

H₂O₂和MAPK介导油菜素内酯诱导番茄抗氧化防护酶SOD和CAT的信号途径

丁海东, 刘慧, 陈一, 王丹, 梁建生*

扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州225009

摘要: 本文以番茄为材料, 研究H₂O₂和MAPK在BR诱导的抗氧化防护系统中的作用。结果表明, 外源BR提高抗氧化防护酶SOD和CAT活性; 而这种诱导机制被H₂O₂产生抑制剂二苯基碘(DPI)和MEK1/2专一抑制剂PD98059阻断。进一步研究发现: BR能够诱导细胞质外体H₂O₂的产生, 这种诱导被PD98059抑制; BR能够活化一种49 kDa MAPK, 这种活化被DPI抑制。本研究结果证实细胞质外体H₂O₂和MAPK候选激酶(49 kDa MAPK)信号参与BR诱导的抗氧化防护途径, 且两者之间存在交互作用。

关键词: 番茄; 油菜素内酯; H₂O₂; MAPK; 抗氧化防护酶

Involvements of H₂O₂ and Mitogen-Activated Protein Kinase Signals in Brassinosteroid-Activated Tomato Antioxidant Defense Enzymes Superoxide Dismutase and Catalase

DING Hai-Dong, LIU Hui, CHEN Yi, WANG Dan, LIANG Jian-Sheng*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: In this study, the role of H₂O₂ and MAPK (mitogen-activated protein kinase) in BR (brassinosteroid)-induced antioxidant defense system were investigated in leaves of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill.. The results showed that exogenous BR increased antioxidant defense enzymes SOD and CAT activities. However, the induction mechanisms were blocked by pre-treatment with the apoplastic H₂O₂ production inhibitor DPI and the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1/2) specific inhibitor PD98059. Further studies showed that BR was able to induce the production of apoplastic H₂O₂ and the activation of a 49-kDa MAPK, which were inhibited by PD98059 and DPI, respectively. The results suggest that the interactive cross-talk between apoplastic H₂O₂ signal and a candidate MAPK kinase (48 kDa MAPK) signal are involved in BR-activated antioxidant defense enzymes.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill.; brassinosteroid; H₂O₂; MAPK; antioxidant defense enzymes

油菜素内酯(brassinosteroid, BR)是一类重要的植物激素, 不仅参与植物的生长发育调控, 而且也可以使植物对生物胁迫和非生物胁迫有一定应答和调节作用。BR能够提高植物耐高温、低温、干旱、盐害、病毒等逆境胁迫的能力(宋丽等2006; Xia等2009)。虽然, 近年来利用BR不敏感和合成缺失突变体材料, 对BR信号产生、与膜受体结合引起信号的感知和传递、最终引起BR诱导基因的表达及参与植物生长发育进行了较为详细的研究, 如BR的细胞表面受体激酶BRI1、BRI1/BAK1激酶复合物的转磷酸化激活、BIN2激酶活性抑制、BSK激酶磷酸化、BSU1磷酸酶激活等(Haubrick和Assmann 2006; Li和Jin 2007), 但是, BR

调控植物耐逆境胁迫的信号转导机理研究还很少(Bari和Jones 2009)。积累的证据表明, BR诱导植物耐逆性至少部分与BR诱导细胞抗氧化防护系统, 从而提高耐氧化胁迫能力有关。BR能够诱导植物细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等抗氧化防护酶活性提高, 诱导一些非酶类抗氧化剂如抗坏血酸(ASC)、谷胱甘肽(GSH)

收稿 2011-08-03 修定 2011-08-17

资助 国家自然科学基金(90917005)、江苏省高校自然科学基金(10KJB180010)和扬州大学科技创新培育基金(2010CXJ047)。

* 通讯作者(E-mail: jssliang@126.com; Tel: 0514-87979320)。

等含量的增加(Özdemir等2004; Arora等2008; Bajguz和Hayat 2009; Xia等2009)。越来越多的证据表明,过氧化氢(H₂O₂)可作为信号分子,在生长发育、气孔运动、激素应答、细胞程序性死亡以及生物胁迫和非生物胁迫应答调控过程中起重要作用(Mittler 2002; Miller等2008)。Xia等(2009)最近的研究表明H₂O₂对BR胁迫诱导的抗氧化酶基因表达及活性具有重要的调节作用。促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的级联系统被认为是植物细胞将胞外刺激信号转换成胞内反应的主要途径之一(Zhang和Klessig 2001; Jonak等2002; Nakagami等2005)。MAPK的活化有利于它转运到细胞核内,磷酸化与活化下游的信号组分如转录因子,从而调节基因表达。大量的研究表明,MAPK参与植物响应干旱、盐渍、各种激素等信号的转导过程(Nakagami等2005; Zhang等2006; Colcombet和Hirt 2008; Xing等2008; Ding等2009)。BR处理不能够活化水稻*OsBR11*(对BR不敏感突变体)幼苗中的60 kDa MAPK (Sharma等2001),但是能够诱导黄瓜幼苗*MAPK1*和*MAPK3*基因表达(Xia等2009)。但是,BR信号途径中MAPK的具体调控机制及下游信号途径还未见报道。

在BR信号途径之中是否存在H₂O₂和MAPK途径是本文要研究的问题。本文以番茄叶片为材料,运用药理学、生理学、细胞生物学等手段,以H₂O₂产生抑制剂二苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)和MEK1/2专一抑制剂PD98059处理,研究H₂O₂和MAPK在BR诱导的抗氧化防护系统中的作用机制。这一研究不仅能够有利于我们对BR调控机制的理解,而且对农业上利用BR进行生产调控具有重要的理论意义。

材料与方法

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. ‘浦红90’)种子,由上海市农业科学院园艺研究所提供。种子经55℃烫种15 min、浸种6 h后置于28℃恒温培养箱中催芽。待种子露白后,播于盛白沙的黑色营养钵中。待两片子叶露出,用霍格兰氏液(Hoagland solution) 0.5倍进行浇灌。待两片真叶充分展开时,从茎基部用刀片快速割取幼苗(Orozco-Cárdenas和Ryan 2002; Zhang等2006),置于纯水

处理1~2 h以去除伤害,然后将离体植株置于铝箔纸包裹的50 mL烧杯中,用10 nmol·L⁻¹ 2,4-表油菜素内酯(2,4-epibrassinolide, EBR)溶液进行时间不等的处理。为研究各种抑制剂的影响,先用100 μmol·L⁻¹ PD98059和100 μmol·L⁻¹ DPI预处理4 h,再转入10 nmol·L⁻¹ BR进行处理8 h,条件同上。以超纯水处理为对照。处理结束后,取第二片真叶作为样品,快速置于液氮中冷冻,-80℃保存。

抗氧化酶活性分析参照Jiang和Zhang (2002)的方法。取冷冻叶片0.5 g,加入10 mL 50 mmol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液(pH 7.0) (1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1% PVP),研磨成匀浆,上清液为粗酶液。SOD活性通过观察NBT的光还原抑制程度来测定,以560 nm时抑制NBT光还原50%作为一个酶单位。CAT活性以H₂O₂在240 nm的分解速率来计算。根据H₂O₂的摩尔消光系数为39.4 mmol·L⁻¹·cm⁻¹计算酶活性。蛋白质含量测定方法参考Bradford (1976),以牛血清白蛋白作标准。

从番茄植株上取下叶片,刀片取1~2 mm²的叶块。置于5 mmol·L⁻¹ CeCl₃ (pH 7.2)中真空渗透1 h。把叶片放在固定液中室温固定1 h及在4℃过夜。用二甲胍酸盐缓冲液(CAB)漂洗2次,每次10 min。用1% (V/V)饿酸固定45 min,乙醇(30%~100%; V/V)逐级脱水后用混合树脂(Eponaraldite)包埋,纯树脂包埋12 h,再换新树脂置换4 h,然后60℃聚合48 h包埋块在Reichert-Ultracut E切片机上切片(70~90 nm),附于铜网上,加速电压75 kV,透射电镜观察H₂O₂亚细胞定位(Zhang等2006)。

参照Ding等(2009)所描述的方法,将-80℃保存的样品液氮研磨成粉末,加1.5倍体积的提取缓冲液(100 mmol·L⁻¹ HEPES, pH 7.5, 5 mmol·L⁻¹ EDTA, 5 mmol·L⁻¹ EGTA, 10 mmol·L⁻¹ dithiothreitol, 10 mmol·L⁻¹ Na₃VO₄, 10 mmol·L⁻¹ NaF, 50 mmol·L⁻¹ β-glycerophosphate, 1 mmol·L⁻¹ PMSF, 5 μg·mL⁻¹ leupeptin, 5 μg·mL⁻¹ aprotinin, 5% glycerol), 4℃浸提2 h, 23 000×g低温(4℃)离心1 h,弃沉淀取上清,上清即为粗提液。凝胶激酶活性分析是将蛋白提取液进行12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,其胶中嵌有MBP 0.5 mg·mL⁻¹作为激酶底物。电泳后,凝胶经过洗脱、变性、复性。然后将凝胶放入30 mL反应缓冲液和200 nmol·L⁻¹ ATP加50 μCi γ-³²P-ATP,在

室温下反应60 min。而后转入终止液中终止反应。用同样溶液将凝胶清洗4次。最后用玻璃纸将凝胶制成干胶,用Kodak XAR-5胶片放射自显影。

50 μg 蛋白质与2 μg 酪氨酸磷酸化单克隆抗体4G10在免疫沉淀缓冲液中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,大约加入20 μL protein G agarose再孵育2 h,简短离心收集蛋白质-抗体复合物,用免疫沉淀缓冲液洗3次,然后加入1 \times SDS上样缓冲液沸水煮3 min,离心,取上清,进行10% SDS-PAGE电泳,电泳结束后进行凝胶酶分析(Zhang等2006)。

实验结果

1 BR提高抗氧化酶活性

采用离体植株快速吸收水分的模式,以外源10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR溶液处理离体番茄幼苗24 h,观察SOD和CAT活性变化。如图1所示,对照情况下酶活性随着时间进程呈不同的动态变化(SOD呈上升趋势;CAT呈下降趋势)。然而,外源BR处理同时提高两种酶活性,且在处理8 h时达最大(SOD和CAT分别上升46.8%和54.2%)。BR却不能显著诱导其他两种常见的APX和GR活性(数据未列出)。因此,本文将处理8 h作为BR活性作用的时间点。

2 H_2O_2 和MAPK介导BR激活的抗氧化防护酶途径

为了研究其是否参与BR诱导的抗氧化防护酶信号途径,结合前人使用的抑制剂浓度(Zhang等2006, 2010)和我们预实验结果,我们以100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPI和PD98059预处理离体幼苗,再经BR处理8 h,

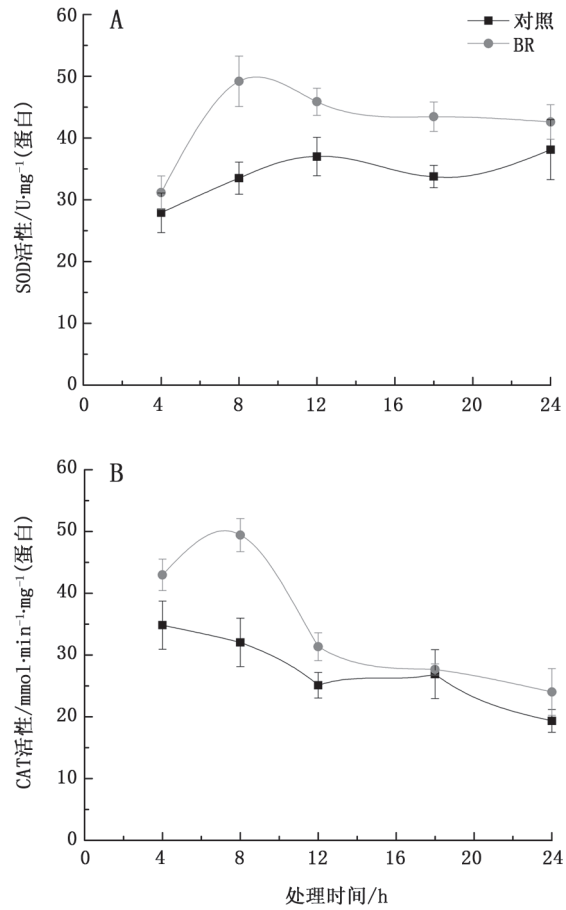


图1 BR对抗氧化防护酶SOD (A)和CAT (B)活性的影响
Fig.1 Effects of BR on the activities of antioxidant defense enzymes SOD (A) and CAT (B) during 24 h treatment

发现BR诱导的抗氧化防护酶的能力降低。如图2,抗氧化酶SOD和CAT活性明显被抑制,降低到对照

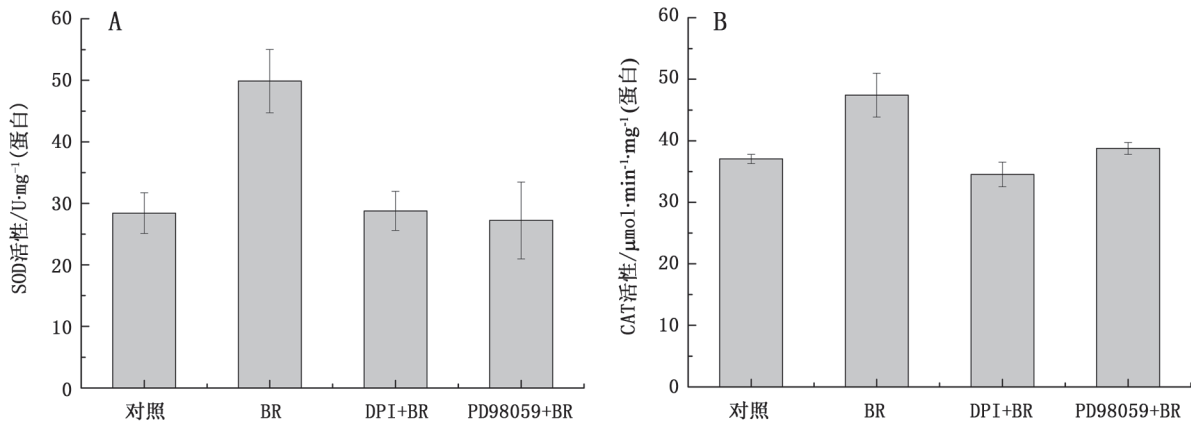


图2 H_2O_2 产生抑制剂DPI和MEK1/2抑制剂PD98059对BR诱导抗氧化防护酶活性的影响
Fig.2 Effects of pretreatment with H_2O_2 production inhibitor DPI and MAPK activation inhibitor PD98059 on antioxidant defense enzymes in tomato leaves induced by BR treatment

水平。药理学证据表明, H₂O₂和MAPK信号参与BR激活的抗氧化防护酶途径。

3 BR诱导H₂O₂产生

为了进一步验证H₂O₂参与BR信号, 我们观察BR对番茄叶片细胞中H₂O₂产生情况。我们采用H₂O₂与CeCl₃形成致密电子复合物的细胞化学方法研究BR诱导叶片中H₂O₂积累的亚细胞位点。如图3所示, BR处理离体叶片8 h, 发现叶肉细胞质外体中H₂O₂积累(图3-B), 而水处理则不能(图3-A)。与直接BR处理的叶片相比, DPI预处理后再进行BR处理, 叶片中H₂O₂-CeCl₃沉淀颗粒明显减少(图3-C)。这些结果表明BR能够诱导H₂O₂大量积累, 且主要来源是NADPH氧化酶。

4 BR活化49 kDa MAPK

为明确外源BR对番茄叶片中MAPK的活化作

用, 我们用BR对离体幼苗进行处理, 以髓鞘碱性蛋白(MBP)为底物的凝胶激酶分析的方法研究了BR对叶片MAPK的活化情况。如图4-A, BR活化一个分子量为49 kDa的MBP激酶, 且持续到8 h, 在2 h时达到最大。抑制剂的溶剂DMSO对活性没有影响(图4-B)。此外, 该酶活性不但能够被PD98059抑制(图4-B), 而且能够被酪蛋白磷酸化抗体4G10免疫共沉淀(图4-C)。MAPK的一个显著特征就是酪氨酸磷酸化。4G10已被广泛用于MAPK的酪氨酸磷酸化鉴定。这表明BR诱导番茄49 kDa的MBP激酶是一种MAPK, 可以作为BR信号途径中一种MAPK候选蛋白。

5 H₂O₂与MAPK相互关系

不同的信号途径中, H₂O₂与MAPK相互关系也不同。如Jiang等(2003)认为活化的MAPKs激活

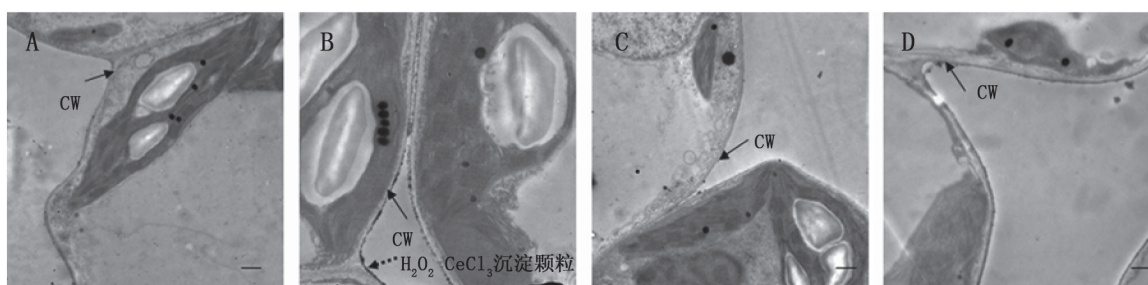


图3 BR诱导番茄叶片H₂O₂产生的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of H₂O₂ production induced by BR in leaves of tomato seedlings

A: 对照; B: BR处理; C: DPI预处理+BR处理; D: PD98059预处理+BR处理。虚线箭头: H₂O₂-CeCl₃沉淀颗粒; 实线箭头: CW (细胞壁)。Bar=1 μm。

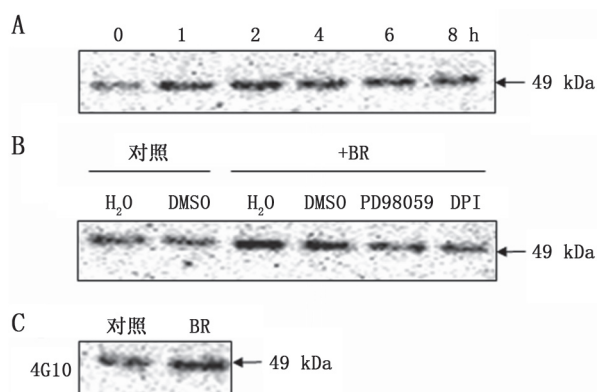


图4 BR活化49 kDa MAPK

Fig.4 BR activated 49 kDa MAPK kinase

A: BR诱导以MBP为底物的49 kDa蛋白激酶活化; B: DPI和PD98059抑制剂预处理抑制49 kDa蛋白激酶活性; C: 酪蛋白磷酸化抗体4G10免疫共沉淀49 kDa蛋白激酶。

下游H₂O₂产生系统的活性, 以调控ABA诱导的气孔关闭。而Zhang等(2006)研究发现ABA诱导的H₂O₂激活ZmMPK5, 再激活下游靶标。为研究BR信号通路中H₂O₂与MAPK的关系, 用MEK1/2的抑制剂PD98059预处理离体叶片, 观察叶片中H₂O₂沉积。如图3-D, 细胞的定位显示MAPK抑制剂几乎完全阻断了BR诱导的质外体中H₂O₂的产生。用H₂O₂产生抑制剂DPI预处理离体幼苗再通过凝胶激酶反应测定叶片中MAPK的活性, 图4-B显示DPI能阻断BR诱导的MAPK的活化。研究结果表明, BR诱导质外体H₂O₂产生途径被MAPK级联介导, 同时H₂O₂也参与了BR诱导的玉米叶片MAPK活化, 两者存在交互对话(cross-talk)。

讨 论

大量研究显示BRs能够通过调控抗氧化系统,提高耐氧化胁迫的能力,进而调控植物对各种环境胁迫的适应性(Bajguz和Hayat 2009)。BR预处理能显著减轻高温胁迫对番茄植株的光合作用抑制,降低膜脂过氧化(MDA)程度,增强抗氧化防护酶SOD、APX、CAT的活性(Ogwen等2008)。BRs预处理能增强铝胁迫下绿豆幼苗和镉胁迫下鹰嘴豆幼苗的CAT、POD、SOD活性(Ali等2008; Hasan等2008)。单独BR处理能够诱导玉米叶片SOD、APX、CAT、GR活性及其基因表达(Zhang等2010)。本文研究结果显示,单独BR处理显著上调番茄叶片SOD和CAT这两种抗氧化防护酶的活性(图1),但是对其他几种酶诱导效果不明显(数据未列出)。之所以存在差异,主要原因可能与不同植物、不同处理时间、方法及不同BR浓度处理等有关。

H₂O₂是细胞有氧代谢的产物,在各种胁迫下产生量增加,不仅具有损伤生物大分子从而伤害细胞的效应,还是一种重要的信号分子,通过诱导细胞内一系列防御基因表达使细胞对环境作出响应。大量研究表明H₂O₂作为信号分子广泛参与了植物的生理过程,包括病原防御、程序性细胞死亡、胁迫防御、激素反应、光合作用调节、生长发育等(Mittler 2002; Mittler等2004; Miller等2008)。最近, Xia等(2009)研究表明H₂O₂参与了BR诱导的黄瓜耐氧化胁迫能力的提高, BR诱导的H₂O₂集中在叶肉细胞的质外体中。Zhang等(2010)研究发现BR不但能够诱导玉米叶片质外体H₂O₂的产生,也能够诱导叶绿体中H₂O₂产生,而线粒体和过氧化物酶体中的H₂O₂产生则不受BR诱导。我们也发现BR能诱导叶肉细胞质外体中H₂O₂积累,且这种积累能够被NADPH氧化酶的抑制剂DPI阻断(图3)。DPI是NADPH氧化酶专一抑制剂,被用来研究NADPH来源的H₂O₂信号通路。同时, DPI预处理消除了BR诱导的番茄叶片SOD和CAT抗氧化防护酶活性的提高(图2)。该结果表明BR通过NADPH氧化酶调控质外体H₂O₂的产生,进而调控抗氧化防护酶SOD和CAT。

来自生物化学与遗传学的研究显示,蛋白质的可逆磷酸化在调节植物适应性响应各种环境胁迫

的生理状态与基因表达方面,起着重要的作用(Xiong和Yang 2003)。MAPK信号的级联系统主要由三种功能上相互联系的蛋白激酶MAPKKK、MAPKK和MAPK组成。在这种蛋白磷酸化的模式中,一种MAPKKK能够磷酸化和活化某一特定的MAPKK, MAPKK再磷酸化和活化某一MAPK。MAPK的激活有利于它转运到细胞核内,磷酸化与活化下游的信号组分如转录因子,从而调节基因表达。MAPK参与多种激素信号途径如ABA、JA、ETH等,但是关于BR信号途径中的MAPK研究还很少。Xia等(2009)报道BR诱导黄瓜幼苗MAPK1和MAPK3基因表达。然而,关于BR诱导植物MAPKs活化的报道还很少。BR能够激活玉米叶片中ZmMPK5 (Zhang等2010)。PD98059是广泛用于MAPK分析的专一性抑制剂,通过抑制MEK1/2的激酶活性进而抑制下游MAPK的活性。本研究BR能活化一个49 kDa MBPK,活性能够持续8 h, PD98059抑制剂和酪氨酸磷酸化抗体4G10免疫共沉淀分析证明该激酶是一种MAPK(图4)。Zhang等(2006)的研究显示ABA能诱导一46 kDa MAPK的活化,而MEK1/2抑制剂PD98059阻断ABA对玉米叶片中抗氧化防护的增强,暗示MAPK参与了ABA诱导的抗氧化防护的增强。然而MAPK是否参与BR诱导的抗氧化防护还不清楚。本实验同时用PD98059预处理番茄幼苗发现对BR诱导的抗氧化防护酶活性上调有明显抑制作用(图2),表明BR通过调控MAPK (如49 kDa MAPK)活性,进而调控抗氧化防护酶SOD和CAT。BR诱导MAPK活化和激活SOD和CAT时间上存在差异,推测BR诱导SOD和CAT途径中,在MAPK下游仍存在信号通路,但是具体信号途径仍有待研究。

已有的研究表明, H₂O₂和MAPK两种信号因子之间在不同的信号途径中可能存在相互作用。H₂O₂能诱导植物MAPKs的活化(Moon等2003; Zhang等2006)。Zhang等(2006)的研究表明H₂O₂能激活玉米叶片中MAPK并具有浓度效应。MAPKs也能够影响植物中H₂O₂的积累(Zhang等2006; Ren等2002; Yoshioka等2003)。运用能表达持续性活化特性的MAPKK和MEK^{DD}突变体的研究表明延长MAPKs的活化将导致H₂O₂的大量产生(Ren等2002; Yoshioka等2003)。BR诱导抗氧化防护信号

途径中H₂O₂和MAPK之间的相互关系仍需进一步探索。我们的研究结果显示, NADPH氧化酶的抑制剂DPI能阻断BR对番茄叶片49 kDa MAPK的活化(图4), 暗示H₂O₂是BR诱导MAPK活化必需的。同时, MEK1/2抑制剂PD98059抑制BR诱导的质外体中大部分H₂O₂的产生(图3), 表明MAPK参与了BR诱导的质外体H₂O₂的产生。所有研究结果表明, 在BR诱导抗氧化防护酶活化过程中, H₂O₂和MAPK起着重要作用, 且之间存在交互对话(crosstalk)。

总之, 本研究结果不仅显示番茄细胞质外体H₂O₂信号和MAPK候选激酶(49 kDa MAPK)信号参与BR诱导番茄叶片抗氧化防护酶(CAT和SOD)活性提高, 而且揭示BR信号途径中H₂O₂和MAPK之间存在交互对话。进一步的相关分子生物学方面功能研究本实验室正在进行。

参考文献

- 宋丽, 李季, 储昭庆, 薛红卫(2006). 拟南芥油菜素内酯信号转导研究进展. 植物学通报, 23: 556-563
- Ali B, Hasan SA, Hayat S, Hayat Q, Yadav S, Fariduddin Q, Ahmad A (2008). A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Environ Exp Bot, 62: 153-159
- Arora N, Bhardwaj R, Sharma P, Arora HK (2008). Effects of 28-homobrassinolide on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in seedlings of *Zea mays* L. under salinity stress. Acta Physiol Plant, 30: 833-839
- Bajguz A, Hayat S (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. Plant Physiol Biochem, 47: 1-8
- Bari R, Jones JD (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol Biol, 69: 473-488
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254
- Colcombet J, Hirt H (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. Biochem J, 413: 217-226
- Ding HD, Zhang AY, Wang JX, Lu R, Zhang H, Zhang H, Jiang MY (2009). Identity of an ABA-activated 46 kDa mitogen-activated protein kinase from *Zea mays* leaves: partial purification, identification and characterization. Planta, 230: 239-251
- Hasan SA, Hayat S, Ali B, Ahmad A (2008). 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. Environ Pollut, 151: 60-66
- Haubrick LL, Assmann SM (2006). Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. Plant Cell Environ, 29: 446-457
- Jiang J, An G, Wang P, Wang P, Han J, Jia Y, Song CP (2003). MAP kinase specifically mediates the ABA-induced H₂O₂ generation in guard cells of *Vicia faba* L. Chin Sci Bull, 48: 1919-1926
- Jiang M, Zhang J (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. J Exp Bot, 53: 2401-2410
- Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. Curr Opin Plant Biol, 5: 415-424
- Li J, Jin H (2007). Regulation of brassinosteroid signaling. Trends Plant Sci, 12: 37-41
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. Physiol Plant, 133: 481-489
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci, 7: 405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci, 9: 490-498
- Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, Kwak SS, Kim DH, Nam J, Bahk J et al (2003). NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 358-363
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. Trends Plant Sci, 10: 339-346
- Ogwen JO, Song XS, Shi K, Hu WH, Mao WH, Zhou YH, Yu JQ, Nogues S (2008). Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*. J Plant Growth Regul, 27: 49-57
- Orozco-Cárdenas ML, Ryan CA (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. Plant Physiol, 130: 487-493
- Özdemir F, Bor M, Demiral T, Türkan I (2004). Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. Plant Growth Regul, 42: 203-211
- Ren D, Yang H, Zhang S (2002). Cell death mediated by MAPK is associated, with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 277: 559-565
- Sharma A, Matsuoka M, Tanaka H, Komatsu S (2001). Antisense inhibition of a BRI1 receptor reveals additional protein kinase signaling components downstream to the perception of brassinosteroids in rice. FEBS Lett, 507: 346-350
- Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, Asami T, Chen Z, Yu JQ (2009). Reactive oxygen species are involved in brassinosteroids-induced stress tolerance in cucumber. Plant Physiol, 150: 801-814
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced *CAT1* expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. Plant J, 54: 440-451
- Xiong L, Yang Y (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. Plant Cell, 15: 745-759

- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N (2003). *Nicotina benthamiana* gp^{91phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 15: 706~718
- Zhang A, Zhang J, Ye N, Cao J, Tan M, Zhang J, Jiang M (2010). Zm-MPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *J Exp Bot*, 61: 4399~4411
- Zhang AY, Jiang MY, Zhang JH, Tan MP, Hu XL (2006). Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiol*, 141: 475~487
- Zhang S, Klessig DF (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, 6: 520~527