

# 紫花苜蓿秋眠性对低温驯化过程与越冬耐寒适应的作用机理

刘志英<sup>1</sup> 李西良<sup>1</sup> 李 峰<sup>1</sup> 王宗礼<sup>1,2\*</sup> 孙启忠<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010010; <sup>2</sup>农业部畜牧业司, 北京 100125

**摘 要** 紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是全球性的栽培牧草, 因其秋眠性强弱而导致的抗寒性差异为深刻解析植物耐寒适应的进化生态学机制提供了一个很好的研究模式。作为多年生豆科植物, 秋眠性是紫花苜蓿适应晚秋日照缩短、温度降低, 以及提高越冬存活率的一种生长特性。秋眠性的形成与几千年来紫花苜蓿在全球的传播扩展和栽培利用有关, 长期处于不同的气候生境, 导致秋眠性的适应进化, 这为人类利用提供了丰富的遗传资源。根据秋眠性的强弱, 学术界目前将之分为11个等级。一般而言, 秋眠性的强弱影响了紫花苜蓿的低温驯化与越冬耐寒适应等过程, 导致不同品种间的抗寒性存在差异。迄今, 关于秋眠性的光温调控, 以及秋眠性影响低温驯化的生理生态过程研究较多, 而对相关的细胞信号转导与基因表达调控途径, 尤其是对秋眠性如何影响越冬紫花苜蓿抗冻蛋白作用等耐寒适应的分子机制, 尚知之甚少。针对目前研究中存在的问题, 该文提出了未来需要重点关注的科学问题。

**关键词** 秋眠性, 抗寒性, 低温驯化, 越冬率, 紫花苜蓿

**引用格式:** 刘志英, 李西良, 李峰, 王宗礼, 孙启忠 (2015). 紫花苜蓿秋眠性对低温驯化过程与越冬耐寒适应的作用机理. 植物生态学报, 39, 635–648. doi: 10.17521/cjpe.2015.0061

## Mechanisms underlying the effects of fall dormancy on the cold acclimation and winter hardiness of *Medicago sativa*

LIU Zhi-Ying<sup>1</sup>, LI Xi-Liang<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, WANG Zong-Li<sup>1,2\*</sup>, and SUN Qi-Zhong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot 010010, China; and <sup>2</sup>Animal Husbandry Department, Ministry of Agriculture of China, Beijing 100125, China

### Abstract

As a global planting forage legume, alfalfa (*Medicago sativa*) is a valuable material to study the evolutionary and ecological mechanisms on plant adaptation to freezing due to their contrasting winter hardiness induced by fall dormancy (FD). This paper reveals that FD is an important growth characteristic that is adaptative to short-day and reducing temperature in late autumn, followed by a higher overwintering rate. Alfalfa cultivars are grouped into 11 FD ratings (numbered from 1 to 11), and this phenomenon is related to the extensive spread and cultivation for thousands of years in the globe. Alfalfa cultivars are under different climate habitats for a long time, leading to FD adaptive evolution, which provides rich genetic resources for human. In general, adaptative process associated with cold acclimation and winter hardiness in alfalfa is affected by FD, thus differences in winter hardiness exist among alfalfa cultivars. So far, regulation of FD by light and temperature and effects of FD on physiological and ecological processes involved in cold acclimation have been reported largely. However, signal transduction and the regulatory network associated with gene expression, especially the molecular mechanisms by which antifreeze proteins function in cold adaptation, are still poorly understood. Several scientific problems that need to be addressed in the future studies are highlighted in this review.

**Key words** fall dormancy, winter hardiness, cold acclimation, overwintering rate, *Medicago sativa*

**Citation:** Liu ZY, Li XL, Li F, Wang ZL, Sun QZ (2015). Mechanisms underlying the effects of fall dormancy on the cold acclimation and winter hardiness of *Medicago sativa*. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 39, 635–648. doi: 10.17521/cjpe. 2015.0061

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是全球第一大栽培豆科牧草(洪绶曾, 2009; 孙启忠等, 2014), 休眠性(fall dormancy)和抗寒性(winter hardness)作为其重要的生物学特性, 是草地栽培与区划的主要依据之一(Castonguay *et al.*, 2013; Nanni *et al.*, 2014)。紫花苜蓿休眠性是一个长久的研究命题, 早在1921年, Oakley和Westover发现来自美国不同地方的紫花苜蓿在晚秋刈割再生后的生长反应截然不同(Oakley & Westover, 1921), 主要特征为, 仅高纬度地区来源的品种生长缓慢、茎秆匍匐, 低纬度品种则快速地直立生长, 而此差异在春季、夏季并无表现, 根据这一现象提出了休眠性理论。自国际上首次报道紫花苜蓿的休眠性现象, 至今已有近百年。比较而言, 中国的休眠性研究较晚, 1991年卢欣石和申玉龙首次以中文论文的形式介绍了苜蓿休眠性的概念, 将休眠性研究引入中国(卢欣石和申玉龙, 1991)。

回溯研究史, 20世纪90年代以前, 科学家们主要研究了休眠性的测度及定级理论(Stout & Hall, 1989), 同时论证了休眠性与越冬率之间的关系(Smith, 1961), 并有限地分析了根呼吸、气孔密度等少量的生理生化过程对休眠性的响应(Megee, 1935; Cole & Dobrenz, 1970)。随着休眠性测度及定级理论体系的构建完成, 自20世纪90年代以来, 围绕紫花苜蓿休眠性与春季再生性、生长习性、根系策略、耐盐性、抗寒性、耐冻性、草产量及持久性等生长特性之间的关系, 国内外开展了大量研究(Sheaffer *et al.*, 1992; 卢欣石和何琪, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2009; 陈托兄等, 2011)。人们发现, 紫花苜蓿休眠性与这些生长特性之间存在着不同形式的关联(Pembleton & Sathish, 2014), 故休眠性的理论和生产价值得以更加凸显, 这激起了学术界极大的研究兴趣。

紫花苜蓿是广布种, 以全球尺度而论, 在其适宜引种的分布区中, 不同地区的温度、光照、水分等气候条件迥异(Yang *et al.*, 2008), 仅以我国为例, 南北分布区的冬季低温温差高达40 °C (徐斌等, 2007), 因此, 将中低纬度品种引种至高纬地区, 常因无法安全越冬而造成严重的生产损失(高菲, 2012)。越来越多的证据表明, 紫花苜蓿的休眠性与抗寒性之间有着紧密的关联(Brummer *et al.*, 2000), 不同休眠级的紫花苜蓿的抗寒性差异为深刻解析其分子生态学、进化生态学机制提供了一个很好的研

究模式, 但纵观20世纪的研究, 关于其作用机制一直不清楚。进入21世纪后, 由于更加重视休眠性、抗寒性的生产指导意义, 加之研究手段的日趋成熟, 大量研究报道了休眠性与抗寒性的关系, 系统揭示了休眠性的生理生态学机制(Wang *et al.*, 2008), 并从分子水平开展了卓有成效的探索(Fan *et al.*, 2014), 尤为引人注意的是, 我国学者在此研究中做出了重要贡献。迄今, 学术界对紫花苜蓿休眠性与抗氧化物质、可溶性物质、植物激素等的作用过程, 及其对低温驯化的影响(刘磊等, 2009; 樊文娜等, 2014)有了更深入的认识, 并分离了抗冻蛋白关键基因(Mohapatra *et al.*, 1989; Monroy *et al.*, 1993; 郭瑞萍, 2007)。

总之, 近年来, 紫花苜蓿休眠性与抗寒性关系的研究得到学术界前所未有的重视, 迄今已对其生态作用机制有了一定的分析, 特别是在植物生理学、分子生物学、表观遗传学等新的研究技术的催生下, 研究取得了重要进展, 但时至今日, 尚缺乏系统的回顾与总结。为此, 针对紫花苜蓿休眠性对低温驯化与越冬耐寒适应的作用机理这一科学问题, 本文全面梳理了国内外相关研究的最新进展, 旨在分析紫花苜蓿休眠性与抗寒性之间的关系, 解析休眠性对低温驯化的影响过程, 归纳休眠性对越冬紫花苜蓿致死与抗寒适应的作用机理, 同时根据目前研究中存在的问题, 提出未来需要重点关注的研究方向。

## 1 紫花苜蓿休眠性

### 1.1 多年生植物的越冬休眠及紫花苜蓿休眠性

在多年生植物的整个生命周期中, 常会遭遇不适的生长环境, 特别是在温带和寒带的冬季, 为抵御寒冷胁迫, 植物的活跃生长器官或组织会通过进入休眠状态来增加对逆境的抵御能力, 安全度过生长环境不利的时期, 在环境适宜时解除休眠, 重新恢复生长(Wisniewski *et al.*, 2011)。越冬植物的休眠分为生态休眠(ecodormancy)、类休眠(paradormancy)和内休眠(endodormancy) 3种类型(Lang *et al.*, 1987), 其中紫花苜蓿的越冬休眠属于内休眠(樊文娜等, 2010)。一般来讲, 植物的休眠发育进程包括生长停止的诱导、休眠的建立和维持、休眠的解除等过程。研究发现, 光、乙烯、脱落酸、赤霉素及生长素信号通路对植物休眠的建立起作用, 控制了

一些植物休眠芽的形成, 其机制与开花调控有类似之处, 如CO (CONSTANS)/FT (FLOWERINGLOCUST)调控途径(李小方和王洋, 2009)。根据学术界的定义, 紫花苜蓿秋眠性是在北纬中高纬度地区, 因秋季日照时间缩短、气温下降, 导致苜蓿生长缓慢, 茎秆成匍匐状的一种适应性生长反应(卢欣石和申玉龙, 1991; Brummer *et al.*, 2000), 显而易见, 秋眠性属于多年生植物整个休眠过程的第一阶段, 即生长停止的诱导。秋眠性在生产中具有重要的指导意义, 美国农业部农研局(USDA-ARS)曾将全美划分为10个气候区, 建议将不同秋眠级的紫花苜蓿品种种植到不同的气候区, 为紫花苜蓿引种提供了一个较为科学的依据; 同样, 主要参考了秋眠级的不同, 我国学者根据气候区域的空间特征, 也研究了中国的紫花苜蓿引种与生产区划(徐斌等, 2007)。

## 1.2 紫花苜蓿秋眠性的适应进化含义

紫花苜蓿秋眠性最初被发现, 是采用了同质种植园实验(common garden experiment)的研究方法。Oakley和Westover (1921)比较了栽培于同一地区的美国北方品种与南方品种, 发现在晚秋刈割后再生植株的形态迥异, 前者茎秆匍匐, 生长缓慢, 后者茎秆直立, 生长较快。此后的研究逐渐建立了秋眠性的评价体系, 由于紫花苜蓿秋眠性受遗传、形态、生理和环境等因素调控, 准确评价秋眠性十分耗时, 常规方法一般利用标准品种计算待测品种的秋眠级数(Barnes *et al.*, 1979)。目前根据紫花苜蓿秋眠性的强弱, 将之划分为11个秋眠级和4个秋眠类型: 秋眠型(1–3级)、半秋眠型(4–6级)、非秋眠型(7–9级)和极非秋眠型(10、11级), 秋眠级越高表示秋眠性越弱(Teuber *et al.*, 1998; Brummer *et al.*, 2002)。近年来, 近红外光谱法在秋眠级预测中应用成功, 可准确地预测单株和各个品种的秋眠级(Kallenbach *et al.*, 2001), 这种快速、可靠的方法能够评价一个紫花苜蓿品种的秋眠级, 尤其针对其在各种环境下的平均秋眠性, 可使育种学家们有效地选择试验方法, 且缩短试验周期(王红柳等, 2011)。

不同地区来源的紫花苜蓿秋眠性相差如此之大, 可能与其在全球的传播、长期的生境差异和适应进化有关(Michaud *et al.*, 1988)。一般认为, 紫花苜蓿起源于小亚细亚、外高加索、伊朗地区(Hanson *et al.*, 1988), 最早作为战马的优良饲料, 战争、商贸和传教士是促进古代紫花苜蓿传播的主要途径, 逐

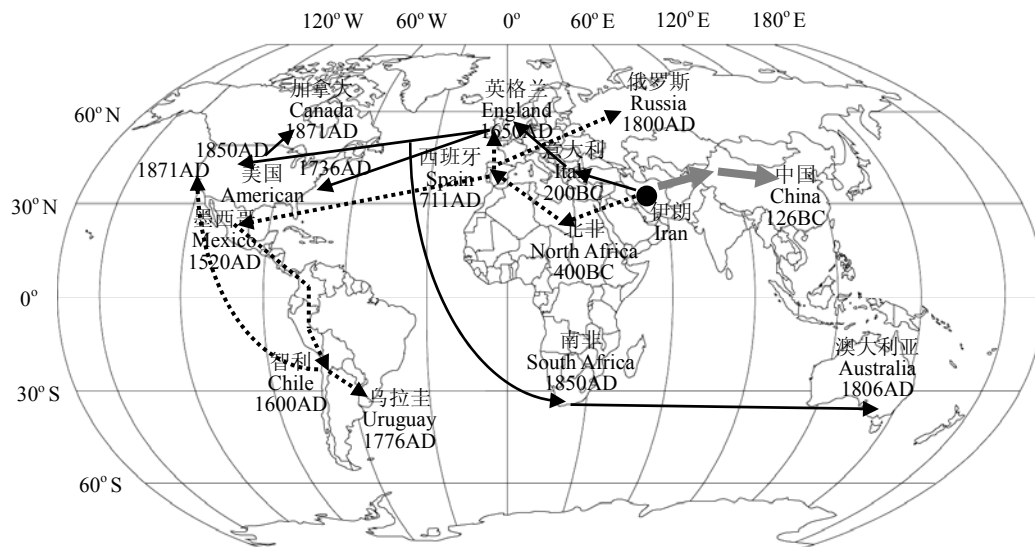
渐传播到世界各地适宜种植区(图1)。几千年来, 随着紫花苜蓿自起源地伊朗向全球范围的传播和栽培利用, 长期对不同地区越冬耐寒的适应, 紫花苜蓿对温度、光照反应的敏感性发生分异, 形成了不同的秋眠级(Michaud *et al.*, 1988)。但目前尚缺乏在全球尺度上的研究, 从遗传与环境之间的作用关系揭示紫花苜蓿起源进化对秋眠性形成及其分异的相关机理。

## 1.3 紫花苜蓿秋眠性的光温调控

秋眠性是受环境诱导的植物生长特性, 关于光照、温度等气象环境因子对秋眠性的调控, 国内外学者做了大量的工作(Chen & Chen, 1988; 覃凤飞等, 2012), 尽管对环境因子的作用排序的结论并不完全一致, 但大都表明光照、温度是秋眠性发生的主要调控要素。具体来讲, 紫花苜蓿是长日照植物, 其生长发育过程中存在光周期效应, 在秋眠性、开花等阶段均受光周期信号的影响(Wang *et al.*, 2008)。研究发现, 冷信号也显著地影响了紫花苜蓿的秋眠过程(Cunningham *et al.*, 2001), 由于植物的低温驯化过程主要受冷信号的影响(Barrero-Gil & Salinas, 2013), 这暗含着秋眠性与低温驯化在机理上具有关联。

判断光温因子对秋眠性的调控效应, 大部分报道主要通过田间观察方法(高菲和卢欣石, 2012), 也有少量的研究通过室内光照、温度控制实验来进行(陈玮玮等, 2010)。人们发现, 光温因子的调控作用随着短日照信号、低温信号的增强, 导致秋眠级的生长表现得分化愈加明显(严秀将等, 2009; 高菲和卢欣石, 2012), 可见秋眠性的表现有赖于光信号、低温信号的剂量效应。研究发现, 在晚秋刈割后植物再生的初期, 在温度降低、日照缩短的一定变化幅度内, 温度往往比光照的作用更大, 除了温度和光照这两个因子, 其他气象因子的剩余效应较小(徐大伟和卢欣石, 2010)。进一步研究发现, 随着短日照信号、低温信号的增强, 达到秋季日长小于11 h, 平均温度低于10.4 °C, 不同秋眠类型的紫花苜蓿出现分化; 在秋季日长低于10 h, 平均温度低于7.8 °C的临界条件, 不同秋眠级发生更明显的分化(徐大伟和卢欣石, 2010; 高菲和卢欣石, 2012)。

气象因子室内控制实验也为秋眠性的光温调控提供了重要证据, 陈玮玮等(2010)通过变温、变光及两者的交互实验发现光照缩短、温度降低互作对紫



**图1** 紫花苜蓿在全球的主要传播路径及其历史轨迹。根据相关文献(Hanson *et al.*, 1988; Michaud *et al.*, 1988; Warburton & Smith, 1993; Bauchan & Hossain, 2001; Segovia-Lerma *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2006; 洪绂曾, 2009; 李平等, 2012)重绘。不同线条代表紫花苜蓿从伊朗(●)向全球传播的不同路径, 图中数据为紫花苜蓿传入的地点及时间(BC, 公元前; AD, 公元)。

**Fig. 1** Main spread paths of alfalfa globally and its historical trace. The figure was redrawn according to the related literatures (Hanson *et al.*, 1988; Michaud *et al.*, 1988; Warburton & Smith, 1993; Bauchan & Hossain, 2001; Segovia-Lerma *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2006; Hong, 2009; Li *et al.*, 2012). Different lines represented different spread paths of alfalfa from Iran (●) to the world, the data in the figure showed the place and date of alfalfa introduction (BC, before Christ; AD, anno Domini).

花苜蓿秋眠性的影响显著大于单一因子的效应, 而且证明光照缩短的作用更加明显, 此外, 光温控制实验下生理水平的一些证据也佐证了光信号、低温信号对秋眠性的调控作用(樊文娜等, 2014)。值得注意的是, 目前关于光信号、低温信号的效应大小的报道结论并不完全一致, 由于光、温信号因子剂量的不可通约, 使得设计出一致的实验比较不同的气象因子对秋眠性的效应并不现实, 关于紫花苜蓿秋眠性的光温调控效应, 揭示其定性的分子调控过程当更为重要。

## 2 紫花苜蓿秋眠性的抗寒效应

### 2.1 紫花苜蓿抗寒性

抗寒性是植物对低温环境长期适应而形成的一种遗传特性, 紫花苜蓿也不例外。一般来讲, 其抗寒性是紫花苜蓿在冬季低温条件下能够存活且在来年可再生的能力(Cunningham *et al.*, 2001)。在中高纬度寒冷地区, 抗寒性是影响紫花苜蓿生长的一个主要特性, 它直接影响紫花苜蓿的持久性(persistence)和生产能力。紫花苜蓿的抗寒过程包含秋季低温驯化与越冬耐寒适应两个方面(Janská *et al.*, 2010)。大

量研究发现, 与未经历低温驯化相比, 经历低温驯化的植物抗寒性大幅提高, 因此低温驯化与越冬性之间具有十分紧密的关联(Castonguay *et al.*, 2011)。其中, 植物在秋末冬初感受逐渐下降的外界温度, 并且受光周期的诱导, 经由细胞信号转导、基因表达调控等一系列过程, 引发植物体内发生一系列生理生化变化, 从而提高对冬季低温的抵抗能力的过程称作低温驯化(cold acclimation)或抗寒锻炼(cold hardening)(Ensminger *et al.*, 2006)。

在低温和光周期的信号转导与基因表达调控中, 往往涉及复杂的过程, 其中包括 $\text{Ca}^{2+}$ 、ABA、蛋白磷酸化酶、蛋白激酶和一些转录因子等(Castonguay *et al.*, 2011)。通过低温驯化, 诱导植物生长缓慢, 储藏性物质发生再分配, 特别是越冬器官细胞发生一系列反应, 降低细胞活动, 提高抗冻性, 为越冬做准备(Ensminger *et al.*, 2006)。紫花苜蓿的秋眠过程是完成低温驯化的关键步骤, 长期进化导致的秋眠级差异, 在同一光周期、低温环境下, 表现出不同的生长特性和生理生态反应, 对紫花苜蓿的越冬过程产生了重要影响(Castonguay *et al.*, 2011)。

## 2.2 高纬地区紫花苜蓿秋眠性与越冬率的关系

研究发现, 紫花苜蓿秋眠性和越冬性密切相关, 秋季刈割后顶端生长长度越短, 越冬性越强, 且因日照缩短和温度降低引起生长高度减少的现象在秋眠品种中的表现比非秋眠品种明显(Brouwer *et al.*, 2000)。非秋眠型紫花苜蓿在夏末秋初再生迅速且生长也较快, 但是越冬率较低(Brummer *et al.*, 2002), 是影响其在相对寒冷地区广泛推广的主要限制因素。Sheaffer等(1992)研究了美国明尼苏达州春播紫花苜蓿在播种当年的收获管理、秋眠性和越冬率三者之间的关系, 发现秋眠性影响紫花苜蓿越冬的程度远大于其他因素, 在收获管理或地理位置一致的情况下, 非秋眠紫花苜蓿品种在冬季死亡, 而秋眠品种有良好的越冬性。该发现也得到了其他研究者的支持, 他们在美国威斯康辛州和明尼苏达州比较了紫花苜蓿秋季生长与冬季植株受伤害程度之间的关系, 发现紫花苜蓿秋季的生长高度均与抗寒性有显著的相关关系(Smith, 1961; Brouwer *et al.*, 2000)。Perry等(1987)发现秋季生长高度和抗寒性呈明显差异的亲本, 杂交后在其分离世代中二者呈中等表型相关性。Barnes等(1979)还曾在北美紫花苜蓿改进会议上制定了一项测定紫花苜蓿秋季生长级别的标准, 将秋季呈现缓慢或停滞生长的品种定为秋眠型且趋于耐寒的品种, 秋季呈现旺盛直立生长的品种定为非秋眠型且在无充足积雪的北方冬季植株表现出较高死亡率的品种, 即秋眠性通常被用来预测紫花苜蓿的越冬率。Schwab等(1996)评价了251个北美紫花苜蓿品种的秋眠性和抗寒性, 并确定了在明尼苏达州的冬季气候条件下秋眠性和冻害之间的关系, 研究指出, 在明尼苏达州利用秋眠性可以很好地预测抗寒性, 但是对于其他地区和将来的某些新紫花苜蓿种质资源, 秋眠性可能不会有相同的预测结果。

## 2.3 关于秋眠性与抗寒性关系的争议

尽管大量的证据表明秋眠性与抗寒性之间具有紧密的表型相关性, 但早期一些杂交试验通过对遗传背景的解析, 发现二者性状可以分离, 因此, 一些学者对秋眠性与抗寒性关联的具体形式与过程产生了质疑。有研究发现, 秋眠性与越冬率之间并非总是存在严格的负相关关系(Busbice & Wilsie, 1965), 与在明尼苏达州所报道的结果并不一致, 可能主要与该研究结论在冬季相对温暖的地区得出有

关(Schwab *et al.*, 1996)。类似地, Daday (1964)采用紫花苜蓿品种‘DuPuits’ (非秋眠)和‘African’ (非秋眠)进行杂交, 发现在F<sub>1</sub>或F<sub>2</sub>代中秋季干物质产量与抗寒性之间既无表型相关性又无遗传关联性。抗寒性与秋眠性可能并非同步增强, 一些紫花苜蓿新品种表现出的抗寒性已经超出了其秋眠级所预测的水平, 甚至还可能表现出相反的结果, 因此建议应有选择地利用秋眠性来预测抗寒性(Weishaar *et al.*, 2005)。归结起来, 这一争议的主要原因在于多点多年试验缺乏、机理性研究不足, 且这些研究的时间均较早, 后续的重复性实验十分缺乏, 更缺乏现代研究技术手段的实验验证, 使得人们对这一问题的认识存在诸多盲点。

近年来, 中国科学家也开始注意到关于紫花苜蓿秋眠性与抗寒性关系的争议。2004年, 我国学者在综述中首次介绍了这一问题(李向林和万里强, 2004), 引起学术界的重视。有报道认为, 秋眠性与抗寒性的密切关联可能与一些品种在北欧和西伯利亚的起源有关(李向林和万里强, 2004), 由于对草食动物过度采食的规避, 长期进化形成了以生长缓慢、茎秆匍匐为主要特征的秋眠性, 同时, 由于本地区寒冷的生境特征, 长期进化形成了抗寒性, 因此二者在遗传上很可能并不具有内在关联。但这一观点目前尚缺乏有力的试验证据, 而且该学说无法解释秋眠性主要受光周期、低温等信号诱导的现象, 也无法解释为什么不同紫花苜蓿品种的秋眠性差异仅在越冬前低温驯化阶段出现。总的来讲, 秋眠性与抗寒性产生关联的过程与机理仍充满疑云(Cunningham *et al.*, 2001), 学术界目前的争议亦主要集中于此。这一争议对于激发研究思路有所裨益, 说明目前对秋眠性与抗寒性关联过程的认识尚不清楚, 亟需藉由新的研究手段, 通过试验验证回答这一科学问题。

## 3 秋眠性对紫花苜蓿低温驯化过程的影响机理

### 3.1 秋眠性影响低温驯化的生理生态过程

低温驯化是植物在秋末冬初感受低温、光周期的变化, 体内发生一系列生理生化变化, 为越冬做抗寒准备的过程。基于对不同秋眠级紫花苜蓿对晚秋光、温因子的差异响应的认知, 可认为, 秋眠性的强弱实质上是影响了低温驯化过程中紫花苜蓿对冷信号、光周期反应的敏感性(Wang *et al.*, 2008), 并进

一步影响了越冬期间的低温抗冻性, 根据目前的研究成果, 并参考国内外在相关领域的最新发现 (Ensminger *et al.*, 2006; Castonguay *et al.*, 2011, 2013), 本文以图示勾勒了秋眠性与抗寒性的关系, 分析了紫花苜蓿秋眠性对低温驯化与越冬耐寒适应可能的作用过程(图2)。

由于秋眠性受光照的显著影响, 因此研究秋眠性的生理调控机制最早是从光周期和光敏色素开始的(Wang *et al.*, 2008)。相关研究发现, 光周期不仅能影响植物的开花、色素的形成及叶的脱落, 还能影响植物的休眠等一系列生理过程, 如Li等(2011)报道光周期不仅可以调节桃(*Amygdalus persica*)花芽休眠诱导过程中的替代呼吸途径, 还可调节呼吸途径中的关键酶活性。光周期是否通过光受体光敏色素来调控紫花苜蓿的秋眠? 关于这个问题近年来取得了重要进展, Wang等(2008)研究发现, 光敏色素(phytochrome, PHY)作为绿色植物的主要光受体可能通过光周期调控了紫花苜蓿的秋眠, 其中PHYB含量多寡程度与光周期和秋眠性强弱有关, 因此推

测它调控了光周期反应。樊文娜等(2014)报道, 秋眠型、半秋眠型和非秋眠型3种不同秋眠型紫花苜蓿PHYA和PHYB在短日照条件下合成量大, 尤其秋眠型品种‘Norseman’表现最明显。可见, 通过借鉴相关学科、物种的研究思路与方法, 目前已有充分的证据表明光敏色素对秋眠性的作用, 这为发现秋眠性调控机理揭开了第一层面纱。

进一步的研究发现, 植物激素也是秋眠性的关键调控因子之一, 作用于低温驯化反应(Han *et al.*, 2011)。植物内源激素如生长素(IAA)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)、细胞分裂素(CKs)、玉米素(ZR)和脱落酸(ABA)在一定浓度下主要影响植物的生长、分化和发育等生理过程, 且在植物地上部和地下部物质的远距离运输中也起到了重要的作用(van Dam & Bezemer, 2006)。研究发现, 紫花苜蓿在短日照、低温两种信号因子下, ABA含量增加, IAA等则下降, 且随着秋眠性的增强, ABA/IAA、ABA/GA<sub>3</sub>、ABA/ZR升高的趋势更强(Wang *et al.*, 2008), 王成章等进一步外源施以ABA, 发现随秋眠性增强, 内源ABA合成量呈

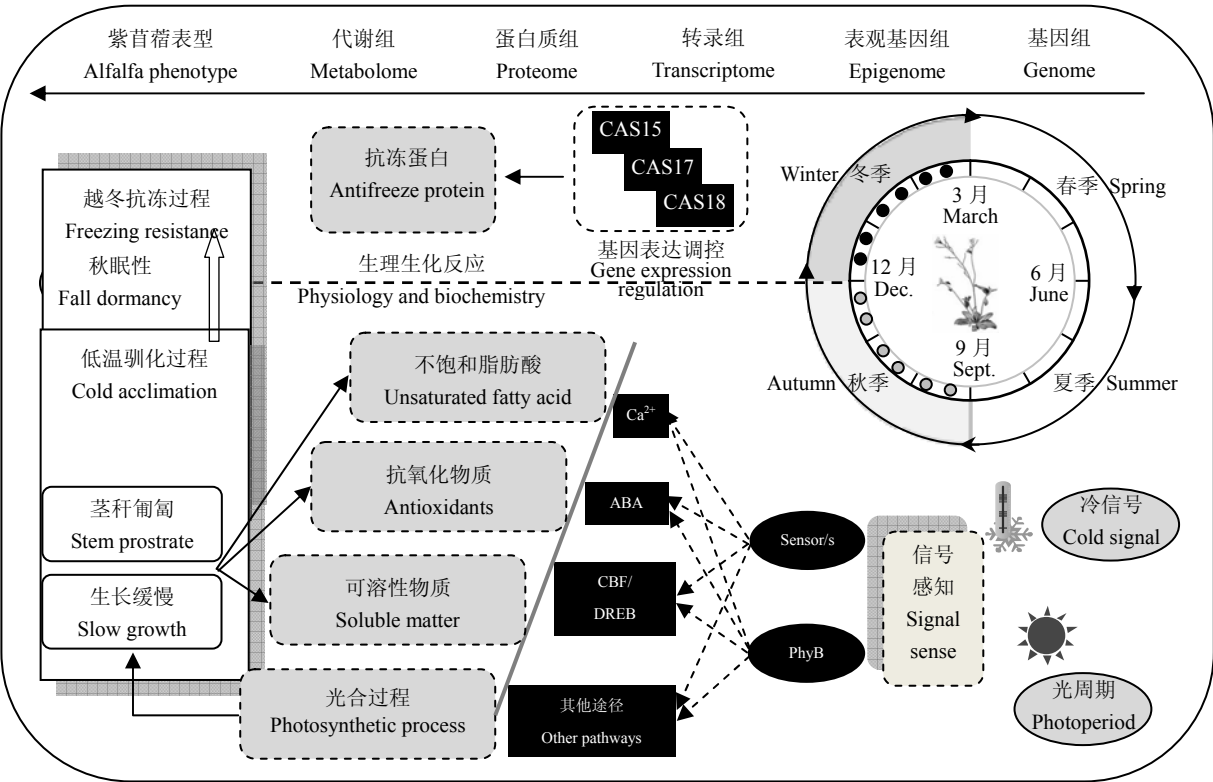


图2 紫花苜蓿秋眠性对低温驯化与越冬耐寒适应可能的作用过程。  
Fig. 2 Possible function process of fall dormancy and its control on the cold acclimation and winter hardiness of alfalfa.



递增趋势, 而IAA、GA<sub>3</sub>合成量呈递减规律(王成章等, 2006), 因此, ABA合成增加可能是导致植物晚秋生长缓慢、导致秋眠的关键因子, 这为探讨紫花苜蓿秋眠调控机理提供了重要线索。结合前述光敏色素的研究成果, 有研究推测, PHYA、PHYB可能影响了ABA、IAA、GA<sub>3</sub>、ZR等的合成量, 进而调节了秋眠(樊文娜等, 2014)。

可溶性糖的增加、抗氧化物质的积累、膜结构不饱和脂肪酸的提高等, 也是秋眠性影响紫花苜蓿低温驯化的重要途径(赵金梅等, 2009)。可溶性物质的积累对于适应低温环境具有重要作用, 研究发现, 在晚秋环境下, 地上部可溶性糖含量随着时间延长呈降低趋势, 主要与可溶性糖向地下根系的转移有关, 而且这种规律随着秋眠性的增强而增强(刘磊等, 2009)。关于抗氧化物质的积累, 有报道认为, 不同秋眠型紫花苜蓿叶片中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性受短日照调控而提高, 推测SOD和POD与紫花苜蓿的秋眠表现、低温驯化过程中的活性氧清除有关联(史莹华等, 2009)。游离脯氨酸是植物细胞内重要的渗透调节物质, 能增加胞内溶质浓度, 降低细胞成冰, 防止细胞过度脱水, 从而减少低温对细胞的伤害(刘磊等, 2009), 紫花苜蓿经过短日照或低温处理, 各个秋眠型品种游离脯氨酸含量都迅速增加, 远大于对照中的脯氨酸含量, 且无论是秋眠型品种、半秋眠型品种, 还是非秋眠型品种, 经缩短日照处理后脯氨酸含量都显著高于经降温处理后的含量(万里强等, 2012), 这反映出不同秋眠级品种脯氨酸含量受光长缩短的影响都大于降温的影响, 同时, 进一步发现脯氨酸在晚秋短日照、低温信号下的积累在秋眠性较强的品种中更为明显(万里强等, 2012)。

### 3.2 秋眠性影响低温驯化的分子机制

随着分子生物学、生物信息学的迅速发展, 为从分子角度揭示紫花苜蓿秋眠性影响低温驯化的调控机制提供了重要基础。总的来看, 目前对紫花苜蓿低温驯化的分子机制的研究, 仍远远落后于对一些主要作物的相关认知。有研究概括认为, 植物抗寒性的遗传机制与调控主要通过5条路径实现(徐呈祥, 2012): (1)丰富多样的植物低温诱导蛋白; (2)低温转录因子DREB/CBF (dehydration responsive element binding protein /C-repeat binding factor)可同时调控多个植物低温诱导基因的表达; (3) DREB/CBF

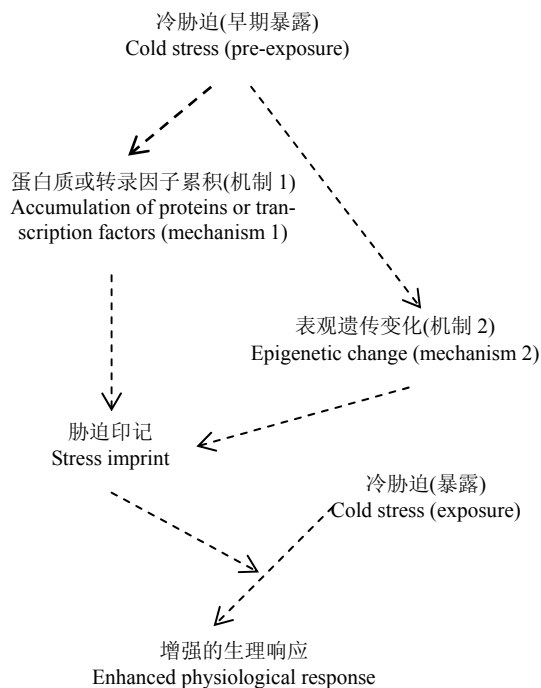
与辅助因子相互作用调控下游基因表达; (4) Ca<sup>2+</sup>、ABA及蛋白质磷酸化上游调控低温诱导基因表达, 以及不饱和脂肪酸酶基因的表达。此外, 研究表明紫花苜蓿秋眠性的分化具有复杂的遗传背景, 采用Scot标记、SRAP标记等手段, 发现标记聚类结果尽管能在一定程度上反映不同秋眠级紫花苜蓿的亲缘关系, 但这种根据聚类结果预测的亲缘关系与实际的情况并不完全一致(于林清等, 2009; 何庆元等, 2012), 足见秋眠性的遗传机理的复杂性。

关于秋眠性的分子调控机制, 我国学者的研究在国际上相对系统, 其中王成章研究团队的报道相对较多。由于生理生态学的相关研究已经探明, 光敏色素在紫花苜蓿秋眠性的调控中起到了重要作用, 因此, 学者们对秋眠性分子调控机理的研究, 主要是从光周期受体及细胞信号转导等相关过程开始的。近年来, 在基础性的基因克隆与功能验证等方面, 已经开展了大量工作。杨玲玲最早成功克隆了PHYA基因, 获得了该基因的序列(杨玲玲, 2008), 随后PHYB基因被成功克隆(李平等, 2011), 为进一步研究光周期诱导对PHYA、PHYB基因的表达调控提供了重要基础。随后, 张亚军等(2010)和朱见明等(2011)分别成功地构建了紫花苜蓿PHYA和PHYB的RNA干扰表达载体, 这些工作为研究PHYA和PHYB在调控紫花苜蓿秋眠性的功能与过程中的作用奠定了基础。

光周期是调控紫花苜蓿秋眠性的主要环境信号, 在有关光周期对不同秋眠型紫花苜蓿PHYA、PHYB基因表达量的研究中, 发现短日照信号刺激了这些基因的表达, 与生理生化水平的研究结果一致(樊文娜等, 2014), 同时发现随着PHYA、PHYB基因表达上调, ABA合成增加, GA<sub>3</sub>合成则显著减少, 因此, 研究推测PHYA、PHYB影响了内源激素的合成量, 进而调控了苜蓿的秋眠。尽管最早的研究聚焦于光周期对秋眠分子过程的调控, 后来的研究进一步表明, 冷信号对PHYB基因的表达也起到了重要作用(倪俊霞等, 2013)。但目前的研究中, 对光周期信号与冷信号的信号转导过程还知之甚少, 而且对两种信号因子调控基因表达的交互作用尚不明晰。

近年来, 分子生物学的理论与技术日臻完善, 特别是表观遗传学得以迅猛发展, 为植物功能基因表达的复杂调控特性提供了有力的理论解释(图3),

在DNA未发生改变的情况下,通过DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA调控等途径影响了基因表达(Turck & Coupland, 2014),目前在秋眠性与低温驯化的调控研究中,已有探索性的试验报道。Fan等(2014)首次通过高通量测序技术,比较分析了紫花苜蓿品种‘Maverick’(第1秋眠级)和‘CUF101’(第9秋眠级)在秋眠过程中的MicroRNA表达谱的差异,发现28个miRNA参与了秋眠性的调控,其中含20个已知miRNA和8个新报道miRNA,这一开创性的研究对将来进一步揭示在秋眠过程中由miRNA介导的相关基因表达的调控机理奠定了重要基础。



**图3** 表观遗传和转录因子在植物冷信号应答中的作用。根据相关文献(Bruce *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011; Grativol *et al.*, 2012)重绘。

**Fig. 3** The role of epigenetics and transcription factors in plant response to cold signal. The figure was redrawn according to the related literatures (Bruce *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011; Grativol *et al.*, 2012).

## 4 秋眠性对紫花苜蓿越冬耐寒适应的作用机理

### 4.1 越冬紫花苜蓿冻害致死机理

迄今,关于越冬紫花苜蓿的冻害致死机理报道有限。在相对寒冷的中高纬度地区,关于冻害致死特征与返青特性,孙启忠等(2004)概括认为,紫花

苜蓿的越冬器官一根颈和根在越冬受冻后,主要有4种不同程度的表现:(1)根颈未受冻,能正常返青,表现为无受冻痕迹;(2)根颈上端受冻,推迟返青15–20天,表现为膨大的根颈上端受冻变黑、腐烂,根颈大部 and 根保持鲜嫩状,根颈下端4周可再产生新芽;(3)根颈全部受冻,不能返青,表现为膨大的根颈全部受冻变黑、腐烂,下端的根保持鲜嫩,但已不能再生新芽;(4)根颈和根受冻,不能返青,表现为根颈和根全部受冻呈干枯状或变黄腐烂而死亡。因此,秋眠性较强的紫花苜蓿品种之所以能提高越冬存活率,关键在于通过秋季低温驯化、越冬耐寒适应,增强了根颈和根系的抗冻性。相关研究发现,以细胞是否结冰为依据,植物寒害区分为低温冷害(>0 °C)和低温冻害(<0 °C),它们引发的植物致死机理不尽相同(曹琴等, 2004)。一般来讲,冷害最先表现在膜系统,0 °C以上低温能改变磷脂双层膜的膜相,使蛋白质从膜上解离,并发生膜融合,导致细胞膜正常功能紊乱(Janská *et al.*, 2010)。冻害则主要是细胞结冰伤害,通常细胞间结冰比细胞内结冰的伤害更大,由于冰晶溶液比液态溶液的水势低得多,并且温度越低水势差值越大,结冰导致细胞原生质过度脱水,引发蛋白质变性,而且冰晶导致细胞器的机械损伤,导致植物的越冬器官死亡(Liu & Osborne, 2013)。一般经历低温驯化的植物,其细胞的抗冻性大大增强,目前对其中的作用机制,以及秋眠性的差异在其中扮演什么样的角色仍不清楚,需进一步的试验验证。

### 4.2 紫花苜蓿秋眠性导致越冬耐寒的适应机制

低温驯化与越冬抗冻性有紧密的联系,研究表明,植物经过低温驯化后,增加了细胞膜不饱和脂肪酸的含量,从而提高了膜的抗冻性,同时,低温驯化提高植物的抗氧化能力,提高细胞内可溶性物质等的含量,增强抗冻能力(Castonguay *et al.*, 2013)。但仅就紫花苜蓿而言,基于目前的研究,究竟秋眠性的提高如何强化其在秋天的低温驯化反应,从而完成低温耐寒的适应准备,进而提高植物的越冬率,尚不太清楚。

越冬耐寒适应机制是一个国际性难题,关于植物的抗寒性,目前多数的报道通过大田试验或室内模拟集中于秋季低温驯化的研究,而对植物越冬期抗冻性的维持机制及分子过程知之甚少。紫花苜蓿越冬的遗传差异和某些越冬器官的生理变化有关,



某些休眠、抗寒的品种与根和根颈中糖含量的积累有关, 尤其与寡糖中的棉子糖家族(raffinose family oligosaccharide, RFO)紧密相关, 相反, 非休眠、不抗寒品种的根和芽中淀粉浓度较高(Castonguay *et al.*, 1995), 因此, 根颈和根中RFO等糖的积累而不是总的非结构性碳水化合物水平影响了紫花苜蓿的抗寒性。也有研究报道含氮化合物在越冬期的根中可以积累, 可作为来年春季返青和收获后再生的一种氮源(Noquet *et al.*, 2001), 表现在休眠、抗寒品种较非休眠品种的根中积累更多的蛋白质和诱导寒冷的多肽。在分子水平上, 研究者们已经分离出一些紫花苜蓿抗寒基因, Cunningham等(2001)对已公认的控制紫花苜蓿抗寒的基因Root-CAR1进行克隆, 发现紫花苜蓿‘Norseman’、‘Wadi Qurayat’品种的根中该基因转录产物的丰度越高, 紫花苜蓿在冬季所受的伤害越小(即抗寒性越强), 说明低温驯化Root-CAR1基因的表达与抗寒性呈正相关关系, 参与了紫花苜蓿的越冬抗寒过程。

紫花苜蓿根颈和根系在冬季极端低温下能够安全越冬, 主要与抗冻基因的表达与抗冻蛋白的积累有关(郭瑞萍, 2007)。研究发现, 抗冻蛋白可降低冰点, 修饰冰晶形态, 避免植物越冬器官胞内结冰, 维持细胞膜结构及生物大分子的低温稳定性, 这主要是通过胞外结冰和细胞液的过冷却作用来实现的(王俊峰, 2012)。具体而言, 其作用为: (1)作为抗冻剂, 阻止冰晶的生成; (2)作为防脱水剂, 防止脱水伤害细胞; (3)大分子物质的脱水忍耐性。目前, 在CAS基因家族中, 紫花苜蓿的CAS15A、CAS15B、CAS17、CAS18、CAS19等抗冻基因已相继被分离出来, 它们属于冷诱导基因, 低温会诱导其过量表达, 可有效地提高对低温冷冻的适应能力(Mohapatra *et al.*, 1989; Monroy *et al.*, 1993; 郭瑞萍, 2007)。

## 5 问题和展望

综上所述, 休眠性影响了紫花苜蓿的低温驯化与越冬耐寒适应过程, 该研究命题与科学理论的演进和苜蓿产业的布局紧密相关, 无疑是当今乃至未来至关重要的一个科学问题。关于紫花苜蓿休眠性如何影响其低温驯化的生理生态过程的研究较多, 而对相关的细胞信号转导、基因表达调控过程, 以及越冬耐寒适应的分子机制尚知之甚少, 特别是缺乏在全基因组水平以及全球尺度下对休眠性分异机

理的解析, 成为高产、抗逆紫花苜蓿栽培管理和新品种培育的重大理论鸿沟。因此, 关于休眠性与抗寒性的关系, 建议未来加强以下几个方面的研究:

1)光周期、冷信号对休眠性作用的基因表达调控机制。大量研究表明, 植物对环境应答的基因表达调控机制十分复杂, 受基因特异表达及DNA甲基化修饰、MicroRNAs等的影响, 目前已经有研究初步报道了紫花苜蓿休眠性与MicroRNAs的相关成果(Fan *et al.*, 2014), 未来亟需进一步研究光周期、低温引发休眠性的信号转导通路, 分析两种信号因子的交互作用机理, 分析休眠性对晚秋紫花苜蓿匍匐生长反应、地上器官衰老作用对低温驯化过程的生物学含义, 进一步揭示其分子机制。

2)紫花苜蓿休眠性与抗寒性的起源进化及其遗传机理。两千年来, 伴随着战争、商贸和传教士的足迹, 紫花苜蓿已在全球主要适宜种植区传播和栽培, 光、温条件差异迥异, 长期的气候生境差异及人类驯化可能是休眠性得以进化的重要原因(Hanson *et al.*, 1988; Michaud *et al.*, 1988), 迄今, 我们对紫花苜蓿休眠性与抗寒性的起源进化及其遗传机理的了解仍极为有限, 未来的研究有必要通过全球科学家的努力, 结合基因组学手段, 破解休眠性与抗寒性进化的遗传机理, 为培育高产、抗逆新品种提供解决方案。

3)休眠性影响下的越冬耐寒适应与低温驯化的关联机理。研究表明, 植物经过低温驯化后, 增加了细胞膜不饱和脂肪酸的含量, 从而提高膜的抗冻性, 同时, 低温驯化提高植物的抗氧化能力, 提高细胞内可溶性物质等的含量, 增强抗冻能力(Ensminger *et al.*, 2006)。但目前关于紫花苜蓿越冬耐寒适应能力与低温驯化的关联机理, 人们尚知之甚少, 特别是休眠性在其中的影响机制, 仍属未知。

4)越冬紫花苜蓿致死机理与耐寒适应的分子机制。强休眠性的紫花苜蓿品种在-40℃以下的极端低温下亦可安全越冬, 而弱休眠性的品种在0℃以上的低温环境即可致死, 次年不能返青, 目前, 仍不清楚紫花苜蓿低温乃至冷冻胁迫下细胞的膜结构稳定机制, 亦不清楚休眠性作用于抗冻蛋白表达的信号通路、基因表达调控机制, 因此, 需要研究越冬紫花苜蓿致死机理与耐寒适应的分子机制。

5)抗寒高产兼有型紫花苜蓿的遗传改良。在紫花苜蓿遗传资源的自然进化中, 抗寒和高产两个性

状往往不能兼顾(Perry *et al.*, 1987), 如何培养抗寒高产兼有型紫花苜蓿一直是学术界的难题, 但通过基因工程方法使之成为可能。Brummer等(2000)利用半秋眠型紫花苜蓿作为亲本进行杂交, 在分离世代的种群中发现抗寒和高产这两种特性并不存在绝对的遗传关联性, 故可从控制抗寒性的诸多途径中筛选出农艺学上所需要的基因型。未来通过研究, 挖掘相关性状的主效基因, 通过生物工程技术手段培育抗寒高产兼有型紫花苜蓿品种, 将是一个长久的命题。

6)不同秋眠型紫花苜蓿的生产管理耦合优化模式。相关研究表明, 在相同的栽培管理模式下, 紫花苜蓿的产量与抗性之间、产量与品质之间具有一定的权衡关系(Rimi *et al.*, 2012, 2014), 秋眠性是一个重要的影响因素(Xu *et al.*, 2012; 马力等, 2014), 这成为生产中的一个矛盾, 但通过合理的栽培管理措施, 在一定的阈值范围内, 可兼顾产量、抗性、品质等关键要素(Chen *et al.*, 2014), 但在目前研究尚且薄弱, 未来需要根据紫花苜蓿秋眠性的强弱, 考虑灌水、施肥、刈割制度等管理要素, 建立相应的基于秋眠性的生产管理耦合优化模式, 提高优质、高产草产品的综合产出。

**基金项目** 中国农业科学院科技创新工程、公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203042)、现代农业产业技术体系项目(CARS-35)和内蒙古自治区科技重大专项。

## 参考文献

- Barnes DK, Smith DM, Stucker RE, Elling LJ (1979). Fall dormancy in alfalfa: A valuable predictive tool. In: Report of the 26th Alfalfa Improvement Conference. South Dakota State University, Brookings, USA. 34.
- Barrero-Gil J, Salinas J (2013). Post-translational regulation of cold acclimation response. *Plant Science*, 205–206, 48–54.
- Bauchan GR, Hossain MA (2001). Distribution and characterization of heterochromatic DNA in the tetraploid African population alfalfa genome. *Crop Science*, 41, 1921–1926.
- Brouwer DJ, Duke SH, Osborn TC (2000). Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa. *Crop Science*, 40, 1387–1396.
- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA (2007). Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173, 603–608.
- Brummer EC, Moore KJ, Bjork NC (2002). Agronomic consequences of dormant-nondormant alfalfa mixtures. *Agronomy Journal*, 94, 782–785.
- Brummer EC, Shah MM, Luth D (2000). Reexamining the relationship between fall dormancy and winter hardiness in alfalfa. *Crop Science*, 40, 971–977.
- Busbice TH, Wilsie CP (1965). Fall growth, winterhardiness, recovery after cutting and wilt resistance in f2 progenies of vernal × DuPuits alfalfa crosses. *Crop Science*, 5, 429–432.
- Cao Q, Kong WF, Wen PF (2004). Plant freezing tolerance and genes express in cold acclimation: A review. *Acta Ecologica Sinica*, 24, 806–811. (in Chinese with English abstract) [曹琴, 孔维府, 温鹏飞 (2004). 植物抗寒及其基因表达研究进展. *生态学报*, 24, 806–811.]
- Castonguay Y, Bertrand A, Michaud R, Laberge S (2011). Cold-induced biochemical and molecular changes in alfalfa populations selectively improved for freezing tolerance. *Crop Science*, 51, 2132–2144.
- Castonguay Y, Dubé MP, Cloutier J, Bertrand A, Michaud R, Laberge S (2013). Molecular physiology and breeding at the crossroads of cold hardiness improvement. *Physiologia Plantarum*, 147, 64–74.
- Castonguay Y, Nadeau P, Lechasseur P, Chouinard L (1995). Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. *Crop Science*, 35, 509–516.
- Chen JS, Zhu RF, Zhang YX, Cao G, Di GL (2014). Yields of alfalfa varieties with different fall dormancy levels in northeast China. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 167–172.
- Chen THH, Chen FSC (1988). Relations between photoperiod, temperature, abscisic acid, and fall dormancy in alfalfa (*Medicago sativa*). *Canadian Journal of Botany*, 66, 2491–2498.
- Chen TX, Wang TM, Lu XS (2011). Evaluation on the salt tolerance of fall nondormancy standard varieties of alfalfa at the germination period. *Pratacultural Science*, 28, 121–126. (in Chinese with English abstract) [陈托兄, 王铁梅, 卢欣石 (2011). 紫花苜蓿非秋眠型标准品种种子萌发期耐盐性评价. *草业科学*, 28, 121–126.]
- Chen WW, Wan LQ, He F, Li XL, Liu SJ (2010). Effect of temperature and light length on the morphological traits of three fall-dormant class varieties of *Medicago sativa*. *Pratacultural Science*, 27(12), 113–119. (in Chinese with English abstract) [陈玮玮, 万里强, 何峰, 李向林, 刘树军 (2010). 温度和光照时间对3个秋眠型紫花苜蓿品种形态特征的影响. *草业科学*, 27(12), 113–119.]
- Cole DF, Dobrenz AK (1970). Stomate density of alfalfa (*Medicago Sativa* L.). *Crop Science*, 10, 61–63.
- Cunningham SM, Gana JA, Volenec JJ, Teuber LR (2001). Winter hardiness, root physiology, and gene expression in successive fall dormancy selections from ‘Mesilla’ and ‘CUF 101’ alfalfa. *Crop Science*, 41, 1091–1098.

- Cunningham SM, Volenec JJ, Teuber LR (1998). Plant survival and root and bud composition of alfalfa populations selected for contrasting fall dormancy. *Crop Science*, 38, 962–969.
- Daday H (1964). Genetic relationship between cold hardiness and growth at low temperature in *Medicago Sativa*. *Hereditas*, 19, 173–179.
- Ensminger I, Busch F, Huner NPA (2006). Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 126, 28–44.
- Fan WN, Sun XG, Ni JX, Du HQ, Shi YH, Yan XB, Wang CZ (2014). Effect of photoperiod on phytochromes and endogenous hormones of alfalfa with different fall-dormancies. *Acta Prataculturae Sinica*, 23(1), 177–184. (in Chinese with English abstract) [樊文娜, 孙晓格, 倪俊霞, 杜红旗, 史莹华, 严学兵, 王成章 (2014). 光周期对不同秋眠型苜蓿光敏色素和内源激素的影响. 草业学报, 23(1), 177–184.]
- Fan WN, Yan XB, Wang CZ (2010). The regulation mechanism of the fall dormancy in alfalfa. *Pratacultural Science*, 27(11), 109–114. (in Chinese with English abstract) [樊文娜, 严学兵, 王成章 (2010). 苜蓿秋眠性调控机理的初步研究. 草业科学, 27(11), 109–114.]
- Fan WN, Zhang SH, Du HQ, Sun XG, Shi YH, Wang CZ (2014). Genome-wide identification of different dormant *Medicago sativa* L. MicroRNAs in response to fall dormancy. *PLoS ONE*, 9, e114612.
- Gao F (2012). *Study on Climatic Regionalization of Alfalfa Based on Fall Dormancy in China*. Master degree dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 102–119. (in Chinese) [高菲 (2012). 基于秋眠性的中国紫花苜蓿气候适应区划研究. 硕士学位论文, 北京林业大学, 北京. 102–119.]
- Gao F, Lu XS (2012). Effect of meteorological factors on fall mowing height of alfalfa with different fall dormancy in Beijing. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28(14), 17–22. (in Chinese with English abstract) [高菲, 卢欣石 (2012). 气象因子对北京不同秋眠等级苜蓿秋季刈割后再生高度的影响. 中国农学通报, 28(14), 17–22.]
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PCG (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819, 176–185.
- Guo RP (2007). *Study on Cloning and Expression Analysis of Cold Tolerance Genes in Different Fall Dormancy Alfalfa*. Master degree dissertation, Jilin University, Changchun. 34–61. (in Chinese with English abstract) [郭瑞萍 (2007). 不同休眠级苜蓿品种抗寒基因克隆与表达差异性研究. 硕士学位论文, 吉林大学, 长春. 34–61.]
- Han QF, Meng HT, Jia ZK, Xu LF, Wu FP, Ding RX (2011). Characteristics of endogenous hormone variations in the roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars of different fall dormancies during spring regrowth stage. *Agricultural Sciences in China*, 10, 1032–1040.
- Hanson AA, Barnes DK, Hill RR (1988). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, USA.
- He QY, Wang WB, Yang HY, Xiang SH, Zhou LY, Wang SH (2012). Optimization of SCoT reaction system and genetic diversity of different fall dormancy alfalfa. *Acta Prataculturae Sinica*, 21(2), 133–140. (in Chinese with English abstract) [何庆元, 王吴斌, 杨红燕, 向仕华, 周丽英, 王松华 (2012). 利用SCoT标记分析不同秋眠型苜蓿的遗传多样性. 草业学报, 21(2), 133–140.]
- Hong FZ (2009). *Alfalfa Science*. China Agriculture Press, Beijing. 1–35. (in Chinese) [洪绶曾 (2009). 苜蓿科学. 中国农业出版社, 北京. 1–35.]
- Janská A, Maršík P, Zelenková S, Ovesná J (2010). Cold stress and acclimation—What is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, 12, 395–405.
- Kallenbach RL, Roberts CA, Teuber LR, Bishop-Hurley GJ, Benedict HR (2001). Estimation of fall dormancy in alfalfa by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*, 41, 774–777.
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22, 371–377.
- Li DM, Tan Y, Yu Q, Chen XD, Li L, Zhang HS, Gao DS (2011). Effects of photoperiod on alternative respiration pathway in nectarine flower buds during dormancy induction. *Agricultural Sciences in China*, 10, 1881–1886.
- Li P, Sun J, Xing JJ (2012). Origin and dissemination of alfalfa. *Inner Mongolia Prataculture*, 24(1), 5–8. (in Chinese) [李平, 孙杰, 邢建军 (2012). 论苜蓿的起源与传播. 内蒙古草业, 24(1), 5–8.]
- Li P, Yang LL, Chen QX, Shi YH, Yan XB, Chen ZK, Wang CZ (2011). Two strategies of cloning *Medicago sativa* phytochrome A and B gens. *Acta Prataculturae Sinica*, 20(6), 85–92. (in Chinese with English abstract) [李平, 杨玲玲, 陈其新, 史莹华, 严学兵, 陈占宽, 王成章 (2011). 两种策略分别克隆紫花苜蓿光敏色素A、B基因. 草业学报, 20(6), 85–92.]
- Li XF, Wang Y (2009). Regulation of plant dormancy. *Plant Physiology Communications*, 45, 1045–1049. (in Chinese with English abstract) [李方, 王洋 (2009). 植物休眠的分子调控. 植物生理学通讯, 45, 1045–1049.]
- Li XL, Wan LQ (2004). Alfalfa fall dormancy and its relationship to winter hardiness and yield. *Acta Prataculturae Sinica*, 13(3), 57–61. (in Chinese with English abstract) [李向林, 万里强 (2004). 苜蓿秋眠性及其与抗寒性和产量

- 的关系. 草业学报, 13(3), 57–61.]
- Liu L, Chen LB, Li ZY, Wang MZ, Guo SJ (2009). Effect of temperature in late autumn on free proline, soluble sugar and POD in alfalfa. *Pratacultural Science*, 26(10), 89–93. (in Chinese with English abstract) [刘磊, 陈立波, 李志勇, 王美珍, 郭淑晶 (2009). 晚秋温度对苜蓿地上部游离脯氨酸、可溶性糖和POD活性的影响. 草业科学, 26(10), 89–93.]
- Liu MZ, Osborne CP (2013). Differential freezing resistance and photoprotection in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> eudicots and grasses. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2183–2191.
- Lu XS, He Q (1997). Genetic diversity for Chinese alfalfa cultivars and landraces. *Grassland of China*, (6), 1–6. (in Chinese with English abstract) [卢欣石, 何琪 (1997). 中国苜蓿品种资源遗传多样性研究. 中国草地, (6), 1–6.]
- Lu XS, Shen YL (1991). Research and utilization on fall dormancy of alfalfa. *Foreign Animal Science· Grassland and Forage Grass*, (4), 1–4. (in Chinese) [卢欣石, 申玉龙 (1991). 苜蓿秋眠性研究与利用. 国外畜牧学·草原与牧草, (4), 1–4.]
- Ma L, Zhou P, Gao XY, Lü AM, An Y (2014). Growth and nutrient dynamics of non-fall dormancy and semi-fall dormancy alfalfa cultivars in winter fallow land of South-East China. *Chinese Journal of Grassland*, 36(5), 38–45. (in Chinese with English abstract) [马力, 周鹏, 高小叶, 吕爱敏, 安渊 (2014). 非秋眠和半秋眠紫花苜蓿品种在华东冬闲田的生长规律和营养动态. 中国草地学报, 36(5), 38–45.]
- Megee CR (1935). A search for factors determining winter hardiness in alfalfa. *Agronomy Journal*, 27, 685–698.
- Michaud R, Lehman WF, Rumbaugh MD (1988). World distribution and historical developments. In: Hanson AA, Barnes DK, Hill RR eds. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, USA. 25–91.
- Mohapatra SS, Wolfrum L, Poole RJ, Dhindsa RS (1989). Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiology*, 89, 375–380.
- Monroy AF, Castonguay Y, Laberge S, Sarhan F, Vezina LP, Dhindsa RS (1993). A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiology*, 102, 873–879.
- Muller MH, Poncet C, Prosperi JM, Santoni S, Ronfort J (2006). Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: Inferences from nuclear sequence polymorphism. *Molecular Ecology*, 15, 1589–1602.
- Nanni V, Paolini M, Innocenti A, Mulè P, Vargiu M (2014). Evaluation of dormancy and winter hardiness of alfalfa (*Medicago sativa* L.) experimental lines, obtained by crossing parental lines characterized within the framework of the permed project. In: Sokolović D, Hayghe C, Radović J eds. *Quantitative Traits Breeding for Multifunctional Grasslands and Turf*. Springer, Netherlands. 167–171.
- Ni JX, Li GZ, Shi YH, Yan XB, Fan WN, Du HQ, Wang CZ (2013). Effects of temperature on the phytochrome and endogenous hormones of different fall dormancy alfalfa. *Acta Agrestia Sinica*, 21, 708–713. (in Chinese with English abstract) [倪俊霞, 李冠真, 史莹华, 严学兵, 樊文娜, 杜红旗, 王成章 (2013). 温度对不同秋眠型紫花苜蓿光敏色素和内源激素的影响. 草地学报, 21, 708–713.]
- Noquet C, Avice JC, Ourry A, Volenec JJ, Cunningham SM, Boucaud J (2001). Effects of environmental factors and endogenous signals on n uptake, n partitioning and taproot vegetative storage protein accumulation in *Medicago sativa*. *Functional Plant Biology*, 28, 279–287.
- Oakley RA, Westover HL (1921). Effect of the length of day on seedlings of alfalfa varieties and the possibility of utilizing this as a practical means of identification. *Journal of Agricultural Research*, 21, 594–607.
- Pembleton KG, Sathish P (2014). Giving drought the cold shoulder: A relationship between drought tolerance and fall dormancy in an agriculturally important crop. *AOB Plants*, 6, plu012.
- Perry MC, McIntosh MS, Wiebold WJ, Welterlen M (1987). Genetic analysis of cold hardiness and dormancy in alfalfa. *Genome*, 29, 144–149.
- Qin FF, Li Q, Cui ZM, Li HP, Yang ZR (2012). Leaf anatomical structures and ecological adaptabilities to light of three alfalfa cultivars with different fall dormancies under shading during overwintering. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 36, 333–345. (in Chinese with English abstract) [覃凤飞, 李强, 崔卓茗, 李洪萍, 杨智然 (2012). 越冬期遮阴条件下3个不同秋眠型紫花苜蓿品种叶片解剖结构与其光生态适应性. 植物生态学报, 36, 333–345.]
- Rimi F, Macolino S, Leinauer B, Lauriault LM, Ziliotto U (2012). Fall dormancy and harvest stage effects on alfalfa nutritive value in a subtropical climate. *Agronomy Journal*, 104, 415–422.
- Rimi F, Macolino S, Leinauer B, Lauriault LM, Ziliotto U (2014). Fall dormancy and harvest stage impact on alfalfa persistence in a subtropical climate. *Agronomy Journal*, 106, 1258–1266.
- Santos AP, Serra T, Figueiredo DD, Barros P, Lourenço T, Chander S, Oliveira MM, Saibo NJ (2011). Transcription regulation of abiotic stress responses in rice: A combined action of transcription factors and epigenetic mechanisms. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 15, 839–857.
- Schwab PM, Barnes DK, Sheaffer CC (1996). The relationship between field winter injury and fall growth score for 251 alfalfa cultivars. *Crop Science*, 36, 418–426.
- Segovia-Lerma A, Murray LW, Townsend MS, Ray IM (2004).

- Population-based diallel analyses among nine historically recognized alfalfa germplasms. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1568–1575.
- Sheaffer CC, Barnes DK, Warnes DD, Lueschen WE, Ford HJ, Swanson DR (1992). Seeding-year cutting affects winter survival and its association with fall growth score in alfalfa. *Crop Science*, 32, 225–231.
- Shi YH, Zhang WY, Yu XD, Wang CZ (2009). Effect of photoperiod on SOD and POD activities in alfalfa. *Grassland and Turf*, (1), 74–77. (in Chinese with English abstract) [史莹华, 张伟毅, 于晓丹, 王成章 (2009). 光周期对紫花苜蓿SOD、POD活性的影响. *草原与草坪*, (1), 74–77.]
- Smith D (1961). Association of fall growth habit and winter survival in alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science*, 41, 244–251.
- Stout DG, Hall JW (1989). Fall growth and winter survival of alfalfa in interior British Columbia. *Canadian Journal of Plant Science*, 69, 491–499.
- Sun QZ, Wang YQ, Hou XY (2004). Alfalfa winter survival research summary. *Pratacultural Science*, 21(3), 21–25. (in Chinese with English abstract) [孙启忠, 王育青, 侯向阳 (2004). 紫花苜蓿越冬性研究概述. *草业科学*, 21(3), 21–25.]
- Sun QZ, Wang ZL, Xu LJ (2014). *Alfalfa in Arid Regions*. Science Press, Beijing. 18–39. (in Chinese) [孙启忠, 王宗礼, 徐丽君 (2014). 旱区苜蓿. 科学出版社, 北京. 18–39.]
- Teuber LR, Taggard KL, Gibbs LK, Mccaslin MA, Peterson MA, Barnes DK (1998). *Fall Dormancy*. <http://www.naaic.org/studies/Dormancy2.html>. Cited: Jan. 2015.
- Turck F, Coupland G (2014). Natural variation in epigenetic gene regulation and its effects on plant developmental traits. *Evolution*, 68, 620–631.
- van Dam NM, Bezemer TM (2006). Chemical communication between roots and shoots: Towards an integration of aboveground and belowground induced responses in plants. In: Dicke M ed. *Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem*. Springer, Dordrecht. 127–143.
- Wan LQ, Li XL, Yuan QH, He F, Chen WW (2012). Effects of reduction of temperature and light length on physiological traits of three fall-dormancy classes *Medicago sativa* varieties. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 25, 455–461. (in Chinese with English abstract) [万里强, 李向林, 袁庆华, 何峰, 陈玮玮 (2012). 降温与光长缩短对3个秋眠型苜蓿生理指标变化的影响. *西南农业学报*, 25, 455–461.]
- Wang CZ, Ma BL, Han JF, Wang YH, Gao YG, Hu XF, Zhang CM (2008). Photoperiod effect on phytochrome and abscisic acid in alfalfa varieties differing in fall dormancy. *Journal of Plant Nutrition*, 31, 1257–1269.
- Wang CZ, Ma BL, Yan XB, Han JF, Guo YX, Wang YH, Li P (2009). Yields of alfalfa varieties with different fall-dormancy levels in a temperate environment. *Agronomy Journal*, 101, 1146–1152.
- Wang CZ, Pan XJ, Zhang CM, Hu XF, Yang YX (2006). Effects of exogenous ABA on hormone content in different varieties of fall dormancy *Medicago sativa* varieties. *Acta Pratacultural Sinica*, 15(2), 30–36. (in Chinese with English abstract) [王成章, 潘晓建, 张春梅, 胡喜峰, 杨雨鑫 (2006). 外源ABA对不同秋眠型苜蓿品种植物激素含量的影响. *草业学报*, 15(2), 30–36.]
- Wang HL, Yue ZW, Lu XS (2011). Study on estimation of fall dormancy in alfalfa by near infrared reflectance spectroscopy and support vector machine model. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 31, 1510–1513. (in Chinese with English abstract) [王红柳, 岳征文, 卢欣石 (2011). 基于近红外光谱技术与支持向量机的苜蓿秋眠类型测定研究. *光谱学与光谱分析*, 31, 1510–1513.]
- Wang JF, Kong WG, Zhang Y, Ma YM, Li NN, Ding HF (2012). Advance in expression and regulation of cold-resistant gens of plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 32, 852–858. (in Chinese with English abstract) [王俊峰, 孔维国, 张煜, 马玉敏, 李娜娜, 丁汉凤 (2012). 植物抗寒基因表达调控研究进展. *西北植物学报*, 32, 852–858.]
- Warburton ML, Smith SE (1993). Regional diversity in non-dormant alfalfas from India and the Middle East. *Crop Science*, 33, 852–858.
- Weishaar MA, Brummer EC, Volenec JJ, Moore KJ, Cunningham S (2005). Improving winter hardiness in nondormant alfalfa germplasm. *Crop Science*, 45, 60–65.
- Wisniewski M, Norelli J, Bassett C, Artlip T, Macarasin D (2011). Ectopic expression of a novel peach (*Prunus Persica*) cbf transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*, 233, 971–983.
- Xu B, Yang XC, Bai KY, Chen ZX, Qin ZH, Qiu JJ (2007). Alfalfa climatic subdivisions in China. *Acta Agrestia Sinica*, 15, 316–321. (in Chinese with English abstract) [徐斌, 杨秀春, 白可喻, 陈仲新, 覃志豪, 邱建军 (2007). 中国苜蓿综合气候区划研究. *草地学报*, 15, 316–321.]
- Xu CX (2012). Research progress on the mechanism of improving plant cold hardiness. *Acta Ecologica Sinica*, 32, 7966–7980. (in Chinese with English abstract) [徐呈祥 (2012). 提高植物抗寒性的机理研究进展. *生态学报*, 32, 7966–7980.]
- Xu DW, Lu XS (2010). Effects of solar light and temperature on fall dormancy of alfalfa in Beijing area. *Pratacultural Science*, 27(4), 112–116. (in Chinese with English abstract) [徐大伟, 卢欣石 (2010). 北京地区光温因子对不同秋眠等级苜蓿秋后再生的影响. *草业科学*, 27(4), 112–116.]
- Xu GM, Yan XB, Wang CZ, Wang YH, Fan WN (2012). Per-

- formance of alfalfa varieties with different fall dormancy across different production areas of Henan province of China. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 6197–6203.
- Yan XJ, Feng CS, Lu XS (2009). Comparative analysis of the growth among alfalfa varieties with different fall dormancy rate in Beijing. *Pratacultural Science*, 26(6), 78–83. (in Chinese with English abstract) [严秀将, 冯长松, 卢欣石 (2009). 北京地区不同秋眠级苜蓿品种生长动态比较. 草业科学, 26(6), 78–83.]
- Yang LL (2008). *Cloning of Alfalfa Phytochrome A Gene Using Rapid Amplification of cDNA Ends*. Master degree dissertation, Henan Agricultural University, Zhengzhou. 29–41. (in Chinese with English abstract) [杨玲玲 (2008). RACE法克隆紫花苜蓿光敏色素A基因. 硕士学位论文, 河南农业大学, 郑州. 29–41.]
- Yang S, Gao M, Xu C, Gao J, Deshpande S, Lin S, Roe BA, Zhu H (2008). Alfalfa benefits from *Medicago Truncatula*: The rct1 gene from *M. Truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 12164–12169.
- Yu LQ, Liu RX, Su D, Yun JF (2009). Genetic diversities of fall dormancy alfalfa based on SSR and EST-SSR. *Chinese Journal of Grassland*, 31(6), 52–58. (in Chinese with English abstract) [于林清, 刘荣霞, 苏东, 云锦凤 (2009). 利用SSR和EST-SSR技术研究不同秋眠级苜蓿遗传多样性. 中国草地学报, 31(6), 52–58.]
- Zhang YJ, Yan XB, Zhu JM, Wang CZ, Shi YH (2010). cDNA fragment cloning of phytochrome a gene from alfalfa and construction of RNAi vector. *Acta Agrestia Sinica*, 18, 897–901. (in Chinese with English abstract) [张亚军, 严学兵, 朱见明, 王成章, 史莹华 (2010). 紫花苜蓿光敏色素A基因片段的克隆及其RNA干扰载体的构建. 草地学报, 18, 897–901.]
- Zhao JM, Zhou H, Sun QZ, Guo Q, Li F (2009). Study on the influence of plant fatty acid desaturation on cold tolerance. *Pratacultural Science*, 26(9), 129–134. (in Chinese with English abstract) [赵金梅, 周禾, 孙启忠, 郭强, 李芳 (2009). 植物脂肪酸不饱和性对植物抗寒性影响的研究. 草业科学, 26(9), 129–134.]
- Zhu JM, Yan XB, Shi YH, Wang CZ (2011). Cloning of *Medicago sativa* phytochrome B cDNA and establishment of its RNA interference expression vector. *Acta Agronomica Sinica*, 37, 374–379. (in Chinese with English abstract) [朱见明, 严学兵, 史莹华, 王成章 (2011). 紫花苜蓿光敏色素B基因片段克隆及RNA干扰表达载体的构建. 作物学报, 37, 374–379.]

责任编辑: 罗天祥 责任编辑: 李 敏