

離層酸誘導之OsMAPK3水稻轉殖株可提升巴拉刈之抗性

趙雲洋、劉麗飛、張孟基*

國立臺灣大學農藝系

摘要

作物對除草劑巴拉刈之抗性與其調控活化氧族之解毒能力有關。先前研究顯示抑制OsMAPK3 (Mitogen activated protein kinase 3) 基因之表現會降低抗氧化酵素的活性，降低水稻對非生物逆境之耐受性。因此本試驗將 ABA 誘導 OsMAPK3 表現之農桿菌質體，轉殖於臺農 67 號水稻中，探討水稻轉殖株之抗氧化酵素活性是否增加，進而得以提升水稻對巴拉刈之抗性。由 RT-PCR 得知，內生 OsMAPK3 基因可受 H₂O₂、ABA 誘導；巴拉刈則無影響。同時 OsMAPK3 轉殖水稻經 ABA 處理後可有效誘導該基因之表現。比較非轉殖株與 OsMAPK3 轉殖水稻間抗氧化酵素活性之差別，發現轉殖水稻 Catalase (CAT) 和 Ascorbate peroxidase (APX) 的活性均較非轉殖株高，而 H₂O₂ 含量則較低。以巴拉刈處理非轉殖與 OsMAPK3 過量表現之稻株，結果顯示轉殖水稻的 Fv/Fm 比值與葉綠素含量都比非轉殖水稻高，生長外觀相對較佳。顯示大量表現 OsMAPK3 可提升水稻抗氧化酵素活性進而增加水稻對巴拉刈之抗性。綜合而言，本試驗結果指出調控水稻 MAPK 之訊息路徑，改變其抗氧化能力可作為未來有效提升作物除草劑抗性之可能途徑。

關鍵詞：MAPK，巴拉刈，氧化逆境，抗氧化酵素。

Expression of an ABA-Induced OsMAPK3 in Transgenic Rice (*Oryza sativa*. L) Increases Paraquat Resistance

Yun-Yang Chao, Li-Fei Liu and Men-Chi Chang*

Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

ABSTRACT

In crops, the detoxification capability especially in eliminating the accumulation of reactive oxygen species, is highly linked to the herbicide tolerance of paraquat. Previous data showed that by inhibition of OsMAPK3 expression in rice resulted in decrease of antioxidant enzymatic activities and reduced abiotic stress tolerance. Hence, in this study we tested whether by ABA-induced OsMAPK3 expression in rice can lead to increase of antioxidant enzymatic activities and further enhance paraquat resistance. RT-PCR analysis indicated that the endogenous OsMAPK3 expression was induced by H₂O₂ and ABA but not paraquat. Meanwhile, after ABA treatment the OsMAPK3 expression was effectively induced in transgenic rice. Antioxidant enzymatic activities analysis showed that catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities were both increased and the H₂O₂ content was reduced in transformant. Also, OsMAPK3 transformant displayed higher PSII electron transfer efficiency (Fv/Fm) and chlorophyll content after paraquat treatment and grew better than control. These results suggest that up-regulation of OsMAPK3

* 通信作者, menchi@ntu.edu.tw

投稿日期：2007 年 4 月 1 日

接受日期：2007 年 4 月 9 日

作物、環境與生物資訊 4:185-200 (2007)

Crop, Environment & Bioinformatics 4:185-200 (2007)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC



not only increased the oxidative-induced antioxidant defense but also improved rice paraquat tolerance. Taken together, by manipulation the expression of MAPK gene and changing the antioxidant capacity may provide an alternative for producing transgenic herbicide tolerance crops in future.

Key words: Mitogen-activated Protein kinase (MAPK), Paraquat, Oxidative stress, Antioxidant.

前言

作物產量及品質的提升有賴田間雜草的防除。為了防止除草劑的濫用提高田間之管理效率，增進土壤再利用能力，抗除草劑轉基因作物之研發有其必要性更成為農業生技公司近年來主要之研發項目。如 Monsanto、AgrEo、AMYC、Rhone Poluenc 等公司皆已發展出抗不同除草劑 (glyphosate、glufosinate、imidazole、phosphinothricin 及 butrtil) 之轉基因作物，包括玉米、大豆、油菜、棉花、菸草、馬鈴薯、小麥及水稻等。目前抗除草劑轉基因作物之發展，在促進除草劑之選擇性使用、改善栽培技術如直播水稻及雜交水稻種子製種、減少除草劑之施用等皆有重要的商業價值。迄今為止，在植物基因工程上如何獲得更有效、抗多重除草劑之轉基因作物依然是研究重點。

一般除草劑依其化學結構及作用模式，可分為抑制光合作用型 (如：巴拉刈)、auxin 型 (如：2,4-D)、抑制脂質合成型、抑制胺基酸合成型 (如 glyphosate) 等。由植物對除草劑抗性生理機制之研究可知除草劑在施用後，植株可於不同階段包括吸收、轉運、代謝、解毒 (抗氧化) 及改變目標酵素之活性等過程產生抗性。目前抗除草劑轉基因作物主要經由 (1) 修飾除草劑作用的標的蛋白，使植物對除草劑不敏感，或過量表現標的蛋白酶，有效解除除草劑對植物的傷害，如：Subramanian (1990) 等人發現菸草與棉花 acetolactate synthase (ALS) 基因的突變體，可以抵抗除草劑 Triazolopyrimidine

sulfanilides 的傷害。而 Harrison (1996) 等人則藉由農桿菌轉殖法將 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 基因轉殖於大豆中，發現此轉殖大豆能耐除草劑 glyphosate 的傷害。(2) 藉由轉殖特定酵素直接去除除草劑的毒害，如：Cao *et al.* (1992) 從 *Streptomyces hygroscopicus* 菌中選殖出 phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) 基因，藉由微注射技術將 PAT 基因(又稱 bar 基因)轉殖於水稻中，轉殖水稻經廣效性除草劑 Basta 處理後，PAT 酵素可將 acetyl-coenzyme A 上的乙醯基轉移至固殺草(phosphinothricin, PTT) 之胺基上，使固殺草失去毒性。(3) 增強植株對除草劑之代謝，如 Kawahigashi *et al.* (2005) 將人類細胞色素 P450 基因(CYP1A1、CYP2B6 和 CYP2C1P) 構建於同一表現載體 p1KBASH 轉入日本晴水稻中，發現該轉殖株可對多種除草劑呈現抗性。

在廣效性除草劑中以巴拉刈對植物的傷害與影響最大，因為巴拉刈(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium, 分子式為 $C_{12}H_{14}N_2$) 極易溶於水且具有很強的還原能力，屬於聯吡啶類 (pyridine) 非選擇性萌後接觸型的除草劑。防除之雜草包括：水稗、鴨舌草、滿天星及其他禾本科、莎草科、菊科、莧科、豆科等植物。作用機制是當植物進行光合作用時，在光反應系統 I 接受電子後，依序將電子傳給鐵氧化還原蛋白(Fd; Ferredoxin)與黃素蛋白(Fp; Flavoprotein)。在此電子傳遞過程中巴拉刈很容易奪取鐵氧化還原蛋白與黃素蛋白應接收的電子轉移給氧分子而形成活化氧族物質(如 O_2^-)。進而引起細胞膜系的脂肪酸氧化，破壞膜系並使膜系崩解最後造成植物枯萎死亡(Chia *et al.* 1981)。當植物吸收巴拉刈產生活化氧族後，若能調控抗氧化酵素活性減低氧化逆境危害，即可避免巴拉刈的毒害。

植物在生長發育過程處於不同之生物或非生物逆境，如：乾旱、鹽害、高、低溫、重金屬、強光、除草劑與病害(Allen 1995,



Desikan *et al.* 2001)下皆會引起氧化逆境而受到傷害。目前已知在真核生物中，Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 可參與氧化逆境下活化氧族的訊息傳遞 (Gustin *et al.* 1998)。MAPK 訊息傳遞是經由一連串磷酸化與去磷酸化的過程，此途徑主要是由 MAPKKK 開始活化下游的 MAPKKs，當 MAPKKs 被活化後即接續活化下游的 MAPKs 進而啟動下游相應的基因，增強植物對氧化逆境之防禦能力而可耐受不同之逆境 (Mizoguchi *et al.* 1997)。在阿拉伯芥中已知有 80 個 MAPKKKs、10 個 MAPKKs 與 23 個 MAPKs 等基因 (Ichimura *et al.* 2002)。Reyna and Yang (2006) 比對水稻基因庫發現有 17 個 OsMAPKs 基因，因此分成 A~F 六群，其中 A、B、C 三群和生物性與非生物性逆境的調控有關，而 D、E、F 三群的功能仍未知。本試驗探討的 OsMAPK3 基因屬於 C 群。此基因位於第二條染色體上，另外一個 C 群的 OsMPK4 基因是位於第六條染色體上，兩者在氨基酸序列上有 91% 相似。根據 Agrawal *et al.* (2003) 及 Fu *et al.* (2002) 之研究，已知 OsMPK4 參與不同非生物性逆境的調控。

目前對於氧化逆境下 MAPK 與活化氧族及抗氧化酵素含量及活性的變化與調控已有諸多報導。Yuasa *et al.* (2001) 將阿拉伯芥 T87 懸浮細胞處理巴拉刈或 3-amino-1,2,4-triazole (catalase 抑制劑) 後，會增加活化氧族的含量，提高細胞內 H₂O₂ 濃度並使 ATMPK6 的活性增強。另外 Rentel *et al.* (2004) 發現 OXI1 (Oxidative signal-inducible 1) 蛋白具絲胺酸 (Serine)/ 蘇胺酸 (Threonine) 蛋白酶的功能，可受 H₂O₂ 的誘導而表現。同時 OXI1 蛋白也能活化受 H₂O₂ 誘導的 AtMPK3 與 AtMPK6 的活性 (Kovtun *et al.* 2000)，顯示活化氧族與 MAPK 這兩個路徑的訊息是藉由 OXI1 連接後，接續將訊息傳遞至下游的基因。此外

Capone *et al.* (2004) 直接將阿拉伯芥根部處理 H₂O₂ 15 分鐘後即有 50~60 kDa 的蛋白激酶開始表現。另亦可偵測到 38 kDa 與 42 kDa 的 MAPK 蛋白。表示當阿拉伯芥根圈 (rhizosphere) 受到活化氧族刺激後，可快速將訊息傳遞給地上部而活化 MAPK 蛋白開啓防禦機制而提高植物對逆境的耐受力。此外 Zhang *et al.* (2006) 對玉米葉片進行 ABA 與 H₂O₂ 處理經兩小時後，可觀測到 46 kD 的 MAPK 的蛋白被活化，且促進下游抗氧化基因之表現並提高其活性，例如：CAT1、cAPX、GR1 與 SOD。由上可知植物清除活化氧族的防禦機制可能主要藉由 MAPK 將訊息傳遞至下游的轉錄因子，啟動清除自由基酵素的基因並活化其蛋白質的活性，如：Superoxide dismutase (SOD)、Ascorbate peroxidase (APX)、Catalase (CAT) 和 Glutathione reductase (GR)。進而減少活化氧族之產生與累積 (Mittler *et al.* 2004)。之前我們已證實抑制 OsMAPK3 基因表現會降低抗氧化酵素的活性，進而減弱植株對乾旱與鹽害的耐受性 (Chao *et al.* 2007)。因此本試驗藉由離層酸誘導 OsMAPK3 表現之水稻轉殖株，探討是否可以因調控 MAPK 路徑中 OsMAPK3 之表現增加抗氧化酵素的活性，進而提高水稻對除草劑巴拉刈的抗性。試驗結果顯示以離層酸誘導 OsMAPK3 可增加水稻抗氧化酵素活性及對巴拉刈之抗性，表示調控水稻 OsMAPKs 基因之表現可作為提升作物除草劑抗性之可能途徑。

材料和與方法

一、基因來源與質體構築

本試驗所用的 OsMAPK3 基因 (Accession No. AF241166) 是國立嘉義大學農藝學系侯新龍助理教授，從水稻懸浮細胞在糖缺乏下，以差異性篩選所選殖而得之。本研究室獲贈該基因後，進行質體構築。首先將載體 pET 32a (Novagen) 與含 OsMAPK3 基因的質體 pBS MAPK 各別進行



Sal I 與 *Not* I 酶切反應。將酶切後兩 DNA 片段黏接得到含 OsMAPK3 基因的質體 pET MAPK。再以 *Nco* I 與 *Xho* I 酶切質體 pQS122Z(中研院植物所賀端華教授提供), 可將約 2.8 Kb TPS (*Trehalose-6-Phosphate Synthase*) 基因切除後當成載體。然後再與從質體 pET MAPK 經 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切後分離得到的 MAPK 片段黏接即可得到以 ABRC 為啓動子及 *Nos* 為終結子誘導 OsMAPK3 之基因表現質體 pQS MAPK。最後將經 *Sac* I 酶切後並補成平端的 pQS MAPK 質體, 與經 *Sma* I 酶切後之農桿菌載體 pCAMBIA 1302 黏接即得到最後轉殖所用的質體 p1302 ARMK (Fig. 1)。

二、水稻基因轉殖、植株再生與繁殖

本試驗以水稻臺農 67 號(*Oryza sativa* L. cv. TNG 67) 為材料, 取開花後約 10~15 天的未成熟胚, 滅菌後接種在誘導癒合組織 CIM 培養基(2N6 基礎培養基; 3.98 g L⁻¹ N6 salt, 30 g L⁻¹ Sucrose, 0.5 mg L⁻¹ Nicotinic acid, 1.0 mg L⁻¹ Thiamine HCl, 0.5 mg L⁻¹ Pyridoxin HCl) 中並添加 10 μM 2-4 dichlorophenoxyacetic acid, 置於 28°C 全日照培養室中, 培養至少 3 週。當癒合組織形成後, 經繼代培養 3~4 週, 做為農桿菌轉殖

材料。利用 MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, UK) 電穿孔儀, 將已構築好的 p1302ARMK 質體轉入 LBA4404 菌系, 並培養於含 100 mg L⁻¹ Kanamycin 的 3 mL YEP (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 0.5% NaCl) 液態培養基中, 在 28°C 振盪培養過夜。將含質體的農桿菌液與癒合組織混合後, 置於 2N6-AS 培養基 (2N6 基礎培養基中加 100 μM Acetosyrigone (AS)、30 g L⁻¹ Glucose) 中共同培養 3 天, 然後以無菌水洗去大部分農桿菌之菌體, 再用含有 250 mg L⁻¹ Cefotaxime (Sigma) 的 MS 培養基洗滌癒合組織, 隨後移至 CIM-CH 篩選培養基(CIM 培養基中加 250 mg L⁻¹ Cefotaxime 與 50 mg L⁻¹ Hygromycin) 上, 於 28°C 全日照培養室中培養 3~4 週, 可得到具 Hygromycin 抗性的癒合組織。接著將此癒合組織移置 RM 分化培養基(2N6 基礎培養基再添加 250 mg L⁻¹ Cefotaxime、50 mg L⁻¹ Hygromycin、300 mg L⁻¹ Casein、0.5 mg L⁻¹ Proline、100 mg L⁻¹ Kinetin、250 mg L⁻¹ Myo-Inositol) 上, 於 28°C 全日照培養室中培養 4 週, 得到再生水稻。隨後將再生苗移至不含抗生素之 MS 固態培養基 (MS 基礎培養基中添 3 g L⁻¹ Phytigel), 培養 2-3 週後, 將再生苗移至人工氣候室種植(日 25°C /

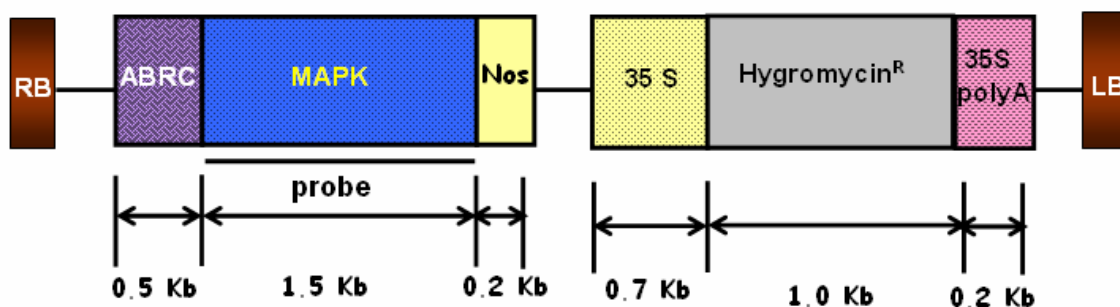


Fig. 1. Schematic diagram of the ABA-induced expression plasmid p1302 ARMK. RB, right border; LB, left border; ABRC, ABA responsive complex of ABA inducible promoter; MA, amplified full-length cDNA fragment of OsMAPK3 gene; NOS, nopaline synthase terminator; 35S, cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; Hygromycin^R, hygromycin B phosphotransferase. Bold underlined bar represents probe used for Southern blot analysis.

夜 20°C)，栽培約 4 個月，得到 T₁ 代種子，並於人工氣候室種植繁殖 T₂ 代。

三、轉殖水稻之 Hygromycin 篩選

取 T₂ 代種子以 1% 次氯酸鈉滅菌後浸於水中，置於 28°C 暗箱催芽兩天，再培養於含 50 mg L⁻¹ Hygromycin 的木村氏水耕溶液中。然後於人工氣候室(日 25°C/夜 20°C)生長兩星期，計算耐抗生素 Hygromycin 水稻植株的比例。藉由轉殖株耐性比例並配合孟德爾定律，決定轉殖水稻是否為轉基因單一拷貝之插入及是否為同質或異質結合體。

四、OsMAPK3 基因表現量之檢測

臺農 67 號水稻生長至三葉齡幼苗時，分別於水耕液中加入 100 μM 巴拉刈或 10 mM H₂O₂ 或 100 μM ABA 等處理，並於 0、0.5、1、2 與 4 小時各別取樣。而 OsMAPK3 轉殖水稻則以 100 μM 巴拉刈處理並於 0、0.5、1、2 與 4 小時各別取樣；100 μM ABA 處理則分制於 0、15、30 分鐘後取樣。將上述材料每處理取約 0.5 克之 5 株地上部組織，用 0.7 mL 萃取液 (TRIzol, Invitrogen) 提取 Total RNA。經 DNase I (Turbo DNA-free Kit, Ambion, Austin, TX) 處理後，取 1 μg Total RNA 進行 RT-PCR 檢測 (one Step RT-PCR Kit, QIAGEN®)。以 OsMAPK3 基因 3' 端 UTR 專一性序列設計引子，利用 RT-PCR 技術偵測 OsMAPK3 基因表現。其序列為 Forward primer 5' TGCCCGATGATCTTCAACTG 3', Reverse primer 5' GCACTTCTCATCAIGAACTAGCC3'。PCR 的設定：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 1 分鐘，煉合溫度 59°C 1 分鐘，延展溫度 72°C 1 分鐘，循環 30 週期；最後延展溫度為 72°C 7 分鐘。試驗中小心調整所使用之 PCR 週期數(26~35)，避免達到最高飽和點以期反應基因之真實變化。而偵測 OsRAB16a 基因表現的引子序列為 Forward primer 5' CGACACACCACCACACCATG 3', Reverse

primer 5' TGIGTACATATGCACGA TGA 3'。PCR 的設定：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 0.5 分鐘，煉合溫度 59°C 0.5 分鐘，延展溫度 72°C 0.5 分鐘，循環 28 週期；最後延展溫度為 72°C 7 分鐘。

本試驗以 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 基因作為實驗之內在控制組，引子序列為 Forward primer 5' CGGTTGATGGACCGTCCAGC 3', Reverse primer 5' GAGCCATTCCAGCCTTGCGC 3', PCR 檢測設定：起始變性溫度為 94°C 5 分鐘；變性溫度 94°C 1 分鐘，煉合溫度 59°C 1 分鐘，延展溫度 72°C 1 分鐘，循環 24 週期；最後延展溫度為 72°C 7 分鐘。PCR 產物以 1.5% 洋菜膠分離，利用 Gel-Pro® Analyzer 軟體將膠體中 DNA 條帶進行標定後，將其濃度轉成數值，再將 OsMAPK3 DNA 條帶反應之數值除以 GAPDH 數值進行標準化。試驗結果之分析是將非轉殖水稻的標準化數值當成 1，轉殖水稻所得之數值則是將標準化之值對照非轉殖水稻而量化，依據量化後之數值繪製成圖。

五、水稻對巴拉刈之抗性與生理表現分析

將臺農 67 號非轉殖水稻與 OsMAPK3 轉殖水稻，在人工氣候室自然光玻璃室(日 25°C/夜 20°C)以木村氏水耕液栽培至三葉齡幼苗，移置溫度 28°C、全日光照 130 ± 0.35 μmol s⁻¹ m⁻² 環境下生長。於四葉齡幼苗時處理 100 μM 巴拉刈一天，每次試驗以 4 株幼苗進行處理。之後在相同環境下恢復生長，一天後固定取第四片葉片尖端三公分管在葉綠素螢光測定儀(Chlorophyll fluorometer, Joniorpam, Walz, Germany)的偵測器上，測量 Fv/Fm 值，同時取下第三片尖端三公分管葉片分析葉綠素含量，並記錄外觀生長情形。實驗共重複三次。

六、水稻 H₂O₂ 含量變化及抗氧化酵素的測定



非轉殖水稻與 OsMAPK3 轉殖水稻之生長與巴拉刈處理如五所述。將四葉齡幼苗生長於含 100 μM 巴拉刈(24%草燕松、興農公司)的水耕液一天後，測量非轉殖與轉殖水稻 H_2O_2 含量與 CAT、APX 和 GR 等酵素活性之變化。每處理 2 株幼苗，重複四次。

H_2O_2 之含量測定係參考 Jana and Choudhuri (1981)之方法，CAT 之活性測定係參考 Kato and Shimizu (1987)之方法，APX 活性測定係參考 Nakano and Asada (1981)之方法，GR 之活性測定係參考 Foster and Hess (1980)之方法。蛋白質測定法則是依據 Bradford (1976)進行。

H_2O_2 含量之原位染色係利用 Diaminobenzidine (DAB) 染色法進行 (Thordal-Christensen *et al.* 1997)。植株經 100 μM 巴拉刈處理一天，立即取第四葉葉尖下三公分的葉片，每一材料處理 3 株幼苗，並重複三次。將這些葉片浸於 0.01% 之 DAB 溶液中，置於光照下一天後，取出葉片浸於含 80% 酒精的試管中，以隔水加熱法煮 20 分鐘去除葉綠素，記錄葉片上紅褐色斑點分佈情形，此即 H_2O_2 累積的位置。

七、統計分析

以 SAS (Statistical Analysis System) 8.2 版統計分析軟體進行統計分析。並利用 LSD (least significant difference) 方法進行分析 ($P < 0.05$)，比較各處理間平均值之差異。

結果

一、OsMAPK3 基因對巴拉刈、 H_2O_2 及 ABA 之反應

爲了瞭解巴拉刈、 H_2O_2 及 ABA 對 OsMAPK3 表現之影響，我們首先將三葉齡之臺農 67 號水稻幼苗以 100 μM 巴拉刈或 10 mM H_2O_2 或 100 μM ABA 各別處理後，利用 RT-PCR 進行 OsMAPK3 的表現分析。試驗結果顯示 OsMAPK3 表現不受巴拉刈影響 (Fig. 2A 及 B)，但在 10 mM H_2O_2 和 100 μM

ABA 處理 30 分鐘時，OsMAPK3 基因表現即開始增加，1 小時後表現量最大；而在 2 小時後則逐漸減弱 (Figs. 2 A 及 B)。

二、ABA 誘導 OsMAPK3 轉殖水稻之分子鑑定

本試驗共獲得 17 個 T_0 代轉殖系 (AR 1~17)，轉殖效率爲 20.2% (資料未顯示)。由於轉殖株具有抗 Hygromycin 的 HPT 基因，在 Hygromycin 處理下幼苗可正常生長，但非轉殖幼苗則不耐 Hygromycin 而造成生長受阻導致枯萎死亡。遂將 T_2 代種子進行 Hygromycin 抗性篩選挑出近似同型結合基因型且種子數較多的品系 AR5E-7-1、AR7A-7-1 與 AR14B-3-1 繼續進行分子鑑定與生理分析。爲了瞭解轉殖水稻中 OsMAPK3 插入的數目與位置，以 OsMAPK3 編碼區全長之 DNA 片段當成探針 (Fig. 1)，進行南方氏墨漬分析法。結果顯示轉殖水稻 AR5E-7-1、AR7A-7-1 與 AR14B-3-1 均僅含一個拷貝的轉基因且插入的位置不同 (Fig. 3A)。其 T_2 代種子經 Hygromycin 抗性篩選皆具抗性顯示可能爲同質結合體 (數據未顯示)。

三、轉殖與非轉殖水稻於 ABA 或巴拉刈處理下 OsMAPK3 之表現分析

爲了進一步測試 ABA 可否經由 ABRC (ABA-responsive complex) 起動子有效誘導轉殖株 OsMAPK3 基因之表現，我們以 RT-PCR 進行上述轉殖水稻於 ABA 處理下 OsMAPK3 基因表現量之檢測。其中由於 OsRab16A 基因已知會受 ABA 誘導表現 (Miyoshi *et al.* 1999)，因此我們以 OsRab16A 作爲 ABA 正向調控之標的基因。結果在未處理 ABA 時三個轉殖系水稻 OsMAPK3 的表現均比非轉殖水稻高；而且轉殖水稻的 OsMAPK3 及 OsRab16A 表現皆隨 ABA 處理時間而增加 (Fig. 3B)。表示轉殖水稻 OsMAPK3 之表現可受 ABA 有效的誘導。



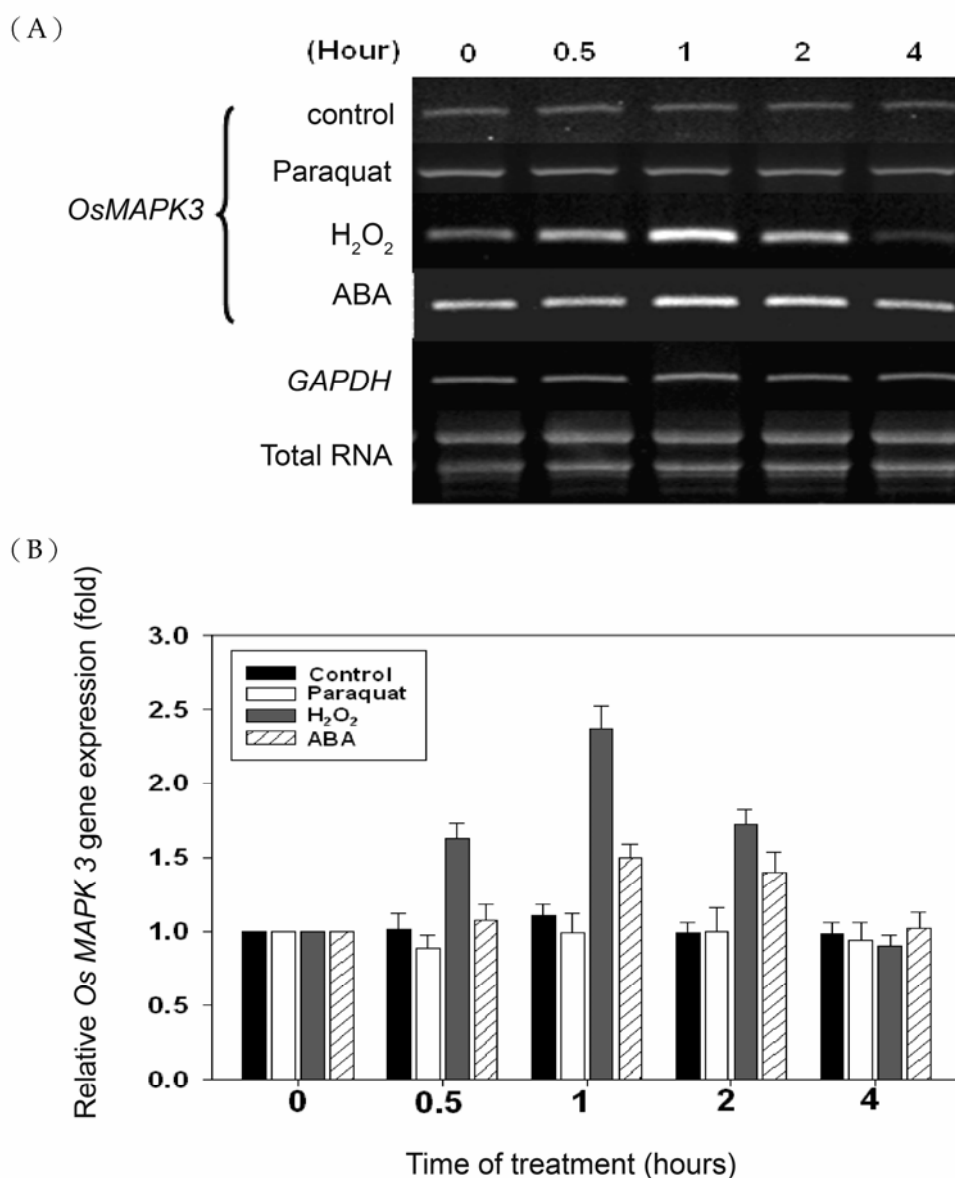


Fig. 2. RT-PCR detection of OsMAPK3 gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) seedling under H₂O₂, ABA or paraquat treatments. TNG 67 rice seedlings were treated with 100 μ M paraquat, 10 mM H₂O₂ or 100 μ M ABA for 0.5, 1, 2, and 4 hours, respectively. Then RT-PCR was conducted to measure OsMAPK3 gene expression profiling. Control indicates rice seedlings grow under normal condition (30°C/25°C) without any treatment. Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an internal control (A). Time course analysis of relative RNA transcription levels of OsMAPK3 gene under H₂O₂, ABA or paraquat treatments. DNA band intensity was processed with Gel-Pro® Analyzer software, then the gene expression of OsMAPK3 was normalized to GAPDH. The value obtained at 0 hr from control experiment was arbitrary set up as 1 for comparison. The data represent means \pm SE (standard error) of five individual rice seedlings from three independent experiments.

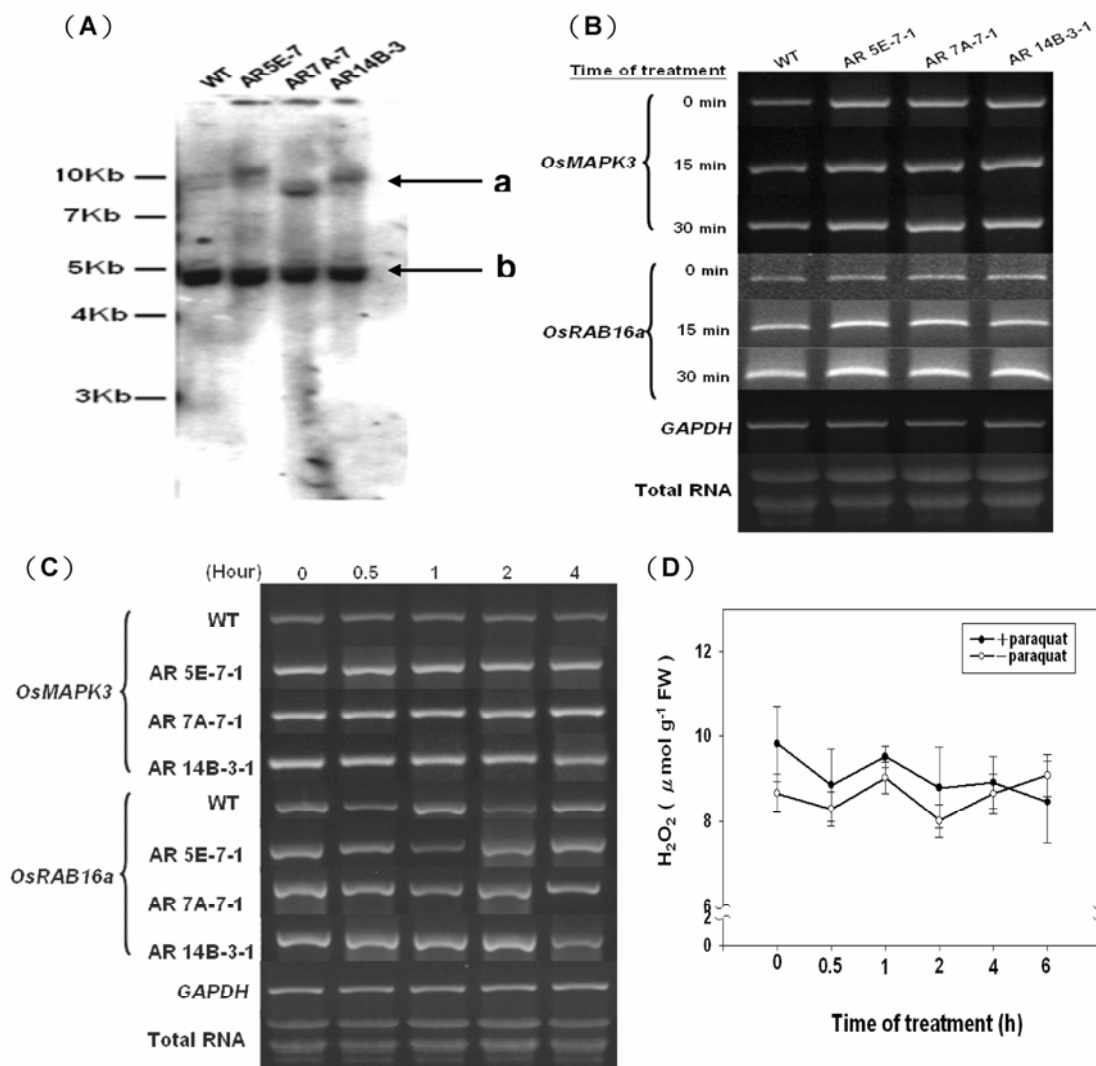


Fig. 3. Determination of inserted gene numbers and expression of *OsMAPK3* in wild-type and T₂ generation transgenic rice seedlings, AR5E-7-1, AR7A-7-1 and AR14B-3-1. Southern blot analysis (A). Genomic DNA extracted from 3-leaf staged rice seedlings was digested with *Hind* III restriction enzyme, then gel separated and hybridized with 1.5 Kb *OsMAPK3* DNA probe. a: foreign introduced *OsMAPK3* gene, b: endogenous rice *OsMAPK3* gene. Time course analysis of *OsMAPK3* and *OsRAB16a* expression under 100 μM ABA (B) or 100 μM paraquat treatment (C). GAPDH gene was used as an internal control and ABA-induced *OsRAB16a* was used for a positive control. Each data was obtained as mean \pm SE from five individuals and three times of independent experiments. Time course analysis of H_2O_2 content change in wild-type rice (TNG 67) under 100 μM paraquat treatment (D). Data were calculated from three times of independent experiments.

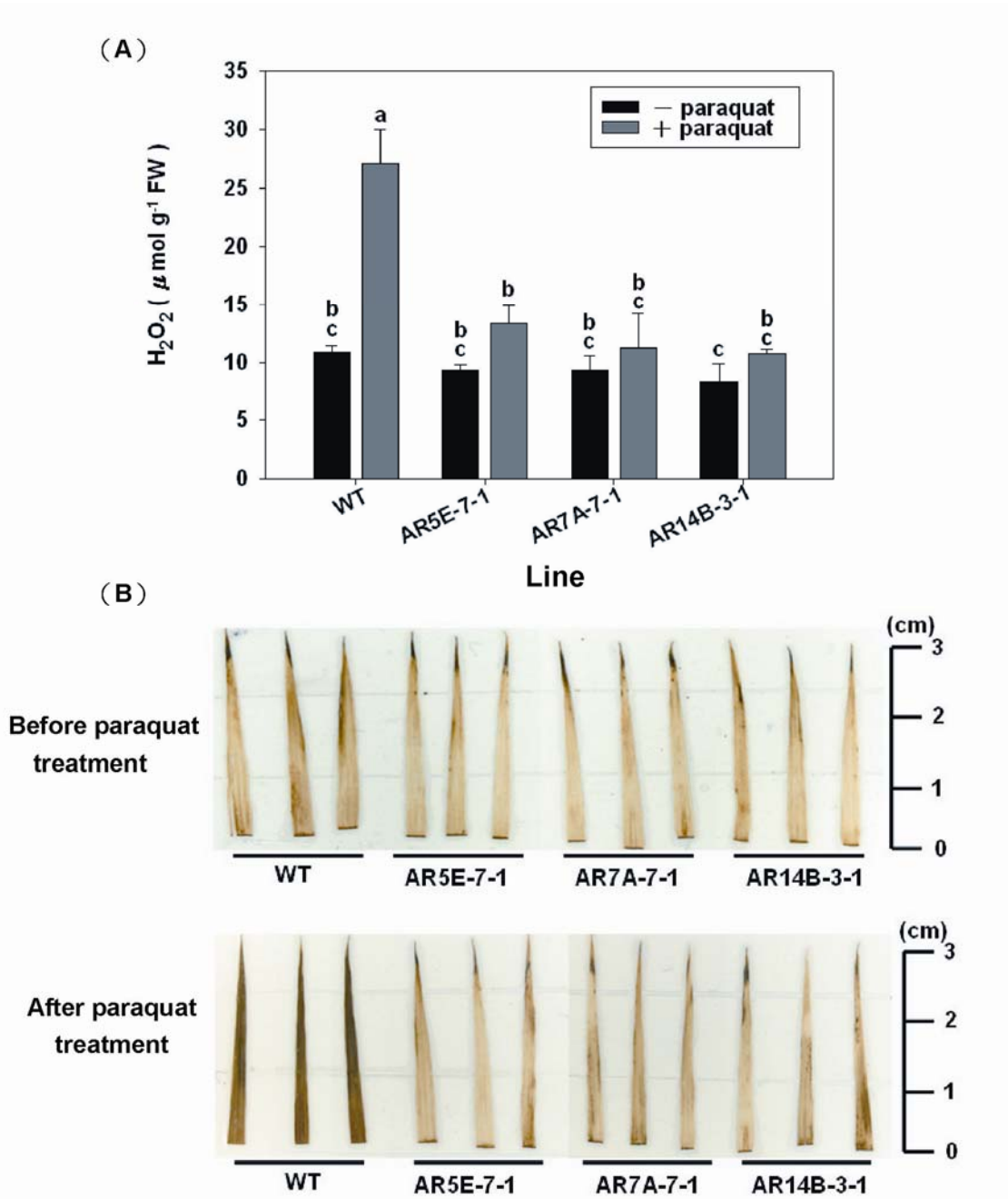


Fig. 4. Changes of H₂O₂ content in ABA-induced OsMAPK3 transgenic rice plants under 100 μM paraquat treatment then recovery for one day. H₂O₂ content (A) distribution of H₂O₂ in rice leaves after DAB staining (B). The data represent means ± SE from three individual plants and replicated for three times. Letters indicate significant differences ($P < 0.05$) as assessed by Duncan's test with SAS software.

此外比較轉殖與非轉殖水稻於巴拉刈處理下 OsMAPK3 基因表現之差異，結果顯示，在巴拉刈處理前、後轉殖水稻 OsMAPK3 表現量都比非轉殖水稻高。但兩者的 OsMAPK3 表現皆不會因巴拉刈處理時間之增加而有所改變(Fig. 3C)。由於除草劑巴拉刈已知會引起植物之氧化逆境提升 H₂O₂ 含量，而 H₂O₂ 則會誘導 OsMAPK3 基因之表現 (Fig. 2A)，因此本試驗亦針對非轉殖水稻於巴拉刈處理後六小時內之 H₂O₂ 含量變化進行測定。由 Fig. 3D 顯示 H₂O₂ 含量並未因巴拉刈之處理而有明顯變化。表示水稻經巴拉刈短期處理並不會快速累積 H₂O₂ 含量進而誘導 OsMAPK3 之表現。試驗結果亦發現不論非轉殖或轉殖水稻經巴拉刈處理後，OsRab16A 表現並無明顯差異(Fig. 3C)，表示巴拉刈處理可能並不會改變水稻內生 ABA 之含量而與 ABA 之調控途徑無關。

四、轉殖與非轉殖水稻於巴拉刈處理之抗氧化酵素活性分析

由於如何去除植物吸收巴拉刈所產生之活化氧族與植物抗巴拉刈的能力有關。因此本試驗將 OsMAPK3 轉殖水稻處理 100 μ M 巴拉刈 1 天後，分析抗氧化酵素活性之變化，以期瞭解誘導 OsMAPK3 基因表現是否可改變轉殖水稻之抗氧化能力。結果顯示非轉殖水稻處理巴拉刈後 H₂O₂ 的含量明顯比轉殖 OsMAPK3 水稻高約 50%~60% (Fig. 4A)，但處理前兩者 H₂O₂ 含量則無明顯差異。除此之外因 DAB 染劑會與 H₂O₂ 結合經還原後呈現紅褐色沈澱，可以此顏色之變化來觀察 H₂O₂ 在葉片組織上的分布。經 DAB 染色可知，在未處理時非轉殖水稻葉片的褐色斑點顏色較轉殖水稻深，表示植株在全日照環境下生長已產生輕微的氧化逆境。經 100 μ M 巴拉刈處理一天後，非轉殖水稻葉片已幾乎完全呈深褐色，而轉殖水稻僅在葉的尖端、基部及部分葉身可看到褐色斑點。由上述 H₂O₂ 定量與原位染色之

結果顯示，轉殖水稻葉片累積的 H₂O₂ 含量明顯比非轉殖水稻低 (Fig. 4 B)。為進一步闡明轉殖株 H₂O₂ 含量之降低，是否歸因於轉殖株抗氧化酵素活性之增加所致，因此本試驗進一步測定抗氧化逆境防禦機制 ascorbate-glutathione cycle 中 CAT、APX 和 GR 等抗氧化酵素活性。結果發現，經 100 μ M 巴拉刈處理後，轉殖水稻的 CAT 與 APX 活性明顯比非轉殖水稻高，其中 CAT 高約 40%~50%，而 APX 高約 10%~25% (Fig. 5)，但 GR 活性與非轉殖水稻則無明顯差異 (Fig. 5)。

五、轉殖 OsMAPK3 水稻處理巴拉刈後之抗性生理分析

以 ABA 誘導 OsMAPK3 轉殖水稻所導致抗氧化能力之提升可否增加水稻對巴拉刈之抗性? 本試驗因此針對轉殖與非轉殖水稻於巴拉刈處理後，分別測量光合作用電子傳遞效率並紀錄植株的生長情形。在逆境下葉綠素螢光量 Fv/Fm 值和葉綠素含量之分析，已普遍被視為植物葉綠囊膜之損傷程度，而其所反應光合作用效率之下降值則可作為巴拉刈抗性的生理評估指標 (Guidi *et al.* 1997)。本試驗結果顯示轉殖水稻在未處理巴拉刈時，所得的 Fv/Fm 值與非轉殖水稻皆為 0.8 左右 (Fig. 6A)。但經 100 μ M 巴拉刈處理一天，再移至正常水耕全日照環境恢復一天後，轉殖水稻所測得 Fv/Fm 值均比非轉殖水稻高出 67%~78% 左右 (Fig. 6A)，而葉綠素含量亦增加了 24%~31%。從植株外觀明顯發現，巴拉刈處理後非轉殖水稻第四葉片皆已捲曲，但轉殖株除 AR14B-3-1 轉殖系少部分植株第四葉捲曲外，其他兩個轉殖系第四葉均展開且生長正常 (Fig. 6B)，顯示轉殖水稻經巴拉刈處理後較非轉殖水稻呈現較高的抗性。

討論

一、H₂O₂ 與 ABA 而非巴拉刈可誘導水稻內生 OsMAPK3 基因之表現



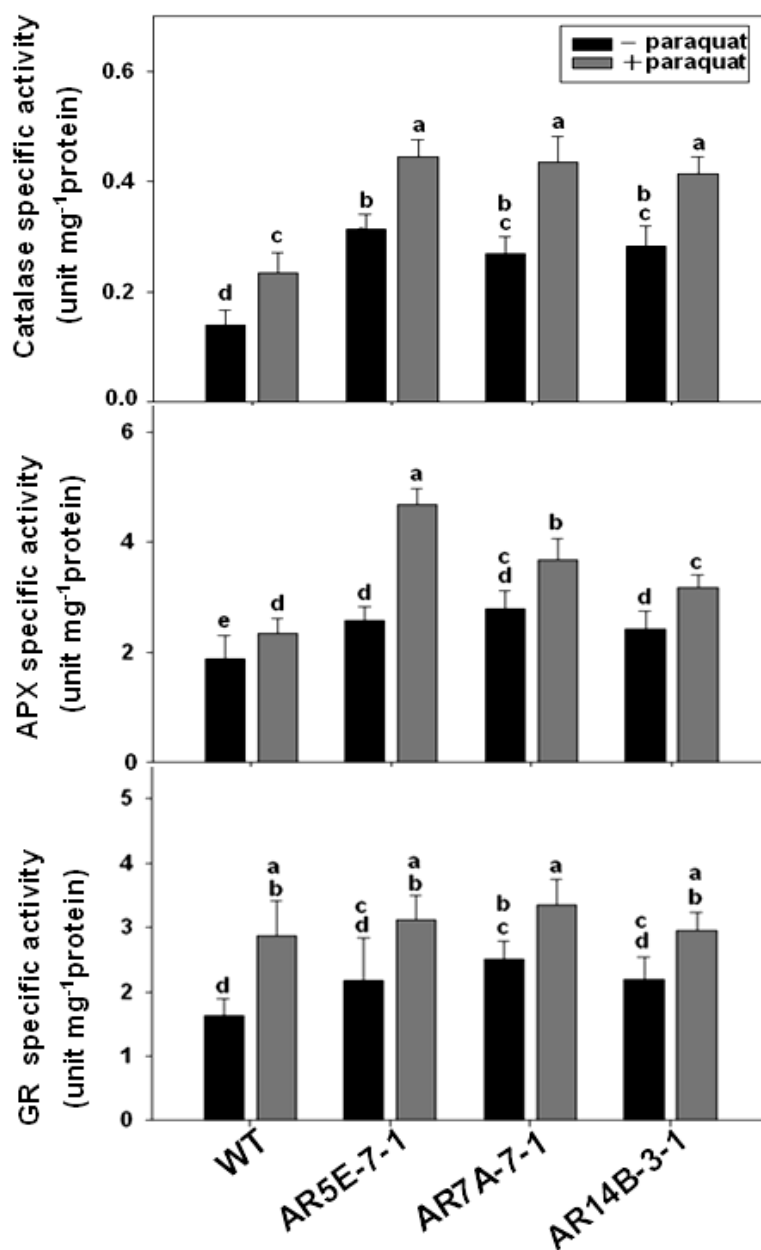


Fig. 5. Enzymatic activities assay of CAT, APX and GR in ABA-induced OsMAPK3 transgenic rice plants under 24 hours 100 μ M paraquat treatment then recovery for one day. The data represent means \pm SE of two individuals from four independent experiments. Significant differences ($P < 0.05$) with or without paraquat treatments were indicated with letters as assessed by Duncan's test with SAS software.

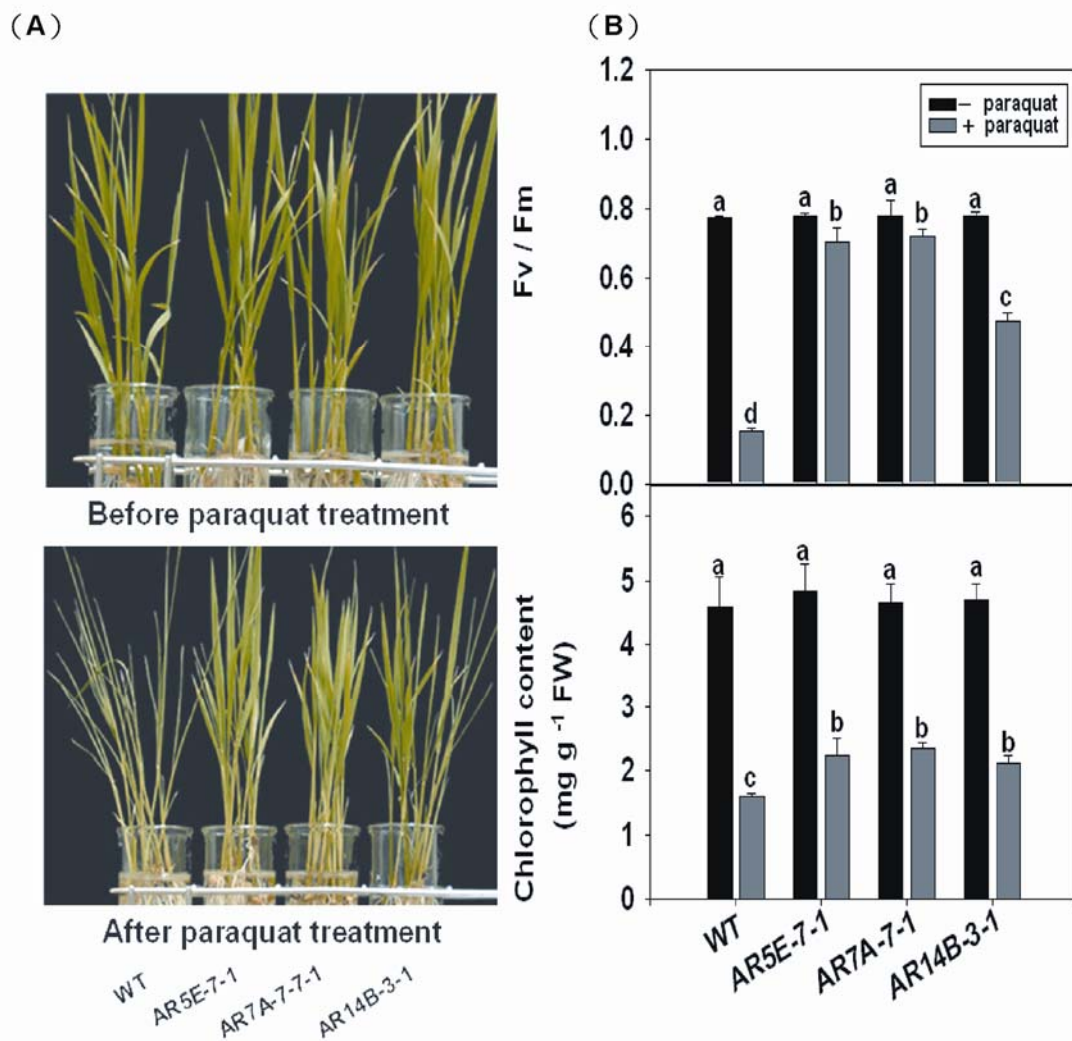


Fig. 6. Phenotypes and herbicide resistance of ABA-induced transgenic rice seedlings under 100 μM paraquat stress. Phenotypes of wild-type and transgenic rice plants before or after one day of 100 μM paraquat treatment then recovered for one day (A). Fv/Fm values were measured from the 4th leaf and the chlorophyll content was determined from the 3rd leaf of wild-type and transgenic rice plants without or with one day of 100 μM paraquat treatment then recovered for one day (B). Data were obtained as means \pm SE of four individual seedlings and experiments were repeated three times. Significant differences ($P < 0.05$) of plants response to paraquat were indicated with letters as assessed by Duncan's test with SAS software.

雖然除草劑巴拉刈已知會造成氧化逆境增加 H_2O_2 含量，但由於短時間之處理並無法造成 H_2O_2 之大量累積(Fig. 3D)是以巴拉刈並不引起 OsMAPK3 表現量之改變。再者由 Fig. 3C 顯示巴拉刈之處理並不會顯著的

造成 *OsRAB16a* 表現之變化，因此巴拉刈亦不會影響內生 ABA 含量導致 OsMAPK3 表現之變異。至於 H_2O_2 是否會影響內生 ABA 含量，在本試驗中因未對 ABA 進行定量分析無法判斷。但 Jiang and Zhang (2002) 對玉

米切離葉處理不同濃度的 H_2O_2 和巴拉刈，由結果顯示 ABA 含量在處理 0~12 小時間變化皆不明顯，表示玉米切離葉經 H_2O_2 和巴拉刈處理後不會改變內生 ABA 的含量，此結果大致與本試驗相同。因此初步結論可認為巴拉刈、 H_2O_2 與 ABA 可被視為獨立的三個因子，而可各別探討巴拉刈、 H_2O_2 與 ABA 對 OsMAPK3 基因表現之影響。先前分析 OsMAPK3 基因之起動子序列 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/sign-alup.html>) 發現其上游具有 ABA responsive element (ABRE) 及 antioxidant responsive element (ARE) 等 cis-acting DNA elements，推測 OsMAPK3 基因很可能會受到 ABA 及 H_2O_2 之誘導。研究結果亦顯示水稻內生之 OsMAPK3 在 H_2O_2 或 ABA 處理可增加基因之表現，巴拉刈則無影響 (Fig. 2)。此結果亦強化了過去認為當植物體中活性氧族增加時會藉由 MAPK 傳遞訊息，開啓相關防禦機制以提升耐受性之概念。例如 Nakagami *et al.* (2004) 發現苜蓿經 H_2O_2 處理後，OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase; MAPKKK) 活性提高，進而活化下游的 MM3 (MAPK) 蛋白引起細胞凋亡之反應。Grant *et al.* (2000) 利用 GST (glutathione S-transferase) 作為活性氧族存在時的指標性基因，將 *gst1::luc* (其中 *gst1* 為 GST 基因的啟動子) 之構築轉殖於阿拉伯芥中，偵測 MAPK 及不同植物荷爾蒙在活化氧族訊息傳遞中扮演之角色。結果顯示施加蕃茄細菌性葉斑病菌 (*Pseudomonas syringae pv.*) 的萃取物於轉殖 *gst1::luc* 阿拉伯芥時，可明顯提高報導基因 luciferase 的活性。若將 *gst1::luc* 轉殖到對水楊酸、茉莉酸和乙烯不敏感且可大量表現活性氧族的阿拉伯芥突變體 *nahG*、*coi1* 和 *etr1* 中，則可發現除了報導基因 luciferase 活性明顯提高，並可偵測到一個 48 kDa 的 MAPK 活化蛋白。表示 GST1 的表現是因活化氧族誘導 MAPK 而非病原菌本身所引起。推測本篇研究中水稻之

OsMAPK3 可能亦可在活化氧族之訊息傳遞中扮演重要之角色。

二、ABA 可有效誘導轉殖水稻 OsMAPK3 之表現

本試驗轉殖水稻經 ABA 處理後發現 OsMAPK3 及 *OsRAB16a* 之表現皆會隨 ABA 處理時間而增加。其中 *OsRAB16a* 為 ABA 調控之正向表達基因。表示 ABA 之處理有效且轉殖水稻中 OsMAPK3 之表現亦可被 ABRC (ABA Responsive Complex) 所驅動。此外實驗還發現在未處理巴拉刈之轉殖水稻 OsMAPK3 基因表現比非轉殖株強 (Fig. 3B)，主要可能因為 ABRC 並非一嚴格調控 (tightly controlled) 之起動子，在轉殖水稻中可經由內生 ABA 之作用提高 OsMAPK3 表現量。而在巴拉刈處理下，轉殖水稻 OsMAPK3 表現量與處理前相比並無變化，但整體而言皆比非轉殖水稻高 (Fig. 3C)。表示轉殖株 OsMAPK3 之增加表現量可能主要皆來自內生 ABA 之影響。

三、轉殖 OsMAPK3 水稻經巴拉刈處理後可增加抗氧化酵素之活性，提升對巴拉刈之抗性

轉殖 OsMAPK3 水稻於巴拉刈處理下 Fv/Fm 值與葉綠素含量都比非轉殖水稻較高 (Fig. 6B)。 H_2O_2 含量與 DAB 染色結果，顯示轉殖水稻 H_2O_2 含量比非轉殖者明顯降低，褐色斑點亦較非轉殖水稻少 (Figs. 4A 及 4B)。轉殖水稻相較於巴拉刈處理下的 CAT 與 APX 活性皆較非轉殖水稻高。綜合此些證據皆顯示 OsMAPK3 經內生 ABA 誘導表現可提升抗氧化酵素之活性，改變轉殖株抗氧化逆境之解毒能力，增加對巴拉刈之抗性。一般植物在葉綠體與細胞質中進行 Ascorbate-Glutathione 循環，平時藉由 APX 維持細胞內 H_2O_2 的穩定。而 CAT 則多存在於細胞質和過氧化體中，其酵素作用之 Km 值較 APX 高。當植物遇到逆境



時，短期由 CAT 負責迅速清除過量的 H_2O_2 ；長期之逆境馴化適應則以 APX 較重要 (Neill *et al.* 2002)。本試驗中轉殖水稻不論在未處理或處理巴拉刈時，CAT 與 APX 含量均比非轉殖水稻高 (Fig. 5)，顯示轉殖水稻具有較高清除 H_2O_2 之能力，使 H_2O_2 之累積量減少 (Fig. 4 A)。此外由於非轉殖水稻經巴拉刈處理後仍有 H_2O_2 之殘留，使 Ascorbate-Glutathione 循環反應中 GR 活性明顯增加，但 GR 活性之表現在轉殖水稻間變化則不明顯 (Fig. 5)。表示 CAT、APX 與 GR 等酵素活性在 Ascorbate-Glutathione 循環反應中或許存有相互協調以達平衡之關聯性。

四、轉殖 OsMAPK3 水稻是否透過 ABA 調控之相關途徑提升抗氧化酵素活性？

Jiang and Zhang (2002) 之研究顯示，玉米切離葉在缺水處理下內生 ABA 含量會提高，進而活化抗氧化酵素活性，以解除活化氧族對細胞的毒害。Yoshida *et al.* (2003) 也證實經 ABA 前處理的藍綠藻，再處理巴拉刈或 H_2O_2 時可減輕活化氧族所造成之逆境。主要是藍綠藻經 ABA 處理後可先活化 CAT 與 APX 的活性，降低細胞內 H_2O_2 含量以減少細胞傷亡。由此可知植物可透過 ABA 之相關調控途徑提高抗氧化酵素活性，以減低細胞傷害。雖然本試驗所使用 OsMAPK3 基因之起動子 DNA 序列經分析已知具有 ABA responsive element (ABRE) 之 cis-acting element (資料未顯示)，但轉殖 OsMAPK3 水稻是否經由 ABA 調控之相關或非相關途徑提升抗氧化酵素活性，而增強對巴拉刈之抗性則仍不甚清楚。在本試驗轉殖 OsMAPK3 水稻經巴拉刈處理後可提高 CAT 和 APX 等抗氧化酵素的活性，但從水稻在巴拉刈處理前、後，檢測 *OsRab16A* 基因表現都無明顯差異 (Fig. 3C)，顯示巴拉刈並不會影響內生 ABA 含量。因此 CAT 與

APX 抗氧化酵素活性之提升可能是受上游 OsMAPK3 基因調控而非與 ABA 調控途徑緊密相關。是否再由 OsMAPK3 啟動下游基因作用於 CAT 及 APX 基因之表現尚待進一步之實驗與研究。

五、OsMAPK3 轉殖水稻於抗除草劑之未來應用

目前耐除草劑的轉殖作物多以轉殖特定的蛋白酶，解除除草劑對植物產生的毒害獲致抗性 (Cao *et al.* 1992, Harrison *et al.* 1996, Subramanian *et al.* 1990)。但本篇是首度以調控 MAPK 訊息傳遞中的因子增加下游的氧化酵素活性，進而解除因處理巴拉刈所形成氧化逆境，提高水稻對除草劑巴拉刈的抗性。在目前全球生技市場對如何獲得更有效、抗多重除草劑轉基因作物之需求仍有其迫切性，抗巴拉刈之 OsMAPK3 轉殖水稻有其意義。未來之應用上我們希望進一步瞭解 OsMAPK3 轉殖水稻對其它不同作用方式除草劑是否依然呈現抗性？是否較現有之抗巴拉刈轉基因作物更耐受巴拉刈之毒性？綜合而言，本試驗證明藉由 ABA 誘導 OsMAPK3 之基因轉殖方式可活化下游抗氧化酵素活性，清除因除草劑產生之氧化逆境進而提高水稻對巴拉刈的抗性。此項研究在未來有效提升作物除草劑抗性方面，提供調控水稻 MAPK 之訊息路徑改變其抗氧化能力之可能途徑。

致謝

本試驗承蒙嘉義大學農藝系侯新龍助理教授提供水稻 OsMAPK3 基因與協助，謹此誌謝。

引用文獻

Agrawal GK, SK Agrawal, J Shibato, H Iwahashi, R Rakwal (2003) Novel rice MAP kinases OsMSRMK3 and OsWJUMK1 involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation. **Biochem.**



- Biophys. Res. Commun.** 300:775-783.
- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiol.** 107:1049-1054.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analy. Biochem.** 72: 248-254.
- Cao J, XL Duan, D McElroy (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. **Plant Cell Rep.** 11:586-591.
- Capone R, BS Tiwari, A Levine (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in Arabidopsis. **Plant Physiol. Biochem.** 42:425-8.
- Chao YY, LF Liu, MC Chang (2007) Suppression of OsMAPK3 gene confers to decrease salt and drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Taiwanese J. Agric. Chem. Food Sci.** 45 (3): 133-145.
- Chia LS, JE Thompson, EB Dumbroff (1981) Simulation of the effects of leaf senescence on membranes by treatment with paraquat. **Plant Physiol.** 67:415-420.
- Desikan R, SAH Mackerness, JT Hancock, SJ Neill (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiol.** 127:159-172.
- Foster JG, JL Hess. (1980) Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. **Plant Physiol.** 66:482-487.
- Fu S-F, W-C Chou, D-D Huang, H-J Huang (2002) Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, *OsMAPK4*, in response to environmental stresses. **Plant Cell Physiol.** 43:958-963.
- Grant JJ, B-W Yun, GJ Loake (2000) Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. **Plant J.** 24:569-582.
- Guidi L, C Nali, S Cimopi, G Lorenzini, GF Soldatini (1997) The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars. **J. Exp. Bot.** 48:173-179.
- Gustin MC, J Albertyn, M Alexander, K Davenport (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 1264-1300.
- Harrison LA, MR Bailey, MW Naylor, JE Ream, BG Hammond, DL Nida, BL Burnette, TE Nickson, TA Mitsky, ML Taylor, RL Fuchs, SR Padgett (1996) The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. **J. Nutr.** 126: 728- 740.
- Ichimura K, K Shinozaki, G Tena, J Sheen, Y Henry, A Champion, M Kreis, S Zhang, H Hirt, C Wilson, E Heberle-Bors, BE Ellis, PC Morris, RW Innes, JR Ecker, D Scheel, DF Klessig, Y Machida, J Mundy, Y Ohashi, JC Walker (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. **Trends Plant Sci.** 7:301-308.
- Jana S, MA Choudhuri (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. **Aquat. Bot.** 12: 345-354.
- Jiang M, J Zhang (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.
- Kato M, S Shimizu. (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic-dependent peroxidative degradation. **Can. J. Bot.** 65:729-735.
- Kawahigashi H, S Hirose, H Inui, H Ohkawa, Y Ohkawa (2005) Enhanced herbicide cross-tolerance in transgenic rice plants co-expressing human CYP1A1 CYP2B6 and CYP2C19. **Plant Sci.** 168:773-781.



- Kovtun Y, WL Chiu, G Tena, J Sheen (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 2940-5.
- Mittler R, S Vanderauwera, M Gollery, F Van Breusegem (2004) Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.** 9:490-498.
- Miyoshi K, E Nakata, Y Nagato, T Hattori (1999) Differential in situ expression of three ABA-regulated genes of rice, *RAB16A*, *REG2* and *OSBZ8*, during seed development. **Plant Cell Physiol.** 40:443-447.
- Mizoguchi T, K Ichimura, K Shinozaki (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. **Trends Biotechnol.** 15:15-19.
- Nakagami H, S Kiegerl, H Hirt (2004) OMTK1, a Novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. **J. Biol. Chem.** 279: 26959-26966
- Nakano Y, K Asada. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22:867-880.
- Neill S, R Desikan, J Hancock (2002) Hydrogen peroxide signalling. **Curr. Opin. Plant Biol.** 5:388-395.
- Rentel MC, D Lecourieux, F Ouaked, SL Usher, L Petersen, H Okamoto, H Knight, SC Peck, CS Grierson, H Hirt, MR Knight (2004) OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. **Nature** 427:858-861.
- Reyna NS, Y Yang (2006) Molecular analysis of the rice MAP kinase gene family in relation to *Magnaporthe grisea* infection. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19:530-540.
- Shinozaki K, K Yamaguchi-Shinozaki, M Seki (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6:410-417.
- Subramanian MV, H-Y Hung, JM Dias, VW Miner, JH Butler, JJ Jachetta (1990) Properties of mutant acetolactate synthases resistant to triazolopyrimidine sulfonanilide. **Plant Physiol.** 94:239-244.
- Thordal-Christensen H, Z Zhang, Y Wei, DB Collinge (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant J.** 11:1187-1194.
- Yoshida K, E Igarashi, M Mukai, K Hirata, K Miyamoto (2003) Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. **Plant Cell Environ.** 26:451-457.
- Yuasa T, K Ichimura, T Mizoguchi, K Shinozaki (2001) Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. **Plant Cell Physiol.** 42:1012-6.
- Zhang A, M Jiang, J Zhang, M Tan, X Hu (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.