

OsRboh 基因家族在水稻免疫应答中的表达及功能分析

李业¹, 陈银华^{1,2}, 吴家和¹, 何朝族^{1,2}

1 中国科学院微生物研究所 植物基因组国家重点实验室, 北京 100101

2 海南大学农学院, 海口 570228

摘要: 为了阐明 *Rboh* 基因家族在水稻免疫应答中的功能, 首先利用生物信息学方法从水稻基因组数据库中检索到 7 个水稻 *Rboh* 基因, 并对其进行了系统发育学和组织特异性表达分析, 发现 *OsRbohD* 只在穗和愈伤组织中表达, 且 *OsRbohE* 和 *OsRbohF* 仅在愈伤组织中特异表达, 而其他基因为组成型表达。利用 Real-time PCR 对分别在水杨酸 SA、茉莉酸甲酯 MeJA 和水稻黄单胞菌 PXO99 致病菌株处理下的 *OsRboh* 基因家族的表达水平进行了分析, 同时对处理后的叶片 H₂O₂ 含量进行测定。结果表明, SA 可以提高 *OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohD* 的表达水平, MeJA 可以提高 *OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohG* 的表达水平, 接种水稻黄单胞菌致病菌株 PXO99 可以提高 *OsRbohA* 和 *OsRbohB* 的表达水平。然而三者诱导 *OsRboh* 基因家族成员的表达时序性和表达程度存在着差异。此外, 3 种不同处理都能导致不同程度的 H₂O₂ 积累。结果显示, *OsRboh* 基因家族各基因在水稻免疫应答中可能扮演不同角色, 发挥不同作用。

关键词: *OsRboh* 基因家族, 生物信息学分析, 表达分析, 过氧化氢, 免疫应答

Expression and functional analysis of *OsRboh* gene family in rice immune response

Ye Li¹, Yinhua Chen^{1,2}, Jiahe Wu¹, and Chaozu He^{1,2}

1 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: The preliminary role of respiratory burst oxidase homolog (*Rboh*) in plant immune response is defined, but the exact function of *OsRboh* gene in rice immune response and its expression pattern is yet unclear. In order to clarify the role of *OsRboh* in rice immune response, we screened seven *OsRboh* genes from the latest rice genome annotation database. The result of tissue specific expression analysis demonstrated that *OsRbohD* was expressed only in spike and calli, and *OsRbohE* and *OsRbohF* were only expressed in calli. The rest of *OsRboh* genes were constitutively expressed in rice. In addition, the expression level of *OsRboh* gene family was analyzed in the rice leaves respectively treated with salicylic acid (SA), methyl jasmonic acid (MeJA) and *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae* (*Xoo*) PXO99 strain by Real-time PCR, and H₂O₂ content was also quantified by spectrophotometry after the three treatments. The result shows that the expression of *OsRbohA*, *B*, *C* and *D* was increased under the treatments of SA, the expression of *OsRbohA*, *B*, *C* and *G* was increased under the treatments of MeJA,

Received: March 21, 2011; Accepted: April 15, 2011

Supported by: Transgenic Research Program of the Ministry of Agriculture of China (No. 2009ZX08009-41B).

Corresponding author: Chaozu He. Tel: +86-898-66160728; Fax: +86-898-66160721; E-mail: hecz@im.ac.cn

农业部转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-41B) 资助。

and the expression of *OsRbohA* and *OsRbohB* was induced by *Xoo* PXO99 strain. However, the levels of expression and responsive times of these genes were different. Moreover, all three treatments led to H_2O_2 accumulation. These *OsRboh* genes have functional roles in rice native immune response.

Keywords: *OsRboh* gene family, bioinformatics analysis, expression pattern analysis, H_2O_2 , immune response

NADPH氧化酶是一种以胞质NADPH为电子供体,催化胞外 O_2 生成超氧阴离子(O_2^-)的氧化还原酶,并伴随着 H_2O_2 的产生。由NADPH氧化酶介导产生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)在抵御病原物、应答非生物胁迫反应以及调节植物自身生长发育的过程中发挥着非常重要的作用^[1-2]。植物NADPH氧化酶,又名RBOH(Respiratory Burst Oxidase Homolog),具备NADPH结合结构域、FAD结合结构域以及6个保守的跨膜结构域,这和哺乳动物NADPH氧化酶催化亚基gp91^{phox}的保守结构域一致。与此不同的是,植物NADPH氧化酶的N末端还存在着可结合 Ca^{2+} 的EF手性模体^[3]。*OsRbohA*是世界上第一个被分离出来的植物*Rboh*基因^[4],此后在拟南芥和烟草等植物中,该基因被相继分离出来。经研究发现,在经过寄主识别病原的过程当中,最早被激发的应答之一就是氧爆发,即各级水平的ROS的迅速增长。由NADPH氧化酶催化产生的ROS可以通过氧化交联反应或者糖基化来加强细胞壁的防御,从而抑制病原物侵入^[5]。此外, H_2O_2 作为最稳定的ROS类型,能够在各细胞区域间自由扩散,并可作为一种信号分子,激活下一级的免疫反应,比如细胞程序性死亡以及PR基因的表达^[6]。最近的研究表明,在拟南芥中有10个*Rboh*基因^[7],分别是*AtRbohA-J*。其中,*AtRbohD*和*AtRbohF*在 H_2O_2 的积累以及抗病反应中是必需的^[8]。此外,烟草中的*NbrbohA*、*NbrbohB*和*NtrbohD*也在抵抗马铃薯晚疫病菌*Phytophthora infestans*的侵染中发挥重要作用^[9-10]。在水稻当中,*Rboh*基因的相关研究尚不深入。在本研究中,我们从最新的水稻基因组数据库(RGAP 6.1)中检索到了7个*OsRboh*基因,分别为*OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC*、*OsRbohD*、

OsRbohE、*OsRbohF*和*OsRbohG*。对这些基因进行了组织特异性分析以及SA、JA和水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)致病菌株PXO99处理后的表达分析,并对处理后的水稻叶片进行了 H_2O_2 含量测定,结果表明*OsRboh*基因具有组织表达特异性,受SA、MeJA处理和*Xoo* PXO99感染诱导表达也存在着应答时间和表达水平的差异,与此同时,分别经过3种处理后,水稻叶片中的 H_2O_2 含量也得到了明显的提升。本研究证实不同的*OsRboh*基因在水稻的先天免疫应答反应中可能分别担当不同功能。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

水稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare)盆栽在中国科学院微生物研究所网室内,常规栽培管理。水稻胚性愈伤组织用含2.0 mg/L 2,4-D的NB₀培养基暗培养获得。水稻根器官用去离子水在黑暗条件下培养获得。取7日龄根,1月龄叶片与叶鞘,抽穗期3~5 d带花幼穗和穗下第2节幼茎,1月龄胚性愈伤组织,各取样0.2 g进行核酸提取。

水稻日本晴种子盆栽于光照培养箱中,30 ℃光培养14 h,28 ℃暗培养10 h。待四叶一心期,分别利用0.1 mmol/L水杨酸和0.1 mmol/L茉莉酸甲酯进行喷洒处理,无菌去离子水为对照,处理后0、3、6、9、12、24、48 h分别采集叶片,进行样品制备,用于*OsRboh*基因家族表达分析以及 H_2O_2 含量测定。

同上,得到四叶一心期的水稻秧苗。将培养好的水稻黄单胞菌致病菌株PXO99调至OD值为0.4~0.6,利用剪切接种法接种水稻秧苗,以蘸有

无菌液体培养基的剪子剪切作为对照, 接种后 0、3、6、9、12、24、48 h 分别采集叶片, 进行样品制备, 用于 *OsRboh* 基因家族表达分析以及 H_2O_2 含量测定。

1.2 *OsRboh* 基因家族的生物信息学分析

根据已知的 *OsRbohA* 的保守结构域^[4]作为搜索对象, 从最新的水稻基因组数据库 (RGAP 6.1) 中搜索相似蛋白序列, 并利用 Pfam 软件 (<http://pfam.sanger.ac.uk>) 对相似蛋白序列进行保守结构域的鉴定。利用 CLUSTALX2 程序对选定的 *OsRboh* 基因家族成员进行同源多序列比对, 并用 Genedoc 软件显示结果。运用 Mega4.0 软件的 Neighbour-Joining 的方法构建系统发育树。使用 WoLF PSORT 程序 (<http://wolfsort.cbrc.jp>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。

1.3 水稻各器官总 RNA 提取

液氮速冻研磨, 用 Trizol 一步法提取水稻各器官总 RNA, 提取过程按照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 说明书进行操作, 总 RNA 溶解到 30 μ L (Diethylpyrocarbonate, 焦炭酸二乙酯) 水中。为除去 RNA 中少量 DNA, 用 DNA 酶 I (New England Biolabs, NEB) 进行消解, 然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整程度, 查看 DNA 是否除净。用 NanoDrop ND-1000 测量其 RNA 浓度。取 3 μ g 总 RNA 进行反转录合成 cDNA 第一链, 操作过程按照说明书

(MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen) 进行。

1.4 半定量 RT-PCR 和 Real-time PCR

以水稻各组织 cDNA 作为模板, 并利用 *OsRboh* 基因的特异引物进行半定量 RT-PCR, 并以水稻 *Ubiquitin* 基因作为内参对照。半定量 RT-PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用凝胶成像分析仪观察条带亮度, 确定反转录样品间的 PCR 扩增量的比例。PCR 引物合成及克隆测序由上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司完成。半定量 RT-PCR 引物见表 1。

Real-time PCR 所用试剂来自 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) 试剂盒, 反应体系按照说明书要求配制。Real-time PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 80 $^{\circ}$ C, 86 $^{\circ}$ C, 90 $^{\circ}$ C 各读板一次, 共 45 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 并在温度范围为 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C 内, 每升高 0.3 $^{\circ}$ C, 读板一次, 绘制溶解曲线。Real-time PCR 所用的仪器为 ABI PRISM 7 000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), 采用比较 C_t 值的方法进行相对定量, 以水稻 *GAPDH* 基因作为内标校正模板量, 计算公式为: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。Real Time PCR 引物见表 2。

表 1 半定量 RT-PCR 引物

Table 1 Semi-quantitative RT-PCR primers used in this study

Purpose gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>OsRbohA</i>	ATAGGAAGGTCACAAGGCTAAT	CCAACCTGGAGCCAATAAAACT
<i>OsRbohB</i>	ACCACGGACACTCGTACAGC	CGTCGTCGTCCTTGAACCTG
<i>OsRbohC</i>	GTAGGTTGGTAGTGATTGGGTC	GTTTACTGCATCTTTTCTTTCC
<i>OsRbohD</i>	TCGGTTAGCAACTCTTTCTGTG	TTGATCCTAAACAAGGCCACTG
<i>OsRbohE</i>	TAGCCTACCACCACCTCCCTC	GGCACCTTCATCGACACCC
<i>OsRbohF</i>	AGGTCCGGGATGAGGAAGA	AACGACGACGACCGCTTCT
<i>OsRbohG</i>	CTCCATAGCATTAGGTACGGTA	TCTATAGCGAAAATTAGCAACG
<i>Ubiquitin</i>	GGACACGATCGACAACGTGAAGGCC	GTGTGATGGTCTTGCCAGTCAGGG

表 2 Real-time PCR 引物

Table 2 Real-time PCR primers used in this study

Purpose gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>OsRbohA</i>	ATAGCAAGGTGAGGAAGCAAGC	GCATAAGACATGCTGCAAAAAGC
<i>OsRbohB</i>	CACCTAGTGGAAGAAGCTGTGC	CTAGGCATCCTTTGGTCACAA
<i>OsRbohC</i>	GGTCAGGCTACAAGATTTGCTC	GGACCCAATCACTACCAACCTA
<i>OsRbohD</i>	CTGCCGTTTATAGATGGAGGAA	GATCCTAAACAAGGCCACTGAC
<i>OsRbohG</i>	GCTTCTCCTGATCTCCATAGCA	TCAGGAAGAGAGGTGTCAGCTTTG
<i>OsGAPDH</i>	ACAGGGGAGTTGTGTTTTGC	CCCAACCAACCACCATGATA

1.5 H₂O₂ 含量的测定

按照刘俊等^[11]方法进行 H₂O₂ 含量测定, 并稍作改进。取 0.5 g 水稻叶片, 加入 3 mL 冷丙酮和少量石英砂, 充分研磨匀浆, 4 °C、10 000 × g 离心 10 min, 取上清液, 加入 3 mL 混合萃取液(V(CCl₄): V(CHCl₃)=3:1), 再加入 5 mL 去离子水混匀, 4 000 r/min 离心 1 min, 取上层水相为 H₂O₂ 待测液, 并测量体积。取出 1 mL H₂O₂ 待测液作为空白, 加入终浓度为 3 U/mL 的过氧化氢酶, 30 °C 处理 10 min; 另取 1 mL 待测液, 加入等体积高温灭活的过氧化氢酶, 30 °C 保温 10 min。分别向 2 份待测液中加入 1 mL 0.2 mol/L, pH 7.8 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液和 1 mL 0.2 mmol/L 的 Ti (IV)-PAR 显色剂, 45 °C 水浴 20 min, 并静置至室温, 测量 508 nm 处的吸光值, 根据 H₂O₂ 的标准曲线算得 H₂O₂ 的含量。依照相同方法, 以 H₂O₂ 梯度浓度绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 *OsRboh* 基因家族的特征分析

在最新发表的水稻基因组数据库 (RGAP 6.1) 中, 我们检索到了 7 个水稻 *Rboh* 基因, 分别命名为 *OsRbohA* (*Os01g0734200*), *OsRbohB* (*Os01g0360200*), *OsRbohC* (*Os05g0528000*), *OsRbohD* (*Os05g0465800*), *OsRbohE* (*Os01g0835500*), *OsRbohF* (*Os11g0537400*), *OsRbohG* (*Os09g0438000*) (表 3)。将这 7 个 *OsRboh* 基因编码的蛋白序列与哺乳动物 NADPH 氧化酶催化亚基 gp91^{phox} (GenBank Accession No. NP_000388.2) 进行多序列比对, 结果表明 *OsRbohA-G* 与 gp91^{phox} 一样具备 6 个跨膜结构域 (TMD I-TMD VI)、FAD 结合结构域和 NADPH 结合结构域。在 gp91^{phox} 结合亚铁血红素发挥重要作用的组氨酸残基对在 *OsRbohA-G* 的

表 3 *OsRboh* 基因家族各基因特征Table 3 *OsRboh* gene family in rice genome

Gene name	Chromosome localization	Genomic DNA length (bp)	Number of intron	Protein size (aa)	Subcellular localization
<i>OsRbohA</i>	1	11 735	12	727	Plasma membrane
<i>OsRbohB</i>	1	6 643	11	905	Plasma membrane
<i>OsRbohC</i>	5	8 435	13	951	Plasma membrane
<i>OsRbohD</i>	5	5 035	14	819	Plasma membrane
<i>OsRbohE</i>	1	4 537	12	843	Plasma membrane
<i>OsRbohF</i>	11	7 521	9	936	Plasma membrane
<i>OsRbohG</i>	9	10 942	13	1 007	Plasma membrane

跨膜结构域 TMD III 和 TMD V 中也同样存在^[12]。另外,对 gp91^{phox} 的催化活性起到关键作用的 Pro-415 残基、His-494 残基、Asp-500 残基和 Pro-570 残基在 OsRbohA-G 中也同样保守^[13]。与 gp91^{phox} 不同的是,在 OsRbohA-G 的 N 末端都含有 2 个可以结合 Ca²⁺ 的 EF 手性模体 (EF hand), 该模体含有典型的 helix-E loop-helix F 结构^[14] (图 1A)。

用 Mega4.0 分子进化软件分析 7 个 OsRboh 蛋白序列与 5 个已经被证实参与抗病反应的 AtRbohD、AtRbohF^[8]、NbRbohA、NbRbohB 和 NtRbohD^[9-10], 构建系统发育树, 结果显示这些蛋白被分在了 3 个簇中, 其中 OsRbohA、OsRbohC、OsRbohG 与 AtRbohF 和 NbRbohA 属于一个簇, OsRbohB 和 OsRbohF 与 AtRbohD、NbRbohB 和 NtRbohD 属于一簇, OsRbohD 和 OsRbohE 独立形成一簇 (图 1B)。OsRboh 蛋白质家族内成员的两两相似度为 41.6%~78%, 其中 OsRbohD 与 OsRbohE 相似度为 78%, OsRbohA 和 OsRbohC 相似度为 70.3%。另外, OsRbohA 和 OsRbohC 与 AtRbohF 的相似度分别为 59.2% 和 67.5%, 与 NbRbohA 的相似度分别为 58.8% 和 68.8%, 其中 AtRbohF 和 NbRbohA 分别在拟南芥和烟草的超敏反应和细胞程序性死亡中起到至关重要的作用^[8,10]。OsRbohB 与 AtRbohD、NbRbohB、NtRbohD 的相似度分别为 54.7%、53.2% 和 53.3%, 而后三者各自植物的抗病反应中的 H₂O₂ 的积累过程起到了关键的作用^[8-10]。

2.2 OsRboh 基因家族的组织特异性表达分析

利用半定量 RT-PCR 对 7 个 OsRboh 基因的组织特异性表达进行分析, 发现这 7 个基因的表达水平和在不同器官中的表达存在明显差异 (图 2)。OsRbohA、OsRbohB、OsRbohC 和 OsRbohG 为组成型表达, 在根、茎、叶、穗、鞘和愈伤组织中均有表达; OsRbohD 在穗和愈伤组织中表达, 但是在穗中的表达十分微弱; OsRbohE 和 OsRbohF 仅仅在愈伤组织得到了表达。所有 OsRboh 基因在根部的表达都十分微弱, 甚至不能检测到表达;

而在愈伤组织中, 所有 OsRboh 基因均有表达; OsRbohA 在各器官组织的表达量都比其他 OsRboh 基因要高。

2.3 SA 和 MeJA 可以诱导 OsRboh 基因家族的表达以及 H₂O₂ 含量的提高

据报道称, SA 可以诱导植物体产生系统获得性抗性和超敏反应来抵御病原攻击, 同时伴随着 PR 基因的表达以及 H₂O₂ 的积累^[6,15]; MeJA 在较高浓度 (>50 μmol/L) 的条件下, 可以引发细胞程序性死亡以及 H₂O₂ 积累^[16-17]。

为了阐明 SA 和 MeJA 与 OsRboh 基因家族的相互关系, 我们利用 0.1 mmol/L SA 和 0.1 mmol/L MeJA 分别处理四叶一心的水稻秧苗, 以去离子水作为空白对照。我们预先利用半定量 RT-PCR 分别对 OsRboh 基因在两种处理后的 0~48 h 内的 7 个时间段进行表达分析, 结果表明, OsRbohE 和 OsRbohF 在这两种处理的条件下均未被检测出来, 并且 OsRbohD 在 MeJA 的处理下未检测出表达, 而 OsRboh 基因家族的其他基因在两种处理的条件下均有表达量的改变 (数据未显示)。此后利用 Real-time PCR 分别对 OsRbohA、OsRbohB、OsRbohC、OsRbohD 和 OsRbohG 在处理后的 0~48 h 内的 7 个时间段进行相对定量表达分析, 并对处理后的水稻叶片 H₂O₂ 含量进行了测定 (图 3)。结果显示 SA 处理后, OsRbohA、OsRbohB、OsRbohC 和 OsRbohD 表达量均有所提高, 但是这 4 个基因对 SA 的应答时间和诱导表达水平不同。OsRbohA 在 SA 处理后 3 h 显现出表达量升高的现象, 相对于对照表达量大约提高了 4 倍; OsRbohB 在 SA 处理后 9 h 和 12 h 显现出表达量升高, 相对于对照表达量分别提高 16 倍和 7 倍; OsRbohC 在 SA 处理后的 3 h 和 6 h 显现出表达量升高, 相对于对照表达量分别提高 7 倍和 6 倍, 然而在 SA 处理后 9 h, OsRbohC 又出现了表达量下降, 相比对照下降大约 2 倍; OsRbohD 在 SA 处理后 12 h 和 24 h 表达量得到了明显的提升。而

A

```

OsRbohG : -MWTSPRGSNAARRSRHRIADYLADDQT----TNTDTSDNESYTTAYGDEFFAAAAAAGSGGGMLPAFLADQDGLVEVMELEDEESVMVR--SVTPTSATLYGGGG : 102
OsRbohB : -MADLEAGMVAATAAQGNSTRSQDDAAT-----LIPNSGNLGSNSRSTKARFKD-----DDELVEITLDVQRDSVAIQEVRVGDDEG : 77
OsRbohE : -----MASPYDQSPH : 11
OsRbohC : MRAGIGSGSGGGTTPVPRRWGSGVTTTPRS----LSTGSSPRGSDRSDDGEELEVEVTLDLQEDDTIVLRSVEPAGGAAVASSSSGASPSAVAPPRRAEPPGGVASRSRS : 105
OsRbohA : ----- : -
OsRbohF : -MHHTRAGAADGAGGGGEDIVEAGAEAPPQQRERLVPHSGPLSKRSRMRKSARFAESVSAPLSAPSGVAAARRAAAAAANDDEEDYVEITLDRDSDVAVHVKPAGGGG : 109
OsRbohD : -----MAGDYVDVPLG : 11
gp91phox : ----- : -

```

```

OsRbohG : GQMPQPLPPLIRTPEGGGGARSLSRCSSTSSRKRKFWALRSFSPSPSPRPPTPAELQREAAAAARERRRITQARINNSSTGKPKLKGKRFRTSRTTGTQVAALERRFD : 212
OsRbohB : SGHGTFDGLPLVSPSSKSKGLTSKLRQVTNGKMKSSSRKAPSP-----QAQSSAKRVRKRLDREKSSPAVAVLKGKQVPT---AKVGNDCRAAVK : 166
OsRbohE : AQHPSGLFRPPGAGAGAAAGGFARGLMKQPSRLASGVRFASRVS-----MKVPEGVGGMRPGGGRMTMQSSAQVGLRGRFRIDKTSGGKREG---AKSVR : 105
OsRbohC : PAMRRTSSHRLLQFSQELKAEAMARAROFSDITKRFTRTQSTTTAPPG-----IESALARAERRRQALDRKSGRQRFIRGRFIS---GPNKASNAIIEVCA : 203
OsRbohA : ----- : -
OsRbohF : EDSVTLARLLEKRSSSF--HNVIRNASSRKRQVSEQLRRLAS-----VNRGGGGGGPFRDREKSAHAHLKGLKRFIS---RADGAGCAPAVK : 196
OsRbohD : GGGQSTLPP-----VAPLKKQPSRLASGMKRLAS-----MVPDTMKLRTHSSQVPLRGRFRIDKTSAGKDG---AKNVR : 80
gp91phox : ----- : -

```

EF-hand I

```

OsRbohG : RFAALRAGLISDDEGEGTGVDSSEFAVGFEDALARRFRONLERITREIYDFMLDLSIQSPTARIQIFFDWVLIIVDGRITREVECELIISASANKIAKIKKQAE : 321
OsRbohB : RFAQLQVDFVLLSRSGKICIGDGSDFPVMQMPDLSARKKQIVKQVITRELDKDFEOLTIQGFQDNRITFFDMQKNAQGRITAEVKEIILASANKIKSKIKERAD : 275
OsRbohE : RFDNRNRGRPKESGKICIGDGSDFPAGELVADARRRNEPEDEGTHREOLKEFBEEMTIQNFDSRIQIFFDWQKNGQMTEDVEKVEIILASANKIAKLRGHA : 215
OsRbohC : NFDRLARQYLSRDEDPQICGPTESREFALEFDITSRRRQKQVDRKINRELRINQOITNSFDSRIQIFFDWQKNAQGRITAEVKEIILASANKISRLKQAE : 312
OsRbohA : -----VTESEFALEFDITSRRRQKQVDRKINRELRINQOITNSFDSRIQIFFDWQKNAQGRITAEVKEIILASANKISRLKQAE : 88
OsRbohF : RFDLAKNGLPKSKGCGGIVMK-ELREFALEFDALARRRNSGDSISRAELRFDQISITSPDSRIQIFFDWQKNAQGRITAEVKEIILASANKIKSKVQOSE : 304
OsRbohD : RFDLSANRIPQESAKICGADSEFASEVVALARRRSLKPEDCHREOLKEFBEELTIQNFDSRIQIFFDWQKNGQMTEDVEKVEIILASANKIAKLRGHA : 190
gp91phox : ----- : -

```

-n-nn-nx-y-zG-Ix-zn-nn-nn-
helix loop helix

```

OsRbohG : EYASLIMEELDENIGYTELWGLEAFLLRISYMNYSRPLSTAGQAWSQNLGGAAVAAGAAAATGGGAHAAVAARGGQQQQOQEGRRGGWGVRAAAAVRVAAEERHW : 431
OsRbohB : EYALIMEELDENIGYTELEDELEALLQSFSEAAARSTTHSS-----KLSKASMKDASNKEMSPVHYWQOFMYEIEERHW : 354
OsRbohE : EYASLIMEELDENIGYTELWOLETILRGMVSAQAAPKMKRTI-----SSARTVIPSRYRSLKRVHSTVDVPHENWR : 291
OsRbohC : EYALIMEELDENIGYTELWOLETILLLKQDIYVNSQALSYS-----QASQNLAGLKRKSPRRISTKLSYSYLEDNWR : 388
OsRbohA : EYALIMEELDENIGYTELWOLETILLLKQDIYVNSQALSYS-----QASQNLAGLKRKSPRRISTKLSYSYLEDNWR : 164
OsRbohF : EYALIMEELDENIGYTELWLEMLLQAPS-QSVRIGTNSR-----NLSQNLQNRPTAEPNLRRVWRPASYELEDNWR : 382
OsRbohD : EYASLIMEELDENIGYTELWOLETILRGMVSAQAAPKMKRTI-----ASARTVIPSRRSPRRQFRFNKTVDEPHENWR : 266
gp91phox : -----MGNVAVNEGL : 10

```

TMD I

TMD II

TMD III

```

OsRbohG : RAVVVALWFAAMASLWVWKFVQVYRRT---PAPRVMGYCIPTAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTLTWLS---SWARFVYPPDDNTEPHKMIATAVYVITLHAGNH : 533
OsRbohB : RAVVTLWLSFICIALFHNKFIQYRNE---AVGCMGYCVTTAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTITWRSK---IQVGAVYPPDDNINFKHVLAAGCAVGLWAGAH : 457
OsRbohE : RTWLWALWLANVGLFAKKEQYRER---AAQVMGHCVCVAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTLTWLS---VALSHVYPPDDNINFKHVLAATAAATAVHTLAHV : 393
OsRbohC : RLWVIALWLGFMAGLFTNKFQYRHR---YVAVVMGYCVTTAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTITWLN---RAARALYPPDDNINFKHTIAAATAVYVILHGGHL : 490
OsRbohA : RLWVIALWLGFMAGLFTNKFQYRHR---YVAVVMGYCVTTAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTITWLS---RAARALYPPDDNINFKHTIAAATAVYVILHAGNH : 266
OsRbohF : RVVWVILWALCAGLFTYKFIQYRHR---AVRVMGYCVVCVAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTITWLN---AAVARVYPPDDNINFKHVLAAGCAVGLWAGH : 485
OsRbohD : RLWVIALWALNIALFVYKFIQYRHR---DAQVMGYCVVCVAKGAAETLRKNNMALVLLPVCNRTITWLS---VALSKVYPPDDNINFKHVLAATAAATAVHTLAHV : 368
gp91phox : SEVLVIALWALCNVLEAVYRVDIPPKFFYTRKILGSAALALAFACINFCMLLIPVCNRTLSFLIGSSACCSTRVRRQLRRTPHKMWVAVWVAHSAHTIAH : 120

```

TMD IV

```

OsRbohG : A-CDFPRLIASGPEYRILADARPEKILYVGLISG---VEGTVGMVVMVMTVSETLATHFSRKGEGKGGSGGAAATVLPVARSSEFNRIAGNAPFYSHHILGIV : 638
OsRbohB : T-CDFPRLIHASDAQELNKPFEKKEKPNWVWFKG---TEGTVGMVVMVMAIAETLACQWFR---NHNDSNFKLNAGNAPFWTHHILGIV : 547
OsRbohE : T-CDFPRLINCSDEKMATGPNQYRQIYADLLES---AFVTVGLMLIMVMSFSETLATHFSR---SVVKLSELHLAGNAPFYSHHILGIV : 483
OsRbohC : V-CDFPRLIGSSEERKAPGKPEETKILYTLVKG---VEGTVGLVLMVMAIAETLATHFRFR---SLVRLKRFRLRAGNAPFYSHHILGIV : 579
OsRbohA : V-CDFPRLIKSSDEKMAPGQYFETKILYTLVKG---VEGTVGMVVMVMAIAETLATHFRFR---SLVRLKRFRLRAGNAPFYSHHILGIV : 355
OsRbohF : T-CDFPRLIHATDADPEPKREPEETKILYTLVKG---TEGTVGLVLMVMAIAETLATHFRFR---GRLRLRFLNRIAGNAPFYSHHILGIV : 575
OsRbohD : T-CDFPRLINSCPRDKLEATGPNYVQIYSSLAS---TEGTVGLMLIMVMSFSETLATHFSR---SVVKLSELHLAGNAPFYSHHILGIV : 458
gp91phox : FNVEYCVNARVNSDPYSVALSELDQRNEXYLNFAKRIKNEPGLYLAATLAGLGVVITLCL-----ILTSSSTKTIIRSYEVSWTHHILGIV : 215

```

TMD V

TMD VI

```

OsRbohG : YALLAHGYSYLFVIRRWL---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRALSNAAAKKILKVCILRGNVLTITNSKPTFRYKSG : 716
OsRbohB : YTLVYHGTCTYLSRKKWR---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRFLSHDANGYKAVVYPGNVLIAYSKKPTFRYKSG : 624
OsRbohE : YLLVWVSYLFTLREAVK---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRVNNRPSVAVAIYPCNVLSLRKPKPGFKYKSGM : 561
OsRbohC : YLSLVHGERLYLITWYK---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRFFSGSYSLRLLKVAIYPCNVLTIQSKKPTFRYKSG : 657
OsRbohA : YHALVHGEQYLIHVVYR---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRFFSGSYSLRLLKVAIYPCNVLTIQSKKPTFRYKSG : 433
OsRbohF : YALLVHGYLFTLTDWYK---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRALSSVVRPKILKVAVYPCNVLSIRFSKPKPGFKYKSG : 653
OsRbohD : YLLVWVSYLFTLTDWYK---RTTWYLVSPVCLVYGERLFRVNNRPSVAVAIYPCNVLSIRFSKPKPGFKYKSGM : 536
gp91phox : FIGLAHGAERIRGQTAEASLAVHNITVCEQKISEWGKIKCEPIQFAGNPPMTRKAVVGERLFRVNNRPSVAVAIYPCNVLSIRFSKPKPGFKYKSGM : 323

```

FAD-isoalloxazine

NADPH-ribose

```

OsRbohG : YIFIKCTITSPFEWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVENYFSEHLNRASFSELG-----ATEPRSLPRLLDVGPYGAQAQDFRNYDVLLLVGLGIGA : 819
OsRbohB : YIFIKCTAVSPYEWHPPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSEACRPETEG-ESGLADLS---KGITDEKARFKLVDGPYGAQAQDFRNYDVLLLVGLGIGA : 731
OsRbohE : YIFIKCTAVSPFEWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSEACRPETEG-ESGLADLSLETTVVADAQTEDTRFPKVLIDGPYGAQAQYKDYDILLVGLGIGA : 671
OsRbohC : YMFVQCAVSPFEWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSA-ACEPPVGGSCGLAAD-----ETTKKALPKLLIDGPYGAQAQYKDYDILLVGLGIGA : 759
OsRbohA : YMFVQCAVSPFEWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSA-ACEPPVGGSCGLAAD-----ETTKKILPKLLIDGPYGAQAQYKDYDILLVGLGIGA : 535
OsRbohF : YIFVNCVAVSPFQWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSEACRPETEG-RSGLRAYEYD---RDGAMTNPSFPKVLIDGPYGAQAQYKDYDILLVGLGIGA : 760
OsRbohD : YMFVQCAVSPFEWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSEACRPETEG-RSGLRAYEYD---RDGAMTNPSFPKVLIDGPYGAQAQYKDYDILLVGLGIGA : 646
gp91phox : YIFVQCAVSPFQWHFPTSITAPGDYLSVHIRLGDWTELEKRIKRVSEACRPETEG-RSGLRAYEYD---FQDAWKLPKLVADGPECTASLIVFSEVVMVAVGLGIGA : 413

```

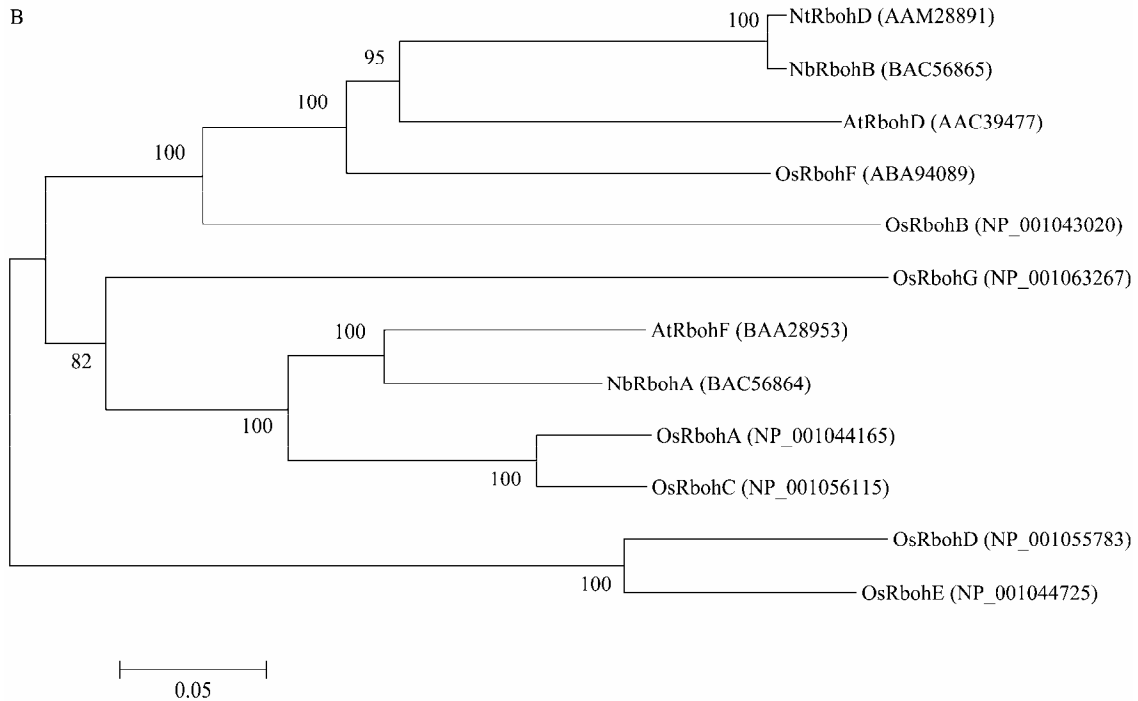
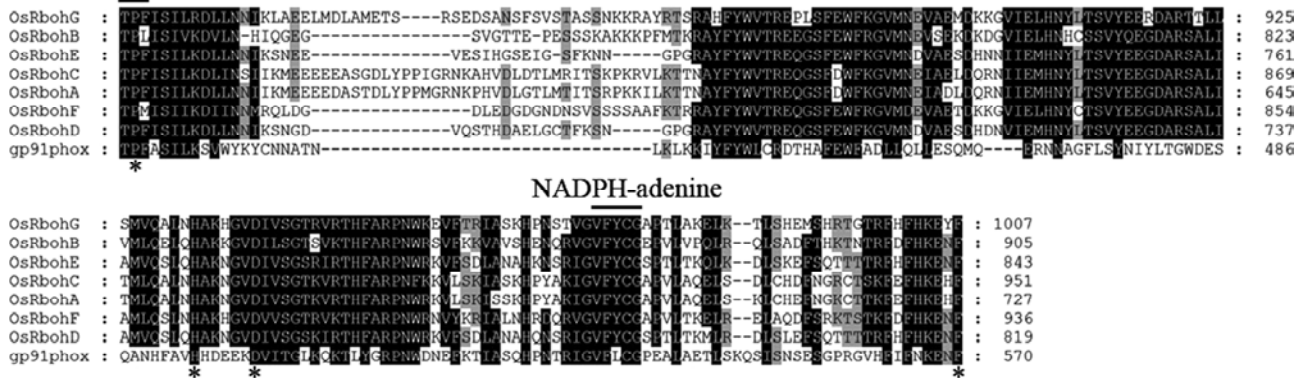


图 1 水稻 Rboh 蛋白的结构与系统发育学分析

Fig. 1 OsRboh protein structure and systemic phylogeny analysis of OsRboh family. (A) Multiple alignments of predicted OsRbohA-G and gp91^{phox} protein were made with CLUSTALX2 program. A line above the alignments is used to mark strongly conserved domains such as EF hand motifs, transmembrane-spanning domains (TMD I to TMD VI), FAD binding domain and NADPH binding domain. The asterisks under the sequences indicate amino acid residues which are required for human NADPH oxidase function and are conserved between gp91^{phox} and OsRboh protein. Solid triangles represent histidines forming part of the bis-heme motif. Beneath EF hand motifs is the sequence of a canonical helix E-loop-helix F. n is usually a hydrophobic residue. Dashed line indicates variable amino acid residues. x, y, z, contain oxygen within their side. z is usually glutamic acid. (B) An unrooted phylogenetic tree of OsRboh and some Rboh homologs from other plants. Bootstrap value of 50% or higher are shown on significant nodes. Species names are: At, *Arabidopsis thaliana*; Nb, *Nicotiana benthamiana*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*.

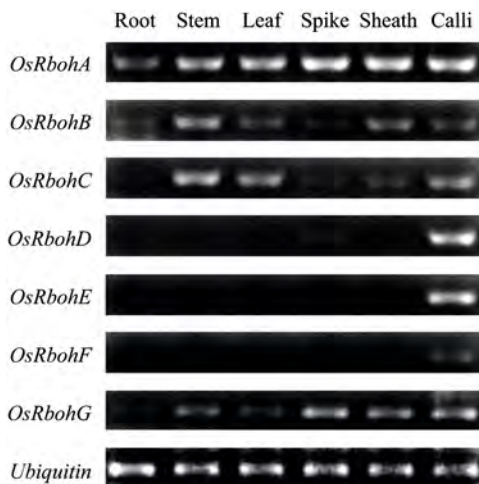


图 2 *OsRboh* 基因家族的组织特异性表达分析

Fig. 2 Tissue specific expression analysis of *OsRbohA-G* by semi-quantitative RT-PCR with 30 cycles. Equal loading of cDNA was monitored by amplification of a constitutively expressed *Ubiquitin* gene with 25 cycles. Tissue samples are root, stem, leaf, spike, sheath and calli from rice.

OsRbohG 却随着时间的推移, 表达量渐渐呈现下降趋势 (图 3A)。与此同时, 经 SA 处理后, 水稻叶片中的 H_2O_2 含量也产生了变化。在处理 3~6 h, H_2O_2 含量逐渐提高, 处理 6 h 后的 H_2O_2 含量相对于处理前提高了 27%; 而在处理后 9~12 h, H_2O_2 含量积累加速, 并在处理后 12 h 达到最高峰, 相对于处理前提高了 50%; 而自处理后 24~48 h, H_2O_2 含量逐渐下降, 但在处理后 48 h, H_2O_2 含量仍然比处理前要高 (图 3B)。

在经过 MeJA 处理后, *OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohG* 的表达量均得到了提高, 并且在时间上也展现出了一致性。这 4 个基因表达量均在处理后 9 h 和 12 h 得到了显著的提高。其中, *OsRbohG* 的表达量相对于对照提高了 6~7 倍 (图 3A)。与此同时, 水稻叶片 H_2O_2 含量也在处理后 9 h 和 12 h 达到了最高峰, 但相比于 SA 处理, H_2O_2 含量的增幅相对较低, 处理后 9 h 和 12 h 的 H_2O_2 含量相对于处理前分别提高了 28% 和 29%。自处理后 24 h 至 48 h, H_2O_2 含量逐渐降低, 在处理 48 h, H_2O_2 含量比处理前略高 (图 3B)。

以上结果表明, *OsRbohA*、*OsRbohB* 和 *OsRbohC* 在 SA 和 MeJA 的处理下都显现出了表达量的明显提升, 并且在这 3 个基因表达上调的时间内, H_2O_2 的

含量也逐渐积累, 说明这 3 个基因在 SA 和 MeJA 介导的水稻免疫应答中可能起到了比较重要的作用; *OsRbohD* 则仅在 SA 的处理下显现出了表达量的提升, 说明 *OsRbohD* 可能与 SA 的诱导更为相关; *OsRbohG* 分别在 SA 和 MeJA 的处理下呈现出不同的结果, 体现出 SA 和 MeJA 可能通过不同的信号通路起作用; 而 *OsRbohE* 和 *OsRbohF* 在 SA 和 MeJA 的处理下未检测出表达, 说明 *OsRbohE* 和 *OsRbohF* 可能与 SA 和 MeJA 介导的抗病信号通路不相关。

2.4 水稻黄单胞菌 PXO99 菌株可诱导 *OsRbohA* 和 *OsRbohB* 的表达量提升以及 H_2O_2 含量的提高

为了阐明水稻致病茵与 *OsRboh* 基因家族的相互关系, 我们利用水稻黄单胞菌 PXO99 菌株对四叶一心期的水稻秧苗进行接种, 并预先利用半定量 RT-PCR 分别对 *OsRboh* 基因在处理后的 0~48 h 内的 7 个时间段进行表达分析, 结果显示, 除 *OsRbohA* 和 *OsRbohB* 外, 其余的 *OsRboh* 基因并未显现出表达量的明显改变, 并且 *OsRbohD*、*OsRbohE* 和 *OsRbohF* 仍然未检测出表达 (数据未显示)。此后我们利用 Real-time PCR 对 *OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC*

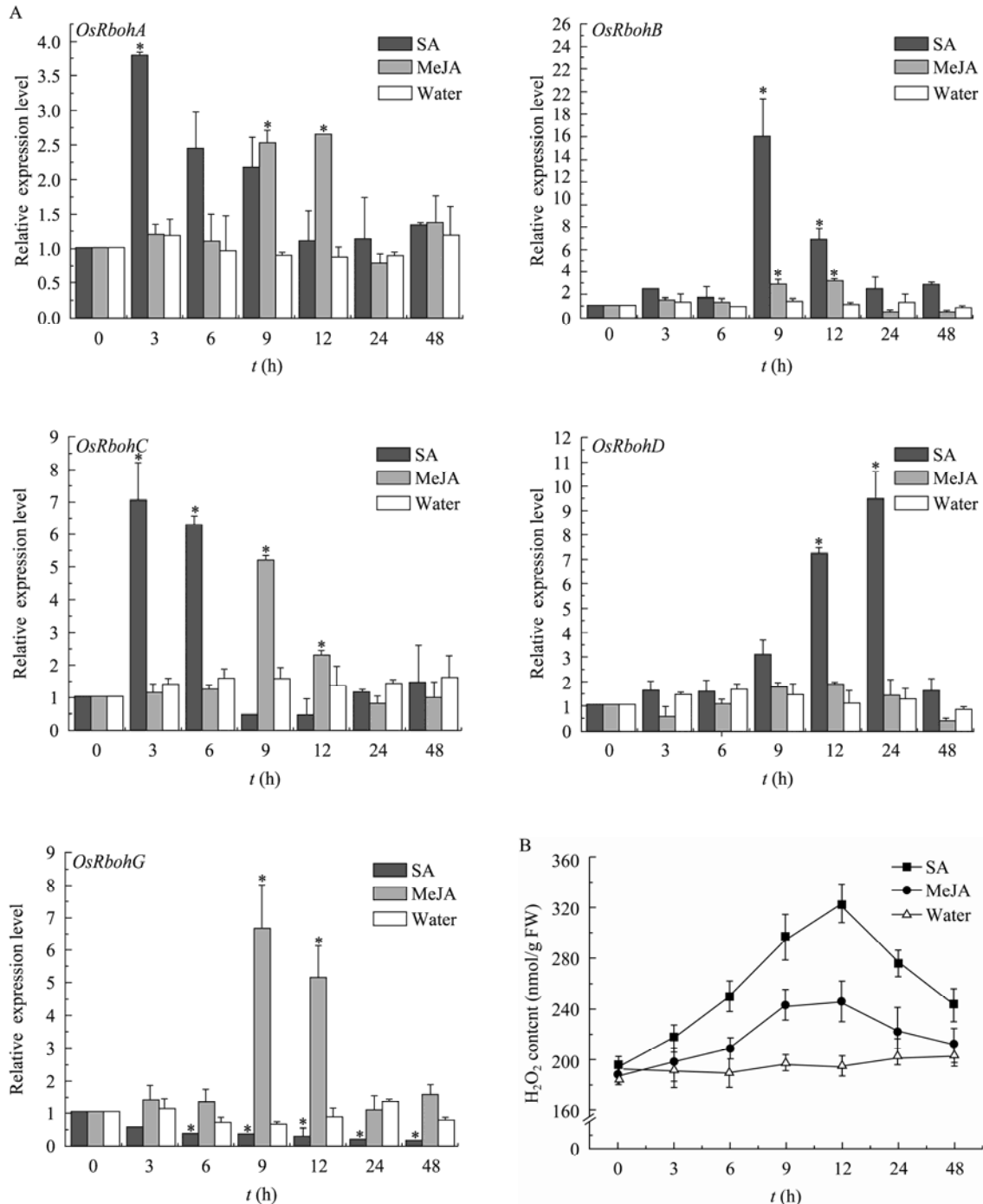


图3 0.1 mmol/L SA 和 0.1 mmol/L MeJA 处理下 *OsRboh* 基因家族表达水平的变化以及 H₂O₂ 含量的变化

Fig. 3 Expression of *OsRboh* gene family and H₂O₂ content quantification under SA and MeJA treatment respectively. (A) Real-time PCR analysis of expression level of *OsRbohA*, *OsRbohB*, *OsRbohC*, *OsRbohD* and *OsRbohG* under 0.1 mmol/L SA and 0.1 mmol/L MeJA respectively in the leaf samples collected at times indicated above. Water treatment was used as control. The error bars indicate standard deviation of the mean of three experiments. The asterisks indicate there are significant differences between 0 h and other time points for each treatment after biostatistics analysis ($P \leq 5\%$). (B) H₂O₂ content quantification was assayed by spectrophotometry under 0.1 mmol/L SA and 0.1 mmol/L MeJA respectively in the leaf samples collected at times indicated above. Water treatment was used as control. The error bars indicate standard deviation of the mean of three experiments.

和 *OsRbohG* 在处理 0~48 h 内 7 个时间段进行相对定量表达分析, 并对处理后的水稻叶片 H_2O_2 含量进行了测定 (图 4)。结果显示, 在接种后 3~48 h 期间, *OsRbohA* 和 *OsRbohB* 的表达量都得到了不同程度的提高。其中 *OsRbohA* 随着时间的推移, 表达量呈逐渐上升趋势; 而 *OsRbohB* 则表现出了不同, 在接种后 3 h, *OsRbohB* 的表达量相对于对照就立刻提升了 11 倍, 此后基因表达量的提高倍数相对下降, 但又在接种后

48 h, 表达量相对于对照提升了 24 倍 (图 4A), 然而 *OsRbohC* 和 *OsRbohG* 的表达量并无明显变化 (数据未显示)。与此同时, 自接种后 3~48 h, 水稻叶片中的 H_2O_2 含量迅速积累。随着时间的推移, H_2O_2 含量逐渐提高, 并在接种后 48 h, H_2O_2 含量比接种前提高了 104% (图 4B)。以上结果与 SA 和 MeJA 单独处理所呈现出的结果不太一致, 显然水稻对病原菌的免疫应答可能还存在着其他的信号通路。

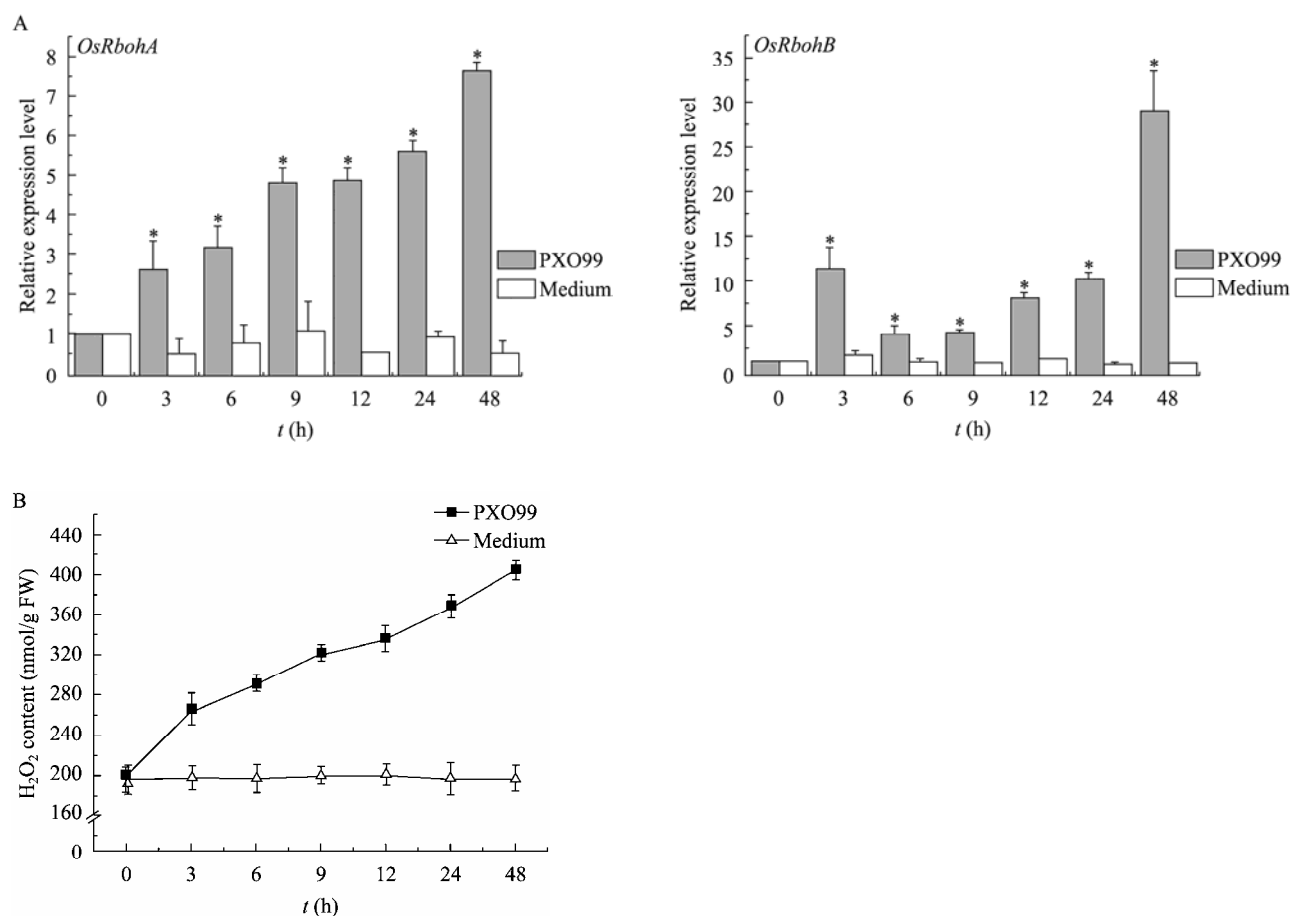


图 4 水稻黄单胞菌 PXO99 菌株接种后 *OsRbohA* 基因和 *OsRbohB* 基因表达水平的变化以及 H_2O_2 含量的变化

Fig. 4 Expression of *OsRbohA* and *OsRbohB* family and H_2O_2 content quantification under inoculation of *Xoo* PXO99 strain. (A) Real-time PCR analysis of expression level of *OsRbohA* and *OsRbohB* under inoculation of *Xoo* PXO99 strain in the leaf samples collected at times indicated above. Medium treatment was used as control. The error bars indicate standard deviation of the mean of three experiments. The asterisks indicate there are significant differences between 0 h and other time points for each treatment after biostatistics analysis ($P \leq 5\%$). (B) H_2O_2 content quantification was assayed by spectrophotometry under inoculation of *Xoo* PXO99 strain in the leaf samples collected at times indicated above. Medium treatment was used as control. The error bars indicate standard deviation of the mean of three experiments.

3 讨论

OsRbohA、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohG* 为组成型表达基因,表明它们对水稻生长发育起到比较重要的作用。然而,*OsRbohD*、*OsRbohE* 和 *OsRbohF* 则与 4 个组成型表达的 *OsRboh* 基因表达模式存在着差异。其中 *OsRbohD* 只在叶鞘和愈伤组织中表达,而 *OsRbohE* 和 *OsRbohF* 仅在愈伤组织中得到表达。这种现象在拟南芥 *AtRboh* 基因家族中也同样存在,可能是由于这两类基因在 NADPH 氧化酶的进化过程中扮演着不同的角色,行使着不同的功能^[18]。值得注意的是,在 1 月龄胚性愈伤组织中,这 7 个 *OsRboh* 基因都得到了不同程度的表达。*OsRboh* 基因家族各基因在各器官组织表达的差异明显,表明这 7 个基因可能在水稻发育、抗病以及抗逆的过程中扮演不同的角色^[2]。

外源的 SA 和 MeJA 分别可以诱导植物抗病基因的表达,并伴随着 ROS 的爆发。有研究表明,利用 SA 处理烟草后,会大大增加 *NbRbohB* 基因的转录水平,最终诱导 H₂O₂ 的大量积累,并且此途径需要两条 MAPK 级联途径的参与。这两条途径分别为 MEK2-SIPK/NTF4 和 NPK1-MEK1-NTF6^[19]。此外,在对拟南芥的研究中,MeJA 可以诱导 *AtRbohD* 和 *AtRbohF* 表达量的升高,并伴随着 H₂O₂ 的积累,然而在分别对 *coi-1* 突变体和 *atrbohD atrbohF* 双突变体进行 MeJA 处理后,H₂O₂ 并未体现明显的提升^[20]。在我们的研究中,水稻经 SA 处理后,*OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohD* 都表现出了表达量的上调,并且伴随着 H₂O₂ 的显著积累;在经 MeJA 处理后,*OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohG* 也都呈现出了表达量的提高,也同样伴随着 H₂O₂ 的积累。这表明在水稻中,SA 和 MeJA 可能分别利用 MAPK 级联途径和 COI1 介导的方式诱导 *OsRboh* 基因家族相关基因的表达以及 H₂O₂ 的积累。*OsRbohA*、*OsRbohB* 和 *OsRbohC* 在 SA 和 MeJA 的处理下都显现出了表达量的明显提升,并且 H₂O₂

的含量也随之逐渐积累,说明这 3 个基因在 SA 和 MeJA 介导的水稻免疫应答中可能起到了比较重要的作用。另外,我们还发现水稻经 SA 处理后,*OsRbohA* 和 *OsRbohC* 表达量上调的时间比 *OsRbohB* 和 *OsRbohD* 要早,而在 MeJA 处理后,*OsRbohA*、*OsRbohB*、*OsRbohC* 和 *OsRbohG* 在表达量上调的时间上呈现一致性,这表明 SA 和 MeJA 可能通过不同的信号通路来调控 *OsRboh* 基因家族的表达,并且 *OsRboh* 基因家族内的各基因可能处在多种调控机制的作用下。而更为深入的机理尚需进一步研究。

植物细胞质膜上含有胞外模式识别受体 (Pattern-recognition receptors, PRRs), 可用来识别病原菌并引发基础免疫应答,期间伴随着 MAPK 级联应答、抗性基因的诱导表达以及 ROS 的氧爆发等早期应答^[21-22]。另有研究发现,拟南芥遭病原菌侵染后,内源的 SA 和 MeJA 的含量都得到了显著地提高^[23]。在本实验中,*Xoo* PXO99 的侵染导致 *OsRbohA* 和 *OsRbohB* 的表达量迅速提升以及 H₂O₂ 的迅速积累,表明水稻在受到病原菌攻击后,立刻激活了体内的基础免疫应答。其中内源 SA 和 MeJA 浓度的提升可能作为调控机制影响着 *OsRboh* 基因家族表达量的上调,然而 *OsRbohA* 和 *OsRbohB* 的表达量呈现持续性的上涨以及 *OsRbohC*、*OsRbohD* 和 *OsRbohG* 表达量并未上调的结果,与单独 SA 和 MeJA 处理所表现的情况有所不同,表明可能有其他机制与 SA 及 MeJA 一起参与到病原菌诱导 *OsRboh* 基因家族的表达模式,而更为深入的机理尚需进一步研究。

REFERENCES

- [1] Torres MA, Dangl JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(4): 397-403.
- [2] Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol*, 2006, 141(2):

- 336–340.
- [3] Keller T, Damude HG, Werner D, et al. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*, 1998, 10(2): 255–266.
- [4] Groom QJ, Torres MA, Fordham-Skelton AP, et al. *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene. *Plant J*, 1996, 10(3): 515–522.
- [5] Iwano M, Che FS, Goto K, et al. Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells. *Mol Plant Pathol*, 2002, 3(1): 1–8.
- [6] Chen Z, Silva H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 262(5141): 1883–1886.
- [7] Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulates plant cell growth. *Nature*, 2003, 422(6930): 442–446.
- [8] Torres MA, Dangl JL, Jones JDG. *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1): 517–522.
- [9] Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J*, 2002, 31(2): 137–147.
- [10] Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, et al. *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 2003, 15(3): 706–718.
- [11] Liu J, Lü B, Xu LL. An improved method for the determination of hydrogen peroxide in leaves. *Prog Biochem Biophys*, 2000, 27(5): 548–551.
刘俊, 吕波, 徐朗莱. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(5): 548–551.
- [12] Finegold AA, Shatwell KP, Segal AW, et al. Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 1996, 271(49): 31021–31024.
- [13] Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, et al. Mutations in the x-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*, 1996, 87(5): 1663–1681.
- [14] Kretsinger RH. EF-hands reach out. *Nat Struct Biol*, 1996, 3(1): 12–15.
- [15] Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(5): 466–472.
- [16] Liechti R, Farmer EE. The jasmonate pathway. *Science*, 2002, 296(5573): 1649–1650.
- [17] Turner JG, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 2002, 14(S1): S153–S164.
- [18] Torres MA, Onouchi H, Hamada S, et al. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). *Plant J*, 1998, 14(3): 365–370.
- [19] Asai S, Ohta K, Yoshioka H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 2008, 20(5): 1390–1406.
- [20] Saito N, Munemasa S, Nakamura Y, et al. Roles of RCN1, regulatory A subunit of protein phosphatase 2A, in methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(9): 1396–1401.
- [21] Chisholm ST, Coaker G, Day B, et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006, 124(4): 803–814.
- [22] Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B, et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*, 2004, 198(1): 249–266.
- [23] Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43: 205–227.