

高表达水稻 *WRKY2* 基因影响拟南芥生长素信号传导*宋 钰^{1,2}, 刘冬梅^{1,2}, 余迪求^{1**}

(1 中国科学院西双版纳热带植物园植物分子实验室, 云南 昆明 650223;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 植物转录调控因子 *WRKY* 基因家族是一个拥有众多成员的超家族, 功能涵盖了植物生长发育的控制与抗病耐逆的调节。我们主要分析了 *OsWRKY2* 基因在外源植物拟南芥中的生物学功能。通过转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的遗传学研究发现外源高表达该基因不单明显地抑制转基因植株的顶端优势, 增强植株侧枝的生长, 还改变了转基因植株叶片和角果的发育。进一步分析证实, 高表达 *OsWRKY2* 基因所导致转基因拟南芥植株的表型和其它生理现象都与生长素信号通路改变所导致的表型和生理变化极其相近。这些结果说明 *OsWRKY2* 基因在外源植物拟南芥体内高表达后很可能改变了其正常的生长素信号通路。

关键词: *OsWRKY2*; 顶端优势; 生长素

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2008) 06- 699- 07

Overexpression of *OsWRKY2* Gene Causes Auxin Signaling Passway in *Arabidopsis*

SONG Yu^{1,2}, LIU Dong-Mei^{1,2}, YU Di-Qiu^{1**}

(1 Laboratory of Plant Molecular Biology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: The transcription factors *WRKY* protein superfamily are widely presented in plants. It is well known that a majority of the plant biological processes are modulated by *WRKY* transcription factors. And here we focused on *OsWRKY2*. Genetic analysis showed the apical dominance of 35S:*OsWRKY2* transgenic *Arabidopsis thaliana* was repressed and the transgenic plants had significantly more shoot branches comparing with the control plants. Besides the reduced apical dominance, the phenotypes, including curled leaves and short fruits in transgenic *Arabidopsis*, were similar to those of the characteristic mutants deficiency in auxin signal transduction. These results suggested that *OsWRKY2* played an important role in the auxin signaling pathway.

Key words: *OsWRKY2*; Apical dominance; Auxin

转录调控因子是一类通过调控下游靶基因的表达进而控制细胞代谢过程的一类蛋白质, 在植物生长发育和耐逆抗病过程中发挥极其重要的调节和控制作用 (余迪求等, 2006)。根据转录调控蛋白的结构特点可以将其分为若干个家族, 其中 *WRKY* 转录调控因子家族是一个多成员的大家族,

拟南芥拥有 72 个成员, 粳稻日本晴拥有 98 个成员, 中国籼稻 93-11 拥有 102 个成员 (Qiu 等, 2004; Ross 等, 2007)。*WRKY* 转录调控因子以其典型的保守结构域 *WRKYQK* 高亲和性地结合 DNA 的 W 盒 (C/TTGACT/C) 而自成一个家族 (Eulgen 等, 2000)。同时 *WRKY* 转录调控因子氨基酸序列

* 基金项目: 云南省基金项目 (2003C0342M)、国家自然科学基金 (3037803) 和中国科学院“百人计划”择优资助项目

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: ydq@xtbg.ac.cn

收稿日期: 2008-03-21, 2008-05-10 接受发表

作者简介: 宋钰 (1982-) 男, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 植物基因功能分析。

上毗邻 WRKY 域的还有一个 C_2H_2 的锌指结构, 这一结构特点类似乙烯应答因子 (ERF) 家族 (Gutterson 等, 2004)。与大多数 WRKY 蛋白不同, 拟南芥 WRKY 家族中的 AtWRKY50, AtWRKY51 和 AtWRKY59 的 WRKY 结构域序列为 WRKYGKK, 而水稻 WRKY 家族的一些成员中则出现新的 WRKY 结构域序列 WRKYGEK (Qiu 等, 2004)。

得益于水稻全基因组测序工作, 水稻 WRKY 基因家族成员的功能研究近年来取得了很大的进展。自 2000 年克隆到第一个水稻 WRKY 基因 *OsWRKY4* 后 (Kim 等, 2000), 已经发现近 20 个水稻 WRKY 基因受真菌性的稻瘟病诱导, 超过 10 个水稻 WRKY 基因受细菌性的白叶枯病诱导 (Ryu 等, 2006)。近年来又在水杨酸依赖的抗病信号途径中发现 *OsWRKY12* 和 *OsWRKY71* 处于 *OsNH1* 的上游 (Liu 等, 2005, 2007), 而 *OsWRKY45* 独立于 *OsNH1* 信号通路 (Shimono 等, 2007)。此外, 由我们实验室承担的水稻胁迫条件下相关 WRKY 转录调控因子基因的筛选工作预示一些水稻 WRKY 基因家族成员可能参与了水稻对环境胁迫因子的响应 (Qiu 等, 2004)。而新近发表的过表达 *OsWRKY100* 基因增强水稻对紫外辐射耐性的结果 (Wang 等, 2007) 和正在发表的转基因 *OsWRKY45* 增强拟南芥耐旱性的结果 (Qiu 等, 2008) 都从遗传学的角度证实了先前我们利用分子生物学手段对水稻 WRKY 转录因子参与植物耐逆性的预测。

WRKY 转录调控因子除了在植物抗病耐逆过程中发挥重要的生物学作用外, 还参与了植物发育过程的调控。如 AtWRKY44 (TTG2) 不单可以控制拟南芥表皮毛和种皮的发育 (Johnson 等, 2002), 还可以影响拟南芥表皮的分化和根毛的形成 (Ishida 等, 2007); 而 AtWRKY10 (MIN3) 则可以和其他基因一起控制拟南芥种子的发育 (Luo 等, 2005); 由美国内华达大学 Qingxi J. Shen 教授领导的小组发现在 α 淀粉酶基因表达的过程中, *OsWRKY51* 和 *OsWRKY71* 的表达受 ABA 抑制、GA 诱导 (Xie 等, 2005, 2006), 而它们的表达情况则会决定种子的发育和萌发 (Ross 等, 2007)。最新的结果显示一些 WRKY 基因在水稻中的表达是有组织特异性的, 预示它们在水稻发育过程中生物学功能的多样性 (Ramamoorthy 等,

2008), 而中国农业大学的郭泽建教授领导的小组也确实发现了 *OsWRKY55* 的过表达影响了水稻不定根的发育和转基因水稻的生长素反应 (Zhang 等, 2008)。

基于以上 WRKY 转录调控因子的重要作用, 我们利用分子生物学和反向遗传学的方法对 *OsWRKY72* (DAA50784) (Xie 等, 2005; Kato 等, 2007) 基因的异源高表达拟南芥进行了分析。已有的研究发现 *OsWRKY72*、*GWRKY01* 和 *AtWRKY75* 三者间存在较高的同源性 (Kato 等, 2007), 而在水稻糊粉层细胞内的 *OsWRKY72* 受 ABA 诱导但不受 GA_3 诱导 (Xie 等, 2005)。我们的结果显示 *OsWRKY72* 基因在水稻幼叶中的表达量较高。*OsWRKY72* 连接 35S 强启动子异源转化拟南芥发现随着其表达量的增强, 转基因植株出现明显的顶端优势减弱而产生了较多的分支, 此形态特征与空载体转基因植株相比差异明显。另外, 转基因拟南芥还出现成苗叶形变小且卷曲, 角果缩短并伴随部分败育等生理现象。进一步的分析发现 *OsWRKY72* 的高表达抑制了拟南芥生长素相关基因 *AXR1* 的表达。这些都预示 *OsWRKY72* 在植物形态建成过程中影响了其生长素信号通路。

1 材料和方法

1.1 植物材料

columbia 生态型的野生和转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 及烟草 (*Nicotiana tabacum* CV. Xanthi NC) 由本实验室长期种植。拟南芥种子表面灭菌后均匀散布在 1/2 MS 培养基 (含 0.9% agar), 4℃ 春化 3 天后转移到 24℃ 培养箱培养 5~7 天移栽到土里。培养条件为 22~24℃, 14 h 光照/10 h 黑暗, 湿度 40%。*japonica* 栽培种水稻 (*Oryza sativa*) 由云南农业大学李成云教授赠予, 和烟草一同在 28℃ 左右的温室生长。用于表达谱分析的水稻幼叶为萌发 4 周后收割所得, 其他部位均为水稻扬花时取材。野生型和转基因拟南芥生长 5 周后经 100 μ mol/L NAA 处理于相应时间点取材。

1.2 核酸的提取及 *OsWRKY72* cDNA 的克隆

japonica 生态型水稻 4 周幼苗和转基因拟南芥 3 周苗的总 RNA 提取方法依照 Logemann 等 (1987) 的报道。根据 NCBI 公布的序列设计用于 *OsWRKY72* cDNA 克隆的引物分别为 A: 5' cgcttcgaattctcaatctctct3', B: 3' gttacgggtacgggtgacatg5'; 用于 *OsWRKY72* 反转录 PCR (21 个循环) 的

引物为 A: 5' cgcttgaatttcaatctctct3', B: 3' ttctggcgacttctcca5'; 用于 *AtAXR1* 反转录 PCR (26 个循环) 的引物为 A: 5' gggtgaatgggatttatattctt3', B: 3' ttactgcaagtcgacttgg15'; 用于 *AtAtin2* 反转录 PCR (24 个循环) 的引物为 A: 5' attcagatgccagaagtcttg3', B: 3' ccttagcaagtgtctttacaag5'。首先将 RNA 用 DNase 处理, 再使用 2×10^{-7} g RNA 样品和 2×10^{-8} g 引物 B 进行反转录, 反转录产物取 1/10 体积进行 PCR。PCR 产物 DNA 电泳后片段回收。以上所用试剂均由 Fermentas 公司生产。

1.3 质粒构建与农杆菌转化

将上步克隆到的 *OsWRKY72* cDNA 连接至 pUGm-T Vector (Fermentas) 后测序。通过测序证实后再克隆到含 35S 启动子的高表达载体 (pca28) (Du and Chen, 2000) 上, 记作 35S:: *OsWRKY72*。另外我们将空载体转入拟南芥获得转基因植株作为对照, 记作 CK。农杆菌转化拟南芥按照 Clough and Bert (1998) 的花浸染法操作, 转化烟草按照 Horsch (1985) 的圆叶切片法操作。

1.4 Northern 杂交

使用 1.5% 甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶分离总 RNA 后, 转移到尼龙膜上。杂交温度为 68℃; 杂交液选用 Perfect HybTM Plus buffer (Sigma-Aldrich); 使用 *OsWRKY72* cDNA 全长做探针; 探针通过 klenow fragment (Takara) 进行 32 P-dATP 标记。洗膜: $2 \times$ SSC/0.5% SDS, 每次 10 min, 1 次; $0.5 \times$ SSC/0.1% SDS, 2 次, 每次 20 min; $0.1 \times$ SSC/0.1% SDS, 每次 20 min, 1 次。最后压片放射自显影。

2 结果与分析

2.1 *OsWRKY72* 基因的组织表达

利用 Northern 杂交技术, 我们对 *OsWRKY72* 基因在水稻各部位的表达情况进行了分析。用 *OsWRKY72* 全长 cDNA 作探针杂交后放射自显影, 结果显示 *OsWRKY72* 在叶片和花序中均有表达, 在幼叶中的表达量明显高于成熟叶、旗叶和老叶 (图 1)。Ramamoorthy (2008) 等新近的表达谱分析在证实上述结果可靠性的同时补充了该基因在幼苗根部表达较强而在成苗根部几乎不表达的结果。这些都说明 *OsWRKY72* 具有部位表达的特异性, 在生长旺盛的部位表达较强。

2.2 转基因拟南芥筛选

为了深入探讨 *OsWRKY72* 基因的生物学功能, 我们将 *OsWRKY72* 基因转化拟南芥。通过筛选, T1 代得到 19 株转基因植物, 其中 4 株未能得到种子。T2 代中# 19 表型与其他 14 株转基因植物明显不同, 经检测不表达 *OsWRKY72*。在剩

余 14 株转基因植株中, 我们分别选取了一株中等表达水平和一株高表达水平的转基因植株用于观察实验和数据采集, 并以转空载体的转基因植株为对照, 其它转基因植株主要用于定性观察。如图 2 所示, 株系 15 号为中等表达水平的转基因植株, 株系 17 号为高表达水平的转基因植株。

2.3 高表达 *OsWRKY72* 基因的转基因植物叶片向下卷曲

在转基因拟南芥的生长过程中, 我们发现高表达 *OsWRKY72* 基因的转基因植物莲座叶和茎生叶明显比转空载体的转基因植株小且幼嫩, 部分叶片叶尖明显下卷 (图 3: A)。通过激光共聚焦扫描显示: 与转空载体的转基因植株相比, 高表达 *OsWRKY72* 基因的转基因植株叶片表皮细胞未发生变化, 而栅栏层细胞变大且细胞间隙较疏松 (图 3: B, C)。这可能是高表达 *OsWRKY72* 基因的转基因植物叶片卷曲和变嫩的生理原因之一。

2.4 高表达 *OsWRKY72* 转基因植物的角果变短或者败育

在转基因拟南芥果实的发育过程中, 我们发现与转空载体的转基因植株相比, 高表达 *OsWRKY72* 基因的转基因植物角果长度明显较短, 且随着 *OsWRKY72* 表达量的增加, 高表达植株出现角果逐步缩短, 且败育果荚的数目增多 (图 4: A, B)。此结果说明高表达 *OsWRKY72* 影响了转基因拟南芥角果的发育和种子的形成。

2.5 高表达 *OsWRKY72* 基因降低转基因植物的顶端优势

纵观高表达 *OsWRKY72* 转基因植物整体形

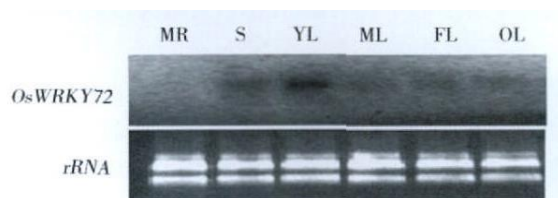


图1 *OsWRKY72* 基因的水稻组织定位
(MR: 成熟根; S: 小穗; YL: 幼叶; ML: 成熟叶;
FL: 旗叶; OL: 老叶)

Fig. 1 Spatial expression profiles of *OsWRKY72*. Transcript level of *OsWRKY72* was inspected by RNA gel blot analysis in different organs. Ethidium bromide staining of rRNA for the blot is displayed to demonstrate equal loading of RNA in each lane. (MR: mature root; S: spikelet; YL: young leaf; ML: mature leaf; FL: flag leaf; OL: old leaf)



图 2 拟南芥高表达 *OsWRKY72* 转基因植株的筛选
左一为转基因植株中 *OsWRKY72* 的表达情况，右图为野生型和各转基因植株 4 周龄苗的表型
Fig. 2 The screen of transgenic lines of 35S:: *OsWRKY72*. The left is transcript level of *OsWRKY72* in different lines, and the right is the phenotypes of wild type and transgenic lines at the age of 4 weeks

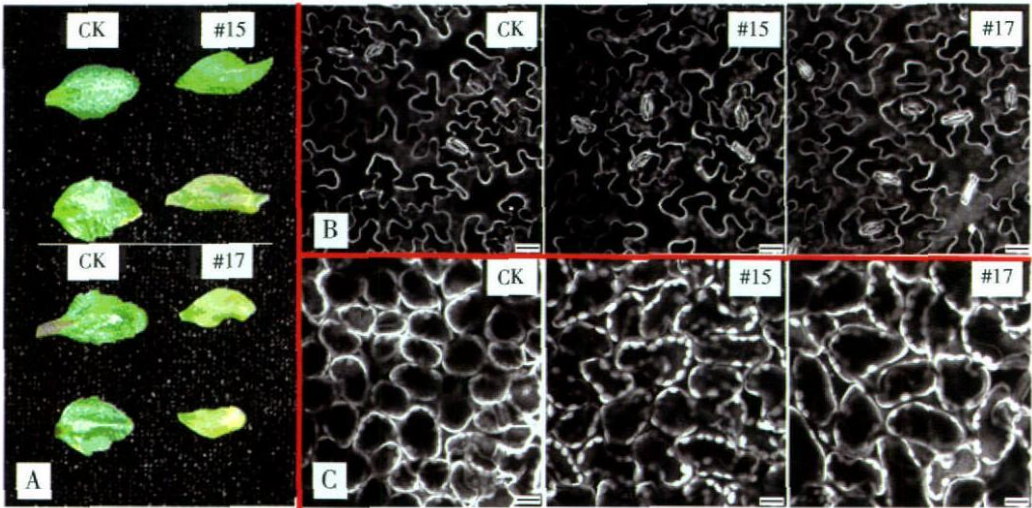


图 3 转基因拟南芥表现出的叶变小和叶卷曲现象及叶片共聚焦显微照
(A. 空载体与 *OsWRKY72* 转基因拟南芥茎生叶形态比较; B. 空载体与 *OsWRKY72* 转基因拟南芥叶表皮细胞的比较;
C. 空载体与 *OsWRKY72* 转基因拟南芥叶栅栏细胞的比较。Bars= 10 μ m)
Fig. 3 Morphological comparison of cauline leaf between vector and 35S:: *OsWRKY72* transgenic plants
(A: The cauline leaves of vector and 35S:: *OsWRKY72* transgenic plants; B: Normal stomata and epidermal cells;
C: Loose palisade cell clearance and increased palisade cell volume of transgenic lines. Bars= 10 μ m)

态，与转空载体的植株相比，侧枝的发育较转空载体的转基因植株强盛，主枝与侧枝的明显差异消失（图 5: A）。经统计发现随 *OsWRKY72* 的表达量增加，高表达 *OsWRKY72* 转基因植物侧枝的分支数明显的较转空载体的转基因植物增多（图 5: B）。众所周知，植物顶芽会不同程度的抑制腋芽的生长，而这一特性在高表达 *OsWRKY72* 转基因植物上明显发生改变，即其顶端优势现象明显受到抑制。另外这一现象在转基因烟草中也得到了重复，图 5C 显示转基因烟草的侧芽发育明显较对照强。

3 讨论

植物顶端优势的改变在一定程度上反映了其生长素信号通路的变化（McSteen and Leyser, 2005），而现已普遍认为生长素可以促进一些器官细胞的伸长（Jones, 1994）和调控叶片的发育（李林川和瞿礼嘉, 2006），更加明确的是生长素信号通路受阻会强烈影响种子的形成和果实的发育（Wang 等, 2005; Goetz 等, 2006），因而上述叶片向下卷曲、角果发育不良、顶端优势降低的现象暗示高表达 *OsWRKY72* 可能影响了转基因植物的生长素信号通路。

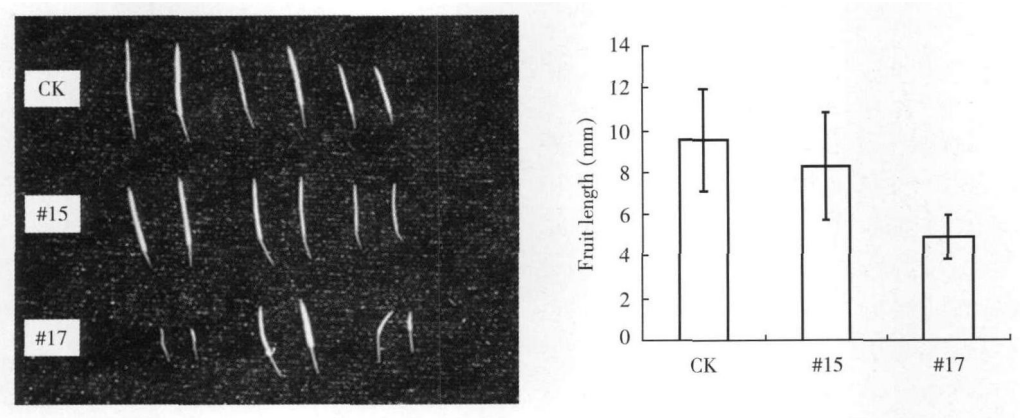


图4 转基因拟南芥角果的发育情况及长度统计 (Mean±SD, n= 50)

Fig. 4 Morphological and statistical comparison of fruit phenotype and length between vector and 35S:: OsWRKY 72 transgenic plants (Figures represent the means±SD from at least 50 Fruits for each line)

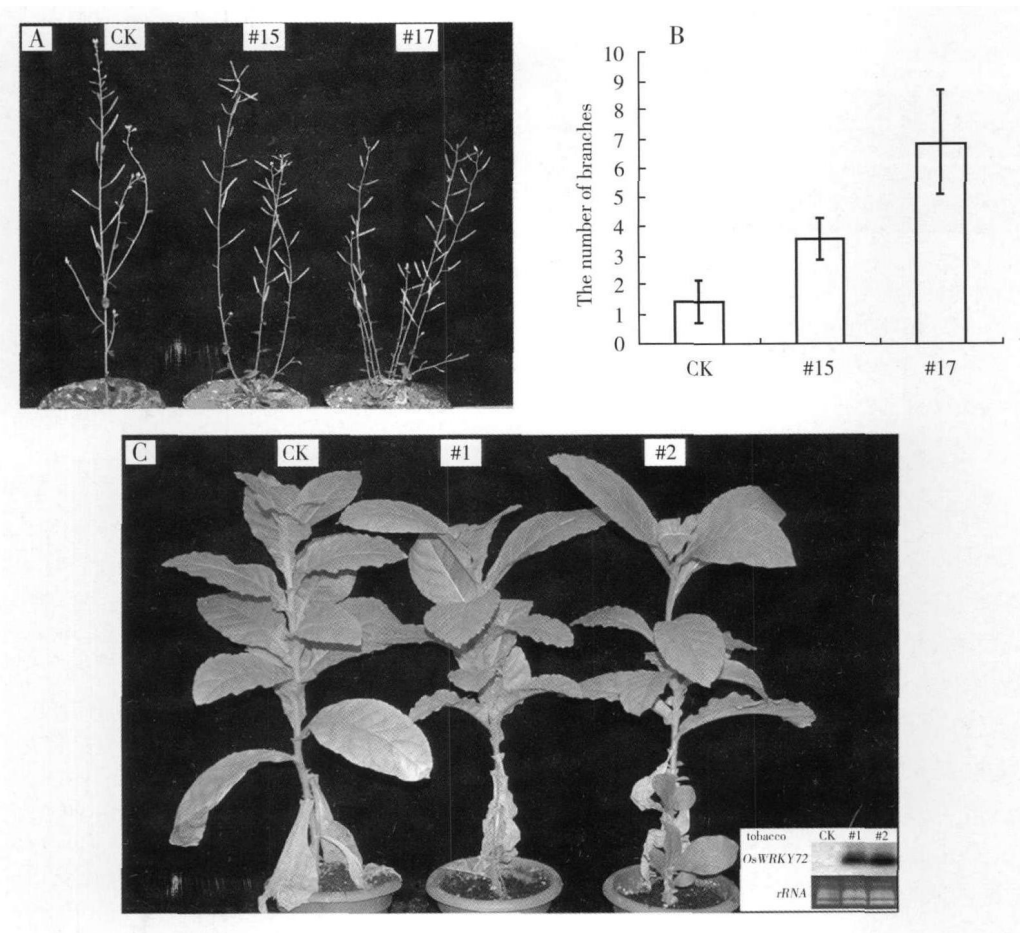


图5 转基因拟南芥和烟草表现的顶端优势减弱, 侧枝增多情况 (Mean±SD , n= 25)

Fig. 5 The increased branches of transgenic *Arabidopsis* and tobacco in morphological and statistical comparison (Figures represent the means±SD from at least 25 plants for each line)

另外 *OsWRKY72* 基因在生长旺盛的幼嫩组织 影响植物生长发育的激素是否能有效地调控其表 强烈表达 (图 1) 的事实促使我们想进一步探讨 达水平? 而事实上根据 Xie 等 (2005) 和 Rama-

moorthy 等 (2008) 的表达谱分析发现 *OsWRKY72* 确实受 ABA 和 IAA 的诱导, 因此我们推测 *OsWRKY72* 可能参与了脱落酸和生长素的信号途径。进一步调查生长素信号通路相关基因的突变体后我们发现, 35S:: *OsWRKY72* 植株的表型确实很大程度的与 *bud1* (Dai 等, 2006)、*axr1* (Lincoln 等, 1990)、*aux1* (Cernac 等, 1997)、*atmdr1-1* *atpgp1* (Noh 等, 2001) 等突变体表型高度相近。为此我们检测了 *AXR1* 基因在 35S:: *OsWRKY72* 植株抽苔后的表达情况, 结果发现它在 35S:: *OsWRKY72* 植株的表达量比在野生型的表达量低 (图 6)。由此我们推断是否是以 *AXR1* 基因为代表的生长素相关基因因 *OsWRKY72* 基因的高表达而受抑制进而导致相关表型的出现。

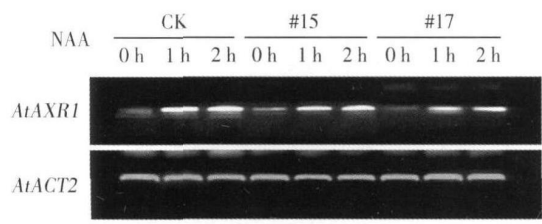


图 6 1μM NAA 处理过程中 35S:: *OsWRKY72* 转基因拟南芥中 *AXR1* 基因的表达情况。(Actin 为内标)

Fig. 6 Expression of *AXR1* in 35S:: *OsWRKY72* transgenic plants treated with or without 1μmo/L NAA. The actin gene was used as an internal standard

植株侧芽发育增强及叶卷曲等现象与 *AXR1* 和 *BUD1* 基因的变化相关联 (Stimberg 等, 1999; Dai 等, 2006)。而 *BUD1* 基因编码 MAPKK7 激酶, 可以在上游负调控 *AXR1*、*AUX1*、*MDR1* 和 *PGP1* 等基因的表达 (Dai 等, 2006)。MAPKK 激酶家族共有 10 个成员, 与 60 个 MEKK 激酶和 21 个 MAP 激酶共同组成三级磷酸化级联网络 (MAPK group, 2002)。现已在拟南芥中发现 MAPK 成员和 WRKY 成员间可以相互作用, 如 MEKK1 在蛋白水平和转录水平上都可以直接和 WRKY53 发生相互作用进而影响衰老和抗病信号通路 (Miao 等, 2007), MAPK4 可以在转录水平上调控 WRKY25 和 WRKY33 进而影响抗逆信号通路 (Andreasson 等, 2005), MEKK1、MKK4/MKK5、MPK3/MPK6 组成的级联体系很可能在上游调控 WRKY22 和 WRKY29 (Asai 等, 2002)。对

突变体进行诱导发现 WRKY33 和 WRKY53 与处于其上游的 MPK6/MPK3 之间具有强烈的关联性 (Wan 等, 2004)。另外 *bud1* 是一个 *BUD1* 基因过表达的突变体 (Dai 等, 2006), 它和高表达 *OsWRKY72* 的转基因植株以及 *axr1* 敲除突变体表型和生理变化十分相近, 暗示 WRKY 转录因子和 MAPKK7 直接或者间接的调控或者影响下游生长素极性运输相关基因进而产生与它们突变体相近的表型。

综合以上证据和推论我们认为 *OsWRKY72* 基因确实影响了生长素极性运输信号通路, 它的高表达很可能通过与 MEKK7 互作直接或者间接的调控生长素极性运输相关基因, 从而造成生长素的信号通路自身节点蛋白的变化进而影响生长素指导的生长发育, 特别是影响植物顶端优势。而对这一现象形成的分子机制做进一步的研究探索将有利于我们对植物顶端优势等的生长素反应的认识和利用。

致谢 图片的摄影和文献的整理工作得到了陈征、高洁和赖茵同学的热心协助。

[参 考 文 献]

Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P *et al.*, 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses [J]. *The EMBO J*, **24**: 2579—2589

Asai T, Tena G, potnikova J *et al.*, 2002. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity [J]. *Nature*, **415**: 977—983

Cernac A, Lincoln C, Lammer D *et al.*, 1997. The SAR1 gene of *Arabidopsis* acts downstream of the *AXR1* gene in auxin response [J]. *Development*, **124**: 1583—1591

Clough SJ, Bent AF, 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, **16**: 735—743

Dai Y, Wang H, Li B *et al.*, 2006. Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, **18**: 308—320

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

Eugene T, Rushton PJ, Robatzek S *et al.*, 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Sci*, **5**: 199—206

- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD *et al.*, 2006. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, **18**: 1873—1886
- Gutterson N, Rehner TL, 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors [J]. *Current Opinion in Plant Biol*, **7**: 465—471
- Horsch RB, 1985. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, **217**: 1229—1231
- Ishida T, Hattori S, Sano S, 2007. *Arabidopsis* TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation [J]. *Plant Cell*, **19**: 2531—2543
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR, 2002. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Tridome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor [J]. *Plant Cell*, **14**: 1359—1375
- Jones AM, 1994. Auxin-Binding Proteins [J]. *Annu Rev Plant Phys*, **45**: 393—420
- Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y *et al.*, 2007. Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* [J]. *Plant & Cell Physiol*, **48**: 8—18
- 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
- Li LC (李林川), Qu LJ (瞿礼嘉), 2006. Regulation of leaf development by Auxin in *Arabidopsis* [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, **23**: 459—465
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M, 1990. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, **2**: 1071—1080
- Liu XQ, Bai XQ, Wang XJ *et al.*, 2005. OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1 [J]. *Cell Res*, **15**: 593—603
- Liu XQ, Bai XQ, Wang XJ *et al.*, 2007. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response [J]. *J Plant Physiol*, **164**: 969—979
- Logemann J, Schell J, Wilmutter L, 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues [J]. *Anal Biochem*, **163**: 16—20
- Luo M, Dennis ES, Berger F, 2005. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis* [J]. *PNAS*, **102**: 17531—17536
- MAPK group, 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature [J]. *Trends in Plant Sci*, **7**: 301—308
- McSteen P, Leyser O, 2005. Shoot Branching [J]. *Annu Rev Plant Biol*, **56**: 353—374
- Miao Y, Laun TM, Smykowski A *et al.*, 2007. *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter [J]. *Plant Mol Biol*, **65**: 63—76
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP, 2001. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin mediated development [J]. *Plant Cell*, **13**: 2441—2454
- Qiu YP, Jing SJ, Fu J *et al.*, 2004. Cloning and analysis of expression profile of 13 WRKY genes in rice [J]. *Chin Sci Bull*, **49**: 2159—2168
- Qiu YP, Yu DQ, 2008. Overexpression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Environ Exp Bot*, publishing
- Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N *et al.*, 2008. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments [J]. *Plant Cell Physiol*, **49**: 865—879
- Ross CA, Liu Y, Shen QJ, 2007. The WRKY gene family in rice [J]. *J Integrative Plant Biol*, **49**: 827—842
- Ryu HS, Han M, Lee SK *et al.*, 2006. A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response [J]. *Plant Cell Rep*, **25**: 836—847
- Shimono MS, Sugano SS, Nakayama A *et al.*, 2007. Rice WRKY45 plays a crucial role in Benzothiadiazole-inducible blast resistance [J]. *Plant Cell*, **19**: 2064—2076
- Stirnberg P, Chatfield SP, and Leyser HMO, 1999. AXRL acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, **121**: 839—847
- Wan JR, Zhang SQ, Stacey G, 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin [J]. *Mol Plant Pathol*, **5**: 125—135
- Wang H, Jones B, Li ZG *et al.*, 2005. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis [J]. *Plant Cell*, **17**: 2676—2692
- Wang HH, Hao JJ, Cheng XJ *et al.*, 2007. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants [J]. *Plant Mol Biol*, **65**: 799—815
- 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
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X *et al.*, 2006. Interactions of two abscisic acid-induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells [J]. *Plant J*, **46**: 231—242
- Yu DQ (余迪求), Chen LG (陈利钢), Zhang LP (张利平), 2006. Transcription factor WRKY superfamily: origin, structure and function [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, **28**: 69—77
- Zhang J, Peng YL, Guo ZJ, 2008. Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants [J]. *Cell Res*, **18**: 508—521