

RNA 病毒诱导的烟草 WRKY 转录因子基因的应急表达

周汉琛, 席玉珍, 魏书*

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: 植物和病毒在基因水平上的互作是植物感病和抗病的分子基础。以模式植物烟草及其 3 种 RNA 病毒 (马铃薯 Y 型病毒, *Potato virus Y*, PVY; 烟草花叶病毒, *Tobacco mosaic virus*, TMV; 黄瓜花叶病, *Cucumber mosaic virus*, CMV) 为试材, 旨在研究受病毒共同诱导、并可能在植物抗病反应中具有重要功能的转录因子基因。试验首先获得 10 个受病毒诱导的烟草同源基因。在比较了 3 种病毒感染、低温和盐害胁迫以及逆境信号物质(茉莉酸甲酯与水杨酸)处理对上述基因表达的影响后发现, 3 种 RNA 病毒所诱导的植物基因有所不同。但属于 WRKY 基因家族的 06G 基因受 3 种病毒的共同、高效诱导, 其表达水平与叶片发育程度呈负相关。研究结果表明, 该基因在植物病毒病发生及植物抗病分子育种中可能有重要意义。

关键词: RNA 病毒; 防御反应; 烟草; WRKY 转录因子

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)06-1020-07

Expression of a novel WRKY gene in response to three RNA viruses in tobacco

ZHOU Hanchen, XI Yuzhen, WEI Shu

(School of Tea and Food Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Gene between viruses and plants is the molecular basis of plant susceptibility and resistance to virus diseases. In this study, three RNA viruses (potato virus Y-PVY, tobacco mosaic virus-TMV, and cucumber mosaic virus-CMV) were used to study virus-induced transcription factor genes in *Nicotiana tabacum*. These genes may play an important role in plant defensive responses to virus infection. Based on public database and literature, ten tobacco genes homologous to the virus-induced genes previously identified in *N. benthamiana* and *Oryza sativa* were found. Quantitative analyses of the gene transcripts responding to virus infection, abiotic stresses, and stress related compounds (1 mmol·L⁻¹ of methyl jasmonic acid or salicylic acid solution) revealed that each virus had its specific expression profile of induced plant genes. Tobacco 06G gene, a member of WRKY subfamily II, was quickly and effectively induced by all three viruses. Expression of the 06G gene was higher in young leaves than in old ones. Our data suggest that this novel WRKY gene may function as a regulator in plant-virus interactions and such interactions can be utilized to enhance virus resistance in plants.

Key words: plant virus; resistance response; tobacco; WRKY transcription factor

农作物常常遭受病毒的危害, 造成重大损失。研究病毒病症的发生规律和植物抗病的遗传学机理对防治农作物病毒病害意义重大^[1]。已有的研究表明, 在病毒侵染寄主植物的过程中, 病毒和植物在分子水平上的相互作用决定了植物抗性反应的差异和病症的严重程度。许多植物基因在抵御病毒的抗性反应中具有重要功能^[2-3]。其中, 植物的 R 抗性基因 (Resistance gene) 能通过病毒蛋白的直接或间

接作用, 进而启动植物对病毒的抗性反应^[4-5]。在心叶烟中 (*Nicotiana glutinosa*), R 抗性基因可使其叶片在烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 侵染时产生环病毒的坏死斑, 从而阻止病毒在植物组织中的进一步扩散^[6]。此外, R 基因还能促使内源信号物质的产生、诱发系统获得性抗性 (Systemic acquired resistance, SAR) 反应^[7]。水杨酸 (Salicylic, SA) 是诱发 SAR 反应的信号分子之一^[8]。在拟南芥

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31070614) 和教育部博士点项目 (20123418110002) 共同资助。

作者简介: 周汉琛, 硕士研究生。E-mail: Tuesday1011@163.com

* 通信作者: 魏书, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: weishu@ahau.edu.cn

中, SA 能够促进 NPR1、TGA 等转录因子的互作, 全面激活与 SAR 有关的 PR (pathogenesis-related) 等植物基因的表达^[9-11]。在这一过程中, WRKY 转录因子具有重要作用^[12]。此外, 由信号物质 SA 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 为中心的信号传导途径相互作用, 共同调节植物的 SAR 反应^[13]。

大多数植物病毒都是以 RNA 为遗传信号载体的病毒^[14]。大量转录组水平的研究表明, 植物对于不同病毒的侵染既有病源特异性反应, 又有非特异性反应^[15-16]。研究不同病毒侵染时植物在基因水平上产生的相同反应, 将有助于探索植物广谱性抗病或感病的机理。

本研究以模式植物烟草为试材, 定量分析 10 个受病毒诱导的烟草同源基因在 3 种 RNA 病毒(即烟草花叶病毒 TMV、黄瓜花叶病毒 CMV 和马铃薯

Y 型病毒 PVY)侵染后的时空表达变化, 以研究 3 种病毒共同诱导的植物基因在植物抗病性或感病性上可能具有的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为普通烟 (*Nicotiana tabacum*) “云烟 85”。病毒材料为烟草花叶病毒 (TMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 和马铃薯 Y 病毒(PVY), 由安徽农业大学江彤副教授提供。下列分子生物学试材均从 TaKaRa 公司订购: RNA 提取试剂盒 (RNAiso Plus)、反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit With gDNA Eraser Perfect Real Time) 和实时荧光定量试剂盒 (SYBR® Premix Ex Taq™ GC Perfect Real Time)。

表 1 用于基因表达水平实时定量 PCR 分析的引物
Table 1 Primers used for gene transcript quantification in this study

基因登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length of product
AAN63619.1	Forward: TTGCCCCATTCTACTGTGAGCTG Reverse: GCCCTACAAGTTTGTCAATCTGC	162
CAA69901.1	Forward: TTGACGAGGCTAAGGAGCAATACAG Reverse: GACAAGCTCATCAAGGAATTTCTGG	181
AF329729.1	Forward: CACTCAAAAAGGCAACGACGACTAC Reverse: TACCGCCTTCACACACCTCCTG	178
AF390211.1	Forward: CGGCTTCGGAGATTTGATCATT Reverse: TTCCAAAATACAGCGGCTCCATC	158
X64399.1	Forward: AATCCCCTTTCATGCCTTCTGATC Reverse: CCTCCGAAGTATGGCTTGTCTCC	198
AJ011576.1	Forward: AACGATGATGGGATGCTTGGATG Reverse: TCCCTTGAGAATGAAATCACAGTTGG	149
AB028022.1	Forward: TGTGGTGGCAACATATGAAGGAGAG Reverse: AATGGTTGGTCTGATGAATTGAGAG	171
EU727158.1	Forward: TGGAGGTTACCCATCCCGACTTC Reverse: AGGCAATTCTGCAACCAACTCTTG	151
AF190634.1	Forward: GACGCGAGCAAGCTGCAACC Reverse: TCCCACTTCAACAGCCCAAGG	157
AB024510.1	Forward: GCCAAGGGAATCAGAACCAATG Reverse: TCTTGACTGGGCATGATGGTGC	178
EF-1a	Forward: TGAGATGCACCACGAAGCTC Reverse: CCAACATTGTCACCAGGAAGTG	103
TMV-CP	Forward: GGTTCCCTGACAGTACTTTAAGGT Reverse: TTATCGCGCTCCTTATGGCCACC	194
TMV-MP	Forward: GGGTTTCTGTCCGCTTTCTCTGGA Reverse: TGCAAGCCTGATCGACATAGGGA	174
TMV-RNase	Forward: TTTGGCCCGTTGTTTAGTGAGCT Reverse: CAGCTCCAAGACATCCATCGGCA	166
TMV-Replicase	Forward: AAGGGTTCGATGGCCAGAGGAGA Reverse: GGACCCGTGTACACAATCGAGCT	150

1.2 试验方法

1.2.1 基因的筛选及引物设计 通过文献和公开网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu> 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) 获得前人发现的烟草近缘

种本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)和水稻受多种病毒诱导共表达基因的序列。再经 BLASTX 分析, 得

到其在烟草同源基因。并利用在线程序 Primer premier 5.0, 设计烟草基因和烟草花叶病毒 TMV 基因 (NC_001367.1) 专一性引物(表 1)。所得到的 PCR 产物经测序确认其基因序列。

1.2.2 试验材料的处理 病毒接种试验: 供试烟草种子播种于营养土(泥炭: 砾石: 珍珠岩, 3:2:1)盆钵上, 发芽后在 25°C、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 光强和 12 h 光周期下培养一个半月。用磨擦接种法在成熟叶片中部分别接种 TMV、CMV 和 PVY 3 种病毒。接种后第 15 天, 剪取不同生长状态的非侵染叶片以提取 RNA。此外, 为监测病毒诱导基因表达的动态变化, 分别在 TMV 接种后的 6 h、1 d 和 3 d, 剪取侵染叶的非侵部位。并在接种后的第 5、7、9、11、13、15 和 20 天, 剪取非侵染叶片。

非生物逆境试验: 将 25°C、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 光强和 12 h 光周期下生长至六片叶的无菌烟草植株转接至含有 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 MS 培养基中(货号 HB8469, 海博公司, 青岛), 进行为期 15 d 的盐害处理。然后剪取叶样。与此类似, 将相同大小的、生长于 MS 培养基的无菌苗放置于 4°C 下进行 4 d 的低温处理, 再剪取叶样。此外, 与病毒侵染试验相同的盆栽植株, 分别用 MeJA 和 SA 溶液(均为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 喷布全株叶片的上下叶面, 5 h 后剪取叶样。

上述各处理均有至少 3 次以上的生物重复。所有剪取的叶样均立即经液氮冷冻后, 储存于 -80°C 冰箱备用。

1.2.3 RNA 提取及 cDNA 合成 上述生物和非生物逆境处理后所获得的鲜叶样品(约 0.1 g)在液氮中充分研磨, 然后用 RNAiso Plus 试剂盒按产品说明书提取叶片总 RNA。所得 RNA 样品, 用 PrimeScriptTM RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa) 反转录成 cDNA, 用于定量实验。

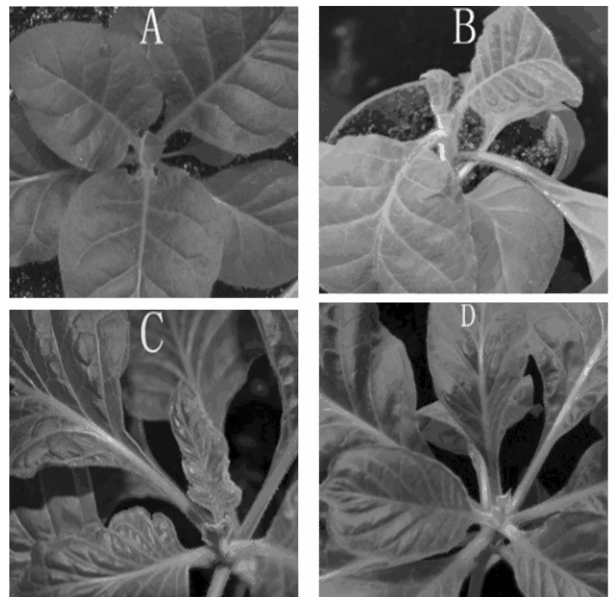
1.2.4 基因表达的定量分析 利用已经合成的 cDNA 为模板, 以烟草中 *EF-1a* (AF120093) 基因作为内参, 用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 定量检测分析各个样品中基因的表达。qRT-PCR 的反应在 Bio-Rad 仪器上进行, 反应条件如下: 95°C 预变性 3 min, 95°C 变性 10 s, 55°C 退火 30 s, 共进行 39 个循环。定量数据用 ΔCt 方法在 CFX ManagerTM software (Bio-Rad) 平台上分析所得结果。

2 结果与分析

2.1 受病毒诱导的烟草基因的生物信息学预测

通过与 Cheng 等报道的不同病毒共同诱导的本

氏烟基因比对^[15], 作者在普通烟中找到了 5 个同源基因: *AAN*、*CAA*、*AF3902*、*AF3297* 和 *X64* (表 2)。另外, 在 Satoh 等^[16]发现的、受多个不同病毒共同诱导的 5 个水稻基因 *LOC-Os02g50330*、*LOC-Os02g08440*、*LOC-Os06g44010*、*LOC-Os01g73770* 和 *LOC-Os04g12720* 在烟草中的同源基因分别为 *AJ011576.1 (02G)*、*AB028022.1 (WIZZ)*、*AB024510.1 (06G)*、*EU727158.1 (01G)* 和 *AF190634.1 (04G)* (表 2)。其中, *WIZZ* 是与机械创伤相关的转录因子。*01G* 属于 DREB/CBF 家族的转录因子。*ANN*、*04G*、*CAA* 和 *AF3297* 分别编码硫氧还蛋白、葡萄糖基转移酶、多肽和钙调蛋白, 而 *AF3902* 和 *X64* 是生长素调节的相关基因。我们克隆了 *06G* 的 cDNA, 测序结果显示该基因和已登录的 *AB024510.1* 序列相同, 但基因功能未知。蛋白质序列分析结果表明, 该基因是转录因子 *WRKY* 家族 II 的成员。



A: 未接种病毒的健康株; B: 接种 PVY 烟草; C: 接种 TMV 烟草; D: 接种 CMV 烟草。

A: Non-inoculated healthy tobacco; B: PVY infected tobacco; C: TMV infected tobacco; D: CMV infected tobacco

图 1 病毒接种 15 d 后的烟草症状

Figure 1 Leaf symptom of tobacco after virus infection for 15 days

2.2 病毒侵染对烟草基因表达的影响

烟草在接种 PVY、TMV 和 CMV 3 种病毒后都产生了各自典型的症状(图 1)。从表型上看, PVY 和 TMV 接种后, 烟草叶片的变色和畸形程度较重。进一步的研究表明, 病毒侵染对烟草基因的表达有明显的影响。染病株基因的表达变化不仅与叶片的发育程度有关, 而且与病毒种类相关。PVY 的侵染

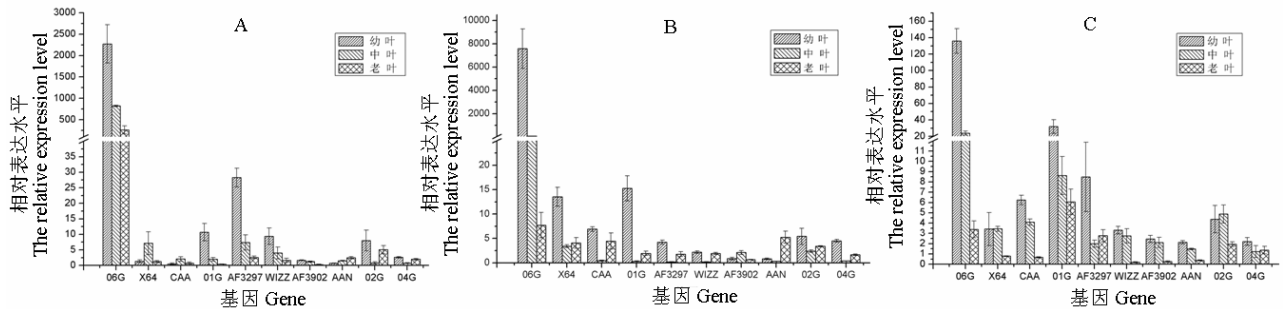
导致供试 10 个基因的表达水平有不同程度的升高, 表达水平升高 5 倍以上的基因依次为 06G、AF3297、01G、WIZZ、02G 和 X64。其中, 06G 基因表达水平升高最为显著, 达到 2000 余倍 (图 2 A)。除 X64 和 02G 外, 其他基因的表达水平与叶片发育程度呈负相关, 即幼叶表达水平高, 老叶表达水平低。TMV 的侵染导致表达水平升高 5 倍以上的基因依次是 06G、01G、X64、CAA、02G 和 ANN。06G 的表达水

平的高低与叶片发育程度也呈现负相关。此外, 上述 6 个基因中除 ANN 外, 其余基因的表达也以幼叶最高 (图 2 B)。CMV 的侵染导致表达水平升高 5 倍以上的基因依次是 06G、01G、AF3297、CAA 和 02G, 除了 02G 外, 其余各基因的表达均以幼叶最高 (图 2 C)。3 种病毒共同显著诱导的植物基因依次是 06G、01G 和 02G。他们分别编码未知功能蛋白、DREB4 以及 RNA-directed RNA polymerase。

表 2 生物信息法预测的可能受病毒诱导的烟草基因

Table 2 Genes putatively virus-induced in tobacco predicted by bioinformatics approaches

登录号 Accession number	简称 Abbreviation	基因功能 Gene function
AAN63619.1	AAN	<i>Nicotiana tabacum</i> thioredoxin h-like protein
CAA69901.1	CAA	<i>Nicotiana tabacum</i> membrane polypeptide plasma
AF329729.1	AF3297	<i>Nicotiana tabacum</i> regulator of gene silencing mRNA
AF390211.1	AF3902	<i>Nicotiana tabacum</i> AER mRNA
X64399.1	X64	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA C-7
AJ011576.1	02G	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for RNA-directed RNA polymerase
AB028022.1	WIZZ	<i>Nicotiana tabacum</i> wizz mRNA
AB024510.1	06G	<i>Nicotiana tabacum</i> (common tobacco) gene
EU727158.1	01G	<i>Nicotiana tabacum</i> DREB4 mRNA
AF190634.1	04G	<i>Nicotiana tabacum</i> UDP-glucose: salicylic acid glucosyl transferase

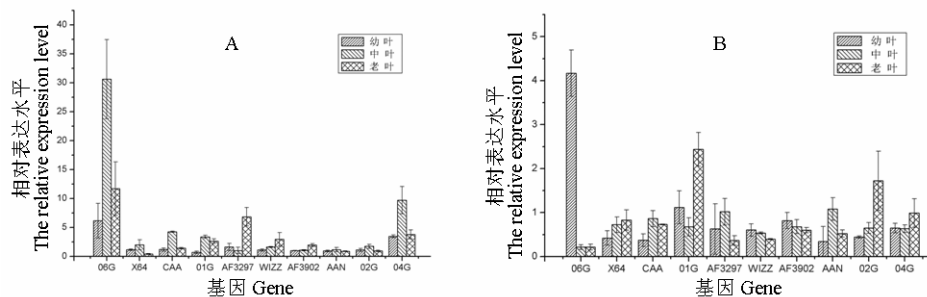


A: PVY 诱导的基因表达; B: TMV 诱导的基因表达; C: CMV 诱导的基因表达

A: PVY-induced gene expression; B: TMV-induced gene expression; C: CMV-induced gene expression;

图 2 接种 3 种病毒后烟草不同发育阶段基因表达变化

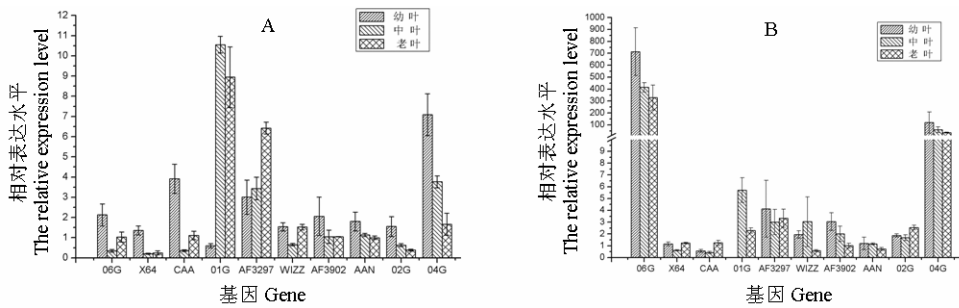
Figure 2 Changes in transcript levels of putatively virus-induced genes in tobacco leaves after virus infection



A: 低温处理; B: 高盐处理 A: At 4 °C; B: 150 mmol·L⁻¹ NaCl

图 3 低温、高盐处理后烟草不同发育阶段基因表达变化

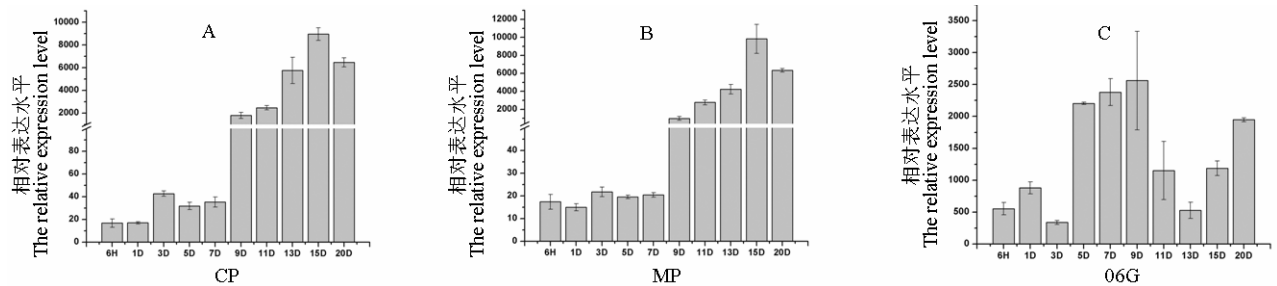
Figure 3 The change of gene expression in leaves at different development stages under salt and cold stresses



A: MeJA 处理; B: SA 处理 A: Treated by MeJA; B: Treated by SA

图 4 MeJA 和 SA 处理后烟草不同发育阶段叶片中基因表达变化

Figure 4 Gene expression levels in the leaves at different development stages treated with MeJA or SA



A: 外壳蛋白; B: 运动蛋白; C: 06G 基因

A: for coat protein; B: for movement protein; C: for 06G

图 5 不同时间段 TMV 病毒基因和 06G 表达变化

Figure 5 Dynamic changes in transcript level of 06G in the plant and genes for coat and movement proteins in TMV

2.3 低温和高盐处理后烟草基因的表达

为进一步研究病毒诱导的基因是否受非生物胁迫的诱导, 本研究分析了 4℃低温和盐害胁迫下上述基因的表达变化。结果显示, 除了 06G 基因外, 其他基因在逆境和不同发育程度叶片中的表达较为稳定(图 3A 和 3B)。4℃低温逆境下, 中度发育的叶片中的 06G 基因表达升高约 30 倍, 表明 06G 基因对低温有响应。此外, AF3297 和 04G 的表达有少许升高。盐胁迫下, 06G 的表达仅在幼叶中有少许高, 在发育状态稍高的叶片中却有所降低。上述结果表明, 供试基因对非生物逆境的响应较微弱, 且与叶片的发育水平没有明显稳定一致的相关性。

2.4 MeJA 和 SA 处理后烟草基因的表达

为进一步确认上述烟草基因主要受病毒的诱导, 本研究比较了 MeJA 和 SA 处理后相关基因表达的异同。结果显示 01G、04G 和 AF3297 对 MeJA 有响应(图 4A), 但 06G 的响应微弱。SA 处理显著提高 06G、04G 和 01G 的表达水平。其中 06G 和 04G 的表达水平分别升高了 700 倍和 100 余倍(图 4B)。此外, 基因表达水平与叶片发育程度大体也呈现负相关。这与病毒诱导的基因表达相一致。

2.5 病毒侵染后 06G 基因表达的动态变化

以上结果显示, 06G 基因对病毒侵染和病害信

号物质 SA 处理有一致的反应, 说明该基因对烟草病毒病症的发生和防御反应可能有重要作用。为此, 我们进一步研究了病毒侵染后的一段时间内该基因乃至病毒基因表达(如 TMV 外壳蛋白基因等)的动态变化。结果发现, 病毒接种 6 h 后, 就可检测到 TMV 编码外壳蛋白(coat protein, CP)和运动蛋白(movement protein, MP)基因的表达。随着时间的推移, 其表达水平不断升高, 在第 9 天时陡增到千倍以上(图 5A、5B)。与作者的预期一致, 06G 的表达呈现出与病毒基因相对应的变化。其表达水平在病毒接种 6 h 后, 就达到 500 余倍, 第 9 天表达水平最高, 达到 2500 倍(图 5C)。此后虽有下降, 但仍保持在较高的表达水平。

3 讨论

本研究发现, PVY、TMV 和 CMV 3 种病毒接种烟草后, 供试 10 个烟草基因均有不同程度的升高, 表现出病毒和植物的基因水平上的互作具有专一性, 这为前述许多研究结果所肯定^[17-18]。另外, 病毒诱导的基因表达大都与叶片发育状态相关, 幼叶表达较高, 老叶表达较低。这可能因为幼叶生物合成活动更为活跃^[19-20]。特别值得注意的是, 06G 基因的表达受 3 种病毒的共同诱导, 其中以 TMV

诱导表达的水平最高, 达到 7000 倍。非生物逆境处理下, *06G* 表达水平虽有升高, 但不如病毒诱导的显著。而其他基因在非生物逆境下的表达相对稳定。在供试 10 个烟草基因中, *WIZZ* 和 *O1G* 分别是与创伤、冷害相关的转录因子, 易受到非生物逆境的影响。*ANN*、*CAA* 和 *AF3297* 分别编码硫氧还蛋白、多肽和钙调蛋白, 而 *AF3902* 和 *X64* 是生长素调节的相关基因, 它们虽然与植物基础代谢密切相关, 但可能是因为病毒侵染所产生的逆境胁迫更为强烈, 因而其表达变化在本研究的病毒处理中表现较为明显。这一结果与此前有关病毒诱导本氏烟和水稻基因表达的研究结果一致^[15-16]。*06G* 是转录因子 *WRKY* 家族 II 成员, 但具体功能未知。已经知道, *WRKY* 家族是植物中重要的转录因子, 主要参与生物逆境与非生物逆境的调控。*WRKY* 通过与靶基因结合, 调控与抗性有关的靶基因表达^[21]。在拟南芥中, *WRKY33* 的过量表达可以使拟南芥对腐生菌 (*Botrytis cinerea* 和 *Alternaria brassicicola*) 抗性增强^[22]。而在水稻中, 过量表达 *WRKY45* 可以对灰霉菌抗性加强^[23]。*06G* 基因在病毒侵染下异常升高, 说明 *06G* 基因可能在烟草的病毒反应中起着重要作用。

植物与抗性有关的内源信号分子主要有水杨酸 SA、乙烯 (Ethylene, ET) 和茉莉酸 (Jasmonic acid, JA), 它们介导的信号传导途径调控着植物对逆境的应激反应^[24-25]。这些途径既相对独立^[26], 又相互作用, 形成了植物抵抗生物和非生物胁迫的信号传导网络, 共同调节对各种逆境的反应^[27]。有研究报道, SA 信号传导途径通过激活与 SAR 有关的 *PR* (pathogenesis-related) 基因和 *WRKY* 基因表达^[9-12], 抵御活体营养型的病菌对植物的伤害。JA 和 ET 信号传导途径则是应对死体营养型的病菌病害和食草性昆虫的机械损伤的重要机制^[28]。本研究发现, SA 处理后 *06G* 基因表达水平远高于 MeJA 处理诱导的表达水平, 说明 *06G* 基因主要受 SA 信号途径的调控, 并作用于 SA 诱导的下游基因。本研究还发现, SA 葡萄糖基转移酶基因 *04G*, 在 MeJA 和 SA 两种处理下, 表达水平都有明显升高, 并以 SA 处理的升高更为显著。已有报道表明, *04G* 调控 SA 前体的产生, 与 SA 的合成有直接关系^[29]。此外, 本研究发现 *04G* 基因也受 MeJA 的诱导, 证明了此前关于 JA 和 SA 途径互作的报道。

对 *06G* 基因表达的动态分析结果表明, *06G* 基因对 TMV 侵染的反应迅速、高效和持续。在接种 TMV 6 h 后, TMV 基因表达水平仅升高数十倍, 但

06G 的表达水平已达到 500 余倍。随着时间的推移 TMV 基因和 *06G* 的表达水平也随之显著升高。这表明, *06G* 基因不仅对病毒反应灵敏, 而且持续。由此可见, RNA 病毒侵染对 *06G* 的诱导表达有较强的特异性。有必要进一步研究该基因在植物病毒防御反应中的生物学功能及其在病毒病害防治上的应用。

致谢: 衷心感谢江彤老师 (安徽农业大学植物保护学院) 在试验材料、试验设计和论文撰写等方面给予的无私帮助。

参考文献:

- [1] Khetarpal R K, Maisonneuve B, Maury Y, et al. Breeding for resistance to plant viruses [M]. The America Phytopathology Society Press, 1998: 14-32.
- [2] Dardick C. Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2007, 20: 1004-1017.
- [3] Senthil G, Liu H, Puram V G, et al. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses [J]. Journal of General Virology, 2005, 86: 2615-2625.
- [4] Kang B C, Yeam I, Jahn M M. Genetics of plant virus resistance [J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43: 581-621
- [5] Martin G B, Bogdanove A J, Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins [J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 23-61.
- [6] van der Binzen E A, Jones J D. Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1998, 23: 454-456.
- [7] Soosaar J L M, Burch-Smith T M, Dinesh-Kumar S P. Mechanisms of plant resistance to viruses [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 789-798.
- [8] Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, et al. Systemic acquired resistance [J]. Plant Cell, 1996, 8: 1809-1819.
- [9] Pieterse C M J, van Loon L C. Salicylic acid-independent plant defence pathways [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4: 52-58.
- [10] Spoel S H, Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells [J]. Nature Reviews Immunology, 2012, 12: 89-100.
- [11] Kesarwani M, Yoo J M, Dong X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 336-346.
- [12] Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of *WRKY* DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1527-1539.
- [13] van Wees S C M, de Swart E A M, van Pelt J A, et al. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense

- pathways in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97: 8711-8716.
- [14] Hull R. Matthews' plant virology [M]. Academic Press, 2002: 27-42.
- [15] Cheng S, Huang Y, Wu Z, et al. Identification of differentially expressed genes induced by *Bamboo mosaic virus* infection in *Nicotiana benthamiana* by cDNA-amplified fragment length polymorphism [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 286.
- [16] Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, et al. Relationship between symptoms and gene expression induced by the infection of three strains of *Rice dwarf virus* [J]. PLOS ONE, 2011, 6(3): e18094.
- [17] Dardick C. Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20: 1004-1017.
- [18] Senthil G, Liu H, Puram V G, et al. Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses [J]. The Journal of General Virology, 2005, 86: 2615-2625.
- [19] Gibbs A J, Gower J C. The use of a multiple-transfer method in plant virus transmission studies-some statistical points arising in the analysis of results [J]. Annals of Applied Biology, 1960, 48: 75-83.
- [20] Sdoodee R, Teakle D S. Transmission of *tobacco streak virus* by *Thrips tabaci* a new method of plant virus transmission [J]. Plant Pathology, 1987, 36: 377-380.
- [21] Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity [J]. Plant Physiology, 2009, 150: 1648-1655.
- [22] Zheng Z, Qamar S A, Chen Z, et al. Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens [J]. Plant Journal, 2006, 48: 592-605.
- [23] Shimono M, Sugano S, Nakayama A, et al. Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance [J]. Plant Cell, 2007, 19: 2064-2076.
- [24] Koornneef A, Pieterse C M J. Cross-talk in defense signaling [J]. Plant Physiology, 2008, 146: 839-844.
- [25] Thomma B P H J, Eggermont K, Penninckx I A M A, et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(25): 15107-15111.
- [26] von Dahl C C, Baldwin I T. Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2007, 26: 201-209.
- [27] Spoel S H, Dong X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses [J]. Cell Host Microbe, 2008, 3: 348-351.
- [28] Kessler A, Baldwin I T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis [J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 299-328.
- [29] Lee H, Raskin I. Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274: 36637-36642.