

转录调控因子 WRKY 超级家族：起源、结构和功能

余迪求¹, 陈利钢^{1,2}, 张利平^{1,2}

(1 中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部生物技术实验室, 云南 昆明 650223; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: WRKY 蛋白质是一个植物特有的超级转录调控因子家族, 在拟南芥和水稻基因组中分别拥有至少 74 个和 97 个成员。最古老的 WRKY 转录调控因子拥有 2 个高度保守的 WRKY 结构域, 可能起源于 15 ~ 20 亿年前的真核生物。虽然所有 WRKY 蛋白质主要通过特异地结合靶基因启动子区域的 W 盒序列而调控其表达, 但各家族成员基因的生物学功能存在着各自的特异性。本文详细总结了 WRKY 蛋白质在调控植物发育和逆境诱导反应的信号转导途径建立等方面的分子生物学功能。

关键词: 转录调控因子; WRKY 基因的起源; 信号转导; 分子生物学功能

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)01-069-09

Transcription Factor WRKY Superfamily: Origin, Structure and Function

YU Di-Qiu¹, CHEN Li-Gang^{1,2}, ZHANG Li-Ping^{1,2}

(1 Laboratory of Biotechnology, Kunming Section, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The transcription factor WRKY protein superfamily so far is found exclusively in plants. There exist at least 74 and 97 members in *Arabidopsis* and rice, respectively. The most archaic WRKY transcription factors, which may originate some 1.5-2 billion years ago in eukaryotes, contain two highly conserved WRKY domains. Although all WRKY proteins regulate mainly the expression of target genes by specifically binding to the (T) TGACC (A T) (W box) sequences of their promoter, the biological function of each member is specific. In this review, we summarize in detail the molecular biological function of WRKY proteins in regulating specific signaling pathways during development or in response to stress factors.

Key words: Transcription factor; Origin of the WRKY genes; Signal transduction; Molecular biological function

与其他生物体一样, 植物的生长发育和对逆境的诱导反应涉及到复杂的基因表达调控网络。而这种调控网络及其信号传导的建立最初依赖于众多转录调控基因表达的激活及其对下游靶基因表达水平的调控。转录调控因子 WRKY 基因家族是植物特有的超级基因家族, 在其蛋白质 N-端含有高度保守的氨基酸序列 WRKYGQK 和 CX₄₋₅CX_nHXH C (X 为任一氨基酸), 属于锌指型 (Zinc-finger type) 转录调控因子 (Eulgem 等, 2000; Yu 等, 2001; Dong

等, 2002), 并通过结合靶基因启动子区域 W 盒 (T) TGACC (A T) 核苷酸序列而调控相应基因的表达, 发挥其分子生物学功能 (Yang 等, 1999; Eulgem 等, 1999; Yu 等, 2001)。最早被鉴定的植物 WRKY 基因是甘薯 (*Ipomoea batatas*) SPF1 (SPF1: SWEET POATATO EACTOR 1) 基因, 其基因产物特异地与甘薯 *Sporamin* 基因和 α -淀粉酶 (α -amylase) 基因启动子区域的 SP8 序列识别, 从而参与并调控植物糖信号途径的建立 (Ishiguro and Na-

基金项目: 云南省自然科学基金 (2003C0342M) 和国家自然科学基金 (30373803); 中国科学院“西部之光”计划; 科技部国家自然科技基础条件平台项目 (2004DKA30430) 和中国科学院“百人计划”资助项目

收稿日期: 2005-04-15, 2005-06-17 接受发表

作者简介: 余迪求 (1964-) 男, 理学博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向: 植物功能基因分析、植物抗逆信号传导及分子生物学、植物基因资源发掘和利用。

kamura, 1994)。随后, 相继在野燕麦 (*Avena fatua*; *SPF2*) (Rushton 等, 1995)、欧芹 (*Petroselinum crispum*; *PcWRKY1*, 2, 3) (Rushton 等, 1996) 和拟南芥 (*Arabidopsis*; *ZAP1*) (de Pater 等, 1996) 等植物中克隆到相应的 *WRKY* 基因, 并开展了较详细的分子生物学功能分析 (Eulgem 等, 2000; Ulker and Somssich, 2004)。最近几年, 植物分子生物学家又陆续在烟草 (Wang 等, 1998)、水稻 (Kim 等, 2000)、茄属植物 *Solanum dulcamara* (Huang and Duman, 2002)、鸭茅草 (*Dactylis glomerata* L.) (Alexandrova and Conger, 2002) 以及沙漠豆科植物 *Retama raetam* (Pnueli 等, 2002) 等植物基因组之中鉴定了 *WRKY* 基因的存在, 并阐明了相应的分子生物学功能。

1 拟南芥和水稻 *WRKY* 超级基因家族成员组成及结构特点

随着模式植物拟南芥和重要粮食作物水稻全基因组序列测定完成, 利用 *WRKY* 蛋白质高度保守的氨基酸序列 *WRKYGQK*, 搜索拟南芥和水稻基因组编码序列, 现已发现拟南芥和水稻基因组分别拥有 74 个和 97 个 *WRKY* 基因 (Eulgem 等, 2000; Dong 等, 2002; Qiu 等, 2004)。根据氨基酸序列比较分析, 可以将拟南芥和水稻 *WRKY* 蛋白质家族划分为三大类型 (Eulgem 等, 2000; Dong 等, 2002; Qiu 等, 2004)。第一大类型: 拥有 2 个典型的 *WRKY* 结构域 (即 *WRKYGQK* 保守序列) 和 Cys_2-His_2 锌指型结构。第二大类型: 拥有 1 个典型的 *WRKY* 结构域和 Cys_2-His_2 锌指型结构。第三大类型: 拥有 1 个典型的 *WRKY* 结构域和 Cys_2-His_2 锌指型结构。通过矩阵分析方法所构建的拟南芥和水稻 *WRKY* 蛋白质家族系统发生树表明, 拟南芥第一大类型和第三大类型的 *WRKY* 蛋白质分别独立聚集成一族, 即 *WRKY1* 族和 *WRKY2* 族, 第二大类型的 *WRKY* 蛋白质被划分为 2a~2e 等 5 族 (Eulgem 等, 2000) 或 a~g 等 7 族 (Dong 等, 2002) 或 2-a + 2-b, 2-c 和 2-d + 2-e 等 3 族 (Zhang and Wang, 2005); 而水稻第一大类型的 *WRKY* 蛋白质独立聚集成一族, 第三大类型的 *WRKY* 蛋白质分别聚集成 a 和 b 等 2 族, 而第二大类型的 *WRKY* 蛋白质被划分为 a~j 等 10 族 (Qiu 等, 2004)。从基因表达谱分析结果来看, 聚集成一族或一亚族的 *WRKY*

基因成员之间具有相似的逆境诱导表达模式 (Dong 等, 2002; Qiu 等, 2004), 预示着它们可能具有相似的分子生物学功能。特别是经靴带 (Bootstrap) 分析表明, 拟南芥和水稻 *WRKY* 蛋白质家族分别有 8 组和 20 组 *WRKY* 成员的亲源关系得到 95% 以上的强烈支持 (Dong 等, 2002; Qiu 等, 2004), 更加预示着这些 *WRKY* 基因可能起源于相同的祖先, 并可能具有相似的分子生物学功能。

在拟南芥 *WRKY* 基因家族之中, 除了大部分 *WRKY* 蛋白质具有典型的 *WRKYGQK* 结构域外, 尚有 3 个蛋白质的 *WRKY* 结构域的氨基酸序列有别于其典型的结构域序列, 即为 *WRKYGKK* (Dong 等, 2002); 而在水稻 *WRKY* 基因家族之中, 除了 *WRKYGQK* 和 *WRKYGKK* 二种结构域序列外, 还拥有 1 种全新的、尚未在其他植物基因组之中被鉴定的 *WRKY* 结构域 *WRKYGEK* (Qiu 等, 2004)。因此, 此类拥有 *WRKYGEK* 结构域的水稻 *WRKY* 基因可能从其他类 *WRKY* 基因进化而来, 并可能具有新的生物学功能 (Qiu 等, 2004)。

除了具备高度保守的 *WRKY* 结构域和 Cys_2-His_2 (或 $His-Cys$) 锌指型结构域外, 植物 *WRKY* 蛋白质还拥有核定位序列 NLS (nuclear localization signals)、亮氨酸拉链 LZs (leucine zippers) 以及富含丝氨酸-苏氨酸域 (Serine-threonine-rich region)、富含谷氨酰胺域 (glutamine-rich region) 和富含脯氨酸域 (proline-rich region) 等结构 (Eulgem 等, 2000; Ulker and Somssich, 2004)。由于上述结构特点, *WRKY* 蛋白质将定位于细胞核, 并可能通过蛋白质之间的相互作用形成同源二聚体或异源二聚体而调控靶基因的表达。

2 *WRKY* 基因的起源与分子进化

如前所述, 植物转录调控因子 *WRKY* 基因家族成员基因的数量存在着很大的差异。比如, 拟南芥基因组拥有 74 个 *WRKY* 基因成员, 而水稻基因组拥有 97 个 *WRKY* 基因 (Eulgem 等, 2000; Qiu 等, 2004)。通过搜索 GenBank 和其他相关数据库, 真核单细胞藻类衣藻基因组仅拥有一个可表达的 *WRKY* 基因 (根据其 EST 片段的存在), 而低等植物苔藓植物 *Physcomitrella patens* 和蕨类植物 *Ceratopteris richardii* 基因组也拥有多个可表达的 *WRKY* 基因。最近的研究发现, 苔藓植物 *Physcomitrella patens* 基因组至少拥有 12 个 *WRKY* 基因 (Ulker and

Somssich, 2004)。另外, 我们的研究工作还发现, 裸子植物苏铁基因组至少拥有 21 个 WRKY 基因。除上所述之外, 非光合真核生物黏霉菌 *Dictyostelium discoideum* 和单细胞原生生物 *Giardia lamblia* 的基因组也拥有 1 个可表达的 WRKY 基因。

如前所述, 根据 WRKY 基因家族各成员蛋白质的结构域特点, 将 WRKY 基因家族划分为三大类型 (Eulgem 等, 2000; Qiu 等, 2004)。有趣的是, 目前在真核单细胞衣藻、非光合真核生物黏霉菌 *Dictyostelium discoideum*、单细胞原生生物 *Giardia lamblia*、低等植物苔藓植物 *Physcomitrella patens* 和蕨类植物 *Ceratopteris richardii* 等基因组之中所发现的 WRKY 基因均属于第一大类型。而我们从裸子植物苏铁 (*Cycas revoluta*) 基因组中所克隆的 21 个 WRKY 基因之中, 15 个苏铁 WRKY 基因属于第一大类型, 而另外 6 个 WRKY 基因属于第二大类型。最近, Zhang 和 Wang (2005) 通过邻接法 (neighbor-joining program) 分析表明, 第二大类型 2-a + 2-b 和 2-c 等 2 族的 WRKY 蛋白质与第一大类型 WRKY 蛋白质 C-末端区域具有较近亲源性, 而第二大类型 2-d + 2-e 族 WRKY 蛋白质与第三大类型 WRKY 蛋白质聚集一起。上述发现和研究证据预示着: 第一大类型 WRKY 基因成员可能是植物 WRKY 基因家族最古老的类型, 并且可能起源于 15 ~ 20 亿年前的真核生物起源之时 (Ulker and Somssich, 2004); 而第二大类型和第三大类型的 WRKY 基因成员可能在苔藓植物起源之后才在裸子植物或蕨类植物 (目前尚无研究证据) 基因组之中出现。同时, 上述发现和研究证据还说明, 可能第一大类型 WRKY 蛋白质经断裂, 并由 C-末端区域演化成第二大类型; 而第三大类型 WRKY 蛋白质可能是由第二大类型 2-d + 2-e 族 WRKY 蛋白质演化而来 (Xie 等, 2005; Zhang and Wang, 2005)。

值得注意的是, 目前在原核生物细菌和原核生物光合蓝细菌 (蓝藻)、以及真核单细胞生物酵母、低等动物线虫、果蝇、家蚕、高等生物原鸡、家猪和人类基因组之中尚未发现 WRKY 基因的存在。而在植物界基因组之中, WRKY 基因家族成员随着植物从低等单细胞真核藻类到高等多细胞被子植物的系统演化而迅速扩增。比如, 由衣藻基因组拥有 1 个 WRKY 基因、苔藓植物 *Physcomitrella patens* 基因组至少拥有 12 个 WRKY 基因、到裸子植物苏铁 (*Cycas revoluta*) 基因组至少拥有 21 个 WRKY 基因、

高等被子植物拟南芥基因组拥有 74 个 WRKY 基因和水稻基因组至少拥有 97 个 WRKY 基因等, 其 WRKY 基因成员数量从 1 个迅速扩增到至少 97 个。另一方面, WRKY 基因家族各成员基因的分子生物学功能主要参与并调控植物生长发育、形态建成、代谢调控和抗逆境信号转导途径建立。由此推测, 随着植物从低等到高等和从水生环境向陆生环境的演化, 植物面临着一系列与其生长发育、形态建成、代谢调控和抵抗逆境因子胁迫相关的信号转导途径的建立, WRKY 基因家族可能是为了满足植物上述信号转导途径建立所需而迅速扩增。

3 WRKY 基因调控植物生物逆境反应及其信号传导

虽然最早被鉴定的植物 WRKY 基因 SPF1 的生物学功能是调控甜马铃薯 (*Ipomoea batatas*) 糖信号途径的建立 (Ishiguro and Nakamura, 1994), 但随后的大量研究工作证实植物 WRKY 基因的主要生物学功能是调控植物抗病反应及其信号转导途径的建立 (Rushton 等, 1996; Yu 等, 2001; Deslandes 等, 2002; Asai 等, 2002)。当病原微生物侵染植物细胞时, 将诱导宿主细胞产生一系列抗病反应, 比如宿主组织的区域性细胞坏死、活性氧增加、细胞壁增厚、信号分子水杨酸 (Salicylic acid: SA) 生物合成被激活, 其含量显著增加; 同时伴随着一系列基因表达的激活或抑制, 比如病害发生相关 (*pathogenesis-related: PR*) 基因家族成员基因的表达被激活、WRKY 基因家族成员基因的表达被激活、抗病信号转导途径 (包括水杨酸、乙烯和茉莉酸脂等信号转导途径) 被激活或抑制等 (Dong, 1998; Yu 等, 1999; Campbell 等, 2002; Singh 等, 2002; Shah, 2003; Nimchuk 等, 2003)。病原菌诱导的植物抗病性及其抗病反应的信号转导途径建立必须依赖定位于细胞核内的十分重要且非常关键的抗病调控基因 *NPR1* 的存在 (Cao 等, 1997; Ryals 等, 1997)。不管抗病信号分子 SA 或 INA 处理与否, 拟南芥 *NPR1* 基因突变体植株均表现对病原菌侵染的敏感 (Cao 等, 1997; Ryals 等, 1997; Yu 等, 2001)。在 *NPR1* 基因的启动子区域, 拥有大量的、能被 WRKY 蛋白质识别的 W 盒序列, WRKY 蛋白质通过结合 *NPR1* 基因启动子区域 W 盒核苷酸序列而调控 *NPR1* 基因的表达, 从而激活植物抗病性及其信号转导途径的建立, 在依赖于

NPR1 基因的抗病信号转导途径之中发挥十分重要的生物学功能 (Yu 等, 2001)。进一步的研究揭示, 拟南芥抗病调控基因 *NPR1* 的表达调控和转录调控因子 *WRKY* 基因家族的基因表达调控之间存在着相互影响和相互调控的关系。*NPR1* 基因的表达受 *WRKY* 蛋白质的调控, 反之 *WRKY* 基因家族的某些成员基因的表达调控也受 *NPR1* 蛋白质影响 (Yu 等, 2001; Dong 等, 2002)。许多研究工作证实, 病原菌侵染或抗病信号分子 SA 处理能显著地提高植物原位抗病性和系统获得抗病性 (SAR: Systemic acquired resistance) 的建立 (Chen 等, 1993; Yu 等, 1999; Cao 等, 1997), 同时, 能显著地诱导拟南芥 *WRKY* 基因家族 49 个 *WRKY* 基因成员表达水平的改变 (Dong 等, 2002), 但对拟南芥抗病调控基因 *NPR1* 表达水平的影响有限, 而能有效地诱导细胞内 *NPR1* 蛋白质氧化态和还原态的改变 (Mou 等, 2003)。因此, 病原菌侵染或抗病信号分子 SA 处理所诱导的植物抗病性提高可能是通过诱导 *WRKY* 基因家族大部分成员基因表达水平和 *NPR1* 蛋白质氧化 - 还原状态的改变而实现。

另一类参与植物抗病反应及其信号转导途径建立的重要基因家族是受体样蛋白激酶 (*RLKs*: receptor-like protein kinases) 基因家族 (Du and Chen, 2000; Chen, 2001)。比如, 拟南芥 *CRK5* (*RLK*) 基因的高表达可激活植株抗病保护反应和程序性细胞死亡 (Chen 等, 2003)。有趣的是, 在许多受病原菌侵染或抗病信号分子 SA 处理而诱导表达的受体样蛋白激酶 (*RLKs*) 基因的启动子区域存在着许多能被 *WRKY* 蛋白质识别的 W 盒序列, 其表达水平均与 W 盒的核心序列单个核苷酸突变有关, 即如果将 W 盒的核心序列 TGAC 突变为 TGAA 后, 其表达水平下降约 10 倍 (Du and Chen, 2000)。最近报道也证实, 受体激酶基因 *SFR2* 启动子区域的 W 盒序列的存在是病原菌侵染、SA 处理和伤害等逆境因子诱导其表达必要条件 (Rocher 等, 2005)。因此, *WRKY* 基因可能处于 *RLKs* 和受体激酶基因的上游, 其蛋白质通过与 W 盒序列的相互作用而调控 *RLKs* 基因的表达, 从而调控植株抗病保护反应和程序性细胞死亡。另一方面, *WRKY* 转录调控因子的分子生物学功能也与受保护反应诱导的促细胞分裂素激活蛋白激酶 (MAPK: mitogen-activated protein kinase) 信号转导途径相关联。比如, 拟南芥 *WRKY22* 蛋白质和 *WRKY29* 蛋白质是 MAPK 介

导植物抵抗细菌和真菌病原菌侵染的信号转导途径的重要下游组分 (Asai 等, 2002; Wan 等, 2004)。瞬间表达 *AtWRKY29* 基因的转基因拟南芥叶片对病原菌侵染具有很强的抗性 (Asai 等, 2002)。在几丁质 (chitin) 介导植物抗病信号转导途径之中, 拟南芥 2 个 *MAPK* (*AtMPK3* 和 *AtMPK6* 基因) 和相应的酶活性均受几丁质正调节; 另有 4 个 *WRKY* 基因 (*AtWRKY22*、*AtWRKY29*、*AtWRKY33* 和 *AtWRKY53*) 的表达水平也受几丁质正调节 (Wan 等, 2004)。烟草 *MAPKK NtMEK2* 基因的高表达能有效地激活其下游基因 *MAPKs SIPK* 和 *WIPK* 基因 (相应的拟南芥同源基因为 *AtMPK6* 和 *AtMPK3* 基因) 的表达 (Jin 等, 2003; Kim 等, 2003; Liu 等, 2003)。进一步分析表明, 在转基因烟草和拟南芥植株内, 高表达烟草 *SIPK* 和 *WIPK* (*AtMPK3* 和 *AtMPK6*) 上游基因 *MAPKK NtMEK2* 能分别有效地激活烟草 *NtWIZZ* (*WRKY*) 和 *NtWRKY3* 基因以及拟南芥 *AtWRKY33* 和 *AtWRKY53* 基因的表达 (Kim and Zhang, 2004; Wan 等, 2004), 并能有效地提高 W 盒的结合活性和植物的抗病性 (Kim and Zhang, 2004)。支持 *WRKY* 转录调控因子参与病原菌激活的 MAPK 信号转导途径的研究证据也在欧芹中获得 (Kroj 等, 2003)。综上所述, *WRKY* 转录调控因子的表达调控和病原菌激活的蛋白激酶 (包括 *RLKs*、*MAPK* 和 *MAPKK* 等) 基因的表达调控之间存在着相互影响和相互调控的关系。*WRKY* 转录调控因子作为上游基因调控受体样蛋白激酶 (*RLKs*) 基因的表达, 同时 *WRKY* 转录调控因子作为下游基因也参与病原菌激活的 MAPK 信号转导途径。

虽然已有许多研究证实 *WRKY* 基因家族主要涉及植物抗病信号转导途径的建立, 但各 *WRKY* 转录调控因子参与抗病信号转导途径的建立存在着其特异性。比如, 拟南芥 *RRS1-R* (*WRKY52*) 蛋白质拥有抗病基因产物典型的核苷结合位点 (NBS) 及富含亮氨酸重复序列 (LRR) 结构域 (NBS-LRR) 特征和 *WRKY* 基因产物典型的入细胞核信号及 DNA-结合结构域 (*WRKY*) 特征, 因此 *WRKY52* 基因既作为典型的抗病基因参与拟南芥植株抵抗病原菌 *Ralstonia solanacearum* 的侵入, 又作为典型的 *WRKY* 基因参与拟南芥植株的抗病信号传导 (Deslandes 等, 2002), 并将植物保护反应的战场扩展至细胞核 (Lahaye, 2002)。拟南芥 *WRKY6* 基因正调控衰老和病原菌诱导的病原相关基因 *PR1* 及抗病

调控基因 *NPR1* 表达 (Robatzek and Somssich, 2002)。拟南芥 *WRKY* 基因家族第三组 *WRKY* 基因成员 (*WRKY30*, 38, 41, 46, 52, 53, 54, 55, 62, 63, 64, 66, 67 和 70) 受不同病原菌的侵染, 各成员基因的表达水平和表达时空呈现特异性, 可能分别参与植物不同保护信号转导途径的建立 (Kalde 等, 2003)。拟南芥 *WRKY18* 基因的高表达激活转基因植株病原相关基因 *PR1*、*PR2* 和 *PR5* 随着发育进展而不断增强, 进而激活转基因植株抗病性建立 (Chen and Chen, 2002)。因此, 拟南芥 *WRKY18* 基因可能涉及植物不同时空保护信号转导途径的建立。拟南芥 *WRKY70* 蛋白质激活水杨酸介导的植株抗病信号转导途径而抑制茉莉酸介导的植株抗病信号转导途径, 是此二条抗病信号转导途径的调控交叉点 (Li 等, 2004)。拟南芥 *WRKY22* 蛋白质和 *WRKY29* 蛋白质是 MAPK 介导植物抵抗细菌和真菌病原菌侵染的信号转导途径的重要下游组分, 并与拟南芥 *WRKY33* 和 *WRKY53* 基因协同调控 flagellin 和几丁质 (chitin) 介导植物抗病信号转导途径的建立 (Asai 等, 2002; Wan 等, 2004)。烟草 *TIZZ* (*WRKY*) 基因在烟草遭受烟草花叶病毒 TMV 的侵染所诱发的过敏性反应启动时即刻诱导表达, 但信号分子水杨酸处理或机械致伤都不能诱导表达, 由此证实烟草 *TIZZ* (*WRKY*) 基因可能参与植物保护反应启动早期的信号转导途径的建立 (Yoda 等, 2002)。烟草 *WIZ* (*WRKY*) 基因则参与虫害侵袭的早期抗性反应和系统性抗虫反应的信号转导途径建立 (Hara 等, 2000)。另外, 马铃薯 *WRKY* 基因受晚疫病病原菌诱导表达, 并参与马铃薯抗病数量性状形成的信号转导途径建立 (Trognitz 等, 2002; Dellagi 等, 2000)。

4 *WRKY* 基因调控植物非生物逆境反应及其信号传导

在植物的整个生命活动周期之中, 植物不仅面临着病害和虫害等生物逆境的胁迫, 而且也面临着诸如伤害、干旱、冷害及高温等非生物逆境的胁迫。针对非生物逆境的胁迫, 植物发展了一套非常复杂而完善的调控网络。已有文献报道认为, *WRKY* 基因家族在此调控网络之中起着十分重要的调节作用, 因为 *WRKY* 基因的表达受伤害、干旱、冷害及高温等逆境因子诱导表达。比如, 拟南芥 7 个 *WRKY* 基因 (*AtWRKY40*、*AtWRKK33*、*AtWRKY53*、

AtWRKY22、*AtWRKY11*、*AtWRKY15* 和 *AtWRKY60*) 受伤害诱导表达 (Cheong 等, 2002)。沙漠豆科植物 *Retama raetam* 的 *WRKY* 基因参与植物抗旱性建立和种子休眠的形成 (Pnueli 等, 2002), 而来源于灌丛 (*Larrea tridentata*) 的 *LtWRKY21* 蛋白质作为植物激素 ABA 信号转导途径的激活因子参与 ABA 介导的灌丛抗旱性建立 (Zou 等, 2004)。烟草 *WIZZ* (*WRKY*) 基因在植株受到伤害 10 min 后即刻在局部及全身开始积累, 30 min 后达到高峰, 随后其表达水平逐渐降至正常水平 (Hara 等, 2000), 说明 *WIZZ* (*WRKY*) 基因参与烟草早期阶段的伤害响应; 而另一个烟草 *WRKY* 转录调控因子在干旱和热激协同作用下被特异激活, 但不被单一逆境因子 (干旱或热激) 所诱导表达 (Rizhsky 等, 2002), 这预示着该烟草 *WRKY* 基因在建立干旱和热激协同诱导 (而不是单一逆境因子诱导) 的信号转导之中发挥重要作用; 但与烟草 *WIZZ* 基因具有同源性的柑橘类水果两个 *WRKY* 基因只在预先热处理的胁迫下被诱导表达, 可能参与高温胁迫的信号转导途径的建立 (Sanchez-Ballesta 等, 2003)。大麦 *WRKY38* 基因在冷害和干旱胁迫中表达, 表明其在冷害和干旱胁迫的信号转导之中起调控功能 (Mare 等, 2004); 而从茄属植物 (bittersweet nightshade) 基因组之中克隆获得的一个 67 kDa 抗冻蛋白 (*WRKY*) 基因在 11 和 12 月植物叶中表达, 表明寒冷环境能诱导其表达并可能在植物适应寒冷环境中起作用 (Huang and Duman, 2002)。最近, 我们从水稻基因组之中克隆获得 13 个 *WRKY* 基因, 其中至少 10 个 *WRKY* 基因受盐害、PEG、冷害及高温等 4 种逆境因子诱导表达 (Qiu 等, 2004)。

5 *WRKY* 基因调控植物生长发育、形态建成和代谢调控及其信号传导

除了在植物抗逆性的信号转导方面起着十分重要作用外, *WRKY* 基因家族在调控植物生长发育、形态建成和代谢等也具有非常重要作用。植物毛状体 (Trichome) 为植物提供一种防御捕食者 (predator) 攻击和紫外线辐射损伤的物理保护屏障, 一般分布于植物叶片、叶缘、茎和花萼的上表皮, 是由单表皮细胞经膨大发育而成。通过分子遗传学研究, 目前已揭示了许多基因参与植物毛状体的发生和形态建成。如, 拟南芥 *GLABROUS* (*GL1*) 基因和 *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) 基因控

制叶片上表皮毛状体的发生,其相应的突变体植株叶表面缺乏毛状体 (Hulskamp 等, 1994) 或导致叶表面毛状体的数量减少 (Walker 等, 1999)。而 *GL2* 基因和 *GL3* 基因则控制叶片上表皮毛状体的形态建成,其相应的突变体植株叶表面毛状体无分枝建成 (Hulskamp 等, 1994) 或分枝由 3 枝转变成 2 枝 (Hulskamp 等, 1994; Payne 等, 2000)。第 5 个调控拟南芥叶表面毛状体形态建成的基因是转录调控因子 *TRANSPARENT TESTA GLABRA2* (*TTG2*) (*WRKY44*) 基因,其基因突变体植株叶表面毛状体的数量减少并没有分支,同时其种皮中黏液的产生和单宁酸的合成均减少 (Johnson 等, 2002)。因此, *TTG2* (*WRKY44*) 基因至少调控拟南芥 3 条独立的形态建成途径:毛状体的发育、种皮黏液的产生和种皮单宁酸的合成。进一步的研究证实,在毛状体的发生和形态建成途径之中, *WRKY44* 基因处于 *TTG1* 基因的下游,并与 *GL2* 基因的功能重叠;在种皮黏液产生的途径之中, *WRKY44* 基因的功能是独立于 *TTG1* 和 *GL2* 基因功能之外;而在种皮单宁酸合成的途径之中, *WRKY44* 基因的功能需依赖于 *TTG1* 基因的功能,处于 *TTG1* 基因的下游 (Johnson 等, 2002)。如前所述, *WRKY* 蛋白质通过特异地与靶基因启动子区域的 W 盒结合而实现其分子生物学功能 (Yu 等, 2001)。虽然涉及植物叶片表面毛状体的发生和形态建成有关基因 (如上述的 *GL1*、*TTG1*、*GL2* 和 *GL3* 等 4 个基因) 启动子区域存在许多能被 *WRKY* 蛋白质识别的 W 盒,但 *WRKY44* 基因在控制植物叶片表面毛状体的形态建成、种皮黏液的产生和种皮单宁酸的合成等途径是否通过特异地与靶基因启动子区域的 W 盒结合而实现,目前尚无实验证据。

在拟南芥根的发生与形态建成方面,有超过 22 000 个基因 (约占拟南芥基因组 90%) 在根的不同发育阶段表达 (Birnbaum 等, 2003)。在根组织中表达的 577 个转录调控因子之中,有 331 个基因存在差异表达。特别是在根组织表达的 37 个 *WRKY* 基因之中,有 12 个基因在根成熟区组织细胞内特异表达,这预示着 *WRKY* 基因调控根细胞的成熟 (Birnbaum 等, 2003)。在植物胚胎发育方面,茄属植物 *Solanum chacoense* 的 *ScWRKY1* 基因在鱼雷胚后期特异地瞬间高表达,这似乎表明 *WRKY* 基因在胚胎发育中起到某种特殊调控作用 (Lagacé and Matton, 2004);而 *DGE1* (*DgWRKY1*) 基因在

体外诱导鸭茅草 (*Dactylis glomerata* L.) 的叶肉细胞的体细胞胚胎之中特异表达,这预示着 *DGE1* (*DgWRKY1*) 基因参与体细胞胚胎发生及其形态建成等途径的基因表达调控 (Alexandrova and Conger, 2002)。来源拟南芥花序 (包括胚胎组织) 组织 mRNA 所构建的 cDNA 文库中,许多 *WRKY* 基因家族的成员基因 cDNA 被克隆,更进一步预示 *WRKY* 基因家族将调控植物的花或花序发育、胚胎发生及其形态建成。同样地,拟南芥 *ZAP1* (*AtWRKY1*) 基因的分子生物学功能可能主要调控植株根和花的发生及形态建成,因为 *ZAP1* 基因仅在根和花组织细胞中表达,而在茎、叶和长角果组织中未见表达 (de Pater 等, 1996)。有趣的是,分别调控拟南芥上表皮毛状体形态建成的 *AtWRKY44* 基因以及根和花形态建成的 *ZAP1* (*AtWRKY1*) 基因均不受病原微生物侵染和抗病信号分子 SA 处理而诱导表达 (Dong 等, 2002),这预示着 *WRKY* 基因家族各成员基因的分子生物学功能具有各自的特异性。

植物激素赤霉素在调控植物种子萌发、植株生长和花发育的信号转导途径建立具有十分重要的生理功能。比如赤霉素通过调控种子糊粉层细胞的 α -淀粉酶 (α -amylase) 和蛋白水解酶 (*Protease*) 基因的诱导表达而影响种子萌发。作为赤霉素信号转导途径的转录调控抑制因子, *WRKY* 蛋白质特异地与 α -淀粉酶启动子区域的 W 盒序列结合而控制种子糊粉层细胞糖代谢途径的建立 (Rushton 等, 1995; Zhang 等, 2004)。赤霉素调节野燕麦 α -淀粉酶 (α -Amy2 54) 基因的诱导表达涉及到 *WRKY* 与 W 盒的相互作用 (Rushton 等, 1995);水稻 *WRKY71* 蛋白质通过与启动子区域的 W 盒序列特异地结合而抑制赤霉素诱导的糊粉层 α -淀粉酶 (*Amy32b*) 基因表达 (Zhang 等, 2004)。另外,大麦 *SUSIBA2* (*WRKY*) 基因产物通过特异地结合到异构淀粉酶 1 (*iso1: isoamylase1*) 基因启动子区域的 SURE (Sugar responsive) 和 W 盒序列而调控糖代谢信号转导 (Sun 等, 2003)。在其他代谢调控方面, *WRKY* 基因也发挥重要的调控作用,比如 *GaWRKY1* 基因参与调节棉花倍半萜烯的生物合成 (Xu 等, 2004)。

在植物叶片衰老的信号转导途径建立方面, *WRKY* 基因也具有重要的调控作用。比如,随着拟南芥叶片衰老的发生,一组 *WRKY* 基因 (包括 *AtWRKY4*、6、7、11 和 53 等基因) 的表达不断增强

(Hinderhofer and Zentgraf, 2001; Robatzek and Somsich, 2001; Miao 等, 2004)。同时, 在衰老叶片转录体中, 就转录调控因子而言, *WRKY* 转录调控因子的表达数量位居第二 (Guo 等, 2004)。采用免疫沉淀分析表明, *AtWRKY53* 蛋白质可以和衰老相关基因家族 (*SAGs: senescence-associated genes*) 特异结合 (如 *SAG12* 基因)。进一步分析显示, 在高表达 *AtWRKY53* 基因的转基因植株叶片内, *SAG12* 基因的表达水平显著提高 (Miao 等, 2004)。上述现象可能预示着 *WRKY* 基因在植物叶片衰老的信号转导途径之中起着关键的调控作用。

6 *WRKY* 基因功能研究的展望

鉴定 *WRKY* 转录调控因子的下游靶基因对于理解它们的分子生物学功能最为关键。目前, 广泛地采用在转基因植株、原生质体和叶片等组织之中高表达外源特定 *WRKY* 基因, 结合基因芯片技术, 寻找下游靶基因。如与对照植株比较, 高表达或高抑制拟南芥 *WRKY70* 基因诱导 42 个基因的表达水平发生显著的差异 (Li 等, 2004)。*AtWRKY29* 和 *AtWRKY22* 基因在拟南芥叶肉细胞原生质体中瞬间高表达导致本身启动子和受体样蛋白激酶 *FRK1 SIRK* 基因的激活, 并下调 *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE6 (GST6)* 和 *RD29A* 基因的表达 (Asai 等, 2002)。*PcWRKY1* 基因在欧芹叶肉细胞原生质体中瞬间高表达激活 3 个潜在的靶基因 *PcPR1-1*、*PcWRKY1* 和 *PcWRKY3* 的表达 (Eulgem 等, 1999)。另外, 利用 cDNA-AFLP 分析技术揭示, 受 *AtWRKY6* 基因调控的潜在靶基因涉及拟南芥叶片衰老相关基因, 包括 *FRK1 SIRK* 基因 (Robatzek 等, 2002)。因此, 通过分析高表达或高抑制相应 *WRKY* 基因的转基因植株的表达谱差异, 鉴定各 *WRKY* 转录调控因子的下游靶基因, 是今后 *WRKY* 基因功能研究领域最为重要的研究思路。

通过生物信息学分析, 寻找在启动子区域拥有可被 *WRKY* 蛋白质识别的 W 盒序列的靶基因, 理解 *WRKY* 基因在植物特定的生命活动之中的生物学功能和相应的调控机制, 也是今后 *WRKY* 基因功能研究领域最为重要的研究思路。比如, 现已发现, 转录调控因子 *WRKY* 基因家族许多成员基因的启动子区域拥有大量的、可被 *WRKY* 蛋白质识别的 W 盒序列 (Dong 等, 2002), 这预示着 *WRKY* 基因之间可能存在一条相互调控或自反馈调控途

径。另外, 我们最近的研究也发现, 在一些重要的抗逆境和发育调节基因的启动子区域均拥有许多能被 *WRKY* 蛋白质识别的 W 盒序列, 推测 *WRKY* 蛋白质可能调控这些基因的表达。

采用酵母双元杂交系统及染色质免疫亲和沉淀分析方法, 分析特定 *WRKY* 蛋白质之间或与其他蛋白质之间的相互作用以及 *WRKY* 蛋白质特异调控相应靶基因表达, 可以有效地理解 *WRKY* 基因参与调控靶基因表达的分子机制。比如, 采用酵母双元杂交系统, 我们发现, 基因表达模式相同和氨基酸同源性较高 (处于同一组) 的 *WRKY* 基因产物 (蛋白质) 可能通过相互作用的方式共同调控靶基因的表达, 参与植物抗逆性建立和植物生长发育及其代谢的调控网络的形成。采用染色质免疫亲和沉淀分析方法, Turck 等 (2004) 进一步证实, 欧芹 *PcWRKY1* 蛋白特异调控 *PcPR1-1* 和 *PcWRKY1* 的表达。

【参 考 文 献】

- Alexandrova KS, Conger BV, 2002. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*) [J]. *Plant Science*, 162: 301—307
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, et al, 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity [J]. *Nature*, 415: 977—983
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, et al, 2003. A gene expression map of the *Arabidopsis* root [J]. *Science*, 302: 1956—1960
- Campbell MA, Fitzgerald HA, Ronald PC, 2002. Engineering pathogen resistance in crop plants [J]. *Transgenic Res*, 11: 599—613
- Cao H, Bowling SA, Gordon S, et al, 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats [J]. *Cell*, 88: 57—64
- Chen Z, 2001. A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats [J]. *Plant Physiol*, 126: 473—476
- Chen C, Chen Z, 2002. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor [J]. *Plant Physiol*, 129: 706—716
- Chen K, Du L, Chen Z, 2003. Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 53: 61—74
- Chen Z, Silva H, Klessig DF, 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid [J]. *Science*, 262: 1883—1886
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, et al, 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 129: 661—677

- de Pater S, Greco V, Pham K, *et al*, 1996. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis* [J]. *Nucleic Acids Res*, 24: 4625—4632
- Dellagi A, Helibronn J, Avrova AO, *et al*, 2000. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is co-regulated with class I endochitinase expression [J]. *MPMI*, 13: 1092—101
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, *et al*, 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes [J]. *PNAS USA*, 99: 2404—2409
- Dong J, Chen C, Chen Z, 2002. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Mol Biol*, 51: 21—37
- Dong XN, 1998. SA, JA, ethylene and disease resistance in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 316—323
- Du L, Chen Z, 2000. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 24: 837—847
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, *et al*, 1999. Early nuclear events in plant defence signaling: rapid gene activation by WRKY transcription factors [J]. *The EMBO J*, 18: 4689—4699
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, *et al*, 2000. The WRKY superfamily of plant transcriptional factors [J]. *Trends Plant Sci*, 5: 199—206
- Guo Y, Cai Z, Gan S, 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence [J]. *Plant Cell Environ*, 27: 521—549
- Hara K, Yagi M, Kusano T, *et al*, 2000. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding [J]. *Mol Gen Genet*, 263: 30—37
- Hinderhofer K, Zentgraf U, 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence [J]. *Planta*, 213: 469—473
- Huang T, Duman JG, 2002. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bitter-sweet nightshade, *Solanum dulcamara* [J]. *Plant Mol Biol*, 48: 339—350
- Hulskamp M, Misera S, Jurgens G, 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 76: 555—566
- Ishiguro S, Nakamura K, 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' -upstream regions of genes coding for sporamin and α -amylase from sweet potato [J]. *Mol Gen Genet*, 244: 563—571
- Jin H, Liu Y, Yang KY, *et al*, 2003. Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco [J]. *Plant J*, 33: 719—731
- Jonson CS, Kolevski B, Smyth DR, 2002. *TRANSPARENT TESTA GLABRA 2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor [J]. *The Plant Cell*, 14: 1359—1375
- Kalde M, Barth M, Somssich IE, *et al*, 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY Group III transcriptional factors are part of different plant defense signaling pathways [J]. *MPMI*, 16: 295—305
- Kim CY, Lee SH, Park HC, *et al*, 2000. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis [J]. *MPMI*, 13: 470—474
- Kim CY, Liu Y, Throne ET, *et al*, 2003. Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants [J]. *The Plant Cell*, 15: 2707—2718
- Kim CY, Zhang S, 2004. Activation of a nitrogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco [J]. *Plant J*, 38: 142—151
- Kroj T, Rudd JJ, Nurnberger T, *et al*, 2003. Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-dependent expression of pathogenesis-related genes in parsley [J]. *J Biol Chem*, 278: 2256—2264
- Lagacé M, Matton DP, 2004. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense* [J]. *Planta*, 219: 185—189
- Lahaye T, 2002. The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene—uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense [J]. *Trends Plant Sci*, 7: 425—427
- Li J, Brader G, Palva T, 2004. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense [J]. *The Plant Cell*, 16: 319—331
- Liu Y, Jin H, Yang KY, *et al*, 2003. Interaction between two mitogen-activated protein kinases during plant defense signaling [J]. *Plant J*, 34: 149—160
- Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, *et al*, 2004. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley [J]. *Plant Mol Biol*, 55: 399—416
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, *et al*, 2004. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Bio*, 55: 853—867
- Mou Z, Fan W, Dong X, 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes [J]. *Cell*, 113: 935—944
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BE, *et al*, 2003. Recognition and response in the plant immune system [J]. *Annu Rev Genet*, 37: 579—609
- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM, 2000. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1* [J]. *Genetics*, 156: 1349—1362
- Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, *et al*, 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam* [J]. *Plant J*, 31: 319—330
- Qiu Y, Jing S, Fu J, *et al*, 2004. Cloning and analysis of expression profile of 13 WRKY genes in rice [J]. *Chin Sci Bull*, 49: 2159—2168
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R, 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco [J]. *Plant Physiology*, 130: 1143—1151

- Robatzek S, Somssich I, 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense [J]. *Gene Dev*, 16: 1139—1149
- Robatzek S, Somssich IE, 2001. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence and defense-related processes [J]. *Plant J*, 28: 123—133
- Rocher A, Dumas C, Cock JM, 2005. A W-box is required for full expression of the SA-responsive gene SFR2 [J]. *Gene*, 344: 181—192
- Rushton PJ, Macdonald H, Huttly AK, *et al*, 1995. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis element in the promoters of *-Amy2* genes [J]. *Plant Mol Biol*, 29: 691—702
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, *et al*, 1996. Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes [J]. *EMBO J*, 15: 5690—5700
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, *et al*, 1997. The *Arabidopsis* NIMI protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I B [J]. *The Plant Cell*, 9: 425—439
- Sanchez-Ballesta MT, Lluch Y, Gosalbes MJ, *et al*, 2003. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit [J]. *Planta*, 218: 65—70
- Shah J, 2003. The salicylic acid loop in plant defense [J]. *Current Opin Plant Biol*, 6: 365—371
- Singh KB, Foley RC, Onate-Sanchez L, 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses [J]. *Current Opin Plant Biol*, 5: 430—436
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, *et al*, 2003. A novel WRKY transcription factor, *SUSIBA2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter [J]. *The Plant Cell*, 15: 2076—2092
- Trognitz F, Manosalva P, Gysin R, *et al*, 2002. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x *dihaploid S. tuberosum* hybrids [J]. *MPMI*, 15: 587—597
- Turck F, Zhou A, Somssich IE, 2004. Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene PcPR1-1 in Parsley [J]. *The Plant Cell*, 16: 2573—2585
- Ulker B, Somssich IE, 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. *Current Opin Plant Biol*, 7: 491—498
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, *et al*, 1999. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein [J]. *The Plant Cell*, 11: 1337—1349
- Wan J, Zhang S, Stacey G, 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin [J]. *Mol Plant Pathol*, 5: 125—135
- Wang Z, Yang P, Fan B, *et al*, 1998. An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defence response [J]. *Plant J*, 16: 515—522
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, *et al*, 2005. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, 137: 176—189
- Xu YH, Wang JW, Wang S, *et al*, 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (*1-d-cadinene synthase-A1*) [J]. *Plant Physiology*, 135: 507—515
- Yang P, Wang Z, Fan B, *et al*, 1999. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter [J]. *Plant J*, 18: 141—149
- Yoda H, Ogawa M, Yamaguchi Y, *et al*, 2002. Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants [J]. *Mol Genet Genomics*, 267: 154—161
- Yu D, Cen C, Li B, *et al*, 1999. Systemic acquired disease resistance and signal transduction in plant [J]. *Acta Bot Sin*, 41: 115—124
- Yu D, Chen C, Chen Z, 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding protein in the regulation of NPR1 gene expression [J]. *The Plant Cell*, 13: 1527—1539
- Zhang Y, Wang L, 2005. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. *BMC Evol Bio*, 5: 1—28
- Zhang ZL, Xie Z, Zou X, *et al*, 2004. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, 134: 1500—1513
- Zou X, Seemann JR, Neuman D, *et al*, 2004. A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 279: 55770—55779