

高山离子芥 *CbMAPK3* 基因功能分析

张腾国¹, 夏小慧², 刘玉冰³, 杨宁¹, 贾凌云¹, 王娟¹, 安黎哲^{4,*}

¹西北师范大学生命科学院, 兰州 730070; ²兰州城市学院, 兰州 730070; ³中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 兰州 730000; ⁴兰州大学生命科学院, 兰州 730000

摘要: 将高山离子芥丝裂原活化蛋白(MAP)激酶基因*CbMAPK3*编码区连接到表达载体pET-30a中, 转化大肠杆菌JJ001 (*srI::Tn10*), 在1 mol·L⁻¹山梨醇的渗透胁迫及IPTG的诱导下, 转化pET-30a-CbMAPK3的大肠杆菌JJ001 (*srI::Tn10*)生长情况比转化pET-30a的好。免疫分析表明, 在0℃下处理时, 高山离子芥CbMAPK3激酶蛋白质水平没有明显的变化; 在4℃处理下, 高山离子芥CbMAPK3激酶蛋白质水平在处理前3 h明显增加, 并在3 h后达到最高值。高山离子芥*CbMAPK3*在响应环境胁迫的过程中起作用。

关键词: 高山离子芥; *CbMAPK3*基因; 功能分析

Functional Analysis of *CbMAPK3* Gene in *Chorispora bungeana* Fisch. et Mey.

ZHANG Teng-Guo¹, XIA Xiao-Hui², LIU Yu-Bing³, YANG Ning¹, JIA Ling-Yun¹, WANG Juan¹, AN Li-Zhe^{4,*}

¹School of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; ²Lanzhou City University, Lanzhou 730070, China; ³Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; ⁴College of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: *Chorispora bungeana* is a rare alpine subnival plant species that is highly tolerable to freezing environment. To investigate whether mitogen-activated protein (MAP) kinase CbMAPK3 of *C. bungeana* has the osmo-protection function, the coding region was subcloned into prokaryotic expression vector pET-30a. In the presence of 1 mol·L⁻¹ sorbitol and induction with IPTG, *Escherichia coli* strain JJ001 (*srI::Tn10*) transformed with pET-30a-CbMAPK3 exhibited better growth than the same strain transformed with the empty vector. Western blot analysis showed that the protein level of CbMAPK3 was not significantly altered by 0℃ freezing treatment, but increased significantly at 4℃ cold treatment and the maximum level was observed at 3 h after the treatment. These results indicated that the *CbMAPK3* might play a role in response to environmental stresses.

Key words: *Chorispora bungeana*; *CbMAPK3* gene; functional analysis

高等植物在生长和发育过程中不断遭受生物胁迫和非生物胁迫。大量研究表明, 蛋白激酶在感受外界信号以调节细胞功能方面起着重要作用。通过蛋白质的磷酸化和去磷酸化进行信号转导是生物体中普遍存在的调节机制。蛋白激酶是一类在胞内信使依赖的在蛋白质磷酸化过程中起中介和放大作用并帮助完成信号传递过程的酶。蛋白激酶负责将磷酸基团转移到特定底物蛋白上, 这类酶用ATP或GTP作为磷酸基团供体, 而蛋白质中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸作为磷酸基团的受体。丝裂原活化蛋白(mitogen-activated protein, MAP)激酶级联途径是外界刺激信号从细胞表面传到细胞核内部的重要信号通路。MAP激酶级联途径包括3种蛋白激酶成分: 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated

protein kinase, MAPK)、丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK)、丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK) (Jonak等1999, 2002)。很多植物MAP激酶级联成分在各种生物胁迫和非生物胁迫下激活(Cowan和Storey 2003; Zhang等2006; Andreasson和Ellis 2009)。苜蓿在低温和干旱的胁迫下, MMK4激酶被迅速激活(Jonak等1996)。Matsuoka等(2002)用一种特殊的

收稿 2010-04-06 修定 2010-06-29

资助 国家自然科学基金(30960065和30800122)和西北师范大学知识与科技创新项目(nwnu-kjcxgc-03-76和nwnu-kjcxgc-03-49)。

* 通讯作者(E-mail: lizhean@lzu.edu.cn; Tel: 0931-7971722)。

抗体研究发现拟南芥 MKK1 可以被触伤、低温、干旱、高盐胁迫激活, 激活后的 MKK1 可以磷酸化下游底物 MPK4, 从而使 MPK4 活化。MPK4 和 MPK6 激酶可以被低温、渗透胁迫、触伤等激活 (Ichimura 等 2000)。MKK9 在乙烯合成及相应盐胁迫过程中发挥重要的作用 (Xu 等 2008)。MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 级联途径在抵御病原体过程中发挥重要作用 (Qiu 等 2008)。番茄在热胁迫条件下, 有一个 50 kDa 的 MAPK 被激活 (Link 等 2002)。烟草 WIPK 和 SIPK 激酶在植株受到损伤后几分钟之内被激活 (Seo 等 1999)。

目前, 用于 MAP 激酶基因克隆和功能研究的植物大都是生长在正常生长环境条件下的植物。高山离子芥是十字花科多年生植物, 分布在海拔 3 600~3 900 m 亚高山草甸和草原砾石质山坡上, 经常受到干旱和极低环境温度的胁迫, 具有较高的适应寒冷环境的能力, 因此高山离子芥是研究 MAP 激酶级联途径的理想材料。我们克隆得到了高山离子芥中与抗逆境胁迫有关的 MAP 激酶基因 *CbMAPK3*, 功能分析表明 *CbMAPK3* 基因的表达受到盐胁迫诱导 (张腾国等 2009), 说明 *CbMAPK3* 与植物抵御逆境胁迫信号转导有关。为了进一步深入研究该基因的功能, 我们进行了 *CbMAPK3* 基因全长编码区的扩增, 并将该编码区与原核表达载体 pET30a 连接, 转化功能缺陷型大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*), 在 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇的渗透胁迫及 IPTG 的诱导下, 对转化 *CbMAPK3* 和没有转化的大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 的生长情况进行了测定, 并研究了低温 (0 和 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 胁迫下 *CbMAPK3* 激酶蛋白水平的变化, 以期为进一步探讨 *CbMAPK3* 酶活性变化建立基础。

材料与方法

1 植物材料

取高山离子芥 (*Chorispora bungeana* Fisch. et Mey.) 叶片进行脱分化组织培养。培养温度为 $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $40\sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间为 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。培养基成分为: $\text{MS}+4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ GA}_3+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NAA}+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$ 。选取生长良好的继代培养 10~14 d 的愈伤组织置于含有 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KT}$ 和 3% 蔗糖的液体 MS 培养基中进行悬浮培养, 摇床转速为 $110 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 总 RNA 提取 选取生长良好的高山离子芥愈伤组织, 按照 Trizol 的试剂手册提取总 RNA 及反转录, 提取的 RNA 于 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存或者直接转录得到相应的 cDNA 后放置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.2 *CbMAPK3* 基因转化功能缺陷型大肠杆菌 JJ001 及在山梨醇胁迫下生长量的测定 用上游引物 I (5' TCCGAATTTCGAGAGAGAGATGAACACCG 3', 下划线序列为 *EcoRI* 酶切位点) 和下游引物 II (5' GGCGTCGACCTAACCATACGTTGGATTGAGT 3', 下划线序列为 *SalI* 酶切位点) 扩增含有 *CbMAPK3* 全长编码区 (CDS) 序列的片段。扩增产物及表达载体 pET30a 分别用 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切, 将酶切后的扩增产物和 pET30a 载体用 T4 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。通过蓝白斑筛选, 鉴定阳性克隆。提取阳性质粒, 转化功能缺陷型大肠杆菌 JJ001 (*pyrE41*、*entA403*、*argHI*、*rspsL109*、*supE44*、*AuncBEFH*、*recA56*、*srl::Tn10*)。该菌种由美国 Robert H. Fillingame 教授 (Department of Biomolecular Chemistry, University of Wisconsin Medical School) 惠赠。通过酶切和 PCR 的方法鉴定阳性克隆, 送上海博亚公司测序。同时转化空质粒 pET30a 于大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 中作为阴性对照。带有阳性质粒 pET30a-*CbMAPK3* 的大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 分别接种于 LB 培养基和附加 $1 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2% 甘油、0.1% 维生素 B、 $0.0348 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ L-精氨酸}$ 、 $0.0022 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ 尿嘧啶}$ 的 M9 培养基, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至 OD_{600} 约为 0.5, 加入 $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导表达, 2 h 后向培养液中加入 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的山梨醇至终浓度 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 开始渗透胁迫。在加入山梨醇以后每隔一定时间取样 2 mL, 测定 OD_{600} 吸收值, 检测细菌生长量。同时以带有空质粒 pET30a 的大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 作为阴性对照。

2.3 高山离子芥总蛋白的提取及 Western blot 分析 将高山离子芥悬浮细胞分别置于 4 和 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下处理不同时间, 分别取大约 0.3 g 经过处理的材料, 加入 2 倍体积的提取缓冲液 [$\text{pH } 7.5$ 的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF、 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -甘油磷酸、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

PMSF、 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗蛋白酶、 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抑酶肽、 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亮抑蛋白酶肽、10% 甘油、7.5% 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)]。充分研磨后, 转入 2 mL 离心管中, $4\,000\times g$ 离心 20 min, 上清液转入新的离心管, 用液氮快速冷冻, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。总蛋白含量按 Bradford 染色法测定。Western blot 分析时, 总蛋白通过 10% 的 SDS-PAGE 分离胶电泳分离, 转移至 NC 膜上进行免疫学反应。所用一抗为抗 MAP3 的 $\alpha\text{-C-MPK3}$ 抗体, 由 Daniel F. Klessig 教授(Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York)惠赠, 二抗为羊抗兔 IgG。

实验结果

1 重组表达质粒酶切及 PCR 鉴定

构建好的重组表达质粒 pET30a-CbMAPK3 转化大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*), 从过夜培养的 LB 培养基中挑选菌落, 提取质粒 DNA, 用 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切切出 1 119 bp 左右的片段(图 1-A), 与预期的片段相符。以酶切鉴定为阳性的质粒 DNA 作 1:10 稀释后, 用上游引物 I 和下游引物 II 扩增出 1 119 bp 左右的片段(图 1-B)。测序结果表明, 所测序列含 *CbMAPK3* 基因 1 110 bp 的正确阅读框架, 没有移码突变, 证明目的基因 *CbMAPK3* 已定向插入表达载体 pET-30a 中, 并成功转化到大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*)。

2 转化 *CbMAPK3* 基因的大肠杆菌 JJ001 在山梨醇胁迫下的生长量变化

带有重组表达质粒 pET-30a-CbMAPK3 的阳性大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*), 接种于 M9 培养基, 生长到 OD_{600} 约为 0.5 时, 加入 IPTG 诱导表达, 2 h 后加入山梨醇至终浓度为 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始渗透胁迫, 每隔一定时间取样测定细菌生长情况。结果显示, 转化重组表达质粒 pET-30a-CbMAPK3 的阳性大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 和转化空质粒 pET-30a 的对照, 在加入山梨醇后 2 h 之内, 由于山梨醇溶液的稀释作用, 测得的 OD_{600} 值低于加入山梨醇之前的水平; 2 h 后 OD_{600} 开始上升, 10 h 后转化重组表达质粒的阳性大肠杆菌的生长量高于对照(图 2-A)。同样, 检测大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 在含有 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇的 LB 培养基上生长情况的结果表明, 在加入山

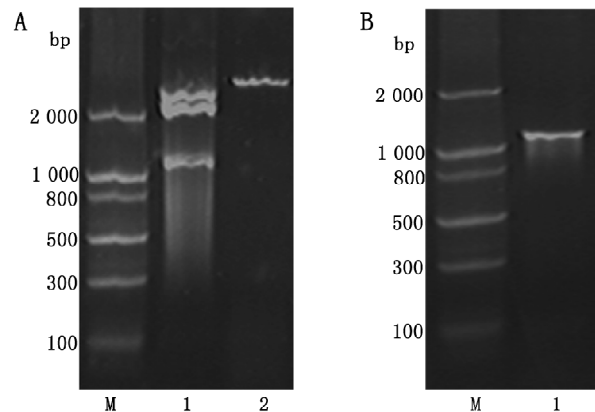


图 1 重组表达质粒 pET-30a-CbMAPK3 的酶切及 PCR 分析
Fig.1 Analysis of recombinant plasmid pET-30a-CbMAPK3 by digesting with *EcoRI/SalI* and PCR

A: 酶切分析。M: 分子量标准; 1: 重组表达质粒的酶切鉴定; 2: 重组表达质粒。B: PCR 分析。M: 分子量标准; 1: 重组表达质粒的 PCR 鉴定。

梨醇 2 h 后, 转化重组表达质粒 pET-30a-CbMAPK3 的阳性大肠杆菌 JJ001 (*srl::Tn10*) 的生长量明显高于转化空质粒 pET-30a 的对照(图 2-B)。由此可见, *CbMAPK3* 在抗渗透胁迫过程中发挥作用。

3 低温胁迫下 *CbMAPK3* 蛋白水平的变化

高山离子芥悬浮细胞分别在 0 和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理后, 提取的总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 NC 膜上进行 Western-blot 的结果表明, 悬浮细胞在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理时, *CbMAPK3* 激酶蛋白质水平没有明显的变化(图 3-A 和 B); 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, *CbMAPK3* 激酶蛋白质水平在处理前 3 h 有所增加, 并在 3 h 达到最高值, 然后逐渐降低, 处理 24 h 后, 降低到基础水平(图 3-C 和 D)。说明 *CbMAPK3* 基因在响应环境胁迫中发挥作用。

讨 论

植物具有的感受外界环境变化的能力是植物赖以生存的基本条件。为了适应外界生存条件, 植物在进化过程中逐渐产生了各种机制来抵御各种胁迫, 例如合成与胁迫有关的激素如 ABA, 以及发动一些特殊基因的表达, 从而改变细胞主要组成成分(Munnik 和 Meijer 2001)。在各种生物胁迫和非生物胁迫下, 有些植物 MAP 激酶的蛋白质水平会发生变化。如水稻 MAP 激酶 OsMAPK5 蛋白质水平在

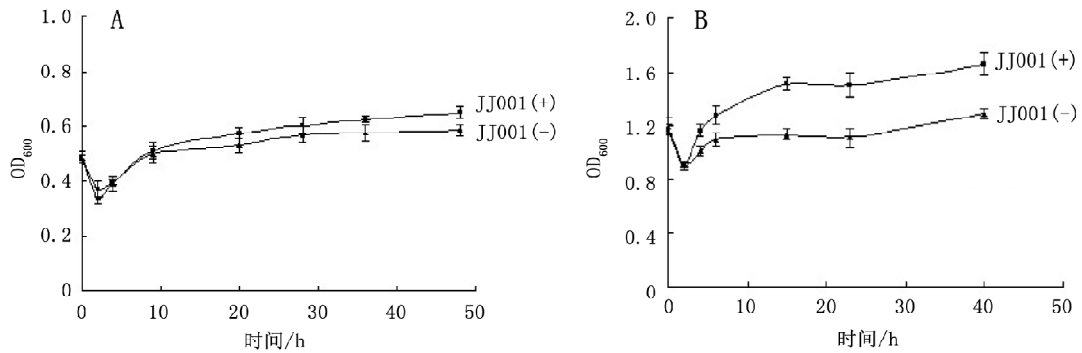


图2 山梨醇(1 mol·L⁻¹)胁迫下转化 pET-30a 或 pET-30a-CbMAPK3 的大肠杆菌 JJ001 (*srl::TnI0*) 在 M9 (A) 和 LB (B) 培养基中的生长检测

Fig.2 Growth analysis of *E. coli* strain JJ001 (*srl::TnI0*) cells transformed with pET-30a or pET-30a-CbMAPK3 in M9 (A) and LB (B) minimal media supplemented with 1 mol·L⁻¹ sorbitol

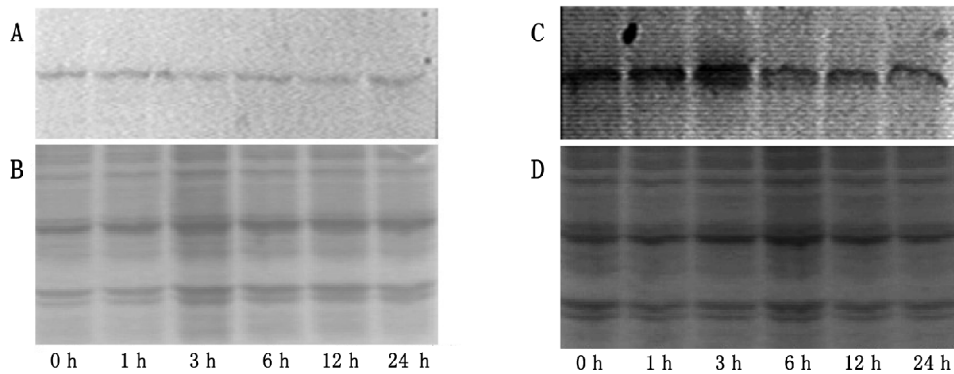


图3 Western blot 分析 0 和 4 °C 低温胁迫下 CbMAPK3 蛋白质水平

Fig.3 Western blot analysis of CbMAPK3 protein levels in cold stress (0 and 4 °C)

A: 0 °C 下总蛋白杂交; B: 0 °C 下总蛋白 SDS-PAGE; C: 4 °C 下总蛋白杂交; D: 4 °C 下总蛋白 SDS-PAGE。

干旱和高盐处理下明显增加,在低温处理下也有微弱的增加(Xiong 和 Yang 2003)。我们的研究表明,*CbMAPK3* 基因的转录受低温胁迫的诱导(张腾国等 2010); *CbMAPK3* 蛋白质水平在 4 °C 处理前 3 h 有所增加,并在 3 h 达到最高值,然后逐渐降低,处理 24 h 后,降低到基础水平。另外,我们还研究了 *CbMAPK3* 激酶蛋白质水平在高盐胁迫下的变化,结果表明, *CbMAPK3* 蛋白质水平在处理 3~12 h 内明显高于基础水平,在处理 24 h 后又降低到基础水平(张腾国等 2009)。可以认为,蛋白水平的提高相应地增加了可供激活的蛋白激酶的量。

大肠杆菌(*srl::TnI0*)突变体缺少山梨醇转运系统,不能代谢山梨醇,因此不能在以山梨醇为唯一碳源的最小培养基中生长(Csonka 和 Clark 1979)。

Garwe 等(2003)为了研究胁迫响应基因 *XVSAPI* 的渗透保护功能,将 *XVSAPI* 与表达载体相连,转化大肠杆菌(*srl::TnI0*),转化菌株可以在含有 1 mol·L⁻¹ 山梨醇的 M9 培养基上稳定生长,而野生型大肠杆菌(*srl::TnI0*)却不能生长,证明 *XVSAPI* 具有抗山梨醇渗透胁迫的能力。Mundree 等(2000)通过功能互补的方法克隆得到抗山梨醇渗透胁迫基因 *ALDRXV4*,转化有 *ALDRXV4* 基因的大肠杆菌(*srl::TnI0*) 在 IPTG 的诱导下,在含有 1.25 mol·L⁻¹ 山梨醇的 M9 培养基上生长良好,而未转化的大肠杆菌(*srl::TnI0*) 不能生长。高山离子芥在高盐以及低温胁迫下, *CbMAPK3* 基因的转录水平和蛋白质水平增加;转化有 *CbMAPK3* 的大肠杆菌 JJ001 (*srl::TnI0*) 的生长量高于没有转化 *CbMAPK3* 的对照。说明 *CbMAPK3*

在抗渗透胁迫中起作用。至于CbMAPK3是作为信号分子在抗渗透胁迫中发挥作用,还是本身具有抗渗透能力,还需要进一步研究。

参考文献

- 张腾国, 刘玉冰, 孙坤, 杨宁, 安黎哲(2009). 高山离子芥 *CbMAPK3* 基因克隆与原核表达. 植物研究, 29: 692~695
- 张腾国, 张艳, 王娟, 杨宁, 安黎哲(2010). 高山离子芥 MAP 激酶基因 *CbMAPK3* 的克隆. 植物生理学通讯, 46: 335~340
- Andreasson E, Ellis B (2009). Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. Trends Plant Sci, 15: 106~113
- Cowan KJ, Storey KB (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. J Exp Biol, 206: 1107~1115
- Csonka LN, Clark AJ (1979). Deletions generated by the transposon Tn10 in the *srl recA* region of *Escherichia coli* K-12 chromosome. Genetics, 93: 321~343
- Garwe D, Thomson JA, Mundree SG (2003). Molecular characterization of *XVSAPI*, a stress-responsive gene from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. J Exp Bot, 54: 191~201
- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. Plant J, 24: 655~665
- Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H (1996). Stress signaling in plant: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 11274~11279
- Jonak C, Ligterink W, Hirt H (1999). MAP kinase in plant signal transduction. Cell Mol Life Sci, 55: 204~213
- 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
- Link V, Sinha AK, Vashista P, Hofmann MG, Proels RK, Ehness R, Roitsch T (2002). A heat-activated MAP kinase in tomato: a possible regulator of the heat stress response. FEBS Lett, 531: 179~183
- Matsuoka D, Nanmori T, Sato K, Fukami Y, Kikkawa U, Yasuda T (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. Plant J, 29: 637~647
- Mundree SG, Whittaker A, Thomson JA, Farrant JM (2000). An aldose reductase homolog from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. Planta, 211: 693~700
- Munnik T, Meijer HJG (2001). Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signaling pathways in plants. FEBS Lett, 498: 172~178
- Qiu JL, Zhou L, Yun BW, Nielsen HB, Fiil BK, Petersen K, MacKinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC (2008). *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. Plant Physiol, 148: 212~222
- Seo S, Sano H, Ohashi Y (1999). Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. Plant Cell, 11: 289~298
- 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
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu HX, Lei L, Yang HL, LiuGQ, Ren DT (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 283: 26996~27006
- Zhang TG, Liu YB, Yang TW, Zhang LJ, Xu SJ, Xue LG, An LZ (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. Plant Physiol Biochem, 44: 274~283