

‘翠冠’梨花芽休眠期碳水化合物变化及其相关基因表达研究

郑鹏华¹, 刘国琴^{1,2}, Sayed Hussain¹, 滕元文^{1,*}

(¹浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室, 杭州 310058; ²贵州大学农学院, 贵阳 550025)

摘要: 以‘翠冠’梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai) 花芽为试材, 连续两年研究了其在休眠过程中的碳水化合物含量变化及编码 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和 α -葡聚糖磷酸化酶等碳水化合物代谢相关基因的表达模式。两年的结果显示, 随着‘翠冠’梨花芽休眠的加深, 可溶性糖含量逐渐下降, 11月15日降到最低。此后, 在内休眠及其解除过程中可溶性糖含量呈上升趋势。花芽中淀粉含量随着休眠的加深逐渐下降, 最低含量出现的时间在年度间有所不同。随着休眠开始解除, 淀粉含量逐渐增加, 在完全解除前达到最大值, 其后则逐渐下降。‘翠冠’梨花芽的 *PpAMY*、*PpBAM1*、*PpBAM2* 和 *PpPHS* 在内休眠阶段均出现一个表达高峰, 然后逐渐下降直到内休眠完全解除前。之后, 除 *PpBAM2* 外, 其余3个基因再次上调表达。‘翠冠’梨花芽休眠期间, 淀粉含量的变化与 *PpAMY*、*PpBAM1*、*PpBAM2* 和 *PpPHS* 的表达变化之间存在联系, 由此推测这些基因可能参与了‘翠冠’梨花芽休眠期碳水化合物代谢的调控。

关键词: 梨; 休眠; 碳水化合物; 基因表达

中图分类号: S 661.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 02-0325-08

Studies on Changes in Carbohydrate Contents and Related Gene Expression in Floral Buds of ‘Cuiguan’ Pear During Dormancy

ZHENG Peng-hua¹, LIU Guo-qin^{1,2}, Sayed Hussain¹, and TENG Yuan-wen^{1,*}

(¹Department of Horticulture, State Agricultural Ministry Key Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Quality Improvement, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Changes in carbohydrate contents and expression patterns of genes coding for alpha-amylase, beta-amylase and alpha-glucan phosphorylase in floral buds of ‘Cuiguan’ pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) were studied during dormancy period for two successive years. The results indicated that the content of soluble sugar in floral buds decreased gradually with increased depth of dormancy, and reached the lowest value on November 15. Then the soluble sugar content increased during endo-dormancy and dormancy release. The starch content in floral buds decreased with increased depth of dormancy. But there is a difference in the occurring date of the lowest content of starch between two years. The starch content increased gradually with the beginning of dormancy release, and reached maximum value just before total

收稿日期: 2012-08-29; **修回日期:** 2013-01-14

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (nycytx-29)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ywteng@zju.edu.cn)

release of dormancy and then decreased gradually. *PpAMY*, *PpBAM1*, *PpBAM2* and *PpPHS* showed an expression peak at the final stage of endo-dormancy and then dropped gradually until the total release of dormancy. Thereafter, except for *PpBAM2*, other three genes up-expressed again. The change in the starch content correlated with the expression levels of *PpAMY*, *PpBAM1*, *PpBAM2* and *PpPHS* during the floral buds dormancy of ‘Cuiguan’ pear, which implied that these genes possibly co-regulated carbohydrate metabolism in floral buds of ‘Cuiguan’ pear.

Key words: pear; dormancy; carbohydrate; gene expression

休眠是落叶果树的一种重要生理现象。休眠过程中, 果树体内会发生一系列的生理变化, 其中作为贮藏养分的碳水化合物种类及量的变化是较为敏感的生理指标之一(毕磊, 2009)。碳水化合物是植物体碳源和能量的基本来源, 还能作为信号分子调控芽的生长, 同时在调节植物芽休眠上有重要作用(Chao & Serpe, 2010)。目前, 相关的研究多集中在休眠期碳水化合物的变化规律及与自然休眠的解除关系上(高东升等, 1999; 毕磊, 2009; 王海波等, 2009; Richardson et al., 2010)。相对来说, 落叶果树休眠期间碳水化合物代谢的分子机理研究并不多(刘国琴等, 2012)。

在多年生草本植物乳浆草(*Euphorbia esula* Linn.)上的研究发现, 编码 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、蔗糖合成酶、蔗糖磷酸合成酶、己糖激酶等碳水化合物代谢相关的基因在其休眠过程中表达量有显著变化。乳浆草 β -淀粉酶基因(*Ee-BAM1*)在整个休眠阶段表达量显著增加; 其他碳水化合物代谢的相关基因(*SuSy*, *SPS*, *HK*等)在不同休眠阶段表达情况不同(Anderson et al., 2005; Chao & Serpe, 2010)。在油桃上亦有研究证明碳水化合物代谢相关基因在休眠期间表达明显不同, 进入内休眠后依赖HK1的糖信号转导途径起重要作用(王慧等, 2011)。杨树形成层分生组织中涉及淀粉降解的基因在内休眠过程中上调表达(Schrader et al., 2004)。这些研究结果表明碳水化合物代谢及其相关基因的表达对休眠组织有重要的调控作用。

关于梨休眠期间的碳水化合物代谢的研究较少, 毕磊(2009)以‘七月酥’梨为材料, 对其休眠过程中的碳水化合物含量进行了研究, 但相关基因的研究至今未见报道。为此, 以‘翠冠’梨为试材, 研究休眠过程中花芽的碳水化合物变化及其相关基因的表达变化, 以期深入了解梨休眠期间碳水化合物代谢的分子调控机制奠定基础, 为休眠调控技术的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试材与取样方法

试验于2010年11—2011年1月和2011年10—2012年1月连续两年进行。试验材料采自于浙江省富阳市千禧园艺场的‘翠冠’梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)10年生成年结果树。试验用树在采样期间未进行修剪和任何化学处理。

2010年11月15日至2011年1月15日每15d采集1次树冠外围生长发育良好、芽体饱满的1年生枝条10枝, 设3次重复, 共30个枝条。枝条采集后迅速用润湿的布或报纸包裹好, 防止干燥脱水, 并及时运回实验室。从采集回的枝条上取下发育良好的花芽, 投入液氮速冻后, 于-70℃冰箱中保存。

第2年的采样方法同第1年, 采样的时间提前至2011年10月2日, 从12月15日起改为每7d采集1次样品直到2012年1月15日试验结束。

1.2 低温积累量的统计

用温湿度记录仪(型号: ZDR-20, 杭州泽大仪器有限公司生产)记录采样梨园的温湿度, 每隔 30 min 自动采集 1 次数据。

低温积累量的统计方法: 采用 7.2 °C 模型 (Weinberger, 1950), 低温积累量以日平均温度稳定通过 7.2 °C 的日期为起点计算低于 7.2 °C 的低温小时数 (Verissimo et al., 2002; 李天忠和张志宏, 2008)。

1.3 休眠阶段的确定

以花芽萌芽率判断休眠阶段。从 2011 年 10 月到 2012 年 1 月采集的枝条中随机选取长约 60 cm, 着生饱满花芽的枝条 15 枝, 将枝条基部剪齐, 放在盛有清水的瓶中, 以淹没枝条基部 2 ~ 3 cm 为准, 立即放入智能人工气候箱 (型号: PRX-450D, 浙江省宁波海曙赛福实验仪器厂) 中进行培养。培养条件为: 昼 12 h / 夜 12 h, 温度为昼 (25 ± 1.0) °C / 夜 (18 ± 1.0) °C, 光照强度 320 μmol · m⁻² · s⁻¹, 空气相对湿度 75%。每 2 d 换 1 次水, 每次剪除基部少许 (约 2 mm), 露出新茬。萌芽以花芽顶端开裂, 露绿为准 [BBCH-scale (pome fruit) [http://en.wikipedia.org/wiki/BBCH-scale_\(pome_fruit\)](http://en.wikipedia.org/wiki/BBCH-scale_(pome_fruit))]。培养 21 d 后统计花芽萌芽率。

进入内休眠时期的确定: 当水培枝条第 1 个芽萌芽所需时间 ≥ 10 d 时, 判断该枝条即进入内休眠 (Jian et al., 1997; 王海波 等, 2008)。

解除内休眠时期的确定: 以萌芽率 ≥ 50% 时的采样日期为准 (高东升 等, 2001; 毕磊, 2009; Campoy et al., 2011)。

1.4 可溶性糖及淀粉含量的测定

可溶性糖和淀粉含量的测定参照赵世杰 (2002) 的方法进行。

1.5 基因表达分析

按照徐昌杰等 (2004) 的 CTAB 方法提取不同时期花芽总 RNA。通过电泳检测 RNA 的质量; 通过 DU800 分光光度计 (Beckman, USA) 检测 RNA 含量 (A₂₆₀) 和质量 (A₂₆₀/A₂₈₀)。

cDNA 的合成参照 TaKaRa PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) 使用说明书进行。按照标准实时定量 PCR (qPCR) 引物设计原则设计碳水化合物代谢相关酶基因的引物 (表 1)。编码 α-淀粉酶基因 (*PpAMY*)、β-淀粉酶基因 (*PpBAM*) 和 α-葡聚糖磷酸化酶基因 (*PpPHS*) 的信息来自于本实验室梨花芽转录组数据 (Liu et al., 2012)。其中内参基因 *actin* 的正向引物为: 5'-CCATCCAGGCTGTTCTCTC-3', 反向引物为: 5'-GCAAGGTCCAGACGAAGG-3'。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers for qPCR

基因 Gene	QPCR 引物 (5' - 3') QPCR Primer (5' - 3')	产物长度/bp Product size
<i>PpAMY</i>	Fp: GCTGAGTGTGGAAGTGGTGAG Rp: ACAAGAAGAGACAGAGATACGATGG	148
<i>PpBAM 1</i>	Fp: AACATAATGGCAAGACAGTAGC Rp: GATACAAACAATCCCAACATTTACC	142
<i>PpBAM 2</i>	Fp: GGTGGCAAACACTGGCAATGTG Rp: GGGATTACTGGTGAATGATTCTGTGTC	121
<i>PpPHS</i>	Fp: GCAGCGATAGAACAATCCGAGAC Rp: GGTGGGAGTGAGGGTGAGC	95

采用 LightCycler 1.5 (Roche, 德国) 仪器进行 qPCR 检测。反应体系 20 μL , 包括 2.0 μL 稀释 cDNA, 0.4 μL 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.4 μL 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 10.0 μL of SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa, 中国大连) 和 7.2 μL H₂O。qPCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s (40 个循环) 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s。每次 qPCR 试验均设阴性对照, 每个样品重复 3 次, qPCR 的数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法 (Livak & Schmittgen, 2001)。

1.6 数据处理

数据采用 Excel 2007 作图, 并用 SAS9.1 进行 LSD 检验。

2 结果与分析

2.1 ‘翠冠’梨的低温积累量

采样梨园日平均温度稳定通过 7.2 $^{\circ}\text{C}$ 的日期分别是 2010 年 12 月 8 日和 2011 年 12 月 7 日, 以此作为计算 7.2 $^{\circ}\text{C}$ 模型低温积累量的起点。

由表 2 可以看出, 2010—2011 年度和 2011—2012 年度的低温积累量存在一定差异。2011 年 12 月 15 日和 12 月 22 日的低温积累量高于 2010 年的同时期, 分别高出 31 h 和 55 h。而 2011 年 12 月 29 日和 2012 年 1 月 15 日的低温积累量低于 2010 年和 2011 年的同时期, 分别低了 17 h 和 53 h。

表 2 2010 和 2011 年度低温积累量

Table 2 Chilling accumulation /h			
日期/(M-D)	Date	2010	2011
12-15		81	112
12-22		177	232
12-29		328	311
01-15 (翌年 Next year)		697	644

2.2 ‘翠冠’梨休眠阶段的确定

2011 年 10 月 15 日采集的‘翠冠’梨花芽样品经离体清水培养后, 统计第 1 芽的萌发时间为 13 d, 大于 10 d, 而且以后萌芽率持续降低, 认为其逐渐进入到休眠的状态。10 月 30 日到 11 月 30 日期间取样的‘翠冠’梨花芽萌芽率很低, 认为其在此阶段的休眠程度较其他时期深, 可以视为深休眠 (图 1)。11 月 30 日以后取样的萌芽率升高, 到 12 月 15 日取样的萌芽率达到 45.1%, 12 月 22 日取样的萌芽率为 85.2%, 已经超过 50%, 认为‘翠冠’梨花芽完全打破内休眠的时间是在 12 月 15 日到 12 月 22 日之间。

由表 2 可知, 2011—2012 年度‘翠冠’梨花芽内休眠完全解除时的低温积累量在 112 ~ 232 h 之间, 因此推断 2010—2011 年度‘翠冠’梨花芽完全打破休眠的时间可能在 12 月 22 日前后。

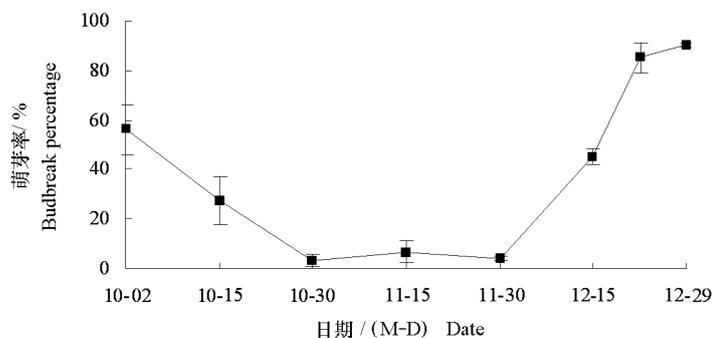


图 1 ‘翠冠’梨花芽的萌芽率 (2011—2012)

Fig. 1 The budbreak percentage of floral bud in ‘Cuiguan’ pear (2011—2012)

2.3 ‘翠冠’ 梨花芽休眠期间可溶性糖和淀粉含量的变化

由图 2, A 可以看出, 两年的可溶性糖含量在同期的动态变化相似。2011—2012 年度秋冬季 ‘翠冠’ 梨花芽进入休眠后, 可溶性糖含量呈下降趋势, 由 10 月 15 日的 $10.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 下降到 11 月 15 日的 $8.81 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$, 下降了 15.53%。随后可溶性糖含量逐渐上升, 到 12 月 22 日, 花芽可溶性糖含量达到 $12.76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 。2010—2011 年度花芽可溶性糖含量从测定开始的 11 月 15 日开始逐渐上升, 由最初的 $4.72 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 增加到 1 月 15 日的 $12.34 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$, 增加了 1.61 倍 (图 2, B)。

2011—2012 年度 ‘翠冠’ 梨花芽淀粉含量随着休眠的加深逐渐下降, 从 10 月 30 日到 11 月 30 日下降了 13.32%; 进入休眠解除阶段, 淀粉含量增加, 由 11 月 30 日的 $17.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 急剧增加到 12 月 15 日的 $25.08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$, 增幅达 46.07%; 12 月 15 日后淀粉含量逐渐下降, 到 1 月 15 日淀粉含量下降到 $18.84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ (图 2, C)。2010—2011 年度淀粉含量变化规律与 2011—2012 年度略有不同, 淀粉含量的最低值出现在 12 月 15 日 (图 2, D), 而 2011—2012 年度则出现在 11 月 30 日。

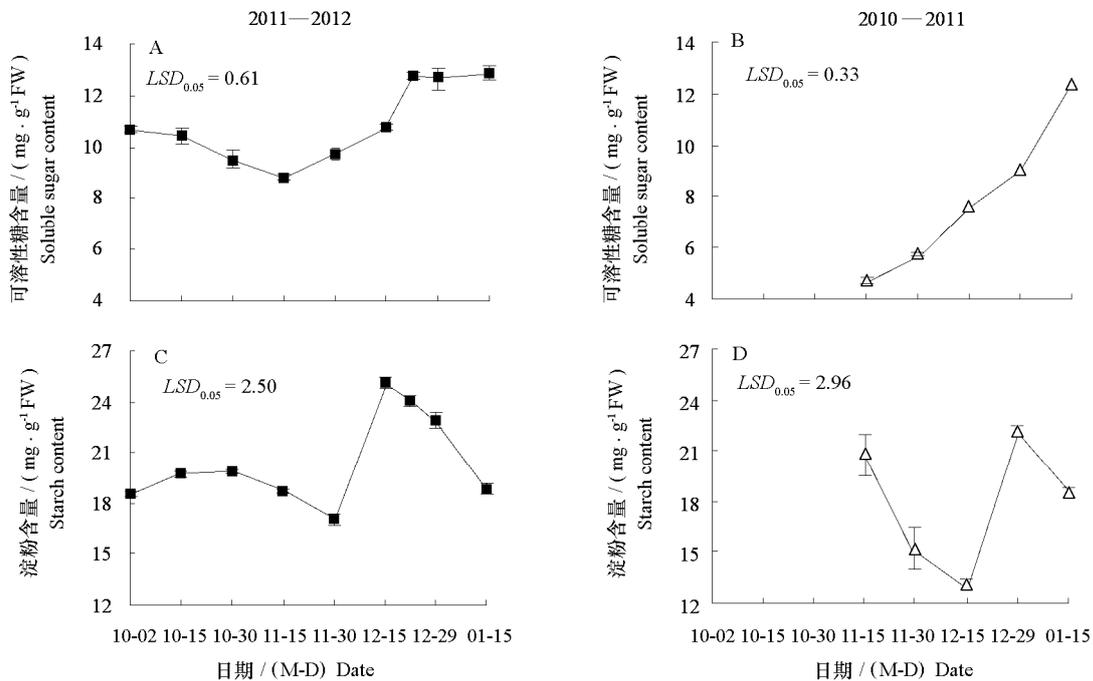


图 2 休眠期间 ‘翠冠’ 梨花芽可溶性糖和淀粉含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble sugar and starch contents in floral buds of ‘Cuiguang’ pear during the dormancy

2.4 ‘翠冠’ 梨花芽休眠期间碳水化合物代谢相关酶基因表达模式

由图 3 可以看出, 2011—2012 年度编码 α -淀粉酶基因 (*PpAMY*), β -淀粉酶基因 (*PpBAM1*, *PpBAM2*) 和 α -葡聚糖磷酸化酶基因 (*PpPHS*) 在 ‘翠冠’ 梨休眠期间的表达量有显著的变化 (图 3, A、C、E、G)。从 10 月 15 日到 11 月 15 日, 4 个基因的表达量很低且几乎没有变化。*PpAMY*、*PpBAM1*、*PpBAM2* 和 *PpPHS* 在内休眠阶段均出现一个表达高峰, 然后逐渐下降直到内休眠完全解除前。11 月 15 日到 11 月 30 日这 4 个基因的表达量显著上调, *PpAMY*、*PpBAM1*、*PpBAM2* 和 *PpPHS* 分别上调了 16.54、5.18、3.59 和 2.69 倍。12 月 15 日后, 除 *PpBAM2* 外, 其余 3 个基因再次上调表达。*PpAMY*、*PpBAM1* 和 *PpPHS* 的表达量从 12 月 15 日到 1 月 15 日分别上调了 9.53、8.55 和 1.3 倍。而 *PpBAM2* 的表达量变化不明显且处在较低水平。2010—2011 年, 4 个基因在 ‘翠冠’ 梨休眠

期间表达量亦有显著变化(图3, B、D、F、H)。休眠过程中,花芽的 *PpAMY*, *PpBAM1*, *PpBAM2* 和 *PpPHS* 的表达模式两年内都呈现相似的变化规律,但 *PpBAM1* 在 2010—2011 年度第 1 个表达高峰出现在 12 月 15 日,而 2011—2012 年度则出现在 11 月 30 日。

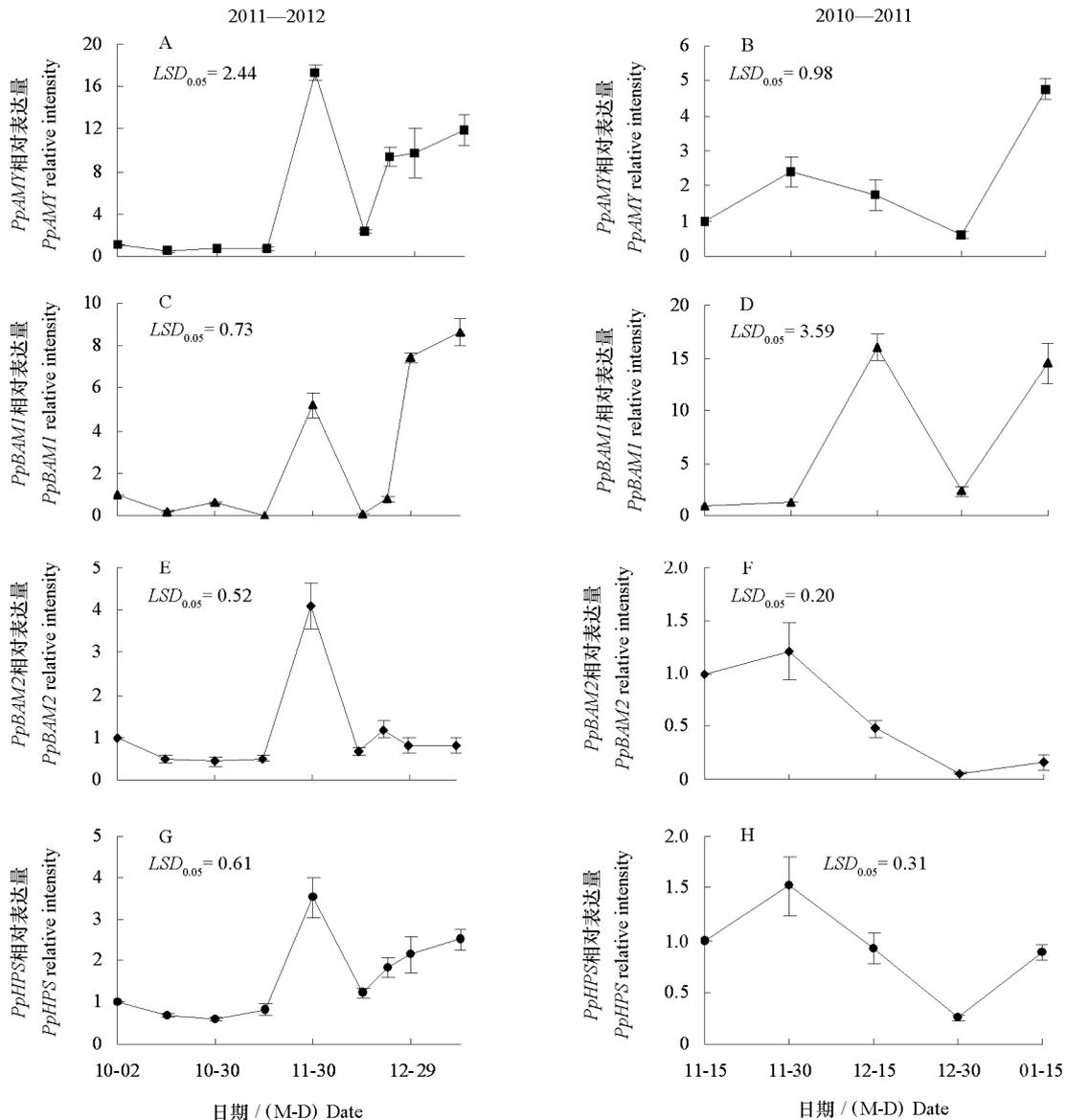


图3 ‘翠冠’梨休眠期间碳水化合物相关基因的表达变化

Fig. 3 The expression levels of carbohydrate related genes of ‘Cuiguan’ pear during the dormancy

3 讨论

高东升等(1999)报道自然休眠期桃树1年生枝条和花芽中淀粉和总糖含量变化平缓;休眠结束后糖含量迅速上升,而淀粉则呈现下降态势。本研究结果表明,随着‘翠冠’梨花芽休眠的加深,可溶性糖含量逐渐下降,11月15日含量降到最低。此后,在内休眠及其解除过程中可溶性糖含量呈上升趋势;而淀粉含量随着休眠的加深逐渐下降,年度间有所不同,2010—2011年在12月15日最低,而2011—2012年在11月30日最低。随着‘翠冠’梨开始进入到休眠解除阶段,淀粉含量逐

渐增加, 在完全解除前达到最大值, 其后则逐渐下降(图 2)。这与中海林等(2004)发现‘金太阳’杏和‘凯特’杏花芽淀粉含量在自然休眠期呈上升趋势的结果有相似之处, 也与毕磊(2009)在‘七月酥’梨上的结果相似。可见, 淀粉和可溶性糖的变化与果树的休眠进程密切相关。随着休眠程度的加深, 植物体内各项生命活动减弱, 碳水化合物代谢亦减弱。10月15日到11月15日, ‘翠冠’梨萌芽率逐渐降低(图 1), 休眠程度不断加深, 其可溶性糖含量下降, 碳水化合物代谢减弱。而随后可溶性糖含量上升可能是由于休眠进程中可溶性糖含量升高会增加细胞内渗透势(Marquat et al., 1999), 保护细胞免受冷害和冻害。本研究中观察到的休眠解除前淀粉含量上升的原因可能是内休眠解除阶段, 芽库强增强导致其他部位淀粉转移(Marquat et al., 1999)。孙红梅等(2004)在百合低温贮藏过程中也观察到休眠顶芽的淀粉含量升高, 认为可能是淀粉向可溶性糖的转化受阻所致。芽库强增强, 与枝条形成源库关系, 枝条中的可溶性糖会转移至芽内, 供淀粉合成用。

α -淀粉酶和 β -淀粉酶是植物淀粉水解的关键酶, 而 α -葡聚糖磷酸化酶是植物淀粉磷酸解的关键酶(Buchanan et al., 2002)。与淀粉和可溶性糖的变化相对应, 本研究中涉及的4个与碳水化合物代谢相关的基因在‘翠冠’梨休眠过程中也发生了显著变化。‘翠冠’梨花芽的 *PpAMY*、*PpBAM1*、*PpBAM2* 和 *PpPHS* 在内休眠阶段均出现一个表达高峰, 即在11月30日(2010—2011年度的 *PpBAM1* 在12月15日)均有一个显著上调过程(图 3), 说明淀粉降解基因在内休眠解除前表达, 为内休眠的解除做物质准备。内休眠完全解除后, 除 *PpBAM2* 外, 其余3个基因均上调表达(图 3), 促使淀粉降解转化为糖类, 与之对应的糖含量上升, 为‘翠冠’梨花芽的萌发提供能量和物质基础。本试验中两个编码 β -淀粉酶的基因(*PpBAM1* 和 *PpBAM2*)表达模式有所不同, 可能是因为基因家族成员之间存在表达不一致的现象(Chao & Serpe, 2010)。“翠冠”梨花芽休眠期间编码 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的基因(*PpAMY* 和 *PpBAM*)的表达模式存在差异(图 3), 这与Chao和Serpe(2010)在乳浆草上的结果相似。结合这些研究结果, 推测在梨芽休眠及解除期间, 不同的淀粉酶在淀粉水解过程中可能起作用的时间不同。综上所述, ‘翠冠’梨花芽休眠期间淀粉含量的变化与 *PpAMY*、*PpBAM1*、*PpBAM2* 和 *PpPHS* 的基因表达有关, 各基因协同表达, 调控淀粉降解, 参与了‘翠冠’梨花芽休眠期碳水化合物代谢的调控。

References

- Anderson J V, Gesch R W, Jia Y, Chao W S, Horvath D P. 2005. Seasonal shifts in dormancy status, carbohydrate metabolism, and related gene expression in crown buds of leafy spurge. *Plant Cell and Environment*, 28 (12): 1567 - 1578.
- Bi Lei. 2009. Study on changes of inclusions and metabolism during dormant period of Qiyuesu pear [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Hebei Agricultural University. (in Chinese)
- 毕磊. 2009. 七月酥梨休眠期内含物变化及生理代谢研究 [博士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L. 2002. *Biochemistry and molecular biology of plant*. Rockville: American Society of Plant Physiologists: 643 - 651.
- Campoy J A, Ruiz D, Egea J. 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae*, 130: 357 - 372.
- Chao W S, Serpe M D. 2010. Changes in the expression of carbohydrate metabolism genes during three phases of bud dormancy in leafy spurge. *Plant Molecular Biology*, 73 (1 - 2): 227 - 239.
- Gao Dong-sheng, Shu Hai-rui, Li Xian-li. 2001. A study on bud chilling requirements of fruit trees in greenhouse. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (21): 283 - 289. (in Chinese)
- 高东升, 束怀瑞, 李宪利. 2001. 几种适宜设施栽培果树需冷量的研究. *园艺学报*, 28 (21): 283 - 289.
- Gao Dong-sheng, Xia Ning, Wang Xing-an. 1999. Changes of carbohydrate content and effect of exogenous growth regulators on dormancy-breaking during dormant period of peach shoot. *Plant Physiology Communications*, 35 (1): 10 - 12. (in Chinese)
- 高东升, 夏宁, 王兴安. 1999. 休眠桃树枝条中碳水化合物的含量变化和外来生长调节剂对破除休眠的效应. *植物生理学通讯*, 35 (1):

10 - 12.

- Jian L C, Li P H, Sun L H, Chen T H. 1997. Alterations in ultrastructure and subcellular localization of Ca^{2+} in poplar apical bud cells during the induction of dormancy. *Journal of Experimental Botany*, 48 (311): 1195 - 1207.
- Li Tian-zhong, Zhang Zhi-hong. 2008. *Modern fruit trees biology*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
李天忠, 张志宏. 2008. *现代果树生物学*. 北京: 科学出版社.
- Liu Guo-qin, Zheng Peng-hua, Teng Yuan-wen. 2012. Research progresses on genes associated with bud dormancy in deciduous fruit trees. *Journal of Fruit Science*, 29 (5): 201 - 207. (in Chinese)
刘国琴, 郑鹏华, 滕元文. 2012. 落叶果树芽休眠相关基因的研究进展. *果树学报*, 29 (5): 201 - 207.
- Liu G Q, Li W S, Zheng P H, Xu T, Chen L J, Liu D F, Hussain S, Teng Y W. 2012. Transcriptomic analysis of 'Suli' pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) buds during the dormancy by RNA-Seq. *BMC Genomics*, 13: 700.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Marquat C, Vandamme M, Gendraud M, Petel G. 1999. Dormancy in vegetative buds of peach: Relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. *Scientia Horticulturae*, 79?: 151 - 162.
- Richardson A C, Walton E F, Meekings J S, Boldingh H L. 2010. Carbohydrate changes in kiwifruit buds during the onset and release from dormancy. *Scientia Horticulturae*, 124 (4): 463 - 468.
- Schrader J, Moyle R, Bhalerao R, Hertzberg M, Lundeberg J, Nilsson P, Bhalerao R P. 2004. Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodeling of the transcriptome. *The Plant Journal*, 40: 173 - 187.
- Shen Hai-lin, Chen Hai-jiang, Xu Ji-zhong. 2004. Study on some physiological indexes during dormant period of apricot bud. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 27 (6): 3. (in Chinese)
申海林, 陈海江, 徐继忠. 2004. 休眠期杏花芽若干生理指标变化的研究. *河北农业大学学报*, 27 (6): 3.
- Sun Hong-mei, Li Tian-lai, Li Yun-fei. 2004. Starch metabolism and sprouting of bulb in *Lilium davidii* var. *unicolor* stored at different cold temperatures. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 337 - 342. (in Chinese)
孙红梅, 李天来, 李云飞. 2004. 不同贮藏温度下兰州百合种球淀粉代谢与萌发关系初探. *园艺学报*, 31 (3): 337 - 342.
- Verissimo V, Gardin J P, Trevisan R, Da Silva J B, Herter F G. 2002. Morphological and physical parameters of flowerbuds of trees of two Japanese pear cultivars grown at three different areas of Southern Brazil, and their relationship with flower bud abortion intensity. *Acta Horticulture*, 587: 381 - 388.
- Wang Hai-bo, Wang Xiao-di, Cheng Cun-gang, Wang Bao-liang, Li Min, Gao Dong-sheng, Liu Feng-zhi. 2008. Natural inducing factors of peach bud dormancy and roles of Ca in the dormancy induction. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 19 (11): 2333 - 2338. (in Chinese)
王海波, 王孝娣, 程存刚, 王宝亮, 李敏, 高东升, 刘凤之. 2008. 桃芽休眠的自然诱导因子及钙在休眠诱导中的作用. *应用生态学报*, 19 (11): 2333 - 2338.
- Wang Hai-bo, Wang Xiao-di, Gao Dong-sheng, Wang Bao-ling, Li Jiang, Liu Feng-zhi. 2009. Physiological changes of peach cultivars with different chilling requirement during bud dormancy induction. *Journal of Fruit Science*, 26 (4): 445 - 449. (in Chinese)
王海波, 王孝娣, 高东升, 王宝亮, 李疆, 刘凤之. 2009. 不同需冷量桃品种芽休眠诱导期间的生理变化. *果树学报*, 26 (4): 445 - 449.
- Wang Hui, Li Ling, Tan Yue, Li Dong-mei, Tan Qiu-ping, Chen Xiu-de, Gao Dong-sheng. 2011. Changes in carbohydrate metabolism and related gene expression in nectarine floral buds during dormancy. *Plant Physiology Journal*, 47 (6): 595 - 600. (in Chinese)
王慧, 李玲, 谭钺, 李冬梅, 谭秋平, 陈修德, 高东升. 2011. 休眠期间油桃花芽碳水化合物代谢及其相关基因的表达变化. *植物生理学报*, 47 (6): 595 - 600.
- Weinberger J H. 1950. Chilling requirements of peach varieties. *Proceedings American Society of Horticultural Science*, 56: 122 - 128.
- Xu Chang-jie, Chen Kun-song, Zhang Bo, Wang Qian-jie, Ye Wei-jia. 2004. A study on methods for RNA extraction from citrus tissues. *Journal of Fruit Science*, 21: 136 - 140. (in Chinese)
徐昌杰, 陈昆松, 张波, 王钱洁, 叶薇佳. 2004. 柑橘组织 RNA 提取方法研究. *果树学报*, 21: 136 - 140.
- Zhao Shi-jie. 2002. *The experimental principles and techniques of plant physiology*. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technique Press. (in Chinese)
赵世杰. 2002. *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业科技出版社.