素 A (concanavalin A) 柱与糖蛋白的亲合特性, 可以将 POD 与非糖基化蛋白加以分离^[40, 48, 49], 并用 Schiff 试剂加以鉴定。需要特别注意的是与愈伤木酚 POD 相比, 抗坏血酸 POD 很不稳定, 尤其是在缺乏电子受体的情况下更不稳定, 如在无抗坏血酸时, 叶绿体内的 POD 半衰期低于 30 s^[50], p-chloromercuribenzoate 也可使此酶失活^[51]。因而在测定此 POD 时, 必须加入抗坏血酸; 因为愈伤木酚 POD 与 H₂O₂ 产生的酚和羟基自由基能迅速氧化抗坏血酸, 故需要通过凝胶过滤或透析去除低分子干扰物质^[52]。Miyaka 等^[53]的研究结果显示当抗坏血酸浓度在微摩尔水平范围内时, 此酶会迅速失活, 其原因是此浓度的抗坏血酸自身氧化反应产生了纳摩尔水平的 H₂O₂ 从而导致血卟啉中间体的降解。

为了分离不同结合态的 POD, 可采用低浓度的缓冲液(0.02~0.1 mmol/L)抽提可溶态组分, 而采用高盐缓冲液(1~3 mol/L NaCl 或 KCl, 或 3 mol/L LiCl, 或 0.2~0.4 mol/L CaCl₂)抽提离子结合态 POD, 用 2.5% (P/V) 果胶酶和 0.5% 纤维素酶(P/V) GF 20 处理植物组织残渣, 可抽提与细胞壁共价结合的 POD^[9, 10, 47, 54]。用高效液相色谱可以纯化 POD 多肽片段。纯化后的样品可用于氨基酸组成分析和序列测定及指纹图谱分析^[55, 56]。

根据 POD 血红素蛋白具有 403 nm (heme 吸收峰)和 280 nm 2 个吸收峰的特性, 可用 RZ 值(OD_{403 nm}/280 nm)来判断 POD 纯度。但不同的同工酶具有不同的 RZ 值^[3]。Lee^[57]报道 IAA 可诱导 HRP 光谱吸收峰从 403 nm 短暂跳跃到 418 nm, 8 min 逐渐降低, 据此推测 HRP 参与催化 IAA 降解, 可能形成了 HRP 中间体。

各种电泳分离技术不仅可用于分离和鉴定 POD 同工酶,也可以用作鉴定酶蛋白纯度的方法。非变性的酸性和碱性 PAGE,可分别用来分析阳离子和阴离子 POD 同工酶。等电聚焦(IEF)可用来分离、纯化和鉴定不同等电点的同工酶,而制备 IEF (preparative IEF)可用于大量纯化 POD^[25]。SDS-PAGE 则可于测定纯化酶蛋白的分子量和鉴定酶纯度^[5,46,47,58]。将电泳和免疫技术结合的 Western blot 则用于同工酶的免疫特性分析。但值得注意的是,在离体条件下,POD 活性的结果并不一定完全代表此酶在原位的情况。分离和纯化酶过程会改变(降低或增加)酶的活性。许多所分离的 POD 能与多种底物反应,可能已远远超出了此酶在植物体内正常生理功能范围。POD 酶活性常用的底物有愈伤木酚、联苯胺、联大茴香胺、抗坏血酸等,特别功能 POD 酶的鉴定需要更专化的底物^[23,27]。

4 酶蛋白基因表达与调控的分子生物学

具生理功能的 POD 涉及 3 个组分的合成。脱辅基蛋白组分主要在粗糙内质网上合成,血红素组分主要在线粒体上以谷氨酸为前体合成,而糖基辅基组分是在高尔基体上进行多肽加工过程中渗入的^[3]。

在高等植物体内,编码 POD 同工酶的基因多达 40 余个,而且还存在转录后的修饰产生的类似物。各种内因(基因调控、激素或离子调控)和外因皆可作用于同工酶基因的表达。基因表达产物和加工方式的差异最终反映是在化学组成和功能上存在差异的各种同工酶的形成,包括新的不同酶蛋白的从头合成、等电点、酶反应速度、底物专化性、酶的细胞和组织定位等的改变及抑制剂或辅助因子的产生等。外因包括光及其它放射线、重力作用、各种胁迫(干旱、盐碱、温度变化等)、衰老、生态环境变化及病菌侵染等因子的单独或综合作用对酶蛋白基因表达调控作用也受到广泛关注。用培养的花生细胞研究结果显示,细胞内的血红素组分的合成量远大于酶蛋白组分的合成量,而不成为限制因子,但血红素可能对脱辅基蛋白的合成起调节作用^[3]。采用低离子强度和高离子强度的缓冲液分离的 POD 常被看做是不同的同工酶,但用抗体沉淀结果暗示了 2 个组分为糖蛋白形成的两个不同阶段。

一般来说,专一性 POD 活性(specific POD activity)的增加可以看作是 POD 酶的合成量的增加。采用专一性抗体免疫沉淀可以鉴定分子,而不考虑其酶活性,故可以用于酶蛋白的基因表达研究。关于 POD 的诱导表达机制则需用 cDNA 探针来分析 POD 基因结构,mRNA 转录和蛋白翻译,其中抗体筛选和根据 POD 保守区域合成寡核苷酸探针是 POD 基因分析的主要手段^[24,46]。Kawaoka 等^[10]克隆了 4 个编码 HRP 的 cDNA;其中 *prxC_{1a}* 和 *prxC_{1b}* 编码中性同工酶,*prxC₂* 和 *prxC₃* 编码碱性蛋白。用基因探针进行的 Northern blot 分析结果显示只有 *prxC₂* 的 mRNA 可由损伤诱导表达。将 4 个基因分别与 *Gus* 基因构建嵌合基因表达载体,转化烟草,结果只有含 *prxC₂* 基因的烟草受损伤而诱导 *Gus* 基因的表达。

POD 蛋白基因表达的组织、发育及诱导表达特点也可通过对 mRNA 的杂交分析、构建与 *Gus* 基因嵌合体转化植物及通过反义 RNA 策略加以了解^[28,46,48,59-62]。在水稻的不同组织中,2 种同工酶合成的 mRNA 水平可由损伤和乙烯处理所诱导^[48]。50 mmol/L NaCl 处理番茄可以引起一种 POD mRNA 的增加,而且这种增加只有根的表皮和内皮层内可

检测到^[63]。Roberts 等^[55]用克隆的马铃薯阴离子 POD 的 cDNA 探讨分析马铃薯和番茄的 mRNA 转录过程发现, 在未损伤的马铃薯果实中检测不到相应的 mRNA, 损伤后 1 d 可检测到 mRNA, 至第 4 d 达到最大值, 然后逐渐降低。用此探针对番茄的分析结果与马铃薯情形类似, 而且这种 mRNA 的变化与其木栓化作用相吻合, 将马铃薯愈伤组织放在含有 10^{-4} mmol/L ABA 的固体琼脂培养基上, 2 d 后可检测到 mRNA 转录, 8 d 达到最大值^[16]。Lagrimini 等^[61]用反义 RNA 策略获得的转基因烟草其阴离子 POD 基因表达水平低 1 600 倍, 并发现转基因植株的后代植株高生长增加, 提前开花, 而过去研究获得的超量表达 POD 的转基因植株则表现为植株矮化、开花延迟、种子发芽率降低。

许多研究证实植物损伤诱导基因表达是在转录水平上的调控, 涉及调控转录因子与启动子区域的特异顺式元件的相互作用对上述的 *prxC2* 的启动子区域 5 端的缺失分析显示, 从翻译起始位点开始的 -296 bp 和 283 bp 之间存在一个与环境应力相关的顺式元件, 含有一个 G-box 核心区域(CACGTG), 其另一个顺式元件在 -177 bp 和 -134 bp 之间含有与 PAL-box 相似的序列, 通过此序列, 核蛋白被结合其上^[64]。

用 PoX381 探针进行的 Northern blot 分析结果显示, 小麦感染白粉菌 (*Erysiphe graminis f. sp. hordei*) 12~14 h 可检测到 103 kb 的杂交带, 而未感染的对照则无此杂交带, 从而证明克隆的 cDNA 代表了病原诱导型基因的 mRNA^[65]。用从大麦中获得的编码阳离子 (pH 8.5) 同工酶的 cDNA 探针研究大麦感染上述白粉菌后的 POD 基因的表达时发现, mRNA 积累开始于接种后 5 h, 24 h 达到最大值, 然后逐渐降低。这种时间进程与 pH 8.5 同工酶活性变化相吻合。用抗体免疫胶体金进行的组织定位结果显示其参与了病原诱导的乳突中酚类化合物的沉积过程, 因而发挥了普通的非专业化性防卫反应^[66]。由柑桔裂皮病类病毒诱导表达的 *Cevi-1* POD 基因编码木质素 POD, 用类病毒接种番茄 2 周后可诱导此 mRNA 的积累, 此时与顶部叶片的症状出现相吻合。mRNA 的积累主要发生在被感染的叶片, 茎部次之, 而根部则积累较少。用 1 mmol/L 乙烯利处理未感染的番茄 6 h 后, 即可检测出 mRNA 的积累, 48 h 达到顶峰, 因而推断乙烯作为一种小分子激素很可能是类病毒与植物相互作用的中介体^[14]; 携带甘薯阴离子 POD cDNA 的转基因烟草细胞系的 POD 与植物叶片 POD 活性有相当大的不同, 因而推测离体细胞的 POD 代谢调节方式可能与完整植株有所不同。

5 酶的生理功能及与环境胁迫的关系

POD 作为植物细胞内重要的组成成分, 具有许多非常重要的生理功能。由于其成分和结构的复杂性, 同工酶的多样性, 以及多基因编码特点, 造成对其功能的认识尚不全面。迄今已肯定的功能可包括以下几个方面。

5.1 参与活性氧代谢过程

分子氧 (O_2) 是相对无活性和对生物无毒性的, 一旦氧分子的电子分布发生改变, 其结构即变成活性氧。活性氧的种类包括过氧化氢 (H_2O_2), 羟自由基 (OH^\cdot), 超氧阴离子 (O_2^-) 3 种。在活性氧代谢过程中, POD 发挥了重要作用。在细胞壁中的 POD 可催化 NADH 或 NADPH 或 NADPH 氧化产生 O_2^- , O_2^- 进一步歧化为 H_2O_2 和分子氧^[67, 68]。 H_2O_2 是一种相对稳定的分子, 能够通过细胞壁运动, POD 和过氧化氢酶一样都具有代谢

H₂O₂ 的功能, 由酚底物还原形成的自由基聚合形成木质素(lignin)。在植物叶中不存在愈伤木酚 POD, 抗坏血酸 POD 承担清除光合作用过程中产生的过量的 H₂O₂ 保护叶绿体的功能^[69], 此酶使抗坏血酸氧化为脱氢抗坏血酸。

已知植物在与病原相互作用过程中广泛存在着活性氧爆发(active oxygen burst)现象^[69-71], 这种现象已被看作是植物防卫反应机制的一部分, 常与程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)或过敏反应(HR)密切相关, 象 H₂O₂ 可能作为防卫反应信号传导的分子发挥作用^[72]。其中 H₂O₂ 在植物抗病中的作用是多重的, 包括对真菌孢子萌发的直接抑制作用和诱导一系列的防卫反应^[67, 73]。将编码葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)的基因导入马铃薯可使体内 H₂O₂ 含量增加, 从而诱导水杨酸的成倍增加和阴离子 POD mRNA 的积累^[74]。刘曼西和 Kolattukudy^[75]的报道也证明病原真菌激发子和外源 H₂O₂ 均可促进番茄细胞中阴离子 POD 酶的基因转录。在烟草花叶病毒感染烟草产生 HR 过程中可诱导胞质抗坏血酸 POD 基因转录, 低氧可降低此基因表达; 而通过增加细胞的活性氧产生可模拟病菌诱导的基因表达^[76]。

5.2 参与木质素和木栓质的合成

木质素和木栓质的积累与 POD 活性增强之间的关系已被许多试验所证实^[77]。其中酸性 POD 被认为参与木质素和木栓质(suberin)合成^[3, 40, 78]。红光处理蚕豆幼苗可引起皮层细胞外 POD 活性增强和木质素的积累^[79], 但也有碱性 POD 参与木质素合成的报道^[17]。导入阴离子 POD 基因的烟草茎部组织中木质素的水平也升高^[80]。木质素被认为是抵抗病原侵入和扩展的重要防卫手段^[77, 81], 象病菌 *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* 的细胞壁糖苷可诱导酚类聚合物的大量积累, 而这种积累过程伴随着阴离子 POD 特异同工酶活性迅速和大量的增强^[78]。在千日红复状分子(tracheary element)分化过程中, 细胞壁结合的 POD 参与了次生细胞木质素积累的加厚过程^[47]。Imberty 等^[82]研究发现杨树韧皮部和木质部分离的一种阴离子 POD 具有高的 syringaldazine 氧化酶活性, 这种反应参与了木质素形成的最后阶段。

5.3 参与生长素的降解

由 POD 参与的吲哚乙酸的氧化分解功能早已被注意。多数研究将氧化吲哚乙酸看成是 POD 的功能之一^[22, 27, 57]。但也有研究发现某些酶氧化 IAA 不需要 H₂O₂ 的参与, 甚至 H₂O₂ 抑制酶活性, 故将其作为独立的吲哚乙酸氧化酶(indole acetic acid oxidase, IAAO)^[63, 83-85]。Krylov 等^[86]的研究发现在正常的 IAA 氧化过程中, 加入 H₂O₂ 时, 阿魏酸可抑制 IAA 氧化作用, 其原因可能与阿魏酸被氧化和自由基浓度过度增高有关。Converso 等^[23]的研究显示, 从小麦中分离的 3 种同工酶 C1、C2、C3 都可以在缺少任何辅助成分的情况下氧化 IAA, 但 Mn²⁺ 和间苯三酚可激活 C1 和 C2 的活性, 但对 C3 无效。过氧化氢酶对此反应无抑制作用, H₂O₂ 对 C1 和 C2 氧化无明显作用, 但可提高 C3 活性。

关于 IAA 被 POD 氧化的机制, 包括酶与底物形成中间复合体的过程, 已有一些研究报告^[87, 88], 但仍有许多问题有待澄清。其中涉及到专一性酶催化吲哚核的氧化而形成氧化吲哚乙酸(OXIAA)和其侧链的氧化脱羧 2 条途径。许多植物的 POD 已被证明具有催化 IAA 氧化脱羧, 从而形成 indole-3ylmethanol 或 3-methylindole 的能力^[63]。有研究报告, 只有由卟啉和脱辅基蛋白共同组成的全酶才具有 IAAO 活性^[57, 89], 但也有研究发现

去掉卟啉组分的脱辅基蛋白也具有 IAA 氧化活性,只是需要加入 Mn^{2+} 、 Ce^{2+} 等金属离子、P-香豆酸和二氯酚化合物^[27, 90]。采用等电聚焦酸性和碱性 PAGE 对 POD 同工酶所具有的氧化 IAA 功能的研究也发现,并非所有的 POD 同工酶带都具有强 IAA 氧化能力,或表现出与 POD 一致的酶活性。某些 POD 活性很强的带,其氧化 IAA 的活性却不高。Marco 等^[38]用烟草细胞培养进行的 5 种碱性和 2 种酸性 POD 的分离纯化和鉴定研究结果显示,只有碱性组分 POD 具有氧化 IAA 的功能,且此组分主要位于根皮细胞和韧皮部细胞内。Vande Berg 等^[34]比较纯化的花生阳离子 POD (44 kD) 和矮牵牛阴离子 POD (36 kD) 结果发现阴离子 POD 的过氧化物氧化活性明显高于阳离子 POD。阳离子 POD 在 pH 3.6 具有氧化 IAA 的最大活性,而阴离子 POD 的 pH 值为 7.0,且需要加入 H_2O_2 和二氯酚。而一般认为,阳离子 POD (碱性或称高等电点 POD) 与 IAA 的亲合力强于阴离子 POD^[2, 83, 89, 91],而阴离子 POD 可能主要参与木质素的合成。但也有少数阴离子 POD 氧化 IAA 的研究报道^[27]。

已知 IAA 在调节植物细胞伸长、细胞分化向性反应、顶端优势、生根、休眠、开花、春化作用、生物节律等方面的重要作用,所以用 POD/IAAO 介导的 IAA 的波动引发的生理效应将是非常深刻的^[92]。在植物受病原侵染过程中 POD 变化与引起的症状发展之间的关系已经被注意到^[93, 98],也有研究分离和鉴定出专一性 IAAO^[44]。病原诱导寄主体内 POD 活性的升高与 IAA 代谢之间的联系尚需引起更多的关注。估计 IAAO 的变化,对 IAA 水平的影响可能涉及到植物与病原相互作用的各个层面,象丛枝、组织肥大、植株矮化等病状的产生等^[80, 99, 101]。

5.4 参与其它物质的氧化过程

许多体外试验发现,POD 可参与催化谷胱甘肽、NADH、DTT、草酰乙酸、氢醌、酪氨酸、阿魏酸等酚类化合物的氧化^[39, 102]。POD 可氧化酪氨酸为 dityrosine, isodityrosine 和 polytyrosine, 当去掉卟啉和碳水化合物成分的酶蛋白不能氧化酪氨酸,这种氧化作用与细胞壁伸展蛋白的偶联有关^[22],与伸展蛋白相关的 POD 降低可降低细胞壁强度,促进细胞膨大和植株生长,相反则可能有助于增强对病菌的抗性。Badiani^[39]发现小麦幼苗可溶性 POD 同工酶具有酚氧化酶活性;而且发现这种氧化反应受抗坏血酸的影响,即抗坏血酸可抑制由 POD 催化的酚类物质的氧化。Henniksen 等^[102]用 X 射线解析 HRP-阿魏酸二元复合物和 HRP-氰化物-阿魏酸三元复合物的结构时发现,在 HRP 中的芳香化合物受体结合区域具有可塑和溶剂暴露区域,这一区域使溶剂分子和小的酚类化合物快速交换,其中远端的精氨酸(Arg38)具有底物氧化和配体结合功能。将氯 POD (chloroperoxidase) 基因导入烟草可使植物产生 hypohalite 和 peracetic acid,从而产生了对炭疽病的抗性^[19]。大麦 POD *prx* 基因参与了抗真菌物质的合成^[103]。POD 多重功能的不断发现说明了其生物效应的多样性和复杂性。由于实现这些不同功能需要不同的辅助因子,因而在植物体内正常代谢过程中可能会通过各种因子的不同作用而发挥其差别调节作用。

5.5 生理功能与环境胁迫的关系

除了与植物正常代谢和生长发育相关的结构型 POD 外^[41, 58, 92, 104~106],很大部分 POD 的合成属于诱导表达型^[32, 107~109]。这已为大量的胁迫处理试验和在分子水平上的基因调控研究证据证实。在上述的 POD 生理功能中,多数是与某种或多种胁迫作用导致细胞膜

的损伤和破坏,细胞的空间结构被打破,以及损伤信号的转导等一系列生理生化变化有关^[89,110]。原来认为只有动物具有谷胱甘肽 POD,后来从柑橘植株中也克隆出与动物具有同源性的 POD 基因,此基因的表达与盐应力诱导有密切的关系^[111]。其中关于 POD 与植物病害抗性的关系研究最为广泛和深入^[11,17,71,112-116]。植物活性氧爆发、木质素合成、多种氧化反应等都与对各种病菌的防卫反应密切相关^[117-119]。Svalheim 等^[120]的研究显示,黄瓜感病品种和抗病品种对病菌(*Cladosporium cucumerinum*)的侵染诱导 POD 合成的差异主要在于抗病品种 POD 的增加比感病品种迅速,而且认为病菌的侵染过程与机械损伤的诱导机制类似。虽然许多研究并未建立起 POD 变化与植物抗性间直接的联系,但很多现象和规律都可以用前述的 POD 生理功效加以解释或分析,也可能存在一些未被揭示的 POD 作用机制。

参考文献

- [1] Fujiyama K, Taakemura H, Shibayama S, *et al*. Structure of the horseradish peroxidase isozyme *c* genes. *Eur J Biochem*, 1988, **173**: 681-687.
- [2] Siegel B Z. Plant peroxidases—an organic perspectives. *Plant Growth Regulation*, 1993, **12**: 303-312.
- [3] Van Huyster R B. Some molecular aspects of plant peroxidase: biosynthetic studies. *Ann Rev Plant Physiol*, 1987, **38**: 205-219.
- [4] Obinger C, Burner U, Ebemann R. Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. Proceedings: IV International Symposium 1996. Vienna: University of Agriculture, 1996.
- [5] Burel C, Berthe T, Mery J C, *et al*. Isoelectric focusing analysis of peroxidases in flax seedling hypocotyls grown in different light conditions. *Plant Physiol Biochem*, 1994, **32**: 853-860.
- [6] Lee M Y, Choi Y, Kim S S. Purification and immunological relationships of six radish isoperoxidases. *Plant Physiol Biochem*, 1994, **32**: 259-265.
- [7] Asada K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, 1992, **85**: 235-241.
- [8] Sato Y, Sugiyama M, Takashi S, *et al*. Purification of cationic peroxidases bound ionically to the cell walls from the roots of *Zinia elegans*. *J Plant Res*, 1995, **108**: 463-468.
- [9] Quesada M A, Tigier H A, Bukovac M J, *et al*. Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases. *Physiol Plant*, 1992, **79**: 623-628.
- [10] Kawakawa A, Kawamoto T, Ohta H, *et al*. Wound-induced expression of horseradish peroxidase. *Plant Cell Reports*, 1994, **13**: 149-154.
- [11] Lagrim L M, Rothstein S. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*, 1987, **84**: 438-442.
- [12] Brownleader M D, Hopkins J, Mobasher A, *et al*. Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta*, 2000, **210**: 668-676.
- [13] Mensen R, Hager A, Salzer P. Elicitor-induced change of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspension-cultured spruce (*Picea abies*) cells and attenuated by auxins. *Physiol Plant*, 1998, **102**: 539-546.
- [14] Vera P, Tornero P, Corejoro U. Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 1993, **6**: 790-794.
- [15] Morgens P H, Callahan A M, Dunn L J, *et al*. Isolation and sequencing of cDNA clones encoding ethylene-induced putative peroxidases from cucumber cotyledons. *Plant Mol Biol*, 1990, **14**: 715-725.
- [16] Roberts E, Kolattukudy P E. Molecular cloning, nucleotide sequence, and abscisic acid induction of a suberization-associated highly anionic peroxidase. *Mol Gen Genet*, 1989, **217**: 223-232.
- [17] Quiroga M, Guerrero C, Botella M A, *et al*. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol*, 2000, **122**: 1119-1127.
- [18] Prosd T, Anderson M D, Stewart C R. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling acclimated maize seedlings. *Plant Physiol*, 1995, **108**: 1597-1505.
- [19] Zapata J M, Sabater B, Martin M. Identification of a thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone. *Phytochemistry*, 1998, **48**: 1119-1123.
- [20] Dawson J H. Probe structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*,

- 1988, **240**: 433 - 439.
- [21] Rajasekaran K, Cary JW, Jacks T J, *et al*. Inhibition of fungal growth in planta and *in vitro* transgenic tobacco expressing a bacterial nonheme chloroperoxidase gene. *Plant Cell Reports*, 2000, **19**: 333 - 338.
- [22] Zheng X, Van Huystee A B. On tyrosine oxidation by cationic POD. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1991, **25**: 35 - 44.
- [23] Converso D, Fernandez M. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties. *Phytochemistry*, 1995, **40**: 1 341 - 1 345.
- [24] Buffard D, Breda C, Van Huystee, *et al*. Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 8 874 - 8 878.
- [25] Clemente E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochem*, 1998, **49**: 29 - 36.
- [26] Rothschild N, Hadar Y, Dosoretz C G. Lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium* can be enzymatically dephosphorylated. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 857 - 861.
- [27] Intapruk C, Yamamoto K, Sekine M, *et al*. Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *A. nidulans*. *Plant Cell Rep*, 1994, **13**: 123 - 129.
- [28] Hertig E, Rebamm G B, Dudler R. Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, 1991, **16**: 171 - 174.
- [29] Hu C, Krol M, Van Huystee R B. Comparison of anionic with cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1990, **22**: 65 - 70.
- [30] Welinder K G. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase: amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, a complete sequence, and some structure characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur J Biochem*, 1979, **96**: 483 - 502.
- [31] Welinder K G. Plant peroxidases—their primary, secondary and tertiary structures and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur J Biochem*, 1985, **151**: 447 - 450.
- [32] Miller R, Zilinskas B A. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 21 802 - 21 807.
- [33] Van Huystee R B, Maldonado B. Some physico-chemical properties of a major cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Physiol Plant*, 1982, **54**: 88 - 92.
- [34] Van den Berg B M, Chibber R N, Van Huystee R B. A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from petunia. *Plant Cell Rep*, 1983, **2**: 304 - 307.
- [35] Van Huystee R B, Zheng X H. Cationic peanut peroxidase and the oxidation of ferulic acid. *Phytochemistry* 1993, **34**: 933 - 939.
- [36] Smith J A, Hammerschmidt R. Comparative study of acidic peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1988, **33**: 255 - 261.
- [37] Espelic K E, Franceschi V R, Kolatukudy P E. Immunocytochemical localization and time suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol*, 1986, **81**: 487 - 492.
- [38] Marco A, Guzzardi P, Jamet E. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol* 1999, **120**: 371 - 381.
- [39] Badiani M, De Biasi M G, Feici M. Soluble peroxidase from winter wheat seedling with phenoloxidase activity. *Plant Physiol*, 1990, **92**: 489 - 494.
- [40] Christensen J H, Bauw G, Welinder K G, *et al*. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol*, 1998, **118**: 125 - 135.
- [41] Agostini A, de Forchetti S M, Figier H A. Production of peroxidases by hairy roots of *B. brassica napus*. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1997, **47**: 177 - 182.
- [42] Smith F T, Shortle W C. LAA oxidase peroxidase, and barrier zone formation in red maple. *Eur J For Path*, 1990, **20**: 241 - 246.
- [43] Lee M Y, Kim S S. Inactivation and cleavage of radish peroxidase by various reducing agents. *Phytochem*, 1998, **49**: 23 - 27.
- [44] Benz A, Spring O. Identification and characterization of an auxin-degrading enzyme in downy mildew infected sunflower. *Physiol Mol Plant Path*, 1995, **46**: 163 - 169.
- [45] Gaspar T, Dubuco M, Antoszewski R. Auxin decarboxylation and isoperoxidases in strawberry petiole extracts. *Biol Plant*, 1975, **17**: 23 - 30.
- [46] Rasmussen S K, Welinder K G, Heugouard J. cDNA cloning, characterization and expression of an endosperm-specific barley peroxidase. *Plant Mol Biol*, 1991, **16**: 317 - 327.
- [47] Sato Y, Sugiyama M, Gorecki R J, *et al*. Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase-isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*. *Planta*, 1989, **189**: 584 - 589.
- [48] Lagrimini L M, Burhart W, Moyer M, *et al*. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-

- forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 7 542 - 7 546
- [49] Hendriks T, Vandenberg B M, Schram A W. Cellular location of peroxidase isoenzymes in leaf tissue of *Petunia* and their affinity for Concanavalin A-Sepharose. *Planta*, 1985, **164**: 89 - 95
- [50] Hossain M A, A sada K. Inactivation of ascorbate peroxidase in pinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol*, 1984, **25**: 1 285 - 1 295
- [51] Amako K, Chen G X, A sada K. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol*, 1994, **35**: 497 - 504
- [52] Chen G X, A sada K. Hydroxyurea and p-aminophenol are suicide inhibitors of ascorbate peroxidase. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 2 775 - 2 781
- [53] Miyake C, A sada K. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes 1 of ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol*, 1996, **37**: 423 - 430
- [54] Garcia-Gomez M L, Sanchez-Romero C, Barcelo-Munoz Heredia A, et al. Peroxidase activity during adventitious root formation in avocado microcuttings. *Can J Bot*, 1995, **73**: 1 522 - 1 526
- [55] Roberts E, Kutchan T, Kolahukudy P E. Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in tuberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Mol Biol*, 1988, **11**: 15 - 26
- [56] Geiger R B, Rio B, Nandris D, et al. Peroxidase production in tissues of the rubber tree following infection by root rot fungi. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1989, **34**: 241 - 256
- [57] Lee T T. Role of phenolic inhibitors in peroxidase mediated degradation of indole-3-acetic acid. *Plant Physiol*, 1977, **59**: 372 - 375
- [58] Kay L E, Basill K V. Specific peroxidase isoenzymes are related with organogenesis. *Plant Physiol*, 1987, **84**: 99 - 105
- [59] Mohan R, Vijayan P, Kolattukudy P F. Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (*tap 1*) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region. *Plant Mol Biol*, 1993, **22**: 475 - 490
- [60] Sherf B A, Bajar A M, Kolattukudy P E. Abolition of an inducible highly anionic peroxidase activity in transgenic tomato. *Plant Physiol*, 1993, **101**: 201 - 208
- [61] Lagrimini L M, Gingas V, Finger F, et al. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol*, 1997, **114**: 1 187 - 1 196
- [62] Ito H, Kimizuko F, Ohbayashi A, et al. Molecular cloning and characterization of two complementary DNAs encoding putative peroxidases from rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Cell Reports*, 1994, **13**: 361 - 366
- [63] Beffa R, Martin H V, Pilet P E. *In vitro* oxidation of indoleacetic acid by soluble auxin-oxidases and peroxidases from maize roots. *Plant Physiol*, 1990, **94**: 485 - 491
- [64] Kaothien P, Shimokawato K, Kawaoaka A, et al. A cis-element containing PAL-box functions in the expression of the wound-inducible peroxidase gene of horseradish. *Plant Cell Report*, 2000, **19**: 558 - 562
- [65] Rebmann G, Hertig C, Bull J, et al. Cloning and sequencing of cDNAs encoding a pathogen-induced putative peroxidase of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, 1991, **16**: 329 - 331
- [66] Scott-Craig J S, Kerby K B, Stein B K, et al. Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, **47**: 407 - 418
- [67] Peng M, Kuc J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathol*, 1992, **82**: 696 - 699
- [68] Martinez C, Baccou J C, Bresson E, et al. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol*, 2000, **122**: 757 - 766
- [69] Bolwell G P, Wojtaszek D. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997, **51**: 347 - 366
- [70] Baker G J, Orlandi E W, Anderson A J. Oxygen metabolism in plant cell culture/bacterial interactions, survival under biological and artificial oxidative stress. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997, **51**: 401 - 415
- [71] Lu H, Higgins V J. Measurement of active oxygen species generated in planta in response to elicitor avia of *Cladosporium fulvum*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1998, **52**: 35 - 51
- [72] Apostol I, Heinstejn P F, Low P S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol*, 1989, **90**: 109 - 116
- [73] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive:

- five disease resistance response. *Cell*, 1994, **79**: 583 - 593
- [74] Wu G, Shortt B J, Lawrence E B, *et al*. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1357 - 1368
- [75] 刘曼西, Kdattukudy P E. 病原激发子对番茄阴离子过氧化物表达与反应性氧诱导的诱导. *植物生理学报*, 1997, **23**: 220 - 226
- [76] Mittler R, Lam E, Shulaev V, *et al*. Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-inducing programmed cell death in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 1999, **39**: 1025 - 1035
- [77] Lewis N, Yamamoto E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, **41**: 455 - 496
- [78] Graham M Y, Graham T L. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycines* wall glucan. *Plant Physiology*, 1991, **97**: 1445 - 1455
- [79] Casal J J, Mella R A, Ballari C L, *et al*. Phytochrome-mediated effects on extracellular peroxidase activity, lignin content and bending resistance in etiolated *Vicia faba* epicotyles. *Physiol Plant*, 1994, **92**: 555 - 562
- [80] Lagrimini L M. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiology*, 1991, **96**: 577 - 583
- [81] Nicholson R L, Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol*, 1992, **30**: 369 - 389
- [82] Imbert A, Goldberg R, Catesson A M. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta*, 1995, **164**: 221 - 226
- [83] Forchetti S M, Tigier H A. Indole-3-acetic acid oxidase and sprig aldehyde oxidase of peroxidase isozymes in soybean root nodules. *Physiol Plant*, 1990, **79**: 327 - 330
- [84] Saleh A N. The effect of kinetin on the IAA level and IAA oxidation activity in roots of young plants. *Physiol Plant*, 1981, **51**: 399 - 401
- [85] Kokkinakis D M, Brooks J L. Hydrogen peroxide mediated oxidation of indole-3-acetic acid by tomato peroxidase and molecular oxygen. *Plant Physiology*, 1979, **64**: 220 - 223
- [86] Krylov S N, Krylova S M, Chebotaru I G, *et al*. Inhibition of enzymatic indole-3-acetic acid oxidation by phenols. *Phytochemistry*, 1994, **36**: 263 - 267
- [87] Gazaryan I G, Lagrimini L M, Ashby G A, Thorneley R N F. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochem J*, 1996, **313**: 841 - 847
- [88] Smith A M, Morrison W L, Milham P J. Oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase: involvement of reduced peroxidase and compound III with superoxide as a product. *Biochemistry*, 1982, **21**: 4414 - 4419
- [89] Pressey R. Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiology*, 1990, **93**: 798 - 804
- [90] Siegel B I, Galston A W. Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. *Science*, 1967, **157**: 1557 - 1559
- [91] Loukili A, Lmam F, Ayadi A, *et al*. Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes. *Physiol Plant*, 1999, **105**: 24 - 31
- [92] Hausman S F. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 1993, **13**: 263 - 268
- [93] 田国忠, 黄钦才, 袁巧平, 等. 感染MLO泡桐组培苗代谢变化与致病机理的关系. *中国科学(B辑)*, 1994, **24**: 484 - 490
- [94] 田国忠, 金开璇, 汪跃. 长春花感染泡桐丛枝病原(MLO)后过氧化物同功酶的变化. *林业科学研究*, 1990, **3**: 146 - 150
- [95] 田国忠, 张锡津, 罗飞. 抗病与感病泡桐感染MLO后过氧化物和IAA氧化酶变化比较. *林业科学研究*, 1996, **9** (专刊): 47 - 52
- [96] 田国忠, 袁巧平, 黄钦才, 等. 类菌原体病原(MLO)的致病机理探讨. 见: 刘仪, 唐文华主编. 中国植病学会第二届青年学术研讨会论文集选编: 植物病理学研究进展. 北京: 中国农业出版社, 1995, 303 - 307
- [97] 田国忠, 张锡津, 罗飞. 感染植原体的泡桐组培苗体内吲哚乙酸氧化酶的组织印迹定位. 见: 刘仪主编. 中国植病学会第六届代表大会学术年会论文集选编. 北京: 中国农业出版社, 1998, 278 - 279
- [98] Tian G Z, Huang Q C, Yuan Q P, *et al*. Correlation of metabolic changes of infected paulownia tissue culture with PWB/MLO pathogenic mechanism. *Sci China*, 1995, **38**(B): 934 - 943
- [99] 田国忠. 泡桐丛枝病植原体与泡桐的生化与分子互作. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 国家图书馆等, 1999
- [100] Lagrimini L M, Brodford S, Rothstein S. Peroxidase-induced wounding in transgenic tobacco plants. *Plant*

- Cell*, 1990, **2**: 7—18
- [101] Ray H, Douches D S, Hammerschmidt R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response *Physiol Mol Plant Pathol*, 1998, **53**: 93—103
- [102] Henriksen A, Smith A T, Gajhede M. The structures of the horseradish peroxidase—ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates *J Biol Chem*, 1999, **274**: 35 005—35 011.
- [103] Kristensen B K, Bloch H, Rasmussen S K. Barley coleoptile peroxidases purification, molecular cloning, and induction by pathogens *Plant Physiol*, 1999, **120**: 501—512
- [104] Mato M C, Rua M L, Ferro E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root-formation in *Vitis* cultured *in vitro* *Physiol Plant*, 1988, **72**: 84—88
- [105] Boeuf G, Legrand H, Rambour S. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants *Physiol Plant*, 1999, **106**: 331—336
- [106] Gaspar T, Penel C, Castillo F J, *et al*. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development *Physiol Plant*, 1985, **64**: 418—423
- [107] Betella M A, Quesada M A, Konowicz A K, *et al*. Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Mol Biol*, 1994, **25**: 105—114
- [108] Chittoor J M, Leach J E, White F F. Differential induction of peroxidase gene family during induction of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *Mol Plant Microbe Interact*, 1997, **10**: 861—861.
- [109] Espelie K E, Kolattukudy P E. Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic-POD associated with suberization in potato. *Arch Biochem Biophys*, 1985, **240**: 539—545.
- [110] Dalisay R F, Kue J A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, **47**: 315—327.
- [111] Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, *et al*. Plant glutathione peroxidases *Physiol Plant*, 1997, **100**: 234—240
- [112] Goy P A, Feria G, Metraux J P, *et al*. Resistance to disease in hybrid *Nicotiana glutinosa* × *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of β -1, 3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase *Physiol Mol Plant Pathol*, 1992, **41**: 11—21.
- [113] Reimers P J, Guo A, Lead J E. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol*, 1992, **99**: 1 044—1 050.
- [114] Miyazawa J, Kawabata T, Ogasawara A. Induction of an acidic isozyme of peroxidase and acquired resistance to wilt disease in response to treatment of tomato roots with 2-furoic acid; 4-hydroxybenzoic hydrazide, or salicylic hydrazide *Physiol Mol Plant Pathol*, 1998, **52**: 115—126
- [115] Calderon A A, Zapata J M, Redreno M A, *et al*. Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in *in vitro*-cultured grapevine *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1992, **239**: 63—70
- [116] Martinez C, Montillet S L, Bresson F, *et al*. Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18 *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, **11**: 1 038—1 047.
- [117] Takahama U, Oniki T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate *Plant Cell Physiol*, 1992, **33**: 379—387.
- [118] Lojowska E, Holubowska M. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *J Phytopathol*, 1992, **136**: 319—328
- [119] Messner B, Bell M. Cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1994, **39**: 69—78
- [120] Svalheim, Robertsen B. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiol Plant*, 1990, **78**: 261—267.