

应用抑制消减杂交技术筛选葡萄冬芽和夏芽 生理休眠相关基因

闵卓¹, 耿万刚¹, 房玉林^{1,2}, 张振文^{1,2}, 李华^{1,2}

(¹西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨陵 712100; ²陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西杨陵 712100)

摘要:【目的】葡萄新梢上的芽有冬芽和夏芽两种, 根据这两种芽休眠特性的差异, 筛选与芽生理休眠相关基因, 进而从分子水平研究葡萄芽生理休眠的相关机制。【方法】以‘赤霞珠’葡萄新梢上冬芽和夏芽为材料, 夏芽作为驱动方(driver), 冬芽作为实验方(tester), 采用抑制消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)构建冬芽和夏芽的SSH-cDNA文库, 筛选冬芽和夏芽差异表达的基因片段。通过NCBI同源比对, 寻找与葡萄芽生理休眠相关的基因, 并对差异表达基因进行功能注释和分类。最后, 运用Real-time PCR技术对部分候选基因进行检测, 以验证其与葡萄芽生理休眠的相关性。【结果】共获得359条有效、高质量的差异基因片段, 经CAP3软件聚类拼接, 得到106个unique EST。在GenBank中进行BLASTN同源比对, 有98条EST与已知蛋白或基因具有不同程度的同源性, 占全部EST的92.4%。进行BLASTX同源比对, 有54条EST与功能已知蛋白或基因具有不同程度的同源性, 占全部EST的51%。已知功能的EST涉及休眠、逆境胁迫、细胞代谢、胞内物质运输等方面, 且绝大多数基因信息来源于葡萄、苜蓿、橄榄、油菜、高粱、棉花、大蒜、拟南芥等植物。对差异基因片段进一步的功能分析发现, 调控开花的基因占生物学过程的20%; 与环境胁迫相关的基因占生物学过程的6%; 与细胞代谢相关的基因占生物学过程的20%; 与胞内物质运输相关的基因占总生物学过程的6%; 其他包括DNA转录、减数分裂、细胞死亡及细胞壁松弛作用等。这些基因的分子功能主要有半胱氨酸型肽链内切酶、甲基转移酶、蛋白激酶、催化活性、结构分子活性、蛋白结合功能、DNA结合功能、ATP结合功能、蛋白质二聚体催化活性及丙酮酸氨基转移酶活性等。经Real-time PCR检测得知, 在夏芽萌发过程中, 候选基因在冬芽和夏芽中表达量呈不规则变化, 且同一基因在相同节位的冬芽和夏芽中表达量均有较大差异。【结论】发现了一些在冬芽中表达频率较高的基因, 如编码MADS FLC-like蛋白、钙依赖蛋白激酶、NADP依赖型的苹果酸酶、细胞壁水解酶、细胞壁松弛蛋白、外被体蛋白、亚基、热激蛋白、衰老相关蛋白、细胞色素P450、细胞壁关联蛋白等基因, 认为线粒体蛋白基因、未知蛋白基因、开花相关基因、ATP合成酶 β 亚基基因、MADS FLC-like蛋白基因等与葡萄芽生理休眠具有相关性。

关键词: 葡萄; 抑制消减杂交; 芽生理休眠; 冬芽; 夏芽

Screening and Identification of Differentially Expressed Endodormant Genes from Latent Buds and Prompt Buds by Suppression Subtractive Hybridization

MIN Zhuo¹, GENG Wan-gang¹, FANG Yu-lin^{1,2}, ZHANG Zhen-wen^{1,2}, LI Hua^{1,2}

(¹College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi; ²Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, Shaanxi)

收稿日期: 2013-11-13; 接受日期: 2014-01-03

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2012K01-25)、国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD31B07)

联系方式: 闵卓, E-mail: 1031759649@qq.com. 通信作者房玉林, E-mail: fangyulin@nwsuaf.edu.cn

Abstract: 【Objective】 There are two kinds of buds, latent buds and prompt buds, along shoots of grapevine. The aim of this study is to screen the genes associated with the bud endodormancy of grapevine depending on the different characteristics of grape latent buds and prompt buds in dormancy, on the basis of which the mechanism of grapevine bud endodormancy was explored.

【Method】 The SSH-cDNA library of latent buds and prompt buds of Cabernet Sauvignon was constructed using the technology of suppression subtractive hybridization (SSH) to screen the differential expressed gene fragments between them, during which latent buds were used as driver and prompt buds as tester. These fragment sequences were analyzed based on the NCBI and the gene functions were annotated. Furthermore, real-time PCR was employed to detect the expression profile of part of candidate genes with bud development to confirm the relationship between candidate genes and bud endodormancy. **【Result】** Totally 359 effective differentially expressed gene fragments with high quality were obtained and assembled by CAP3 Assembly Program, and 106 unique expressed sequence tags (ESTs) were obtained. After comparing the sequences with BLASTN in the Genbank, it was found that 98 unigenes, accounting for 92.4% of all the unigenes, showed homology with the known genes or proteins. And after analysis with BLASTX, it was found that 54 unigenes, accounting for 51% of all, showed homology with the known proteins or genes, which were involved in the dormancy, cell metabolism, abiotic and biotic stress and intracellular transportation etc. Moreover, most of the gene information came from plants such as grape, alfalfa, olive, rape, sorghum, cotton, garlic, arabidopsis etc. Gene ontology (GO) analysis revealed that these ESTs were involved in the regulation of flower development, response to environmental stress, cell metabolism, intracellular material transport, and they accounted for 20%, 6%, 20%, and 6% of all the biological processes, respectively. The rest part included DNA transcription, male meiosis, cell death and cell wall loosening etc. As for the molecular function, these genes were found to have cysteine-type endopeptidase activity, methyltransferase activity, protein kinase activity, catalytic activity, structural molecule activity, protein binding, DNA binding, ATP binding, protein dimerization activity and pyruvate aminotransferase activity, etc. Real-time PCR detection showed that the expression of candidate genes varied greatly with the bud break of prompt buds and showed a big difference between these two kinds of buds even in the same node. **【Conclusion】** Some genes which had high expression in latent buds were indentified such as MADS flowering FLC-like protein, calcium-dependent protein kinase, NADP-dependent malic enzyme, cell wall-associated hydrolase, cell wall loosening protein, subunit beta of coatomer protein complex, heat shock protein, senescence-associated protein, cytochrome P450, cell wall-associated protein etc, and it showed that mitochondrial protein gene, unnamed protein gene, flower bloom associated gene, ATP synthase subunit beta gene, and MADS FLC-like protein gene played important roles in bud endodormancy of grapevine.

Key words: grapevine; SSH; bud endodormancy; latent buds; prompt buds

0 引言

【研究意义】葡萄新梢上的芽包括冬芽和夏芽。一般而言,夏芽形成后没有休眠期,当年即可萌发成为新梢,而冬芽形成后当年一般不萌发,保持休眠状态,直到翌年环境条件适宜时才萌发。根据葡萄冬、夏芽形成后不同的休眠特性,利用抑制消减杂交技术分析新梢上冬、夏芽基因的差异表达,进而筛选出与生理休眠特性相关的基因,为葡萄休眠或破眠机制的研究挖掘新基因资源,也为植物芽生理休眠的研究提供一定的理论基础。**【前人研究进展】**近年来,依据休眠期的新陈代谢变化和冷量积累效应,提出了一些过渡性的假说^[1-3],并逐渐发现了一些与休眠相关的基因家族^[4-6]。现阶段,对于休眠分子机制的研究主要集中在休眠的诱导和打破 2 个方面^[7]。在休眠芽中主要发现了 2 种与休眠相关的基因:一种是 *CEN (CENTRORADIALIS)*,它是 *FL (FLOWERING LOCUST)* 的同源基因。*CEN (CENTRORADIALIS)*

的超表达,能够直接或间接阻止休眠芽进入生理休眠^[8]。它在杨树中的超表达会导致杨树在短日照条件下不能进入休眠^[8-9]。另一种是 *DAM (DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX)*, *DAM* 是一个基因家族,包括 6 个基因^[10]。若敲除桃子成熟芽体中的 6 个基因,在短日照条件下,不能进入生理休眠^[10-11]。在桃树^[12]、杏^[13]、覆盆子^[14]、乳浆草^[15]中已克隆出 *DAM*,并将其表达与休眠的诱导和解除联系起来。植物芽休眠的分子生物学研究,主要是从植物生长停止的诱导及休眠的建立、维持、解除^[7]3 个方面入手。另外,利用抑制消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选差异基因在植物领域中已得到广泛应用,如葡萄^[16]、白杨^[17]、马铃薯^[18]、茶树^[19]、番茄^[20]、角蒿^[21]、黄瓜^[22]、苜蓿^[23]、大豆^[24]、紫杆柞柳^[25]、梭梭幼苗^[26]、大白菜^[27]和拟南芥^[28]等。**【本研究切入点】**葡萄芽休眠的研究多停留在生理生化阶段,关于 GA、ABA、IAA、CTK 等与休眠关系的研究已相当透彻^[29-30],但对于其分子机制,如激素如何调控休眠,信号分子

之间的相互联系及其交互作用等研究相对较少。【拟解决的关键问题】本研究以欧亚种葡萄‘赤霞珠’为材料,通过 SSH 技术,分析冬芽和夏芽中与芽生理休眠相关的差异表达基因片段,筛选与芽生理休眠相关的基因,并研究其转录模式,以阐释葡萄芽生理休眠的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘赤霞珠’葡萄样品采自西北农林科技大学葡萄酒学院北园酿酒葡萄示范园(陕西杨陵)。2003 年定植,种植密度 1.0 m×1.5 m,单干双臂整形,长梢修剪,常规管理。2010 年 7 月—8 月,从长势良好的植株上剪下生长相对一致的新梢,再从新梢的 3—7 节上采集未萌发的冬芽和夏芽,采后用锡箔纸包好后,立即置于液氮中处理,然后放入-80℃冰箱中备用。

1.2 RNA 的提取、纯化及 cDNA 文库的构建

利用张今今等^[31]改良的 SDS/酚法分别提取冬芽和夏芽总 RNA,利用王西平等^[32]方法纯化提取的总 RNA,采用 Fermentas 公司的 Purification of poly A+ RNA from total RNA Kit 分离 mRNA。以夏芽作为驱动方(driver),冬芽为实验方(tester),建立抑制消减 cDNA 文库,SSH 的具体实验操作参照 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 试剂盒说明书进行。

1.3 生物信息学分析

测序完成后,用 DNASTar 软件对差异基因的全长序列进行拼接,利用 Clustal 进行多重序列比对,挑选出重叠和假阳性菌落。在 NCBI 网站上过滤已测序成功的差异基因的载体序列和 M13 引物序列。然后在 NCBI 上进行相似性比较(BLASTN 和 BLASTX)和编译蛋白功能推测。最后,在 BLASTX 比对结果的

基础上,利用 GO 在线分析工具对筛选出来的差异基因进行功能注释。

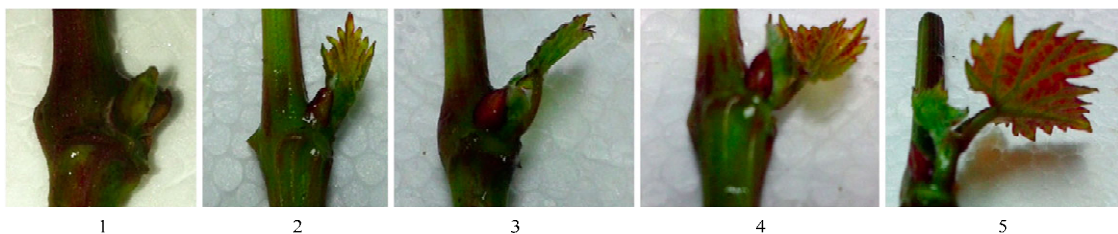
1.4 Real-time PCR 分析

根据‘赤霞珠’葡萄夏芽萌发程度的不同,将夏芽分为 5 类,分别为 1:未萌发;2:萌发形成一片小叶,小叶未完全展开;3:萌发形成一片小叶,小叶完全展开;4:萌发形成两片叶,其中一片小叶未完全展开,一片已完全展开;5:萌发形成两片叶,两片叶均完全展开(图 1)。分别采集上述 5 种萌发状态的夏芽及其同一节位上的冬芽,置于液氮中速冻,然后保存于-80℃冰箱中保存备用。利用 TIANDZ 的柱式植物 RNAout 提取 RNA,用 DNase 处理以去除 DNA 污染,使用 Fermentas 公司的反转录试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链。取等量的反转录产物进行 real-time PCR,反应条件为 95℃ 3 min;95℃ 30 s,58.5℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。以 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, XM_002263109)为内参,从已构建的差减文库中选取部分有差异表达的基因进行荧光定量表达。荧光定量分析仪为 Icyler IQ (Bio-Rad),荧光染料为 SYBR-Green,荧光定量引物见表 1,每个基因每个处理 3 次重复。

2 结果

2.1 ‘赤霞珠’葡萄冬芽和夏芽抑制消减 cDNA 文库的构建

通过对消减之后的杂交产物和未经消减杂交产物进行巢氏 PCR 检测(图 2),结果显示,两次 PCR 产物均为弥散的 cDNA 群体。第二次 PCR 扩增片段比第一次 PCR 扩增片段分布更为集中,且呈较均匀的弥散带,说明消减杂交结果较好,达到了建库的基本要求。



从左到右依次为 1、2、3、4、5 五个不同状态 5 different states of prompt bud from left to right, corresponding to 1, 2, 3, 4, 5

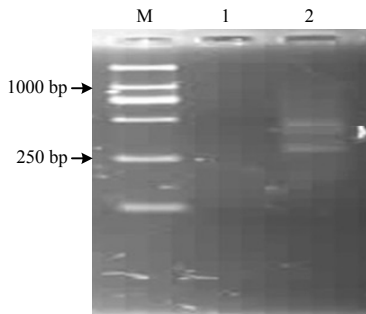
图 1 夏芽的 5 种萌发状态

Fig. 1 Five states of prompt bud germination

表 1 Real time-PCR 所用引物

Table 1 Primers used for quantitative real time -PCR analysis

| 基因 Gene | 前端引物 Forward (5'-3') | 后端引物 Reward (5'-3') |
|---|---------------------------|-------------------------------|
| 线粒体蛋白基因 Mitochondrial protein gene | ACCAGTCGGTCTCACAGTCAGGCAG | TAGGTGGGAGGTGGGACACACAACG |
| 未知蛋白基因 Unnamed protein gene | GTTTTTGGTGACAACACCTGGAGAT | TAGATTGACTGAACGCAGAAAGCCT |
| 开花相关基因 Flower bloom associated gene | CCTACTATGGTATTGACGGGTGACG | CTGCTGCCTTCCTTGGATGTGGT |
| ATP 合成酶 亚基基因 ATP synthase subunit beta gene | GCCTACTATGGTATTGACGGGTG | GCTGCCTTCCTTGGATGTGGT |
| MADs FLC-like 蛋白基因 MADs FLC-like protein gene | TACATCGTGTACCACCTTAGCAGA | AAGGAACTCGGCAAAAATGACCC |
| 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 GAPDH gene | ACTGCCTTGCTCCTTTCGCGAAG | CCAGTGTCTGCTAGGAATGATGTTGAATG |

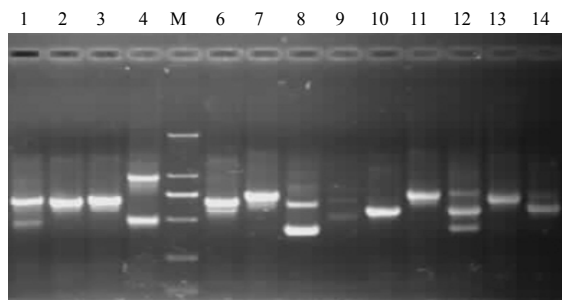


M: Marker DL2000; 1: 第一轮 PCR 产物条带; 2: 第二轮 PCR 产物条带
M: Marker DL2000; 1: Primary PCR product; 2: Secondary PCR product

图 2 巢式 PCR 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis analysis of the nested PCR

通过转化、筛选后, 共获得 450 个白色单克隆菌落。菌落 PCR 检测发现转化大肠杆菌感受态细胞中的片段长度大部分在 400—1 500 bp (图 3), 根据电泳结果, 筛选出条带清晰且片段长度 > 350 bp 对应的菌落, 送交测序公司进行测序。cDNA 文库构建成功。



M: DL2000 Marker; 1—4、6—14: 阳性克隆 PCR PCR products of positive clones

图 3 随机选取的阳性克隆的菌液 PCR 电泳分析

Fig. 3 PCR products of positive clones which were selected randomly

2.2 EST 序列的生物信息学分析

2.2.1 测序结果的冗余分析 通过测序共测定 408 个阳性克隆。经去除污染、重复、低质量 (< 100 bp) 的序列, 共获得 359 条有效、高质量的 EST 序列, 其中, 41 条序列测序出现重叠现象, 8 条序列测序失败, 测序成功率为 88%。经比对和拼接, 共得到 106 个 Unigenes。其中, 最长序列为 1 077 bp, 最短为 174 bp, 平均长度为 417 bp, 与预计插入片段的大小相符。这些 EST 片段的重叠群为 253 个, 单拷贝序列为 106 个。对 106 个 Unigenes 进行编码, 以进行生物信息学分析。

2.2.2 EST 序列的 BLASTN 分析结果 将获得的 106 个有效 Unigenes 片段在 NCBI 的 genbank 数据库中进行 BLAST 同源比对, 结果显示, 98 条序列与现在已知基因的相似性很高, 为同源序列, 占全部 EST 的 92.4%; 6 条在 GenBank 数据库中无任何同源性, 占全部 EST 的 5.6%; 2 条为重复序列, 占全部 EST 的 2%。就 BLASTN 对比同源性最高的基因的来源看, 绝大部分来源于葡萄 (*Vitis vinifera*)、紫花苜蓿 (*Medicago sativ*)、油橄榄 (*Olea europaea*)、欧洲油菜 (*Brassica napus*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、大蒜 (*Allium sativum*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、稻 (*Oryza sativa*)、康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*)、辣椒 (*Capsicum annum*)、白杨 (*Populus alba*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和台湾百合 (*Lilium formosanum*) 等植物。

2.2.3 EST 序列的 BLASTX 同源分析 BLASTX 结果 (表 2) 发现, 共有 54 条与功能已知基因的相似性很高, 为同源序列, 占全部 EST 的 51%; 45 条为大蒜病毒序列, 占全部 EST 的 42.4%; 6 条在 GenBank 数据库中无任何同源性, 占全部 ESTs 的 5.6%。1 条为重复序列, 占全部 EST 的 1%。就 BLASTX 对比同源

表 2 部分 EST 与 GenBank 中已知同源基因的比对结果

Table 2 Comparison of partial ESTs with homologous sequences in GenBank

| 基因编号 Number | 蛋白 Proteins | E-值 E-value | 生物种类 Species | 相似性 Identities (%) |
|----------------|---|----------------|--|-----------------------|
| | MADS FLC-like 蛋白 MADS FLC-like protein | | | |
| SSH-43 | MADS FLC-like 蛋白 2 MADS FLC-like protein 2 | 2.00E-14 | 菊苣 <i>Cichorium intybus</i> | 100 |
| SSH-51 | MADS FLC-like 蛋白 3 MADS FLC-like protein 3 | 8.00E-15 | 菊苣 <i>Cichorium intybus</i> | 96 |
| | 钙依赖蛋白激酶 Calcium-dependent protein kinase | | | |
| SSH-99 | Calcium-dependent protein kinase, putative | 3.00E-30 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 84 |
| | NAPD 依赖型的苹果酸酶 NADP-dependent malic enzyme | | | |
| SSH-74 | NADP 依赖型的苹果酸酶 NADP-dependent malic enzyme | 5.00E-24 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 82 |
| | 细胞壁水解酶 Cell wall-associated hydrolase | | | |
| SSH-63 | 细胞壁水解酶 Cell wall-associated hydrolase | 1.00E-24 | 远洋杆菌属 <i>Candidatus Pelagibacter</i> | 89 |
| SSH-10 | 细胞壁水解酶 Cell wall-associated hydrolase | 2.00E-24 | 远洋杆菌属 <i>Candidatus Pelagibacter</i> sp. HTCC7211 | 89 |
| | 细胞壁松弛蛋白 Plant-type cell wall loosening protein | | | |
| SSH-112 | 细胞壁松弛蛋白 Plant-type cell wall loosening protein | 5.00E-07 | 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 100 |
| | 线粒体蛋白 Mitochondrial protein | | | |
| SSH-181 | 线粒体推测蛋白 Mitochondrial protein, putative | 1.00E-25 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 96 |
| SSH-286 | 线粒体推测蛋白 Mitochondrial protein, putative | 2.00E-12 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 95 |
| SSH-408 | 线粒体推测蛋白 Mitochondrial protein, putative | 1.00E-33 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 92 |
| SSH-256 | 线粒体推测蛋白 Mitochondrial protein, putative | 4.00E-21 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 83 |
| SSH-222 | 线粒体推测蛋白 Mitochondrial protein, putative | 3.00E-14 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 100 |
| SSH-36 | 线粒体推测蛋白 Mitochondrial protein, putative | 5.00E-83 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 91 |
| | 外被体蛋白复合体, β 亚基 Coatomer protein complex, beta prime subunit-like | | | |
| SSH-166 | 外被体蛋白复合体, β 亚基 Coatomer protein complex, beta prime subunit-like | 4.00E-50 | 粳稻 <i>Oryza sativa</i> Linn. subsp. <i>japonica</i> Kato | 81 |
| SSH-233 | 外被体蛋白复合体, β 亚基 Coatomer protein complex, beta prime subunit-like | 7.00E-49 | 粳稻 <i>Oryza sativa</i> Linn. subsp. <i>japonica</i> Kato | 81 |
| | 热激蛋白 Heat shock protein | | | |
| SSH-399 | 热激蛋白 Heat shock protein XF20-2 | 1.00E-67 | 小麦 <i>Triticum aestivum</i> | 94 |
| | 液泡加工酶 4 Vacuolar processing enzyme 4 | | | |
| SSH-100 | 液泡加工酶 4 Vacuolar processing enzyme 4 | 7.00E-50 | 一粒小麦 <i>Triticum monococcum</i> | 60 |
| | 衰老相关蛋白 Senescence-associated protein | | | |
| SSH-101 | 衰老相关蛋白 Senescence-associated protein | 2.00E-26 | 挪威云杉 <i>Picea abies</i> | 100 |
| SSH-247 | 衰老相关蛋白 Senescence-associated protein | 5.00E-30 | 微单胞菌属 <i>Micromonas pusilla</i> | 98 |
| SSH-16 | 衰老相关推测蛋白 Putative senescence-associated protein | 1.00E-20 | 豌豆 <i>Pisum sativum</i> | 88 |
| | 谷胱甘肽硫基转移酶 Glutathione S-transferase family protein | | | |
| SSH-103 | 谷胱甘肽硫基转移酶 Glutathione S-transferase family protein | 5.00E-15 | 玫瑰变色菌 <i>Roseovarius</i> | 98 |
| | 细胞色素 Cytochrome | | | |
| SSH-116 | 细胞色素 Cytochrome P450-like TBP protein | 1.00E-04 | 麝香百合 <i>Lilium longiflorum</i> | 43 |
| | SKP 分子伴侣 Homologue to SKP1 | | | |
| SSH-375 | SKP 分子伴侣 Homologue to SKP1 | 5.00E-49 | 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 80 |
| | DNA 分子伴侣 Homologue to DNA | | | |
| SSH-155 | LDJ2 | 3.00E-64 | 象大蒜 <i>Allium ampeloprasum</i> | 98 |
| | 生长素应激蛋白 Response to auxin stimulus | | | |
| SSH-118 | 生长素应激蛋白 Response to auxin stimulus | 6.00E-59 | 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 92 |
| | ATP 合酶 β 亚基 ATP synthase subunit beta | | | |
| SSH-82 | ATP 合酶 β 亚基 ATP synthase subunit beta | 8.00E-61 | 蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> | 92 |
| | 细胞色素氧化酶 Cytochrome c oxidase | | | |
| SSH-83 | 细胞色素氧化酶 Cytochrome c oxidase | 3.00E-06 | 海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i> | 82 |
| | 甘油激酶 Glycerol kinase | | | |
| SSH-260 | 甘油激酶 Glycerol kinase | 2.00E-50 | 美洲种韧皮杆菌 <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> | 76 |
| | O-甲基转移酶 O-methyl transferase | | | |
| SSH-49 | O-甲基转移酶 O-methyl transferase | 1.00E-20 | 油棕 <i>Elaeis guineensis</i> | 47 |
| | 结构功能蛋白 Structural molecule activity | | | |
| SSH-25 | 结构功能蛋白 Structural molecule activity | 2.00E-11 | 网柄菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> | 83 |

性最高的基因的来源看,绝大部分来源于葡萄 (*Vitis vinifera*)、大蒜 (*Allium sativum*)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、白杨 (*Alnus glutinosa*)、菊苣 (*Cichorium intybus*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、麝香百合 (*Lilium longiflorum*)、蓖麻 (*Ricinus communis*) 和 粳稻 (*Oryza sativa* Linn. subsp. *japonica* Kato) 等。

2.2.4 EST 片段的功能分析和预测 将所得的 106 个 Unigenes 在 NCBI 蛋白质数据库进行 BLASTX 分析。根据分析结果,进行 GO 功能推测及归类。目前,GO 分类体系将基因表达产物分为:(1)细胞组分 (cellular component);(2)分子功能 (molecular function);(3)生物学过程 (biological process),根据这个分类体系,将有比对结果的 EST 片段进行了分类。

如图 4 所示,‘赤霞珠’葡萄冬芽与夏芽的基因表达产物在细胞定位方面大体上较为一致,在细微方面有所差异。用 GO 对 EST 进行功能注释,发现定位于细胞核 (nucleus) 的组分所占比例最高,细胞定位尚不明确的细胞组分 (cellular component) 所占比例也很高。定位于线粒体 (mitochondrion) 和叶绿体 (chloroplast) 的组分所占比例基本一致。此外,在细胞壁 (cell wall)、可溶性组分 (soluble fraction)、细胞质 (cytoplasm)、液泡外膜 (COPI vesicle coat)、膜外被 (membrane coat)、肌动蛋白细胞骨架 (actin cytoskeleton) 及质体 (plastid) 等亚细胞单位中的组分所占比例基本一致。这与现阶段关于休眠芽的研究主要集中在 线粒体上,及其与呼吸作用相关的观点相一致。

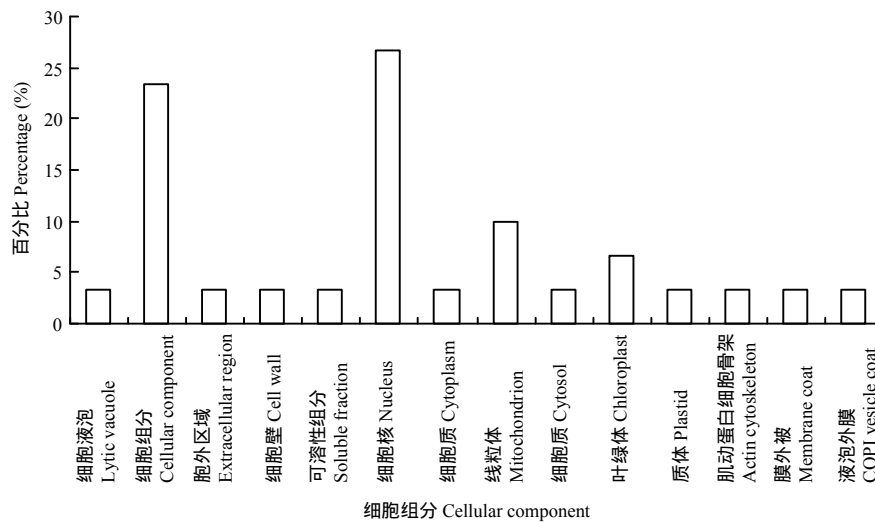


图 4 参与细胞组分分析

Fig. 4 Analysis of sequence distribution of cellular components

图 5 为 GO 的分子功能分析结果,其分子功能主要有:半胱氨酸肽链内切酶活性 (cysteine-type endopeptidase activity)、催化活性 (catalytic activity)、蛋白质二聚体催化活性 (protein dimerization activity)、结构分子活性 (structural molecule activity)、蛋白激酶活性 (protein kinase activity)、蛋白结合功能 (protein binding)、DNA 结合功能 (DNA binding)、ATP 结合功能 (ATP binding)、甲基转移酶活性 (methyltransferase activity) 及丙酮酸氨基转移酶活性 (pyruvate aminotransferase activity)。这些分子生物学功能在休眠芽的维持及打破过程中起重要作用。还有约 23% 的蛋白质在 GO 数据库中未查到其相关功

能,主要原因是这些蛋白大部分为预测蛋白,并没有一个的查询 terms。随着分子生物学的发展,这些蛋白的功能将被一一检测。

通过基因功能注释可知,筛选得到的差异基因的功能涉及葡萄生长发育的各个方面 (图 6)。主要包括以下几类:与休眠相关的开花基因,包括开花过程的调控 (regulation of flower development)、引起开花的光周期现象 (photoperiodism, flowering),这些基因占生物学过程的 20%; 环境胁迫相关的基因,包含失水应激 (response to water deprivation)、真菌感染应激 (defense response to fungus),占总生物学过程的 6%; 细胞代谢相关基因,包括细胞呼吸作

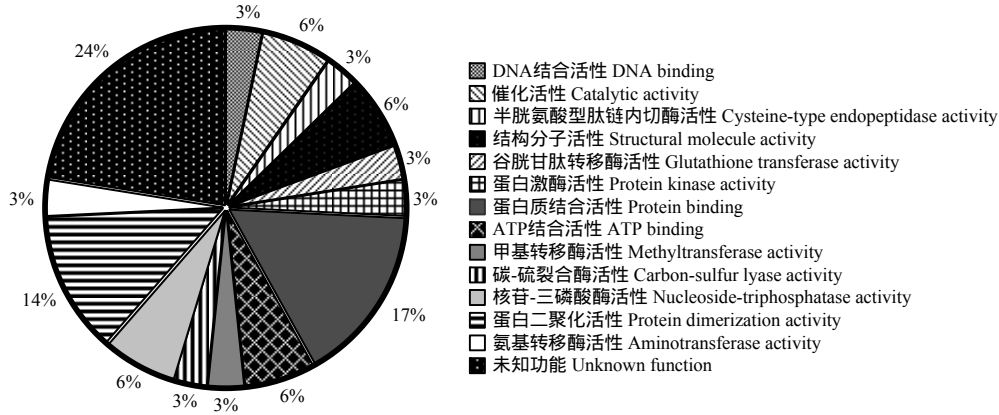


图 5 参与分子功能分析

Fig. 5 Analysis of sequence distribution of molecular function

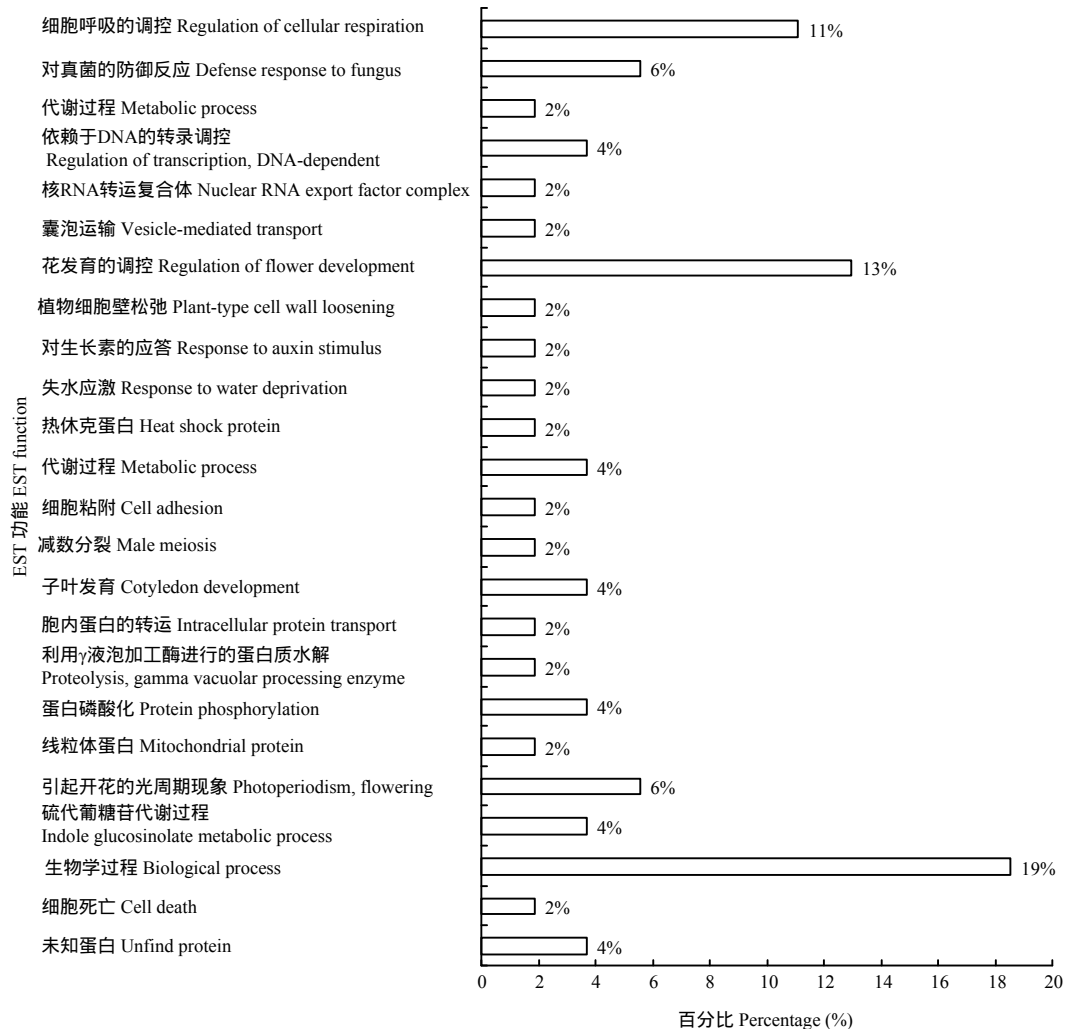


图 6 参与生物学过程

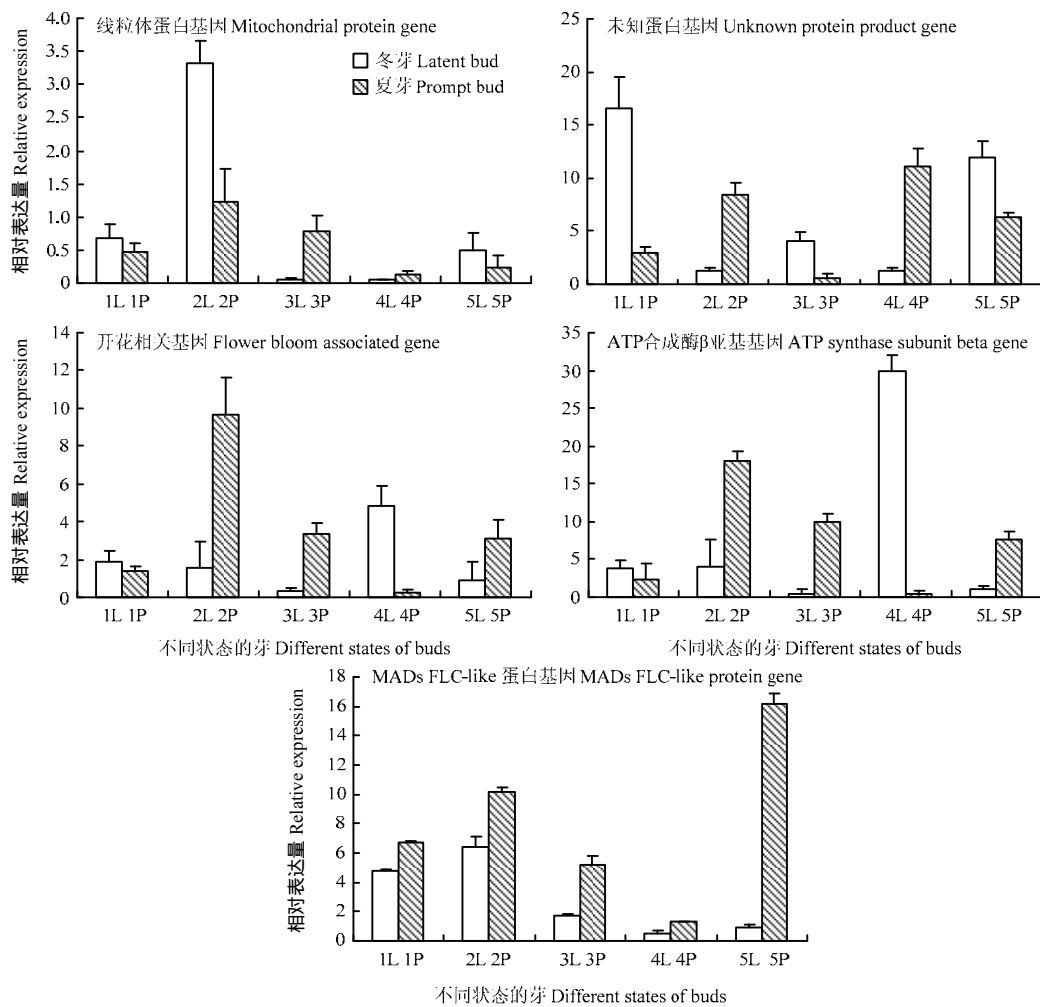
Fig. 6 Analysis of sequence distribution of biological process

用的调控 (regulation of cellular respiration)、可能参与呼吸代谢的线粒体蛋白 (mitochondrial protein potentially involved in respiratory metabolism)、硫代葡萄糖苷反应 (indole glucosinolate metabolic process)、新陈代谢 (metabolic process)、苹果酸盐代谢过程 (malate metabolic process enzyme 3)、蛋白质磷酸化作用 (protein phosphorylation)、利用 γ 液泡加工酶进行的蛋白质水解 (proteolysis, gamma vacuolar processing enzyme) 等, 这些相关基因占总生物学过程的 20%。细胞的呼吸作用, 为植物生命活动提供能量, 是植物生长发育不可或缺的一部分。而硫代葡萄糖苷代谢、蛋白质磷酸化、蛋白质水解等是植物细胞中脂类、糖类、蛋白质、核

酸等代谢过程中均有可能发生的生化过程; 胞内物质运输相关基因, 包括 RNA 运输 (nuclear RNA export factor complex)、囊泡运输 (vesicle-mediated transport)、胞内蛋白运输 (intracellular protein transport), 这些基因占总生物学过程的 6%; 依赖 DNA 的转录调节 (regulation of transcription, DNA-dependent); 减数分裂 (male meiosis)、细胞凋亡 (cell death)、细胞壁松弛作用 (plant-type cell wall loosening)。

2.3 部分基因表达模式分析

从构建的 SSH 文库中, 选取 5 个候选基因, 采用 Real-time PCR 技术分析其在夏芽萌发过程中的表达模式, 及其在冬、夏芽中的差异表达。由图 7 可以看



1P、2P、3P、4P、5P 分别代表根据上述分类依据所得的夏芽; 1L、2L、3L、4L、5L 代表对应节位上的冬芽
1P, 2P, 3P, 4P and 5P represented 5 states of prompt buds, and 1L, 2L, 3L, 4L, and 5L represented latent buds on the corresponding node

图 7 ‘赤霞珠’夏芽萌发过程中不同基因的表达模式分析

Fig. 7 Expression changes of several genes during budburst of prompt buds of Cabernet Sauvignon

出,同一基因在相同节位的冬芽和夏芽中表达量均有较大差异。同时,在夏芽萌发过程中,各个候选基因在冬芽和夏芽中的表达量呈现出较大波动变化,不同基因表达模式也不尽相同。其中,线粒体蛋白基因和 MADs FLC-like 蛋白基因在冬芽和夏芽中的表达量变化趋势大体一致,而未知蛋白基因、开花相关基因、ATP 合成酶 β 亚基基因在冬芽和夏芽中的表达量呈相反的变化趋势。

3 讨论

多年生木本植物芽休眠的形成与解除是一个众多基因共同参与的过程,其中生理休眠的诱导与解除亦是如此。对于日本杏树营养芽休眠的研究表明,与相对休眠芽和生态休眠芽相比,处在生理休眠期的营养芽中参与赤霉素代谢、逆境胁迫、细胞壁修饰、信号转导等的基因上调表达^[13]。本研究中筛选的冬芽与夏芽的差异基因,亦涉及植物生命活动的各个方面:对真菌感染的应激反应、呼吸作用、调控呼吸作用的线粒体蛋白、胞内蛋白质运输、基因转录、减数分裂、对生长激素的调节、对干旱的应激反应、蛋白质的磷酸化作用及新陈代谢和细胞凋亡等。由此可知,多年生木本植物芽休眠的形成与解除是一个非常复杂的过程,涉及植物从开始生长发育到衰老死亡的各个过程,是一个纷繁复杂的有机体系^[33]。

光周期是使植物随着季节性变化而生长、开花及休眠的重要环境因子。很多植物的开花是受光周期调控的,所以人们推测调控开花的基因在植物的休眠过程中也发挥一定的作用。此外,参与休眠起始和解除信号途径调控的遗传组分与调节开花的遗传组分可能相同,例如, Flowering Locus T(*FT*)/Terminal Flower1(*TFL1*), 以及 MADS-box 基因家族^[34]。MAD-box 转录因子的一些成员,例如 Flowering Locus C (*FLC*) 和 Short Vegetative Phase (*SVP*), 参与拟南芥开花应答的温度调控,也能够调控多年生木本植物的芽休眠^[35-36]。在桃树^[37]、杏树^[13]、覆盆子^[38]等植物中曾分离出 *DAM* (Dormancy associated MADS-box) 基因。在枳类和乳浆草的生理休眠过程中,它们上调表达,并且在生理休眠解除后,表达量下降^[39-40]。Sreekantan 等^[41]通过对河岸葡萄和塞伯拉葡萄越冬芽发育过程中的花序原基分化以及成花途径相关基因的分析,鉴定出了具有调控花发育和休眠诱导双重作用的基因,包括生物钟节律和开花相关基因: *AP2*、*BT1*、*COL-13*、*EIN3*、*ELF4*、*DDTR*、*GAI* 和 *HY5*, 并阐明它们之间相互作用

组成了复杂的网络体系来调控休眠和开花的过程。本研究中, MADs FLC-like 蛋白基因和开花相关基因均属开花相关的基因,可调控葡萄的芽休眠,可能是上述调控开花和休眠途径网络体系的成员。随着夏芽的萌发,二者在冬芽和夏芽中表达量均呈不规律变化,开花相关基因在冬芽和夏芽中的变化趋势相反,而 MADs FLC-like 蛋白基因相同,二者之所以变化趋势不同,推测它们对开花基因的调控作用不同,它们的表达产物可能是 *FLC* 的调控因子,可能抑制 *FLC* 的表达,也可能促进 *FLC* 的表达。并且,这两个基因在夏芽中的表达量变化趋势相近,均在第二个状态上调表达,然后下降,在第五个状态又上调表达,之所以出现此种变化趋势,推测与夏芽的萌发状态关系密切,因为第二个状态是夏芽由休眠向萌发过渡的初始阶段,而第五个状态是夏芽完全萌发的状态,可能是因为这两个阶段对夏芽来说是其生活史的关键时期,此期需要更多的物质和能量来满足其需求。

未知蛋白基因在夏芽萌发过程中,表达量不断变化,在冬芽和夏芽中的表达量呈相反的变化趋势,表明该基因与芽休眠和萌发具有一定的关系,但其细胞定位、分子功能及参与的生物学过程有待于进一步研究与探讨。

Pacey-Miller 等^[29]在对葡萄芽休眠的研究中发现,与休眠期相比,在芽萌发阶段,能量代谢相关基因的表达水平有很大的提高。本研究也从差减文库中分离出一批与 ATP 合成酶、囊泡运输、胞内物质运输蛋白、囊泡运输蛋白、线粒体呼吸作用蛋白等能量代谢基因同源的 EST 片段,这表明葡萄冬芽在生理休眠阶段进行着复杂的能量代谢过程;同时也说明,葡萄的芽休眠是一个非常复杂的过程,涉及细胞生理代谢的各个过程。上面研究的线粒体蛋白基因、ATP 合成酶 β 亚基基因参与呼吸作用提供能量,夏芽萌发过程中,二者在冬芽和夏芽中表达量有较大变化,推测是因为在夏芽萌发的不同时期,葡萄体内进行着复杂的能量代谢和细胞重建过程,其关键调控蛋白或关键酶会发生相应的变化。这两个基因在夏芽中表达量呈相似的变化趋势,均在第二个状态下达到最大值,推测可能是因为第二个状态是夏芽萌发的初始状态,此期芽体内需要的物质和能量相对于其他时期较多。

4 结论

成功构建了‘赤霞珠’葡萄冬芽和夏芽差异表达基因文库,对获得的 106 条有效差异基因片段进行同

源比对及功能聚类分析, 分离得到一些表达频率较高的基因, 包括控制开花的 MADS FLC-like 蛋白、线粒体蛋白、衰老相关蛋白、分子伴侣、钙调蛋白、ATP 结合蛋白、蛋白的磷酸化酶和一些未知功能蛋白等基因, 确定线粒体蛋白基因、未知蛋白基因、开花相关基因、ATP 合成酶 β 亚基基因、MADS FLC-like 蛋白基因等与葡萄芽休眠具有一定的相关性。

References

- [1] Gilreath P R, Buchanan D W. Rest prediction [mathematical] model for low-chilling 'Sungold' nectarine. *Journal American Society for Horticultural Science*, 1981, 106: 426-429.
- [2] Mathur D D, Couvillon G A, Vines H M. Stratification effects on endogenous gibberellic acid (GA) in peach seeds. *Hortscience*, 1971, 6: 538-539.
- [3] Dun E A, Ferguson B J, Beveridge C A. Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 812-819.
- [4] Frewen B E, Chen T H, Howe G T, Davis J, Rohde A, Boerjan W, Bradshaw H D J. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics*, 2000, 154(2): 837-845.
- [5] Stupnikova I V, Borovskii G B, Antipina A I, Voinikov V K. Polymorphism of thermo stable proteins in soft wheat seedlings during low-temperature acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2001, 48(6): 804-810.
- [6] Kozarewa I, Ibáñez C, Johansson M, Ögren E, Mozley D, Nylander E, Chono M, Moritz T, Eriksson M E. Alteration of *PHYA* expression change circadian rhythms and timing of bud set in *Populus*. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73(1/2): 143-156.
- [7] 姚骅珊, 张博, 诸葛强. 多年生木本植物季节性休眠的分子机制. 分子植物育种, 2009, 7(5): 985-989.
Yao H S, Zhang B, Zhu G Q. Molecular mechanism of seasonal dormancy in perennial woody plant. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(5): 985-989. (in Chinese)
- [8] Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner A M, Jansson S, Strauss S H, Nilsson O. *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, 2006, 312(5776): 1040-1043.
- [9] Ruonala R, Rinne P L H, Kangasjärvi J, van der Schoot C. *CENLI* expression in the rib meristem affects stem elongation and the transition to dormancy in *Populus*. *The Plant Cell Online*, 2008, 20(1): 59-74.
- [10] Bielenberg D G, Wang Y, Li Z G, Zhebentyayeva T, Fan S H, Reighard G L, Scorza R, Abbott A G. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics and Genomes*, 2008, 4(3): 495-507.
- [11] Bielenberg D G, Wang Y, Fan S, Reighard G L, Scorza R, Abbott A G. A deletion affecting several gene candidates is present in the evergrowing peach mutant. *Journal of Heredity*, 2004, 95(5): 436-444.
- [12] Rohde A, Ruttink T, Hostyn V, Sterck L, van Driessche K, Boerjan W. Gene expression during the induction, maintenance, and release of dormancy in apical buds of poplar. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(15/16): 4047-4060.
- [13] Yamane H, Kashiwa Y, Ooka T, Tao R, Yonemori K. Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated expression of an *SVP/AGL24*-type MADS-box gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 2008, 133(5): 708-716.
- [14] Mazzitelli L, Hancock R D, Haupt S, Walker P G, Pont S D A, Mcnicol J, Cardle L, Morris J, Viola R, Brennan R, Hedley P E, Taylor M A. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(5): 1035-1045.
- [15] Horvath D P, Chao W S, Suttle J C, Thimmapuram J, Anderson J V. Transcriptome analysis identifies novel responses and potential regulatory genes involved in seasonal dormancy transitions of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 536-542.
- [16] 王倩. 中国野生毛葡萄抗黑痘病抑制消减杂交文库构建及表达序列标签 (ESTs) 分析[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2011.
Wang Q. Construction and EST analysis of a suppressive subtraction cDNA library of Chinese wild *Vitis quinquangularis* inoculated with *Elsinoe ampelina* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)
- [17] 孙洪波, 王国英, 孙振元, 古润泽, 赵梁军. 应用抑制差减杂交法分离粗枝大叶黄杨幼苗的冷诱导表达基因. 中国农业科学, 2005, 38(1): 135-139.
Sun H B, Wang G Y, Sun Z Y, Gu R Z, Zhao L J. Isolating cold-regulated genes from *Euonymus japonicus* 'Zhuizi' seedlings through suppression subtractive hybridization. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(1): 135-139. (in Chinese)
- [18] 周志钦. 马铃薯从休眠到发芽过程差异表达基因的分析. 西南农业大学学报, 2001, 23(3): 213-215.
Zhou Z Q. Analysis of differentially expressed genes from dormancy to sprouting of potato tubers. *Journal of Southwest Agricultural*

- University*, 2001, 23(3): 213-215. (in Chinese)
- [19] 王新超, 杨亚军, 陈亮, 马春雷, 姚明哲. 茶树休眠芽与萌动芽抑制消减杂交文库的构建与初步分析. *茶叶科学*, 2010, 30(2): 129-135.
Wang X C, Yang Y J, Chen L, Ma C L, Yao M Z. Construction and preliminary analysis of the suppression subtractive hybridization cDNA libraries between dormant and sprouting buds of tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Tea Science*, 2010, 30(2): 129-135. (in Chinese)
- [20] 李婉莎, 刘德团, 杨永平, 胡向阳. 番茄茎腺毛差异表达序列分离与分析. *植物分类与资源学报*, 2011, 33(6): 660-666.
Li W S, Liu D T, Yang Y P, Hu X Y. Isolation and analysis of differential expressed ESTs from stem trichomes of *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). *Plant Diversity and Resources*, 2011, 33(6): 660-666. (in Chinese)
- [21] 丁勇, 常玮, 张石宝, 胡虹. 热胁迫下中甸角蒿叶片 SSH 文库的构建及初步分析. *植物分类与资源学报*, 2012, 34(1): 47-55.
Ding Y, Chang W, Zhang S B, Hu H. Construction of leave library by SSH and preliminary analysis of genes responsible for heat stress in *Incarvillea zhongdiannensis*. *Plant Diversity and Resources*, 2012, 34(1): 47-55. (in Chinese)
- [22] 李娟娟, 陈福龙, 李鑫, 王蕾, 贾俊忠, 陈远良, 陈芳, 高剑峰. 黄瓜芽黄突变体抑制消减杂交文库的构建及初步分析. *西北植物学报*, 2010, 30(5): 0905-0910.
Li J J, Chen F L, Li X, Wang L, Jia J Z, Chen Y L, Chen F, Gao J F. Construction and analyses of SSH cDNA libraries of a cucumber mutant of yellow virescent. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(5): 0905-0910. (in Chinese)
- [23] 樊奇, 王凭青, 杨青川, 宋文静, 邓腊梅, 张宝云. 抑制消减杂交法分离紫花苜蓿幼苗铝胁迫诱导表达的 cDNA. *生物技术通报*, 2011, 1: 95-98.
Fan Q, Wang P Q, Yang Q C, Song W J, Deng L M, Zhang B Y. Isolation and cloning of cDNA induced by aluminum stress in alfalfa seedling using suppression subtractive hybridization. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 1: 95-98. (in Chinese)
- [24] 颜克亮, 陈波, 姚家玲, 周新安, 张会芳, 魏文辉. 大豆种子形态建成期与成熟期正反抑制消减文库构建及差异表达基因分析. *武汉大学学报: 理学版*, 2008, 54(2): 202-208.
Yan K L, Chen B, Yao J L, Zhou X A, Zhang H F, Wei W H. Analysis of differentially expressed genes at pattern formation and maturation stages of soybean seed. *Journal of Wuhan University: Natural Science Edition*, 2008, 54(2): 202-208. (in Chinese)
- [25] Yooyongwech S, Horigane A K, Yoshida M, Yamaguchi M, Sekozawa Y, Sugaya S, Gemma H. Changes in aquaporin gene expression and magnetic resonance imaging of water status in peach tree flower buds during dormancy. *Physiologia Plantarum*, 2008, 134(3): 522-533.
- [26] 郭新红, 姜孝成, 潘晓玲, 戴玉池, 姜维明, 陈良碧. 用抑制消减杂交法分离和克隆梭梭幼苗受渗透胁迫诱导相关基因的 cDNA 片段. *植物生理学报*, 2001, 27(5): 401-406.
Guo X H, Jiang X C, Pan X L, Dai Y C, Jiang W M, Chen L B. Isolation and cloning of cDNA related with the genes of haloxylon ammodendron (Mey.) Bge. Seedlings induced by osmotic stress by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology Journal*, 2001, 27(5): 401-406. (in Chinese)
- [27] 唐永洽, 于拴仓, 朱月林, 张凤兰, 余阳俊, 赵岫云, 张德双. 大白菜霜霉菌诱导抑制性消减杂交 cDNA 文库的构建和分析. *植物生理学通讯*, 2010, 46(5): 453-458.
Tang Y Q, Yu S C, Zhu Y L, Zhang F L, Yu Y J, Zhao Y Y, Zhang D S. Construction and analysis of suppression subtractive hybridization cDNA library in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) leaves induced by *Peronospora parasitica*. *Plant Physiology Communications*, 2010, 46(5): 453-458. (in Chinese)
- [28] 院海英, 徐芳, 吕新华, 崔百明, 黄先忠. 小拟南芥高盐胁迫诱导 cDNA 文库的构建与测序分析. *石河子大学学报: 自然科学版*, 2012, 30(1): 1-4.
Yuan H Y, Xu F, Lü X H, Cui B M, Huang X Z. Construction and sequencing analysis of cDNA library induced by high salt stress in *Olimarabidopsis pumila*. *Journal of Shihezi University: Natural Science Edition*, 2012, 30(1): 1-4. (in Chinese)
- [29] Pacey-Miller T, Scott K, Ablett E, Tingey S, Ching A, Henry R. Genes associated with the end of dormancy in grapes. *Functional & Integrative Genomics*, 2003, 3(4): 144-152.
- [30] 马海燕. 葡萄生长过程中内源激素含量变化的研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2007.
Ma H Y. Study on changes of endogenous hormones in the process of grape growing [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- [31] 张今今, 王跃进, 王西平, 杨克强, 杨进孝. 葡萄总 RNA 提取方法的研究. *果树学报*, 2003, 20(3): 178-181.
Zhang J J, Wang Y J, Wang X P, Yang K Q, Yang J X. An improved method for rapidly extracting total RNA from *Vitis*. *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(3): 178-181. (in Chinese)
- [32] 张今今. 中国葡萄属野生种抗白粉病基因 cDNA 克隆及序列分析 [D]. 杨陵: 西北农林科技大学. 2003.
Zhang J J. cDNA cloning and sequence analysis of powdery mildew resistance gene in chinese wild *Vitis* species[D]. Yangling: Northwest

- A&F University, 2003. (in Chinese)
- [33] 王新超, 马春雷, 杨亚军. 多年生植物的芽休眠及调控机理研究进展. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(4): 589-595.
Wang X C, Ma C L, Yang Y J. Progress in research on bud dormancy and its regulation mechanisms in perennial plants. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(4): 589-595. (in Chinese)
- [34] Horvath D. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science*, 2009, 177(6): 523-531.
- [35] Hemming M N, Trevaskis B. Make hay when the sun shines: The role of MADS-box genes in temperature-dependant seasonal flowering responses. *Plant Science*, 2011, 180(3): 447-453.
- [36] Lee J H, Yoo S J, Park S H, Hwang I, Lee J S, Ahn J H. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 2007, 21(4): 397-402.
- [37] Jiménez S, Li Z, Reighard G L, Bielenberg D G, Judd M J, Meyer D H, Meekings J S, Richardson A C, Walton E F. An FTIR study of the induction and release of kiwifruit buds from dormancy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(6): 1071-1080.
- [38] Mazzitelli L, Hancock R D, Haupt S, Walker P G, Pont S D A, Mcnicol J, Cardle L, Morris J, Viola R, Brennan R, Hedley P E, Taylor M A. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(5): 1035-1045.
- [39] Zhang J Z, Li Z M, Mei L, Yao J L, Hu C G. *PtFLC* homolog from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) is regulated by alternative splicing and experiences seasonal fluctuation in expression level. *Planta*, 2009, 229(4): 847-859.
- [40] Dođramaci M, Horvath D P, Chao W S, Foley M E, Christoffers M J, Anderson J V. Low temperatures impact dormancy status, flowering competence, and transcript profiles in crown buds of leafy spurge. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73 (1/2): 207-226.
- [41] Sreekantan L, Mathiason K, Grimplet J, Schlauch K, Dickerson J A, Fennell A Y. Differential floral development and gene expression in grapevines during long and short photoperiods suggests a role for floral genes in dormancy transitioning. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73 (1/2): 191-205.

(责任编辑 李莉)