

大豆 *GmWRKY35* 基因的克隆及其增强烟草耐旱能力研究

李大红,王春弘,刘喜平,邬海燕,李鸿雁

(黄淮学院 生物与食品工程学院,河南 驻马店 463000)

**摘 要:**大豆易遭受干旱、盐、低温等非生物胁迫,严重导致产量下降。利用分子生物学技术提高作物抗性是作物育种的有效途径。锌指蛋白是植物中常见的重要转录因子,能够调控多种胁迫诱导基因的表达,有效提高综合抗性。在这项研究中,利用 RT-PCR 方法克隆大豆(*Glycine max* L.)*GmWRKY35* 基因。其 cDNA 为 1 500 bp,编码一个 499 个氨基酸的蛋白质,预测其分子量为 54.89 kD,等电点(pI)为 6.74。亚细胞定位分析表明,*GmWRKY35* 定位于细胞核。实时荧光定量 PCR 分析显示,*GmWRKY35* 转录能被干旱诱导。把 *GmWRKY35* 基因通过农杆菌介导转化烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中。在干旱胁迫下,与野生型烟草相比,转基因烟草植株表现出主根较长,叶子萎焉少,POD 和 SOD 活性较高,MDA 含量和电解质渗漏率较少。主要功能验证表明,*GmWRKY35* 基因在烟草中表达增强了干旱胁迫耐受性。这项研究表明大豆 RING-H2 型锌指蛋白在植物逆境中有重要作用,同时也为大豆抗性育种提供一个优良的候选基因。

**关键词:**大豆;烟草;*GmWRKY35*;干旱胁迫  
**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.05.0685

Expression of *GmWRKY35*, a Soybean WRKY Gene, in Transgenic Tobacco Confers Drought Stress Tolerances

LI Da-hong, WANG Chun-hong, LIU Xi-ping, WU Hai-yan, LI Hong-yan

(School of Biotechnology and Food Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

**Abstract:** Soybean, like other crops, suffers from drought, salt, low-temperature and other abiotic stresses, seriously resulting in yield decline. It is an effective way for crop breeding to improve resistance *via* molecular biology techniques. Zinc finger protein, an important transcription factor commonly found in plant, can regulate the expression of multiple stress-inducible genes and enhance comprehensive resistances effectively. In this study, a RING-H2 zinc finger protein gene, designated as *GmWRKY35*, was isolated from *Glycine max* L. by RT-PCR. Its cDNA was 1 500 bp and encoded a putative protein of 499 amino acids with a predicted molecular mass of 54.89 kD and an isoelectric point (PI) of 6.74. A typical RING-H2 finger domain was found at the C-terminal region of *GmWRKY35* protein. Subcellular localization analysis showed that the *GmWRKY35* was expressed in nuclear. Real-time PCR showed that the transcript of *GmWRKY35* was strongly induced by drought, salinity and cold to some extent. The *GmWRKY35* gene was transformed into tobacco cultivar Wisconsin 38 (W38) by *Agrobacterium* mediated under the control of the CaMV 35S promoter. Under drought stresses, transgenic tobacco lines carrying *GmWRKY35* gene developed the strong primary root, smaller yellow leaves, higher POD and SOD activity, less MDA content and the percentage of electrolyte leakage, and performed higher tolerance to these stresses than the wide-type tobaccos. The primary function verification showed that overexpression of *GmWRKY35* gene in tobaccos enhanced their tolerance to drought stresses. This study shows that RING-H2 zinc finger proteins of soybean play an important role in plant stress resistance and provide an excellent candidate for resistance breeding in soybean.

**Keywords:** *Glycine max* L.; Tobacco; *GmWRKY35*; Drought stress

在高等植物中普遍存在 WRKY 类转录因子,具有序列特异性 DNA 结合位点,它能激活或抑制下游靶基因的转录<sup>[1]</sup>。在这个超家族蛋白中含有一个或两个高度保守区域;该区域约 60 个氨基酸残基,例如 WRKYGQK 序列的锌指结构<sup>[2]</sup>。第一个被克隆出来 WRKY 蛋白编码基因从甘薯(*Ipomoea Batatas*)中得到<sup>[3]</sup>。随后,在许多植物鉴定出有该基因家族。例如在拟南芥(*Arabidopsis*

*thaliana* L.)<sup>[4]</sup>中至少有 109 WRKY 而在水稻(*Oryza sativa*)<sup>[5]</sup>中至少有 72 个 WRKY 家族成员。此外,黄瓜(*Cucumis sativus*)<sup>[6]</sup>含有 55 个 WRKY 基因;葡萄(*Vitis vinefera*)<sup>[7]</sup>含有 59 个 WRKY 转录因子。研究表明,它们参与多种生理过程,如参与各种生物和非生物胁迫<sup>[8-11]</sup>。拟南芥 WRKY 蛋白可能参与调节水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)依赖的防御途径<sup>[12-13]</sup>。研究分析显示,一些拟南芥 WRKY 的转录

收稿日期:2016-06-02  
基金项目:河南省科技发展计划(112300410042)。  
第一作者简介:李大红(1969-),男,博士,副教授,主要从事植物逆境生理研究。E-mail:lidahong27@163.com。

表达受各种非生物胁迫的调控,如盐、干旱和低温<sup>[14-16]</sup>。此外,非生物胁迫(干旱、盐和低温)以及激素处理下,水稻的 *WRKY* 基因转录水平发生相应变化<sup>[17-18]</sup>。最近研究还表明,*WRKY* 蛋白也参与发育过程,如衰老中起着重要的调节作用<sup>[19]</sup>。

大豆是重要的油料作物。由于大豆生长环境不断恶化,大豆种植区土壤干旱、半干旱地区逐渐扩大,导致大豆减产。因此,研究大豆抗旱相关基因,阐明大豆抗旱相关基因的调控机制,对大豆抗性分子育种具有重要意义。尽管关于大豆 *WRKY* 基因家族已有一些报道,但对其功能研究不多。本研究从大豆基因组中克隆出 *GmWRKY35*,对其基因的同源性和进化进行分析,并在烟草中对其在干旱胁迫中的功能进行验证。

1 材料与方法

1.1 大豆材料和干旱处理

取大豆品种中黄 13 的种子(由驻马店市农业科学院提供),用 70% 酒精消毒,蒸馏水冲洗 5 次后,把种子放入水中室温下培养,5 d 后移到土中盆栽培养。在其不同生育时期取叶子、种子、花、茎、子叶及根,洗净后用吸水纸吸干水分,用锡箔纸包裹好于液氮中速冻保存。生长 30 d 的大豆苗 MS 培养基中培养 3 d 后,用 15% PEG4000 处理,分别在 0, 0.5, 1, 6, 12 和 24 h 取样,锡箔纸包裹好于液氮中速冻保存。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

按 TRIzol 试剂盒(TaKaRa,大连)使用说明,提取中黄 13 的总 RNA。取 2 μg 总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成(具体方法参见 TaKaRa 相关试剂盒说明书)。

1.3 GmWRKY35 的克隆与序列测定

根据 GenBank 的大豆基因序列,设计特异性 PCR 引物 P1, P2(上海生工,上海),如表 1 所示。以 P1, P2 为引物,以上述制备好的大豆 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 60 s, 54℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,胶回收 DNA(方法参见上海生工试剂盒说明书),纯化后连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa,大连)上,转化到大肠杆菌 DH5a(本实验室保存)中扩大培养提取质粒,测序(上海生工,上海)。

1.4 目标基因序列生物信息学分析

用 DNAMAN 6.0 软件进行序列分析,预测目标 cDNA 编码的蛋白质,分析序列的开放阅读框和保

守域,并预测蛋白的分子质量和等电点。

1.5 GmWRKY35 编码蛋白的亚细胞定位分析

利用 Primer 5.0 软件,设计 1 对特异性引物 P3 和 P4,在引物前分别加 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点,PCR 产物连到 pMD18-T 克隆载体上并转化大肠杆菌。用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切 *GmWRKY35* 基因,并连接 pCAMBIA1301 载体 35S 和 GFP 之间。获得融合载体 pCAMBIA-*GmWRKY35*-GFP,利用基因枪轰击法<sup>[20]</sup>将融合载体转化到洋葱表皮细胞中,用激光共聚焦显微镜观察,以不含目的基因的 GFP 空载体作对照,重复试验 3 次。

1.6 目标基因转化烟草

为了分析过表达 *GmWRKY35* 对转基因烟草在干旱胁迫下的耐受性影响,把 *GmWRKY35* 连到 pMD18-T 载体上转化到大肠杆菌 DH5a 中进行测序(上海生工)。将测序结果正确的克隆以及空载体 pCAMBIA1301 用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后过夜连接。连接产物转化到大肠杆菌 DH5a 中,阳性克隆经酶切和测序验证,获得融合载体 pCAMBIA1301-*GmWRKY35*。通过农杆菌介导法<sup>[21]</sup>将目标基因转化到烟草(W38)中。50 mg·mL<sup>-1</sup> Kan 筛选,选取长势较好的烟草叶片的 DNA 为模板, P3 和 P4 为引物,通过 PCR 的方法筛选阳性植株。

1.7 转基因烟草对干旱的耐受性检测

为了测试转基因烟草对干旱胁迫的耐受性,将 T<sub>2</sub>代烟草种子分为 2 组,一组在含有 15% PEG4000 的 1/2 MS 培养基做种子萌发试验,每组播 50 粒种子,至少 3 个重复。另选取生长大小一致的转基因阳性烟草幼苗分别转接到含有 15% PEG 的 1/2 MS 培养基中进行根长测定。所有培养均于 25℃, 16 h 光照、8 h 黑暗的培养间进行。野生型(WT)烟草作为对照。另一组对 30 d 的转基因苗与 WT 转入培养瓶中,3 d 后,用 15% 的 PEG4000 处理 24 h,进行相关生理测定,测定方法参照<sup>[22]</sup>。另外,对生长 90 d 的转基因烟草和 WT 进行缺水试验。7 d 后观察试验结果。

1.8 qRT-PCR

用 TRIzol 试剂提取总 RNA,取 2 μg RNA 合成 cDNA。以引物 P5, P6, cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR,3 次重复。反应程序为 95℃ 10 s, 94℃ 10 s, 60℃ 25 s, 40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应 3 次重复,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 算法分析结果<sup>[23]</sup>。β-Tublin 作为内参(U91564)。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

引物 Primer	正向(5'-3') Forward (5'-3')	反向(5'-3') Reward(5'-3')
<i>GmWRKY35</i> 基因克隆 <i>GmWRKY35</i> gene cloning	P1: ATGTGCAGCAGCATCTTTGGGC	P2: TCAGTCAAAGAGATGAAATGGAT
<i>GmWRKY35</i> 转基因烟草和亚细胞定位 <i>GmWRKY35</i> transgenic tobacco and subcellular localization	P3: CCGTACCATCTGCAGCAGCA- TCTTTGGGC	P4: GGGATCCTCACTCAAAGAGAT- GAAATGGAT
<i>GmWRKY35</i> qRT-PCR	P5: AGTTCGCTCTGATTGTGGGC	P6: TGTGTGTTCTTGGATGGCTGTG
$\beta$ -Tublin	P7: GCATCTTTGCGTACACTTTCCT	P8: ACATAAGCCCAAACTAGCTGGA

划线是内切酶酶切位点。  
The lines are endonuclease site.

2 结果与分析

2.1 *GmWRKY35* 的克隆及蛋白同源性分析

通过 DNAMAN 6.0 序列分析软件对大豆 *WRKY35* 及其它 8 个物种基因编码蛋白的结构域和蛋白序列进行鉴定和分析。根据文献<sup>[24]</sup>和测序分

析显示,该基因的 cDNA 长度为1 500 bp,序列分析表明它编码 1 个含有 499 个氨基酸的蛋白质。软件预测该蛋白质的相对分子质量为 54.89 kD,等电点为 6.74。*WRKY35* 基因编码蛋白含有保守域为 II 类型<sup>[24]</sup>,其 C 端 *WRKY* 七肽域结构为 *WRKYGQK* 形式(图 1)。



\* :*WRKY35* 蛋白保守序列;所列蛋白 NCBI 登录号: *GmWRKY35*:XP\_006597676, *OsWRKY35*:BAD69435, *AtWRKY35*: OAP08828, *BnWRKY35*: ACH99804, *GaWRKY35*: KHG13090, *HvWRKY35*: ABL11228, *NaWRKY35*: OIT08032, *PpWRKY35*: EDQ56845, *PqWRKY35*: AEQ29025.

\* : The conserved sequence of the *WRKY35* protein; The protein NCBI accession number: *GmWRKY35*: XP\_006597676, *OsWRKY35*: BAD69435, *AtWRKY35*: OAP08828, *BnWRKY35*: ACH99804, *GaWRKY35*: KHG13090, *HvWRKY35*: ABL11228, *NaWRKY35*: OIT08032, *PpWRKY35*: EDQ56845, *PqWRKY35*: AEQ29025.

图 1 *WRKY35* 氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of *WRKY35* amino acid sequences

2.2 *GmWRKY35* 蛋白进化树分析

通过已知类型的拟南芥等 *WRKY35* 蛋白 *WRKY* 区域,再利用 MEGA 5.0 软件进行进化树分

析。如图 2 进化树结果显示, *GmWRKY35* 蛋白与拟南芥和油菜亲缘关系比较接近。

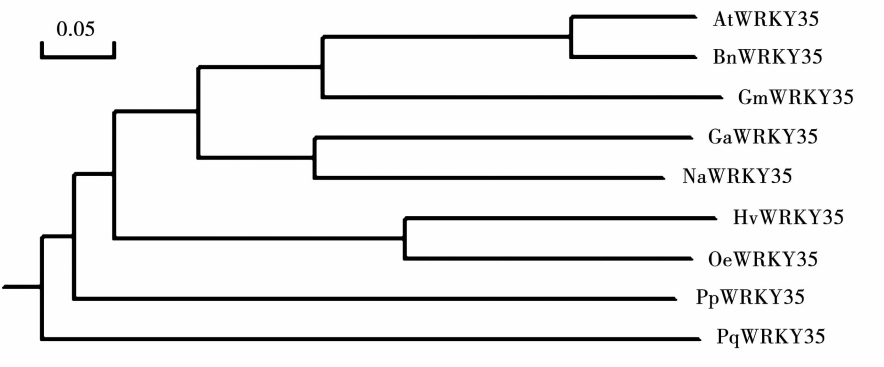


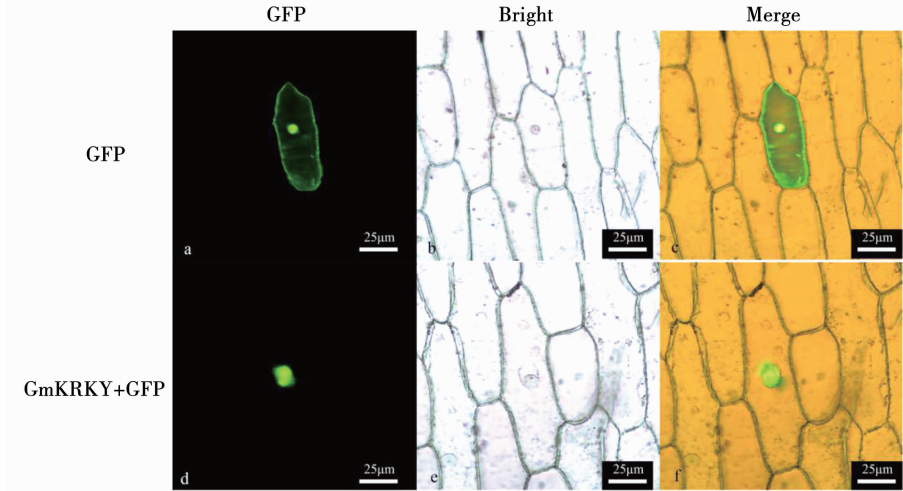
图 2 *GmWRKY35* 进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *GmWRKY35*

2.3 GmWRKY35 的亚细胞定位分析

将 *GmWRKY35* 基因 ORF 分别插入到 35S 启动子和绿色荧光蛋白基因之间,获得融合表达载体 (pCAMBIA-GmWRKY35-GFP)。利用基因枪法将该表达载体转化到洋葱表皮细胞中,25℃ 光照培养 18~24 h 后,激光扫描共聚焦荧光显微镜观察。结

果显示,在转化空载体 pCAMBIA-GFP 的原生质体中,细胞膜、细胞质以及细胞核中均有绿色荧光分布,而在转化重组质粒 pCAMBIA-GmWRKY35-GFP 的原生质体中,绿色荧光主要分布于细胞核部位 (图 3)。这些结果表明,*GmWRKY35* 定位于细胞核内,是一个典型的大豆蛋白转录因子。



a,b,c: GFP 定位; d,e,f: GmWRKY35 + GFP 融合蛋白定位。  
a,b,c: GFP alone location; d,e,f: GmWRKY35::GFP location.

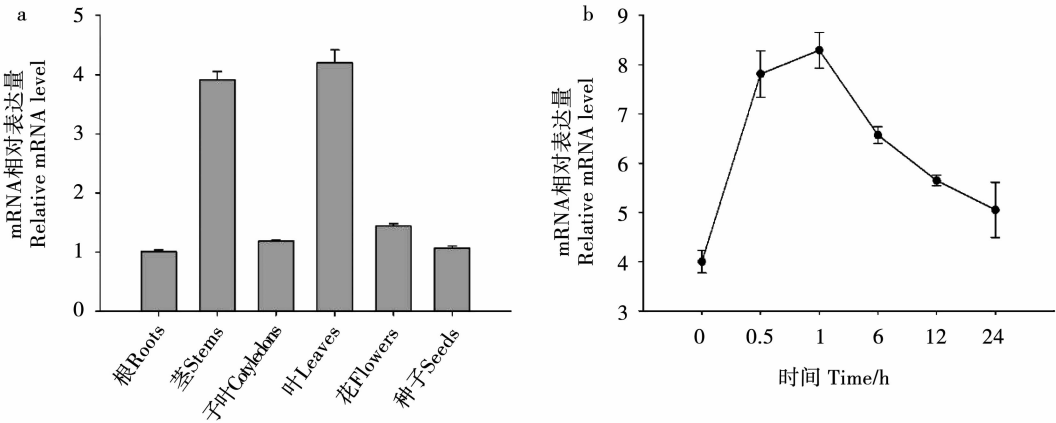
图 3 GmWRKY35 蛋白在洋葱表皮细胞定位分析

Fig. 3 Subcellular localization analysis of *GmWRKY35* protein in onion epidermal cells

2.4 GmWRKY35 表达图谱分析

为了检测 *GmWRKY35* 基因在大豆不同组织的表达量,对大豆叶、花、种子、子叶、茎以及根进行 qRT-PCR 分析,结果表明 *GmWRKY35* 在茎和叶中表

达量最高,而在其它组织中的表达水平相对较低 (图 4a)。在 15% PEG 胁迫下,*GmWRKY35* 表达量在处理 1 h 时有一个高峰,随后出现下降,表明 *GmWRKY35* 能被干旱胁迫诱导。



a: *GmWRKY35* 基因在大豆不同组织的表达量; b: 30 d 的大豆经 15% PEG 处理后,大豆叶不同时间 *GmWRKY35* 基因的表达量。  
a: The expression of *GmWRKY35* gene in different tissues of soybean; b: *GmWRKY35* gene expression in soybean leaves during PEG-mimic dehydration treatment.

图 4 GmWRKY35 基因在大豆的表达特性分析

Fig. 4 Expression analysis of *GmWRKY35* in soybean

2.5 GmWRKY35 基因转化烟草及阳性植株的筛选

利用 Primer 5.0 软件设计带酶切位点的特异性引物扩增目的片段,构建 pBIA-35S-GmWRKY35 植物表达载体。利用农杆菌介导法将该重组质粒转化到烟草中,50 mg·mL<sup>-1</sup> Kan 培养基上筛选出长势较好的烟草进行 PCR 检测。结果表明,在转基因烟

草中检测到 8 条阳性株系。野生型烟草叶片中没有条带 (图 5a)。qRT-PCR 分析表明,8 个株系 *GmWRKY35* 基因均能过量表达,但 OE-1, OE-2 和 OE-3 表达量较高 (图 5b)。以下研究选取这 3 个株系作为研究材料。

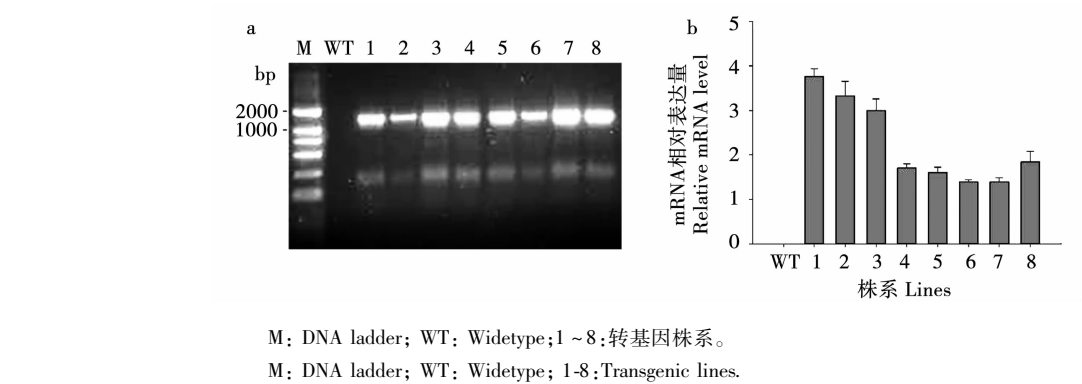


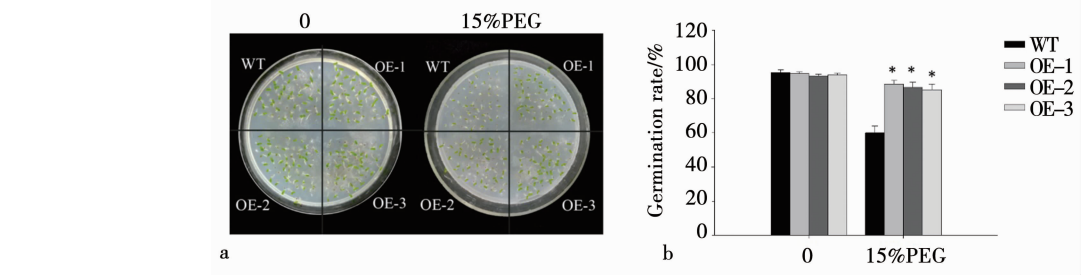
图 5 转基因烟草 PCR 及相对表达量分析

Fig. 5 PCR and relative mRNA level analysis of transgenic lines

2. 6 转基因烟草对干旱的耐受性分析

选取相对表达量较高的 OE-1,OE-2,OE-3 转基因烟草 T<sub>2</sub> 代株系进行干旱的耐旱性分析,结果显示,转 *GmWRKY35* 基因的烟草比 WT 对干旱处理产生了一定的耐性。如图 6a,b 所示,15% PEG 处理 4 d 后,3 个转基因株系发芽率明显高于对照野生型;12 d 后,3 个转基因株系主根长显著大于野生型,转基因株系的长势也优于野生型(图 7a)。经干旱处理 7 d 后,3 个转基因株系叶只有少许萎焉,而野生型的烟草则完全萎焉(图 7b)。丙二醛(MDA)

与电解质渗漏率经常被用来作为衡量细胞膜损伤和组织氧化损伤的生物标志物。对转基因烟草与对照的丙二醛(MDA)与电解质渗漏率的含量进行分析,结果表明,在干旱胁迫下,WT 苗 MDA 和电解质渗漏率含量显著升高,而转基因植株 MDA 和电解质渗漏率的增加比 WT 少(图 8)。表明在干旱胁迫下转基因植株可减少氧化损伤。过氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性结果显示(图 8),在干旱胁迫下,转基因植株超氧化物歧化酶 SOD 和 POD 活性明显高于野生型幼苗。



\*:转基因烟草与 WT 有显著差异 ( $P < 0.05$ )。  
\*:Significant difference between transgenic tobacco and WT ( $P < 0.05$ ).

图 6 转基因烟草种子萌发率测定

Fig. 6 Analysis of seed germination rate of transgenic tobacco

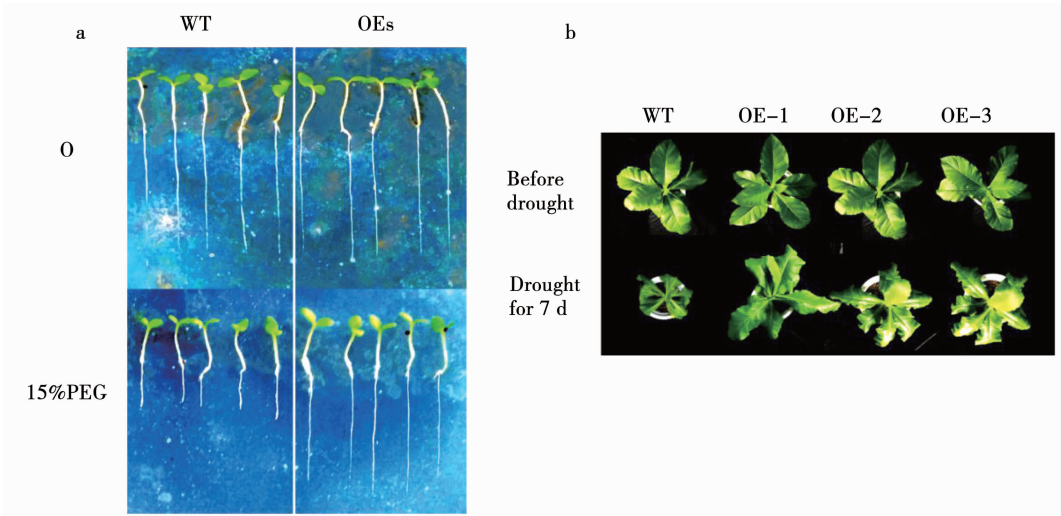
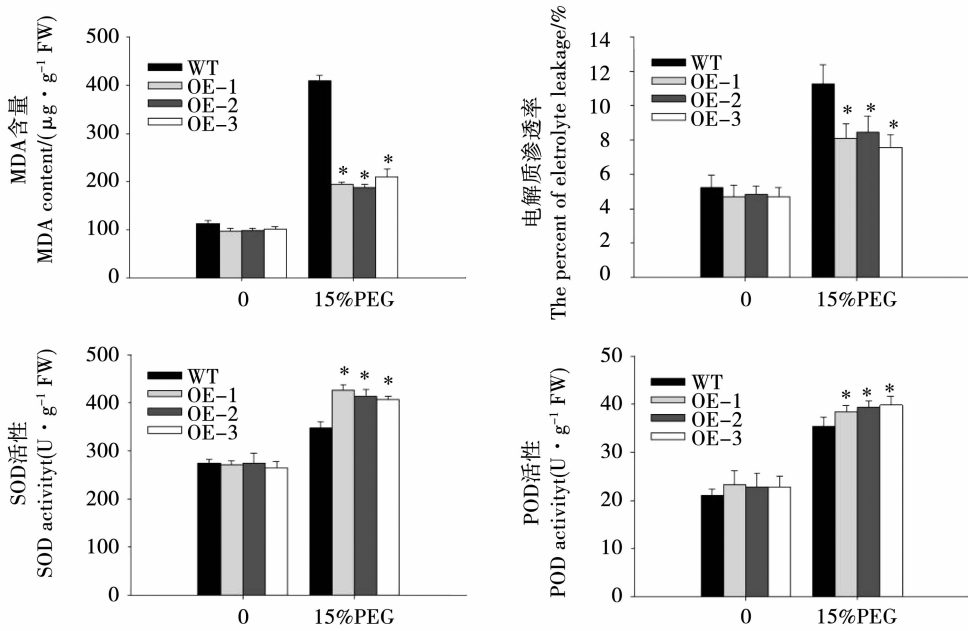


图 7 转基因株系耐旱性分析

Fig. 7 Drought tolerance analysis of transgenic tobacco lines





\*:转基因烟草与 WT 有显著差异 ( $P < 0.05$ )。  
\*:Significant difference between transgenic tobacco and WT ( $P < 0.05$ ).

图8 转基因烟草在干旱胁迫下生理特性测定

Fig. 8 Analysis of physiological characteristics of transgenic tobacco under drought stress

3 结论与讨论

WRKY 蛋白能正向或负向调节各种胁迫与植物发育。本研究利用基因克隆方法从大豆中黄 13 cDNA 中扩增获得了 1 个 GmWRKY35 蛋白编码基因,系统进化树分析显示,GmWRKY35 蛋白属于 3 组RING 型锌指蛋白<sup>[24]</sup>的第 2 组。序列分析表明它含有 WRKYGQK 保守序列,与经典的保守结构域一致;与 GmWRKY35 蛋白进化关系密切的是 AtWRKY35 和 BnWRKY35。WRKY35 是转录因子,一般定位于细胞核。本研究亚细胞定位试验显示,GmWRKY35 定位于细胞核。

此前,植物 WRKY 转录因子被广泛报道,在非生物胁迫反应中扮演重要的角色<sup>[24-27]</sup>。本研究克隆到的 GmWRKY35 基因在大豆的叶和茎有较高的表达。进一步的试验表明,GmWRKY35 促进植物抗旱和调节细胞 ROS 水平。干旱直接影响作物生产力,因此,本文结果有利于 WRKY 蛋白在提高植物抗逆性提供分子生物学基础。

在 PEG 胁迫下,转 GmWRKY35 基因烟草种子萌发率显著高于野生型;而根系的主根长度也高于野生型。表明 GmWRKY35 基因与植物抗旱相关,过表达 GmWRKY35 基因能增加烟草的耐旱能力。在干旱胁迫下,ROS 会大量增加<sup>[28]</sup>。在前人研究中,转小麦 TaWRKY 基因拟南芥比野生型拟南芥积累更多的 SOD 和 POD,而含有较少的 MDA 和较低电解质渗透率;表明在干旱期间,转基因植物减少了

细胞膜的损伤,增加了细胞内抗氧化酶<sup>[29]</sup>。本研究中,转 GmWRKY35 基因烟草活性氧清除相关酶活性增加,包括 SOD 和 POD 活性,同时,MDA 含量与电解质渗透率低于 WT。这些结果表明,GmWRKY35 可能通过调节细胞内 ROS 水平提高植物耐旱能力。总之,GmWRKY35 基因为 II 型锌指蛋白基因。该基因受干旱的强烈诱导表达,GmWRKY35 编码的蛋白质主要定位在细胞核上;功能分析表明过表达 GmWRKY35 基因的转基因烟草增强了对干旱的耐受性。

参考文献

[1] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5 (5):199-206.  
[2] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5):247-258.  
[3] Ishiguro S, Nakamura K. 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 beta-amylase from sweet potato[J]. Molecular Genetics and Genomics, 1994, 244(6):563-571.  
[4] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(1):21-37.  
[5] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4):1500-1513.  
[6] Ling J, Jiang W, Zhang Y, et al. Genome-wide analysis of WRKY

- gene family in *Cucumis sativus* [J]. BMC Genomics, 2011, 12:471.
- [7] Wang Y, Feng L, Zhu Y, et al. Comparative genomic analysis of the *WRKY* III gene family in populus, grape, *Arabidopsis* and rice [J]. Biology Direct, 2015, 10:48.
- [8] Li P, Song A, Gao C, et al. Chrysanthemum *WRKY* gene *Cm-WRKY17* negatively regulates salt stress tolerance in transgenic chrysanthemum and *Arabidopsis* plants [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(8):1365-1378.
- [9] Wang X, Zeng J, Li Y, et al. Expression of *TaWRKY44*, a wheat *WRKY* gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:615.
- [10] Proietti S, Bertini L, van der Ent S, et al. Cross activity of orthologous *WRKY* transcription factors in wheat and *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(6):1975-1990.
- [11] Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, et al. *WRKY* transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana* [J]. The Plant Cell, 2015, 27(9):2645-2663.
- [12] Machens F, Becker M, Umrath F, et al. Identification of a novel type of *WRKY* transcription factor binding site in elicitor-responsive cis-sequences from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 84(4-5):371-385.
- [13] Liu S, Kracher B, Ziegler J, et al. Negative regulation of ABA signaling by *WRKY33* is critical for *Arabidopsis* immunity towards *Botrytis cinerea* 2100 [J]. Elife Sciences, 2015, 4:e07295.
- [14] Qiao Z, Li C L, Zhang W. *WRKY1* regulates stomatal movement in drought-stressed *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(1):53-65.
- [15] Cai R, Zhao Y, Wang Y, et al. Overexpression of a maize *WRKY58* gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2014, 119(3):565-577.
- [16] Li S, Fu Q, Chen L, et al. *Arabidopsis thaliana* *WRKY25*, *WRKY26*, and *WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance [J]. Planta, 2011, 233(6):1237.
- [17] Kim C Y, Vo K T X, Cong D N, et al. Functional analysis of a cold-responsive rice *WRKY* gene, *OsWRKY71* [J]. Plant Biotechnology Reports, 2016, 10(1):13-23.
- [18] Zeng T, Kou Y, Liu H, et al. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14):4863.
- [19] Li H L, Guo D, Yang Z P, et al. Genome-wide identification and characterization of *WRKY* gene family in *Hevea brasiliensis* [J]. Genomics, 2014, 104(1):14-23.
- [20] Hagio T. Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation [J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 1998, 32(4):239-247.
- [21] Anoop N, Gupta A K. Transgenic indica Rice cv IR-50 Over-expressing *Vigna aconitifolia*  $\Delta 1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase cDNA shows tolerance to high salt [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2003, 12(2):109-116.
- [22] Xu X M, Moller S G. ROS removal by DJ-1: *Arabidopsis* as a new model to understand Parkinson's disease [J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(8):1034-1036.
- [23] Li D H, Liu H, Yang Y L, et al. Down-regulated expression of *RACK1* gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice [J]. Rice Science, 2009, 16(1):14-20.
- [24] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, et al. Soybean *WRKY*-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(5):486-503.
- [25] Wu J, Chen J, Wang L, et al. Genome-wide investigation of *WRKY* transcription factors involved in terminal drought stress response in common bean [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:380.
- [26] Wang M, Vannozzi A, Wang G, et al. Genome and transcriptome analysis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* gene family [J]. Horticulture Research, 2014, 1:14016.
- [27] Ren X, Chen Z, Liu Y, et al. ABO3, a *WRKY* transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2010, 63(3):417-429.
- [28] Lee S, Park C M. Regulation of reactive oxygen species generation under drought conditions in *Arabidopsis* [J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(6):599-601.
- [29] Qin Y, Tian Y, Liu X. A wheat salinity-induced *WRKY* transcription factor *TaWRKY93* confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 464(2):428-433.