

异源表达番茄*LeMPK3*基因提高烟草的抗低温胁迫能力

于力^{1,2,*}, 阎君^{1,*}, 张一鸣^{3,*}, 刘士辉⁴, 张辉¹, 刘娜¹, 田守波¹, 姚永康⁴, 朱为民^{1,**}

¹上海市农业科学院园艺研究所, 上海201106; ²中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海200032; ³上海市农业科学院, 上海201106; ⁴上海孙桥现代农业联合发展有限公司, 上海201210

摘要: 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号系统在植物应对环境胁迫中发挥重要作用。为了探讨*LeMPK3*基因在低温胁迫中的功能, 我们从番茄中分离了*LeMPK3*基因并将其转化到烟草中, 获得了异源表达*LeMPK3*基因的转基因烟草。RT-PCR分析结果表明, 番茄幼苗在低温和高温胁迫及外源物质——过氧化氢(H₂O₂)、茉莉酸甲酯(MeJA)和水杨酸(SA)处理下*LeMPK3*基因的表达量提高。在烟草中异源表达*LeMPK3*基因可以提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性, 增加脯氨酸和可溶性糖的含量, 增强逆境相关基因的表达。说明异源表达番茄*LeMPK3*基因提高烟草对低温的抗性。

关键词: 番茄; 低温胁迫; 转基因; *LeMPK3*

Ectopic Expression of Tomato *LeMPK3* Improved Chilling Tolerance of Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

YU Li^{1,2,*}, YAN Jun^{1,*}, ZHANG Yi-Ming^{3,*}, LIU Shi-Hui⁴, ZHANG Hui¹, LIU Na¹, TIAN Shou-Bo¹, YAO Yong-Kang⁴, ZHU Wei-Min^{1,**}

¹Horticulture Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; ²Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; ³Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; ⁴Shanghai Sunqiao Modern Agriculture United Development Limited Liability Company, Shanghai 201210, China

Abstract: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades are important intracellular signaling events that mediate signal transduction associated with the plant response to environmental stress. In order to investigate the function of *LeMPK3* under chilling stress, *LeMPK3* was isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants were obtained. The transcription of *LeMPK3* in tomato leaves was up-regulated by low and high temperatures, and by the exogenous signaling molecules methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Transgenic tobacco overexpressing *LeMPK3* accumulated less reactive oxygen species (ROS), more superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) activities, more proline and soluble sugar contents, and more stress-responsive genes expression, leading to enhancing low temperature stress tolerance compared to the control plants.

Key words: tomato; low temperature stress; transgenic; *LeMPK3*

低温胁迫是限制植物生长季节和生长地域的重要环境因子, 过度低温会对植物造成不同程度的伤害, 甚至死亡(晋文娟等2013)。番茄起源于热带、亚热带地区, 为喜温类作物, 对低温敏感。番茄适宜的生长温度为15~33 °C, 开花坐果最适温度为25 °C左右, 低于适宜温度时植株开花坐果受阻, 产量下降。冬春季低温胁迫限制了我国大部分地区的番茄生产, 制约了番茄生产与周年供应。因此, 有必要对番茄响应低温胁迫信号转导并调控耐冷性分子机理进行研究。

植物有各种复杂的信号转导机制来适应外界环境的变化。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

收稿 2014-10-30 修定 2015-01-06

资助 上海市农科院青年科技发展基金(农科青年科技2012-06)、浦东新区科技发展基金创新资金(PKQ2012-03)、公益性行业(农业)科研专项(201403032)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: wmzhu69@hotmail.com; Tel: 021-62208660)。

途径之一。MAPK信号的级联系统主要由3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(Zhang和Klessig 2001; Nakagami等2005)。番茄中含有16个MAPK基因,在番茄响应生物胁迫和非生物胁迫中发挥着重要作用(Kong等2012)。当受伤害、信号多肽systemin、多糖、UV-B辐射、真菌的壳梭孢菌素刺激时,LeMAPK1和LeMAPK2编码的蛋白激酶磷酸化活性被激活(Higgins等2007)。番茄MAPK基因沉默试验显示,番茄LeMAPK1、LeMAPK2、LeMAPK3以及LeMKK2蛋白在Mi-1介导的抗蚜虫反应中具有激酶活性(Li等2006)。LeMAPK3蛋白在植株受到伤害时激酶活性升高,同时转录水平上调,但是在蛋白质水平含量没有上升,转录水平升高的时间滞后于活性的升高,而LeMAPK1和LeMAPK2蛋白在受到胁迫时活性上升的同时,转录水平和蛋白水平都没有变化(Holley等2003)。于力等(2012)研究发现热胁迫、盐胁迫以及UV-B辐射能诱导LeMPK1基因的转录水平上调,将LeMPK1基因在番茄中超表达可以提高番茄的耐热性。孔福苓等(2012)对番茄进行高温处理,发现LeMAPK12在雄蕊中的相对表达量增高,于12 h时达到顶点,而后下降,推测LeMAPK12可能参与番茄花粉发育过程中的高温胁迫反应。目前,有关番茄MAPK基因的研究主要集中在生物胁迫和高温胁迫,尚未有低温胁迫下番茄MAPK基因功能的报道。因此,本文研究低温胁迫下番茄LeMPK3基因的表达特性及功能,具有重要的理论与现实意义。

材料与amp;方法

1 植物材料与处理

供试番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)品种‘1479’为纯合自交系,由上海农科院园艺所提供。试验在中科院上海植物生理生态研究所玻璃温室中进行,种子发芽后2片子叶时移入Hoagland (pH 6.0)营养液中,温度为22/26 °C (夜/白),水培4周后

用于以下试验。

将水培4周的番茄分别移栽到含有以下物质的Hoagland营养液(温度25 °C)中: (1) 10 mmol·L⁻¹过氧化氢(hydrogen peroxide H₂O₂); (2) 100 mmol·L⁻¹茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA); (3) 100 μmol·L⁻¹水杨酸(salicylic acid, SA)。温度胁迫试验中分别将植株放在低温(4 °C)和高温(42 °C)的光照培养箱内。处理后的0、3、6、12和24 h取样,液氮冷冻后贮藏于-80 °C冰箱,用于基因表达分析。

转基因烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv ‘NC89’)种植于营养钵中,温度控制在20/25 °C (夜/白),待收获转基因纯合烟草种子后,将生长至5~6片真叶期的转基因和野生型烟草进行4 °C低温的胁迫处理,24 h后取第2和第3片叶子,液氮冷冻后贮藏于-80 °C冰箱,用于生理指标测定和基因表达分析。

2 RNA提取及半定量RT-PCR

参考孔凡英等(2014)的方法,提取RNA并反转录为cDNA,通过半定量RT-PCR分析LeMPK3基因的表达特性。Leactin正向引物为: 5'-TGCATCTT-GCTGGTCGTG-3',反向引物: 5'-GGATTGCTG-GAAGAGGACC-3'; LeMPK3正向引物: 5'-TATGG-GTGCTGCTCAATTTC,反向引物: 5'-TTCAGG-ATTCAACGCCAAAG-3'。

3 LeMPK3基因的克隆、载体构建和遗传转化

根据NCBI已公布的LeMPK3基因(GenBank登录号为NM 001247431)序列,设计正向引物G1 (5'-ATGGTTGATGCTAATATGGG-3')和反向引物G2 (5'-TTAAGCATATTCAGGATTCA-3'),扩增番茄LeMPK3基因全长,切胶回收PCR目的片段,构建成PBI121-LeMPK3载体,并转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,经酶切和测序验证后,用冷冻法转化导入农杆菌LBA4404感受态中。以‘NC89’烟草叶片作为转化材料,参考秦利军等(2014)的方法,用农杆菌介导的叶盘法进行转化。浸染后的愈伤组织经卡那霉素筛选,挑选新生抗性愈伤组织进行分化、生根、炼苗,最后移栽到花盆中培养。通过基因组PCR筛选转基因烟草,正向引物35S: 5'-TACGCAGCAGGTCTCTCAAG-3',反向引物LeMPK3: 5'-TTAAGCATATTCAGGATTCA-3'。并通过半定量RT-PCR (见第2小节)筛选LeMPK3表达量较高的3个株系,收取T₂代纯合体用于后续试验。

4 种子萌发和幼苗生长

将野生型和转基因T₂代烟草种子(每株系约22粒)播种于MS培养基上, 分别置于25和12 °C光照培养箱中, 40 d后统计每个株系的萌发率, 每处理3次重复。

将在25 °C萌发6 d的野生型和转基因烟草移至25和12 °C光照培养箱中, 40 d后统计每个株系的根长, 每处理3次重复。

5 生理指标测定

将生长至5~6片真叶期的转基因和野生型烟草进行4 °C低温胁迫处理, 取样后测定H₂O₂、O₂⁻、脯氨酸、可溶性糖含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)的酶活性。参考Jiang和Zhang (2001)的方法测定H₂O₂和O₂⁻含量, 参

考Irigoyen等(1992)的方法测定脯氨酸和可溶性糖含量, 参考Zong等(2009)的方法测定SOD、POD、CAT、APX活性。

6 荧光定量PCR检测基因表达

采用TaKaRa公司的SYBR Premix Ex Taq™定量分析抗逆相关基因的表达, 参考Cools和Ishii (2002)的方法, 实时荧光定量PCR使用的引物见表1。扩增体系为: SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μL、引物(10 μmol·L⁻¹)各0.5 μL、cDNA 2 μL、ddH₂O 9.5 μL。扩增程序如下: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环; 以每30 s升高0.5 °C的速率从55 °C缓慢递增至95 °C, 进行溶解曲线分析。采用双标准曲线法进行定量, 每个反应进行3个重复。

7 数据分析

以上所有试验数据均采用Excel 2007和SPSS 13.0软件进行统计分析。

表1 实时荧光定量PCR使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in real-time PCR

扩增基因	正向(5'→3')	反向(5'→3')
<i>NtSOD</i>	AGCTACATGACGCCATTTC	CCCTGTAAAGCAGCACCTTC
<i>NtPOD</i>	AAATGGTGGCGCTAGCCGGTG	GCATTGAAGACGTGCCGCTGG
<i>NtCAT</i>	AGGTACCGCTCATTACACACC	AAGCAAGCTTTTGACCCAGA
<i>NtP5CS</i>	GAACGGAGGTTGCTGATGGA	TCCCACCTCGGACTGCTAGA
<i>NtNCED1</i>	AAGAATGGCTCCGCAAGTTA	GCCTAGCAATTCCAGAGTGG
<i>NtLEA5</i>	TTGAATCTGGGGTTTTGGTT	GGAAGCATTGACGAGCTAGG
<i>NtADC1</i>	CTTGCTGATTACC GCAATTTATC	TAGGATCAGCAGCCCCATAGCC
<i>NtSAMDC</i>	CATTCACATTACCCCGGAAG	AGCAACATCAGCATGCAAAG
<i>Ntubiquitin</i>	TCCAGGACAAGGAGGGTAT	CATCAACAACAGGCAACCTAG

实验结果

1 番茄*LeMPK3*基因的表达模式分析

采用RT-PCR分析番茄*LeMPK3*基因的表达模式, 结果显示, *LeMPK3*基因在番茄的根、茎和叶中均有表达, 但在叶中的表达量高于根和茎(图1-A)。4 °C低温胁迫下, 番茄叶片中*LeMPK3*基因的表达量在3 h时开始积累, 6 h时到达最高值, 到12 h后开始减少(图1-B)。42 °C高温胁迫下, 番茄叶片中*LeMPK3*基因的表达量在3~12 h一直处于较高水平(图1-C)。在外源施加H₂O₂、MeJA、SA后, 番茄叶片中*LeMPK3*基因的表达量也显著提高, 而施加H₂O的对照中*LeMPK3*基因的表达量没有变化(图1-D~G)。可见, 番茄*LeMPK3*基因参与逆境胁迫并

响应多种信号分子。

2 转基因烟草的鉴定

采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草, 收获的T₀代植株的种子经卡那霉素和基因组PCR筛选(结果未列出), 得到9株转基因阳性植株。提取T₂代转基因植株的总RNA进行RT-PCR检测, 结果表明, *LeMPK3*基因在转基因植株中有表达, 而野生型中未检测到表达(图2)。选取表达量较高的OE-7、OE-12和OE-13株系进行后续试验。

3 异源表达*LeMPK3*基因提高烟草耐冷性

由于4 °C时烟草种子无法萌发(数据未列出), 因此, 测定野生型和转基因烟草在12 °C时种子的萌发率和幼苗根长。结果显示, 25 °C下野生型和转基因

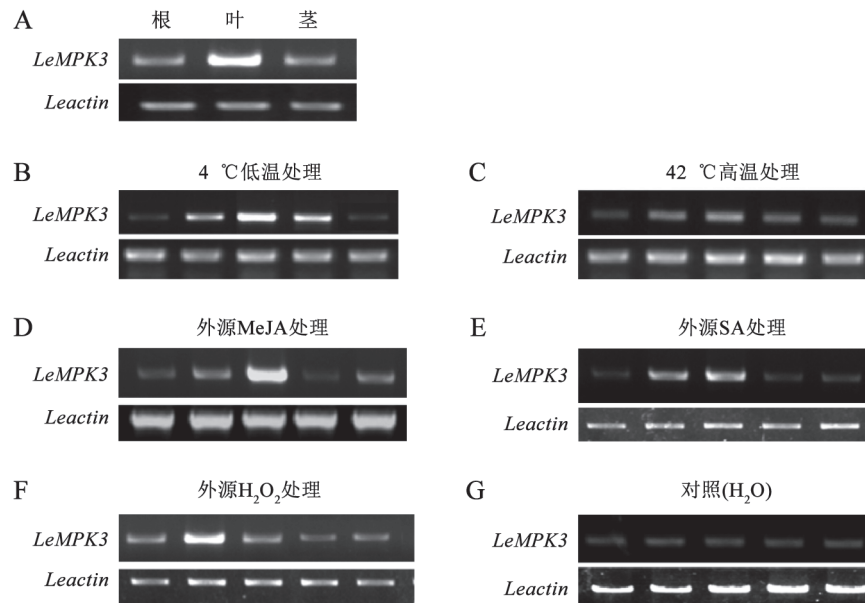


图1 *LeMPK3*基因在不同组织(A)、非生物胁迫(B和C)和信号分子(D、E和F)处理下的表达模式

Fig.1 Expression profiles of *LeMPK3* in different tissues (A), under abiotic stresses (B and C) and signalling molecules (D, E and F)

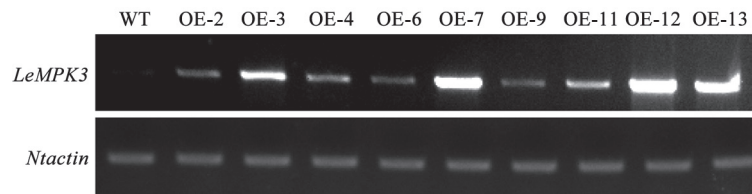


图2 半定量RT-PCR检测转基因植株中*LeMPK3*基因的表达水平

Fig.2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of gene expression levels in *LeMPK3*-ectopic expression plants

烟草种子萌发率都接近100%; 而12 °C时, 野生型的萌发率只有50%, 而转基因烟草在80%左右(图3-A)。

25 °C下野生型和转基因烟草的根长无显著差异; 而12 °C时, 转基因烟草的根比野生型长(图3-B)。

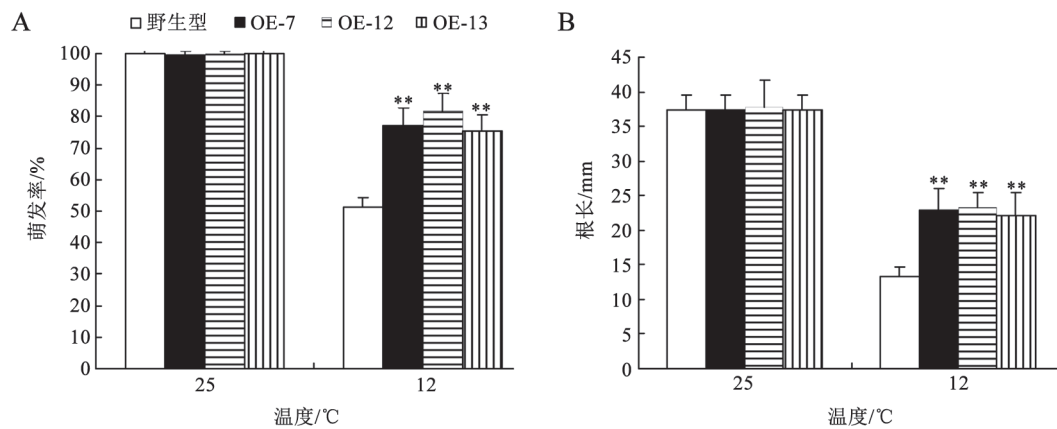


图3 异源表达*LeMPK3*基因提高烟草的低温抗性

Fig.3 Ectopic expression of the *LeMPK3* gene in transgenic tobacco plants increased low temperature tolerance

**表示与对照相比差异极显著($P < 0.01$); 图4~6同此。

4 异源表达LeMPK3基因提高烟草的抗氧化能力

如图4-A和B所示, 在常温下, 野生型和转基因烟草叶片中 H_2O_2 和 O_2^- 含量差异不显著, 而4℃低温胁迫下, 野生型植株叶片中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量显著高于转基因烟草。说明低温胁迫下转基因植株具有更强的活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除能力。

检测野生型和转基因烟草叶片中SOD、POD、CAT和APX活性的结果表明, 常温下除OE-12的

APX活性高于野生型外, 其他株系4种酶的活性与野生型无显著差异; 4℃低温胁迫处理后, 转基因植株叶片中SOD、POD、CAT和APX活性显著高于野生型(图4-C~F)。说明低温胁迫下转基因植株具有更强的抗氧化酶活性, 有利于清除ROS。

5 异源表达LeMPK3基因增加了烟草中脯氨酸和可溶性糖的含量

由图5可见, 4℃低温胁迫下, 转基因植株叶片

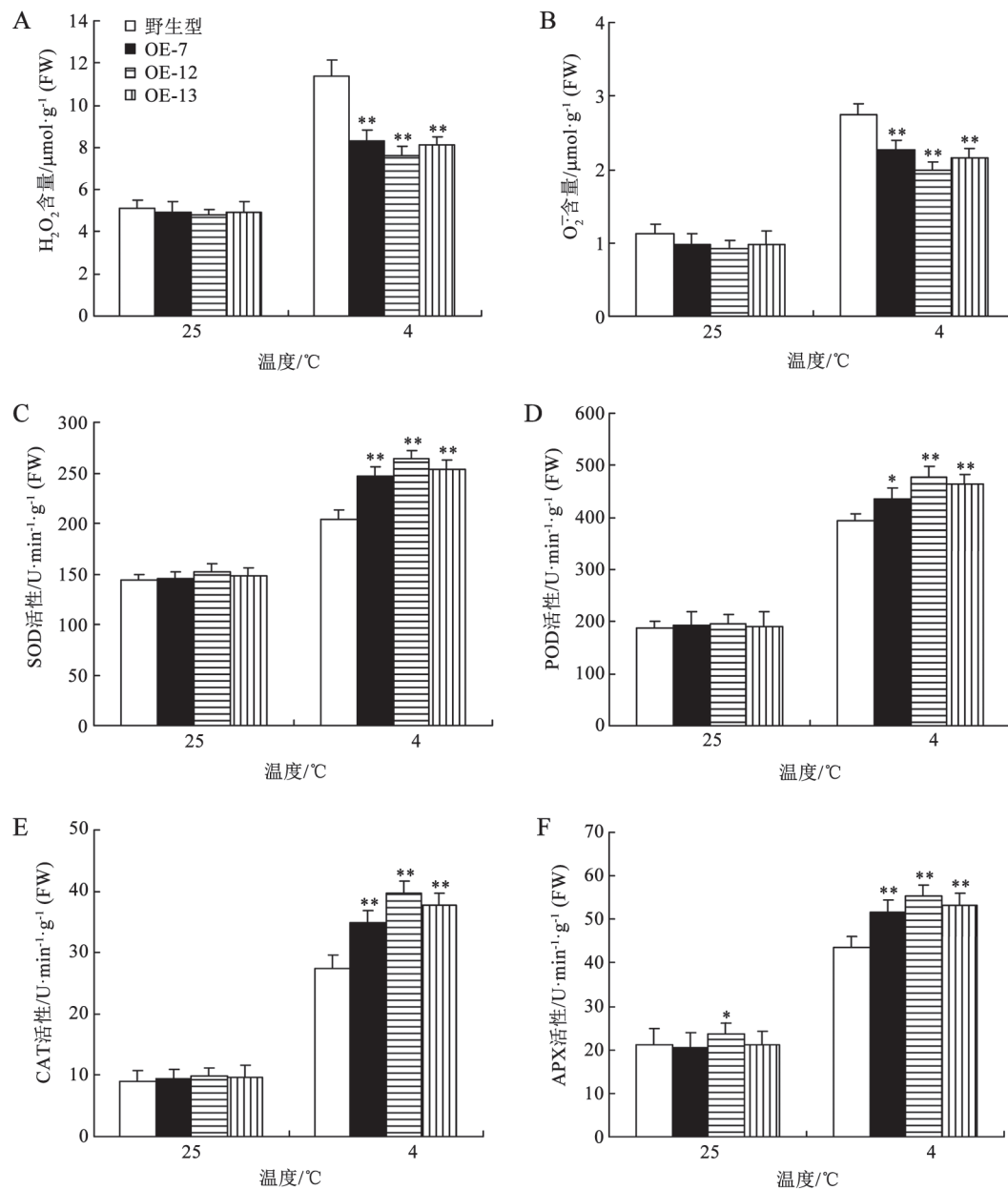


图4 低温胁迫下ROS积累和抗氧化酶活性的变化

Fig.4 Changes in ROS accumulation and activities of antioxidant enzymes under low temperature stress

*表示与对照相比差异显著($P < 0.05$); 图6同此。

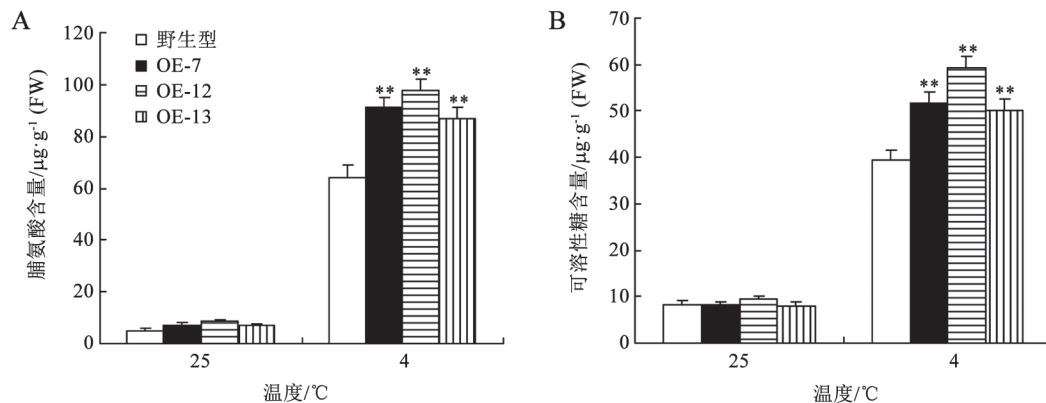


图5 低温胁迫下野生型和转基因烟草中脯氨酸和可溶性糖含量的变化

Fig.5 Changes in proline and soluble sugar contents in wild type and transgenic lines under low temperature stress

中脯氨酸和可溶性糖的含量显著高于野生型,而常温下两者无显著差异。说明低温胁迫下转基因植株能积累更多的渗透调节物质,增强对低温的抗性。

6 异源表达*LeMPK3*基因增加了烟草中逆境相关基因的表达

荧光定量PCR检测野生型和转基因烟草叶片中8个逆境相关基因(*NtSOD*、*NtPOD*、*NtCAT*、*NtNCED1*、*NtP5C5*、*NtLEA5*、*NtADC1*、*NtSAMDC*)的表达,结果显示,常温下,转基因植株叶片中8个逆境相关基因的表达量均高于野生型;4°C低温胁迫下,野生型和转基因植株叶片中逆境相关基因的表达量都有所提高,但后者高于前者(图6)。说明异源表达*LeMPK3*基因增强了烟草中逆境相关基因的表达。

讨 论

植物在长期的进化过程中,由于适应环境的需要,逐渐形成了一套完整的对外界刺激的反应机制,包括对外界刺激的感受、信号的放大、传输及做出应答。在信号传递和应答过程中,MAPK级联途径起着非常重要的作用。MAPK级联在不同层级上存在着不同方式的调控,如磷酸化水平、转录水平、转录后可变剪接、翻译后修饰、细胞定位等,同时不同刺激会开启不同的途径。植物受到低温胁迫时,膜上受体感受低温信号后,将信号向下游传递。MAPK级联作为信号传递体,将外部低温信号级联放大,传递到细胞核内,诱导低温响应基因的表达,使植物获得抗冷性(丁洋等2010)。目前

对于植物中参与低温胁迫的MAPK的研究多集中在模式植物拟南芥上,对番茄MAPK级联通路的成分、调控方式等信息还不完整,因此研究低温胁迫下番茄*LeMPK3*基因的表达特性及功能,将有助于进一步深入研究MAPK级联途径在低温信号转导过程中的作用机制,为研究植物抗冷信号转导机制及其发生和发展规律提供参考。

MAPK在生物信息学上可以分为A、B、C、D四组。番茄*LeMPK3*基因属于A组。大量研究表明,A和B组MAPK参与植物对生物胁迫和非生物胁迫响应(Feilner等2005; Hamel等2006)。OsMPK5参与水稻对多种病害抗性的响应(Song和Goodman 2002)。拟南芥*AtMPK6*被多种生物逆境和环境逆境因子激活(Feilner等2005)。本研究发现,番茄*LeMPK3*基因受低温和高温胁迫诱导,在外源施加H₂O₂、MeJA、SA后,番茄叶片中*LeMPK3*基因的表达量也显著提高,异源表达番茄*LeMPK3*基因提高了低温胁迫下烟草的萌发率和幼苗根长;这与前人关于A组MAPK基因参与生物胁迫和非生物胁迫响应的研究结果相一致。

植物在低温胁迫下产生过多ROS,而MAPK信号系统在植物调节抗氧化系统中发挥重要作用(Zong等2009)。在拟南芥中,AtMEKK1-AtMPK4信号系统通过调节抗氧化系统相关基因来调控ROS(Pitzschke等2009)。Kong等人(2011)研究发现,在烟草中异源表达*ZmMKK4*基因可以提高烟草的抗氧化性,从而提高烟草的抗旱性。本研究发现烟草中异源表达*LeMPK3*基因可以提高烟草中SOD、POD、CAT和APX活性(图4-C~F),降低

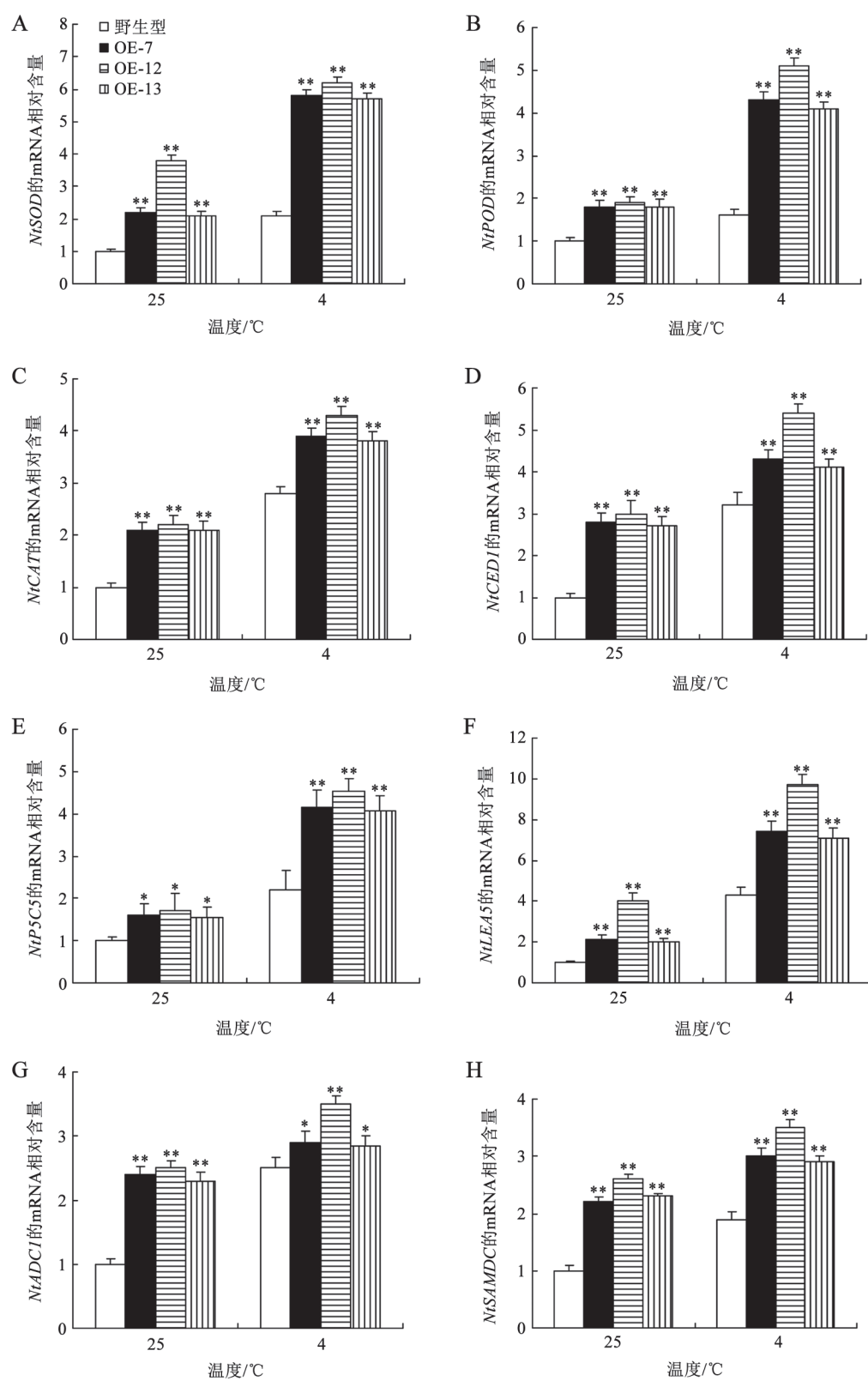


图6 低温胁迫下野生型和转基因烟草中逆境相关基因的表达水平

Fig.6 The expression levels of stress-responsive genes in wild type and transgenic lines under low temperature stress

低温胁迫下植株叶片中 H_2O_2 和 O_2^- 含量(图4-A、B),从而提高植株的耐寒性。后续的荧光定量PCR试验也发现异源表达*LeMPK3*基因提高了烟草中*SOD*、*POD*、*CAT*、*APX*基因的表达(图6),从而提高植株的抗氧化酶活性。

脯氨酸和可溶性糖在植物抗逆适应性中发挥重要作用。脯氨酸含量提高可以防止植物过度失水和蛋白质变性,提高膜系统的稳定性(Liu和Zhu 1997)。植物累积可溶性糖不仅可以降低细胞内水势,防止细胞过度失水,还可以感知和调节ROS平衡,激活低温胁迫相关基因的表达(Heidarvand和Amiri 2010)。本研究发现异源表达*LeMPK3*基因提高了烟草中的脯氨酸和可溶性糖含量(图5),后续的荧光定量PCR试验也发现异源表达*LeMPK3*基因提高了烟草中*NtP5CS*基因的表达量(图6),而*NtP5CS*基因是脯氨酸合成过程中的关键基因。因此,脯氨酸和可溶性糖含量提高也是异源表达*LeMPK3*基因提高烟草耐冷性的重要机制之一。

荧光定量PCR分析结果表明,异源表达*LeMPK3*基因提高了烟草中*NtNCED1*、*NtLEA5*、*NtADC1*和*NtSAMDC*基因的表达量,而*NtNCED1*基因是植物合成脱落酸(ABA)过程中的关键基因,因此可以推断ABA参与了异源表达*LeMPK3*提高植株耐冷性的过程。*NtLEA5*是编码胚胎晚期富集蛋白的基因,该基因编码的蛋白防止细胞失水,保护细胞结构和生物大分子物质的活性(Liu等2009)。多胺广泛参与对植物逆境胁迫的响应,*NtADC1*和*NtSAMDC*基因是植物生物合成多胺的关键基因(Takahashi和Kakehi 2010)。因此,转基因烟草中这些基因表达量的提高,说明异源表达*LeMPK3*基因促进合成更多的ABA、LEA蛋白和多胺,增强抵御低温胁迫的能力。

综上所述,番茄*LeMPK3*基因受低温、高温胁迫和外源信号物质的诱导,异源表达番茄*LeMPK3*基因提高了低温胁迫下烟草的萌发率和幼苗根长,增加了烟草中*SOD*、*POD*、*CAT*和*APX*活性,降低叶片中 H_2O_2 和 O_2^- 含量,提高脯氨酸和可溶性糖的含量,增强逆境相关基因的表达,从而提高转基因烟草对低温的抗性。

参考文献

丁洋,赵瑞瑞,申琳,生吉萍(2010). 低温胁迫下植物MAPK反应及

- LeMAPKs功能的生物信息学预测. 食品科学, 31 (9): 292~296
 晋文娟,张少杰,陈双臣,林晓民,贺超兴(2013). 过表达*Mdip1*基因提高番茄抗低温诱导的氧化胁迫能力. 植物生理学报, 49 (5): 493~500
 孔凡英,邓永胜,尹波,吕巍,孟庆伟(2014). 抑制番茄叶绿体DnaJ蛋白基因的表达降低转基因番茄的抗高温能力. 植物生理学报, 50 (1): 68~76
 孔福琴,王洁,程琳,关小燕,何艳军,卢钢(2012). 番茄*SLMAPK12*基因的分选及表达特征分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 38 (5): 551~558
 秦利军,孙洪荣,赵丹,赵杰宏,赵德刚(2014). 过量表达*NrCN*基因提高烟草植株对TMV的抗性. 植物生理学报, 50 (4): 439~446
 于力,阎君,王海波,朱为民(2012). 番茄热诱导MAPK基因的克隆、表达特性及功能分析. 园艺学报, 39 (增刊): 2679
 Cools HI, Ishii H (2002). Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiol Mol Plant Pathol*, 61: 273~280
 Feilner T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RG, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D et al (2005). High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics*, 4: 1558~1568
 Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehling J (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci*, 11: 192~198
 Heidarvand L, Amiri RM (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol Plant*, 32: 419~431
 Higgins R, Lockwood T, Holley S, Yalamanchili R, Stratmann JW (2007). Changes in the extra cellular pH are neither required nor sufficient for activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in response to systemin and fusicoccin in tomato. *Planta*, 225 (6): 1535~1546
 Holley SR, Yalamanchili RD, Moura S, Ryan CA, Stratmann JW (2003). Convergence of signaling pathways induced by systemin, oligosaccharide elicitors, and ultraviolet-B radiation at the level of mitogen-activated protein kinases in *Lycopersicon peruvianum* suspension cultured cells. *Plant Physiol*, 132 (4): 1728~1738
 Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez DM (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Plant Physiol*, 84: 55~60
 Jiang M, Zhang J (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol*, 42: 1265~1273
 Kong FL, Wang J, Cheng L, Liu SY, Wu J, Peng Z, Lu G (2012). Genome-wide analysis of the mitogen activated protein kinase gene family in *Solanum lycopersicum*. *Gene*, 499: 108~120
 Kong X, Pan J, Zhang M, Xing X, Zhou Y, Liu Y, Li D, Li D (2011). ZmMKK4, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 34: 1291~1303
 Li Q, Xie QG, Smith BJ, Nanarre DA, Kaloshian I (2006). *Mi-1* me-

- diated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Plant Microbe Interact*, 19 (6): 655~664
- Liu J, Zhu JK (1997). Proline accumulation and salt stress induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 114: 591~596
- Liu LX, Hu X, Song J, Zong X, Li DP, Li DQ (2009). Over-expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (*ZmPP2C*) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought. *J Plant Physiol*, 166: 531~542
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci*, 10: 339~346
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H (2009). A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signaling. *Mol Plant*, 2: 120~137
- Song F, Goodman RM (2002). *OsBIMK1*, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses. *Planta*, 215: 997~1005
- Takahashi T, Kakehi JI (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot*, 105: 1~6
- Zhang S, Klessig DF (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, 6: 520~527
- Zong XJ, Li DP, Gu LK, Liu LX, Hu XL, Li DQ (2009). Abscisic acid and hydrogen peroxide induce a novel maize group C MAP kinase gene, *ZmMPK7*, which is responsible for the removal of reactive oxygen species. *Planta*, 229: 485~495