

## 葡萄病程相关蛋白1基因的克隆和表达分析

侯丽霞, 高超, 车永梅, 赵方贵, 刘新\*

青岛农业大学生命科学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛 266109

**摘要:** 以葡萄品种‘左优红’组培苗叶片为材料, 利用同源克隆法获得其病程相关蛋白1基因 *VvPR1* 的cDNA全长序列。扩增片段大小为486 bp, 编码161个氨基酸, 分子量17.5 kDa, 等电点PI=8.69, 含有6个保守半胱氨酸, 4个allergen V5/Tpx-1 related保守结构域。VvPR1与多种植物PR1高度同源。实时定量PCR检测结果表明 *VvPR1* 在葡萄叶片中相对表达量最高; 霜霉病菌、低温、盐和干旱胁迫均可显著诱导其表达; 水杨酸、脱落酸、茉莉酸、一氧化氮、过氧化氢和硫化氢等亦可诱导其大量表达, 据此推测, VvPR1参与了多种生物胁迫和非生物胁迫过程。

**关键词:** 葡萄; 病程相关蛋白1; 基因克隆; 表达分析

## Gene Cloning and Expression Analysis of Pathogenesis-Related Protein 1 in *Vitis vinifera* L.

HOU Li-Xia, GAO Chao, CHE Yong-Mei, ZHAO Fang-Gui, LIU Xin\*

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109, China

**Abstract:** Using homology cloning method, the full-length cDNA of pathogenesis-related protein 1 (PR1) named *VvPR-1* was cloned from leaves of *Vitis vinifera* cultivar ‘Zuoyouhong’ tissue culture seedling. Bioinformatic analysis indicated that VvPR-1 consisted of 486 nucleotides encoding 161 amino acid with molecular weight 17.5 kDa, isoelectric point 8.69, VvPR-1 possessed six conserved cysteine and four conserved allergen V5/Tpx-1 related domain. The VvPR-1 was highly homologous to PR1 in other plants. Real-time PCR analysis showed that expression level of *VvPR-1* was the highest in leaves, *VvPR1* was significantly induced by *Plasmopara viticola* inoculation, salt stress and osmotic stress, signaling molecules such as salicylic acid (SA), jasmonate (JA), abscisic acid (ABA) as well as nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) also had inductive effects on *VvPR-1* expression. It suggested that VvPR1 was concerned with various biotic stresses and abiotic stresses.

**Key words:** *Vitis vinifera*; pathogenesis-related protein 1; gene clone; expression analysis

葡萄是世界范围内被广泛种植的果树, 具有较高经济价值。但葡萄生长发育过程中易受到霜霉病、低温、干旱等生物和非生物因素的危害, 逆境条件严重影响葡萄的产量和质量, 研究葡萄对生物胁迫和非生物胁迫的防御和抗性对于葡萄产业的发展具有重要现实意义。

病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)是植物在受到病原菌感染后积累的一类蛋白质, 研究表明, 许多生物与非生物胁迫均可诱导PRs积累(Hamamouch等2011)。植物PRs可分为17个家族(Van Loon等2006), 其中PR-1家族含量最丰富, 高度保守, 参与植物对多种生物和非生物逆境的响应(牛吉山等2007; Xie等2011; Sarowar等2005), 是植物系统获得性抗性的标志基因。目前, 只有

少数植物的PR1被系统研究, 脱落酸(abscisic acid, ABA)、水杨酸(salicylic acid, SA)和茉莉酸(jasmonate, JA)等植物激素对PR1表达调控的研究多集中于模式植物烟草和拟南芥(Nandi等2003; Flors等2008)上, 且PR1的作用机制尚不明确。目前葡萄基因组测序工作已经完成, 葡萄抗逆分子机制的研究取得许多重要成果, 一些抗逆相关基因如 *VvNPRI.1*、*VrCBF1*、*VrCBF4*和转录因子 *MDR1*、*MDR2*、*bHLH*等被克隆, 并进行了功能分析研究

收稿 2011-07-27 修定 2011-10-14

资助 农业部‘948’项目(2006-G26)和青岛市自然科学基金(10-3-4-5-5-jch)。

\* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-8030224)。

(Le Henanff等2009; Siddiqua和Nassuth 2011; Matus等2010)。最近, Li等利用14个不同葡萄品种, 克隆了*VvPR1b1*, 并比较了功能, 结果表明把品种‘BN5-4’中*VvPR1b1*转入烟草后, 可以增强烟草对野火病菌的抵御能力(Li等2011)。但未见对葡萄*PR1*表达特性研究的报道, 亦不清楚葡萄*PR1*与低温等其他因子之间的关系。因此, 本文拟以对低温和霜霉病抗性较强的葡萄品种‘左优红’为材料, 克隆*VvPR1*, 分析*VvPR1*序列特征, 研究霜霉病菌和低温等生物与非生物逆境及ABA、SA、JA、一氧化氮(nitric oxide, NO)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)等逆境相关信号分子对其表达的影响, 以期为进一步研究*PR1*在葡萄抵御逆境胁迫中的作用及机制提供理论依据。

## 材料与方 法

以葡萄(*Vitis vinifera* L.)抗霜霉病品种‘左优红’试管苗带芽新梢为外植体, 用75%乙醇浸泡15 s, 再用0.1% HgCl<sub>2</sub>浸泡8 min, 经无菌水冲洗3~5次。接种于1/2MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> IAA培养基上, 于光照培养箱中[(25±1 °C, 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>]培养。无菌条件下将生根试管苗的顶芽切下, 接种于培养基1/2MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> IAA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> IBA上诱导生根, 30~50 d后使用。

采用同源克隆法, 以拟南芥病程相关蛋白1基因*AtPR1* (GenBank登录号AY064023、AT2G14610.1) CDS进行WU-BLAST序列比对, 检索到葡萄中*PR1*基因同源序列, DNASTAR软件分析其开放阅读框(open reading frame, ORF), 并以之为模板设计特异性引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。*VvPR1-F*: 5' GCTCTAGAATGGGGTTGTTTAAGATTTC-ACTAG 3'; *VvPR1-R*: 5'GGGGTACCTCAATAA-GGACGCTGTCCG 3'。CTAB法提取葡萄基因组总RNA, 大连宝生物公司RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1 试剂盒反转录PCR。PCR条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存。北京博迈德试剂盒回收目的片段, 与pMD18-T载体连接, 阳性克隆交由上海英潍捷基生物技术有限公司测序。

借助DNASTAR软件分析基因序列并推导其编

码的氨基酸序列, 蛋白分析专家(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)网站分析编码蛋白的氨基酸数量、分子量、PI及稳定性, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>分析其信号肽序列, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>网站分析保守结构域。MEGA 4.0软件(Tamura等2007)的NJ算法构建系统发育树, Bootstrap值取1000。

从田间感病葡萄品种‘霞多丽’上采集感染霜霉病的叶片, 清水冲去旧孢子囊, 将叶片置于20 °C、相对湿度90%条件下培养24 h, 待新孢子囊长出后, 毛刷刷下孢子囊, 无菌水配成每mL含8×10<sup>4</sup>孢子囊霜霉病菌孢子悬液。接种前用载玻片萌芽法测定孢子囊活力, 萌芽率85%以上为有效。用于葡萄霜霉病对*VvPR1*表达影响的研究。

CTAB法提取葡萄组培苗的根、茎、叶3种组织的总RNA, 用于检测*VvPR1*的组织表达特异性分析。分别用霜霉病菌孢子悬液、150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、200 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇、250 mg·L<sup>-1</sup> SA、10 μmol·L<sup>-1</sup> JA、150 mg·L<sup>-1</sup> ABA、0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、1 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>S供体NaHS、0.1 mmol·L<sup>-1</sup> NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理葡萄组培苗叶片0、12、24、48、72、96 h后, 提取总RNA, 用于各种胁迫下的*VvPR1*的相对表达量分析。

上述提取的RNA为材料, 利用M-MLV反转录试剂盒合成cDNA第一条链作为模板。以*ACTIN*为内参对基因进行相对定量, Real-time PCR引物:*VvPR1- Realtime-F*: 5' CTGGTTGGCATAGTTCTG 3', *VvPR1- Realtime-R*: 5' GCTTAGCCTTGGT-TCACA 3'。*ACTIN-F*: 5' AATGAGAGATGGCTG-GAAGAG 3', *ACTIN-R*: 5' TACGAGCAAGAGCT-GGAAA 3'。Real-time PCR程序为: 95 °C 60 s; 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 15 s, 40个循环; Melt 曲线从72 °C至99 °C, 第1步维持45 s, 以后每升高1 °C维持5 s。每个样品进行3次重复。*VvPR1*相对表达量以实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数, 按2<sup>-ΔΔCT</sup>方法计算(Livak和Schmittgen 2001)。

## 实验结果

### 1 *VvPR1*的克隆及序列分析

#### 1.1 *VvPR1*的克隆

以拟南芥病程相关蛋白1基因*AtPR1* (AT2G-

14610.1) CDS进行WU-BLAST序列比对,检索到葡萄品种‘黑诺比’中PR1基因同源序列(XM\_0022-73380)。利用葡萄品种‘左优红’为材料,根据网站公布序列设计引物,并引入XbaI和KpnI酶切位点,PCR扩增VvPR1 CDS。琼脂糖凝胶电泳检测结果(图1-A)所示,500 bp左右处均有1条清晰的条带,片段大小与预测一致。把得到的片段构建到pMD18-T simple载体上,提取质粒,XbaI/KpnI双酶切鉴定,结果正确(图1-B),阳性克隆提交测序。

## 1.2 VvPR1蛋白序列分析

DNAMAN软件测序结果表明,扩增片段大小为486 bp,编码161个氨基酸。BLAST序列结果表明,与网站公布的葡萄‘黑诺比’推测的病程相关蛋白1(XP\_002265050)氨基酸序列相比,一致性96%,相似性99%,证明本实验克隆的VvPR1属于葡萄病程相关蛋白1基因家族成员。蛋白质专家分析其分子量17.5 kDa,等电点PI=8.69,不稳定系数30.72。VvPR1的第1-25个氨基酸是信号肽序列,

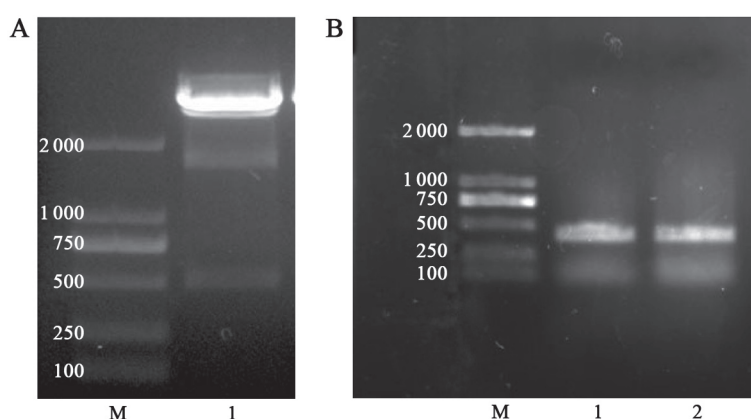


图1 VvPR1 CDS的PCR扩增和酶切鉴定

Fig.1 PCR amplification and enzyme digestion analysis of VvPR1

A: PCR扩增; B: 酶切鉴定。M: DL 2000 DNA Marker; 1和2: 样品。

切割位点在25到26个氨基酸之间,具有6个保守的半胱氨酸结构基序,含有4个allergen V5/Tpx-1 related保守结构域(图2)。

将VvPR1与NCBI检索的PR1同源蛋白(共12个植物物种)进行蛋白序列比对并构建系统发育树,结果(图3)显示葡萄的VvPR1与多种植物中病程相关蛋白1具有同源性,其中VvPR1与马铃薯(*Solanum tuberosum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)等茄科的病程相关蛋白1聚为一类,油菜(*Brassica napus*),拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和山葵(*Eutrema wasabi*)聚为一类,蓖麻(*Ricinus communis*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、大豆(*Glycine max*)聚为一类,以上物种均属于双子叶植物,而与水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)这两种单子叶植物亲缘关系相对较远。

## 2 VvPR1表达特性分析

### 2.1 VvPR1组织表达特性分析

由图4看出,葡萄品种‘左优红’根、茎和叶中

VvPR1相对表达量存在显著差异,其中茎中VvPR1相对表达量最小,其次是根部,叶片中VvPR1的相对表达量最大。

### 2.2 霜霉菌、盐、干旱和低温胁迫对葡萄叶片VvPR1相对表达量的影响

图5表明,正常条件下(H<sub>2</sub>O处理)葡萄叶片VvPR1的表达水平较低,甘露醇、NaCl、4 °C和葡萄霜霉菌处理后,VvPR1表达量均呈先升高后下降趋势,但出现峰值的时间上存在差异。NaCl和4 °C低温可诱导VvPR1迅速表达,处理12 h时VvPR1相对表达量达最大值( $P<0.05$ );接种霜霉菌后VvPR1表达量于24 h达最高值( $P<0.05$ );甘露醇诱导VvPR1表达反应较慢,在处理48 h时相对表达量达最大值( $P<0.05$ ),96 h降至本底水平,表明霜霉菌、低温、盐和干旱胁迫诱导VvPR1表达的机制可能存在差异。

由图6得知,JA、ABA和SA均可诱导葡萄叶片VvPR1相对表达量显著增加( $P<0.05$ ),ABA和SA

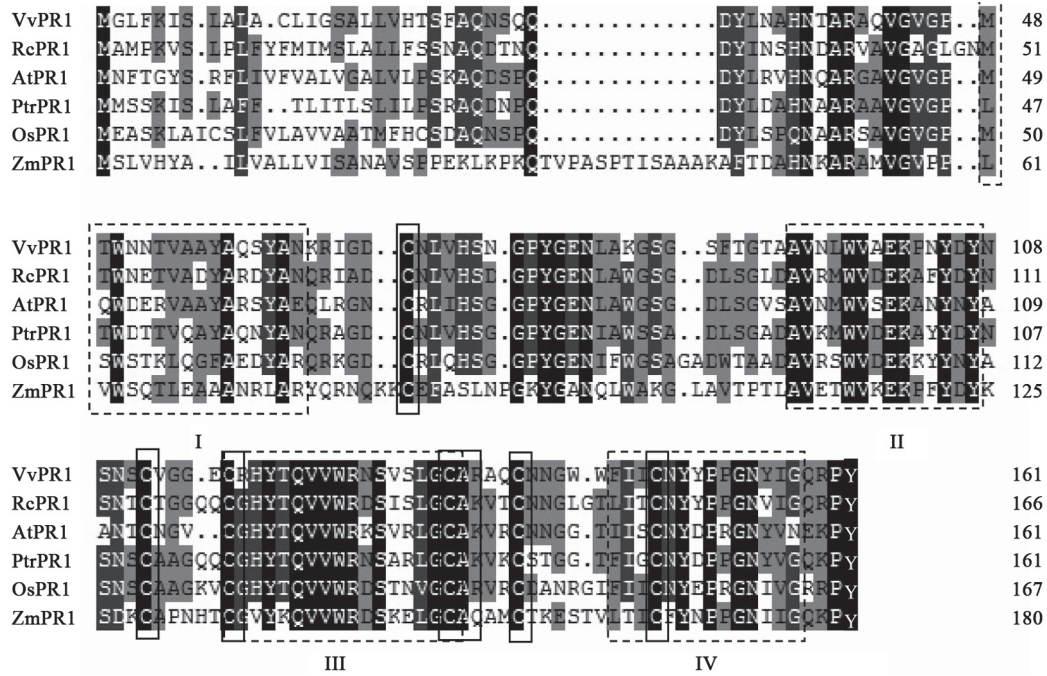


图2 VvPR1与其他物种PR1序列同源性分析

Fig.2 Alignment of the predicted amino acid sequences of VvPR1 and other PR1s

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtPR1 (GenBank登录号AEC06314); 蓖麻(*Ricinus communis*): RcPR1 (GenBank登录号EEF40266); 毛果杨(*Populus trichocarpa*): PtrPR1 (GenBank登录号EEE75470); 水稻(*Oryza sativa*): OsPR1 (GenBank登录号BAB84473); 玉米(*Zea mays*): ZmPR1 (GenBank登录号ACG25182)。实线框表示保守的6个半胱氨酸, 虚线框I、II、III、IV表示4个allergen V5/Tpx-1 related保守结构域。

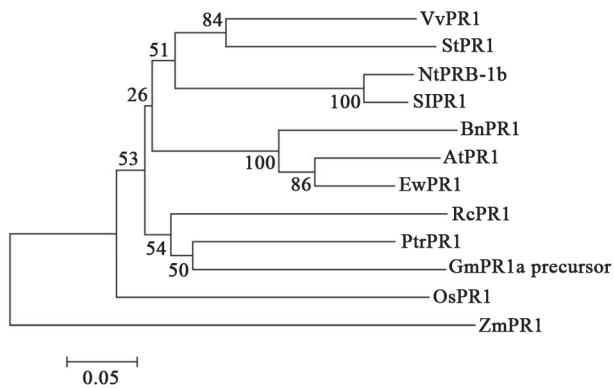
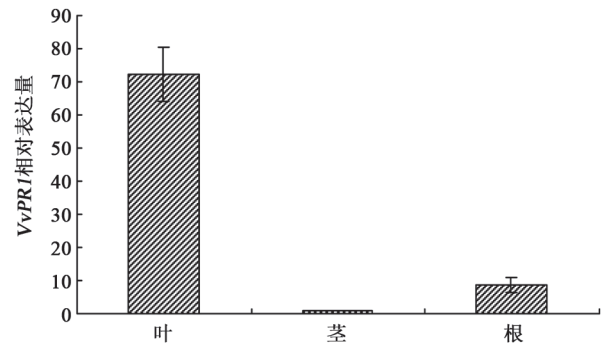


图3 植物PR1蛋白同源序列的系统发育树  
Fig.3 Phylogenetic tree of PR1 homologous sequences from plants

拟南芥: AtPR1 (AEC06314); 油菜: BnPR1 (AAB06458); 山葵: EwPR1 (BAF03626); 大豆: GmPR1a precursor (AAD33696); 烟草: NtPRB-1b (CAA47374); 水稻: OsPR1 (BAB84473); 毛果杨: PtrPR1 (EEE75470); 蓖麻: RcPR1 (EEF40266); 番茄: SIPR1 (ACB88202); 马铃薯: StPR1 (CAB58263); 玉米: ZmPR1 (ACG25182)。

处理后48 h 时 *VvPR1* 相对表达量达到最高值, 之后逐渐降低; JA处理后 *VvPR1* 的相对表达量于72 h

图4 *VvPR1*组织表达特性Fig.4 Characterization of *VvPR1* expression in tissues

时达到最高值, 后逐渐降低, 于96 h基本达到最初相对表达量。

### 2.3 外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO和H<sub>2</sub>S对葡萄叶片*VvPR1*相对表达量的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO和H<sub>2</sub>S是植物响应逆境胁迫的重要信号分子, 图7显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO供体SNP及H<sub>2</sub>S供体NaHS都能诱导*VvPR1*的显著表达, *VvPR1*对NaHS反应迅速, 表达量于处理12 h时达最大值( $P < 0.05$ ),

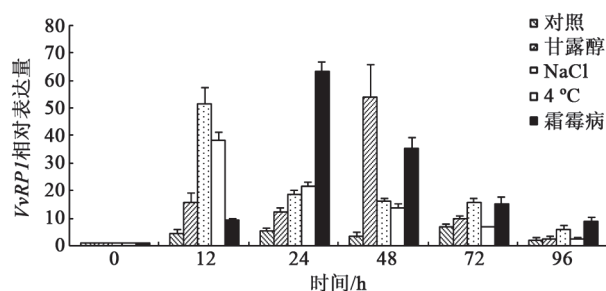


图5 甘露醇、NaCl、低温和霜霉病菌对葡萄叶片 *VvPRI* 表达的影响

Fig.5 Effects of mannitol, NaCl, low temperature and *Plasmopara viticola* on expression of *VvPRI* in leaves of *V. Vinifera*

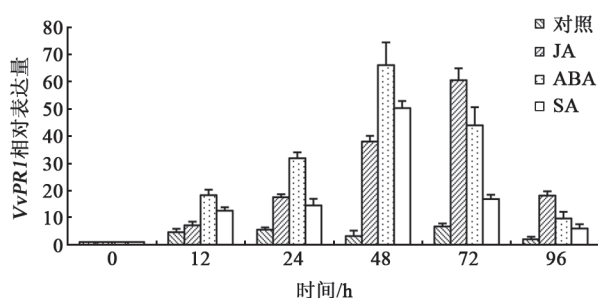


图6 JA、ABA和SA对葡萄叶片 *VvPRI* 表达的影响

Fig.6 Effects of JA, ABA and SA on expression of *VvPRI* in leaves of *V. Vinifera*

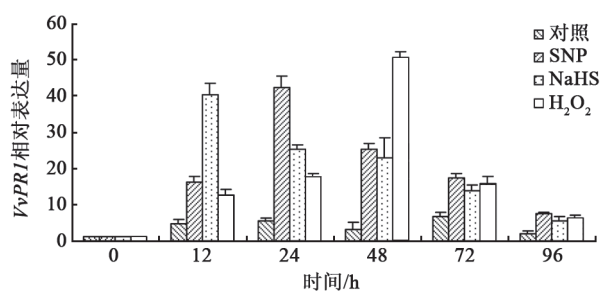


图7 SNP、NaHS和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对葡萄叶片 *VvPRI* 表达的影响

Fig.7 Effects of SNP, NaHS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on expression of *VvPRI* in leaves of *V. Vinifera*

SNP和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后 *VvPRI* 表达量分别于24 h和48 h达最高水平 ( $P < 0.05$ ), 后逐渐降低。

## 讨 论

*PRs* 基因家族中的 *PR1* 基因通常被认为是系统获得性抗性的标记基因, 其中葡萄 *PR1* 是一个包括大约21个成员的基因家族(Li等2011), 本实验以

葡萄品种‘左优红’为材料, 克隆得到 *VvPRI* cDNA 序列, BLAST 比对表明, 与葡萄品种黑比诺公布序列 XP\_002265050 最为接近, 相似性达到99%。软件分析表明, *VvPRI* 具有信号肽, 6个半胱氨酸保守区等 *PR1* 的典型序列特征。进一步分析其表达特性, *VvPRI* 在葡萄叶片表达量最高, 推测其在葡萄叶片的生长发育或防御反应中发挥重要作用。

霜霉病、干旱和低温是限制葡萄生产的重要因素, 本文研究表明 *VvPRI* 可响应多种胁迫, 霜霉病菌、低温、干旱及盐均可上调其表达, 但 *VvPRI* 表达对 NaCl 和 4 °C 低温反应迅速, 而对甘露醇反应较慢, 推测与不同胁迫因素诱导 *VvPRI* 表达的信号转换过程存在差异有关。SA、JA 和 ABA 是重要的逆境适应激素, 均可诱导拟南芥等植物 *PR1* 表达 (Nandi等2003; Le Henanff等2009; Sabater-Jara等2010)。并且三者之间存在信号网络交叉, 例如在植物抵御病原菌浸染过程中, ABA 作为一种信号可以影响 JA 的生物合成并且激活拟南芥的抗性 (Adie等2007)。本文研究表明 SA、JA 和 ABA 对 *VvPRI* 表达也有诱导作用, 且 *PR1* 对 ABA 的响应最早, 其次是 SA, 推测可能 ABA 作为上游的信号分子诱导下游 SA 和 JA 的产生, 最终引起 *PR1* 表达量变化。H<sub>2</sub>S、NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是近期发现的应答逆境信号分子, 它们参与植物对许多逆境的适应过程, 而且之间存在相互作用 (Neill等2008; Sang等2008; Zhang等2009; Zhang等2010)。Leon等(1995)研究发现, 在烟草的系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 过程中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 SA 的上游起作用, 用高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (>300 mmol·L<sup>-1</sup>) 处理烟草后, 产生了计量依赖的 SA 积累和 *PR1* 基因表达。但目前尚未见 NO 和 H<sub>2</sub>S 对植物 *PR1* 表达影响的研究报道。本实验证明外源 H<sub>2</sub>S、NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均可显著诱导 *VvPRI* 表达, 并且 *VvPRI* 对 NaHS 反应最快, 其次是 NO 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 推测这三种信号间可能存在上下游关系。*VvPRI* 可被霜霉病菌等多种胁迫以及 SA 等多种激素和 NO 等信号物质诱导, 那么这些过程是否存在联系和相互作用? 曲凌慧(2010)等研究表明, 低温条件下贝达和赤霞珠葡萄叶片中均出现 ABA 和 JA 的猝发; 林志强等(2010)研究表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO、JA 和 ABA 均参与了葡萄对霜霉病菌的防御反应。葡萄是否通过 ABA、JA 或 SA 等信号分子诱导 *VvPRI*

表达,以增强对各种胁迫的适应性?各种信号分子诱导*VvPR1*表达早晚存在差异,是否说明不同信号分子存在于信号传递链中位置不同?另外,在拟南芥中SA能够通过NPR1依赖和NPR1不依赖两条途径诱导*PRs*基因表达(Nandi等2003);Le Henanff等(2009)发现*VvNPR1.1*在葡萄中过表达可诱导霜霉病菌侵染后PR1含量显著增加,葡萄受霜霉病菌侵染时,是否存在SA $\rightarrow$ ? $\rightarrow$ NPR1 $\rightarrow$ ? $\rightarrow$ PR1信号转导链?这些问题的进一步研究解决将有助于葡萄抗病抗逆机理的阐明。

### 参考文献

- 林志强,李希东,侯丽霞,张英昊,刘新(2010).葡萄感染霜霉病后几种信号物质的变化.植物保护,36(2):50~55
- 牛吉山,刘瑞,郑磊(2007).小麦*PR-1*、*PR-2*、*PR-5*基因的白粉菌和水杨酸诱导表达分析及白粉病抗性研究.麦类作物学报,27(6):1132~1137
- 曲凌慧,车永梅,侯丽霞,刘新,卢江(2010).ABA和JA等激素参与葡萄对低温胁迫的应答.青岛农业大学学报,27(1):117~121
- Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, Godoy M, Sánchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. Plant Cell, 19: 1665~1681
- Flors V, Ton J, van Doorn R, Jakab G, García-Agustín P, Mauch-Mani B (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. Plant J, 54(1): 81~92
- Hamamouch N, Li C, Seo PJ, Park CM, Davis EL (2011). Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. Mol Plant Pathol, 12(4): 355~364
- Le Henanff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. BMC Plant Biol, 9: 54~64
- Leon J, Lawton MA, Raskin I (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. Plant Physiol, 108: 1673~1678
- Li ZT, Dhekney SA, Gray DJ (2011). *PR-1* gene family of grapevine: a uniquely duplicated *PR-1* gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. Plant Cell Rep, 30(1): 1~11
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  method. Methods, 25: 402~408
- Matus JT, Poupin MJ, Cañón P, Bordeu E, Alcalde JA, Arce-Johnson P (2010). Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Plant Mol Biol, 72(6): 607~620
- Nandi A, Kachroo P, Fukushige H, Hildebrand DF, Klessig DF, Shah J (2003). Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the *Arabidopsis ssi1* mutant. Mol Plant Microbe Interact, 16(7): 588~599
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. J Exp Bot, 59(2): 165~176
- Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Ferrer MA, Barceló AR, Pedreño MA (2010). Induction of sesquiterpenes, phytoestrogens and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annum*. J Plant Physiol, 167(15): 1273~1281
- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M (2008). Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. J Integr Plant Biol, 50(2): 231~243
- Sarowar S, Kim YJ, Kim EN, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JS (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. Plant Cell Rep, 24(4): 216~224
- Siddiqua M, Nassuth A (2011). *Vitis* CBF1 and *Vitis* CBF4 differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression. Plant Cell Environ, 34(8): 1345~1359
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 24: 1596~1599
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol, 44(1): 135~162
- Xie XZ, Xue YJ, Zhou JJ, Zhang B, Chang H, Takano M (2011). Phytochromes regulate SA and JA signaling pathways in rice and are required for developmentally controlled resistance to *Magnaporthe grisea*. Mol Plant, 4(4): 688~696
- Zhang H, Tan ZQ, Hu L Y, Wang SH, Luo JP, Jones RL (2010). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. J Integr Plant Biol, 52(6): 556~567
- Zhang H, Tang J, Liu XP, Wang Y, Yu W, Peng WY, Fang F, Ma DF, Wei ZJ, Hu LY (2009). Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. J Integr Plant Biol, 51: 1086~1094