

## 拟南芥 *WRKY2* 转录调控因子可能参与调控渗透胁迫反应

江文波<sup>1,2</sup>, 余迪求<sup>1</sup>

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 拟南芥 *WRKY2* 蛋白定位于细胞核, 表明 *WRKY2* 是转录调控因子。 *WRKY2* 在不同器官组织中的表达分析显示在叶的表达量是最高的。在各种逆境条件下的表达分析显示: *WRKY2* 的表达受 NaCl 和甘露醇比较强的诱导; KCl、LiCl、CaCl<sub>2</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 均不诱导 *WRKY2* 的表达; ABA 处理基本上不影响 *WRKY2* 基因的表达; 另外, *WRKY2* 的表达也不受病原菌、冷害和高温的诱导。这些结果表明 *WRKY2* 可能在 NaCl 和甘露醇引起的渗透胁迫反应中起一定的作用。

关键词: *AtWRKY2*; 转录调控因子; NaCl; 甘露醇; 渗透胁迫

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 05-427-06

## *Arabidopsis WRKY2* Transcription Factor may be Involved in Osmotic Stress Response

JIANG Wen-Bo<sup>1,2</sup>, YU Di-Qiu<sup>1\*\*</sup>

(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;*

2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** The fact that *Arabidopsis WRKY2* protein was nuclear-localized supported that *WRKY2* functioned as a transcription factor. The expression levels of *WRKY2* in leaves were the highest in all tissues. The expression profile indicated that the expression levels of *WRKY2* were elevated by NaCl and mannitol treatments, while which were not induced by other treatments including KCl, LiCl, CaCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pathogenic germs, cold, heat and ABA. These results suggested that *WRKY2* might be involved in osmotic stress induced by NaCl and mannitol.

**Key words:** *AtWRKY2*; Transcription factor; NaCl; Mannitol; Osmotic stress

转录调控因子 *WRKY* 基因家族是植物特有的超级基因家族, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现了 70 多个成员 (Dong 等, 2003; Eulgem 等, 2000, 2007)。 *WRKY* 蛋白质含有高度保守的氨基酸序列 *WRKYGQK* 和 Cys<sub>2</sub> His<sub>2</sub> 或 Cys<sub>2</sub> HisCys 锌指型结构 (Dong 等, 2003; Eulgem 等, 2000)。 *WRKY* 蛋白质通过特异地结合靶基因启动子区域的特异序列 TGACC (A T) (W 盒) 而调节靶基因的表达 (Ulker and Somssich, 2004; Yu 等, 2001)。

许多研究表明 *WRKY* 基因调控植物生物逆境反应。有许多 *WRKY* 基因调控水杨酸介导的抗病反应 (Asai 等, 2002; Chen and Chen, 2000; Dellagi 等, 2000; Eulgem 等, 2000; Kim 等, 2000), 除此之外, *WRKY* 基因也参与了伤害反应的调控 (Hara 等, 2000)。 *WRKY* 基因还调控植物非生物抗逆性反应。如冻害 (Huang and Duman, 2002)、冷害 (Seki 等, 2002)、高温 (Rizhsky 等, 2002)、氧化胁迫 (Rizhsky 等, 2004)、干旱 (Pnueli 等,

基金项目: 国家高科技研究发展计划 (863 计划) (2006AA02Z129)、中国科学院“百人计划”择优支持、云南省自然科学基金 (2003C0342M) 和中国科学院基金项目 (KSCX2-YW-N-007)

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

收稿日期: 2009-03-12, 2009-05-06 接受发表

作者简介: 江文波 (1977-) 男, 在读博士研究生, 主要从事植物基因功能分析研究。E-mail: jwb2001108@163.com

2002; Rizhsky 等, 2002) 及盐害 (Jiang and Deyholos, 2009; Seki 等, 2002) 等。WRKY 基因调控植物的代谢, 例如花青素和淀粉的合成 (Johnson 等, 2002; Sun 等, 2003)。也有一些研究表明, WRKY 基因调控植物的生长发育, 如胚胎 (Lagace and Matton, 2004)、种子大小 (Luo 等, 2005)、种皮和毛状体的发育 (Ishida 等, 2007; Johnson 等, 2002)、衰老 (Hinderhofer and Zentgraf, 2001; Miao and Zentgraf, 2007; Robatzek and Somssich, 2001) 等。

Dong 等 (2003) 的研究表明: WRKY2、WRKY34 和 WRKY44 的氨基酸序列的相似性程度高, WRKY34 特异地在小孢子和雄配子体中表达 (Honys 等, 2006)。到目前为止, WRKY2 基因功能方面的研究未见报道。我们按照反向遗传学的研究思路, 分析基因的表达谱, 以初步推测基因的功能。实验结果表明 WRKY2 可能在 NaCl 和甘露醇引起的渗透胁迫反应中起一定的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验使用的拟南芥为野生哥伦比亚生态型 (*Arabidopsis thaliana* Col.), 拟南芥种子表面灭菌后均匀散布在 MS 培养基 (含 0.7% agar), 4 春化 3 天后转移到 22 培养箱培养 5 天移栽到土里。培养条件为 22, 相对湿度 50%, 光照周期 10 光照 14 黑暗 (光照时间 8:30 ~ 18:30)。用于各种逆境处理表达分析的野生型叶片为 3 周苗龄, 处理后液氮冷冻 -80 保存。各器官组织的材料从同一批种植的野生型获得。用于亚细胞定位分析的烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 生长条件与拟南芥一样。用 4 周苗龄的叶片用于注射农杆菌。

### 1.2 核酸的提取及 *AtWRKY2* cDNA 的克隆

用 TRIZOL 试剂盒 (BRL Life Technologies, Rockville, MD) 提取总 RNA。根据 NCBI 公布的 AT5G56270 序列设计用于 WRKY2 cDNA 克隆的引物分别为 A: 5-AAACCATGGCTGGTTTTGATGAAAATG-3, B: 5-AAAGGATCCTCAATCTGAGGTAATCTACTCATGA-3。首先将 RNA 用 DNA 酶处理, 再使用 2  $\mu$ g RNA 样品和引物 B 进行反转录, 反转录产物取 1  $\mu$ l 进行 PCR。PCR 产物 DNA 电泳后片段胶回收。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

为了在 *E. coli* 表达 WRKY2 蛋白, 用 NcoI 和 BamHI 酶切 WRKY cDNA 后插入 pET-32a 表达载体 (Novagen), 然后转入 BL21 (DE3)。为了检测 WRKY2 蛋白的亚细胞定位, 首先用

引物 5-AAACCATGGGGATCCGAGATGGTGAGCAAGGGCGA-3, 5-AAATCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3, 以 pBIEGFP (Clontech) 载体为模板扩增出 EGFP 片段, 然后用引物 5-AAACCATGGCTGGTTTTGATGAAAATG-3 和 5-AAAGGATCCAATCTGAGGTAATCTACTC-3 获得 WRKY2 cDNA, 用 NcoI 和 BamHI 酶切插入在 EGFP 的 5 端。构建表达载体, 转入 *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101)。

### 1.4 亚细胞定位

将含有 WRKY2-EGFP 和 EGFP 的 *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101) 在 LB (含有 10 mmol L<sup>-1</sup> MES 和 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮) 中培养过夜, 离心后重新悬浮在 10 mmol L<sup>-1</sup> MES-NaOH, pH 5.6 和 10 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 中。调整溶液的 OD600 为 0.5, 然后加入乙酰丁香酮使其浓度为 150  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, 在 22 保育 2 h。将准备好的农杆菌直接注射入烟草叶片, 40 h 后用激光共聚焦显微镜观测结果。

### 1.5 Northern 杂交

3 周苗龄的叶片用 NaCl (300 mmol L<sup>-1</sup>), mannitol (300 mmol L<sup>-1</sup>), ABA (100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), KCl (300 mmol L<sup>-1</sup>), LiCl (40 mmol L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (100 mmol L<sup>-1</sup>) 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (300 mmol L<sup>-1</sup>) 采用离体水溶液浸泡处理。PS-DC3000 处理: 采用 10 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 稀释到 OD600 = 0.001, 活体注射。冷害采用 0 黑暗条件下离体处理, 高温处理采用 42 活体处理。用 TRIZOL 试剂盒 (BRL Life Technologies, Rockville, MD) 提取总 RNA。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 Hyb<sup>TM</sup> Plus buffer (Sigma-Aldrich); 使用 WRKY2 cDNA 的后 1 000 bp 做探针; 探针通过 klenow fragment (Takara) 进行<sup>32</sup>P-dATP 标记。洗膜: 2  $\times$  SSC 和 0.5% SDS, 每次 10 min, 1 次; 0.5  $\times$  SSC 和 0.1% SDS, 2 次, 每次 20 min; 0.1  $\times$  SSC 和 0.1% SDS, 每次 20 min, 1 次。最后压片放射自显影。

### 1.6 定量 RT-PCR

从 4 周苗龄的野生型拟南芥获得了根、茎、叶、花和荚果, 用 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA, 并进行 DNase 消化, 用来进行定量 RT-PCR 实验。定量 RT-PCR 的引物为 WRKY2 (AT5G56270): 5-TTCTTTGGGTTACGATG-3 和 5-CACAACAACCTCTGGCTC-3; ACT2 (AT3G18780): 5-TGTGCCAATCTACGAGGGTTT-3 和 5-TTCCCGCTCTGCTGTTGT-3。反转录总体系为 20  $\mu$ l 包含 1  $\mu$ g 总 RNA, 每个反转录产物用水稀释 20 倍, 然后取 2  $\mu$ l 用作 PCR 模板, 其它反转录产物 -80 保存。定量 PCR 的反应体 (10  $\mu$ l): 1  $\mu$ l SYBR Green I 反应混合物, 3 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 每条引物各 0.5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 和 2  $\mu$ l cDNA。退火温度为 50, 在 Roche LightCycler real-time PCR 仪上进行了定量 PCR 实验。整个定量 PCR 实验用不同的 RNA 样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 WRKY2 基因的蛋白结构和亚细胞定位

拟南芥 WRKY2 蛋白由 687 氨基酸组成，分子量为 74.561 kD，预测的等电点为 5.71。WRKY2 蛋白质含有 2 个高度保守的氨基酸序列 WRKYGQK 和 2 个 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 锌指型结构（图 1）。WRKY2 作为一个转录调控因子，它的蛋白可能定位于细胞核

里。序列分析表明 WRKY2 具有一个典型的核定位信号（图 1）。为了检测 WRKY2 蛋白的亚细胞定位，我们构建了 WRKY2-EGFP 表达载体，农杆菌直接注射烟草（*Nicotiana benthamiana*），激光共聚焦显微镜观测显示：EGFP 蛋白在细胞质和细胞核里均大量存在，而 WRKY2-EGFP 融合蛋白特异地定位于细胞核（图 2）。

```
MAGFDENVAVMGEWVPRSPSPGTLFSSAIGEEKSSKRVLERELSLNHGQVIGLEEDTSSN
HNKDSSQSNVFRGGLSERIAARAGFNAPRLNTENIRTNTDFSIDSNLRSPCLTISSPGLSPAT
LLESPVFLSNPLAQPSPPTTGKFPFLPGVNGNALSSSEKAKDEFFDDIGASFHFPVSRSSSSFF
QGTTEMMSVDYGNYNRSSHQSAEEVKPGSENISSNLYGIETDNQNGQNKTSQVTTN
TSLETVDHQEEEEEQRRGDSMAGGAPAEADGYNWRKYGQKLVKGSEYPRSYKCTNPNC
QVKKKVERSREGHITEIYKGAHNHLKPPPNRRSGMQVDGTEQVEQQQQQRDSAATWVS
CNNTQQQGGSNENNVEEGSTRFEYGNQSGSIQAQTGGQYESGDPVVVDASSTFSNDED
EDDRGTHGSVSLGYDGGGGGGGGEGDESESKRRKLEAFAAEMSGSTRAIREPRVVVQTT
SDVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTAPGCTVRKHVERASHDLKSVITTYE
GKHNDVPAARNSSHGGGGDSGNGNSGGSAAVSHHYHNGHHSEPPRGRFDRQVTTNNQ
SPFSRPFQPHLGPPSGFSFGLGQTGLVNLSPGLAYGQKMPGLPHPYMTQPVGMSEA
MMQRGMPEKVEPVSDSGQSVYNQIMSRLPQI
```

图 1 WRKY2 蛋白的序列分析

WRKY2 的氨基酸序列。高度保守的 WRKYGQK 和 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 用红色显示，核定位信号用下划线标出

Fig . 1 Sequences of WRKY2

Amino acid sequence of WRKY2 . The highly conserved WRKYGQK sequences and the residues forming the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-fingers are in red . The putative nuclear localization signals are underlined

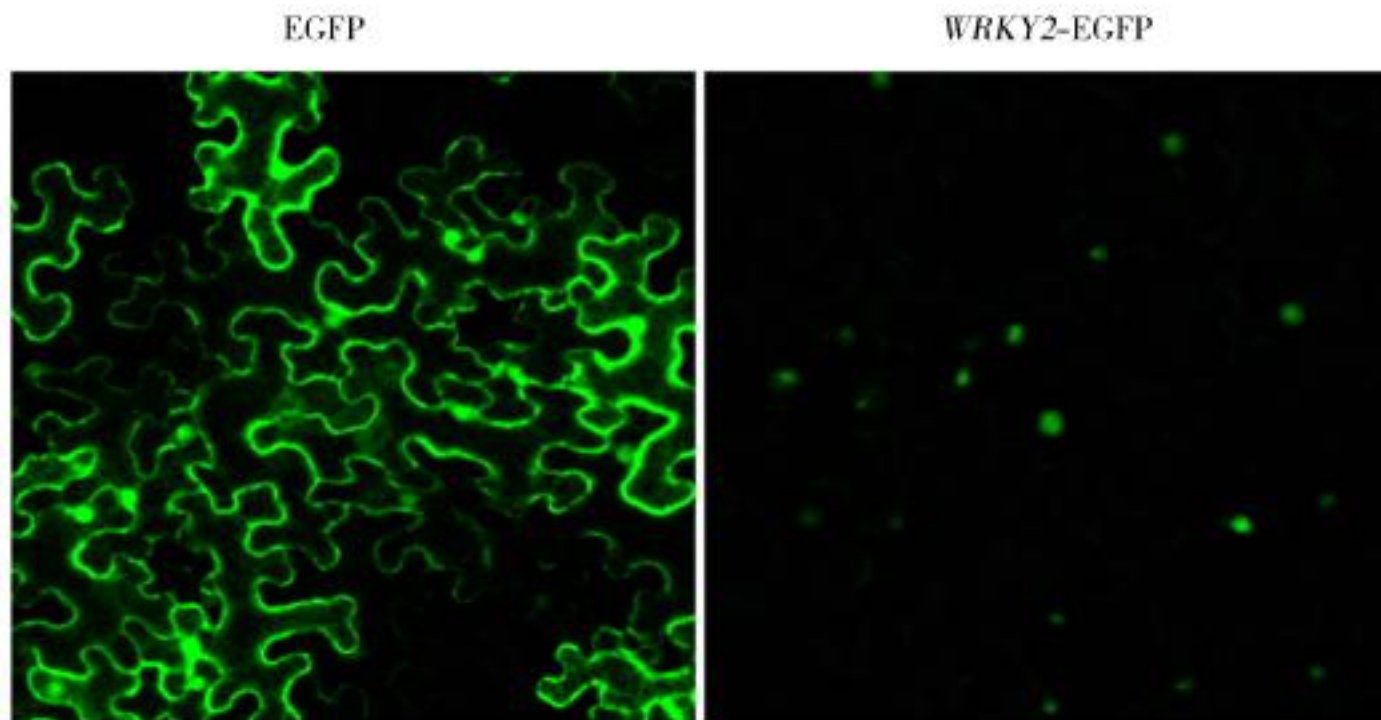


图 2 WRKY2 的亚细胞定位

WRKY2 和 EGFP 融合产生 WRKY2-EGFP。WRKY2-EGFP 融合蛋白定位于烟草叶表皮细胞的细胞核。而 EGFP 在细胞核和细胞质里均有分布

Fig . 2 Subcellular localization of WRKY2

WRKY2 was fused to EGFP to yield WRKY2-EGFP . The chimeric protein was localized to the nucleus of *N. benthamiana* leaf epidermal cells . EGFP alone was detected in both the nucleus and the cytoplasm due to its small size

## 2.2 拟南芥 *WRKY2* 在不同植物器官组织中的表达分析

鉴于在正常生长的情况下, *WRKY2* 的表达水平比较低, 我们采用定量 PCR 检测 *WRKY2* 在不同器官组织中的表达。*WRKY2* 在根、茎、叶、花和荚果中都有表达, 相对来说, 在叶里的表达量是最高的, 茎和花里的表达量次之, 根和荚果里的表达最低 (图 3)。

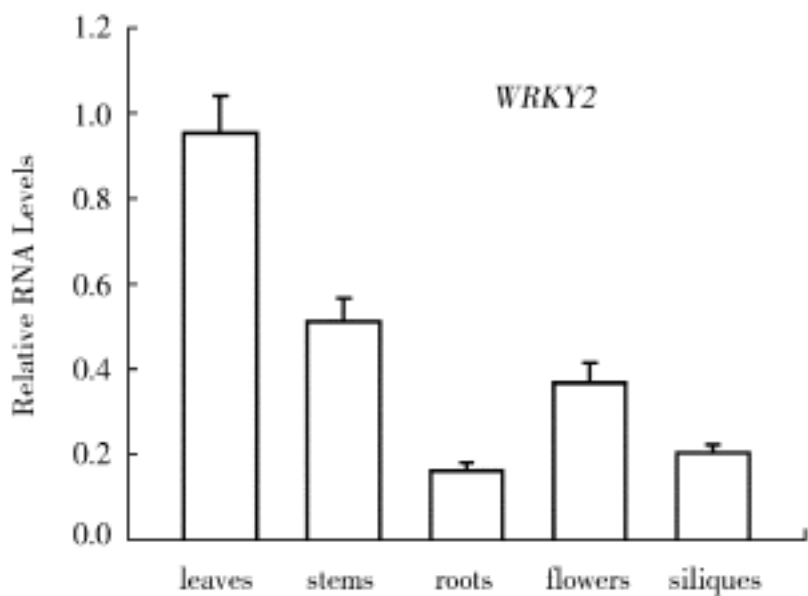


图 3 *WRKY2* 在不同器官组织中的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *WRKY2* in different organ and tissue

## 2.3 拟南芥 *WRKY2* 在各种逆境条件下的表达分析

为了研究 *WRKY2* 基因的功能, 我们分析了 *WRKY2* 在各种逆境下的表达。由于 *WRKY2* 基因的表达在叶里是最高的, 我们以叶为处理材料。首先分析了 *WRKY2* 基因对 NaCl 的响应, 结果显示: *WRKY2* 的表达受 NaCl 比较强的诱导 (图 4)。有文献报道 NaCl 主要有两方面的作用, 一方面是离子的胁迫作用, 另一方面是引起渗透胁迫 (Borsani 等, 2001; Hasegawa 等, 2000)。因此, 我们用特异引起渗透胁迫的甘露醇和一些其它的盐来处理材料, 以明确究竟是渗透胁迫还是离子的作用来诱导 *WRKY2* 的表达的。结果显示: *WRKY2* 的表达不受 KCl、LiCl、CaCl<sub>2</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的诱导, 而受甘露醇比较强的诱导 (图 4)。有研究表明 ABA 在渗透胁迫反应中起重要的调控作用 (Leung and Giraudat, 1998; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。因此我们鉴定了 ABA 处理对 *WRKY2* 表达的影响。实验数据表明: ABA 处理基本上不影响 *WRKY2* 基因的表达 (图 4)。另外,

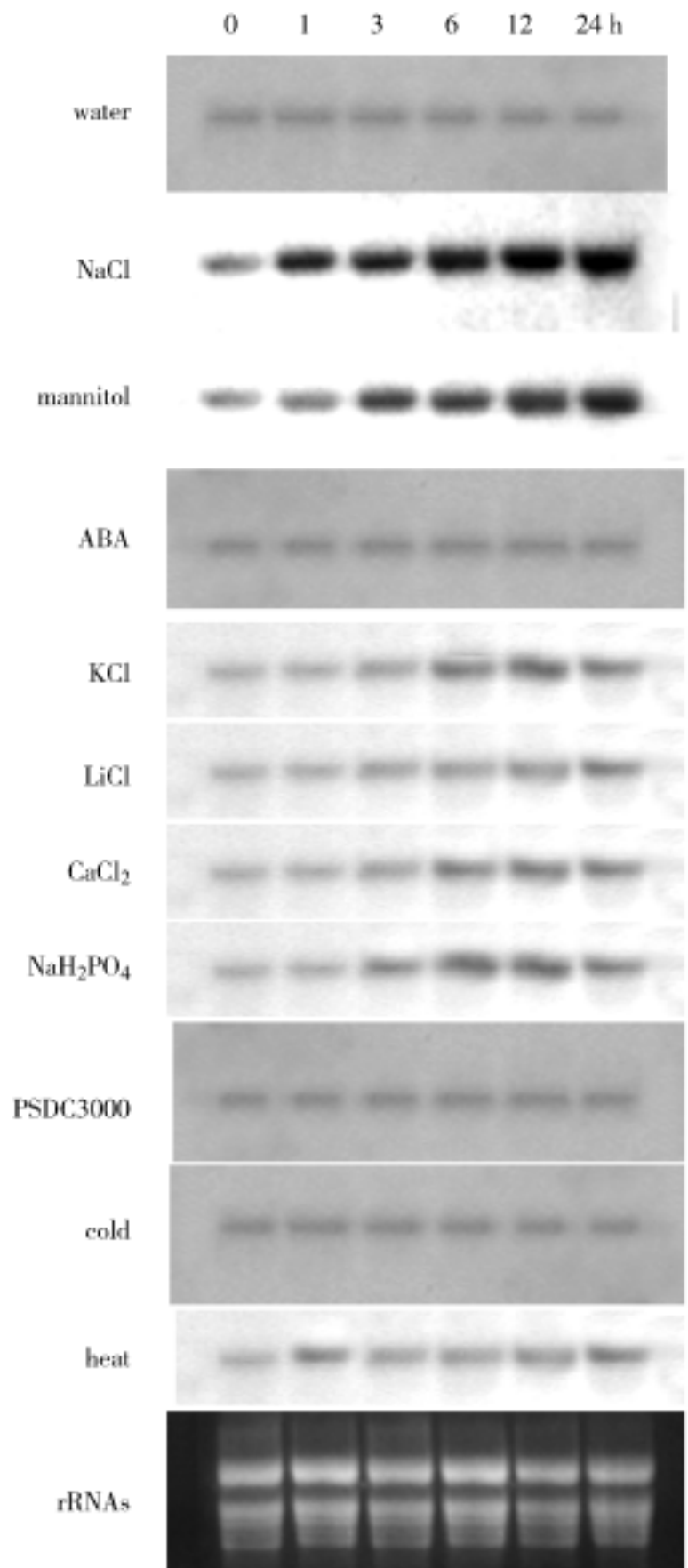


图 4 *WRKY2* 在各种逆境条件下的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *WRKY2* by different stress treatments

*WRKY2* 的表达也不受病原菌、冷害和高温的诱导。综上所述, *WRKY2* 受 NaCl 和甘露醇的诱导, *WRKY2* 可能在 NaCl 和甘露醇引起的渗透胁迫中起一定的作用。

## 3 讨论

本研究分析了 *WRKY2* 蛋白的结构, 其含有 2 个高度保守的氨基酸序列 WRKYGQK 和 2 个 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 锌指型结构; 在体外证实了 *WRKY2* 蛋

白与 TTGACC (W 盒) 特异地结合; 进一步明确 WRKY2 蛋白定位于细胞核, 这些结果支持了 WRKY2 是转录调控因子。

采用定量 RT-PCR 检测了 WRKY2 在不同器官组织中的表达, 结果显示 WRKY2 在根、茎、叶、花和荚果中均有表达, 但在叶中的表达量最高, 茎和花中的表达量次之, 根和荚果里最低。

我们以叶为处理材料, 进行了 WRKY2 在各种逆境条件下的表达分析, 实验数据表明: WRKY2 的表达受 NaCl 比较强的诱导; KCl、LiCl、CaCl<sub>2</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 均不诱导 WRKY2 的表达; 但 WRKY2 的表达受甘露醇比较强的诱导; ABA 处理基本上不影响 WRKY2 基因的表达; 另外, WRKY2 的表达也不受病原菌、冷害和高温的诱导。由于 WRKY2 的表达受 NaCl 比较强的诱导, 而现有文献报道表明 NaCl 主要有两方面的作用, 即离子的胁迫作用和引起渗透胁迫反应 (Borsani 等, 2001; Hasegawa 等, 2000)。那么究竟是那方面的作用来诱导 WRKY2 的表达呢? 为此, 我们用特异引起渗透胁迫的甘露醇和一些其它的盐来处理材料, 以明确是渗透胁迫还是离子的作用来诱导 WRKY2 的表达的。由于其它盐基本不诱导 WRKY2 的表达, 而甘露醇很明显的诱导其表达, 因此, 我们认为渗透胁迫可能在诱导 WRKY2 表达中起重要的作用。

有文献也报道了 ABA 在调控渗透胁迫反应中起重要的作用 (Leung and Giraudat, 1998; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006), 而我们的结果表明 ABA 处理基本上不影响 WRKY2 基因的表达。因此, NaCl 和甘露醇诱导的 WRKY2 的表达可能与 ABA 信号传导途径无关。通过表达分析表明 WRKY2 可能在 NaCl 和甘露醇引起的渗透胁迫反应中起一定的作用, 但 WRKY2 基因究竟是如何在这个反应中发挥作用仍然很不清楚。

致谢 Zhixiang Chen 教授 (Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA) 赠送了 T-DNA 插入的 *wrky2-2* 突变体 (Sail-739-F05)。

### 【参 考 文 献】

- Asai T, Tena G, Plotnikova J *et al.*, 2002 . MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity [J] . *Nature*, 415: 977—983
- Borsani O, Cuartero J, Fernandez JA *et al.*, 2001 . Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance [J] . *The Plant Cell*, 13: 873—888
- Chen C, Chen Z, 2000 . Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco [J] . *Plant Molecular Biology*, 42: 387—396
- Dellagi A, Heilbronn 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 coregulated with class I endochitinase expression [J] . *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 1092—1101
- Dong J, Chen C, Chen Z, 2003 . Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response [J] . *Plant Molecular Biology*, 51: 21—37
- Eulgem T, Somssich IE, 2007 . Networks of WRKY transcription factors in defense signaling [J] . *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 366—371
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S *et al.*, 2000 . The WRKY superfamily of plant transcription factors [J] . *Trends in Plant Science*, 5: 199—206
- Hara K, Yagi M, Kusano T *et al.*, 2000 . Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding [J] . *Molecular and General Genetics*, 263: 30—37
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK *et al.*, 2000 . Plant cellular and molecular responses to high salinity [J] . *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463—499
- 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 bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* [J] . *Plant Molecular Biology*, 48: 339—350
- Hony D, Oh SA, Renák D *et al.*, 2006 . Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis* [J] . *BMC Plant Biology*, 6: 31
- Ishida T, Hattori S, Sano R *et al.*, 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] . *The Plant Cell*, 19: 2531—2543
- Jiang Y, Deyholos M, 2009 . Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses [J] . *Plant Molecular Biology*, 69: 91—105
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR, 2002 . TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor [J] . *The Plant Cell*, 14: 1359—1375
- Kim CY, Lee SH, Park HC *et al.*, 2000 . Identification of rice blast fun-

- gal elicitor-responsive genes by differential display analysis [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 470—474
- Lagace M, Matton DP, 2004. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense* [J]. *Planta*, 219: 185—189
- Leung J, Giraudat J, 1998. Abscisic acid signal transduction [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 199—222
- Luo M, Dennis ES, Berger F *et al.*, 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
- Miao Y, Zentgraf U, 2007. The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium [J]. *The Plant Cell*, 19: 819—830
- 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]. *The Plant Journal*, 31: 319—330
- 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
- Rizhsky L, Davletova S, Liang H *et al.*, 2004. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 11736—11743
- Robatzek S, Somssich IE, 2001. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes [J]. *The Plant Journal*, 28: 123—133
- Seki M, Narusaka M, Ishida J *et al.*, 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray [J]. *The Plant Journal*, 31: 279—292
- 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 *isol* promoter [J]. *The Plant Cell*, 15: 2076—2092
- Ulker B, Somssich IE, 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 491—498
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 781—803
- Yu D, Chen C, Chen Z, 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression [J]. *The Plant Cell*, 13: 1527—1540