作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2023, 49(10): 2705–2716 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.24261

田间条件下不同棉花品种叶片响应化学脱叶剂噻苯隆的转录组分析

朱继杰[1] 王士杰[1] 赵红霞[1] 贾晓昀[1,*] 李 妙[1,*] 王国印[2]

[1] 河北省农林科学院粮油作物研究所 / 河北省作物遗传育种实验室 / 河北省作物栽培生理和绿色生产重点实验室, 河北石家庄 050035; [2] 河北省农林科学院, 河北石家庄 050031

摘 要: 噻苯隆是棉花脱叶的主要化学药剂, 在实现棉花机械采收中发挥了关键作用。目前, 噻苯隆在大田环境下诱导棉花叶片脱落的分子调控机制研究较少。本研究以噻苯隆敏感型品种(冀丰 914)和不敏感型株系(04-1685)为材料, 测定叶片的乙烯、细胞分裂素和脱落酸含量, 同时利用 RNA-seq 技术, 分析噻苯隆处理后 0 d、1 d、3 d、5 d 叶片的基因表达变化, 利用 WGCNA (Weighted gene coexpression network analysis)分析筛选基因共表达模块, 利用 GO 和 KEGG 分析基因功能。结果表明, 冀丰 914 的乙烯、细胞分裂素和脱落酸含量在处理后 1 d 达到最高, 04-1685 的激素含量在处理后 3 d 达到最高。通过 RNA-seq 筛选到 33,283 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 通过 WGCNA 分析, 分别筛选到 2 个和 3 个与激素和样本高度相关的模块, 模块内的基因主要参与非生物胁迫响应、昼夜节律、物质代谢等过程。通过分析植物激素、胁迫响应、昼夜节律等主要过程相关基因的表达量发现, 激素相关基因在敏感型品种冀丰 914 中的表达量更高, 其中乙烯信号响应基因在处理后 5 d 内均保持在较高的表达水平, 脱落酸信号响应基因在处理后 1 d 内保持较高的表达水平, 细胞分裂素代谢相关基因在处理后 1 d 内表达量很低, 处理后 3 d 和 5 d 的表达量急剧增加。处理后 1 d 和 3 d, 热激蛋白基因(*HSP70*、*HSP90*、*ATJ3*)、钙稳态调控基因(*CRT3*、*NCL*)和节律基因(*LNK2*、*APRR9*、*CCA1*)显著下调表达, 节律基因(*ARR8*)上调表达。大田环境下喷施噻苯隆, 在引起激素含量变化的同时, 可能破坏了植物的昼夜节律、降低对非生物胁迫的应激能力, 从而加速叶片衰老和脱落。本研究为丰富噻苯隆诱导叶片脱落的分子调控机制提供了更多思路。

关键词: 陆地棉; 噻苯隆; 转录组; 植物激素; 非生物胁迫; 昼夜节律

Transcriptome analysis of different cotton varieties' leaves in response to chemical defoliant agent thidiazuron under field conditions

ZHU Ji-Jie[1], WANG Shi-Jie[1], ZHAO Hong-Xia[1], JIA Xiao-Yun[1,*], LI Miao[1,*], and WANG Guo-Yin[2]

[1] Institution of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences / Hebei Laboratory of Crop Genetics and Breeding / Hebei Key Laboratory of Crop Cultivation Physiology and Green Production, Shijiazhuang 050035, Hebei, China; [2] Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, Hebei, China

Abstract: Thidiazuron (TDZ) is the main chemical agent for cotton defoliation, which plays a key role in realizing cotton mechanical harvesting. At present, there are few studies on the molecular regulation mechanism of TDZ induced cotton leaf abscission in the field environment. In this study, TDZ sensitive variety (Jifeng 914) and non-sensitive line (04-1685) were used as the experimental materials. Ethylene, cytokinin, and abscisic acid contents in leaves were determined. RNA-seq was used to analyze the changes of gene expression in leaves at 0, 1, 3, and 5 d after TDZ treatment. WGCNA (Weighted gene coexpression network

本研究由河北省现代农业产业技术体系创新团队建设专项-机采品种选育项目(HBCT2018040202), 河北省农林科学院科技创新专项(2022KJCXZX-LYS-14)和河北省农林科学院粮油作物研究所青年基金项目(2020LYS04)资助。

This study was supported by the Hebei Modern Agricultural Industry Technology System Innovation Team Construction Project-Mechanic Picked Variety Breeding (HBCT2018040202), the HAAFS Science and Technology Innovation Special Project (2022KJCXZX-LYS-14), and the Youth Fund Project of Institute of Grain and Oil Crops of HAAFS (2020LYS04).

* 通信作者(Corresponding authors): 贾晓昀, E-mail: jiaxiaoyun1987@163.com; 李妙, E-mail: limiao2003@sina.com

第一作者联系方式: E-mail: nkyzhujj@163.com

Received (收稿日期): 2022-11-22; Accepted (接受日期): 2023-02-21; Published online (网络出版日期): 2023-03-06.

URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20230305.1710.004.html

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

analysis), GO and KEGG were used to analyze and screen gene coexpression modules and gene functions, respectively. The results showed that the ethylene, cytokinin, and abscisic acid contents of Jifeng 914 reached the highest level at 1 d after treatment, and the hormone contents of 04-1685 reached the highest level at 3 d after treatment. A total of 33,283 differentially expressed genes (DEGs) were screened by RNA-seq. Through WGCNA analysis, 2 and 3 modules highly related to hormone and samples were screened respectively. The genes in the modules mainly participate in abiotic stress response, circadian rhythm, and material metabolism. By analyzing the relative expression of plant hormone, stress response, and circadian rhythm related genes, the expression of hormone related genes in sensitive variety Jifeng 914 was higher, among which ethylene signal response genes were kept at a higher expression level within 5 days after treatment, abscisic acid signal response genes were kept at a higher expression level within 1 day after treatment, and cytokinin metabolism related genes expressed very low within 1 day after treatment and increased sharply at 3 d and 5 d after treatment. At 1 d and 3 d after treatment, heat shock protein genes (*HSP70*, *HSP90*, and *ATJ3*), calcium homeostasis regulating genes (*CRT3*, *NCL*), and circadian rhythm genes (*LNK2*, *APRR9*, *CCA1*) were significantly down regulated, while circadian rhythm genes (*ARR8*) were up regulated. Spraying TDZ in the field environment, while causing changes in hormone content, may damage the plant's circadian rhythm and reduce the stress ability to abiotic stress, and thus accelerating leaf senescence and abscission. This study provides more ideas for enriching the molecular regulation mechanism of TDZ induced leaf abscission.

Keywords: upland cotton; thidiazuron; RNA-seq; plant hormone; abiotic stress; circadian rhythm

机械采收减少人工投入、解放劳动力，是实现棉花生产全程机械化的重要前提。目前，全国各植棉区域均在积极摸索机械采收的配套技术，其中新疆北疆 90%棉田实现了机械采收。喷施脱叶催熟剂是促使棉花集中成熟和机械采收的重要技术环节，脱叶催熟效果直接影响机采效率和纤维品质[1-3]。合理喷施脱叶催熟剂不仅可有效促进叶片脱落，而且对产量和纤维品质的负面影响较小。研究表明，自然吐絮率达到 50%时喷施脱叶催熟剂，既可以促进叶片脱落和棉铃成熟，且对铃重、衣分及皮棉产量的影响最小[2,4]。但是，不同生态环境、品种以及种植模式的脱叶催熟效果存在差异[5-8]。

噻苯隆(thidiazuron，TDZ)是目前用于棉花脱叶的主要化学药剂，它能诱导乙烯和脱落酸合成，同时抑制生长素和细胞分裂素的合成以及生长素的转运，促使离区细胞对乙烯更敏感，从而控制叶片脱落，具有细胞分裂素活性[9-10]。研究发现，喷施噻苯隆后，离层形成的顺序为幼叶>基部第 1~2 叶>功能叶，而脱落顺序为幼叶>功能叶>基部第 1~2 叶，乙烯合成基因、信号转导基因在幼叶中高调表达的时间早、表达量更高[11]，细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因和乙烯相关基因显著上调表达，而且敏感型品种中相关基因上调表达的时间更早、表达量更高[12-13]。此外，噻苯隆处理导致活性氧和丙二醛含量增加，并且破坏光合系统，叶片发生光抑制，PSII 复合体受到损伤伴随光合电子传递受阻，净光合、蒸腾速率、气孔导度显著下降，光合相关基因下调表达，并且氧化还原反应参与了叶片脱落过程[4,14]。但是，相邻未着药叶片的净光合速率、激素含量等虽然发生变化，但是10 d后均能恢复到对照水平，叶片不脱落[15]。

叶片脱落作为一个程序性生理过程的结果，进一步分析大田环境下噻苯隆处理引起棉花叶片基因表达水平的变化，是丰富噻苯隆诱导叶片脱落相关分子机制、提高应用效率的重要研究内容。目前，虽然已有论文阐述了噻苯隆诱导叶片脱落的基因表达或转录组变化，但主要以室内试验为主，叶龄与叶片位置的选择与实际田间生产存在一定差异。大田环境下，对噻苯隆诱导叶片脱落的分子调控机制的了解还比较欠缺。因此，本研究参考大量研究成果[2,13,16]，结合自主开展的试验[17-18]，以自育的噻苯隆敏感型品种冀丰 914 和不敏感型株系 04-1685 为材料[17]，在大田环境下通过测定噻苯隆处理后不同时间叶片的转录组，分析敏感型不同的棉花叶片响应噻苯隆处理的差异表达基因，以期为丰富噻苯隆诱导叶片脱落的分子机制以及优化喷施方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

供试材料：脱叶剂敏感型品种冀丰 914 (JF914)和脱叶剂不敏感型株系 04-1685。于 2020 年 4 月 27 日播种于河北省农林科学院粮油作物研究所堤上试验站，27 行区，行长 7 m，行距 0.7 m，株距 0.2 m。于 9 月 20 日在株高相同的健康棉株顶端，选择大小一致未衰老的叶片挂牌，当天处理组均匀喷施噻苯隆 50%可湿性粉剂(25 g 兑水 15 L)，周围用 1.5 m 宽、8 m 长塑料布遮挡，对照组喷施等体积清水。其他环节均按照正常大田管理。

喷施脱叶剂后的 0 d、1 d、3 d、5 d，在处理组摘取 3×3 片(3 次生物学重复，每个重复取 3 片叶片)叶片，用超纯水将叶片表面轻轻搽拭干净，用吸水

纸将叶片表面水分吸干, 迅速用液氮冷冻备用。

1.2　性状调查和激素测定

喷施脱叶剂当天和随后每隔 5 d 统计棉株上保留叶片数, 每个小区统计中间 3 行, 每行固定统计 10 株, 以喷施当天的叶片数为基础叶片数, 计算喷施后的脱叶率: 脱叶率(%)=(基础叶片数–统计当天叶片数)/基础叶片数×100%。

将 0.5 g 叶片磨碎, 在 2 mL 80%甲醇中混匀, –20℃放置 48 h。随后在 4℃条件下 4000×*g* 离心 15 min, 用 C18 Sep-Pak 过滤柱(Waters Corp., 美国)滤掉上清液, 再用 10 mL 100% (v/v)甲醇和 10 mL 乙醚重新悬浮沉淀, 在 20℃下用纯 N_2 干燥, –40℃保存。根据 ELISA 试剂盒的说明书, 采用双抗体夹心法测定乙烯、脱落酸和细胞分裂素。

1.3　RNA-seq 技术及分析

使用天根生化科技(北京)有限公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒, 从棉花叶片中提取总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, Agilent 2100 测定 RIN 值。质检合格后, 采用 Illumina Truseq RNA sample prep Kit 方法构建文库, 于 Illimina Novaseq 6000 平台完成 RNA 测序。首先使用 SeqPrep (https://github.com/jstjohn/SeqPrep) 和 Sickle (https://github.com/najoshi/sickle)软件对下机数据进行质控: 去除 reads 中的接头序列, 剔除低质量 reads, 去除 N 比例大于 10%的 reads, 剔除长度小于 50 bp 的 reads, 最后统计质控后数据的碱基含量、分布和错误率。其次使用 HISAT2 (http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml)软件将质控后序列比对至参考基因组, 统计 Reads 的分布情况及对基因组的覆盖度、测序饱和度等。使用 Cufflinks (http://cole-trapnelllab.github.io/cufflinks/)软件对比对至参考基因组上的 reads 进行组装和注释。使用 RSEM (http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/)软件计算基因表达水平, 转换成 FPKM (每千碱基转录序列的预期片段数/百万碱基对测序)值。采用 DESeq2 (http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/)软件进行样本间差异基因分析, 阈值为$|\log_2 FC| \geq 1$且 $P<0.05$。使用 WGCNA (https://horvath.genetics.ucla.edu/html/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/)软件分析基因共表达模块, 使用 KOBAS (http://kobas.cbi.pku.edu.cn/download.php) 软件进行基因 GO 和 KEGG 分析。

1.4　qRT-PCR 试验

使用康为世纪生物科技(北京)有限公司的 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix 将 RNA 反转录为 cDNA, 使用 TaKaRa 的 TB Green Premix Ex *Taq* 试剂盒完成 qRT-PCR 试验, 引物序列见表 1。各样本均为 3 次生物学重复和 3 次技术重复, 各项操作均严格按照说明书进行。随机选择 10 个基因, 以 *GhHis3* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

2　结果与分析

2.1　噻苯隆诱导不同棉花品种叶片脱落表型及激素含量变化

在脱叶剂敏感型品种冀丰 914 和脱叶剂不敏感型株系 04-1685 外施 TDZ 后, 第 2~3 天叶片开始出现干枯、失水症状, 第 3~4 天开始有叶片脱落。由图 1-a 可以看出, 与对照相比, 处理组的脱叶率明显高, 并且随处理时间的延长脱落率逐渐上升。处理

表 1　qRT-PCR 所用基因及其引物序列
Table 1　Gene and primer sequences used in qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5′–3′)	反向引物 Reverse primer (5′–3′)
GhHis3	TCAAGACTGATTTGCGTTTCCA	GCGCAAAGGTTGGTGTCTTC
Ghir_D07G009830	CAATCAGACAAGCCAACA	CTAAACCGACTTCTATGC
Ghir_D08G005270	CAAGGCTCGTCGTAAGGG	TTGGCATAGTTGACTTTGTTGA
Ghir_A01G018610	AAGTTCACCACCGTCAGA	CTCAAAGGACCATCAATC
Ghir_D08G001540	GGCTAACGCTGACCCTAC	ATCCTCCGTGACTCCAAG
Ghir_D07G008630	AGGGTTGGAATCTTGGTA	CCAGGTTTCGCTTGAATA
Ghir_D11G029010	ATCCAACAATAGGCAAGG	TCAAACTCCGACCACTCT
Ghir_A05G006740	GAACACTTGCCTCCTTCT	CTTAATAGCCTGTGGGTC
Ghir_A04G002920	CTCCTCTGGATTGGGTTTA	GGTTCCTTGGCAGTTGGT
Ghir_D08G020190	GCAACATCCTCCTTCACC	AAGCCCTCCAATACCAAT
Ghir_A06G003210	CAATAGCCAGGCAAGCGG	GGGCAATAGCAAACAGCA

后 5 d, 敏感型品种冀丰 914 的脱叶率接近 60%, 明显高于不敏感型材料 04-1685 的脱叶率(不足 50%); 在处理后 10 d, 冀丰 914 的脱叶率达到 90%以上, 而同期 04-1685 的脱叶率为 70%; 脱叶率均达到 90%时, 冀丰 914 较 04-1685 材料提早至少 10 d。进一步对植株内源相关激素进行测定, 与对照相比, 喷施 TDZ 后的冀丰 914 和 04-1685 的乙烯含量都大幅度提升, 并且在处理后 1 d 冀丰 914 中乙烯的含量快速提高并且达到峰值(330 ng L^{-1}), 而 04-1685 中的乙烯水平增长相对缓慢, 且含量较低(290 ng L^{-1}), 表明喷施 TDZ 后可诱导冀丰 914 更快、更强烈的乙烯的积累(图 1-b)。细胞分裂素测定结果显示, 外施 TDZ 可显著诱导植株体内细胞分裂素的积累, 动态监测表明, 冀丰 914 中细胞分裂素积累较 04-1685 速度更快、水平更高。具体表现为在测定的同时期(1 d), 二者细胞分裂素含量差别最大; 基本持平时(3 d), 冀丰 914 为显著下降阶段, 04-1685 为最高含量(图 1-c)。由图 1-d 可见, 外施 TDZ 后, 脱落酸在 2 个材料里的变化与乙烯与细胞分裂素类似, 冀丰 914 在 1 d 的含量最大, 04-1685 在 3 d 的含量最大。表明, 外施 TDZ 后, 冀丰 914 和 04-1685 株系呈现明显的脱叶表型差异和乙烯、细胞分裂素、脱落酸三大内源激素含量的差异; 冀丰 914 脱叶率更高, 内源激素变化更大, 表现出对 TDZ 处理更敏感。

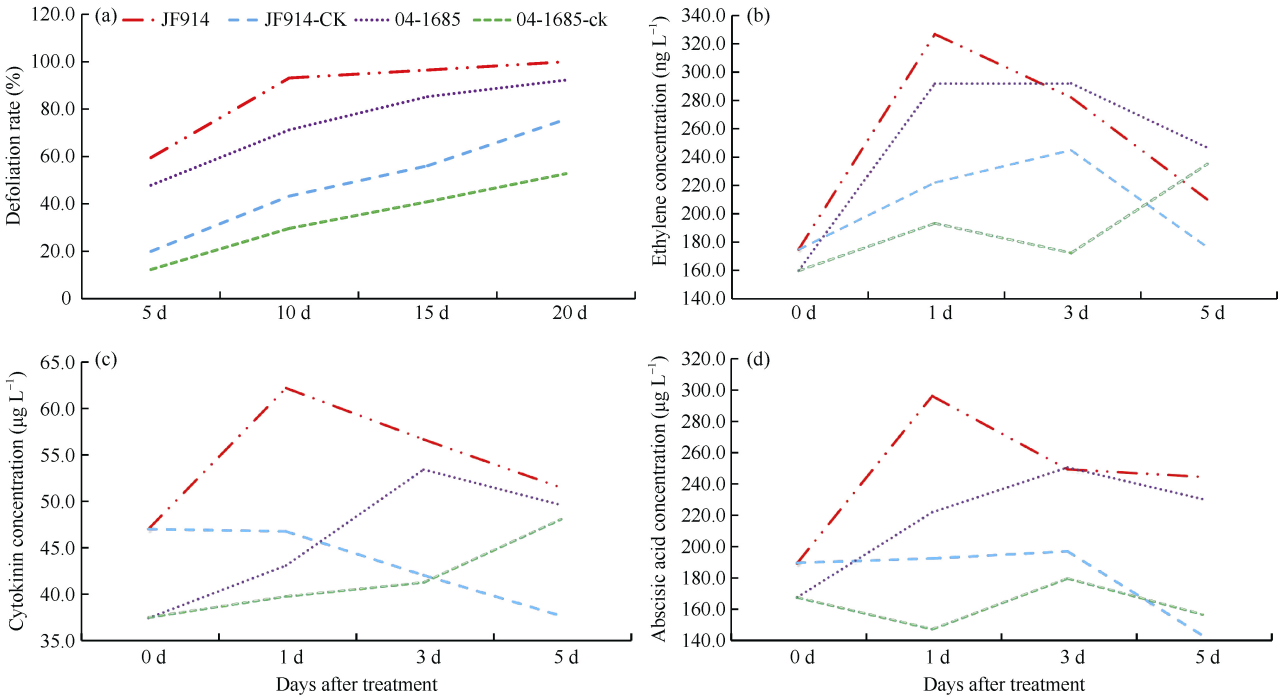


图 1 噻苯隆处理后的脱叶率和激素含量变化

Fig. 1 Changes of leaf defoliation rate and hormone contents after TDZ treatment

JF914: 冀丰 914; CK: 对照。JF914: Jifeng 914; CK: control.

2.2 噻苯隆诱导棉花叶片的转录组及差异表达基因分析

本研究经 RNA-seq 共得到 174.22 Gb 下机数据, 过滤后剩余 169.18 Gb, 各样本的平均数据量为 7.05 Gb, Q30 值最小为 93.03%, 与参考基因组的比对率为 92.83%~95.82%, 特异比对率为 84.09%~89.61%(附表 1)。通过与参考基因组比对, 得到 115,832 个已知转录本和 13,979 个新基因。主成分分析结果表明, 样本重复间聚集效果较好, 说明取样质量较好、测序数据可靠性较高(图 2)。

表 2 为冀丰 914 和 04-1685 材料间同一取样时期以及材料内不同取样时期的差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)数量, 共得到 33,283 个 DEGs。冀丰 914 和 04-1685 间分别有 644 (JF914-0d vs 04-1685-0d, 269 上调, 375 下调)、539 (JF914-1d vs 04-1685-1d, 218 上调, 321 下调)、339 (JF914-3d vs 04-1685-3d, 133 上调, 206 下调)和 1971 (JF914-5d vs 04-1685-5d, 740 上调, 1231 下调)个 DEG。说明喷施塞苯隆后, TDZ 敏感型与不敏感型品种相比, 上调表达的基因数量更少, 而下调表达的基因数量更多。冀丰 914 的不同取样时期间分别有 2151 (JF914-0d vs JF914-1d, 1180 上调, 971 下调)、

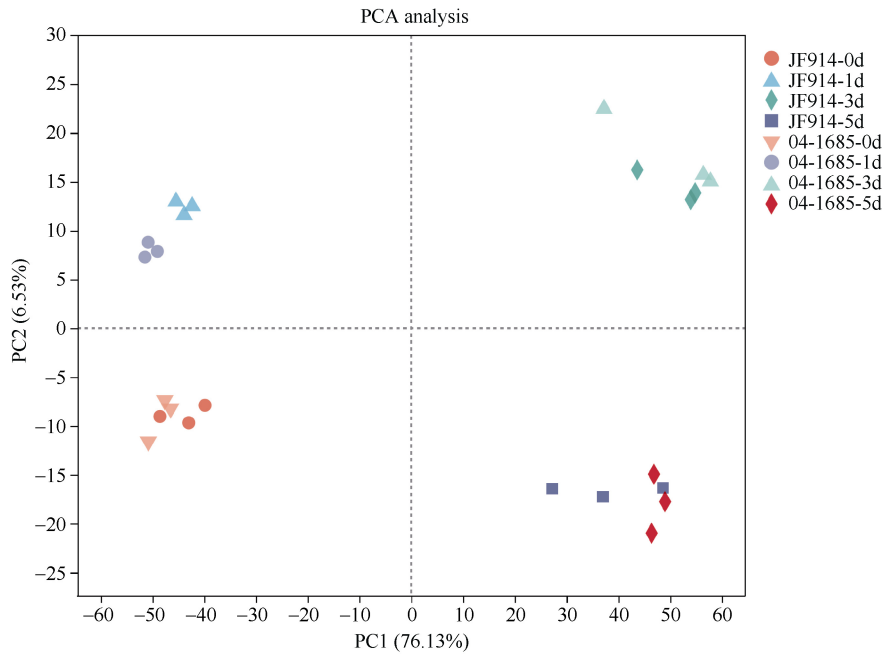


图 2　基于转录组测序数据的样本主成分分析

Fig. 2　Principal component analysis among samples based on RNA-seq data

JF914: 冀丰 914。JF914: Jifeng 914.

表 2　不同取样时期及材料间的差异表达基因数量

Table 2　Number of differentially expressed genes (DEGs) among the sample stages and materials

比较 Comparison	所有 DEGs Total DEGs	上调 Up regulated	下调 Down regulated
JF914-0d vs JF914-1d	2151	1180	971
JF914-1d vs JF914-3d	20,189	8045	12,144
JF914-3d vs JF914-5d	5039	2476	2563
JF914-0d vs 04-1685-0d	644	269	375
JF914-1d vs 04-1685-1d	539	218	321
JF914-3d vs 04-1685-3d	339	133	206
JF914-5d vs 04-1685-5d	1971	740	1231
04-1685-0d vs 04-1685-1d	3355	1892	1463
04-1685-1d vs 04-1685-3d	22,461	9019	13,442
04-1685-3d vs 04-1685-5d	5790	2520	3270

JF914: 冀丰 914。JF914: Jifeng 914.

20,189 (JF914-1d vs JF914-3d, 8045 上调, 12,144 下调)和 5039 (JF914-3d vs JF914-5d, 2476 上调, 2563 下调)个 DEGs。04-1685 的不同取样时期间分别有 3355 (04-1685-0d vs 04-1685-1d, 1892 上调, 1463 下调)、22,461 (04-1685-1d vs 04-1685-3d, 9019 上调, 13,442 下调)和 4790 (04-1685-3d vs 04-1685-5d, 2520 上调, 3270 下调)个 DEGs。由此可知, 在处理后 1~3 d, 冀丰 914 和 04-1685 的差异表达基因数量均最多, 说明处理后 1~3 d 是关键时间点。

为验证 RNA-seq 数据的可靠性, 随机选择 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 试验, 结果表明, 荧光定量结果与 RNA-seq 结果的基因表达趋势一致(图 3), 证明 RNA-seq 数据具有较强的可靠性。

2.3　WGCNA 分析

图 4-A 为模块与样本的 WGCNA 分析结果, 随着处理后时间的推移, yellow 模块与样本的相关性呈由负到正的变化, 与 JF914-5d (r = 0.537, P = 0.006,82)为极显著正相关; brown 和 turquoise 两个模块与样本的相关性呈先增大后减小、由正到负的变化, brown 与 JF914-1d (r = 0.573, P = 0.003,43)为极

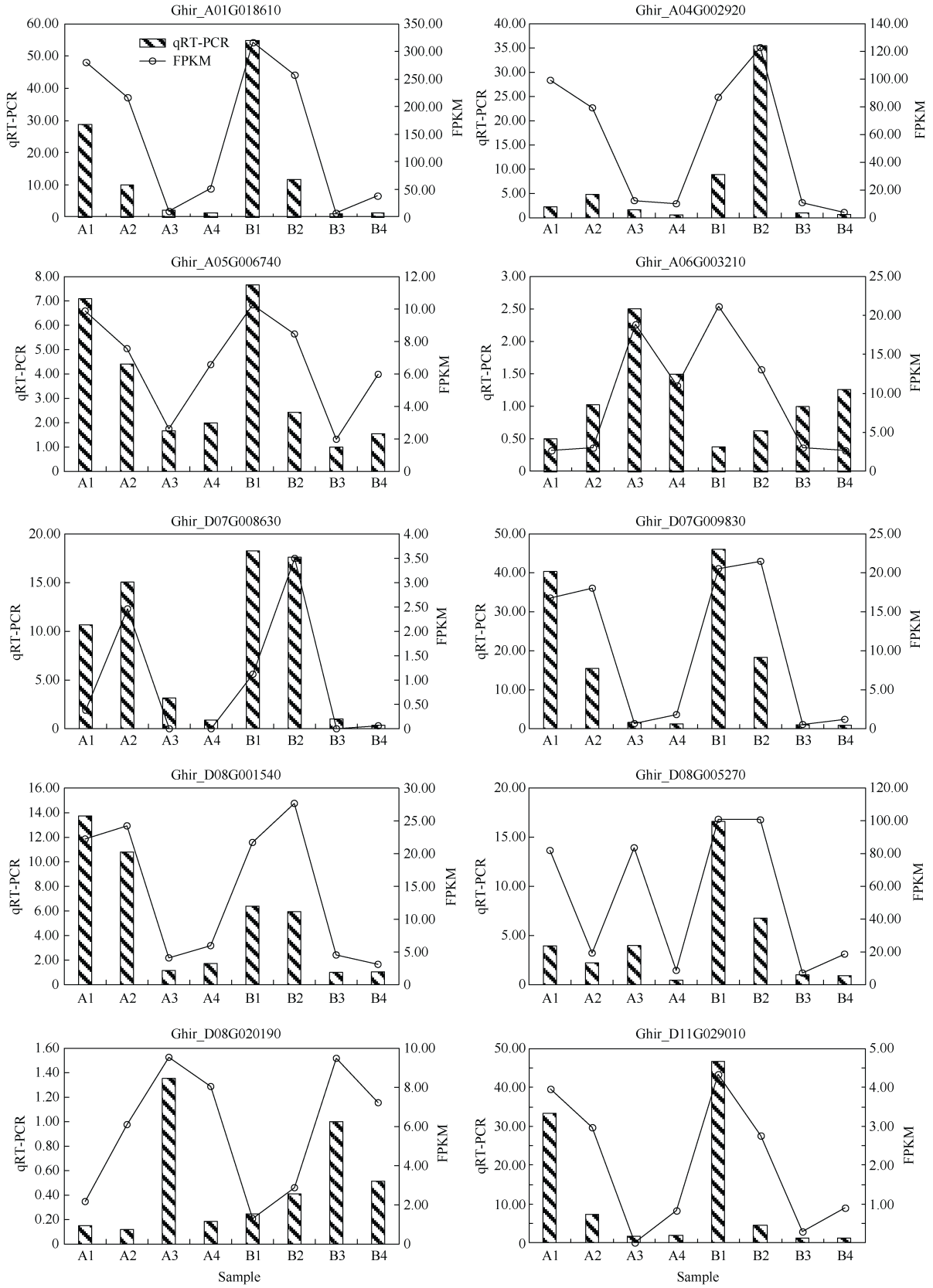


图 3 荧光定量与 RNA-seq 结果比对

Fig. 3 Comparison of qRT-PCR vs RNA-seq

A: 冀丰 914; B: 04-1685; 1: 0 d; 2: 1 d; 3: 3 d; 4: 5 d。

A: Jifeng 914; B: 04-1685; 1: 0 d; 2: 1 d; 3: 3 d; 4:5 d.

显著正相关、与 04-1685-5d (r = –0.573, P = 0.003,43)极显著负相关, turquoise 与 04-1685-1d (r = 0.537, P = 0.006,82)为极显著正相关; magenta、pink、red 和 blue 模块与样本的相关性呈先增大后减小的变化, magenta 与 04-1685-3d (r = 0.537, P = 0.006,82)、pink 与 JF914-1d (r = 0.555, P = 0.004,88)、red 与 JF914-3d (r = 0.573, P = 0.003,43)以及 blue 与 JF914-3d (r = 0.519, P = 0.009,36)均为极显著正相关。

图 4-B 为模块与激素的 WGCNA 分析结果, 其中 magenta 模块与乙烯(r = 0.898, P=0)、脱落酸(r = 0.733, P = 0.000,05)和细胞分裂素(r=0.63, P = 0.000,97)均为极显著正相关, brown 模块与乙烯(r = –0.812, P = 0)、脱落酸(r = –0.722, P = 0.000,07)和细胞分裂素(r = –0.628, P = 0.001,02)均为极显著负相关。

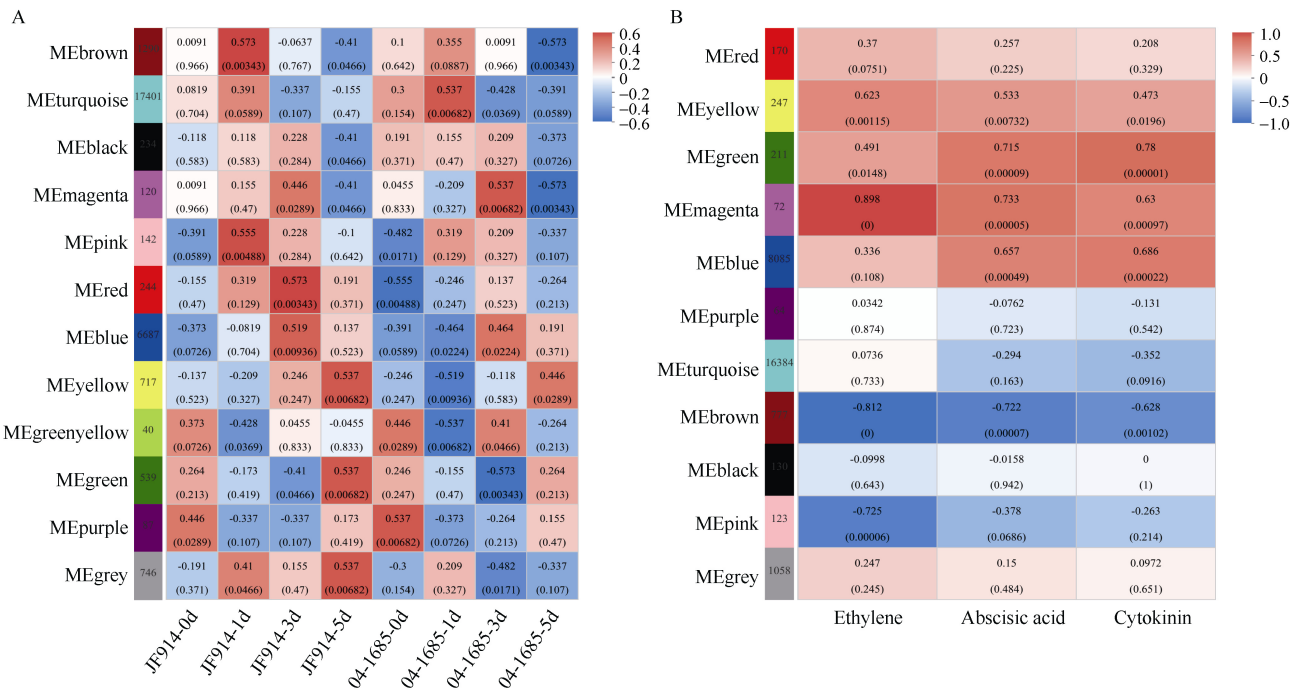


图 4　样品和激素的共表达模块

Fig. 4　coexpression modules for sample and hormone

JF914: 冀丰 914。JF914: Jifeng 914.

2.4　特异模块基因的 GO 富集和 KEGG 分析

根据激素含量的变化发现, 冀丰 914 在处理后 1 d 的激素含量达到最大值, 04-1685 在处理后 3 d 的激素含量达到最大值。由此推测, 喷施噻苯隆后 1 d 和 3 d 分别是 2 个材料响应噻苯隆处理的关键时期。因此, 分别选取与样本 JF914-1d、04-1685-3d 相关性最大的 brown、magenta、pink 模块和激素的 magenta 和 brown 模块, 进行模块内基因的 GO 富集和 KEGG 分析。

根据分析结果, 依据 P-adjust<0.05 或者排序第一位的原则, 选取了每个模块主要富集到的 GO (表 3)和 KEGG 通路(表 4)。由表 3 可知, 激素中, brown 模块基因主要富集到 DNA 光解酶活性、氧化还原酶活性、叶绿素 *a* 加氧酶活性、水分转运、非生物胁迫的响应以及昼夜节律等 GO 条目, magenta 模块基因主要富集到昼夜节律调控相关的 GO 条目; 样本中, brown 模块基因主要富集到结构分子活性、核糖体等细胞器以及翻译等 GO 条目, magenta 模块基因主要富集到 NAD^+激酶活性相关 GO 条目, pink 模块基因主要富集到昼夜节律调控相关 GO 条目。由表 4 可知, 激素中, brown 模块基因主要富集到植物昼夜节律、烟酸和烟酰胺代谢、过氧化物酶体以及蛋白质的加工、运输、水解等 KEGG 通路, magenta 模块基因主要富集到植物激素信号转导、碱基及氨基酸的合成和代谢等 KEGG 通路; 样本中, brown 模块基因主要富集到糖酵解/糖异生、氨基糖和核苷酸糖代谢、戊糖磷酸途径、鞘磷脂代谢、核糖体和噬菌体等 KEGG 通路, magenta 模块基因主要富集到硫胺代谢、内吞作用和噬菌体等 KEGG 通路, pink 模块基因主要富集到植物激素信号转导和萜类骨架生物合成等 KEGG 通路。

根据模块基因的 GO 和 KEGG 分析, 所筛选模块内的基因主要参与非生物胁迫响应、昼夜节律等

过程的调控。在噻苯隆处理后 1 d 和 3 d, 热激蛋白基因(*HSP70*、*HSP90*、*ATJ3*)、钙稳态调控基因(*AtCRT3*、*AtNCL*)和节律基因(*LNK2*、*APRR9*、*AtCCA1*)显著下调表达, 节律基因(*ARR8*)上调表达(附表 2)。

表 3 每个模块内的基因主要富集到的 GO 条目
Table 3 GO items enriched by genes in each module

性状 Trait	模块 Module	GO 号 GO ID	描述 Description	条目类型 Term type	基因数量 Gene number	校正 *P* 值 *P*-adjust
激素 Hormone	棕色 Brown	GO:0003913	DNA 光解酶活性 DNA photolyase activity	MF	5	0
		GO:0016703	氧化还原酶活性, 作用于结合分子氧的单个供体, 结合一个氧原子(内部单加氧酶或内部混合作用氧化酶) Oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of one atom of oxygen (internal monooxygenases or internal mixed function oxidases)	MF	6	0.002
		GO:0010277	叶绿素 *a* 加氧酶[总]活性 Chlorophyllide *a* oxygenase [overall] activity	MF	6	0.002
		GO:0005372	水跨膜转运子活性 Water transmembrane transporter activity	MF	6	0.003
		GO:0042044	液体转运 Fluid transport	BP	6	0
		GO:0006833	水分转运 Water transport	BP	6	0
		GO:0009628	响应非生物刺激 Response to abiotic stimulus	BP	31	0.007
		GO:0007623	昼夜节律 Circadian rhythm	BP	6	0.017
		GO:0048511	节律过程 Rhythmic process	BP	6	0.017
	品红 Magenta	GO:0042752	昼夜节律调控 Regulation of circadian rhythm	BP	4	0.001
		GO:0042753	昼夜节律正向调控 Positive regulation of circadian rhythm	BP	3	0.009
样品 Sample	棕色 Brown	GO:0005198	结构分子活性 Structural molecule activity	MF	59	0.013
		GO:0003735	核糖体结构组分 Structural constituent of ribosome	MF	53	0.020
		GO:0047334	二磷酸果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶活性 Diphosphate-fructose-6-phosphate-1-phosphotransferase activity	MF	4	0.043
		GO:0005840	核糖体 Ribosome	CC	55	0.011
		GO:0043228	无膜包裹的细胞器 Non-membrane-bounded organelle	CC	67	0.038
		GO:0043232	细胞内部无膜包裹的细胞器 Intracellular non-membrane-bounded organelle	CC	67	0.038
		GO:0006412	翻译 Translation	BP	49	0.044
	品红 Magenta	GO:0003951	NAD^+激酶活性 NAD^+ kinase activity	MF	3	0.938
	粉色 Pink	GO:0042752	昼夜节律调控 Regulation of circadian rhythm	BP	4	0.008
		GO:0042753	昼夜节律正向调控 Positive regulation of circadian rhythm	BP	3	0.066

MF: 分子功能; BP: 生物学过程; CC: 细胞组分。
MF: molecular function; BP: biological process; CC: cellular component.

表 4　每个模块内的基因主要富集到的 KEGG 通路

Table 4　KEGG pathways enrich by genes in each module

性状 Trait	模块 Module	KEGG 通路号 KEGG pathway ID	描述 Description	基因数量 Gene number	校正 *P* 值 *P*-adjust
激素 Hormone	棕色 Brown	map04712	昼夜节律-植物 Circadian rhythm-plant	13	3.02E-06
		map00760	烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	5	0.079
		map04141	内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	18	0.162
		map04146	过氧化物酶体 Peroxisome	9	0.494
		map03060	蛋白质外排 Protein export	6	0.647
		map04120	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	11	0.698
	品红 Magenta	map04075	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	5	0.006
		map00230	嘌呤代谢 Purine metabolism	2	0.168
		map00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis	1	0.769
		map00240	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	1	0.992
样品 Sample	棕色 Brown	map00010	糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	18	0.062
		map03010	核糖体 Ribosome	38	0.088
		map00520	氨基糖和核苷酸唐代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	17	0.170
		map04145	噬菌体 Phagosome	14	0.586
		map00030	戊糖磷酸途径 Pentose phosphate pathway	8	0.830
		map00600	鞘磷脂代谢 Sphingolipid metabolism	6	0.867
	品红 Magenta	map00730	硫胺素代谢 Thiamine metabolism	2	0.195
		map04144	内吞作用 Endocytosis	4	0.426
		map04145	吞噬体 Phagosome	3	0.527
	粉色 Pink	map04075	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	5	0.420
		map00900	萜类主链生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	2	0.740

3　讨论

3.1　噻苯隆引起叶片激素含量变化

优化脱叶催熟效果，有助于提高棉花机械收获的效率和品质，达到节本、提质、增效的目的。近年来，研究噻苯隆诱导脱叶的分子调控机制，是棉花基础研究的热点之一，中国农业科学院棉花研究所[1,14]、中国农业大学[10]、华中农业大学[13]等单位均开展了相关研究。现有研究结果表明，乙烯、生长素、脱落酸、细胞分裂素等在噻苯隆诱导棉花叶片脱落过程中发挥了重要作用，其中乙烯的作用最关键，通过与生长素、细胞分裂素、脱落酸等激素的相互作用，发挥核心功能[10,13]。乙烯和细胞分裂素的互作对叶片离层的形成至关重要[13]。本研究发现，喷施噻苯隆后，棉花叶片中的乙烯、脱落酸和细胞

分裂素含量均显著增加, 乙烯含量的变化在 2 个材料中均较为迅速, 而细胞分裂素和脱落酸的含量变化在敏感型材料中更为迅速。敏感型品种冀丰 914 的激素含量在处理后 1 d 达到最高水平, 不敏感型材料 04-1685 的激素含量在处理后 3 d 达到最高水平。由此推测, 冀丰 914 在处理后 1 d 内高浓度的乙烯、脱落酸和细胞分裂素含量, 能够更早地促进离层细胞分化和离层的形成, 3 d 后细胞分裂素浓度快速下降也有利于离层的形成。而 04-1685 中激素含量的变化相对缓慢, 离层细胞的分化和离层的形成均晚于冀丰 914。Li 等[10]研究发现, 喷施噻苯隆后, 叶片的乙烯和脱落酸含量显著增加, 但是细胞分裂素含量减少, 而本研究发现细胞分裂素在处理后呈现先增加后减少的变化趋势, 可能是由于大田环境比控制条件下更为复杂引起。

3.2 噻苯隆引起叶片激素信号响应基因表达变化

Xu 等[13]的研究表明, 喷施噻苯隆后, 细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因和乙烯相关基因上调表达, *GhCKX3* 表达量下降后会推迟叶片脱落并且降低对乙烯的响应。Li 等[10]的研究表明, 噻苯隆处理会诱导乙烯合成和信号基因的表达、增加乙烯的积累, 下调生长素合成、信号和转运基因的表达, 抑制细胞分裂素合成基因同时促进其代谢基因的表达。本研究利用 RNA-seq 技术, 分析了噻苯隆敏感型和不敏感型棉花叶片在噻苯隆处理后激素相关基因表达的变化(附表 3), 结果发现, 乙烯信号响应基因 *Ghir_A04G003200*、*Ghir_A05G010280*、*Ghir_D05G010000* 和 *Ghir_D12G023960* 在处理后 5 d 内均保持在较高的表达水平, 因而能促进乙烯含量的积累, 其中 *Ghir_A04G003200* 和 *Ghir_D12G023960* 在敏感型品种冀丰 914 中的表达量更高, 因此冀丰 914 中乙烯含量的积累速度和浓度均高于 04-1685。脱落酸信号响应基因 *Ghir_D03G018940*、*Ghir_D11G004410* 和 *Ghir_D12G027950* 等主要在处理后 1 d 内保持较高的表达水平, 随后逐渐下降, 因此能够促使脱落酸在处理后 1 d 内快速增加, 其中 *Ghir_D11G004410* 和 *Ghir_D12G027950* 在敏感型品种冀丰 914 中的表达量更高, *Ghir_D11G004410* 同时响应乙烯信号, 因此能够促进冀丰 914 中脱落酸和乙烯含量快速积累。细胞分裂素代谢相关基因 *Ghir_A05G004020*、*Ghir_A07G001250* 和 *Ghir_D07G001260* 等在处理后 1 d 内表达量很低, 处理后 3 d 和 5 d 的表达量急剧增加, 但是细胞分裂素响应基因 *Ghir_A05G003480* 在处理后 1 d 内保持较高的表达水平, 处理后 3 d 和 5 d 的几乎不表达, 因而能够保持细胞分裂素在噻苯隆处理后 1 d 内较高的含量, 随后由于代谢加快, 含量逐渐减少, 其中 *Ghir_A05G004020* 和 *Ghir_D07G001260* 在敏感型品种中的表达量更高, 因此冀丰 914 中细胞分裂素的分解代谢更快。因此, 喷施噻苯隆后, 乙烯和脱落酸信号基因在噻苯隆敏感型品种中快速高调表达, 导致乙烯和脱落酸含量在 1 d 内快速积累, 促进离层细胞的分化, 而细胞分裂素代谢基因的在第 3 天开始高调表达, 加快细胞分裂素的分解, 进一步促进离层的形成[10,12-13]。

3.3 昼夜节律和非生物胁迫反应可能参与噻苯隆诱导的叶片脱落

昼夜节律[19-21]和非生物胁迫[22-24]均能导致细胞死亡、叶片衰老和脱落。激素与昼夜节律之间存在相互调控关系[25-26], 乙烯[27-28]、细胞分裂素[26]、脱落酸[29]等激素代谢、感知和响应基因均受到植物节律的调控, 各种激素信号也调控着植物节律的变化。干旱、温度、盐等的非生物胁迫, 也会加速叶片的衰老和脱落, 激素也参与其中[30-32]。田间环境下, 光照、温度、湿度、病虫等均会影响棉花的生长, 棉花应对着更加复杂的外界刺激[22,24-25,30], 喷施噻苯隆后不仅会对棉花叶片形成激素形式的外界刺激, 同时会引发一系列应激反应。本研究在大田环境下, 利用 RNA-seq 技术研究噻苯隆诱导棉花叶片脱落的分子调控机制, 通过 WGCNA 分析, 富集到了大量的植物节律基因和非生物胁迫响应基因(表 3、表 4 和附表 1)。结果发现, 在噻苯隆处理后 1 d 和 3 d, 热激蛋白基因(*HSP70*、*HSP90*、*ATJ3*)、钙稳态调控基因(*CRT3*、*NCL*)和节律基因(*LNK2*、*APRR9*、*CCA1*)显著下调表达, 节律基因(*ARR8*)上调表达。由此推测, 在塞苯隆的刺激下, 棉株体内的抗逆基因表达量下降, 从而降低叶片应对外界刺激的能力, 同时节律基因表达被破坏, 导致昼夜节律失调, 扰乱了叶片的内稳态, 加速叶片衰老, 同时在激素的作用下形成离层, 最终诱导叶片脱落。

然而, 噻苯隆处理是否通过改变激素水平、扰乱植物节律、破坏叶片内稳态, 从而降低叶片对非生物胁迫刺激的防御能力、加速叶片衰老脱落, 以及各个生理过程相关基因表达的时间顺序、调控关系如何等问题, 均有待进一步探究证明。

4　结论

大田环境下, 吐絮期喷施噻苯隆, 棉花叶片中的乙烯、脱落酸和细胞分裂素含量均显著增加, 敏感型品种激素含量增加更为迅速, 不敏感型材料激素含量增加相对较慢。同时检测到乙烯和脱落酸信号响应基因、细胞分裂素代谢基因在敏感型品种中的表达量更高。发现非生物胁迫响应基因和植物节律基因可能参与田间条件下噻苯隆诱导棉花叶片脱落的分子调控过程。

附表　请见网络版: 1) 本刊网站 http://zwxb.chinacrops.org/; 2) 中国知网 http://www.cnki.net/; 3) 万方数据 http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx。

References

[1] Jin D, Xu Y, Gui H, Zhang H, Dong Q, Sikder R K, Wang X, Yang G, Song M. Evaluation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf abscission sensitivity triggered by thidiazuron through membership function value. *Plants*, 2021, 10: 49.

[2] 田景山, 张煦怡, 张丽娜, 徐守振, 祁炳琴, 随龙龙, 张鹏鹏, 杨延龙, 张旺锋, 勾玲. 新疆机采棉花实现叶片快速脱落需要的温度条件. 作物学报, 2019, 45: 613–620.
Tian J S, Zhang X Y, Zhang L N, Xu S Z, Qi B Q, Sui L L, Zhang P P, Yang Y L, Zhang W F, Gou L. Temperatures of promoting rapid leaf abscission of cotton in Xinjiang region. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 613–620 (in Chinese with English abstract).

[3] 聂军军, 代建龙, 杜明伟, 张艳军, 田晓莉, 李召虎, 董合忠. 我国现代植棉理论与技术的新发展: 棉花集中成熟栽培. 中国农业科学, 2021, 54: 4286–4298.
Nie J J, Dai J L, Du M W, Zhang Y J, Tian X L, Li Z H, Dong H Z. New development of modern cotton farming theory and technology in China: concentrated maturation cultivation of cotton. *Sci Agric Sin*, 2021, 54: 4286–4298 (in Chinese with English abstract).

[4] 高丽丽, 李淦, 康正华, 李健伟, 王蜜蜂, 马云珍, 张巨松. 脱叶剂对棉花叶片叶绿素荧光动力学参数的影响. 棉花学报, 2016, 28: 345–352.
Gao L L, Li G, Kang Z H, Li J W, Wang M F, Ma Y Z, Zhang J S. Effect of defoliants on chlorophyll fluorescence of cotton leaves. *Cotton Sci*, 2016, 28: 345–352 (in Chinese with English abstract).

[5] 宋兴虎, 徐东永, 孙璐, 赵文超, 曹龙龙, 张祥, 唐纪元, 韩焕勇, 王洪这, 陈洪章, 王林, 赵冰梅, 杜明伟, 田晓莉, 李召虎. 在不同棉区噻苯隆和乙烯利用量及配比对脱叶催熟效果影响. 棉花学报, 2020, 32: 247–257.
Song X H, Xu D Y, Sun L, Zhao W C, Cao L L, Zhang X, Tang J Y, Han H Y, Wang H Z, Chen H Z, Wang L, Zhao B M, Du M W, Tian X L, Li Z H. Effect of thidiazuron and ethylene use and ratio on defoliation ripening in different cotton area. *Cotton Sci*, 2020, 32: 247–257 (in Chinese with English abstract).

[6] 张大伟, 魏鑫, 徐海江, 刘忠山, 李春平, 马清倩, 徐建辉. 不同棉花品种对脱叶剂的响应. 新疆农业科学, 2019, 56(1): 146–153.
Zhang D W, Wei X, Xu H J, Liu Z S, Li C P, Ma Q Q, Xu J H. Study on the response of cotton varieties with different genotypes to defoliants. *Xinjiang Agric Sci*, 2019, 56(1): 146–153 (in Chinese with English abstract).

[7] 王天友. 南疆陆地棉种质资源遗传多样性及对脱叶剂的敏感性分析. 塔里木大学硕士学位论文, 新疆阿拉尔, 2020.
Wang T Y. Analysis of Genetic Diversity and Sensitivity to Sefoloant of Upland Cotton Germplasm Resources in Southern Xinjiang. MS Thesis of Tarim University, Aral, Xinjiang, China, 2020 (in Chinese with English abstract).

[8] 周先林, 覃琴, 王龙, 李璐, 胡成成, 洪秀春, 王伟, 朱海勇. 脱叶剂对两种机采模式下棉花脱叶效果及纤维品质的影响. 中国农业科技导报, 2020, 22(11): 144–152.
Zhou X L, Qin Q, Wang L, Li L, Hu C C, Hong X C, Wang W, Zhu H Y. Influence of defoliant on defoliation effect and fiber quality of cotton under two kinds of mechanical harvesting modes. *J Agric Sci Technol*, 2020, 22(11): 144–152 (in Chinese with English abstract).

[9] Suttle J C. Disruption of the polar auxin transport system in cotton seedlings following treatment with the defoliant thidiazuron. *Plant Physiol*, 1988, 86: 241–245.

[10] Li F, Wu Q, Liao B, Yu K, Huo Y, Meng L, Wang S, Wang B, Du M, Tian X, Li Z. Thidiazuron promotes leaf abscission by regulating the crosstalk complexities between ethylene, auxin, and cytokinin in cotton. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 2696.

[11] 廖宝鹏, 王崧嫚, 杜明伟, 李芳军, 田晓莉, 李召虎. 棉花不同部位主茎叶对脱叶剂噻苯隆的响应及机理. 棉花学报, 2020, 32: 418–424.
Liao B P, Wang S M, Du M W, Li F J, Tian X L, Li Z H. Responses and underlying mechanisms of different mainstem leaves on cotton to defoliant thidiazuron. *Cotton Sci*, 2020, 32: 418–424 (in Chinese with English abstract).

[12] 高瑜, 徐娇, 张冰, 孙伟男, 杨细燕. 机采棉化学脱叶伴随着剧烈的乙烯及细胞分裂素信号响应. 棉花学报, 2020, 32: 491–500.
Gao Y, Xu J, Zhang B, Sun W N, Yang X Y. Chemical defoliation of machine-harvested cotton was accompanied by intense ethylene and cytokinin signal responses. *Cotton Sci*, 2020, 32: 491–500 (in Chinese with English abstract).

[13] Xu J, Chen L, Sun H, Wusiman N, Sun W, Li B, Gao Y, Kong J, Zhang D, Zhang X, Xu H, Yang X. Crosstalk between cytokinin and ethylene signaling pathways regulates leaf abscission in cotton in response to chemical defoliants. *J Exp Bot*, 2019, 70: 1525–1538.

[14] Jin D, Wang X, Xu Y, Gui H, Zhang H, Dong Q, Sikder R K, Yang G, Song M. Chemical defoliant promotes leaf abscission by altering ROS metabolism and photosynthetic efficiency in *Gossypium hirsutum*. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 2738.

[15] 王晓婧, 李思嘉, 刘瑞显, 张国伟, 杨长琴, 倪万潮. 棉花施用脱叶剂对相邻未着药叶片生理活性的影响. 棉花学报, 2019, 31: 64–71.
Wang X J, Li S J, Liu R X, Zhang G W, Yang C Q, Ni W C. Effect of defoliants application on physiological characters of cotton leaf without defoliants. *Cotton Sci*, 2019, 31: 64–71 (in Chinese with English abstract).

[16] 高丽丽. 脱叶剂喷施时间对棉花生理调节效应的研究. 新疆

农业大学硕士学位论文, 新疆乌鲁木齐, 2016.
Gao L L. Study of Defoliants Spraying Time on Cotton Physiological Mechanism. MS Thesis of Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, China, 2016 (in Chinese with English abstract).

[17] 朱继杰, 王士杰, 赵红霞, 李妙, 王国印, 聂俊杰, 牛立强, 闫丽丽. 适宜河北省机械采摘的棉花品种筛选研究. 河北农业科学, 2018, 22(4): 60–62.
Zhu J J, Wang S J, Zhao H X, Li M, Wang G Y, Nie J J, Niu L L, Yan L L. Study on screening cotton varieties suitable for mechanical harvest in Hebei province. *J Hebei Agric Sci*, 2018, 22(4): 60–62 (in Chinese with English abstract).

[18] 朱继杰, 赵红霞, 王士杰, 李妙, 王国印. 不同棉花品种对脱叶剂敏感性研究. 中国棉花, 2018, 45(4): 15–18.
Zhu J J, Zhao H X, Wang S J, Li M, Wang G Y. Study on the sensitivity of different cotton cultivars to defoliant. *China Cotton*, 2018, 45(4): 15–18 (in Chinese with English abstract).

[19] Xu X, Yuan L, Yang X, Zhang X, Wang L, Xie Q. Circadian clock in plants: linking timing to fitness. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64: 792–811.

[20] Creux N, Harmer S. Circadian rhythms in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11: a034611.

[21] Srivastava D, Shamim M, Kumar M, Mishra A, Maurya R, Sharma D, Pandey P, Singh K N. Role of circadian rhythm in plant system: an update from development to stress response. *Environ Exp Bot*, 2019, 162: 256–271.

[22] Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad M. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot*, 2007, 61: 199–223.

[23] Xu Y, Zhan C, Huang B. Heat Shock Proteins in association with heat tolerance in grasses. *Int J Proteom*, 2011, 2011: 529648.

[24] Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam M, Roychowdhury R, Fujita M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 9643–9684.

[25] Hanano S, Domagalska M A, Nagy F, Davis S J. Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells*, 2006, 11: 1381–1392.

[26] Covington M F, Maloof J N, Straume M, Kay S A, Harmer S L. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genom Biol*, 2008, 9: R130.

[27] Song Q, Ando A, Xu D, Fang L, Zhang T, Hu E, Qiao H, Deng X W, Chen Z J. Diurnal down-regulation of ethylene biosynthesis mediates biomass heterosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 5606–5611.

[28] Haydon M J, Mielczarek O, Frank A, Román Á, Webb A A. Sucrose and ethylene signaling interact to modulate the circadian clock. *Plant Physiol*, 2017, 175: 947–958.

[29] Mockler T C, Michael T P, Priest H D, Shen R, Sullivan C M, Givan S A, McEntee C, Kay S A, Chory J. The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2007, 72: 353–363.

[30] Kou X, Zhao X, Wu B, Wang C, Wu C, Yang S, Zhou J, Xue Z. Auxin response factors are ubiquitous in plant growth and development, and involved in crosstalk between plant hormones: a review. *Appl Sci*, 2022, 12: 1360.

[31] Kamal N M, Gorafi Y S A, Abdelrahman M, Abdellatef E, Tsujimoto H. Stay-green trait: a prospective approach for yield potential, and drought and heat stress adaptation in globally important cereals. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 5837.

[32] Ahanger M A, Ashraf M, Bajguz A, Ahmad P. Brassinosteroids regulate growth in plants under stressful environments and crosstalk with other potential phytohormones. *J Plant Growth Regul*, 2018, 37: 1007–1024.