

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

高瑜,徐娇,张冰,孙伟男,杨细燕*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070)

摘要:【目的】化学脱叶是棉花机采前必需的技术措施,脱叶效果直接影响棉花机采的效率和纤维品质,解析脱叶剂调控脱叶的分子机理可以有效地指导机采棉品种的选育。【方法】选取 200 份棉花种质资源在温室种植,根据初花期脱叶剂处理后第 4 天的脱叶率筛选出对脱叶剂敏感性不同的材料,并在大田种植的吐絮期进行脱叶剂处理,统计处理后第 7 天的脱叶率确定脱叶效果。在脱叶剂敏感和不敏感材料中各选取 2 个,对脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天离层进行取样,通过实时荧光定量聚合酶链反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测乙烯、细胞分裂素和水解酶相关基因的表达。【结果】通过温室及大田筛选,得到脱叶剂敏感材料和不敏感材料各 6 个;qRT-PCR 研究发现,大部分乙烯相关基因、细胞分裂素相关基因及水解酶相关基因在脱叶剂处理后呈现不同的表达模式,且在不同敏感性材料中差异表达。【结论】不同棉花种质对脱叶剂响应存在差异,这可能是细胞分裂素和乙烯相关基因差异表达的结果。

关键词:棉花;细胞分裂素;脱叶剂;脱叶率;乙烯

Chemical Defoliation of Machine-Harvested Cotton was Accompanied by Intense Ethylene and Cytokinin Signal Responses

Gao Yu, Xu Jiao, Zhang Bing, Sun Weinan, Yang Xiyan*

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] Chemical defoliation is a necessary technical measure for machine-harvested cotton, and the effect of chemical defoliation directly affects the efficiency of mechanical-picking and fiber quality. Study on the molecular mechanism of defoliant in regulating defoliation could effectively guide the screening and improvement of defoliant-sensitive cotton germplasms. [Method] In this study, 200 cotton accessions were collected and planted in greenhouse, and treated with defoliant at the early flowering stage. Different varieties with high or low sensitivity to defoliant were selected according to the defoliation rate on the 4th day after treatment. The selected cotton varieties were also treated with defoliant at the boll opening stage in the field, and the defoliation rate on the 7th day after treatment was calculated. Meanwhile, samples from the abscission zone of the selected varieties were collected on the first and third day after treatment. And the expression of ethylene-, cytokinin- and hydrolase- related genes were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). [Result] Six defoliant sensitive and 6 insensitive varieties were selected from greenhouse and field tests. According to the qRT-PCR results, cytokinin-related genes, ethylene-related genes and hydrolase-related genes showed different expression patterns following defoliant treatment in different varieties, and most of these genes showed significant different expression in the defoliant sensitive and insensitive varieties. [Conclusion] This study indicates that different cotton germplasms respond to differently to defoliant, which might be the result of differential expression of cytokinin- and ethylene-related genes.

Keywords: cotton; cytokinin; defoliant; defoliation rate; ethylene

棉花是我国重要的经济作物。棉花全程机械化是稳定棉花种植面积及其产业链,实现“快乐植棉”的根本出路^[1]。机采机收是棉花全程机械化

的关键环节。自 21 世纪初采棉机在我国推广以来,我国机采技术不断发展,机采棉花比例逐步上升,相关政策法规体系日趋完善,综合效益逐

收稿日期:2019-09-03

第一作者简介:高瑜(1997—),女,本科生,15057067488@163.com。* 通信作者:yxy@mail.

hzau.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD1000907)

步呈现。2019 年新疆机采棉面积达到 77 万 hm^2 , 北疆 90% 棉田实现机采, 黄河流域和长江流域棉区也在积极示范推广。

化学脱叶是机采前必需的技术措施, 能有效减少机采棉杂质含量。化学脱叶剂作用原理主要是通过调控植物内源激素平衡, 诱导叶片形成离层进而脱落^[2]。脱叶剂可以分为触杀型和内吸型。触杀型脱叶剂通过化学作用伤害植物细胞组织, 刺激内源乙烯的生成, 达到脱叶催熟的效果, 如脱叶磷 (Butiphos)、百草枯 (Paraquat) 等; 内吸型脱叶剂不伤害植物组织, 通过喷施直接释放乙烯的化合物达到脱叶催熟效果, 如乙烯利 (Ethephon)、噻唑隆 (Thidiazuron) 等^[3]。生产上常用的脱叶剂为内吸型脱叶剂, 主要由乙烯利、噻唑隆及相关助剂组成。噻唑隆具有细胞分裂素的效果, 能促进细胞急剧分裂, 其诱发的乙烯释放与化学伤害、衰老无关, 有较好的脱叶效果^[4]。

脱落是 1 种普遍的自然现象, 正常的脱落与成熟衰老有关, 具有高度的精确性和程序性^[5-7]。植物激素对脱落具有重要的调控作用, 乙烯和生长素是研究较多的 2 类激素。Addicott^[8] 认为植物器官的脱落是由近轴端和远轴端生长素的相对浓度, 即“生长素梯度”决定的。生长素可能通过阻断离层细胞对乙烯信号的响应而抑制脱落^[9-10]。乙烯依赖性信号转导途径是目前认为的主要脱落调控途径。乙烯的含量直接影响离层的形成和器官的脱落。这一过程主要有 3 种基因的参与: (1) 乙烯信号转导途径中的乙烯受体基因, 如 *ETR1* 和 *EIN4* 等; (2) 乙烯响应转录因子基因, 如 *ERF*, 可以对乙烯做出反应, 诱导离层的形态变化; (3) 器官脱落相关基因, 如编码纤维素酶的基因等, 能响应脱落信号, 启动器官脱落^[9]。研究表明棉花叶片脱落期间内源乙烯含量有动态变化^[4]。对棉花中脱叶剂敏感品种新陆早 50 和不敏感品种新陆早 33 研究发现, 脱叶剂处理后 2 个品种离层组织乙烯含量均显著升高, 且在脱叶剂敏感品种中极显著升高, 并伴随着乙烯合成及信号转导途径相关基因的差异表达^[11]。超表达 *MADS* 转录因子基因 *FYF* 通过调控乙烯信号传导延迟脱落^[12]。脱落酸促进器官脱落, 主要是通过促进乙烯合成发挥作用^[13]。细胞分裂素也参与器官脱

落的调控。对脱叶剂处理后不同棉花材料的表达谱研究也表明, 多个细胞分裂素氧化酶基因在脱叶剂敏感型品种中提前差异表达, 并伴随着细胞分裂素含量的降低, 从而加快了敏感品种新陆早 50 叶片脱落; 进一步研究表明, 干涉细胞分裂素氧化酶基因 *GhCKX3-1* (*Gh_D13G2062*) 表达, 转基因棉花对脱叶剂的敏感性降低^[11]; 分析干涉 *GhCKX3* 表达植株中乙烯含量及信号转导途径相关基因的表达, 发现细胞分裂素和乙烯在调控棉花对脱叶剂的响应中存在互作^[11]。

脱落的发生还受到其他信号的调控, 如 IDA (Inflorescence deficient in abscission) 小肽介导的脱落途径^[14]。脱落的激活受富含亮氨酸重复序列 (Leucine-rich repeat, LRR) 的受体激酶 HAESA (HAE) 和 HAESA-like 2 (HSL2) 调控, HAE/HSL2 与 SERK1/2/3/4 协同作用^[14-15], 激活下游由丝裂原活化蛋白激酶 4/5 (Mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 4/5, MKK4/5) 和 MPK3/6 组成的 MAPK 级联^[16], 进而调控转录因子 KNAT1、KNAT2/6 和 AGL15^[17]。转录因子也参与调控脱落过程, 番茄中通过图位克隆得到 1 个 *MADS*-box 家族的编码基因 *JOINTLESS*, 在 *jointless* 突变体中花柄和果柄不能形成离层^[18]。DNA 结合蛋白基因 *AtDOF4.7* 也参与调控脱落过程^[19]。活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 信号也参与器官脱落的调控, ROS 清除蛋白超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 基因和过氧化氢酶基因 *CAT1* 的过表达也会延迟细胞分离^[20]。脱落过程中, 一些重要的水解酶基因上调表达, 如 β -1, 4-葡聚糖酶、木葡聚糖内转糖苷酶等^[21]。最新研究发现, 磺胺素 (Phytosulfokine, PSK) 参与调控干旱胁迫下番茄落花落果。过表达肌醇六磷酸酶基因 *SlPhyt2* 促进干旱胁迫下转基因番茄的花脱落, 而 *SlPhyt2* 基因沉默植株坐果率比过表达植株显著提高; 进一步研究发现, 植物 PSK 的前体是 *SlPhyt2* 的特异性底物^[22]。

与其他植物相似, 棉花叶片脱落是植株内源激素变化及互作平衡导致叶柄离层形成的结果, 常常由衰老引起。化学脱叶是使用脱叶剂使代谢旺盛的功能叶叶柄处形成离层而被动脱落。化学脱叶效果受到各种环境因素 (温度、湿度等) 以及

非环境因素(品种、种植方式、脱叶剂种类等)的影响^[2, 23-24]。在影响棉花脱叶效果的诸多因素中,品种对脱叶剂的响应是最核心的。现有研究对脱叶剂的组配及施用技术及生理机制研究较多,而对棉花品种响应化学脱叶机理还没有系统的研究报道^[3, 11, 25-27]。本研究广泛筛选棉花种质资源获得脱叶剂敏感和不敏感的品种,并检测前期表达谱筛选中差异表达的乙烯相关、细胞分裂素相关及水解酶相关基因在脱叶剂敏感性不同品种中的表达情况,为棉花机采化控技术研发提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 棉花材料。200份棉花种质资源来自于实验室收集的自然群体^[28],包括来自于湖北17份、湖南2份、四川5份、安徽2份、北疆16份、南疆13份、甘肃1份、云南1份、贵州2份、河北13份、河南27份、浙江2份、江苏30份、江西1份、辽宁10份、山东18份、山西19份、陕西7份、苏联3份、美国11份。

1.1.2 脱叶剂配制及用量。脱叶剂(TE)配制参照 Xu 等^[11],配方为 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 噻唑隆 + $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 40%(质量分数)乙烯利 + $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱叶剂助剂,每公顷用量 600 L。

1.2 试验方法

1.2.1 温室内脱叶剂处理及材料筛选。200份棉花种质资源于2017年4月种植于华中农业大学表型组平台温室,试验设置3个重复。每盆1株,互不干扰,分行排列,每行间隔50 cm。对所有植株进行常规管理。在初花期调查每个单株总真叶数目(N_{TL})后,喷施脱叶剂,在处理第4天统计植株脱叶后剩余真叶数目(N_{L})。使用 Microsoft Excel 2016 软件对得到的真叶数目、剩余真叶数目进行统计分析,分别计算各单株的脱叶率 r_{D} 。 $r_{\text{D}}(\%) = (N_{\text{TL}} - N_{\text{L}}) / N_{\text{TL}} \times 100$ 。根据脱叶处理后植株表型及脱叶率,筛选得到对脱叶剂处理敏感和不敏感的棉花品种。

1.2.2 脱叶剂敏感和不敏感材料的大田种植处理、脱叶率统计及取样。分别挑选粒大饱满的脱叶剂敏感和不敏感的棉花种子用硫酸脱绒后洗

净晒干保存。于2018年4月中旬种植于华中农业大学棉花试验田,采用营养钵育苗,待2片子叶平展(5月上旬)进行大田移栽,株距40 cm,行距50 cm,每个材料种4行,设3个重复。移栽后定期进行常规田间管理,按时浇水、整枝、打药等。

10月上旬吐絮期时,挑选连续7 d晴天、气温20~25℃的下午,对大田的棉花材料进行处理,2行喷施脱叶剂,2行喷施蒸馏水作为对照。在处理前及处理后第7天统计棉株叶片数目,根据上述公式计算各单株第7天脱叶率。并在处理后第1天和第3天用刀片小心选取适量的植株离层样品,放入2.0 mL的离心管中,用液氮速冻,取样后保存在-80℃冰箱中备用。

1.2.3 目标基因的选择。基于实验室前期的研究^[11]选择目标基因。(1)细胞分裂素相关基因:细胞分裂素氧化酶基因 *GhCKX3-1* (Gh_D13G2062)、*GhCKX3-2* (Gh_A06G0643)、*GhCKX3-3* (Gh_D07G2372)、*GhCKX7* (Gh_A05G0290)和细胞分裂素响应调节因子基因 *GhCTKRR2* (Gh_A01G0218)、*GhCTKRR9* (Gh_A05G3475)。(2)乙烯相关基因:乙烯合成相关基因 *GhACCO3* (Gh_D07G0841)、*GhACCO* (Gh_D11G1565),乙烯受体蛋白基因 *GhETR1* (Gh_D11G1181)、*GhEIN3* (Gh_D07G0364)和乙烯信号传导相关基因 *GhERF113-1* (Gh_03G1349)、*GhERF113-2* (Gh_A04G0869)、*GhERF61* (Gh_D08G1225)、*GhERF92* (Gh_A08G1686)、*GhRAP23* (Gh_A09G2077)。(3)水解酶相关基因:*GhBXL1* (Gh_A10G1516,编码β-D-木糖苷酶)、*GhCHI1* (Gh_D01G1683,编码内切几丁质酶)、*GhGUN1* (Gh_D03G0779,编码内切葡聚糖酶)、*GhRNS1* (Gh_D06G1912,编码核糖核酸酶)、*GhE13B-1* (Gh_A09G0635,编码β-葡萄糖苷酶)和 *GhE13B-2* (Gh_A09G1126)。

1.2.4 基因表达量检测。利用 TIANGEN 公司的 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取各材料离层组织的总 RNA,后使用 PROMEGA 公司的试剂对 RNA 进行反转录,得到 cDNA。实时荧光定量聚合酶链反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)程序参照前期研究^[11],采用 BIO-RAD 公司的 Sybr-

Green-mix 试剂，利用 20 μ L 体系进行。以 *GhUBQ7* 基因为内参基因,本研究中所使用引物见表 1，所有试验进行 3 次生物学重复。使用 Microsoft Excel 2016 对水处理和脱叶剂处理下各品种中的基因表达量进行单因素方差分析,判断不同处理下基因表达量差异显著性。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

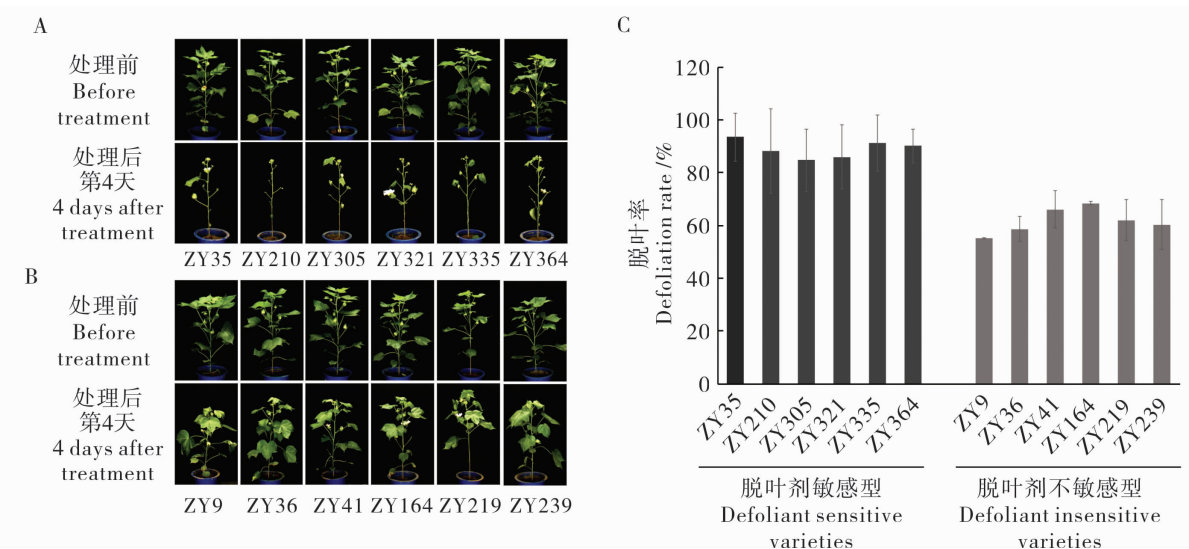
基因名称 Gene name	登录号 Accession number	正向引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')
<i>GhCKX3-1</i>	Gh_D13G2062	GTTCTTCACCCCTTCAGCACCACA	GTCCACCACGACCCCGTTTTC
<i>GhCKX3-2</i>	Gh_A06G0643	AGCATAGCAGCCAGAGGGAAC	CCGCCAACATCCACATAAGAC
<i>GhCKX3-3</i>	Gh_D07G2372	TGTTGCACCTGTTTCTTGAC	AGTGGGATTCTTGCTCTGGTTA
<i>GhCKX7</i>	Gh_A05G0290	AACGGTGGGTGGGACTTTATC	TAACACCGAACTGACCAAGCC
<i>GhCTKRR2</i>	Gh_A01G0218	CTGGTTTGCGTGTCTCGTTG	TGCTTGAGAAGTTCGAATCCG
<i>GhCTKRR9</i>	Gh_A05G3475	AGTGGATTCTGGAAGCAAGGC	TCCTCAGGAGATCATACCCCG
<i>GhACCO</i>	Gh_D11G1565	TAAAAACGGGGAATGGGTGG	CCCTGGGTGTAAAAACGAAGC
<i>GhACCO3</i>	Gh_D07G0841	GGTGGCATCATCTTGCTGTTC	CCTGTGCTCCACGCTCTTG
<i>GhERF61</i>	Gh_D08G1225	CGCCAGAGAGAGCTCCTTCAA	GGCCACCCATTACCCAGT
<i>GhERF92</i>	Gh_A08G1686	ACGCAGCGGAGATAAGGGACT	CAAAGCCACGACAGGTGAACA
<i>GhERF113-1</i>	Gh_A03G1349	TCACCGACGCCCTCATCAGTA	TGTGTCAAAAAGTGCCAAGCCA
<i>GhERF113-2</i>	Gh_A04G0869	ACATCGGCGGAGAAAAGACAA	TGTGGGAAACCAATGAGCTGC
<i>GhETR1</i>	Gh_D11G1181	AGCTTCTGTTGCAAAACCGGA	CCGCTATTTCACCTTTGAGGC
<i>GhRAP23</i>	Gh_A09G2077	CTCAAACGCCCACCAAAAATC	CCAGAAATGATTCCAGGCTCC
<i>GhEIN3</i>	Gh_D07G0364	CTGTTGGAACCACTGGTCTGTG	ACTTGAGAGAAGGGCAACCGC
<i>GhBXL1</i>	Gh_A10G1516	TCACTATGGGAGCAAATCGGA	CTGGAGGCCACGGACGTAG
<i>GhCHI1</i>	Gh_D01G1683	ACTACTGGTGGGGCAGGGTG	ACACGGCCCGTAGTTGTAGTT
<i>GhE13B-1</i>	Gh_A09G0635	CAATGGCTGCTATGCTCCTTC	TTGGAAGGGTCAGCGAGGTT
<i>GhE13B-2</i>	Gh_A09G1126	CTACGAGCCAAACCAACCTGC	TGAACTTCATTCCCAACAGCG
<i>GhRNS1</i>	Gh_D06G1912	AAACCATGGGATGTGCTCTGA	GGCTCCCACGTTCTGTACAC
<i>GhGUN1</i>	Gh_D03G0779	ATCCGATGTAGCAGGCGAGA	GTAAAATGGGCAGACCACAGAA

2 结果与分析

2.1 脱叶剂敏感型材料的筛选

根据温室内各品种脱落剂处理前后叶片数目,计算处理后第 4 天的脱叶率。根据脱叶后表型及脱叶率(图 1),筛选出 6 个脱落率高的脱叶剂敏感型材料:ZY35 (晋棉 28 号)、ZY210 (57-681)、ZY305(晋棉 24)、ZY321(辽棉 6 号)、ZY335(鲁棉 22)、ZY364(秦远 4 号)和 6 个脱落率低的脱叶剂不敏感型材料:ZY9 (鲁棉 1 号)、ZY36 (晋棉 36 号)、ZY41 (冀棉 12 号)、ZY164 (中棉所 40)、ZY219(北农 1 号)、ZY239(敦棉 1

号),上述材料名称在下文以编号代替。
将温室中筛选出的脱叶剂敏感型和不敏感型棉花材料在大田种植，由于种子量不足等情况,实际种入大田的棉花材料有脱叶剂敏感材料 ZY35、ZY335、ZY364 和脱叶剂不敏感材料 ZY9、ZY36、ZY164、ZY219、ZY239。在处理前及处理后第 7 天统计各棉花材料的叶片数,计算脱叶率,发现大田中敏感型材料脱叶率较高，而不敏感型材料脱叶率相对较低(表 2),与温室筛选结果相符。
2.2 细胞分裂素相关基因参与棉花响应脱叶剂处理
在脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天,对脱叶剂



A. 脱叶剂敏感型材料 (ZY35、ZY210、ZY305、ZY321、ZY335、ZY364) 处理前后的表型;B. 脱叶剂不敏感型材料 (ZY9、ZY36、ZY41、ZY164、ZY219、ZY239)处理前后的表型;C. 脱叶剂敏感和不敏感型材料在脱叶剂处理后第 4 天脱叶率。误差线是标准差。

A. phenotype of defoliant sensitive varieties ZY35, ZY210, ZY305, ZY321, ZY335 and ZY364; B. phenotype of defoliant insensitive varieties ZY9, ZY36, ZY41, ZY164, ZY219 and ZY239; C. the defoliation rate of defoliant sensitive and insensitive varieties at the 4th day after defoliant treatment. Bar indicates standard errors of defoliation rate of the varieties.

图 1 脱叶剂处理后敏感型、不敏感型材料的表型及脱叶率

Fig. 1 Phenotype and defoliation rate of defoliant sensitive and insensitive varieties after defoliant treatment

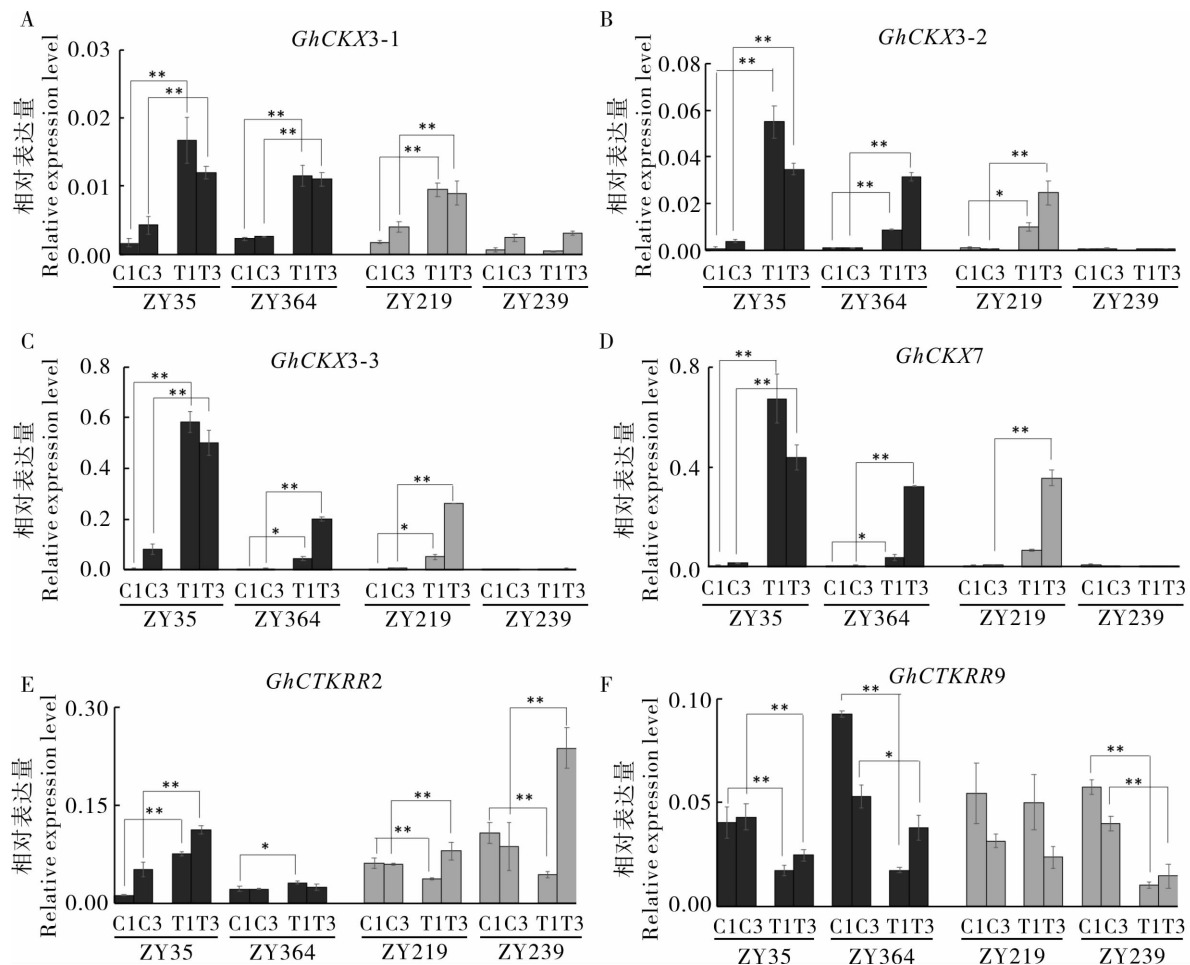
表 2 筛选出的棉花材料在脱叶剂处理后第 7 天的脱叶率
Table 2 Defoliation rates at the 7th day after defoliant treatment in field of the selected cotton varieties

品种类型	棉花材料	脱叶率
Variety type	Cotton varieties	Defoliation rate/%
敏感型	ZY35	74.3±14.6
Sensitive	ZY335	68.1±18.0
	ZY364	71.5±16.4
不敏感型	ZY9	67.9±11.6
Insensitive	ZY36	62.1±12.3
	ZY164	66.0±23.6
	ZY219	55.1±9.7
	ZY239	46.4±13.4

敏感的 ZY35、ZY364 和不敏感的 ZY219、ZY239 的离层组织取样,抽提 RNA 并逆转录成 cDNA,通过 qRT-PCR 检测 6 个细胞分裂素相关基因、9 个乙烯相关基因及 6 个水解酶活性相关基因在这 4 个棉花材料中的表达模式。

结果(图 2)显示,在脱叶剂敏感材料中,细胞分裂

素氧化酶基因 *GhCKX3-1*、*GhCKX3-2*、*GhCKX3-3* 和 *GhCKX7* 基因表达模式表现相似的趋势,但是差异表达的倍数不同。相对于水处理对照,脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天,4 个基因在脱叶剂敏感材料 ZY35 的离层中均上调表达,在脱叶剂处理后第 1 天上调幅度更大 (*GhCKX3-1* 上调 8.9 倍, *GhCKX3-2* 上调 79.4 倍, *GhCKX3-3* 上调 140.8 倍, *GhCKX7* 上调 120.0 倍);而在敏感型材料 ZY364 中, *GhCKX* 基因表达在处理第 3 天达到较高水平(*GhCKX3-1* 上调 3.3 倍, *GhCKX3-2* 上调 31.7 倍, *GhCKX3-3* 上调 33.1 倍, *GhCKX7* 上调 65.8 倍)。在不敏感型材料 ZY239 中, *GhCKX3-2*、*GhCKX3-3* 和 *GhCKX7* 基因的表达在脱叶剂处理后有微弱上调或基本没有上调(图 2A~D);然而,不敏感型材料 ZY219 经脱叶剂处理后所有 *GhCKXs* 基因均上调表达,只是上调程度比敏感型材料 ZY35 低。细胞分裂素响应调节因子基因 *GhCTKRR2* 和 *GhCTKRR9* 则表现出复杂的表达模式。与水处理对照相比,在脱叶剂处理后第 1 天, *GhCTKRR2* 在 2 个脱叶剂敏感材料中均上调表达,而在 2 个脱叶剂不敏感材料中



A~F 为各基因的相对表达量, C1 和 C3 分别代表水处理后第 1 天和第 3 天离层(对照组); T1 和 T3 分别代表脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天离层(处理组)。* 和 ** 分别表示同一材料在不同处理下基因的表达差异显著和极显著。

A~F represent the relative expression level of related gene, C1 and C3 represent the gene expression level in the abscission zone at 1 and 3 days after treatment with water (control); T1 and T3 represent the gene expression levels in the abscission zone at 1 and 3 days after defoliant treatment. * and ** represent the significant difference of the gene expression level between the control treatment and defoliant treatment at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

图 2 细胞分裂素相关基因在不同棉花材料中的表达模式

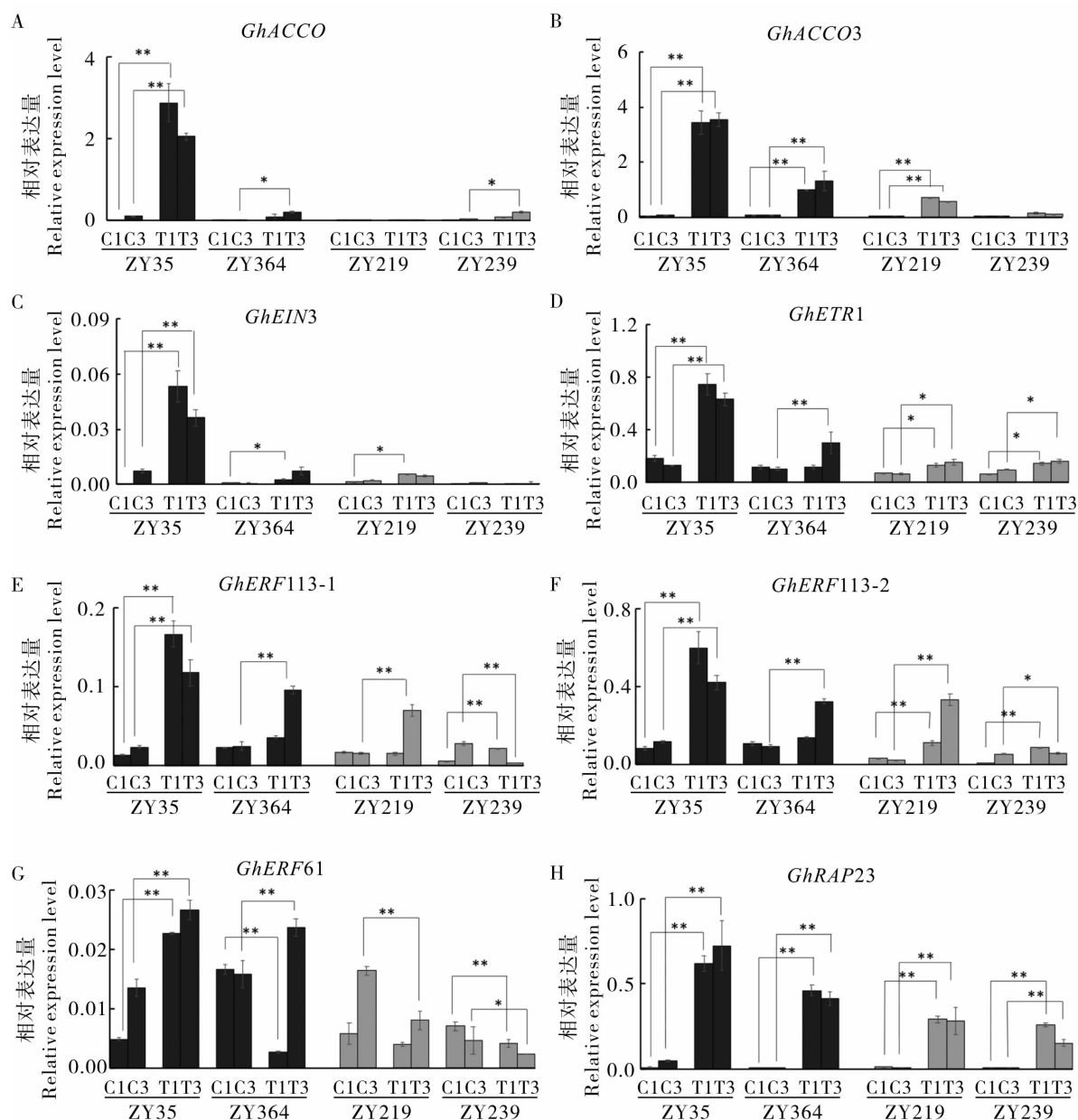
Fig. 2 Expression patterns of cytokinin-related genes in the selected cotton varieties

均下调表达;在脱叶剂处理后第 3 天,除了脱叶剂敏感材料 ZY364,其他 3 个材料中 *GhCTKRR2* 均上调表达(图 2E)。在 2 个脱叶剂敏感材料中和不敏感材料 ZY239 中,*GhCTKRR9* 在脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天均下调表达(图 2F)。综上所述,大部分细胞分裂素相关基因参与棉花响应脱叶剂处理。

2.3 乙烯相关基因参与棉花响应脱叶剂处理

水处理下,编码 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)氧化酶的 *GhACCO* 和 *GhACCO3* 基因在 4 个棉花材料中均低水平表达或不表达。在敏感型材料 ZY35 中,脱叶剂处理后 *GhACCO* 和

GhACCO3 基因明显上调表达,且在脱叶剂处理后第 1 天的表达量上调幅度极高;而在不敏感型材料 ZY219 和 ZY239 中的表达量没有明显上升,或与敏感型材料相比上调幅度较低(图 3A、B)。乙烯受体基因 *GhEIN3* 和 *GhETR1* 也呈现类似的表达模式(图 3C、D)。转录因子基因 *GhERF113-1* 和 *GhERF113-2* 表达模式相似,脱叶剂处理后在敏感型材料 ZY35 和 ZY364 中上调表达;而在不敏感型材料 ZY239 中,*GhERF113-1* 和 *GhERF113-2* 在处理第 1 天上调表达(*GhERF113-1* 上调 2.7 倍,*GhERF113-2* 上调 8.4 倍),在第 3 天却显著下调表达(图 3E、



A~H 为各基因的相对表达量, C1 和 C3 分别代表水处理后第 1 天和第 3 天离层(对照组); T1 和 T3 分别代表脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天离层(处理组)。* 和 ** 分别表示同一材料在不同处理下基因的表达差异显著和极显著。

A—H represent the relative expression level of related gene, C1 and C3 represent the gene expression level in the abscission zone at 1 and 3 days after treatment with water (control); T1 and T3 represent the gene expression levels in the abscission zone at 1 and 3 days after defoliant treatment. * and ** represent the significant difference of the gene expression level between the control treatment and defoliant treatment at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

图 3 乙烯相关基因在筛选的棉花材料中的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of ethylene-related genes in the selected cotton varieties

F)。在脱叶剂处理后第 3 天,相对于水处理而言, *GhERF61* 在敏感型材料中上调表达,而在不敏感型材料中下调表达(图 3G);水处理下转录因子基因 *GhRAP23* 在 4 个材料中基本不表达,而在脱叶剂处理下均上调表达,在敏感型材料中上调的幅度更大(图 3H)。上述结果说明乙烯相

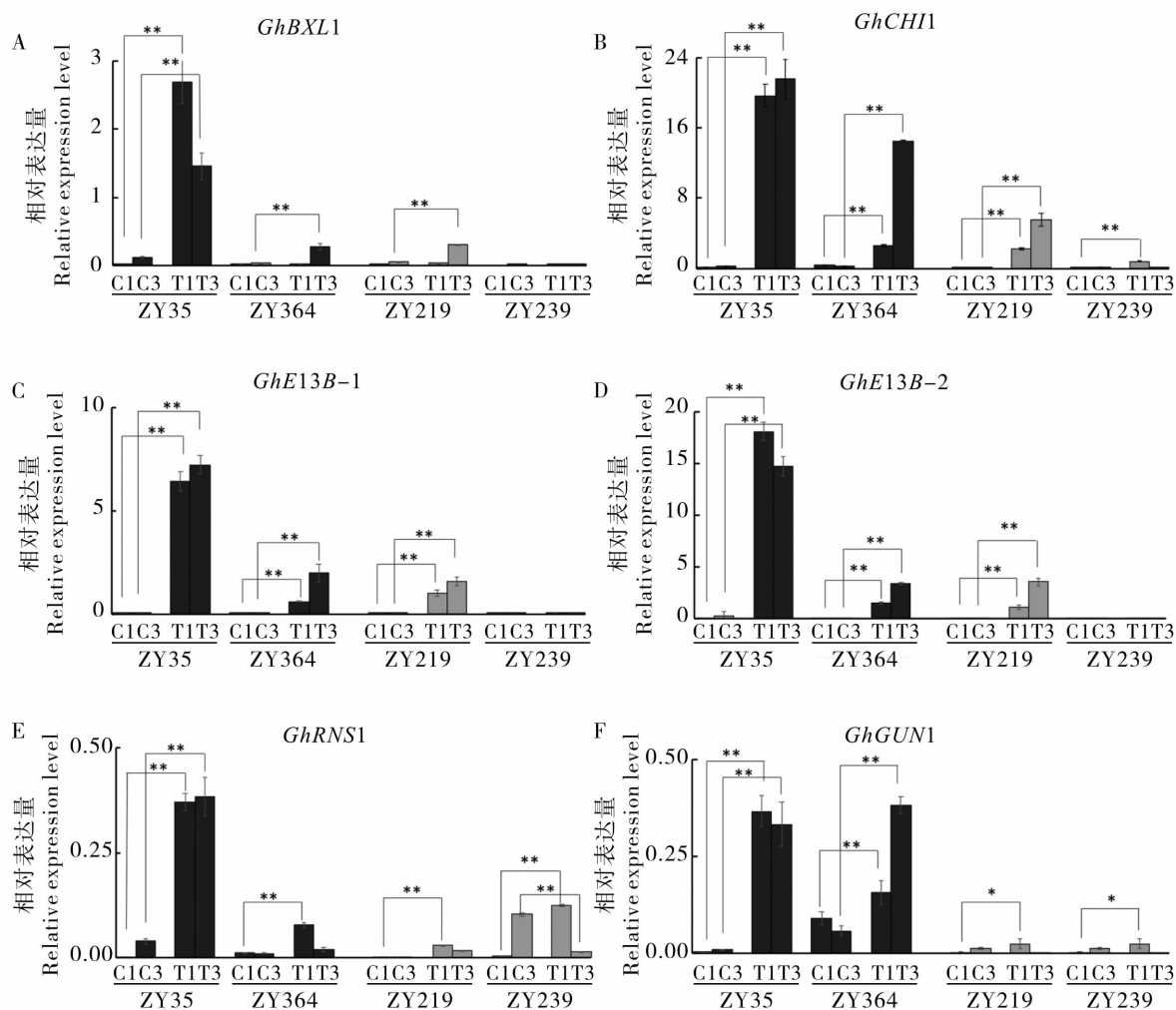
关基因参与棉花响应脱叶剂处理。

2.4 水解酶活性相关基因参与棉花响应脱叶剂处理

对 6 个具有水解酶活性基因的表达量结果分析发现,4 个水解酶相关基因 (*GhBXL1*、*GhCH1*、*GhE13B-1* 和 *GhE13B-2*) 在 4 个材料中,

在水处理后的第 1 天和第 3 天基本不表达或者低量表达;而在脱叶剂处理后第 1 天,*GhBXL1*、*GhCHI1*、*GhE13B-1* 和 *GhE13B-2* 在敏感型材料 ZY35 中的表达量分别是水处理的 629.4 倍、220.5 倍、45 287.3 倍和 1 754.6 倍,在敏感型材料 ZY364 中脱叶剂处理后也上调表达,但是上调倍数比 ZY35 中低(图 4)。*GhBXL1*、*GhE13B-1* 和 *GhE13B-2* 在脱叶剂不敏感型材料 ZY239 中水处理和脱叶剂处理下均基本不表达(图 4A、C、D)。编码核糖核酸酶的 *GhRNS1* 基因在脱叶剂处理后的敏感型材料 ZY35 中均上调表达(第 1

天上调 274.5 倍,第 3 天上调 8.7 倍),而该基因在不敏感型材料 ZY239 中于脱叶剂处理后第 3 天下调表达(图 4E)。脱叶剂处理后,编码内切葡聚糖酶的 *GhGUN1* 基因在 2 个敏感型材料中相对于水处理均极显著上调表达;而在 2 个不敏感材料中,于脱叶剂处理后第 1 天显著上调表达,在处理第 3 天的表达量无显著变化(图 4F)。脱叶剂处理后,6 个具有水解酶活性的基因在脱叶剂敏感型材料离层组织中均有较高水平的上调表达,说明这些水解酶基因参与棉花响应脱叶剂处理。



A~H 为各基因的相对表达量, C1 和 C3 分别代表水处理后第 1 天和第 3 天离层(对照组); T1 和 T3 分别代表脱叶剂处理后第 1 天和第 3 天离层(处理组)。* 和 ** 分别表示同一材料在不同处理下基因的表达差异显著和极显著。

A~F represent the relative expression level of related gene, C1 and C3 represent the gene expression level in the abscission zone at 1 and 3 days after treatment with water (control); T1 and T3 represent the gene expression levels in the abscission zone at 1 and 3 days after defoliant treatment. * and ** represent the significant difference of the gene expression level between the control treatment and defoliant treatment at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

图 4 水解酶相关基因在筛选的棉花材料中的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of hydrolase genes in the selected cotton varieties

3 讨论

3.1 温室及大田的 200 份资源材料筛选

在温室条件下,对广泛筛选得到的 200 份资源材料进行了脱叶剂处理,并统计脱叶率,从而从 200 份种质资源中筛选出敏感型材料 ZY35、ZY210、ZY305、ZY321、ZY335、ZY364 和不敏感型材料 ZY9、ZY36、ZY41、ZY164、ZY219、ZY239。为了与生产上田间脱叶剂处理一致,后续将部分棉花材料在大田种植,于吐絮期进行脱叶剂处理,并根据表型及脱叶率筛选出敏感型材料 ZY35、ZY364 和不敏感型材料 ZY219、ZY239。

比较温室处理与大田处理的脱叶率,可以发现温室处理后第 4 天的脱叶率比大田处理后第 7 天高。温室处理时间为 6 月中下旬,正值初花期;田间处理时间为 10 月上旬,正值棉花的吐絮期,温室处理棉花处于旺盛生殖发育时期对外界因子更敏感;且比起大田较为恶劣的自然环境,温室中棉花长期处于舒适的生长环境,所以对脱叶剂胁迫更敏感,较大田的棉花易于形成离层从而脱叶。

3.2 脱叶剂处理下棉花落叶特点

棉花正常叶片脱落常常由衰老引起,乙烯被认为是棉花落叶最关键的生理因素^[3, 27, 29];研究表明,处于旺盛期的功能叶对乙烯的反应最迟钝,而幼叶和衰老叶片对乙烯较敏感^[27, 30]。化学脱叶是在脱叶剂作用下使代谢旺盛的功能叶叶柄处形成离层而被动脱落,除乙烯之外,还有其他的重要因素参与调控。生产上使用的化学脱叶剂主要由乙烯利、噻唑隆及相关助剂组成,具有脱叶和催熟功能,但是脱叶功能与催熟功能不能等同^[3]。研究发现脱叶剂敏感型材料在脱叶剂处理后,叶柄离层快速形成,叶片迅速脱落^[11]。而不敏感材料在脱叶剂处理后常表现 3 种情况:第 1 种是植株对脱叶剂没有反应,正常完成生长发育,这种情况比较少见;第 2 种是叶柄离层形成缓慢,叶片脱落延缓;第 3 种情况是植株对乙烯过于敏感,导致叶片迅速失水干枯,而不形成离层,叶片干枯不脱落。现在生产上使用的机采棉材料较多较杂,除了脱叶剂敏感型材料外,有些第 3 种脱叶剂不敏感材料因为其强烈的乙烯敏感性也被归为适宜机采的材料。

本研究中通过脱叶率筛选出的脱叶剂敏感型和不敏感型材料在部分细胞分裂素相关基因、乙烯相关基因及水解酶相关基因表达上存在差异:总体上脱叶剂处理后这些基因在脱叶剂敏感型材料中均显著上调表达;然而这些基因在 2 个脱叶不敏感型材料中的表达呈现不同的特点,这说明不敏感型棉花对脱叶剂的响应可能存在多种表现形式和调控模式。另外,脱叶剂处理后,与乙烯响应相关的基因在脱叶剂敏感型和不敏感型材料中多上调表达,验证了乙烯参与棉花脱叶响应的结论^[4, 11]。而关于乙烯和细胞分裂素在响应棉花化学脱叶过程中的关系需要进一步探讨。

4 结论

从棉花种质资源中筛选得到脱叶剂敏感型和不敏感型材料,并进行化学脱叶分子机理的解析,对机采棉品种种质资源的评价、筛选和改良及脱叶剂组配和开发具有一定的理论意义。

参考文献:

- [1] 喻树迅, 张雷, 冯文娟. 快乐植棉——中国棉花生产的发展方向[J]. 棉花学报, 2015, 27(3): 283-290.
Yu Shuxun, Zhang Lei, Feng Wenjuan. Easy and enjoyable cotton cultivation: Developments in China's cotton production[J]. Cotton Science, 2015, 27(3): 283-290.
- [2] 王爱玉, 高明伟, 王志伟, 等. 棉花化学脱叶催熟技术应用研究进展[J]. 农学学报, 2015, 5(4): 20-23.
Wang Aiyu, Gao Mingwei, Wang Zhiwei, et al. Research progress on the technology of chemical defoliation and ripening in cotton[J]. Journal of Agriculture, 2015, 5(4): 20-23.
- [3] 田晓莉, 段留生, 李召虎, 等. 棉花化学催熟与脱叶的生理基础[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 758-762.
Tian Xiaoli, Duan Liusheng, Li ZhaoHu, et al. Physiological basis of chemical ripening and defoliation of cotton[J]. Plant Physiology Communications, 2004, 40(6): 758-762.
- [4] Suttle J C. Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron[J]. Plant Physiology, 1985, 78(2): 272-276.
- [5] 崔娅松, 陈庆富, 霍冬放, 等. 植物落花落果的分子机理研究进展[J]. 广西植物, 2018, 38(9): 1234-1247.
Cui Yasong, Chen Qingfu, Huo Dong'ao, et al. Research progress on molecular mechanism of plant falling flowers and fruits[J]. Guihaia, 2018, 38(9): 1234-1247.
- [6] Lee Y, Yoon T H, Lee J, et al. A lignin molecular brace controls

- precision processing of cell walls critical for surface integrity in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2018, 173(6): 1468-1480.
- [7] Yu Y Q, Hu H, Doust A N, et al. Divergent gene expression networks underlie morphological diversity of abscission zones in grasses[J]. New Phytologist, 2020, 225(4): 1799-1815.
- [8] Addicott F. Plant hormones in the control of abscission[J]. Biological Reviews, 1970, 45: 485-524.
- [9] Roberts J A, Elliott K A, Gonzalez-Carranza Z H. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53(1): 131-158.
- [10] Meir S, Hunter D A, Chen J C, et al. Molecular changes occurring during acquisition of abscission competence following auxin depletion in *Mirabilis jalapa*[J]. Plant Physiology, 2006, 141(4): 1604-1616.
- [11] Xu J, Chen L, Sun H, et al. Crosstalk between cytokinin and ethylene signaling pathways regulates leaf abscission in cotton in response to chemical defoliant[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(5): 1525-1538.
- [12] Chen W, Li P, Chen M, et al. FOREVER YOUNG FLOWER negatively regulates ethylene response DNA-binding factors by activating an ethylene-responsive factor to control *Arabidopsis* floral organ senescence and abscission[J]. Plant Physiology, 2015, 168(4): 1666-1683.
- [13] Mishra A, Khare S, Trivedi P K, et al. Ethylene induced cotton leaf abscission is associated with higher expression of cellulase (GhCell1) and increased activities of ethylene biosynthesis enzymes in abscission zone[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(1): 54-63.
- [14] Meng X, Zhou J, Tang J, et al. Ligand-induced receptor-like kinase complex regulates floral organ abscission in *Arabidopsis* [J]. Cell Reports, 2016, 14(6): 1330-1338.
- [15] Shi C L, von Wangenheim D, Herrmann U, et al. The dynamics of root cap sloughing in *Arabidopsis* is regulated by peptide signalling[J]. Nature Plants, 2018, 4(8): 596-604.
- [16] McKim S M, Stenvik G E, Butenko M A, et al. The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*[J]. Development, 2008, 135(8): 1537-1546.
- [17] Patharkar O R, Walker J C. Floral organ abscission is regulated by a positive feedback loop[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(9): 2906-2911.
- [18] Mao L, Begum D, Chuang H W, et al. *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development[J]. Nature, 2000, 406(6798): 910-913.
- [19] Liljegren S J, Leslie M E, Darnielle L, et al. Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVER-SHED ARF-GAP protein[J]. Development, 2009, 136(11): 1909-1918.
- [20] Liao W B, Wang G, Li Y Y, et al. Reactive oxygen species regulate leaf pulvinus abscission zone cell separation in response to water-deficit stress in cassava[J/OL]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 21542(2016-02-22)[2019-09-03]. <https://doi.org/10.1038/srep21542>.
- [21] Meir S, Philosophhadass S, Sundaresan S, et al. Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion[J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 154(4): 1929-1956.
- [22] Reichardt S, Piepho H P, Stintzi A, et al. Peptide signaling for drought-induced tomato flower drop[J]. Science, 2020, 367(6485): 1482-1485.
- [23] Wang H M, Gao K, Fang S, et al. Cotton yield and defoliation efficiency in response to nitrogen and harvest aids[J]. Agronomy Journal, 2019, 111(1): 250-256.
- [24] Li J, Wu P, Xiao S, et al. Effects of cotton planting modes with machine picking on defoliation and fiber quality of different plant types[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2019, 37(1): 82-88.
- [25] 张国蕾, 陈兵, 刘景德, 等. 不同配置模式下机采棉脱叶催熟视觉症状及机理[J]. 新疆农业科学, 2019, 56(10): 1783-1793. Zhang Guolei, Chen Bing, Liu Jingde, et al. Analysis of visual symptoms and mechanism of machine-picked cotton under different configuration modes[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2019, 56(10): 1783-1793.
- [26] 马晓梅, 代勇强, 李生秀, 等. 新疆机采棉区试新品系脱叶剂敏感性及其品质产量性状分析[J]. 广东农业科学, 2016, 43(2): 19-24. Ma Xiaomei, Dai Yongqiang, Li Shengxiu, et al. Analyse the defoliant sensitivity and yield stability of machine-harvested cotton new lines from Xinjiang regional trials[J]. Guangdong Agricultural Science, 2016, 43(2): 19-24.
- [27] Suttle J C, Hultstrand J F. Ethylene-induced leaf abscission in cotton seedlings: The physiological bases for age-dependent differences in sensitivity[J]. Plant Physiology, 1991, 95: 29-33.
- [28] Huang C, Nie X, Shen C, et al. Population structure and genetic basis of the agronomic traits of upland cotton in China revealed by a genome-wide association study using high-density SNPs [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(11): 1374-1386.
- [29] Morgan P W. Stimulation of ethylene evolution and abscission in the cotton by 2-chloroethanephosphonic acid[J]. Plant Physiology, 1969, 44: 337-341.
- [30] Jeffrey C S. Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron[J]. Plant Physiology 1985, 78(2): 272-276.