

## 빛과 카드뮴이 벼 catalase 활성과 동위효소 발현에 미치는 영향

김윤경 · 이미영\*

순천향대학교 유전공학과

Effect of Light and Cadmium on the Activity and Isozyme Pattern of Catalase from Rice (*Oryza sativa* L.)

Yoon Kyoung Kim and Mi Young Lee\*

Department of Genetic Engineering, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 336-600, Korea

Received September 27, 2006; Accepted November 14, 2006

The effects of cadmium on the catalase activity and isozyme patterns under light and dark conditions of rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) seedlings were examined. Cadmium treatment resulted in the notable enhancement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents in the seedling roots and leaves under light and dark conditions. The catalase isozyme patterns in the roots were different from those in the leaves, showing tissue-specific expression of the enzyme. Moreover, the expression patterns of catalase isozymes in the green seedling roots were different from those in the etiolated seedling roots following cadmium treatment. The increase of total catalase activity was about 16 times at 1 mM cadmium and marked inductions of the isozyme CAT1 and CAT2 contributed to this increase in the green seedling roots. On the other hand, in the etiolated seedling roots, total catalase activity was lower than that of control at 0.5 and 1 mM cadmium, even though catalase activity increased about 3 times at 0.1 mM cadmium. The 3 fold increase of total catalase activity was mainly due to the increase of CAT1, CAT3 and CAT4 at 0.1 mM cadmium. However, treatment with higher concentrations of cadmium decreased the activity of CAT2 and CAT4 in the etiolated roots. In the leaves, the catalase existed as three isozymes; one cationic isozyme CATc, one neutral isozyme CATn and one anionic isozyme CAT1 in the control. The isozyme patterns and total activities remained unaffected by cadmium under light and dark conditions in the seedling leaves. Taken together, it seems that cadmium-induced changes of catalase might be regulated by light in the roots, but not in the leaves.

**Key words:** cadmium, catalase, light, rice

## 서론

Catalase(CAT: EC 1. 11. 1. 6)는 heme을 포함한 효소로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 물과 산소로 분해시킨다.<sup>1)</sup> Peroxidase가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하기 위해 페놀 화합물 같은 co-substrate의 산화를 수반하는데 비해,<sup>2)</sup> catalase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 직접 분해시킨다. Catalase는 식물에서 광호흡과 지방산의 산화과정에서 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포획함으로써 환경요인 뿐만 아니라 생리화학적 산화스트레스에 대해 중요한 방어기능을 수행하고 있다. 또한 catalase 유전자는 다양한 스트레스에 대한 지표 유전자로 제시되어 있다.<sup>3)</sup> 식물 catalase는 보통 다수의 동위효소로 이루어져 있다. 옥수수, 목화, 밀 등에는 다수의 서로 다른 catalase 유전자가 존재하는데 각 유전자의 발현패턴이 발달단계와 환경조건에 따라 서로 차이가 낫

다. 벼 catalase 경우 CatA, CatB 및 CatC 유전자가 분리되어 있다. CatA cDNA는 미성숙 종자에서 처음으로 분리되었는데<sup>4)</sup> CatB cDNA와 약 63.6%의 유사성을 가지고 있었다.<sup>5)</sup> CatA 유전자는 초기 발달단계와 유묘에서 발현량이 증가하였다. Methyl viologen 처리에 의해서 유묘 잎의 CatA 유전자 유도가 약 3배 증가한 반면 abscisic acid, 상처, salicylic acid, 과산화수소에 의해서는 유전자 발현량에 거의 변화가 없었다.<sup>6)</sup> CatB 유전자는 뿌리와 배양세포에서 주로 발현되었는데<sup>7)</sup> CatB mRNA 양은 암 상태에서 감소하였다.<sup>8)</sup> CatA와 CatB 유전자는 서로 다른 조직 특이적 발현을 보일 뿐만 아니라 salicylic acid (SA)에 대하여 서로 다른 반응성을 보였다.<sup>9)</sup> CatA 유전자는 담배의 SA-민감성 catalase와 시퀀스 유사성이 매우 낮는데 비해 CatB 유전자는 SA-민감성 catalase와 시퀀스 유사성이 매우 높았다. 잎에서 주로 발현되는 CatC 유전자(OsCATC)는<sup>10)</sup> CatA, CatB에 비하여 다양한 시그널에 반응하였으며 특히 jasmonic acid, salicylic acid, ethylene 뿐만 아니라 단백질 인산화효소(PP) 2A 억제제 처리에 의하여 유전자 발현이 감소하는 특성을 보였다.

\*Corresponding author

Phone: 82-41-530-1355; Fax: 82-41-520-1355

E-mail: miyoung@sch.ac.kr

카드뮴은 강력한 독성을 나타내는 중금속으로서 토양에도 미량 포함되어 있다.<sup>11)</sup> 카드뮴은 식물 잎의 백화현상, 잎과 뿌리의 세포파괴, 식물의 생장과 조직 크기에 영향을 주는 것으로 보고되었다.<sup>12)</sup> 그리고 카드뮴은 세포막의 인산지질의 산화적 인산화에 영향을 주며, 세포 호흡의 손상, 효소 활성 억제와 단백질 변성의 원인이 될 뿐만 아니라 영양분 운반 과정을 방해하였다.<sup>13)</sup> 카드뮴 처리에 의한 CAT의 활성변화는 다양한 식물에서 보고되어 있는데 카드뮴 처리에 의해 CAT의 총 활성 뿐만 아니라 동위효소의 발현패턴에도 차이를 보였다. 그러나 아직 catalase 동위효소와 Cat 유전자와의 상호관계는 밝혀져 있지 않아서 어느 유전자가 어느 동위효소의 활성과 연계되어 있는지 분명하지 않다. *Phaseolus aureus*,<sup>14)</sup> *Pisum sativum*,<sup>15)</sup> *Lemna minor*<sup>16)</sup>과 *Amaranthus lividus*<sup>17)</sup>의 성장 배지에 카드뮴을 첨가했을 때 catalase 총활성과 동위효소의 발현패턴이 변화되었다. 중금속 처리에 의한 CAT의 활성변화와 동위효소의 발현패턴 변화를 통해서, 특정 동위효소의 발현변화가 중금속 스트레스에 대한 세포내 지표로 사용될 수 있다고 제안되었다.

본 연구에서는 카드뮴 처리에 의한 동진벼(*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) 유묘의 catalase의 활성 변화와 동위효소 발현패턴의 변화를 명암조건으로 나누어 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

**재료의 준비.** 동진벼 종자에 충분한 양의 3차 증류수를 넣어 암상태의 32°C 배양기 안에서 48시간 동안 침종하여 발아시켰다. 침종시킨 동진벼 종자의 줄기가 위를 향하도록 하여 60-70 개체씩을 지지판에 심은 다음, 3일 동안 3차 증류수에서 재배한 후 5일 동안 Hoagland 배양액에서 수경 재배하였다. 명조건의 동진벼 종자는 명 : 암의 비율이 12 : 12시간이 되도록 한 32°C 배양기 안에서 5일간 배양시켰다. 암조건의 동진벼 종자는 32°C 배양기 안의 암조건에서 5일간 배양시켰다. 회수된 벼 잎과 뿌리는 액체질소를 사용하여 급속 냉동시켜 -70°C에서 보관하여 사용하였다.

**카드뮴 처리.** Hoagland 배양액에서 3일 동안 자란 벼 유묘에 CdCl<sub>2</sub> 최종 농도가 0, 0.1, 0.5와 1 mM가 되도록 처리한 후 명암 조건으로 나누어 48시간 동안 생장시켰다.

**효소액의 제조 및 catalase 활성 측정.** 효소액을 제조하기 위하여 -70°C 극저온 냉동조건에서 보관된 시료 100 g을 액체질소를 첨가하면서 균질화시켰다. 균질화된 시료에 최소부피의 50 mM potassium phosphate(pH 7.0) 완충용액을 넣은 후 12,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 효소액으로 사용하였다. Catalase 활성은 100 mM potassium phosphate(pH 7.0), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 효소액의 혼합액이 3 ml가 되게 한 후 240 nm에서 5분 동안 흡광도의 감소를 측정하였다.<sup>18)</sup>

**Nondenaturing PAGE.** Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Gabriel<sup>19)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였다. 3% acrylamide로 된 stacking gel과 9% acrylamide로 된 separating gel을 포함하는 slab gel에 모든 시료의 단백질량이 30 μg이 되게 주입하여 전기이동을 수행하였다. 미리 차가게 해 둔 running buffer를 사용하였고 전기이동을 하는 동안에 4°C를

유지시켰다. 전기이동시 stacking gel에서 70 V로 유지시키다가 separating gel 구간에서는 120 V로 전압을 올려 전개시켰다.

**Catalase 활성 염색.** 전기이동 후 gel을 3.27 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 25분간 반응시킨 후 증류수로 씻고 1% ferric chloride-1% potassium ferricyanide(III) 용액에 담귀 두었다가 염색 후 gel을 증류수로 씻었다.<sup>20)</sup> 청녹색 바탕위의 노란색 띠로 나타나는 catalase 활성을 확인하였다.<sup>21)</sup>

**과산화수소 함량 측정.** 카드뮴 처리된 잎 또는 뿌리 1 g을 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.8) 3 ml에 넣고 파쇄기로 파쇄한 후, 12,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 사용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량을 측정하였다. 상등액 0.5 ml을 peroxide reagent(83 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.005% o-dianisidine, 40 μg peroxidase/ml)와 혼합한 후 30°C에서 10분 동안 반응시켰다. 위 반응을 1 N perchloric acid 0.5 ml를 첨가하여 정지시키고, 5,400 × g에서 3분 동안 원심분리하였다. 상등액의 흡광도를 436 nm에서 측정 후 표준곡선과 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량을 구하였다.<sup>22)</sup>

## 결과 및 고찰

**카드뮴 처리에 의한 뿌리 카탈라제의 변화.** Fig. 1에서는 명조건과 암조건에서 동진벼 뿌리의 catalase 활성 변화를 보여주고 있다. 명조건에서는 동진벼 뿌리의 catalase 총활성이 카드뮴 농도증가에 따라 급격하게 증가하였다. 0.1 mM 카드뮴에 의하여 catalase 총활성이 대조군에 비하여 약 4배 증가하였고 1 mM 카드뮴에 의하여 catalase 총활성이 약 16배 증가하였다. 이에 비해 암조건에서는 동진벼 뿌리의 catalase 총활성이 0.1 mM 카드뮴에 의해서 약 3배 증가하였으나 카드뮴 농도가 더 증가하게 되면 오히려 대조군보다 총활성이 감소하였다.

카드뮴 처리에 의한 동위효소의 발현 패턴의 변화가 Fig. 2에 나타나 있다. 동위효소의 이름은 동위효소로 존재하는 산화 환원효소군의 명명체계와 마찬가지로 음극에서 양극으로의 이동속도가 느린 효소에서 빠른 효소로 갈수록 숫자번호를 증가시켜가면서 명명하였다. 명조건과 암조건에서 뿌리 대조군의 동일 양의 단백질을 기준으로 동위효소를 서로 비교해보면 명조건에서는 두 개의 동위효소 CAT1과 CAT2가 약하게 모두 염색되었으나 암조건에서는 동위효소 CAT2만이 염색되었다. 카드뮴을 처리하게 되면 명조건에서는 동위효소 CAT1과 CAT2의 발현이 모두 급격하게 증가하였다. 따라서 카드뮴 처리에 의한 명조건 뿌리 catalase 총활성의 급격한 증가는 동위효소 CAT1과 CAT2의 발현증가에 의한 것임을 알 수 있다. 따라서 동진벼 뿌리의 CAT1과 CAT2 동위효소의 현저한 증가는 빛과 카드뮴 처리로 인해 유도된 세포내 산화스트레스를 극복하기 위한 방어기작의 일부로 추측할 수 있다. 이에 비해 암조건에서는 0.1 mM 카드뮴에 의해서 동위효소 CAT2가 약간 감소한 대신 CAT1, CAT3, CAT4가 유도되었다가 카드뮴 처리농도를 0.5, 1 mM로 높이면 CAT2와 CAT4는 크게 감소하였고 CAT1, CAT3만이 발현되어 염색되었다. 이러한 결과들은 종합적으로 카드뮴에 의한 뿌리 catalase 동위효소의 발현변화가 빛과 연관될 가능성을 시사한다. CatB 유전자의 경우 뿌리에서

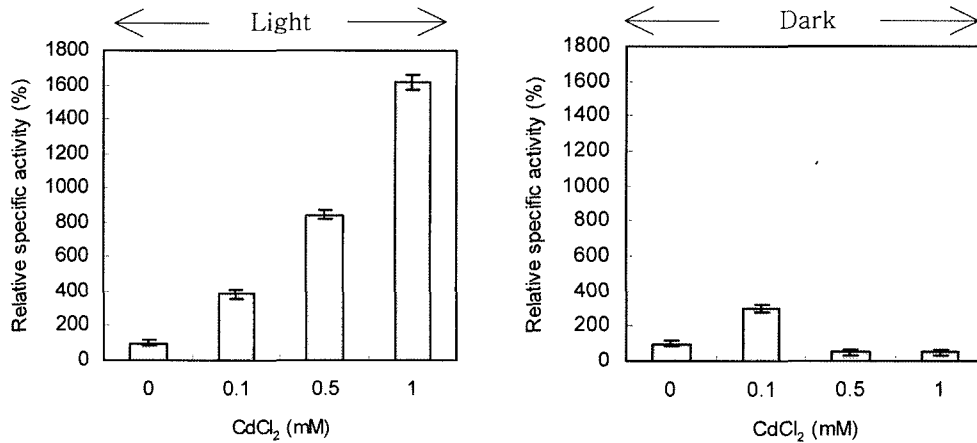


Fig. 1. Changes in the total activities of catalase from rice seedling roots following CdCl<sub>2</sub> treatment.

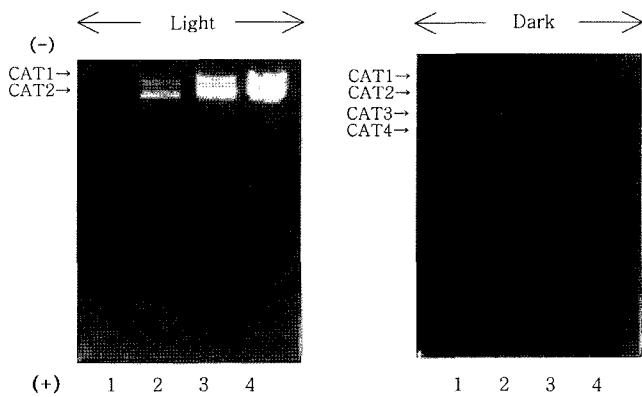


Fig. 2. Effect of CdCl<sub>2</sub> on the patterns of catalase isozymes from rice seedling roots on the acrylamide gel. Lane 1, control; lane 2, 0.1 mM CdCl<sub>2</sub>; lane 3, 0.5 mM CdCl<sub>2</sub>; lane 4, 1 mM CdCl<sub>2</sub>.

주로 발현될 뿐만 아니라 암조건에서 mRNA 양이 감소한다고 보고되어 있다.<sup>8)</sup> 그러나 CatB 유전자가 어느 동위효소를 코딩하는지 효소수준에서 연구가 미흡하여 아직 알 수가 없다.

카드뮴 처리에 의한 CAT의 총 활성 변화가 다양한 세포에서 보고되어 있다. 그리고 중금속 처리에 의한 CAT 동위효소의 발현패턴 변화를 통해서, 특정 동위효소의 발현변화가 중금속 스트레스에 대한 세포내 지표로 사용될 수 있다고 제안되었다. *Phaseolus aureus*에서는 카드뮴 처리에 의해 뿌리와 잎의 catalase의 활성이 현저히 감소되었으나 줄기의 catalase 활성은 크게 변화하지 않았다. 그러나 *Agropyron repens*에서는 카드뮴 처리에 의해 잎과 줄기의 catalase의 활성이 모두 증가하였다.<sup>23)</sup> *Helianthus annuus*<sup>24)</sup>에서는 22일 이상의 장시간 카드뮴을 처리했을 경우에만 catalase 활성이 변화되었다. 이와 비슷한 경향은 *Solanum tuberosum*에서도 나타났으며 *Solanum tuberosum*에서 카드뮴에 의한 catalase의 활성은 일시적인 증가를 제외하고 전반적으로 빠르게 불활성화 되었다.<sup>25)</sup> 두 종류의 *Alyssum*의 catalase의 활성은 20 μM 카드뮴 처리에 의하여 증가하였지만 50 μM 카드뮴 처리에 의해서는 감소하였다.<sup>26)</sup>

*Raphanus sativus*의 경우 카드뮴 처리에 의해 뿌리와 잎의 catalase 총활성이 모두 증가하였다. *Raphanus sativus*의 잎에는

두개의 주요 CAT 동위효소가 존재하고 뿌리에는 하나의 CAT 동위효소가 활성 염색되었는데, 0.5 mM 카드뮴을 처리하면 잎의 두 종류의 CAT 동위효소와 뿌리의 CAT 효소가 모두 현저히 증가하였다. *Crotalaria juncea*의 경우 2 mM 카드뮴에 의해 잎의 catalase 총활성은 카드뮴 처리시간이 증가함에 따라 증가하였는데 이러한 증가현상은 활성염색된 세 개의 CAT 동위효소의 발현 증가에 의한 것이었다. 반면 뿌리의 catalase 활성은 카드뮴 처리 시간이 증가함에 따라 오히려 감소하는 경향을 보였으며, 활성염색된 주요 CAT 동위효소도 마찬가지로 모두 감소하였다. 그러나 카드뮴을 24시간 처리하였을 때 오히려 두 종류의 새로운 CAT 동위효소가 유도되었다. 이와 같이 다양한 식물에서 보고된 카드뮴에 의한 catalase 총활성변화와 동위효소의 발현 패턴 변화는 카드뮴에 대한 세포내 방어기작의 일부임을 시사한다.

**카드뮴 처리에 의한 잎 카탈라제의 변화.** 명조건과 암조건에서 동진벼 잎의 catalase 총활성 변화(Fig. 3)와 동위효소의 발현변화(Fig. 4)를 살펴보았다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 명조건과 암조건 모두 동진벼 잎의 catalase 총활성은 카드뮴 처리에 의해서 거의 변화하지 않았다. 동위효소의 발현 패턴을 살펴보면 명조건에서 배양한 동진벼 잎에는 CAT1 뿐만 아니라 염기성 동위효소인 CATc와 중성 동위효소인 CATn이 존재하였다(Fig. 4). 그리고 명조건에서 발현된 동진벼 잎의 동위효소는 암 처리에 의하여 크게 변화하지 않았다. 뿐만 아니라 카드뮴처리를 한 후 동위효소의 발현차이도 거의 나타나지 않아 catalase 동위효소인 CATc, CATn, CAT1이 카드뮴 처리농도를 증가시켜도 대조군과 거의 비슷한 수준으로 발현되었다. 이러한 결과는 뿌리와 달리 카드뮴에 의한 잎 카탈라제 동위효소의 발현패턴이 빛의 영향을 받지 않음을 보여준다.

**세포내 과산화수소 함량.** 과산화수소는 식물체의 엽록체, peroxisome, 미토콘드리아 등에서 안정된 산소라디칼의 형태로 생성되므로, 즉시 제거되지 않으면 강력한 산화력에 의해 엽록체 효소의 불활성화, 세포구성물질의 산화, 세포막 지질의 과산화반응 등을 일으켜 세포막의 파괴와 함께 세포가 총체적인 손상을 입게 된다. 따라서 세포내 과산화수소 함량은 엽록체 손상과 함께 세포손상 정도를 나타내는 주요 지표로 사용될 수

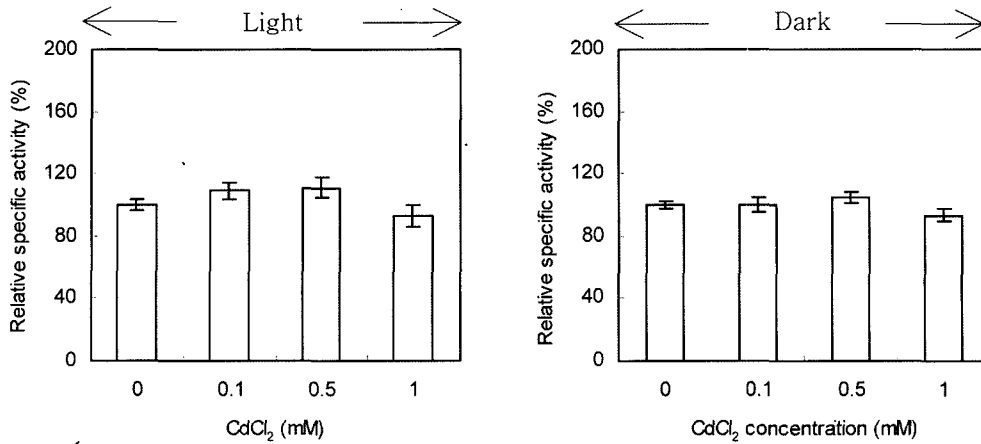


Fig. 3. Changes in the total activities of catalase from rice seedling leaves following CdCl<sub>2</sub> treatment.

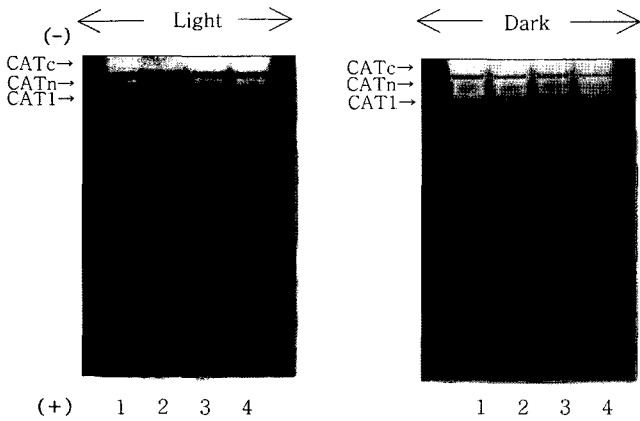


Fig. 4. Effect of CdCl<sub>2</sub> on the patterns of catalase isozymes from rice seedling leaves on the acrylamide gel. Lane 1, control; lane 2, 0.1 mM CdCl<sub>2</sub>; lane 3, 0.5 mM CdCl<sub>2</sub>; lane 4, 1 mM CdCl<sub>2</sub>.

있다. Fig. 5와 Fig. 6에서는 명조건과 암조건의 동진벼 뿌리와 잎의 과산화수소 함량을 보여준다. 동진벼 잎과 뿌리의 과산화수소 함량은 카드뮴 농도를 증가시키에 따라 서로 비슷한 수준으로 증가하였다. 동진벼 뿌리의 경우 명조건에서는 1 mM 카드뮴 처리에 의해서 대조군보다 약 2.3 배정도 과산화수소 함량이 증가하였고 암조건에서는 1 mM 카드뮴 처리에 의해서 약

1.7배 증가하였다(Fig. 5). 동진벼 잎의 경우 명조건에서는 1 mM 카드뮴 처리에 의해서 대조군보다 과산화수소 함량이 약 1.9배 증가하였고 암조건에서는 1 mM 카드뮴 처리에 의해서 약 1.5배 증가하였다 (Fig. 6). 과산화수소는 대표적인 활성산소종이므로 세포내 과산화수소의 함량증가는 세포가 활성산소종에 의한 산화스트레스 상태에 있음을 뜻한다. 명조건의 뿌리의 경우 1 mM 카드뮴 처리에 의하여 catalase가 대조군보다 약 16 배 증가하였고 이때의 세포내 과산화수소 함량은 대조군보다 약 2.3배 증가하였다. 명조건 뿌리에서의 catalase 활성의 급격한 증가는 1 mM 카드뮴에 의하여 축적된 과량의 과산화수소를 제거하기 위하여 catalase가 높은 활성으로 제거반응을 일으키고 있음을 보여준다. 그러나 아직 제거되지 못한 과산화수소가 축적되어 있음을 볼 때 세포가 여전히 심각한 산화스트레스를 받고 있을 것을 추측할 수 있다.

Fig. 6에서 알 수 있듯이 명조건의 잎은 1 mM 카드뮴에 의하여 대조군보다 약 1.9배 과산화수소 함량이 증가하였다. 그러나 명조건 뿌리와 달리 catalase 활성변화는 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 명조건 잎에는 catalase가 아닌 또 다른 시스템이 과산화수소 제거반응을 수행할 가능성을 보여준다. 세포내에서 과산화수소를 제거하는 시스템으로는 catalase 이외에도 ascorbate-glutathione 회로가 알려져 있다. Ascorbate-

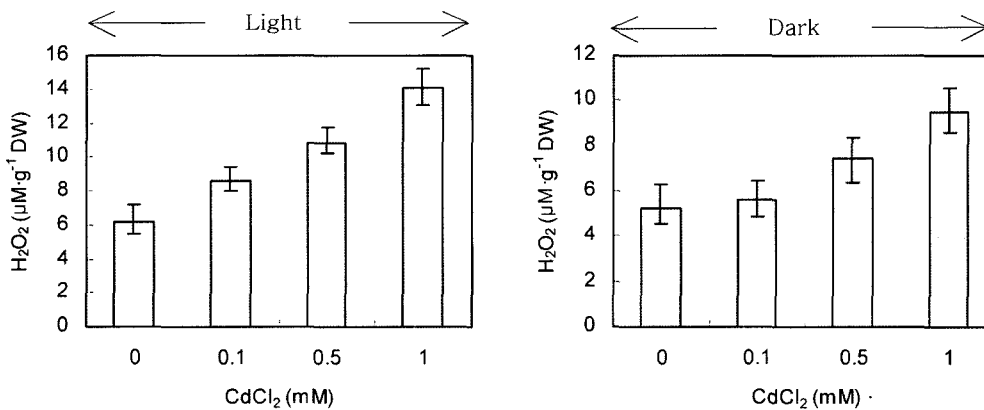


Fig. 5. Levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the roots of rice seedling roots following CdCl<sub>2</sub> treatment.

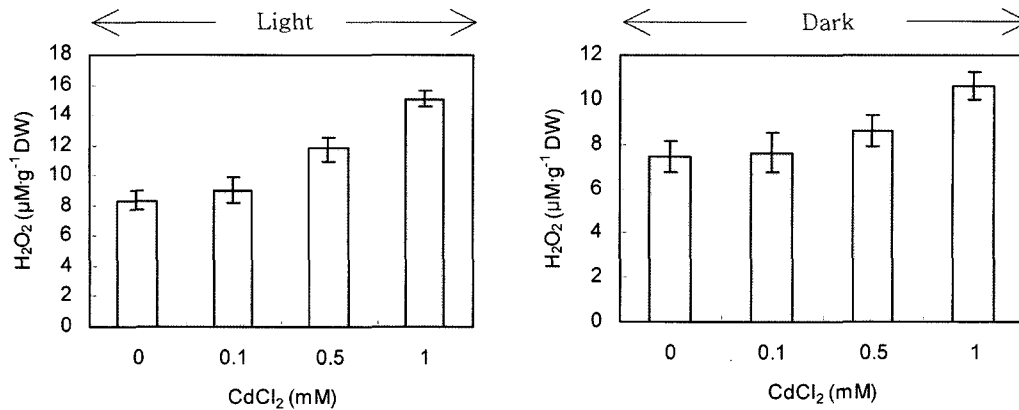


Fig. 6. Levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the leaves of rice seedling leaves following CdCl<sub>2</sub> treatment.

glutathione 회로에 관련된 ascorbate peroxidase는 과산화수소에 대한 높은 친화력을 가지고 있어서 저농도의 과산화수소에 대해서도 제거능력이 탁월하다고 알려져 있다. 또한 catalase가 보통 peroxisome에 한정되어 존재하는 것과 달리 ascorbate peroxidase는 엽록체와 세포질 모두에 존재하면서 과산화수소 제거반응을 수행할 수 있다고 알려져 있다.

초 록

명조건과 암조건에서 카드뮴이 벼 유묘 뿌리와 줄기의 카탈라제 총 활성과 동위효소 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 카드뮴을 처리하면 명조건과 암조건의 뿌리와 줄기에서 과산화수소 함량이 현저하게 증가하였다. 뿌리의 카탈라제 동위효소는 잎과는 서로 다른 조직 특이적 발현양상을 보여주었다. 또한 카드뮴을 처리하게 되면 명조건 뿌리는 암조건 뿌리와 카탈라제 동위효소의 발현 패턴에 차이를 보였다. 1 mM 카드뮴 처리에 의하여 명조건 뿌리의 카탈라제 총 활성은 약 16 배 증가하였는데 이러한 활성증가는 동위효소 CAT1과 CAT2의 증가에 의한 것이었다. 반면 암조건 뿌리의 카탈라제는 0.1 mM 카드뮴에 의하여 약 3배 증가하였으나, 0.5와 1 mM 카드뮴에 의하여 오히려 효소활성이 감소하였다. 0.1 mM 카드뮴에 의한 효소활성 증가는 CAT1, CAT3, CAT4 동위효소의 활성 증가에 기인하였으나 카드뮴 농도를 더 높였을때 CAT2와 CAT4가 감소하였다. 대조군 앞에는 양극 동위효소인 CATc, 중성 동위효소인 CATn와 음극 동위효소인 CAT1이 존재하였다. 앞에서는 명조건과 암조건 모두에서 카드뮴을 처리하여도 카탈라제 활성과 동위효소 발현에 차이가 없었다. 이러한 결과들은 카드뮴에 의한 뿌리 카탈라제 효소의 발현변화는 빛에 의하여 조절되지만 잎 카탈라제의 발현은 빛에 의하여 조절되지 않음을 보여준다.

**Key words:** 벼, 카탈라제, 카드뮴, 빛

감사의 글

본 연구는 2005년도 순천향대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S. and Cakmak, I. (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J. Trace Elem Med Biol.* **20**, 181-189.
2. Sasaki, K., Ito, H., Mitsuhara, I., Hiraga, S., Seo, S., Matsui, H. and Ohashi, Y. (2006) A novel wound-responsive cis-element, VWRE, of the vascular system-specific expression of a tobacco peroxidase gene, tpxN1. *Plant Mol Biol.* **62**, 753-768.
3. Zhao, F. Y., Wang, X. Y., Zhao, Y. X. and Zhang, H. (2006) Transferring the Suaeda salsa glutathione S-transferase and catalase genes enhances low temperature stress resistance in transgenic rice seedlings. *J. Plant Physiol. Mol Biology.* **32**, 231-238.
4. Mori, H., Higo, K., Minobe, Y., Matsui, H. and Chiba, S. (1992) Nucleotide and derived amino acid sequence of a catalase cDNA isolated from rice immature seeds. *Plant Mol. Biol.* **18**, 973-976.
5. Morita, S., Tasaka, M., Fujisawa, H., Usimaru, T. and Hideo, T. (1994) A cDNA clone encoding a rice catalase isozyme. *Plant Physiol.* **105**, 1015-1016.
6. Higo, K. and Higo, H. (1996) Cloning and characterization of the rice CatA catalase gene, a homologue of the maize Cat3 gene. *Plant Mol Biol.* **30**, 505-521.
7. Iwamoto, M., Higo, H. and Higo, K. (2004) Strong expression of the rice catalase gene CatB promoter in protoplasts and roots of both a monocot and dicots. *Plant Physiol Biochem.* **42**, 241-249.
8. Iwamoto, M. and Higo, K. (2006) Accumulation of sense-antisense transcripts of the rice catalase gene CatB under dark conditions requires signals from shoots. *Gene.* **377**, 186-194.
9. Chen, Z., Iyer, S., Caplan, A., Klessig, D. F. and Fan, B. (1997) Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* **114**, 193-201.
10. Agrawal, G. K., Rakwal, R. and Jwa, N. S. (2001) Stress signaling molecules involved in defense and protein phosphatase 2A inhibitors modulate OsCATC expression in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *J. Plant Physiol.* **158**, 1349-1355.
11. Brune, A., Urbach, W. and Klessig, D. F. (1995) Differential

- toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *New Phytol.* **129**, 404-409.
12. Aidid, S. B. and Okamoto, H. (1992) Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. *Environ. Exp. Bot.* **32**, 439-448.
  13. Van Assche, F. and Clijsters, H. (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research.* **7**, 31-40.
  14. Shaw, B. P. (1995) Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol. Plant.* **37**, 587-596.
  15. Edwards, R. (1996) Characterization of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiol. Plant.* **98**, 594-604.
  16. Mohan, B. S. and Hosetti, B. B. (1997) Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environ. Poll.* **98**, 233-238.
  17. Bhattacharjee, S. (1998) Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biol. Plant.* **40**, 131-135.
  18. Rao, M. V., Paliyath, G. and Ormrod, D. P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **110**, 125-136.
  19. Gabriel, O. (1971) Locating enzymes on gels. *Meth. Enzymol.* **22**, 578-604.
  20. Anderson, M. D., Prasad, T. K. and Stewart, C. R. (1995) Changes in isozyme profile of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* **109**, 1247-1257.
  21. Woodbury, W., Spencer, A. K. and Stahmann, M. A. (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* **44**, 301-305.
  22. Okuda, T., Masuda, Y., Yamanaka, A. and Sagisaka, S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* **97**, 1265-1267.
  23. Brej, T. (1998) Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. Populations from Legnica copper smelter area, Lower Silesia. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae.* **67**, 325-333.
  24. Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* **121**, 151-159.
  25. Stroinski, A. and Kozłowska, M. (1997) Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta. Societatis Botanicorum Poloniae.* **66**, 189-195.
  26. Schickler, H. and Caspi, H. (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant.* **105**, 39-44.