

INA 诱导的香蕉果实抗病性与早期活性氧积累的关系

黄雪梅¹, 张 灿¹, 庞学群², 张昭其^{1,*}

(¹ 华南农业大学园艺学院广东省果蔬保鲜重点实验室, 广州 510642; ² 华南农业大学生命科学院, 广州 510642)

摘 要: 研究 2,6-二氯异烟酸 (INA) 对采后香蕉果实抗病性的诱导作用和早期果皮活性氧含量、抗病相关酶活性及基因表达量的变化。结果表明: 香蕉果实经 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ INA 处理后 0、3、6、12、24 h 接种炭疽病菌孢子, 贮藏 8 d 后, INA 处理果实的病斑直径比对照果实的明显减小; INA 处理果实的 H_2O_2 含量和 NADPH 氧化酶活性分别在 6 h 和 3~12 h 明显高于对照; 过氧化氢酶 (CAT) 活性均明显低于对照, 抗坏血酸氧化酶 (APX) 活性稍低于对照, CAT 和 APX 基因的表达也受到一定的抑制; 内切几丁质酶 (CHI) 活性在 0、3、6、12 h 高于对照, 外切 CHI 活性在 24 h 内逐步增加, 而对照保持不变; *CHI1* 和 *CHI2* 基因的表达在前 6 h 略高于对照。综上所述, INA 诱导采后香蕉果实抗病性增加与其早期活性氧水平及抗病相关酶活性增加有密切关系, 由于活性氧合成酶活性增加、清除酶活性减少而产生的高水平活性氧可能作为信号分子启动了抗病应答反应。

关键词: 香蕉; 果实; 2,6-二氯异烟酸; 炭疽病; 活性氧; 抗病相关酶

中图分类号: S 668.1; S 379 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2011) 02-0265-08

Early Changes of Reactive Oxygen Species in 2,6-dichloroisonicotianic Acid Inducing Tolerance in Postharvest Banana Fruits

HUANG Xue-mei¹, ZHANG Can¹, PANG Xue-qun², and ZHANG Zhao-qi^{1,*}

(¹Guangdong Key Lab for Postharvest Science of Fruits and Vegetables, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ²College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) induces plant tolerance to a wide spectrum of diseases. But whether the compound induced the diseases-tolerance in postharvest fruits and vegetables remains to be clarified. We investigated the effects of INA on diseases-tolerance in harvested banana (*Musa* AAA Group 'Brazil') and the possible mechanism. The results showed that INA treatment effectively reduced the disease spot sizes on the peel of banana fruit when inoculated with spore suspension of *Collectotrichum musae* during 24 h after INA treatment and cultured for 8 d. H_2O_2 , a type of reactive oxygen species (ROS), and the involved enzymes were analysed and it was found that the content of H_2O_2 and activity of NADPH oxidase, an enzyme catalyze the production of ROS, were stimulated at 3 h, 6 h

收稿日期: 2010-10-08; 修回日期: 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771515); 广东省联合基金重点项目 (U0631004); 广东省自然科学基金团队项目 (06200670); 华南农业大学校长科学基金项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zqzhang@scau.edu.cn)

and 12 h after INA treatment, respectively. In addition, INA treatment decreased CAT and APX activities obviously, and suppressed the both genes expression to a certain extent. We also analysed the defence enzyme of chitinase (CHI) and found that activity of intro-CHI and extro-CHI were enhanced at 0 – 12 h and 0 – 24 h after INA treatment, respectively, and the expression of *CHI1* and *CHI2* genes were enhanced lightly at 3 – 6 h and 0 – 3 h after INA treatment, respectively. These results strongly suggest that elevated H_2O_2 levels, resulting from enhanced NADPH oxidase activity and suppressed CAT and APX activities, and the enhanced CHI activity are involved in the INA-induced disease tolerance.

Key words: banana; fruit; 2,6-dichloroisonicotinic acid; *Collectotrichum musae*; reactive oxygen species; defense-related enzyme

香蕉采后病害主要为潜伏侵染病害, 目前主要依靠化学杀菌剂处理, 但效果不佳, 且易造成毒性残留和病原菌的抗药性。对采后果蔬采用一些物理的、化学的因子处理后, 可诱导产生抗病性, 为果蔬采后病害防治开辟了一条安全无毒的途径, 成为采后病害防治研究的重点和热点之一 (Terry & Joyce, 2004; 黄雪梅 等, 2006)。研究表明, 水杨酸 (Salicylic acid, SA)、茉莉酸甲脂 (Methyl jasmonate, MJ) 和苯并噻二唑 (BTH) 等处理可诱导采后果实的抗病性, 这些诱导抗病处理往往诱导活性氧的爆发 (Liu et al., 2005; Zeng et al., 2006; Cao et al., 2008; 汪跃华 等, 2010)。长期以来, 活性氧被认为是细胞代谢中有害的副产品, 然而近年来的研究发现, 活性氧更可能是细胞信号传导和调控的重要组成部分 (Neill et al., 2002; Laloi et al., 2004; Kwak et al., 2006)。

2,6-二氯异烟酸 (2,6-dichloroisonicotinic acid, INA) 是一种人工合成的、结构和功能与 SA 类似的化合物。研究表明, INA 能激活植物系统获得性抗性反应 (SAR), 提供广谱的抗病性 (Hijwegen & Verhaar, 1994; Basson & Dubery, 2007), 但目前对 INA 诱导抗病性的研究主要集中在植株上, 在采后果蔬上的诱导抗病性研究报道较少 (曹建康和姜微波, 2005; 曾凯芳和姜微波, 2009)。

本研究中围绕 INA 对采后香蕉果实是否具有诱导抗病效果, INA 处理后需多长时间内才能诱导出抗病性, 这种诱导效果可维持多长时间等问题, 采用 INA 溶液对采后香蕉果实进行渗透处理, 从活性氧代谢的角度探讨了 INA 诱导采后香蕉果实抗病性的效果及其与果实活性氧水平、相关酶活性及基因表达水平的关系, 以为果蔬病害的生物防治研究以及探索香蕉保鲜新技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

绿熟 (七至八成熟) 巴西香蕉 (*Musa* AAA Group ‘Brazil’) 于 2007 至 2008 年采自广州市番禺区, 选择大小均匀、无病虫害及机械伤的果实, 用 0.1% 次氯酸钠溶液浸洗 5 min, 自来水冲洗, 晾干备用。

炭疽病菌种由华南农业大学资源环境工程学院植物保护系提供, 菌种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 培养 7 d, 用无菌水冲洗下粉红色孢子, 显微镜下用血球计数板计算孢子密度, 用无菌水将孢子稀释至 2×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$ 。

INA 为 Sigma 公司产品, H_2O_2 试剂盒为南京建成生物工程研究所生产。

1.2 方法

1.2.1 INA 诱导处理

通过 INA 浓度预备试验确定 INA 最佳诱导抗病处理的浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将果实置于 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ INA 溶液中进行低压 (0.8 MPa) 渗透处理 5 min, 恢复常压后继续浸泡 5 min, 以清水进行同样处理的果实作为对照, 取出晾干后于 0、3、6、12 和 24 h 取样, 一部分果实用于接种炭疽病菌孢子, 另外的果实取果皮切碎混匀分装, 置于 -80°C 待用。

1.2.2 接种处理

按黄雪梅等 (2006) 的方法对 INA 处理和对照果实各 20 个接种炭疽病菌, 分别分装于 4 个塑料框中并套 0.03 mm 聚乙烯袋保湿, 置于 20°C 下培养, 8 d 时测定果实发病情况。按病斑大小判断病情, 以病斑扩展垂直两个方向的平均宽度 (mm) 计算病斑大小。

1.2.3 H_2O_2 含量的测定

使用 H_2O_2 试剂盒进行测定, 原理是 H_2O_2 可与钼酸作用生成一种络合物, 在波长 405 nm 测定其生成量, 计算出 H_2O_2 含量。取 1.0 g 果皮液氮研磨, 用双蒸水定容至 3 mL, $13\,600 \times g$ 离心 15 min, 取上清液 1 mL 按试剂盒的加样步骤进行反应和测定, 依据 H_2O_2 标准曲线计算出样品 H_2O_2 含量。每样品测定 2 次, 3 次重复。

1.2.4 CAT、APX 和 CHI 活性的测定

CAT 测定参照范兰兰等 (2010) 的方法并修改。取 1.0 g 果皮液氮研磨, 测定 OD_{240} 值在 3 min 内的变化, 以每分钟 OD_{240} 减少 0.001 表示 1 个酶活力单位 (U), 样品的酶活性以 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

APX 测定参照赵会杰 (1999) 的方法。取 1.0 g 香蕉果皮, 液氮粉碎, 测定 OD_{290} 值在 3 min 内的变化, 以每分钟 OD_{290} 减少 0.001 表示 1 个酶活力单位 (U), 样品的酶活性以 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

外切几丁质酶和内切几丁质酶活性参照 Boller 等 (1983) 的方法。取 1.0 g 果皮加 4 mL pH 4.8 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 - 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液, 充分研磨, 于 4°C $18\,000 \times g$ 离心 15 min, 上清液为粗酶。加 1% 对二甲氨基苯甲醛 (DMAB) 溶液, 在波长 585 nm 比色测定 N - 乙酰葡萄糖胺量, 以每增加 0.01 个光密度所需酶量为一个酶活力单位 (U), 为 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 。

上述每样品测定 2 次, 3 次重复。

1.2.5 细胞膜微膜囊提取和 NADPH 氧化酶活性测定

参照 Morré 等 (2000) 的方法提取细胞膜微膜囊。取果皮 12 g, 用 60 mL 提取液 [$25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Mes, pH 7.8, 含: $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 0.9% PVP, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT (二硫苏糖醇), $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF (苯甲基磺酰氟)] 匀浆, 4 层纱布过滤。滤出液于 $7\,500 \times g$ 离心 15 min, 上清液 $36\,000 \times g$ 离心 1 h, 保留沉淀。沉淀用 3 mL 悬浮液 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Mes, pH 7.8, 含: $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF) 稀释, 得到细胞膜微膜囊粗提液。

NADPH 氧化酶活性测定按 Sagi 和 Fluhr (2001) 的方法进行, 采用上述细胞膜微膜囊粗提液, 通过 NADPH 氧化酶产生的活性氧氧化 XTT [2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -2H-Tetrazolium-5-carboxanilide inner salt] 的量来表示该酶活性。反应体系 1 mL 包括 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ XTT, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH 和 20 μL 的细胞膜微膜囊, 加入 NADPH 启动反应, XTT 减少量可通过 470 nm 检测。本底值 (background production) 可在反应系统中加入 50 U SOD (超氧化歧化酶) 测得。酶活性可通过 XTT 比吸收系数 $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 换算成活性氧的量来表示, 单位为 $\text{O}_2^- \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 。

1.2.6 香蕉果皮 CAT、APX、CHI 基因克隆和表达分析

参照 Wan 和 Wilkins (1994) 的热硼酸法提取绿熟香蕉果皮的总 RNA, 作为模板利用 Takara PrimeScript Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一链, 根据 NCBI 发表的香蕉 CAT (ABV55108.1)、CHI1 (AY525367.1) 和 CHI2 (AJ277279.1) 基因片段的序列设计特异引物克隆上述基因的片段,

利用其他物种 *APX* 基因蛋白序列的保守区域设计简并引物克隆 *APX* 基因的片段, 然后根据这些基因的片段序列设计上游引物, 采用 Takara 3'-Full RACE Core Set 试剂盒扩增 3'末端, 根据上述基因的 3'末端序列, 按照 Yang 等 (2009) 方法进行探针的地高辛标记、RNA 转膜和 Northern 杂交分析。各基因的地高辛标记引物分别为: CAT 上游: 5'-GTGCCCCGCATCTACTACTC-3', CATR 下游: 5'-TGGAATGGGGAATCTCTCTG-3'; APX 上游: 5'-ACACACACTGGGAAGGTGCC-3', APX 下游: 5'-TATTGGTGAGATGTTTCCGA-3'; CHI1 上游: 5'-TGGCAACGCACTCAGAACAG-3', CHI1 下游: 5'-GACCACATATAGTACAAGCG-3'; CHI2 上游: 5'-ACGGCTCTGTGGTTCTGGAT-3', CHI2 下游: 5'-CTTCCTCCGCAACTTCTACA-3'。

2 结果与分析

2.1 INA 处理对香蕉果实接种炭疽病菌病斑直径的影响

将香蕉果实经 INA ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理, 于处理后 0、3、6、12 和 24 h 接种炭疽病菌孢子, 在 20°C 下保湿培养 8 d 后的感病情况如图 1 所示。INA 处理的果实病斑直径在各个时间点均显著小于对照果实, 其中以 INA 处理后 6 h 接种的病斑最小。结果表明 INA 处理完毕后 (0 h) 即可诱导香蕉果实产生抗病性, 并且至少 24 h 内保持抗病性。

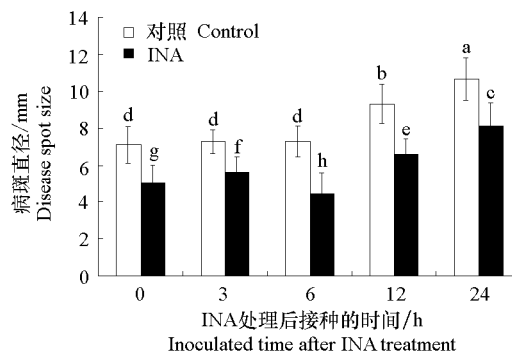


图 1 INA 处理后 24 h 内接种炭疽病菌 8 d 时香蕉果实的病斑直径

不同字母表示经 Duncan's 多重比较分析差异显著, $P \leq 0.05$ 。

Fig. 1 Disease spot sizes on the peel of banana fruit that inoculated with *Collectotrichum musae* within 24 h after INA treatment and cultured for 8 d

A different letter showed significant difference at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

2.2 INA 处理对接种炭疽病菌香蕉果皮 H_2O_2 含量和 NADPH 氧化酶活性的影响

香蕉果实经 INA 渗透处理后于 24 h 内接种炭疽病菌, 果皮中的 H_2O_2 含量的变化趋势与对照基本相似, 但 INA 处理后 6 h 接种的果实 H_2O_2 含量显著高于对照, 约高 12.5%, 其它时间点差异不显著 (图 2)。

NADPH 氧化酶活性与活性氧的产生密切相关 (Sagi & Fluhr, 2001; Neil et al., 2002; Laloi et al., 2004)。处理和对照果实的 NADPH 氧化酶活性变化趋势不一致, INA 处理果实后 3~12 h 内接种炭疽病菌, NADPH 氧化酶活性有较大提高, 比对照提高 14%~22%, 24 h 后接种回落到 0 h 接种的水平; 对照果实的 NADPH 氧化酶活性在 3~12 h 内活性处于较低水平, 到 24 h 才明显升高 (图 2)。结果表明, 在 INA 诱导香蕉产生抗病性的早期检测到 H_2O_2 含量 (6 h) 和 NADPH 氧化酶活性 (3~12 h) 提高。

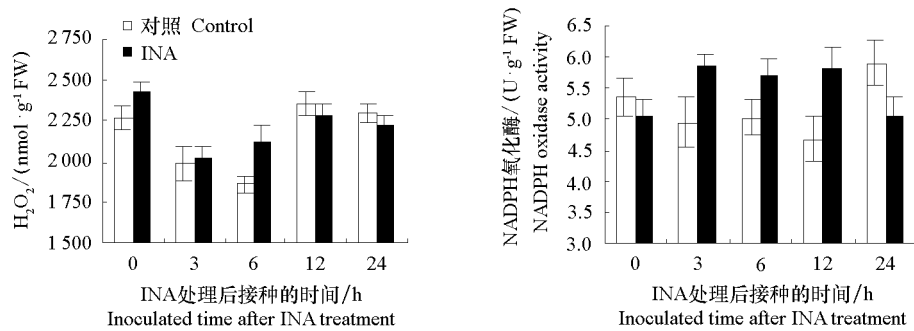


图 2 INA 处理后 24 h 内接种炭疽病菌香蕉果皮 H_2O_2 含量和 NADPH 氧化酶活性的变化

Fig. 2 Changes of the content of H_2O_2 and activity of NADPH oxidase in the peel of banana fruit during 24 h after INA treatment

2.3 INA 处理对接种炭疽病菌香蕉果皮 CAT 和 APX 活性及其基因表达的影响

INA 处理和对照香蕉果实在 24 h 内 CAT 活性均呈现出逐步升高的趋势,但 INA 处理果实的 CAT 活性一直低于对照,在 6 h 时仅为对照的 80%左右;INA 处理对果实 APX 活性也具有一定的抑制作用,INA 处理果实的 APX 活性除 12 h 外,其它均低于对照,为对照的 69%~90% (图 3)。

从基因表达结果 (图 4) 来看,12 h 前的 CAT 和 APX 基因表达强于 12 h 后。INA 处理果皮中 CAT 基因的表达量在各时间点都比对照 (CK) 低,这与 CAT 酶活性所表现的趋势相似;APX 基因表达仅在 3 h 时低于对照,其它时间点两者差异不大。这与上述 APX 酶活性多数时间低于对照的变化规律不完全一致。

总体上,INA 处理诱导香蕉产生抗病性的早期,检测到 CAT 和 APX 活性与 CAT 和 APX 基因的表达受抑制。

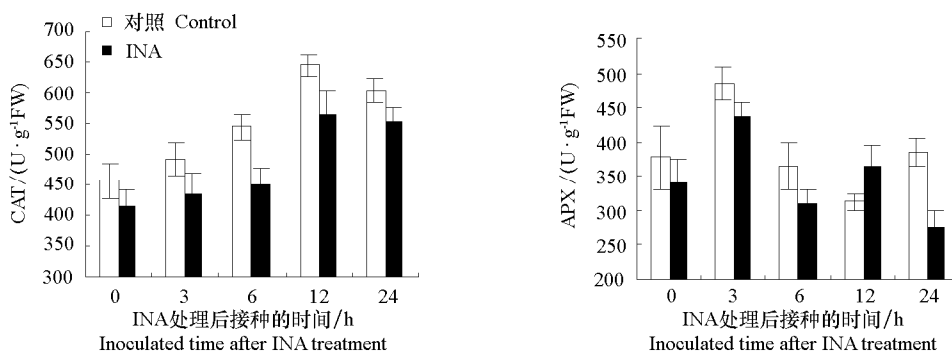


图 3 INA 处理后 24 h 内接种炭疽病菌香蕉果皮 CAT 和 APX 活性的变化

Fig. 3 Changes of the activities of CAT and APX the peel of banana fruit during 24 h after INA treatment

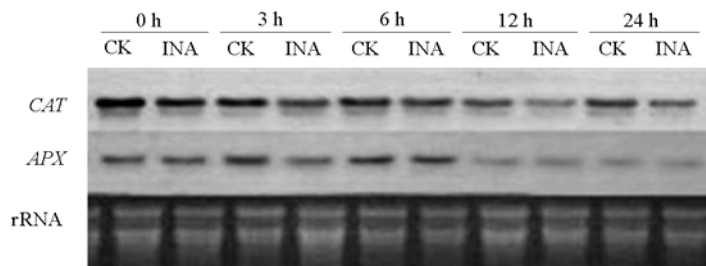


图 4 INA 处理后 24 h 内接种炭疽病菌香蕉果皮 CAT 和 APX 基因表达的变化

Fig. 4 Changes of CAT and APX genes expression in the peel of banana fruit during 24 h after INA treatment

2.4 INA 处理对接种炭疽病菌香蕉果皮 CHI 活性和基因表达的影响

植物 CHI (Chitinase, EC3.2.1.14) 是一种与防卫反应有关的次生物水解酶。对照果实果皮外切 CHI 活性在 24 h 内基本维持不变, 经 INA 处理的该酶活性逐步升高, 在 12 h 和 24 h 的酶活性比对照增加 15% 和 18%; 对照果皮内切 CHI 活性在 24 h 内变化不大, 但 12 h 之前 INA 处理均比对照提高, 6 h 的活性提高较明显, 约比对照增加 11% (图 5)。

从 CHI 基因表达图谱 (图 6) 可见, *CHI1* 表达量 6 h 后有所增加, *CHI2* 表达量变化不大。INA 处理果实 *CHI1* 和 *CHI2* 表达量分别在 3 h 与 6 h、0 h 与 3 h 有所增强, 其它时间与对照 (CK) 间没有明显差异。

总体上, INA 处理诱导香蕉产生抗病性的早期, 检测到外切 CHI 和内切 CHI 活性升高, 也在一定程度上促进 *CHI1* 和 *CHI2* 基因的表达。

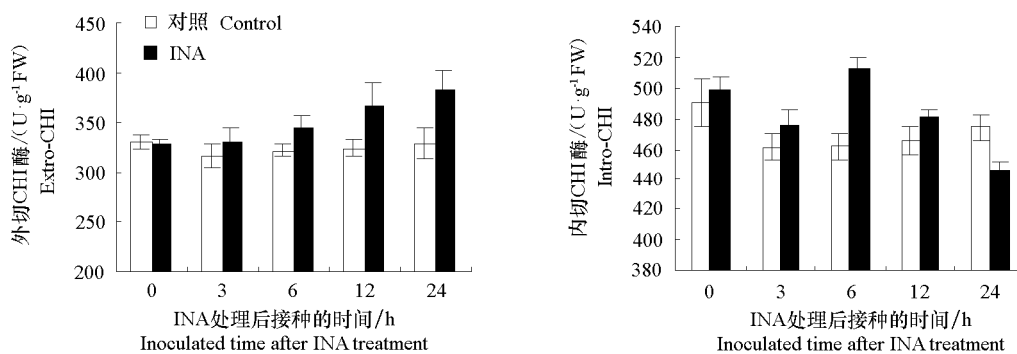


图 5 INA 处理后 24 h 内接种炭疽病菌香蕉果皮中的 CHI 活性的变化
Fig. 5 Changes of the activities of CHI1 and CHI2 in the peel of banana fruit during 24 h after INA treatment

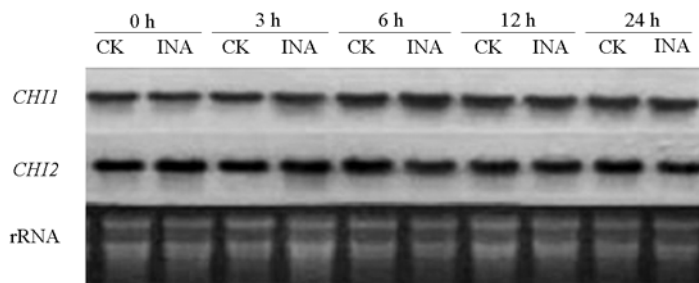


图 6 香蕉果实经 INA 处理后 24 h 期间果皮中的 CHI 基因表达的变化
Fig. 6 Changes of the expression of *CHI1* and *CHI2* genes in the peel of banana fruit during 24 h after INA treatment

3 讨论

INA 是 SA 的结构和功能类似物。研究表明, INA 能增强植物抗病性, 激活植物系统获得抗病性 (SAR) 反应; 用 INA 处理植物整株、叶片或种子等均可有效活化抗病防御反应, 保护作物免受病毒、细菌和真菌等病原物的侵害 (Hijwegen & Verhaar, 1994; Basson & Dubery, 2007)。然而, INA 处理对园艺产品采后诱导抗病性的影响报道仍较少。曹建康和姜微波 (2005)、曾凯芳和姜微波 (2009) 发现 INA 浸泡处理可提高鸭梨和芒果的抗病能力。本研究中采用 INA 溶液渗透处理香蕉果实, 并在之后的 24 h 内接种香蕉炭疽病菌孢子, 结果表明处理后不同时间接种对采后香蕉果实均具有诱导抗病作用, 以处理后 6 h 时接种的抗病效果最好, 并在 24 h 内仍保持一定的抗病性。说

明香蕉果实在 INA 渗透处理后能激发一系列的生理反应以提高其抗病性。

近年来大量研究表明,活性氧是动植物细胞应答各种逆境,如病原体、激发子、损伤、热、强光、紫外线、臭氧等生物及非生物胁迫所产生的重要的信号分子。植物组织或细胞受到病菌或诱导因子的诱导后能短时间内产生大量的活性氧(oxidative burst),一方面引起膜脂过氧化,细胞壁木质化,导致侵染点的组织坏死,另一方面还可作为第二信使将侵染信号转入细胞内,使依赖于氧化还原的转录因子被激活,启动防卫反应基因表达,诱导植物产生抗病反应(Neill et al., 2002; Laloi et al., 2004; Kwak et al., 2006)。研究发现,各种激发子诱导采后果蔬抗病性提高的同时往往也诱导了活性氧含量的增加,如 SA 处理促进芒果活性氧含量的急剧提高(Zeng et al., 2006), BTH 处理显著提高了采后桃果实活性氧含量(Liu et al., 2005)。研究发现,在 INA 处理后 6 h,即可检测到 H_2O_2 含量显著增加及与合成 H_2O_2 密切相关的 NADPH 氧化酶活性(Foreman et al., 2003)增加,而与清除活性氧相关的 CAT 和 APX 活性受到不同程度的抑制, CAT 和 APX 的表达受到相应抑制。Chan 和 Tian (2006) 发现采后 SA 处理提高甜樱桃果实抗病性的同时也显著抑制了 CAT 活性,采后 MJ 处理也可减少枇杷果实由炭疽病菌引起的腐烂率和病斑直径,且在感病早期 MJ 处理显著抑制了 CAT 和 APX 活性,而 H_2O_2 含量提高(Cao et al., 2008)。因此,INA 处理诱导香蕉果实 H_2O_2 含量的提高与 NADPH 氧化酶活性增加, CAT 和 APX 的活性受抑及基因表达的下降具有密切关系。

各种诱导抗病处理也改变了采后果蔬的一些蛋白或酶基因的表达模式,如 SA 处理促进了甜樱桃 CHI 和 α -1,3-葡聚糖酶的活性及其基因表达,激活了抗氧化防御反应(Xu & Tian, 2008); SA 处理引起了甜樱桃不同成熟阶段的 7 个抗氧化蛋白和 3 个病原相关蛋白的出现,这些蛋白质的改变可能激活了抗病相关蛋白活性,从而提高了抗病能力(Chan et al., 2008)。王文娟等(2008)发现喷施 BTH 能诱导苹果体内与防卫反应有关的苯丙氨酸解氨酶、CHI 及 β -1,3-葡聚糖酶的活性。作者的研究也发现,INA 处理不同程度促进了与抗病密切相关的外切 CHI 和内切 CHI 活性,CHI1 和 CHI2 的基因表达得到一定程度的增强(分别在 3~6 h 和 0~3 h)。因此,INA 处理促进早期 CHI 活性及基因表达与香蕉抗病性的提高有密切关系。

综上所述,INA 处理可诱导增加香蕉果实的抗病性。在 INA 处理后的 24 h 内,与活性氧合成有关的 NADPH 氧化酶活性增加,而与活性氧清除的主要酶类如 CAT, APX 活性减少或表达抑制,导致调控着香蕉组织或细胞在短时间内积累活性氧,从而引起一系列的防卫反应如 CHI 增加等,减少香蕉病害发生。

References

- Basson A E, Dubery I A. 2007. Identification of a cytochrome P450 cDNA (CYP98A5) from *Phaseolus vulgaris*, inducible by 3,5-dichlorosalicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Journal of Plant Physiology*, 164 (4): 421 - 428.
- Boller T, Gehria A, Mauch F, Vögeli U. 1983. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification properties, and possible function. *Planta*, (157): 22 - 31.
- Chan Z L, Tian S P. 2006. Induction of H_2O_2 -metabolizing enzymes and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, (39): 314 - 320.
- Chan Z L, Wang Q, Xu X B, Meng X H, Qin G Z, Li B Q, Tian S P. 2008. Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics*, 8: 4791 - 4807.
- Cao Jian-kang, Jiang Wei-bo. 2005. Control of black mould disease in 'Yali' pear fruit by the treatment with ASM induction after harvest. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 783 - 787. (in Chinese)
- 曹建康, 姜微波. 2005. 采后 ASM 诱导处理对鸭梨果实黑霉病的控制. *园艺学报*, 32 (5): 783 - 787.
- Cao S F, Zheng Y H, Yang Z F, Tang S S, Jin P, Wang K T, Wang X M. 2008. Effect of methyl jasmonate on the inhibition of *Colletotrichum*

- acutatum* infection in loquat fruit and the possible mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, (49): 301 – 307.
- Fan Lan-lan, Jiang Zi-de, Xiang Mei-mei. 2010. Effect of vulculic acid on the activities of defense enzymes of *Alternanthera philoxeroides*. *Journal of South China Agricultural University*, 31 (3): 28 – 31. (in Chinese)
- 范兰兰, 姜子德, 向梅梅. 2010. 莲子草假隔链孢毒素对空心莲子草根尖组织防御酶活性的影响. *华南农业大学学报*, 31 (3): 28 – 31.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell J H F, Mylona P, Miedema H, Torresk M A, Linstead P, Costa S, Bronlee C, Jonesk J D G, Davies J M, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442 – 446.
- Hijwegen T, Verhaar M A. 1994. Effects of cucumber fenotype on the induction of resistance to powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Pathology*, 44: 756 – 762.
- Huang Xue-mei, Liu Ming-jin, Zhang Zhao-qi, Ji Zuo-liang. 2006. Preliminary study on induced resistance to postharvest disease of banana (*Musa AAA*) fruits. *Food Science*, 27 (3): 224 – 227. (in Chinese)
- 黄雪梅, 刘明津, 张昭其, 季作梁. 2006. 香蕉采后诱导抗病性的初步研究. *食品科学*, 27 (3): 224 – 227.
- Kwak J M, Nguyen V, Schroeder J I. 2006. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology*, 141: 323 – 329.
- Laloi C, Apel K, Danon A. 2004. Reactive oxygen signaling: The latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 323 – 328.
- Liu H X, Jiang W B, Bi Y, Luo Y B. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 35: 263 – 269.
- Morré D J, Morré D M. 2000. Application of aqueous two-phase partition to isolation of membranes from plants: A periodic NADH oxidase activity as a marker for side-out plasma membrane vesicles. *Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743 (1-2): 369 – 376.
- Neill S, Desikan R, Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 388 – 395.
- Sagi M, Fluhr R. 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by *Tobacco mosaic virus* infection. *Plant Physiology*, 126: 1281 – 1290.
- Terry L A, Joyce D C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 1 – 13.
- Wan C Y, Wilkins T A. 1994. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytical Biochemistry*, 223: 7 – 12.
- Wang Wen-juan, Wei Chao-jun, Zhao Jian-zhong, Feng Qiang, Lu Ping. 2008. The study of BTH-induced resistance to *Alternaria alternata* f.sp. *mali* in apple. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 24 (5): 213 – 218. (in Chinese)
- 王文娟, 魏朝俊, 赵建庄, 冯 强, 路 苹. 2008. 苯并噻二唑 (BTH) 诱导苹果抗斑点落叶病研究. *中国农学通报*, 24 (5): 213 – 218.
- Wang Yue-hua, Xu Lan-ying, Pang Xue-qun, Huang Xue-mei, Zhang Zhao-qi. 2010. Postharvest BTH treatment induces resistance of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco ‘Shiyueju’) fruit to *Penicillium digitatum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (12): 1901 – 1908. (in Chinese)
- 汪跃华, 徐兰英, 庞学群, 黄雪梅, 张昭其. 2010. 苯并噻二唑处理提高采后砂糖橘对指状青霉菌的抗性. *园艺学报*, 37 (12): 1901 – 1908.
- Xu X B, Tian S P. 2008. Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, (49): 379 – 385.
- Yang X T, Pang X Q, Xu L Y, Fang R Q, Huang X M, Guan P J, Lu W J, Zhang Z Q. 2009. Accumulation of soluble sugars in peel at high temperature leads to stay-green ripe banana fruit. *Journal of Experimental Botany*, 60 (14): 4051 – 4062.
- Zeng K F, Cao J K, Jiang W B. 2006. Enhancing disease resistance in harvested mango (*Mangifera indica* L. cv. ‘Matisu’) fruit by salicylic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 694 – 698.
- Zeng Kai-fang, Jiang Wei-bo. 2009. Effects of 2,6-dichloroisonicotinic acid treatments on postharvest quality of mango fruits. *Transactions of the CSAE*, 25 (3): 267 – 271. (in Chinese)
- 曾凯芳, 姜微波. 2009. 2,6 - 二氯异烟酸处理对芒果果实采后品质的影响. *农业工程学报*, 25 (3): 267 – 271.
- Zhao Hui-jie. 1999. Determine of ascorbic acid contents and ascorbate-peroxidase activities // Institute of Plant Physiology & Ecology, Chinese Academy of Sciences, The Shanghai Society for Plant Physiology. Guide of experimental techniques of modern plant physiology. Beijing: Science Press: 315 – 315. (in Chinese)
- 赵会杰. 1999. 抗坏血酸含量及抗坏血酸过氧化物酶活性的测定 // 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理实验指南. 北京: 科学出版社: 315 – 315.