

## 过量表达 *SbWRKY50* 基因对高粱田间长势的影响

陈 炜, 王映婷, 李东保, 杨 文

(南京大学生命科学学院, 江苏南京 210023)

**摘要:** 叶片衰老是一个由复杂调控网络调控的生物学过程, 该调控网络包括环境因素和内部因子, 如转录因子 (Transcriptional factors, TFs) 和植物激素, 其中, 乙烯 (Ethylene ET) 对于植物衰老尤为关键。高粱 (*Sorghum bicolor* L.) WRKY 家族转录因子 *SbWRKY50* 是乙烯信号途径中关键成员乙烯不敏感 3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3 EIN3) 的直接靶标, 能够抑制高粱叶片衰老。然而, *SbWRKY50* 在田间是否能够通过调控叶片衰老影响高粱农艺性状仍然未知。文章对 *SbWRKY50* 过表达高粱的田间表型进行分析, 并对 *SbWRKY50* 过表达高粱和野生型进行黑暗处理, 检测叶绿素含量、鲜质量、干质量、乙烯合成速率。结果表明, 过表达植株在田间自然条件下依然可以延缓高粱衰老; 衰老相关基因 *SbSAG20*、*SbSAG21* 与 *SbSAG39* 的表达分析发现, 这些基因的表达量在 *SbWRKY50* 过表达高粱中显著低于野生型。表明 *SbWRKY50* 通过抑制衰老相关基因表达延缓高粱衰老。*SbWRKY50* 过表达高粱相比于野生型更为滞绿, 且叶绿素含量、鲜质量、干质量显著高于野生型, 表明 *SbWRKY50* 过表达可以增加高粱的田间生物量。综上, *SbWRKY50* 过表达不仅可以延缓高粱衰老, 而且能够增加高粱生物量。

**关键词:** 高粱; *SbWRKY50*; 田间; 叶片衰老

中图分类号: S514

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)06-0029-08

### Effects of *SbWRKY50* Overexpression on the Growth of Sorghum in Field

CHEN Wei, WANG Yiting, LI Dongbao, YANG Wen

(School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** The onset of leaf senescence is governed by a complex regulatory network including environmental cues and internal factors such as transcription factors (TFs) and phytohormones, in which ethylene (ET) is one key inducer. The TF *SbWRKY50* of WRKY family from *Sorghum bicolor* L. is a direct target of the key component ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3) in ET signalling, functioning for leaf senescence repression. However, it remains unknown whether *SbWRKY50* can affect sorghum agronomic traits by regulating leaf senescence in the field. In this paper, field phenotypic analysis of *SbWRKY50* overexpressing sorghum was conducted, and the chlorophyll content, fresh weight, dry weight, and ethylene synthesis rate of *SbWRKY50* overexpressing sorghum and wild-type sorghum were detected after dark treatment. The results found that overexpressing plants could still delay sorghum senescence under natural field conditions. Expression analysis of senescence-related genes *SbSAG20*, *SbSAG21*, and *SbSAG39* revealed that the expression levels of these genes were significantly lower in *SbWRKY50* overexpressing sorghum than that of wild-type. The results showed that *SbWRKY50* delayed sorghum senescence by inhibiting the expression of senescence-related genes. Compared with wild-type, *SbWRKY50* overexpressing sorghum was greener, and chlorophyll content, fresh weight, and dry weight were significantly higher than those of wild-type. In conclusion, *SbWRKY50* overexpression could not only delay sorghum senescence but also increase sorghum biomass.

**Key words:** *Sorghum bicolor* L.; *SbWRKY50*; field; leaf senescence

叶片衰老是植物发育的最后阶段, 其过程受到分子和细胞层面的精确调控<sup>[1-3]</sup>。叶片衰老过程清晰可见, 尤其是叶片颜色的变化, 其中涉及到叶绿素和大分子的降解、细胞体积的缩小以及细胞代谢的退化<sup>[1-5]</sup>。这些复杂的变化往往是通过大量衰老相关基因 (Senescence-associated genes, SAGs) 的

表达<sup>[6-7]</sup>以及营养成分从老叶向生殖器官或生长活跃的幼嫩组织转移实现的<sup>[8-9]</sup>。

高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 是世界第五大谷类作物, 为亚洲和非洲主食之一, 也被广泛用于动物饲料、糖浆和生物燃料<sup>[10-11]</sup>。滞绿是高粱开花后适应干旱的一个重要性状<sup>[12-13]</sup>。前人研究表明, 延绿

收稿日期: 2024-09-25

基金项目: 国家自然科学基金 (32070200); 中央高校基本科研专项 (0208/14380180)

作者简介: 陈 炜 (1987-), 男, 江苏淮安人, 副教授, 博士, 主要从事植物生长发育以及植物响应非生物胁迫的分子机制研究工作。

高粱杂交种在干旱条件下可多产生 47% 的生物量<sup>[14]</sup>。因此,了解叶片衰老的分子机制以及延缓高粱衰老对于高粱种植有着重要意义。

植物激素对叶片衰老具有加速或延缓作用<sup>[1,15-17]</sup>。乙烯对叶片衰老的促进作用早已阐明<sup>[18-19]</sup>。外源施加乙烯会加速叶片衰老,而抑制乙烯的生物合成会延缓叶片衰老<sup>[20-21]</sup>。EIN3(ETHYLENE-INSENSITIVE 3)是乙烯信号途径的核心成分和关键转录因子。EIN3 的突变会延缓叶片衰老,而过表达 EIN3 会加速衰老<sup>[22-24]</sup>。另外,CLE 多肽也能通过抑制 EIN3 的功能来延缓叶片衰老<sup>[25]</sup>。转录组分析表明,EIN3 在不同的发育过程中可激活或抑制下游靶标<sup>[26]</sup>。EIN3 可直接或间接诱导叶绿素分解途径相关基因 *NON-YELLOWING 1(NYE1)*、*NON-YELLOW COLORING 1(NYCI)* 和 *SAGs* 的表达,从而实现了对叶片衰老的调控<sup>[27]</sup>。然而,叶片衰老过程中的乙烯信号途径非常复杂,其潜在的分子机制还不完全清楚。

WRKY 家族转录因子的显著特点是其具有植物所特有的“WRKYGQK”保守序列<sup>[28-30]</sup>。拟南芥的全基因组表达分析表明,WRKY 家族转录因子是参与植物衰老的第二大类转录因子<sup>[31-32]</sup>。许多 WRKY 转录因子对叶片衰老至关重要,如正调控因子 WRKY6<sup>[33]</sup>、WRKY22<sup>[34]</sup>、WRKY45<sup>[35]</sup>、WRKY53<sup>[36]</sup> 和 WRKY75<sup>[37]</sup>,负调控因子 WRKY54 和 WRKY70<sup>[38]</sup>。此外,WRKY 转录因子也能对各种植物激素做出响应,如脱落酸(Abscisic acid, ABA)、赤霉素(Gibberellic acid, GA)和茉莉酸(Jasmonic acid, JA)<sup>[34,39-44]</sup>,这些激素都能促进植物衰老<sup>[5]</sup>。同时,WRKY 转录因子也可响应乙烯信号。EIN3 被报道可间接通过调控 WRKY 转录因子介导叶片衰老<sup>[45]</sup>。前期研究发现,*SbWRKY50* 作为乙烯通路关键成员 EIN3 的直接靶标,可通过招募 PRC1 (Polycomb repressive complex 1) 复合体引起高粱叶绿素降解途径中多个成员的 H2A 单泛素化修饰,进而抑制它们表达,调控叶片衰老<sup>[46]</sup>。然而,*SbWRKY50* 在田间自然条件下能否同样延缓高粱衰老,以及 *SbWRKY50* 的滞绿作用对高粱农艺性状的影响仍然未知。

本研究对野生型高粱以及 *SbWRKY50* 过表达高粱的田间表型进行观察,从而分析 *SbWRKY50* 的育种潜力,旨在为高粱甚至其他作物的育种工作提供方向和支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试高粱品种为 P898012,由黑龙江八一农垦大学戴玲燕教授提供。*SbWRKY50* 过表达高粱由南京大学生命科学学院植物生长发育课题组通过遗传转化获得。

### 1.2 试验地概况

高粱种植在江苏省南京市南京农业大学白马教学科研基地,属亚热带湿润气候区,平均气温为 25~35 °C,肥力情况均衡。土壤理化性质为:有机质含量为 2.06%~2.41%,全氮含量为 0.105%~0.121%,有效磷含量为 8.42~10.28 mg/kg,速效钾含量为 85.28~94.40 mg/kg。

### 1.3 试验方法

1.3.1 材料种植 高粱品种 P898012(野生型)和 *SbWRKY50* 过表达高粱的种子播种于植物培养室,湿度为 70%,昼夜温度均为 22 °C,光周期为连续光照,出苗后移植于白马教学科研基地直至生长成熟。

1.3.2 样品收集 不同时期高粱叶片中 *SbWRKY50* 和 *SbWRKY42* 的表达分析,选取生长 40 d 或者 60 d 从下往上数第 5 片叶子提取 RNA。田间高粱叶片不同区域中 *SbWRKY50* 和 *SbWRKY42* 的表达分析,选取生长 70 d 从下往上数第 5 片叶子提取 RNA。对于田间生长的高粱叶片中衰老相关基因的表达分析,选取生长 120 d 从下往上数第 5 片叶子提取 RNA。黑暗处理诱导叶片衰老试验,选取生长 21 d 高粱的幼苗进行为期 5 d 的黑暗处理,观察表型特征,并进行叶绿素含量以及生物量测定。所有试验均进行 3 次生物学重复。田间高粱黄绿叶分析,选取生长 75 d 从下往上数 20 片高粱叶片进行黄绿叶百分比统计。

1.3.3 荧光定量分析 使用 RNA 提取试剂 RNA isolator Total RNA Extraction Reagent(Vazyme)从高粱叶片中提取总 RNA。随后用反转录试剂盒 The HiScript II Q RT SuperMix for qPCR kit(Vazyme)对 1 μg RNA 进行反转录,用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)进行定量实时 PCR 分析,以 *SbACTIN1* 基因的表达为内参。实时定量 PCR 所用仪器为 the Step One Plus real-time PCR system(Applied Biosystems),荧光定量 PCR 程序为 95 °C 30 s;95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个

循环;溶解曲线使用仪器默认溶解曲线采集程序。 进行荧光定量分析的引物见表1。

表1 引物序列与用途  
Tab.1 Primer sequence and usage

引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'-3')	用途 Function
SbWRKY50-RT-F	CTTCAAGTGGCGCAAGTACG	荧光定量PCR试验分析 <i>SbWRKY50</i> 基因表达量
SbWRKY50-RT-R	TAGGTGGTGATGACGTAGCG	荧光定量PCR试验分析 <i>SbWRKY50</i> 基因表达量
SbWRKY42-RT-F	GAGCCACCTTGTTGGGCG	荧光定量PCR试验分析 <i>SbWRKY42</i> 基因表达量
SbWRKY42-RT-R	GAGTCCCTCGAGAAGAAGTCC	荧光定量PCR试验分析 <i>SbWRKY42</i> 基因表达量
SbSAG20-RT-F	TTCTAAGCTGGAGAGAGCTGC	荧光定量PCR试验分析 <i>SbSAG20</i> 基因表达量
SbSAG20-RT-R	GACGAGGAACCTTGTTGCGCT	荧光定量PCR试验分析 <i>SbSAG20</i> 基因表达量
SbSAG21-RT-F	GGTGTCTGATGAGGGACC	荧光定量PCR试验分析 <i>SbSAG21</i> 基因表达量
SbSAG21-RT-R	TAGTCCTTCCTGGCGAGCAG	荧光定量PCR试验分析 <i>SbSAG21</i> 基因表达量
SbSAG39-RT-F	GGTAACTGCAACTCCGACGA	荧光定量PCR试验分析 <i>SbSAG39</i> 基因表达量
SbSAG39-RT-R	AAAGAGGTTGTCCCTCCGT	荧光定量PCR试验分析 <i>SbSAG39</i> 基因表达量
SbActin1-RT-F	TGGCATCTCTCAGCACATTC	荧光定量PCR试验分析内参基因表达量
SbActin1-RT-R	GGGCGAAAGAATTAGAAGC	荧光定量PCR试验分析内参基因表达量

#### 1.4 测定项目及方法

1.4.1 叶绿素含量 取300 mg叶片样品研磨并溶于5 mL无水乙醇中。12 000 r/min离心5 min后,取上清,用分光光度法分别于649、665 nm波长下测定吸光值。根据朗伯-比尔定律计算提取液中叶绿素含量(以乙醇为空白对照)。

$$Ca(\text{mg/g}) = (13.95A_{665} - 6.88A_{649}) \times V / 1000 \times W \quad (1)$$

$$Cb(\text{mg/g}) = (24.96A_{649} - 7.32A_{665}) \times V / 1000 \times W \quad (2)$$

$$Ct = Ca + Cb \quad (3)$$

式中,Ca代表叶绿素a,Cb代表叶绿素b,Ct代表叶绿素a和叶绿素b含量总和;V是提取物的体积(mL),W是鲜叶的质量(g)。

1.4.2 乙烯合成速率 高粱叶片的乙烯含量由南京优选生物公司测定。称取30 d苗龄野生型高粱和过表达转基因高粱叶片各10 g,静置于清洁、干燥的气密玻璃瓶中6 h;用注射器分别吸取1 mL的顶部气样,注入配备30 m HP-PLOT分子筛柱(AGILENT,货号为19095P-QO4)的气相色谱仪(SHIMADU,型号为GC-14C)中进行乙烯合成速率的测定。气相色谱仪的层析柱可将气体样品中的乙烯与其他有机挥发物质分开,并测定乙烯气体的浓度。

#### 1.5 数据统计

数据以平均值±标准差表示。各处理之间的统计显著性由one-way ANOVA(针对1个变量)和

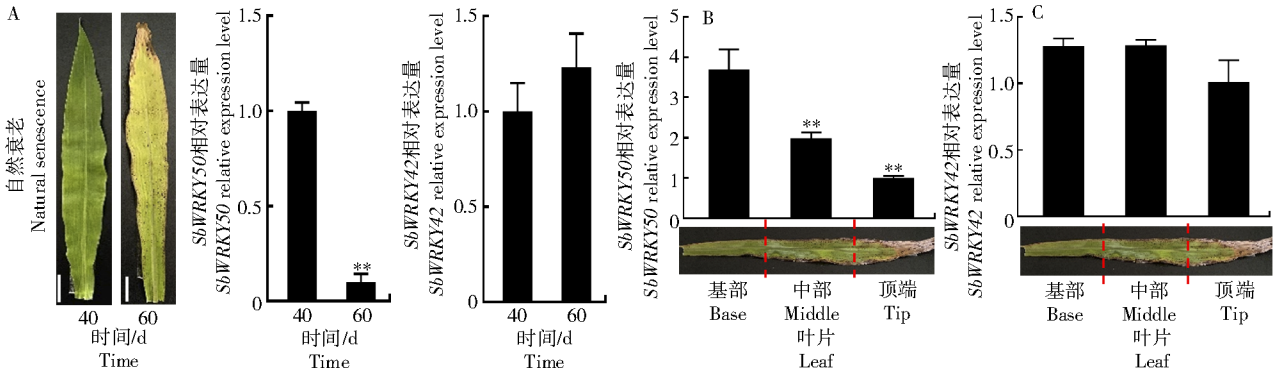
two-way ANOVA(针对2个或多个变量)确定,并以双尾 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示统计显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SbWRKY50* 基因与叶片衰老的关系

已有研究发现,在134个 *SbWRKY* 的启动子附近(-1 500 bp~500 bp区域,其中转录起始位点被定义为0)搜索EIN3的潜在结合基序(AYGWAYCT)<sup>[47]</sup>,发现了9个 *SbWRKY* 具有潜在的SbEIN3结合序列<sup>[46]</sup>。通过蛋白序列比对发现,*SbWRKY42*和 *SbWRKY50*在拟南芥中的同源蛋白与乙烯信号通路或叶片衰老相关<sup>[48-49]</sup>。进一步在高粱自然衰老的叶片中发现,*SbWRKY50*在衰老叶片中的表达量急剧下降,而 *SbWRKY42*的表达量则无明显差异<sup>[46]</sup>。然而,*SbWRKY42*和 *SbWRKY50*在田间条件下是否也与叶片衰老相关仍不清楚。因此,本研究检测了 *SbWRKY42*和 *SbWRKY50*在田间自然条件下生长不同天数高粱叶片中的表达,结果发现,*SbWRKY50*在衰老叶片中的表达量极显著降低( $P < 0.01$ ),而 *SbWRKY42*的表达量在衰老叶片和嫩叶中无明显差异(图1-A)。同时,本研究也检测了 *SbWRKY42*和 *SbWRKY50*在田间生长条件下高粱叶片不同部位中的表达,结果发现,*SbWRKY50*的表达模式与单个叶片(从顶端到基部)的衰老梯度成反比(图1-B),而 *SbWRKY42*在叶片不同部位的表达无明显差异(图1-C)<sup>[46]</sup>。说明 *SbWRKY50*在田间自然条件下

也与叶片衰老相关。



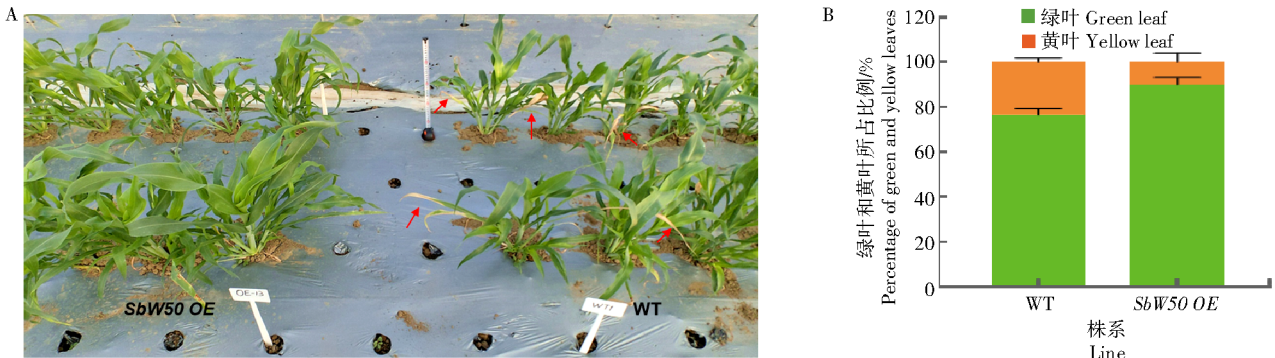
A. *SbWRKY42* 和 *SbWRKY50* 在田间自然衰老的高粱叶片中的表达分析, 比例尺为 4 cm; B. *SbWRKY50* 在田间高粱叶片(生长 70 d)不同区域(从顶端到基部)的表达分析; C. *SbWRKY42* 在田间高粱叶片(生长 70 d)不同区域(从顶端到基部)表达分析。 \*\* $P < 0.01$

图 1 *SbWRKY50* 在田间条件下参与叶片衰老调控  
Fig.1 Regulation of leaf senescence by *SbWRKY50* in the field

### 2.2 *SbWRKY50* 过表达植株在田间的表型分析

已有研究发现<sup>[46]</sup>, 相对于野生型, 在温室生长条件下的 *SbWRKY50* 过表达植株能够显著延缓高粱衰老, 而且 *SbWRKY50* 过表达植株中叶片衰老相关基因和叶绿素降解相关基因的表达显著降低, 叶绿素合成相关基因的表达显著升高。为了进一步确定 *SbWRKY50* 在田间自然条件下是否能够影响高粱衰老, 随机在田间选择 3 个区域(每个区域均

相邻种植了野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱)并对叶片的衰老程度进行分析, 结果发现, 经过 75 d 的生长, 经历拔节期、孕穗期后, 野生型高粱的多个叶片均出现不同程度的衰老, 而 *SbWRKY50* 过表达高粱几乎无衰老(图 2-A)。同时, 相比于野生型, *SbWRKY50* 过表达高粱含有更低的黄叶百分比(图 2-B)。表明 *SbWRKY50* 在田间自然条件下也能延缓高粱衰老。



A. 75 d 的野生型高粱(WT)和 *SbWRKY50* 过表达高粱(*SbW50 OE*)的田间衰老表型; 红色箭头为已衰老的高粱叶片; B. 75 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱的黄绿叶百分比  
A. The senescent phenotypes of 75 d wildtype and *SbW50 OE* sorghum in the field; The red arrow represented the senescent sorghum leaves; B. The percentage of green and yellow leaves of 75 d wildtype and *SbW50 OE* sorghum

图 2 75 d 龄的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱的田间衰老表型以及黄绿叶百分比  
Fig.2 The senescent phenotypes and percentage of green and yellow leaves of 75 d wildtype and *SbW50 OE* sorghum in the field

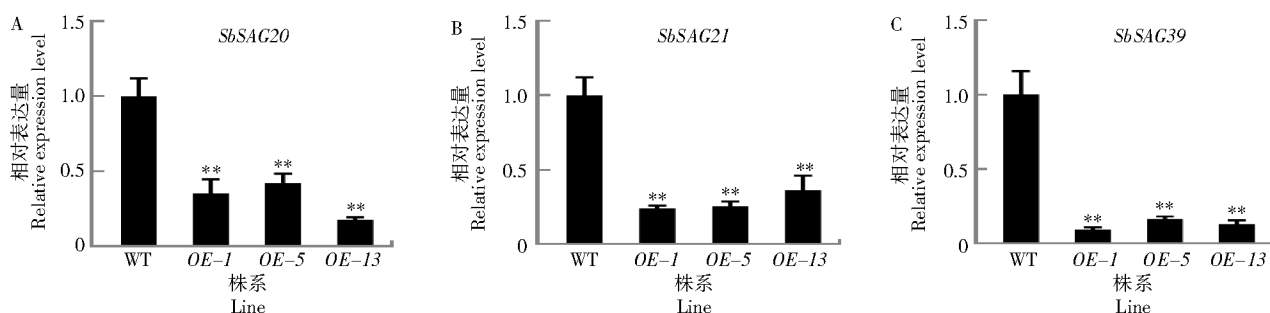
### 2.3 *SbWRKY50* 过表达高粱中衰老相关基因的表达分析

已有研究发现, *SbWRKY50* 是乙烯通路关键成员 EIN3 的直接靶标, 可通过招募 PRC1 复合体调控叶片衰老<sup>[46]</sup>。同时, EIN3 可直接或间接诱导叶绿素分解途径相关基因 *NYE1*、*NYC1*、*SAGs* 等的

表达, 从而实现对叶片衰老的调控<sup>[27]</sup>。为了进一步探究自然环境下 *SbWRKY50* 调控高粱衰老的途径, 本研究检测了田间生长的 *SbWRKY50* 过表达植株和野生型中与衰老相关的基因(*SbSAG20*、*SbSAG21* 与 *SbSAG39*)的表达量, 结果发现, 它们在 *SbWRKY50* 过表达植株中的表达量均极显著低

于野生型( $P < 0.01$ ) (图3), 结合 *SbWRKY50* 在温室条件下对于衰老的作用, 表明 *SbWRKY50* 在温室

条件以及田间自然条件下均能通过影响衰老相关基因的表达调控高粱衰老。



A. 120 d 的野生型高粱(WT)和 *SbWRKY50* 过表达高粱(OE-1、OE-5 和 OE-13) 在田间自然生长条件下 *SbSAG20* 的表达分析; B. 120 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱在田间自然生长条件下 *SbSAG21* 的表达分析; C. 120 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱在田间自然生长条件下 *SbSAG39* 的表达分析; \*\* $P < 0.01$

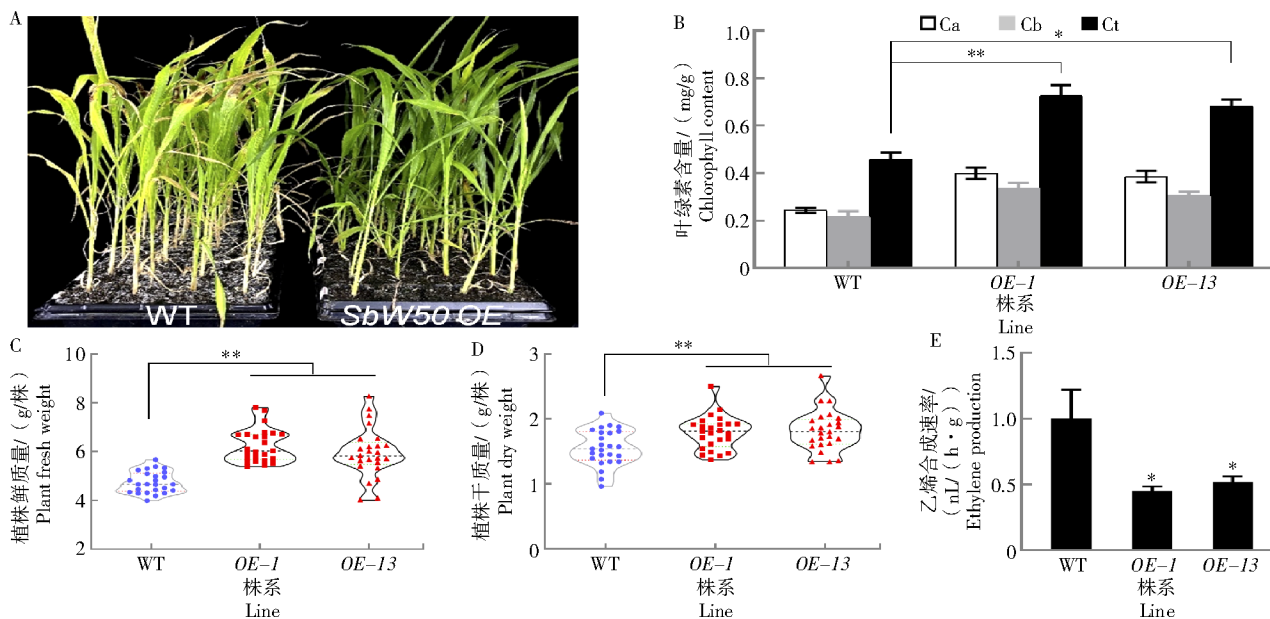
A. Analysis of *SbSAG20* expression of 120 d wildtype and *SbWRKY50*-OE sorghum in the field; B. Analysis of *SbSAG21* expression of 120 d wildtype and *SbWRKY50*-OE sorghum in the field; C. Analysis of *SbSAG39* expression of 120 d wildtype and *SbWRKY50*-OE sorghum in the field; \*\* $P < 0.01$

图3 *SbWRKY50* 调控衰老相关基因表达  
Fig.3 Regulation of the expression of senescence-related genes by *SbWRKY50*

#### 2.4 *SbWRKY50* 过表达高粱的黑暗处理表型以及生物量分析

叶绿素含量的高低与植物的光合能力紧密相关, 是影响作物生物量的重要性状。已有研究表明, 温室生长条件下的 *SbWRKY50* 过表达植株中叶绿素降解相关基因的表达显著降低, 而叶绿素合

成相关基因的表达显著升高<sup>[46]</sup>。为了进一步探究 *SbWRKY50* 延缓叶片衰老是否能够通过调控叶绿素含量影响高粱生物量, 首先对野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱进行了黑暗处理, 结果表明, 黑暗处理后的 *SbWRKY50* 过表达高粱比野生型更为滞绿(图4-A)。



A. 30 d 的野生型高粱(WT)和 *SbWRKY50* 过表达高粱(*SbW50* OE) 的黑暗处理表型; B. 30 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱的叶绿素含量测定; Ca. 叶绿素 a; Cb. 叶绿素 b; Ct. 叶绿素 a 和叶绿素 b; C. 30 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱黑暗处理后的鲜质量测定; D. 30 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱黑暗处理后的干质量测定; E. 30 d 的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱黑暗处理后的乙烯合成速率测定。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

A. The phenotypes of 30 d wildtype and *SbW50* OE sorghum after dark treatments; B. The chlorophyll content determination of 30 d wildtype and *SbW50* OE sorghum after dark treatments; Ca. chlorophyll a; Cb. chlorophyll b; Ct. chlorophyll a and chlorophyll b; C. Determination of fresh weight of 30 d wildtype and *SbW50* OE sorghum after dark treatments; D. Determination of dry weight of 30 d wildtype and *SbW50* OE sorghum after dark treatments; E. Determination of ethylene synthesis rate of 30 d wildtype and *SbW50* OE sorghum after dark treatments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

图4 *SbWRKY50* 过表达高粱黑暗处理后的表型、生物量和乙烯合成速率分析  
Fig.4 Analysis of phenotype, biomass, and ethylene synthesis rate of *SbWRKY50* overexpressing sorghum after dark treatment

同时, *SbWRKY50* 过表达高粱的叶绿素含量也显著高于野生型 ( $P < 0.05$ ) (图 4-B), 表明 *SbWRKY50* 过表达高粱有着更高的叶绿体活性。进一步研究表明, 黑暗处理后的 *SbWRKY50* 过表达高粱的鲜质量和干质量也均极显著高于野生型 (图 4-C、D) ( $P < 0.01$ )。此外, 也对黑暗处理后的野生型高粱和 *SbWRKY50* 过表达高粱的乙烯合成速率进行了测定, 结果发现, 野生型高粱中乙烯合成速率显著高于 *SbWRKY50* 过表达高粱 ( $P < 0.05$ ), 这也与黑暗处理后二者的衰老表型相一致 (图 4-E)。表明 *SbWRKY50* 可以延缓高粱衰老, 且能够提高高粱生物量。

### 3 结论与讨论

叶片衰老是一个复杂的组织退化过程, 会在环境因子和内源信号的共同作用下导致大量生理生化变化<sup>[8]</sup>, 其中, 包括植物激素的变化<sup>[35, 39]</sup>和大量转录因子表达谱的改变<sup>[15, 38]</sup>。然而, 叶片衰老过程中转录因子在激素信号传导中的作用仍知之甚少。WRKY 家族转录因子是响应叶片衰老的第二大转录因子家族<sup>[31]</sup>。在 WRKY 转录因子家族中, *WRKY5*<sup>[50-51]</sup>、*WRKY6*<sup>[33, 52]</sup>、*WRKY22*<sup>[34]</sup>、*WRKY45*<sup>[35]</sup>、*WRKY53*<sup>[36]</sup>和 *WRKY75*<sup>[37]</sup>曾被报道正向调控叶片衰老, 而 *WRKY54*和 *WRKY70*<sup>[38]</sup>则在拟南芥中发挥负向调控作用。已有研究发现<sup>[46]</sup>, *SbWRKY50*在衰老叶片中的表达急剧下降, 表明其参与叶片衰老; 而另一个 WRKY 家族转录因子 *SbWRKY42*在自然衰老叶片中的表达几乎保持不变。同时, 本研究中的田间试验结果也证明了这一现象。即使 *SbWRKY42*的同源基因在拟南芥中被报道参与衰老相关调控<sup>[49]</sup>, 且其可能是 *SbEIN3*的潜在靶标, 但在高粱中 *SbWRKY42*并不调控叶片衰老<sup>[46]</sup>。说明基因在物种进化过程中可以发生功能分化, 因地制宜满足不同植物的生长需要。

植物滞绿意味着更持久的叶绿体活性以及更活跃的叶绿素积累。叶绿体是绿色植物进行光合作用的场所, 其中含有的光合色素叶绿素从太阳光捕获能量, 并将其存储在能量储存分子 ATP 和 NADPH 中, 以支持植物的生长和发育。同时, 叶绿素也能对氮、铁、镁等元素的吸收、转运和利用进行调控, 确保植物的正常生长和光合作用的进行<sup>[53-54]</sup>。本研究的前期工作也表明, *SbWRKY50*是乙烯信号途径关键成员 *EIN3*的直接靶标<sup>[46]</sup>, 在乙烯信号下游通路中发挥关键作用。 *SbWRKY50*过

表达高粱相对于野生型更为滞绿, 且含有较低的 SAGs 表达水平<sup>[46]</sup>。而敲除或者沉默 *SbWRKY50*会加速叶片衰老, 表明 *SbWRKY50*在温室培养条件下负调控高粱衰老<sup>[46]</sup>。植物衰老的调控网络虽然极为复杂, 但最终的归因主要有 3 个, 分别为影响衰老相关基因的表达、影响叶绿素合成相关途径以及影响叶绿素降解相关途径<sup>[46]</sup>。高粱可被广泛用于动物饲料、糖浆和生物燃料<sup>[10]</sup>。本研究发现, 过表达 *SbWRKY50*在田间自然条件下依然可以延缓高粱衰老, 同时也可通过影响叶绿素途径增加高粱的鲜质量和干质量, 暗示其具有提高高粱田间生物量的潜力。同时, 前人研究也表明<sup>[14]</sup>, 延绿高粱杂交种在干旱条件下可多产生 47% 的生物量。因此, *SbWRKY50*在高粱滞绿方面的作用能否提高干旱条件下的高粱生物量仍有待进一步研究。

总之, 本研究在前期工作的基础上进一步揭示了乙烯响应因子 *SbWRKY50*也可以在田间自然条件下调控高粱衰老。 *SbWRKY50*的滞绿作用也显著提高了高粱生物量。因此, 本研究结果将有助于进一步了解叶片衰老的分子机制, 也为提高高粱甚至其他作物的产量提供了一定的基础和依据。

#### 参考文献:

- [1] LIM P O, KIM H J, GIL NAM H. Leaf senescence[J]. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 115-136.
- [2] REN G D, ZHOU Q, WU S X, et al. Reverse genetic identification of CRN1 and its distinctive role in chlorophyll degradation in *Arabidopsis*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52 (5): 496-504.
- [3] 胡益旂, 杨畅博慧, 姚宇舟, 等. 植物衰老调控机制研究现状[J/OL]. 分子植物育种, 1-7[2024-11-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230626.1508.008.html>.
- [4] HU Y Y, YANG Y B H, YAO Y Z, et al. Research status on the regulation mechanism of plant senescence[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 1-7[2024-11-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230626.1508.008.html>.
- [4] 李中海, 郭永峰, 任国栋, 等. 叶片衰老研究进展[J]. 植物生理学报, 2023, 59(9): 1627-1656.
- [5] LI Z H, GUO Y F, REN G D, et al. Advances in leaf senescence research[J]. Plant Physiology Journal, 2023, 59(9): 1627-1656.
- [5] GAN S, AMASINO R M. Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence)[J]. Plant Physiology, 1997, 113(2): 313-319.
- [6] LI Z H, PENG J Y, WEN X, et al. Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of *Arabidopsis* leaf senescence[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(8): 526-539.
- [7] LI Z H, ZHAO Y, LIU X C, et al. LSD 2.0: an update of the leaf senescence database[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42 (Database issue): D1200-D1205.

- [8] GUO Y F, GAN S S. Leaf senescence: signals, execution, and regulation[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2005, 71:83-112.
- [9] WOO H R, KIM H J, NAM H G, et al. Plant leaf senescence and death-regulation by multiple layers of control and implications for aging in general[J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126 (Pt 21):4823-4833.
- [10] SILVA T N, THOMAS J B, DAHLBERG J, et al. Progress and challenges in *Sorghum* biotechnology, a multipurpose feedstock for the bioeconomy[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(3):646-664.
- [11] 李魁印,周光怡,丁延庆,等. 高粱重要性状分子基础研究进展与展望[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(10):3375-3394.  
LI K Y, ZHOU G Y, DING Y Q, et al. Progress and prospects in the molecular basic research on important traits in *Sorghum* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(10):3375-3394.
- [12] HADEBE S T, MODI A T, MABHAUDHI T. Drought tolerance and water use of cereal crops: a focus on *Sorghum* as a food security crop in sub-Saharan Africa[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2017, 203(3):177-191.
- [13] HUANG R D. Research progress on plant tolerance to soil salinity and alkalinity in *Sorghum*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(4):739-746.
- [14] BORRELL A K, HAMMER G L. Nitrogen dynamics and the physiological basis of stay-green in *Sorghum*[J]. *Crop Science*, 2000, 40(5):1295-1307.
- [15] BUCHANAN-WOLLASTON V, EARL S, HARRISON E, et al. The molecular analysis of leaf senescence: a genomics approach[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2003, 1(1):3-22.
- [16] 饶玉春,罗怡琳,叶语涵,等. 激素与水稻叶片衰老调控的研究进展[J/OL]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 1-11[2024-11-11]. <https://doi.org/10.16218/j.issn.1001-5051.2025.005>.  
RAO Y C, LUO Y L, YE Y H, et al. Research progress on hormones and the regulation of leaf senescence in rice[J/OL]. *Journal of Zhejiang Normal University(Natural Sciences)*, 1-11 [2024-11-11]. <https://doi.org/10.16218/j.issn.1001-5051.2025.005>.
- [17] 彭凯轩,章薇,朱晓仙,等. 细胞分裂素延缓叶片衰老的机制研究进展[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(1):12-18.  
PENG K X, ZHANG W, ZHU X X, et al. Research progress on the mechanisms of cytokinin-inhibited leaf senescence[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57(1):12-18.
- [18] AHARONI N, LIEBERMAN M. Ethylene as a regulator of senescence in tobacco leaf discs[J]. *Plant Physiology*, 1979, 64 (5):801-804.
- [19] KAO C H, YANG S F. Role of ethylene in the senescence of detached rice leaves[J]. *Plant Physiology*, 1983, 73(4):881-885.
- [20] VAN DER GRAAFF E, SCHWACKE R, SCHNEIDER A, et al. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141 (2):776-792.
- [21] WANG N N, YANG S F, CHARNG Y. Differential expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes during orchid flower senescence induced by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(1):253-260.
- [22] KIM H J, HONG S H, KIM Y W, et al. Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(14):4023-4036.
- [23] LI Z H, PENG J Y, WEN X, et al. Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(9):3311-3328.
- [24] 张雅瑶. 一个截短的棉花 EIN3/EIL 类转录因子 GhLYI 调控植物的衰老进程[D]. 杭州:浙江大学, 2023.  
ZHANG Y Y. A truncated cotton EIN3/EIL transcription factor, GhLYI, regulates the senescence process in plants[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2023.
- [25] ZHANG Y, TAN S Y, GAO Y H, et al. CLE42 delays leaf senescence by antagonizing ethylene pathway in *Arabidopsis*[J]. *New Phytologist*, 2022, 235(2):550-562.
- [26] LIU X Q, LIU R L, LI Y, et al. EIN3 and PIF3 form an interdependent module that represses chloroplast development in buried seedlings[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(12):3051-3067.
- [27] QIU K, LI Z P, YANG Z, et al. EIN3 and ORE1 accelerate degreening during ethylene-mediated leaf senescence by directly activating chlorophyll catabolic genes in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(7):e1005399.
- [28] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5):199-206.
- [29] 王淑叶,伍国强,魏明. WRKY 转录因子调控植物逆境胁迫响应的作用机制[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(1):35-52.  
WANG S Y, WU G Q, WEI M. Functional mechanisms of WRKY transcription factors in regulating plant response to abiotic stresses[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40 (1):35-52.
- [30] 邓雅茹,柳燕,吴丽霞,等. WRKY 转录因子调控植物养分吸收利用及重金属解毒的研究进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2023, 29(10):1932-1943.  
DENG Y R, LIU Y, WU L X, et al. Functions of plant WRKY transcription factors in nutrient uptake and utilization as well as detoxification of heavy metals[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2023, 29(10):1932-1943.
- [31] GUO Y, CAI Z, GAN S. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2004, 27(5):521-549.
- [32] 叶红,王玉昆. WRKY 转录因子在调控叶片衰老中的作用[J]. *植物生理学报*, 2024, 60(6):905-918.  
YE H, WANG Y K. Roles of WRKY transcription factors in regulating leaf senescence[J]. *Plant Physiology Journal*, 2024, 60(6):905-918.
- [33] ROBATZEK S, SOMSSICH I E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(9):1139-1149.
- [34] ZHOU X, JIANG Y J, YU D Q. WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Molecules and Cells*, 2011, 31(4):303-314.
- [35] CHEN L, XIANG S, CHEN Y, et al. *Arabidopsis* WRKY45 interacts with the DELLA protein RGL1 to positively regulate

- age-triggered leaf senescence[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(9): 1174-1189.
- [36] MIAO Y, LAUN T, ZIMMERMANN P, et al. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(6): 853-867.
- [37] GUO P R, LI Z H, HUANG P X, et al. A tripartite amplification loop involving the transcription factor WRKY75, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(11): 2854-2870.
- [38] BESSEAU S, LI J, PALVA E T. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2667-2679.
- [39] JIANG Y J, LIANG G, YANG S Z, et al. Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 230-245.
- [40] LIN J F, WU S H. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(4): 612-628.
- [41] LIU Z Q, YAN L, WU Z, et al. Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18 WRKY40 and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(18): 6371-6392.
- [42] SIMON J A, KINGSTON R E. Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put[J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(5): 808-824.
- [43] MOZGOVA I, HENNIG L. The polycomb group protein regulatory network[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2015, 66: 269-296.
- [44] 邓江霞, 张国良, 李边豪, 等. WRKY 类转录因子在植物激素 ABA, SA 和 JA 信号转导中的作用[J]. *黑龙江农业科学*, 2023(10): 138-144.
- DENG J X, ZHANG G L, LI B H, et al. Role of WRKY transcription factors in plant hormone ABA, SA and JA signal transduction[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2023(10): 138-144.
- [45] KOYAMA T. The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 650.
- [46] CHEN W, ZHENG Y C, WANG J Y, et al. Ethylene-responsive SbWRKY50 suppresses leaf senescence by inhibition of chlorophyll degradation in *Sorghum*[J]. *New Phytologist*, 2023, 238(3): 1129-1145.
- [47] KOSUGI S, OHASHI Y. Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3(EIN3) homolog[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(4): 960-967.
- [48] HASS C, LOHRMANN J, ALBRECHT V, et al. The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*[J]. *EMBO Journal*, 2004, 23(16): 3290-3302.
- [49] ZHANG D Y, ZHU Z, GAO J, et al. The NPR1-WRKY46-WRKY6 signaling cascade mediates probenazole/salicylic acid-elicited leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(5): 924-936.
- [50] KIM T, KANG K, KIM S H, et al. OsWRKY5 promotes rice leaf senescence via senescence-associated NAC and abscisic acid biosynthesis pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4437.
- [51] YOSHIMOTO K, JIKUMARU Y, KAMIYA Y, et al. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(9): 2914-2927.
- [52] ZHANG S C, LI C, WANG R, et al. The *Arabidopsis* mitochondrial protease FtSH4 is involved in leaf senescence via regulation of WRKY-dependent salicylic acid accumulation and signaling[J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(4): 2294-2307.
- [53] REBEIZ C A, NISHIJIM C, CRANE J C. Biosynthesis and accumulation of microgram quantities of protochlorophyll, chlorophyll a and chlorophyll B in a cell-free system from higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1971, 47(1): 24-32.
- [54] TRIPATHY B C, REBEIZ C A. Chloroplast biogenesis. Demonstration of the monovinyl and divinyl monocarboxylic routes of chlorophyll biosynthesis in higher plants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(29): 13556-13564.