果 树 学 报 2021,38(3):325-334
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20200177

外源脱落酸抑制蓝莓早花及相关基因表达特性研究

安 爽[1],高玉迪[1],麦迪努尔•玉苏普[1],潘益娜[1],邵 婉[1],
宗 宇[1,2],陈文荣[1,2],杨 莉[1,2],郭卫东[1,2],李永强[1,2*]

([1]浙江师范大学化学与生命科学学院,浙江金华 321004;[2]浙江省特色经济植物生物技术研究重点实验室,浙江金华 321004)

摘 要:【目的】为抑制蓝莓暖冬早花,对南高丛蓝莓品种‘Emerald’进行外源脱落酸处理,了解脱落酸对蓝莓花芽内休眠及相关基因表达的影响。**【方法】**通过统计冬季低温积累量,以萌芽率为指标,确定蓝莓南高丛品种‘Emerald’花芽的不同休眠状态和打破休眠的需冷量;以不同休眠状态下的花芽为试验材料,通过外源施用不同浓度的ABA(50、100、150 μmol·L^{-1})及ABA处理后给予不同的冷量,探究外源ABA及低温对蓝莓花芽内休眠促进及解除的影响。利用实时荧光定量PCR技术,探究外源ABA和低温处理对蓝莓花芽休眠相关基因表达的影响。**【结果】**打破蓝莓花芽内休眠时间为2019年12月4—11日,此后花芽萌芽能力强,进入生态休眠阶段。外源ABA处理具有促进花芽内休眠作用,在进入生态休眠之前外源施用ABA能显著抑制花芽萌发,8 d以上冷处理能抵消外源ABA对萌芽的抑制,并显著提高开花的整齐度,而在生态休眠阶段外源施用ABA,抑制效果不显著。花芽休眠相关基因中*VcNCED3*、*VcPYL1*的表达量在ABA处理后显著上调,随低温打破休眠显著下调。*VcPYL2*、*VcCBF*、*VcGA20OX-1*、*VcFT*的表达规律与其相反,说明其参与蓝莓花芽内休眠解除调控。**【结论】**生态休眠之前外源施用ABA能够调控相关基因的表达,加深蓝莓内休眠并抑制蓝莓早花。

关键词:蓝莓;休眠;早花;ABA;基因表达

中图分类号:S663.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2021)03-0325-10

Research on application exogenous abscisic acid in inhibiting early flowering and associated genes expression characteristics in blueberry

AN Shuang[1], GAO Yudi[1], Maidinuer · Yusupu[1], PAN Yina[1], SHAO Wan[1], ZONG Yu[1,2], CHEN Wenrong[1,2], YANG Li[1,2], GUO Weidong[1,2], LI Yongqiang[1,2*]

(*[1]College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China; [2]Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Specialty Economic Plants, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China*)

Abstract:【Objective】The study aimed at investigating the effect of abscisic acid on flower bud dormancy and related genes expression in blueberry (*Vaccinium* spp.).【Methods】 The chilling accumulation of blueberry in winter was calculated using the Utah model in Jinhua. Annual branches of 20 cm length with flower buds of Southern highbush blueberry cultivar ‘Emerald’ were collected at the blueberry base for the study of sprouting rate estimation, hormone treatment, and cold treatment following hormone treatment. The branches with flower buds were randomly divided into three replicates. Sprouting rate was used as an indicator to determine dormant states of the flower buds and chilling requirement for breaking dormancy. ‘Emerald’ blueberry branches with flower buds were sampled on November 20, 2019, December 11, 2019 and January 8, 2020. Flower buds in different dormancy states were used as experimental materials which were treated with exogenous ABA (50, 100, 150 μmol · L^{-1}) and different chilling times following ABA treatment. We aimed at investigating the effects of ABA and chilling time on dormancy promotion or release on blueberry floral buds. The qRT-PCR was employed to explore the expression of dormancy related genes in blueberry flower buds with treatments of exoge-

收稿日期:2020-05-12 接受日期:2020-10-22
基金项目:浙江省公益技术项目(LGN21C150011);浙江省重点研发项目(2018C02007);浙江省重点实验室开放课题(ZX201907)
作者简介:安爽,女,在读硕士研究生,研究方向:果树分子生物学。Tel:17857971297,E-mail:599068905@qq.com
*通信作者 Author for correspondence. Tel:15888980578,E-mail:lyq@zjnu.cn

nous ABA and different chilling times. The total RNA of ‘Emerald’ flower buds was extracted by modified CTAB method. Reverse transcription of the total RNA into cDNA was performed by HiScript Ⅲ RT reagent Kit. Eight genes, *VcNCED3*, *VcPYL1*, *VcPYL2*, *VcSVP*, *VcCBF*, *VcICE*, *VcGA20OX-1* and *VcFT* were filtered from differently expressed genes of a transcriptome profile of flower bud dormancy-release. The specific primers of those genes in blueberry were designed by Primer 5.0 software. The two-steps qRT-PCR was performed with four biological replications per sample using a 2×Sybr Green qPCR Mix (High ROX) kit in the following system including 2×SybrGreen qPCR Mix of 10 μL, 5 μmol forward primer and reverse primer respectively, cDNA (200 ng·μL^{-1}) 1 μL, ddH_2O 8 μL, composing a 20 μL total volume. The relative expressions of genes were estimated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The significant differences were detected using SPSS Statistics 21 software. The data results were analyzed using single factor analysis of variance, such as LSD, Duncan, etc., and using prism software for plotting.【Results】The endo-dormancy of flower buds was broken on between December 4 and December 11 in 2019. The sprouting rate of flower buds on December 11 in 2019 reached 83.14%, which indicated the endo-dormancy was broken based on an arbitrary release standard of 50%. Chilling requirement of ‘Emerald’ was 177.33 C·U. After that point, flower buds of blueberry had strong sprouting potential and high germination rate before entering eco-dormancy phase. Accordingly, we defined an endo-dormancy state, endo-dormancy release state and eco-dormancy state for blueberry variety ‘Emerald’ flower buds on Nov. 20, Dec. 2019 and Jan. 8, 2020. Exogenous application of ABA treatment before eco-dormancy state could significantly inhibit sprouting of flower bud and promote flower bud into endo-dormancy. The germination rates of flower buds gradually decreased with the increase of ABA concentration. The exogenous application of 150 μmol·L^{-1} ABA during the endodormancy state could significantly inhibit the germination of flower buds. The results showed that with the increase of 4 ℃ cold treatment time, the germination rate of flower buds increased significantly, the accumulation of 8 days low temperature could counteract the inhibition of ABA on germination. At the same time, cold treatment could also promote the uniformity of flowering. According to the Utah model, chilling accumulation at 4 ℃ for 4, 8 and 12 days is equivalent to 96, 192, 288 C·U which could achieved in the field. However, no inhibitory effect was found when exogenous application of ABA was done in ecodormancy state. The expression level of the *VcNCED3* in dormancy flower buds was significantly up-regulated after ABA treatment, and the expression level of the *VcNCED3* was promoted by 3.67 fold. It was significantly down-regulated with low temperature breaking dormancy, the expression reached 0.15 when treated at 4 ℃ for 8 days. The expression profile of the *VcPYL1* showed similar pattern with the *VcNCED3*. By contrast, the genes *VcPYL2*, *VcCBF*, *VcGA20OX-1* and *VcFT* were down-regulated with exogenous ABA treatment probably due to promoting flower buds into dormancy and being up-regulated by low temperature to break dormancy. Our results suggested that the genes might be involved in the regulation of blueberry flower bud dormancy.【Conclusion】The exogenous application of ABA could promote blueberry flower buds into deep endo-dormancy state through regulating the expression of flower buds dormancy related genes and inhibit blueberry early flowering.

Key words: Blueberry; Dormancy; Early flowering; Abscisic acid; Gene expression

休眠是多年生木本植物进行下一个生长周期所必须经历的阶段，也是植物为度过冬季严寒的适应性进化。根据影响休眠因素的不同，可以将芽休眠划分为类休眠、内休眠和生态休眠3种类型[1-2]。广义上的休眠是指类休眠、内休眠和生态休眠等的总称，而狭义的休眠是指内休眠[3]。解除芽内休眠所需的有效低温时数称为果树的需冷量（chilling requirement）。经过一定的低温冷量打破内休眠，才

能恢复萌芽的能力。如果冷量不足，则表现萌芽晚或萌芽不整齐，严重影响品质及产量。果树的需冷量具有遗传性，物种间和物种内需冷量的不同是由植物对原生地自然环境的适应所导致的。

脱落酸（abscisic acid，ABA）是植物的一种内源激素，通过一系列的信号转导途径来调控植物的各项生长发育[4]。目前普遍认为，ABA能够促进多年生植物形成休眠芽，并且延迟芽的萌发。进入秋季至初冬后，草莓内源ABA含量开始积累至高峰后下降，解除休眠后，ABA含量降至最低，不同草莓品种的ABA含量与休眠进程密切相关[5]。Tuan等[6]的研究发现，在‘幸水’梨中ABA含量随着内休眠过渡到生态休眠而变化，由高到低。前人研究表明，葡萄外源施用ABA能够有效地延迟冬季芽的萌发，随着休眠的解除，ABA含量下降，抑制芽休眠的能力也由强变弱[7]。木本植物低温解除休眠的分子机制一直是研究的热点，如在桃树中敲除*DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX*（*DAM*）基因会出现常绿性状，不会进入休眠[8]。杨树转录因子*SVL*属于*DAM*的同源基因，受到ABA调控，经验证其下游靶基因是*TCP18*（*BRC1*），在对拟南芥的研究中发现，*BRC1*可以促进*HB21*、*HB40*、*HB53*的转录，共同促进*NCED3*的表达[9]。因此，在内休眠进程中，ABA加深休眠并激活*SVL*的表达，同时SVL间接激活*NCED3*的表达，进而加快ABA生物合成[10-11]。Zheng等[12]的研究表明，葡萄*VvCYP707A4*超表达后，会导致ABA含量下降，并显著提高芽的萌发。低温积累解除芽内休眠，同时ABA含量降低，其本质原因是ABA代谢基因*CYP707A*上调，而ABA生物合成的基因*NCED*表达下调[7,13]。

蓝莓（*Vaccinium* spp.）又名越橘，属杜鹃花科（Ericaceae）越橘属（*Vaccinium*）木本植物，果肉细腻，富含花青素，具有抗氧化、提高免疫力、增强心肺功能等作用，被誉为“浆果之王”，具有较高的营养价值和经济价值。蓝莓中的高需冷量品种（如‘钱德勒’‘蓝丰’等）果实硬脆，但在浙江省及以南地区由于不能完全满足其对需冷量的要求，因此导致品质产量下降；而低需冷量品种因需冷量过早得到满足，随着全球气候变化，暖冬天气频繁，导致其早花进而遭受冻害，不仅消耗了树体养分、导致品质产量下降，而且残花还滋生病原菌，引起病害爆发，这也是影响浙江省多种果树经济效益的关键问题之一。众多研究发现，ABA在植物芽休眠过程中起到重要的调控作用，外源脱落酸也能有效地延迟冬季芽的萌发，但在实际生产中，不同的果树尤其是冬季易早开花的蓝莓品种，在何时施用多少量的ABA仍没有依据，施用ABA后田间的低温积累能否再次解除休眠、外源ABA调控了哪些基因的表达导致内休眠的维持也仍不清楚。因此，笔者在蓝莓花芽的不同休眠阶段，外源施用不同浓度的ABA，通过统计萌芽率筛选出适宜的施用时期和浓度；采用qRT-PCR分析外源ABA及冷处理对蓝莓休眠相关基因的表达影响情况。研究可为农业生产实践中科学合理地使用ABA抑制蓝莓冬季早花提供理论依据，并能探明ABA调控植物花芽休眠的分子机制。

1　材料和方法

1.1　材料

试材为浙江省特色经济植物生物技术研究重点实验室蓝莓基地栽培的3年生蓝莓南高丛品种‘Emerald’，试验用树在试验期间正常管理。自2019年11月20日起每7 d剪取生长势较为一致的1年生‘Emerald’带花芽枝条若干枝，长约20 cm，分别用于萌芽率测定、激素处理、激素加冷处理，试验所用的枝条均随机分为3个重复。

1.2　试验设计

外源ABA处理。将2019年11月20日、12月11日、2020年1月8日采集的‘Emerald’枝条基部置于50、100、150 μmol·L^{-1} ABA中浸泡并涂抹花芽4 d，以清水处理为对照。处理后，将枝条转移至清水中，在光照培养箱内正常培养，培养条件为：温度为昼/夜25/23 ℃，光照时间为昼/夜16/8 h，光照度为320 μmol·m^{-2}·s^{-1}，空气相对湿度为75%。培养14 d后统计萌芽率。培养4、8 d时采集自顶芽下4~5个花芽，液氮速冻后贮存于−80 ℃超低温冰箱，待提取RNA。

外源ABA加冷处理。对2019年12月11日采集的‘Emerald’枝条首先进行外源ABA处理（同上），然后分别进行昼/夜4 ℃处理4、8、12 d；不同时间的冷处理结束后转入光照培养箱正常培养，培养条件同上。培养14 d后统计萌芽率，花芽取样及保存同上。

1.3　测定方法

1.3.1　需冷量统计　使用温度记录仪（ZOGLAB DSR-THUA）连续记录田间温度及湿度的变化，利

用犹他模型统计低温积累量。

1.3.2 萌芽率统计 将每周剪取的枝条剪平基部，放入盛有清水的培养瓶中，并置于光照培养箱中培养。培养条件见1.2。每2 d更换1次清水并剪去枝条基部少许，露出新茬[14]。每2 d观察并统计1次萌芽状况，以花芽出现明显膨大、鳞片松动、露绿较多为萌发标准，统计萌芽率[15]。当花芽最终萌芽率达到50%时，认为是内休眠解除，之后便进入生态休眠阶段[16-17]。

1.3.3 蓝莓休眠相关基因的qRT-PCR分析 (1)蓝莓花芽RNA的提取及反转录。参考余柯达等[18]的CTAB法提取蓝莓花芽RNA，略有改动。反转录采用HiScript Ⅲ RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技有限公司)，按照说明书进行cDNA文库的构建，以反转录后的cDNA作为模板进行qRT-PCR。取样及RNA提取均进行4次生物学重复。

(2)引物合成。根据蓝莓花芽休眠解除转录组数据库中差异表达基因，筛选出8个与花芽休眠相关基因，分别为*NCED3*、*PYL1*、*PYL2*、*SVP*、*CBF*、*ICE*、*GA20OX-1*和*FT*。在越橘属数据库(GDV)中查找完整的基因序列。用软件Primer Premier 5.0设计定量引物(表1)。引物效率用标准曲线法进行检测，效率为80%~120%的引物才被用于后续试验，以蓝莓*GAPDH*作为内参基因。

表1 蓝莓休眠相关基因的定量引物序列

Table 1 qRT-PCR primers sequence for dormancy related genes in blueberry

编号 No.	基因名称 Gene name	上游引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')
1	*VcNCED3*	TCCAAACACAAATCCCTTCTCC	CTCTCCATTGCGTCTAGCG
2	*VcPYL1*	CAACGTCATCTCCGGATTACC	ACGACTTGTAATTCCTCAGCC
3	*VcPYL2*	CCCCTCATTCAAACCTACCAC	TCGATGCGTTGGGTTATGAG
4	*VcSVP*	GGATTGAGCCGTGTGATAGAG	TTCCATCACTTGCTGTCTCAG
5	*VcCBF*	GACGCTAAGGACATTCAGAGG	CTACACCCACTTCATCCACC
6	*VcICE*	TCTTGCTTCACTCAGTTGGG	AAGGAATGGAGGTGGGTTTG
7	*VcGA20OX-1*	GGAGTGAGCAGAGACCATTTC	CCTGGTGAAGTATGGTTAGCG
8	*VcFT*	CCAAGTGACCCCAACCTAAG	CCACCTCATGTCCAAAGCTAG
9	*VcGAPDH*	CGGCTACTTACGAGCAAATCAA	TTCAGTGTAGCCCAAAATTCCTTT

(3)实时荧光定量PCR。定量试剂盒为2×Sybr Green qPCR Mix(High ROX)(北京艾德莱生物科技有限公司)，采用两步法进行qPCR扩增反应。反应体系为20 μL：2×Sybr Green qPCR Mix 10 μL、Forward primer(10 μmol · L^{-1}) 0.5 μL、Reverse primer(10 μmol · L^{-1}) 0.5 μL、cDNA(200 ng · μL^{-1}) 1 μL、ddH_2O 8 μL。反应程序：95 ℃ 2 min；40个循环，95 ℃ 15 s、Tm 30 s和72 ℃ 30 s。采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta CT}$)进行数据分析。

1.3.4 统计分析 试验数据使用SPSS Statistics 21软件进行显著性差异分析，数据结果分别采用LSD、Duncan等单因素方差分析的方法统计分析差异显著性(以$p < 0.05$表示)，使用Prism软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同冷量积累对蓝莓萌芽率的影响

如图1所示，随着田间取样时间的推移，'Emerald'花芽萌芽率总体呈上升趋势，花芽萌发的速率由慢变快，萌芽率在14~16 d后无明显的变化。由图2可知，蓝莓花芽在11月下旬处于深度休眠状态，萌芽能力较低。12月4日采取的花芽萌芽率为

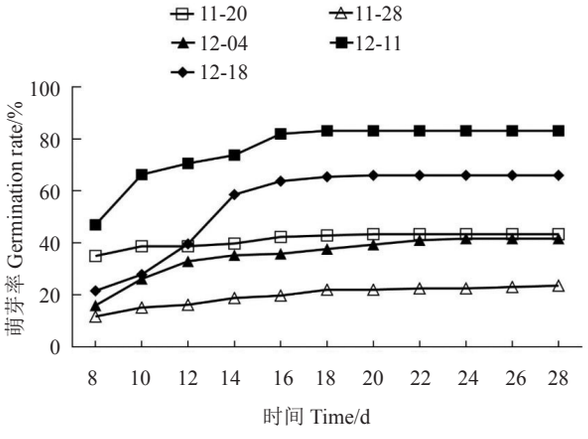
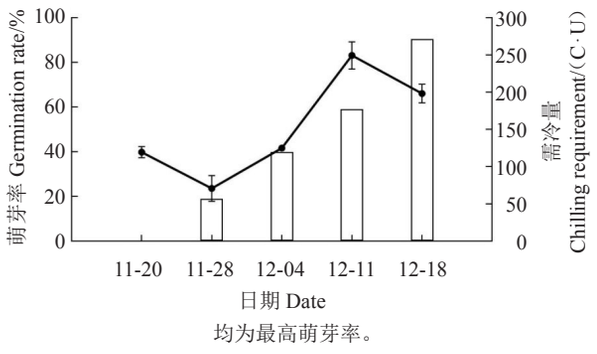


图1 不同取样时期的蓝莓花芽萌芽率

Fig. 1 Germination rates of blueberry flower bud under different sampling period



均为最高萌芽率。

All were the highest germination rates.

图 2　不同冷量积累条件下的蓝莓花芽萌芽率

Fig. 2　Germination rates of blueberry flower bud under different cold accumulation

41.66%，冷量积累为119 C·U，在12月11日萌芽率达83.14%，超过50%，内休眠解除，此时冷量为177.33 C·U。所以确定打破内休眠时间为2019年12月4—11日。

2.2　外源施用ABA对不同休眠状态蓝莓花芽萌芽率的影响

2019年11月20日采集的样品，花芽处于内休眠期，进行ABA处理后，处理组的萌芽率显著低于清水对照。花芽萌芽率随着ABA处理浓度的升高而降低，150 μmol·L^{-1} ABA处理组的花芽萌芽率最低（图3），说明ABA能够加深蓝莓花芽的休眠。2019年12月11日采集的蓝莓花芽处于内休眠解除期，由图4可知，ABA处理组的萌芽率同样显著低于清水对照，ABA处理组的花芽萌芽率较低，不同浓度ABA处理组间萌芽率已无显著性差异。2020年1月8日采集的样品，花芽处于生态休眠阶段，从萌芽率统计来看，清水对照与ABA处理组的花芽萌芽率存在差异，清水对照萌芽率为70.64%，ABA处理

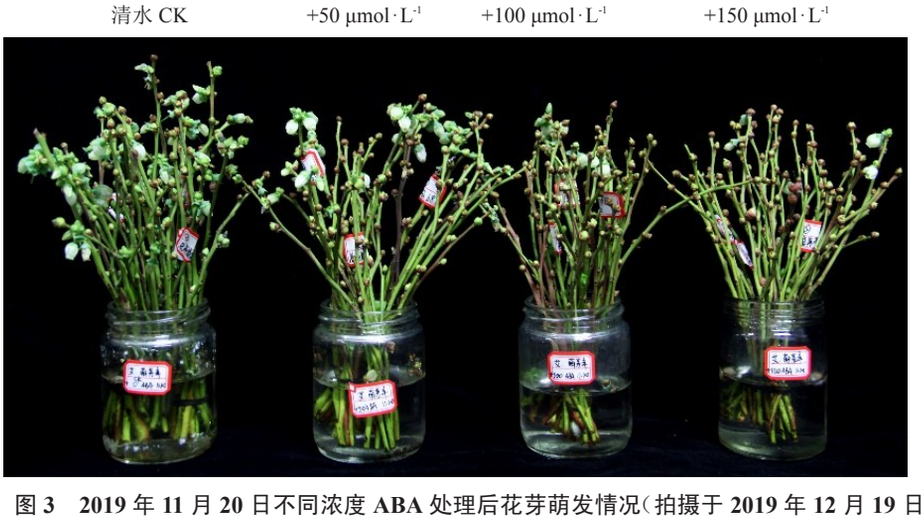


图 3　2019 年 11 月 20 日不同浓度 ABA 处理后花芽萌发情况（拍摄于 2019 年 12 月 19 日）

Fig. 3　Flower bud germination after ABA treatment at different concentrations on November 20，2019 (photo was taken on December 19，2019)

后花芽萌芽率随着ABA浓度的升高而逐渐降低，150 μmol·L^{-1} ABA处理组花芽萌芽率显著低于清水对照，其花芽萌芽率最低，为47.15%。但50、100 μmol·L^{-1} ABA处理后萌芽率均高于60%。

从3个时期外源施用50、100、150 μmol·L^{-1} ABA来看，在内休眠期、内休眠解除期，外源施用ABA后花芽萌芽率显著降低，基本不会超过50%。当花芽进入生态休眠期，此时外源施用ABA抑制效果不明显，当使用150 μmol·L^{-1} ABA处理，萌芽率才能控制在50%以内，萌发的速度也未见减缓。结果说明，在生态休眠期之前外源施用ABA能有效促进花芽休眠，并能显著抑制蓝莓早花，而在生态休眠阶

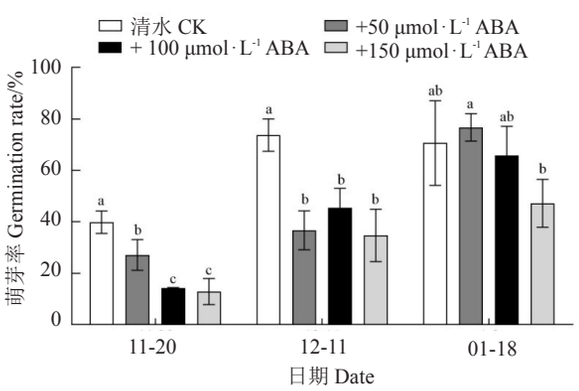


图 4　不同浓度 ABA 处理不同休眠状态花芽的萌芽率

Fig. 4　Germination rates of different dormant flower buds treated with different concentrations of ABA

段外施用外源ABA，抑制效果不明显。

2.3 ABA处理后冷量对解除萌芽抑制作用的影响

在田间实际生产中，外源施用ABA后，花芽休眠加深，因此还要考虑处理后的田间冷量能否打破其休眠状态，保证正常的开花坐果。由图5可知，4 ℃处理4 d，随着外源施用ABA浓度的增加，萌芽率逐渐下降，但是随着4 ℃冷处理时间的加长，外源ABA处理浓度越高，萌芽率也就越高，在4 ℃处理12 d时不仅萌芽率最高，而且萌芽速率也加快。4 ℃处理4、8、12 d相当于犹他模型冷量积累96、192、288 C·U，由表2可知，田间两年冬季低温数据显示，休眠解除之后，田间冷量积累分别为340、460 C·U，完全可以满足外源施用ABA后再次打破花芽休眠所需的冷量。试验数据说明冷量的积累不仅能够抵消外源ABA对于花芽萌发的抑制作用，同时也会改善开花的整齐度。

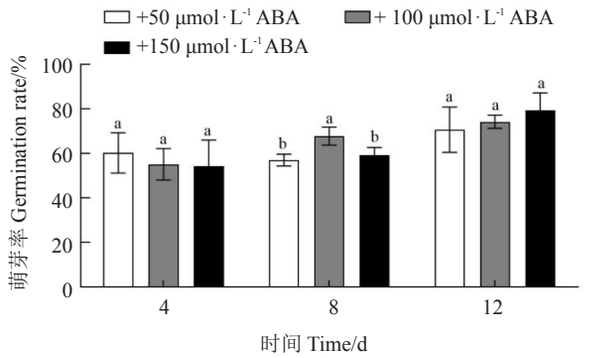


图5 ABA处理并给予不同冷量后的花芽萌芽率

Fig. 5 Flower bud germination rate under different cold treatments after ABA treatment

表2 2018—2020年低温积累量

Table 2 Low temperature accumulation in 2018—2020

日期 Date	低温积累量 Low temperature accumulation/(C·U)
2018-11-20	16.83
2018-12-11	167.83
2019-01-08	628.08
2019-11-20	1.58
2019-12-11	177.33
2020-01-08	519.01

2.4 外源ABA及低温处理对蓝莓花芽休眠相关基因表达的影响

选择2019年12月11日采集的‘Emerald’花芽进行基因表达分析试验。处理及取样点为：处理1为清水对照，常温培养4、8 d，处理2为外源施用150 μmol·L^{-1} ABA后常温培养4、8 d，处理3为外源施用150 μmol·L^{-1} ABA后4 ℃处理4、8 d，采用实时荧光定量PCR检测了蓝莓花芽休眠相关基因表达变化情况，结果如图6所示。

9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶基因（*NCED3*）是ABA合成过程中的关键基因，外源施用ABA 8 d后，蓝莓*VcNCED3*的表达显著上调，表达量为对照的3.67倍；在对ABA处理组进行4 ℃冷处理4、8 d后发现，*VcNCED3*的表达显著下调，由此可知蓝莓*VcNCED3*随着外源施用ABA促进休眠而上调，随着低温打破休眠而下调。GA在解除芽休眠中的作用十分重要，GA20OX为GA代谢途径中的关键氧化酶，是影响GA含量的关键酶，在清水对照中，*VcGA20OX-1*的表达随常温处理显著上调；外源ABA处理后*VcGA20OX-1*的表达量较低，显著低于清水对照，外源ABA及低温处理后表达量略有升高，整体表达趋势与*VcNCED3*相反，试验结果进一步证明ABA与GA在花芽的休眠与萌发中表现出拮抗效应。

PYL作为ABA信号传导途径中的受体蛋白之一，在外源ABA及低温处理下*VcPYL1*和*VcPYL2*之间的表达模式有所不同。清水处理4、8 d后*VcPYL1*和*VcPYL2*的表达较为一致，均显著上调；在外源施用ABA 4 d、8 d后，*VcPYL2*的表达显著下调，而*VcPYL1*表现为先下调后上调，在8 d时表达量达2.86；在ABA及4 ℃低温处理下，*VcPYL1*表现为显著下调，而*VcPYL2*上调。

*CBF*和*ICE*均为植物中响应冷胁迫信号传导途径的重要转录因子。蓝莓*VcCBF*基因在对照处理4、8 d后上调，8 d时表达量达18.60，而*VcICE*的表达无显著性差异；在外源施用ABA后，*VcICE*、*VcCBF*的表达随ABA促进休眠上调，说明外源ABA促进了花芽休眠，ABA信号启动了*VcICE*的表达，进而提高抗寒性。在ABA处理后进行4 ℃冷处理4、8 d发现，*VcCBF*的表达相较于无4 ℃ ABA处理上调，说明*ICE*基因在常温条件下以钝化的形式存在于植物体内，当低温胁迫侵袭植物时被激活，启动*CBF*基因的表达，这与前人的研究结果相符[19]。

SVP（*short vegetative phase*）为MADS-box转录因子家族中的成员，与*DAM*基因是同源基因。具有促进休眠、抑制萌芽的功能，在外源ABA处理4 d后，花芽中*VcSVP*的表达相较于清水对照显著上调；

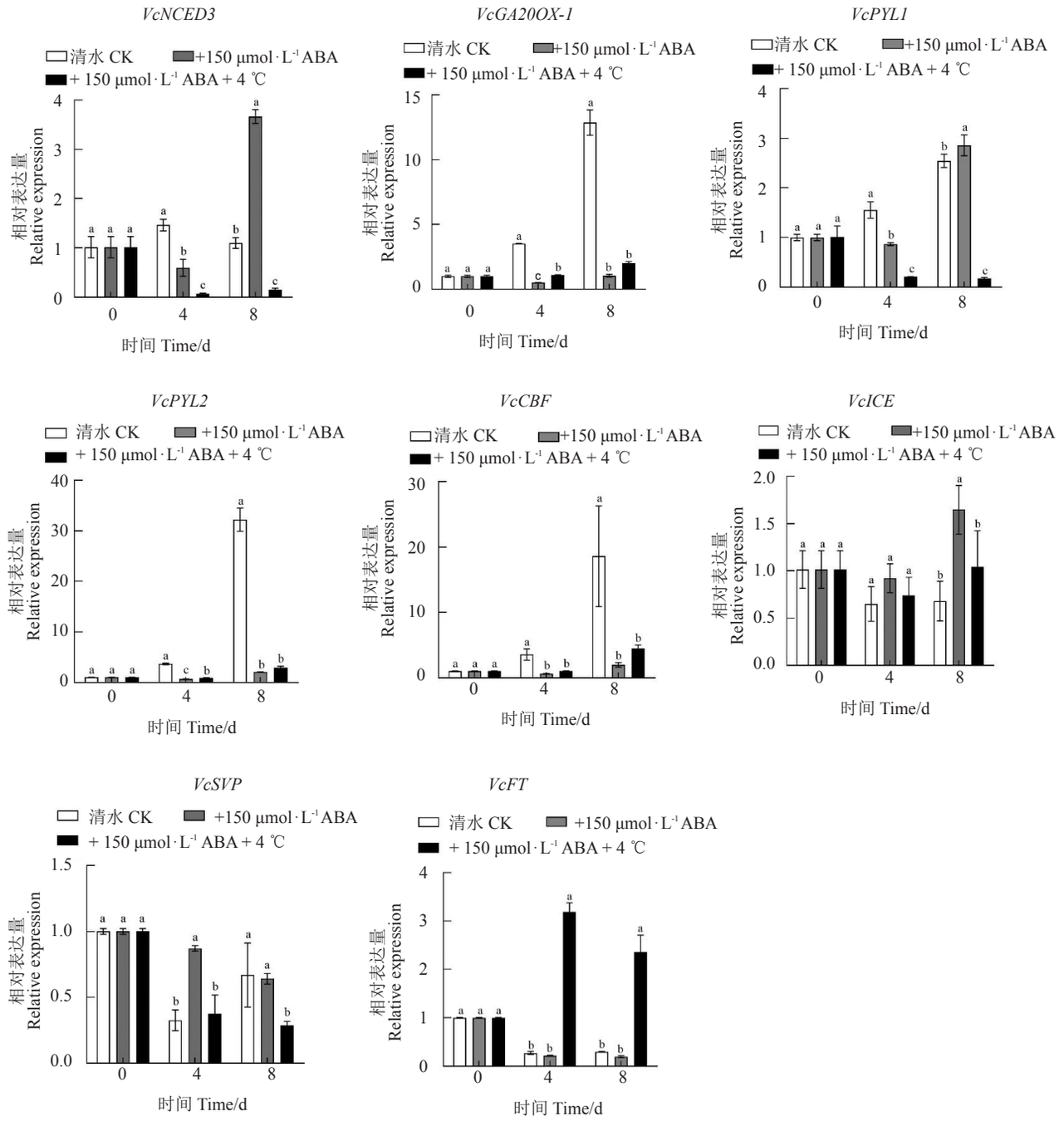


图 6　外源 ABA 及低温处理调控蓝莓花芽休眠相关基因的表达

Fig. 6　Exogenous ABA and low temperature treatment regulates flower bud dormancy-related genes expression in blueberry

在4 ℃冷处理4、8 d时表达量随之下降。结果说明，当芽内接收外源ABA时，*VcSVP*表达上调，当随着低温处理ABA信号减少时，其表达下调。这证明*VcSVP*的表达与ABA含量呈正相关，是控制芽休眠的重要基因。*FT*参与调控植物开花途径，*VcFT*在ABA处理4、8 d表达下调，说明开花的能力受到抑制；在ABA处理基础上进行4 ℃冷处理发现，其表达显著上调，在4 d时表达量升高3倍，说明随着低温处理抵消了外源ABA的影响，使芽具备了开花的能力。

3　讨　论

3.1　冷量积累对蓝莓萌芽率的影响

短日照及低温是促进植物芽进入休眠的重要因素。休眠不是生命活动绝对的停止，只是一种相对现象，是植物生长发育过程中形成的一种对环境条

件和季节性气候变化的生物学适应，对物种的生存和繁衍具有重要的生物学和生态学意义，而且在农业生产上还具有重要的经济意义。在自然状态下，当落叶果树进入内休眠以后，必须有一定的低温积累才能使得其休眠解除，如冷量积累不足，果树的萌芽以及开花将会受到影响。在果树引种栽培中，要根据品种的需冷量选择适宜的种植区，以便为正常开花和坐果提供足够的冷量[20]。本研究统计了金华地区田间冷量及蓝莓花芽萌芽率，结果表明，‘Emerald’花芽打破内休眠的时间为2019年12月4—11日，需冷量为177.33 C·U。此后采取的花芽萌芽率高，且萌发速度快，进入生态休眠阶段。

3.2 外源ABA对蓝莓不同休眠状态花芽萌芽率的影响

南高丛蓝莓品种‘Emerald’的需冷量很低，进入生态休眠的时间较早。随着全球气候变化，暖冬天气频发，持续的温暖天气会解除生态休眠并造成早花，而随后的低温天气会造成减产。ABA作为植物重要的内源激素之一，在种子和芽休眠的诱导和维持过程中起到了重要的作用。种子晚熟期产生的ABA可能是种子休眠和萌发的重要调节因子，其代谢或信号的改变能导致显著的休眠相关表型的发生[21-23]，ABA的缺失以及对ABA信号的干扰会导致休眠的丧失，而抑制ABA的分解代谢则会导致休眠程度的增加[4,24]。本试验结果显示，在生态休眠期之前，外源施用ABA的效果比较理想，50~150 μmol·L^{-1}浓度范围的外源ABA均能促进花芽进入休眠，萌芽率都显著低于对照，并随着ABA浓度的升高而逐渐降低。说明外源ABA能够促进蓝莓花芽内休眠，抑制花芽萌芽。这与前人对苹果[25]外源施用ABA能够促进休眠并阻止休眠解除的研究结果相似，与Zheng等[7]在葡萄中施用高浓度的ABA抑制芽萌发的效果更强的观点一致。笔者发现在生态休眠期外源施用ABA时，已无法将花芽转化内休眠，萌芽率与对照无显著性差异。前人研究表明，芽从内休眠到生态休眠的过程是不可逆的。Yang等[26]在研究中发现，梨内休眠解除后进行ABA处理只能轻微降低花芽萌发率。因此，抑制蓝莓早花必须要在进入生态休眠之前采取措施。

3.3 ABA及低温对花芽休眠及基因表达的影响

本试验对蓝莓花芽外源施用ABA处理后进行冷处理，结果表明，随着外源施用ABA浓度的增加，萌芽率逐渐下降，但随着4 ℃冷处理时间的加长，外源ABA浓度越高萌芽率也越高，说明不同浓度ABA促进芽进入内休眠的程度也不同，而充足冷量的积累不仅能够抵消外源ABA对萌芽的抑制作用，还能改善开花的整齐度。因此在亚热带地区种植需冷量极低的蓝莓品种时，可在内休眠解除前先施用ABA促使花芽统一进入深的内休眠状态，这不仅能避免早花，还能使花期整齐。

Zheng等[7]的研究表明，秋季短日照信号会抑制细胞的增殖和芽的生长，促进顶芽的形成，诱导内休眠，芽内ABA含量升高。对杨树进行3~4周短日照处理后，能诱导产生ABA生物合成调节因子（*NCED3*、*ABA1* 和 *ABA2*）和ABA信号转导因子（*PP2C*、*ABI1*、*AREB3* 等），并使顶芽ABA水平达到峰值[27-29]。试验证明在苹果中超表达*DAMb*和*SVPa*基因使萌芽出现了延迟[30]。在蓝莓花芽外源施用ABA后*VcSVP*的表达显著上调，*VcNCED3*的表达随之上调，并随低温打破休眠下调。GA在芽休眠解除过程中也起到了重要的作用，它除了通过自身的信号途径来调控芽的休眠，还可以和ABA之间通过拮抗来调节芽的休眠。Singh等[31]和Rajesh等[10]对杨树休眠的研究结果表示，ABA促进芽的休眠，并且间接地抑制*GA20OX*的表达，在本试验中，蓝莓*VcGA20OX-1*在外源施用ABA后表达量显著低于对照，导致GA合成途径受阻，花芽萌芽率降低。ABA的信号转导受到多种ABA受体的调控，PYR/PYR-like(PYL)/RCAR为其中之一，在葡萄[32]中报道了8个编码PYR/ PYL/RCAR蛋白的基因，并且已经证明*VIPYL1*能降低ABA处理的植物种子萌芽率[33]。本研究中蓝莓*VcPYL1*在ABA响应途径中的表达情况与*VcNCED3*相似，随外源施用ABA而上调，随低温作用而下调，*VcPYL2*的表达模式与其有所差异，猜测基因在功能上有所不同，需进一步研究。Xiao等[34]对葡萄的研究发现，ABA处理可以促进*CBF*的表达，Rubio等[35]在葡萄研究中，进行ABA和低温双重处理休眠状态的芽，发现能够协同促进*CBF/DREB1*的表达。研究发现，*CBF*位于ABA信号的下游，在梨树中*PpCBF 1*、*PpCBF4*能响应低温并且可以选择性地调控*DAM*基因来参与内休眠的调控[36-37]。在本研究中，外源施用ABA后，*VcICE*、*VcCBF*的表达随ABA促进休眠上调，说明外源ABA信号启动了*VcICE*的表达，进而提高抗寒性。

在ABA处理后进行4 ℃冷处理4、8 d，发现*VcCBF*的表达相较于无4 ℃ ABA处理上调，说明*VcICE*基因在常温条件下以钝化的形式存在于植物体内，当低温胁迫侵袭植物时被激活，启动*CBF*基因的表达，这与前人的研究结果相符[19]。

4　结　论

统计分析了蓝莓品种‘Emerald’的需冷量。在花芽不同休眠阶段外源施用不同浓度ABA，通过萌芽率统计，筛选出在生态休眠期之前外源施用50~150 μmol·L^{-1} ABA均可加深蓝莓花芽的休眠并抑制冬季早花；ABA和低温双重处理发现，8 d以上冷处理可抵消外源ABA对萌芽的抑制，并且随着外源施用ABA浓度的升高，改善了开花的整齐度。

参考文献 References：

[1] LANG G A，EARLY J D，MARTIN G C，DARNELL R L. Endo-，para- and ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research[J]. HortScience，1987，22(3): 371-377.

[2] HORVATH D P，ANDERSON J V，CHAO W S，FOLEY M E. Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy[J]. Trends in Plant Science，2003，8(11): 534-540.

[3] 杨期和，杨和生，李姣清，尹小娟 . 植物芽休眠的类型、影响因素及调控的研究进展[J]. 广东农业科学，2011，32(11)：4-9.
YANG Qihe，YANG Hesheng，LI Jiaoqing，YIN Xiaojuan. Progress on categories，factors and regulation of bud dormancy in plants[J]. Guangdong Agricutural Sciences，2011，32(11):4-9.

[4] NAMBAARA E，MARION-POLL A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism[J]. Annual Review of Plant Biology，2005，56 (1): 165-185.

[5] 葛会波，李青云 . 草莓休眠过程中内源激素含量的变化[J]. 园艺学报，1998，25(1)：89-90.
GE Huibo，LI Qingyun. Changes of endogenous hormone content of dormancy in strawberry[J]. Acta Horticulturae Sinica，1998，25(1): 89-90.

[6] TUAN P A，BAI S L，SAITO T，ITO A，MORIGUCHI T. *Dormancy-associated MADS-box* (*DAM*) and abscisic acid pathway regulate pear endodormancy through a feedback mechanism[J]. Plant & Cell Physiology，2017，58(8): 1378-1390.

[7] ZHENG C，HALALY T，ACHEAMPONG A K，TAKEBAYASHI Y，JIKUMARU Y，KAMIYA Y，OR E. Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy，and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism[J]. Journal of Experimental Botany，2015，66(5): 1527-1542.

[8] BIELENGBERG D G，WANG Y，LI Z，ZHEBENTYAYEVA T，FAN S，REIGHARD G L，RALPH S，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[J]. Tree Genetics and Genomes，2008，4(3): 495-507.

[9] EUARDO G，PAJORO A，FRANCO-ZORRILLA J，TARANCON C，IMMINK R G H，CUBAS P. Abscisic acid signaling is controlled by a BRANCHED1/HD-ZIP I cascade in *Arabidopsis* axillary buds[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，2017，114(2): 245-254.

[10] SINGH R K，MAURYA J P，AZEEZ A，MISKOLCZI P，TYLEWICZ S，STOJKOVIC K，DELHOMME N，BUSOV V，BHALERAO R P. A genetic network mediating the control of bud break in hybrid aspen[J]. Nature Communications，2018，9(1): 4173.

[11] TYLEWICZ S，PETTERLE A，MARTTILA S，MISKOLCZI P，AZEEZ A，SINGH R K，IMMANEN J，MAHLER N，HVIDSTEN T R，EKLUND D M，BOWMAN J L，HELARIUTTA Y，BHALERAO R. Photoperiodic control of seasonal growth is mediated by ABA acting on cell-cell communication[J]. Science，2018，360(6385): 212-215.

[12] ZHENG C，ACHEAMPONG A K，SHI Z，MUGZECH A，HALALY-BASHA T，SHAYA F，SUN Y，COLOVA V，MOSQUNA A，OPHIR R W，GALBRAITH D，OR E. Abscisic acid catabolism enhances dormancy release of grapevine buds[J]. Plant，Cell & Environment，2018，41(10): 2490-2503.

[13] LI J，XU Y，NIU Q，HE L，TENG Y，BAI S. Abscisic acid (ABA) promotes the induction and maintenance of pear (*Pyrus pyrifolia* White Pear Group) flower bud endodormancy[J]. International Journal of Molecular Sciences，2018，19(1): 310.

[14] KLAUS-PETER G，JOBADATUN N，JOERG F，FRANK-M C. Changes of proteins during dormancy and bud development of sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. Scientia Horticulturae，2018，239: 41-49.

[15] CARMEN L，ANA C，GERARDO L，MARIA L B，GABINO R. Histone modifications and expression of *DAM6* gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner[J]. New Phytologist，2012，193(1): 67-80.

[16] YOOYONGWECH S，SUGAYA S，SEKOZAWA Y，GEMMA H. Differential adaptation of high and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content[J]. Plant Cell Reports，2009，28(11): 1709-1715.

[17] 刘国琴，郑鹏华，HUSSAIB S，滕元文 . 梨两个休眠相关MADS-box基因特征及在其休眠过程中的表达分析[J]. 园艺学报，2013，40(4)：724-732.
LIU Guoqin，ZHENG Penghua，SAYED H，TENG Yuanwen. Characteristics of two dormancy-associated MADS-box genes in pear and their expression analysis during the dormancy[J]. Acta Horticulturae Sinica，2013，40(4): 724-732.

[18] 余柯达，叶美娟，陈文荣，朱凯丽，张常晶，郭卫东 . 蓝莓组织

RNA 提取方法的研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版)，2016，39(1)：60-64.
YU Keda，YE Meijuan，CHEN Wenrong，ZHU Kaili，ZHANG Changjing，GUO Weidong. Methods for RNA isolation from blueberry tissues[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Science Edition)，2016，39(1): 60-64.

[19] MIURA K，JIN J B，LEE J，YOO C Y，STIRM V，MIURA T，ASHWORTH E N，BRESSAN R A，YUN D J，HASEGAWA P W. *SIZ1*-mediatedsumoylation of *ICE1* controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell，2007，19(4): 1403-1414.

[20] LUEDELING E，GIRVETZ E H，SEMENOV M A，BROWN P H. Climate change affects winter chill for temperate fruit and nut trees[J]. PLoS One，2011，6(5): e20155.

[21] KARSSEN C M，BRINKHORST-VAN DER SWAN D L C，BREEKLAND A E，KOORNNEEF M. Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh[J]. Planta，1983，157(2): 158-165.

[22] FREY A，GODIN B，BONNET M，SOTTA B，MARION-POLL A. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*[J]. Planta，2004，218(6): 958-964.

[23] ARC E，SECHET J，CORBINEAU F，RAJJOU L，MARION-POLL A. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination[J]. Frontiers in Plant Science，2013，4 (63): 1-19.

[24] NAMBARA E，OKAMOTO M，TATEMATSU K，YANO R，SEO M，KAMIYA Y. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination[J]. Seed Science Research，2010，20(2): 55-67.

[25] GUAK S，FUCHIGAMI L H. Effects of applied ABA on growth cessation，bud dormancy，cold acclimation，leaf senescence and N mobilization in apple nursery plants[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology，2001，76(4): 459-464.

[26] YANG Q，YANG B，LI J，WANG Y，TAO R，YANG F，WU X，YAN X，AHMAD M，SHEN J，BAI S，TENG Y. ABA‐responsive ABRE‐BINDING FACTOR3 activates *DAM3* expression to promote bud dormancy in Asian pear[J]. Plant，Cell & Environment，2020，43(6): 1360-1375.

[27] ARORA R，ROWLAND L J，TANINO K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age [J]. HortScience，2003，38(5): 911-921.

[28] ROHDE A，BHALERAO R P. Plant dormancy in the perennial context[J]. Trends in Plant Science，2007，12(5): 217-223.

[29] RUTTINK T，AREND M，MORREEL K，STORME V，ROMBAUTS S，FROMM J，BHALERAO R P，BOERJAN W，ROHDE A. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar[J]. The Plant Cell，2007，19(8): 2370-2390.

[30] WU R，TOMES S，KARUNAIRETNAM S，TUSTIN S D，HELLENS R P，ALLAN A C，MACKNIGHT R C，VARKONYI-GASIC E. *SVP*-like MADS box genes control dormancy and budbreak in apple[J]. Frontiers in Plant Science，2017，8: 477.

[31] SINGH R K，MISKOLCZI P，MAURYA J P，BHALERAO R P. A tree ortholog of *SHORT VEGETATIVE PHASE* floral repressor mediates photoperiodic control of bud dormancy[J]. Current Biology，2019，29(1): 128-133.

[32] LI G，XIN H，ZHENG X F，LI S，HU Z. Identification of the abscisic acid receptor *VvPYL1* in *Vitis vinifera*[J]. Plant Biology，2011，14(1): 244-248.

[33] GAO Z，LI Q，LI J，CHEN Y，LUO M，LI H，WANG J，WU Y，DUAN S，WANG L，SONG S，XU W，ZHANG C，WANG S，MA C. Characterization of the ABA receptor *VIPYL1* that regulates anthocyanin accumulation in grape berry skin[J]. Frontiers in Plant Science，2018，9: 592.

[34] XIAO H G，SIDDIQUA M，BRAYBROOK S，NASSUTH A. Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature，drought and abscisic acid[J]. Plant Cell & Environment，2010，29(7): 1410-1421.

[35] RUBIO S，NORIEGA X，PEREZ F J. Abscisic acid (ABA) and low temperatures synergistically increase the expression of CBF/DREB1 transcription factors and cold-hardiness in grapevine dormant buds[J]. Annals of Botany，2019，123(4): 681-689.

[36] LI J，YAN X，YANG Q，MA Y，YANG B，TIAN J，TENG Y，BAI S. PpCBFs selectively regulate *PpDAMs* and contribute to the pear bud endodormancy process[J]. Plant Molecular Biology，2019，99(6): 575-586.

[37] 牛庆丰 . 梨花芽休眠转换的分子网络及调控机制[D]. 杭州：浙江大学，2016.
NIU Qingfeng. The molecular mechanism and molecular network of pear flower bud dormancy transition[D]. Hangzhou: Zhejiang University，2016.