

# 草莓芽休眠诱导过程中叶生长及相关基因表达变化

于淑梅 贾楠 王忆 吴婷 韩振海 张新忠\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 为进一步研究草莓(*Fragaria* × *ananassa*)芽休眠诱导过程中温度和光周期响应的互作关系,以草莓 Albion 盆栽匍匐茎苗为试材,分别实施 18℃/8 h、15℃/16 h、15℃/8 h 和 12℃/16 h 处理,以 26℃/16 h 为对照,光照强度是 200 μmol/(m<sup>2</sup> · s),调查叶生长和相关基因表达量。结果低温、短日均使相邻两片叶抽生的时间间隔明显延长,抑制草莓叶生长。15℃/8 h 和 12℃/16 h 温光组合可以有效诱导草莓植株假休眠。15℃临界温度下 *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 表达受短日照诱导,通过 *FaPIF4* 调控 IAA 响应,较高温度下植株对日长的响应延迟。而 12℃条件下草莓植株休眠诱导与光周期反应不相关。低温与短日均为草莓芽休眠诱导的环境因子,温度较光周期更重要。

**关键词** *Fragaria* × *ananassa*;芽休眠;光周期;温度

中图分类号 S 668.4

文章编号 1007-4333(2015)06-0099-09

文献标志码 A

## Changes in leaf growth and related gene expressions during bud dormancy induction in strawberry

YU Shu-mei, JIA Nan, WANG Yi, WU Ting, HAN Zhen-hai, ZHANG Xin-zhong\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** To identify the mutual relationship between temperature and photoperiod during the bud dormancy induction in strawberry(*Fragaria* × *ananassa*), Growth of newly unfolded leaves and the relative expression of genes related temperature and photoperiod responses were analyzed under the conditions of 18℃/8 h, 15℃/16 h, 15℃/8 h, 12℃/16 h and 26℃/16 h. And Light intensity is 200 μmol/(m<sup>2</sup> · s). Time interval of new leaf emergence between two neighboring leaves was increased by low temperature and short photoperiod obviously, and the growth of leaf was inhibited Pseudo-dormancy was effectively induced at 15℃/8 h or 12℃/16 h. The expressions of *FaPHYA* and *FaPHYB* were activated in short day under the condition of 15℃, then regulating the auxin signaling via *FaPIF4*. The response to short day length is delayed under higher temperature. In 12℃, the induction of dormancy did not correlate to photoperiod response in strawberry. Low temperature and short photoperiod are the environmental factors in the dormancy induction of strawberry. Temperature is more important than photoperiod in bud dormancy induction of strawberry.

**Key words** *Fragaria* × *ananassa*; bud dormancy; photoperiod; temperature

芽休眠是植物生长发育过程中的一个暂停现象,是一种有益的生物学适应性。芽休眠分类休眠(Para-dormancy)、内休眠(Endo-dormancy)和生态休眠(Eco-dormancy)3种类型<sup>[1]</sup>。而有些多年生植

物如草莓(*Fragaria* × *ananassa*)等芽休眠属于假休眠(Pseudo-dormancy),表现为营养生长和生殖生长均明显减缓而非停止<sup>[2]</sup>。研究假休眠诱导的生理与分子机制,对认识植物对环境的响应有意义。

收稿日期:2015-02-05

基金项目:国家科技支撑计划项目(2011BAD12B02);农业部园艺作物营养与生理重点实验室项目;北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室资助

第一作者:于淑梅,硕士研究生,E-mail:yushumei88@163.com

通讯作者:张新忠,教授,主要从事果树种质资源与分子生物学研究,E-mail:zhangxinzhong999@126.com

温度和日照长短是引起休眠的主要环境影子。有些植物芽休眠受短日照诱导,日照长度是启动这类植物生长或休眠的关键因素<sup>[3]</sup>。在 21~25 °C 条件下,短日照能诱导杨树(*Populus deltoides*)进入内休眠<sup>[4]</sup>。日照是诱导桑树芽进入休眠的主要因子,长日照条件下即使温度降低也不会进入休眠<sup>[5]</sup>。有些植物芽休眠诱导受温度调控。在寒冷地区的某些木本植物如桦树可被低温诱导进入休眠<sup>[6]</sup>。梨树休眠诱导对短日照不敏感,低温才是休眠诱导的主要因子<sup>[7]</sup>。多数植物芽休眠既受温度影响也受光周期调节。低温是诱导苹果进入芽休眠的主要因子<sup>[8]</sup>。在李属植物中,休眠诱导则表现为是日长和温度相互作用的结果<sup>[9]</sup>。之前的研究<sup>[2]</sup>发现温度和日照长度均与草莓芽休眠诱导有关,且温度是主要决定因素:15 °C 是草莓休眠的临界温度,15 °C 短日条件能诱导休眠,而 15 °C 长日条件不能诱导休眠;18 °C 条件下,即使短日条件也不能诱导休眠;12 °C 无论长日还是短日条件均能诱导休眠。但光周期与温度在草莓芽休眠诱导中的互作机制尚不清楚。

植物芽休眠诱导的温度和光周期调控均与光敏色素信号通路有关。至少有 5 个光敏色素(Phytochrome, PHY)基因被分离,它们分别为 *PHYA*、*PHYB*、*PHYC*、*PHYD* 和 *PHYE*<sup>[10]</sup>。*PHYA* 和 *PHYB* 基因表达受温度、光照及生物钟的调节<sup>[11-12]</sup>。短日照条件下拟南芥 *PHYA* 和 *PHYB* mRNA 含量高于长日照<sup>[13]</sup>。但对于紫花苜蓿,*PHYA* 和 *PHYB* mRNA 含量随着日照时间的缩短和温度的降低上升<sup>[14-15]</sup>。短日照诱导葡萄进入内休眠与 *PHYA* 和 *PHYB* 的表达量升高有关<sup>[16]</sup>。

PIFs 属于 basic-loop-helix (bHLH) 转录因子家族的第 15 亚族,PIFs 蛋白能直接与光敏色素结合,参与介导光敏色素信号通路中 *PHYA/B* 信号下游基因的表达调控<sup>[17-18]</sup>。草莓芽休眠诱导过程中伴随着叶片生长素的持续下降<sup>[2]</sup>。PIF4 直接调控生长素生物合成基因 *YUC8* 和 *TAA* 基因的表达,进而调控植物的高温下胚轴伸长反应<sup>[19-21]</sup>。

PIF4 通过直接结合在 *IAA19* 和 *IAA29* 的启动子激活其表达,负调控生长素信号调节途径<sup>[22]</sup>。高温条件下 *SAURs* 基因家族也表现出高表达<sup>[23]</sup>。

基于前人 *PHYs*、PIF4 及生长素信号通路相关基因的研究结果,认为这些基因在诱导芽休眠的过程中可能通过 *PHYs* 响应光温信号,通过 PIF4 调

控生长素的响应参与草莓休眠过程。

为了进一步研究草莓芽休眠诱导过程中温度和光周期响应的互作关系,本试验以草莓 *Albion* 为试材,分别实施 18 °C/8 h、15 °C/16 h、15 °C/8 h 和 12 °C/16 h 处理,以 26 °C/16 h 为对照,检测叶片生长和相关基因表达量,分析光周期调控信号通路基因表达量对光温的响应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于 2013 年和 2014 年 8 月将 *Albion* 草莓匍匐茎苗移栽到 10 cm 花盆中,盆中基质是菜园土:草炭=5:1。缓苗 7 d 后将盆装草莓移入植物光照培养箱,设置 3 个温度(12、15 和 18 °C)和 2 个日长 8 h (Short day, SD) 和 16 h (Long day, LD) 的不同光温组合条件处理,对照为 26 °C/16 h。白天和黑夜的光照强度分别是 200 和 0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,相对湿度是 75%。草莓植株每周浇 1 次营养液,其余时间用自来水浇灌。每个重复 1 株,重复 3 次,于各光温组合处理后 0、1、3、5、7、14、28、42 和 56 d 共 9 个时间点取幼叶约 0.2 g 检测基因表达量;另外各光温处理下各取 6 株草莓苗于幼叶展开后每周测量一次三出复叶的中间小叶叶片长度、宽度及叶柄长,直至叶片长至最大,以分析其动态变化,重复 2 年。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 形态指标的测定

用刻度尺测量草莓三出复叶的叶柄长和中间小叶的叶片的长度,宽度和叶柄长,因为双侧小叶的形状常不规则。

#### 1.2.2 基因表达量的测定

采用改进的 CTAB 法提取植物材料总 RNA<sup>[24]</sup>,用 DNase I (Takara, 大连) 于 37 °C 消化 30 min,以除去 DNA。将提取的 RNA 用微量紫外分光光度计(NANODROP2000, Thermo Scientific)检测消化后的 RNA 浓度以及纯度(OD260/280, OD260/230)。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。取 2  $\mu\text{g}$  RNA,用 M-MLV reverse transcriptase (Takara) 做反转录。用 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) 扩增,反应体系为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环,每个反应重复 3 次。草莓基因序列如下: 根据拟南芥的基因分别为 *AtPHYA* (AT1G09570. 1)、*AtPHYB* (AT2G18790. 1)、

*AtPIF4*(AT2G43010. 1)、*AtYUC8*(AT4G28720. 1)、*AtIAA29*(AT4G32280. 1)、*AtSAUR19*(AT5G18010. 1)、*AtTAA1*(AT1G70560. 1)、*AtARP6*(AT3G33520. 1)和 *AtHSP70*(AT3G12580. 1), 分别用这些基因对草莓基因组 Blast (<http://www.rosaceae.org/node/1>), 分别获得同源性最高的对应草莓基因。用 Premier 5.0 软件设计基因特异引物(表 1), 对照选用 Actin<sup>[25]</sup>。

表 1 实时荧光 PCR 所用基因引物序列  
Table 1 Primers used in Real time quantitative PCR

| 目标基因<br>Target gene | 正向引物(5'-3')<br>Forward primer (5'-3') | 反向引物(5'-3')<br>Reverse primer (5'-3') |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>FaACTIN</i>      | TGGGTTTGCTGGAGATGAT                   | CAGTTAGGAGAACTGGGTGC                  |
| <i>FaPHYA</i>       | TTGCAGGAAGTATTGGTTGCC                 | CTGGAATCCCACCGCCC                     |
| <i>FaPHYB</i>       | CTCCAGCATGACATGTCCCA                  | AATGTCCGATGGCCTCTTCC                  |
| <i>FaPIF4</i>       | ATCAAGGAGGACACGTGCTG                  | TTTGTTGGTGGAGCCACAGT                  |
| <i>FaYUC8</i>       | TCAAGTCCGGTGGCATCAAA                  | TTCTCACGGCGTCACATGAA                  |
| <i>FaIAA29</i>      | CTGACGGCAGCAACAAGAAC                  | CTCCACGACGTAATAGGCGG                  |
| <i>FaSAUR19</i>     | TGTTCCGAAGGGACACATGG                  | AACTCGGAAGCCTCACATGG                  |
| <i>FaARP6</i>       | TTCGTACCGGTCCGTGAATG                  | CGACGGCCAAGTACCTCTTT                  |
| <i>FaHSP70</i>      | AGGATGCAATCGAACAGGCA                  | CTATGCCACCAGCCATGTCA                  |

1.2.3 数据统计分析

首先采用 Excel 2010 软件进行数据的整理计算和作图,用 IBM SPSS Statistics 21 软件的单因素 ANOVA 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 草莓休眠诱导过程中叶生长变化

2.1.1 复叶抽生进程

处理前已出现但尚未展开的叶片(L0)于26℃/16 h 处理后第 7 天展开,18℃/8 h、15℃/16 h 和 15℃/8 h 温光组合 L0 在处理后第 14 天展开,而 12℃/16 h 处理 L0 在处理后第 21 天才展开(图 1)。实施 26℃/16 h 处理后抽生的第 1 片叶(L1)在处理后第 21 天展开,18℃/8 h、15℃/16 h 和 15℃/8 h 温光组合 L1 在处理后第 28 天展开,而 12℃/16 h 处理 L1 在处理后第 35 天才展开(图 1)。26℃/16 h 光温组合处理后抽生的第 2 片叶(L2)展开时间为处理后第 35 天;18℃/8 h 和 15℃/16 h 处理 L2 展开时间为处理后第 42 天;而 15℃/8 h 和 12℃/16 h 处理 L2 展开的时间延迟到处理后第 56 天(图 1)。26℃/16 h 光温组合处理后抽生的第 2 片叶(L3)展开时间为处理后第 49 天;

18℃/8 h 和 15℃/16 h 处理 L3 展开时间为处理后第 56 天;而 15℃/8 h 和 12℃/16 h 处理 L3 展开的时间延迟到处理后第 77 天。以上结果表明无论能否诱导草莓植株假休眠,低温和短日均均使相邻 2 片叶抽生的时间间隔明显延长(图 1)。

2.1.2 叶片长度

26℃/16 h 温光组合条件下处理前已出现但尚未展开的叶片(L0)到处理后第 21 天时叶片长度达到最大值 5.3 cm;其余 4 个光温组合中 L0 叶片长度均至第 28 天达到最大值,但 18℃/8 h 和 15℃/16 h 条件下叶片长度最大值为 5.1 cm,而 15℃/8 h 和 12℃/16 h 条件下 L0 叶片长度最大仅为 4.2 cm,显著低于其他 3 个光温组合(图 1)。26℃/16 h 条件下 L1 叶片长度到第 35 天达到最大值 5.3 cm。18℃/8 h 和 15℃/16 h 条件下 L1 叶片长度到第 42 天达到最大值,分别为 4.3 和 4.7 cm,18℃/8 h 处理叶片长度甚至低于 15℃/16 h 处理。15℃/8 h 和 12℃/16 h 温光组合 L1 叶片长度直至第 49 天才达最大值,分别为 3.5 和 4.0 cm,15℃/8 h 处理的 L1 叶片长度甚至低于 12℃/16 h (图 1)。15℃/16 h 和 18℃/8 h 温光组合条件下 L2 和 L3 叶片长度均明显低于 26℃/16 h,且

18℃/8 h 较 15℃/16 h 处理叶片长度更小。15℃/8 h 和 12℃/16 h 条件下 L2 和 L3 叶片长度显著低于其他 3 个光温组合,叶片长度最大值仅约 3.0 cm 左右(图 1)。综合分析认为,15℃/8 h 和

12℃/16 h 光温组合处理 L2 和 L3 叶片长度显著低于其他光温组合,表现为休眠态,18℃/8 h 和 15℃/16 h 虽未有效诱导休眠,但也抑制叶片长度。

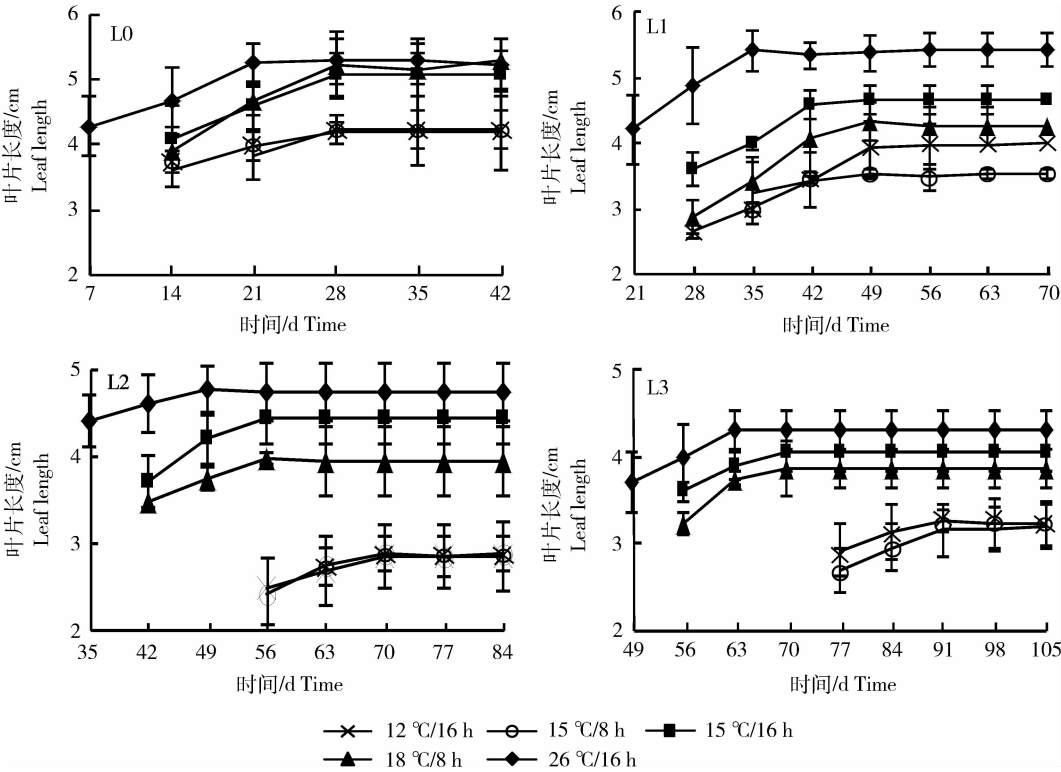


图 1 不同温度和日长下草莓处理前已抽生新叶(L0)、处理后抽生第一片叶(L1)、处理后抽生第二片叶(L2)、处理后抽生第三片叶(L3)叶片长度变化

Fig.1 Dynamic of leaf length of unexpanded emerging leaf when treatment starts (L0)、the first leaf emerged after treatment (L1)、the second leaf emerged after treatment (L2) and the third leaf emerged after treatment (L3) under different temperature and photoperiod regimes

2.1.3 叶片宽度

26℃/16 h 温光组合条件下处理前已出现但未展开的叶片(L0)到处理后第 21 天时叶片宽度达到最大值 4.8 cm;其余 4 个光温组合中 L0 叶片宽度均至第 28 天达到最大值,但 18℃/8 h 和 15℃/16 h 条件下叶片宽度最大值为 4.8 cm,而 15℃/8 h 和 12℃/16 h 条件下 L0 叶片宽度最大仅为 4.3 cm,显著低于其他 3 个光温组合(图 2)。

26℃/16 h 条件下 L1 叶片宽度到第 35 天达到最大值 5.2 cm。18℃/8 h 和 15℃/16 h 条件下 L1 叶片宽度到第 42 天达到最大值,分别为 4.0 和 4.4 cm,18℃/8 h 处理叶片宽度甚至低于 15℃/16 h 处理。15℃/8 h 和 12℃/16 h 温光组合 L1 叶片宽度直至第 49 天才达最大值,分别为 3.4 和

3.7 cm,15℃/8 h 处理的 L1 叶片宽度甚至低于 12℃/16 h(图 2)。

15℃/16 h 和 18℃/8 h 温光组合条件下 L2 叶片宽度均明显低于 26℃/16 h,且 18℃/8 h 较 15℃/16 h 处理叶片宽度稍小;18℃/8 h 温光组合条件下 L3 叶片宽度均明显低于 26℃/16 h 和 15℃/16 h。15℃/8 h 和 12℃/16 h 条件下 L2 和 L3 叶片宽度显著低于其他 3 个光温组合,且 15℃/8 h 较 12℃/16 h 处理叶片宽度更小(图 2)。

综合分析认为,12℃/16 h 和 15℃/8 h 处理条件下,尽管 L0 和 L1 叶片变小,但并非典型休眠态,而处理 56 d 后抽生的 L2 和 L3 方才表现出典型休眠态。相反,15℃/16 h 和 18℃/8 h 处理后 56 d,即使 L2 和 L3 亦未表现休眠态。

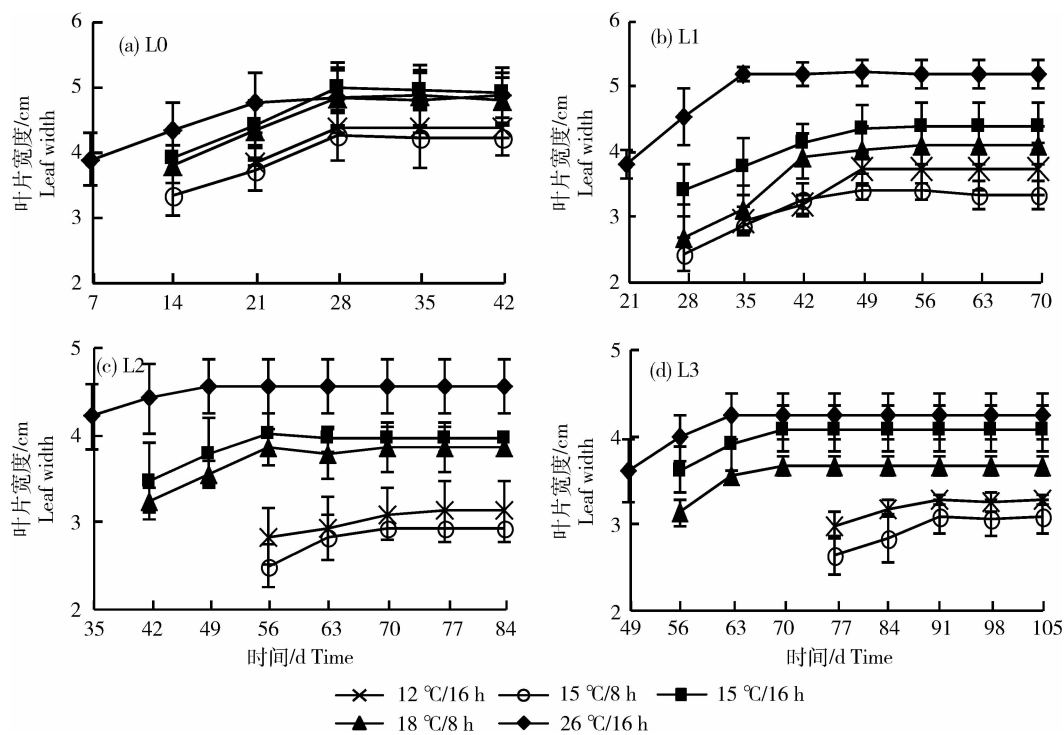


图 2 不同温度和日长下草莓处理前已抽生新叶(L0)、处理后抽生第一片叶(L1)、处理后抽生第二片叶(L2)、处理后抽生第三片叶(L3)叶片宽度变化

Fig. 2 Dynamic of leaf width of unexpanded emerging leaf when treatment starts (L0), the first leaf emerged after treatment (L1), the second leaf emerged after treatment (L2) and the third leaf emerged after treatment (L3) under different temperature and photoperiod regimes

2.1.4 叶柄长

26 °C/16 h 温光组合条件下处理前已出现但尚未展开的叶片(L0)到处理后第 21 天时叶柄长达到最大值 6.6 cm;其余 4 个光温组合中 L0 叶柄长均至第 28 天达到最大值,但 18 °C/8 h 和 15 °C/16 h 条件下叶片叶柄长最大值分别为 6.0 和 4.8 cm,而 15 °C/8 h 和 12 °C/16 h 条件下 L0 叶柄长最大仅分别为 4.2 和 3.3 cm,低于其他 3 个光温组合(图 3)。

26 °C/16 h 条件下 L1 叶柄长到第 35 天达到最大值 6.7 cm。18 °C/8 h 和 15 °C/16 h 条件下 L1 叶柄长到第 42 天达到最大值 4.9 cm。15 °C/8 h 和 12 °C/16 h 温光组合 L1 叶柄长直至第 49 天才达最大值,分别为 3.9 和 3.1 cm(图 3)。

15 °C/16 h 和 18 °C/8 h 温光组合条件下 L2 和 L3 叶柄长均明显低于 26 °C/16 h,且 18 °C/8 h 较 15 °C/16 h 处理叶叶柄长稍小。15 °C/8 h 和 12 °C/16 h 条件下 L2 和 L3 叶柄长显著低于其他 3 个光温组合(图 3)。

综合分析认为,15 °C/8 h 和 12 °C/16 h 光温组

合处理 L2 和 L3 叶叶柄长显著低于其他光温组合,表现为休眠态,18 °C/8 h 和 15 °C/16 h 虽未有效诱导休眠,但也抑制叶柄长度。

2.2 草莓休眠诱导过程中幼叶基因表达变化

与处理前相比,实施处理后基因转录水平均显著降低。*FaPHYA*、*FaPHYB*、*FaPIF4*、*FaSAUR19* 和 *FaHSP70* 基因表达水平降低到处理前的 0.2 倍以上,*FaYUC8*、*FaIAA29* 和 *FaARP6* 甚至降低到处理前的 0.01 倍以上。

*FaPHYA* 和 *FaPHYB*:16 h 长日照条件下,无论 15 °C 和 12 °C,处理 1~8 周, *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 的表达量均未见显著的规律性变化。相反,15 °C/8 h 处理后, *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 相对表达量分别在 5 和 1 d 开始逐渐升高,直至 8 周,表达水平显著高于 15 °C/16 h 和 12 °C/16 h 处理。18 °C/8 h 条件下, *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 相对表达量均在 4 周显著升高,直至试验结束,其表达水平接近甚至相当于 15 °C/8 h 处理(图 4)。以上结果表明 *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 均在短日条件下加强表达,较高温度条件下对日长的响应延迟。

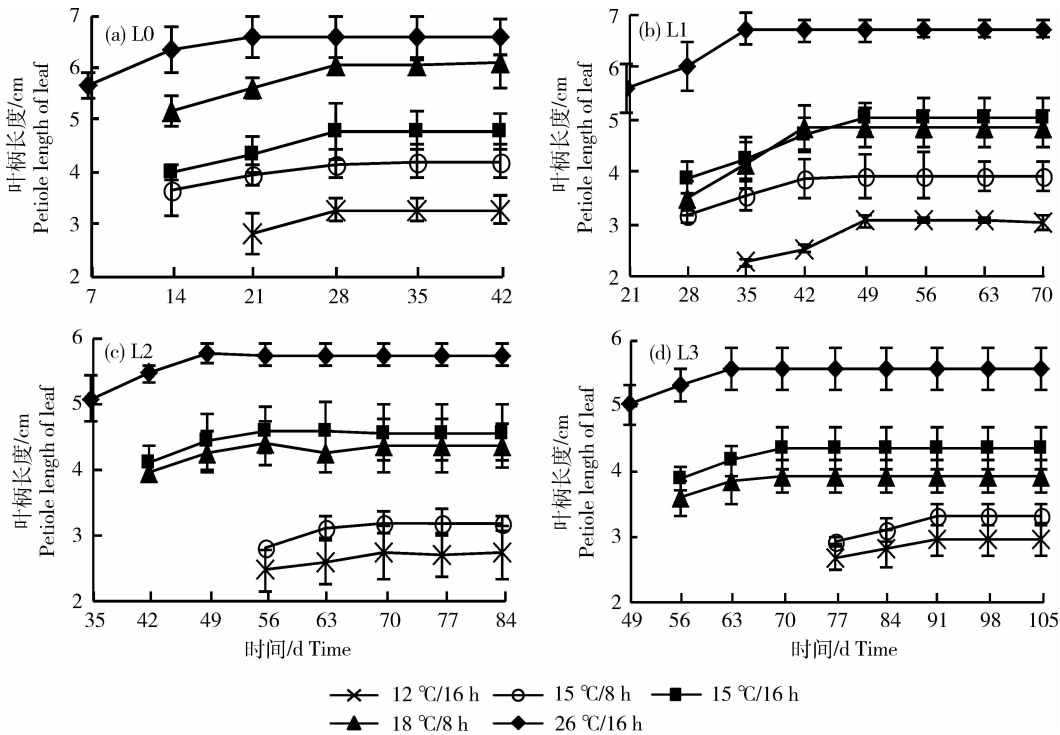


图 3 不同温度和日长下草莓处理前已抽生新叶(L0)、处理后抽生第一片叶(L1)、处理后抽生第二片叶(L2)、处理后抽生第三片叶(L3)叶片叶柄长度变化

Fig. 3 The dynamic of petiole length of unexpanded emerging leaf when treatment starts(L0)、the first leaf emerged after treatment(L1)、the second leaf emerged after treatment(L2) and the third leaf emerged after treatment(L3) under different temperature and photoperiod regimes

*FaPIF4*: 在 15 °C 的较低温度下 *FaPIF4* 基因相对表达量受短日诱导, 18 °C 条件下不响应日长。15 °C/8 h 条件下, *FaPIF4* 相对表达量从 14 d 开始升高, 且于 14 和 28 d 时表达量最高。而其他 3 个处理条件下, *FaPIF4* 的表达量未见显著的规律性变化(图 4)。

*FaYUC8*: *FaYUC8* 基因相对表达量在 15 °C 的较低温度下受短日诱导, 18 °C 条件下不响应日长。15 °C/8 h 条件下, *FaYUC8* 相对表达量从 14~56 d 开始迅速升高, 且 14 和 28 d 时表达量最高。而其他 3 个处理条件下, *FaYUC8* 的表达量未见显著的规律性变化(图 4)。

*FaIAA29*: 在 15 °C 较低温度下 *FaIAA29* 基因相对表达量受短日诱导, 18 °C 条件下不响应日长。15 °C/8 h 条件下, *FaIAA29* 的表达量从 1 d 开始逐渐升高。其他 3 个处理条件下, *FaIAA29* 的表达量未见显著的规律性变化(图 4)。

*FaSAUR19*: *FaSAUR19* 的基因表达未见与休

眠诱导一致规律。15 °C/8 h 条件下, *FaSAUR19* 的表达量从 5 d 开始逐渐升高, 56 d 时最高。15 °C/16 h 和 18 °C/8 h 条件下, *FaSAUR19* 的表达量从 28 d 开始显著升高, 56 d 时达到最高。而 12 °C/16 h 条件下, *FaSAUR19* 的表达量一直很低(图 4)。

*FaARP6*: 4 个温光组合处理后 *FaARP6* 表达急剧下降至处理前的 0.01 倍以上, 且随着处理时间的进行, 各个温光组合 *FaARP6* 表达量没有太大变化(图 4)。认为 *FaARP6* 表达量的变化与休眠诱导不相关。

*FaHSP70*: 15 °C/8 h 和 15 °C/16 h 处理, 自处理后第 5 天, *FaHSP70* 表达量始终高于其他温度, 15 °C 处理后长期日照进一步加强 *FaHSP70* 表达水平。15 °C 条件下, 无论是短日照还是长日照, *FaHSP70* 相对表达量从 3 d 开始, 急剧升高。认为 *FaHSP70* 表达量的变化与休眠诱导不相关(图 4)。

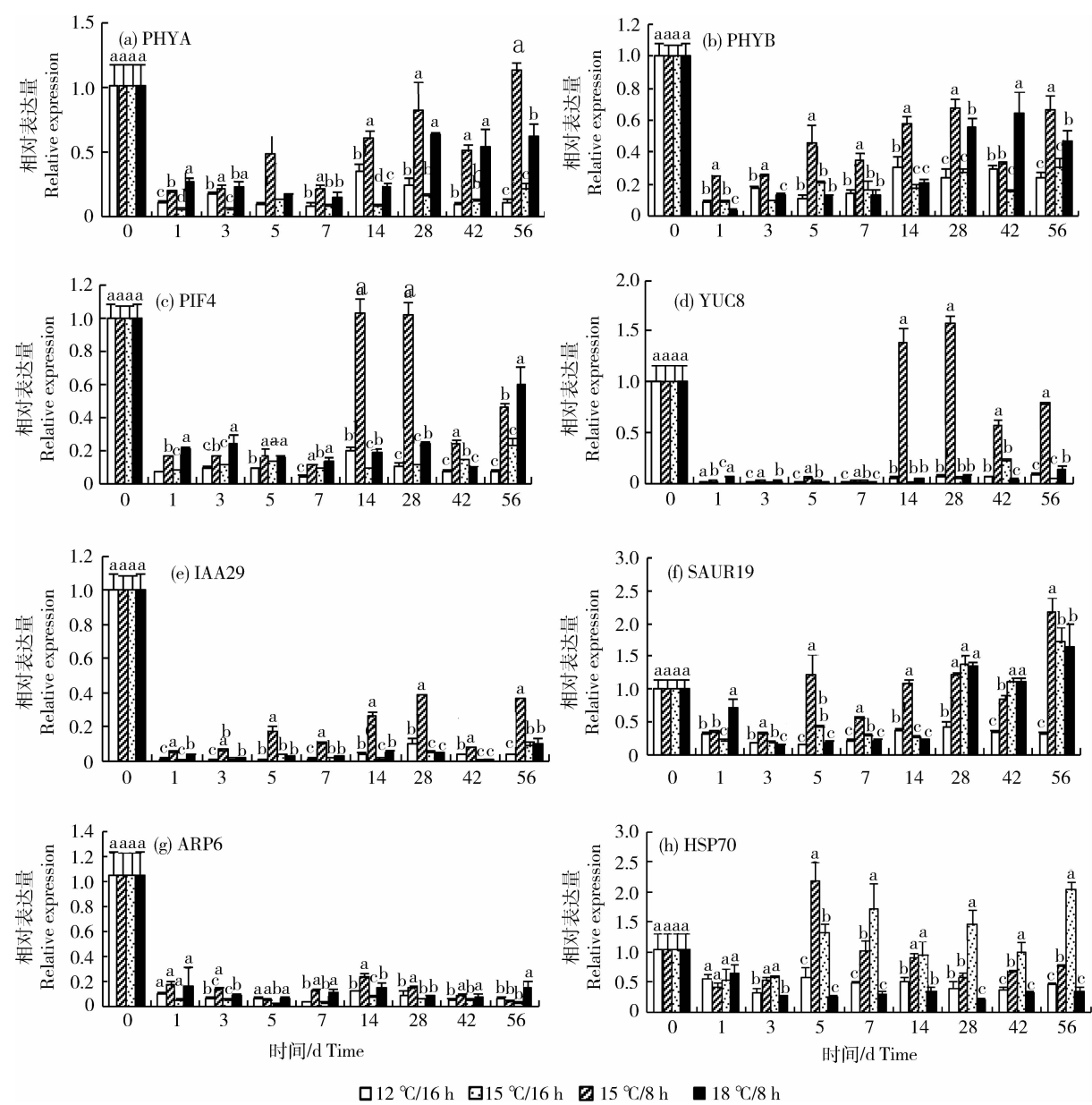


图 4 不同温度和日长下 *FaPHYA*、*FaPHYB*、*FaPIF4*、*FaYUC8*、*FaIAA29*、*FaSAUR19*、*FaARP6* 和 *FaHSP70* 基因在新展开叶片中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *FaPHYA*、*FaPHYB*、*FaPIF4*、*FaYUC8*、*FaIAA29*、*FaSAUR19*、*FaARP6* and *FaHSP70* in new unfold leaves of strawberry under different temperature and photoperiod regimes

3 讨论

低温短日抑制生长,15 °C/8 h 或 12 °C 能够诱导休眠。无论是否诱导休眠,低温短日处理均使草莓复叶抽生进程减缓,叶片变小,叶柄变短。表明早春温度每升高或降低 0.45 °C,苹果盛花期平均提前或延迟 1.6 d<sup>[26]</sup>。15 °C/8 h 或 12 °C 处理自 L2 开始叶柄长和叶片纵宽度显著降低,表现为休眠态。

进一步证明之前报道<sup>[2]</sup>,在 15 °C 下,短日条件能诱导草莓进入休眠,长日条件则不能诱导草莓进入休眠状态,即 15 °C 是诱导草莓休眠的临界温度。12 °C 即使长日照条件也能诱导草莓进入休眠状态,18 °C 时,即使在短日条件下,也不能诱导草莓进入休眠。在光周期诱导草莓休眠过程中可能存在温度“Gating”的现象<sup>[27]</sup>。

临界温度下 *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 表达受短

日照诱导,通过 *FaPIF4* 调控 IAA 响应,较高温度下植株对日长的响应延迟。15 °C/8 h 处理 *FaPHYA* 和 *FaPHYB* 表达量从 5 d 开始逐渐增加;随后 *FaPIF4*、*FaYUC8* 和 *FaIAA29* 表达量从 14 d 激增。而 18 °C/8 h 条件下,*FaPHYA* 和 *FaPHYB* 的表达水平的响应则从 4 周开始,*FaPIF4* 响应则延迟至 8 周。短日照条件下拟南芥、紫花苜蓿等 *PHYA* 和 *PHYB* 的 mRNA 表达量高于长日照<sup>[13,15]</sup>。而短日照诱导葡萄休眠与 *PHYA* 和 *PHYB* 表达量升高有关<sup>[16]</sup>。*FaSAUR19* 对不同光温组合的响应与 *FaPHYA*、*FaPHYB* 以及 *FaPIF4* 不一致,除 12 °C/16 h 外,其他光温组合处理 4~8 周均可诱导 *FaSAUR19* 表达量升高,说明与休眠诱导不相关。自然休眠的苜蓿,随着温度降低和光周期缩短,*PHYA* 和 *PHYB* 的 mRNA 含量升高<sup>[14]</sup>。因此 15 °C/8 h 条件下,*FaPHYA* 和 *FaPHYB* 高表达可能是诱导草莓休眠过程中的关键基因,*PHYA* 和 *PHYB* 可能参与了温度与光周期对草莓休眠的调控。*PHYB* 能直接调控 *PIF4*,而且 *PIF4* 是受生物钟调控的,短日条件下 *PIF4* 的表达高于长日照条件<sup>[28-29]</sup>; *PIF4* 通过调控生长素合成基因 *YUC8* 的表达,调控生长素响应<sup>[30]</sup>。通过 *FaPIF4* 调控的 IAA 响应。*IAA29* 也能参与光周期调控植物生长发育,有一些充足的证据证明光周期和生长素信号通路存在着交叉点<sup>[28,31-32]</sup>。

相反,12 °C 条件下草莓植株休眠诱导则不再依赖日长。12 °C/16 h 条件下能够诱导草莓植株假休眠,但 *FaPHYA*、*FaPHYB*、*FaPIF4* 以及 IAA 响应因子均未见显著变化,说明此条件下诱导休眠与光周期反应不相关。Dormancy Associated MADS-box(DAM)基因与多年生植物休眠诱导关系密切<sup>[33-34]</sup>。低温诱导桃树芽休眠过程中 *DAM5*/*DAM6* 的表达受抑制,但短日不仅不能抑制,反而诱导 *DAM5*/*DAM6* 表达<sup>[35-36]</sup>。拟南芥上研究认为含有 H2A.Z 的核小体是温度的准确感应子<sup>[32]</sup>。但是,本研究检测了与 H2A.Z 温度感应相关的 *FaARP6* 基因表达量,并未检测到显著的规律性变化,可能草莓 H2A.Z 对温度的响应不依赖 *FaARP6* 的转录调控。*HSP70* (At3g12580) 与 H2A.Z 对温度的响应有关<sup>[37]</sup>。本研究结果发现,15 °C 条件下,无论能否诱导休眠 *FaHSP70* 表达量均较高,说明 *FaHSP70* 转录水平对温度的响应与草莓芽休眠诱导不相关。

实施不同温光组合后 1 d 样品中所有基因表达均出现明显下调,系由于植物材料从 26 °C 移入 12~18 °C 环境,造成 8~14 °C 温差,导致基因表达量的全面显著下调。29 °C 条件下拟南芥 *AtPIF4* 和 *AtYUC8* 表达显著高于 22 °C<sup>[21]</sup>。拟南芥植株在短日照条件下,27~12 °C, *AtPIF4* 基因的表达显著下调<sup>[38]</sup>。同样,28 °C 条件下,拟南芥 *AtSAUR19* 的表达量显著高于 20 °C<sup>[23]</sup>,12~27 °C, *AtHSP70* mRNA 水平则迅速上升<sup>[23]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Lang G A, Early J D, Martin G C, et al. Endormancy, paradormancy and ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research[J]. Hortscience, 1987, 22: 371-377
- [2] Zhang L, Wang Y, Zhang X Z, et al. Dynamics of phytohormone and DNA methylation patterns changes during dormancy induction in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) [J]. Plant Cell Rep, 2012, 31: 155-165
- [3] 江泽平. 温带木本植物芽休眠的解除与温度[J]. 林业科学, 1995, 31(2): 200-205
- [4] Jian L C, Li P H, Sun L H, et al. Alterations in ultrastructure and subcellular location of Ca<sup>2+</sup> in poplar apical bud cells during the induction of dormancy[J]. J Exp Bot, 1997, 48: 1195-1207
- [5] 简令成, 卢存福, 邓江明, 等. 木本植物休眠的诱导因子及其细胞 Ca<sup>2+</sup> 内水平的调节作用[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(1): 1-6
- [6] Junttila O, Nilsen J, Igeland B. Effect of temperature on the induction of bud dormancy in ecotypes of *Betula pubescens* and *Betula pendula* [J]. Scand J Forest Res, 2003, 18: 208-217
- [7] Heide O M, Prettrud K. Low temperature, but not photoperiod, controls growth cession and dormancy induction and release in apple and pear[J]. Tree Physiol, 2005, 25: 109-114
- [8] 束怀瑞. 苹果学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 245-249
- [9] Heide O M. Interaction of photoperiod and temperature in the control of growth and dormancy of *Prunus* species [J]. Sci Hort, 2008, 115: 309-314
- [10] Bradshaw H D, Frewen B E, Chen T H H, et al. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus* [J]. Genetics, 2000, 154(2): 837-845
- [11] Bognar L K, Hall A, Adam E, et al. The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 1999, 96(25): 14652-14657
- [12] Hall A, Kozma B L, Toth R, et al. Conditional circadian regulation of phytochrome a gene expression [J]. Journal of

- Plant Physiology, 2001, 127(4):1808-1818
- [13] Gottman K, Schafer E. Analysis of phytochrome kinetics in light-grown *Avena sativa* L seedlings[J]. Planta, 1983, 157(5):392-400
- [14] 杜红旗, 梁明根, 樊文娜, 等. 自然环境下不同秋眠型苜蓿 PHYA 和 PHyb mRNA 表达量的变化[J]. 北京: 草地学报, 2014, 22(3):572-578
- [15] 倪俊霞. 光温调控下紫花苜蓿 PHYA/B 的表达及其植物激素含量的测定分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011
- [16] Kuhn N, Ormeno N J, Jaque Z G, et al. Photoperiod modifies the diurnal expression profile of VvPHYA and VvPHyb transcripts in field-grown grapevine leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(15):1172-1180
- [17] Gabrela T O, Enamul H, Peter H. Quail. The *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factor family [J]. Plant Cell, 2003, 15(8):1749-1770
- [18] Castillon A, Shen H, Huq E. Phytochrome-interacting factors: Central players in phytochrome-mediated light signaling networks[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(11):514-521
- [19] Franklin K A, Lee S H, Patel D, et al. Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(50):20231-20235
- [20] Koini M A, Alvey L, Allen T, et al. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4[J]. Curr Biol, 2009, 19(5):408-413
- [21] Sun J Q, Qi L L, Li Y N, et al. PIF4-Mediated Activation of YUCCA8 Expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth[J]. Plos Genetics, 2012, 8(3):e1002594
- [22] Sun J Q, Qi L L, Li Y N, et al. PIF4 and PIF5 transcription factor link blue light and auxin to regulate the phototropic response in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(6):2102-2114
- [23] Keara A, F, Sang H L, et al. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature[J]. PNAS, 2011, 108(50):20231-20235
- [24] 张玉刚, 成建红, 韩振海, 等. 小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD-PCR 扩增[J]. 生物技术通报, 2005(4):50-53
- [25] Mehli L, Schaart J G, Kjellsen T D, et al. A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry[J]. New Phytol, 2004, 163(1):99-110
- [26] Stefan G, Alessandro C. Advance of apple and pear tree full bloom dates in climate change in the southwestern Cape, South Africa, 1973—2009[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2011, 151(2011):406-413
- [27] Halliday K J, Salter M G, Thingnaes E, et al. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT[J]. The Plant Journal, 2003, 33:875-885
- [28] Atsushi K, Takafumi Y, Norihito N, et al. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 and 5 (PIF4 and PIF5) activate the homeobox ATHB2 and auxin-inducible IAA29 genes in the coincidence mechanism underlying photoperiodic control of plant growth of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(8):1315-1329
- [29] Yuji N, Saori K, Miki M, et al. Circadian clock and PIF4-mediated external coincidence mechanism coordinately integrates both of the cues from seasonal changes in photoperiod and temperature to regulate plant growth in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(2):e22863
- [30] Kazunari N, Stacey L H, Julin N M. Genomic analysis of circadian clock-, light- and growth-correlated genes reveals PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR5 as a modulator of auxin signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2011, 156:357-372
- [31] Alabadi D, Blázquez M A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth[J]. Plant Mol Biol, 2009, 69:409-417
- [32] Robertson F C, Skeffington A W, Gardner M J, et al. Interactions between circadian and hormonal signalling in plants[J]. Plant Mol Biol, 2009, 69:419-427
- [33] Ruttink T, Arend M, Morreel K, et al. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar[J]. The Plant Cell, 2007, 19:2370-2390
- [34] Mazzitelli L, Hancock R D, Haupt S, et al. Coordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L) buds[J]. J of Exp Bot, 2007, 58:1035-1045
- [35] Jiménez S, Reighard G L, Bielenberg D G. Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate[J]. Plant Mol Biol, 2010, 73:157-167
- [36] Li Z, Reighard G L, Abbott A G, et al. Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns[J]. J Exp Bot, 2009, 60:3521-3530
- [37] Kumar S V, Wigge P A. H2A Z-Containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2010, 140(1):136-147
- [38] Kumar V, Lucyshyn D, Jaeger K E, et al. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering[J]. Nature, 2012, 484:242-246