

苹果花芽和种子休眠过程中 *MdCibHLH1* 基因的表达分析

任怡然, 赵 强, 赵先炎, 郝玉金, 由春香*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 国家苹果工程技术研究中心, 山东泰安 271018)

摘 要: 对前期在苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 中发现的受低温诱导的 bHLH 转录因子进行了生物信息学分析, 并以层积苹果种子和苹果芽为试材, 用半定量和实时定量 PCR 技术分析其花芽休眠不同阶段的表达变化。蛋白质二级结构预测结果表明, *MdCibHLH1* 蛋白中以 α 螺旋和无规则卷曲为主, β 折叠和延伸链较少, 其中 α 螺旋 145 个 (27.31%)、 β 折叠 19 个 (3.58%)、无规则卷曲 310 个 (58.38%)、延伸链 57 个 (10.73%)。半定量和定量结果显示, 在层积的苹果种子和休眠的花芽中 *MdCibHLH1* 有相同的表达模式, 在休眠解除之前表达较高, 随着休眠的解除其表达量下调。因此推测 *MdCibHLH1* 的表达对层积的苹果种子或者花芽休眠及解除具有调控作用。

关键词: 苹果; *MdCibHLH1*; 休眠; 表达分析

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 08-1429-08

Expression Analysis of a *MdCibHLH1* Gene from Apple Flower Buds and Seeds in the Process of Dormancy

REN Yi-ran, ZHAO Qiang, ZHAO Xian-yan, HAO Yu-jin, and YOU Chun-xiang*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, National Research Center for Apple Engineering and Technology, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: A bHLH transcription factor was found from apple (*Malus × domestica* Borkh.) induced by low temperature. To understand sequence characteristics of the gene, bioinformatics analysis was carried out. Furthermore, the gene expression patterns of the laminated apple seeds and lateral flower buds were analyzed during the period of dormancy and release by semi RT-PCR and real-time PCR. On the basis of secondary structure prediction, the results showed that *MdCibHLH1* protein was mainly α -helix and random coil, the contents of β -sheet and extended strand were less, including random coil 310 (58.38%), α -helix 145 (27.31%) and β -sheet 19 (3.58%), respectively, extending chain 57 (10.73%). qRT-PCR analysis showed that the expression patterns of *MdCibHLH1* was similar in the laminated apple seeds and lateral flower buds during the period of dormancy-release. The *MdCibHLH1* expression levels highly accumulated in dormant buds or apple seeds and were gradually down-regulated during the period of the release of dormancy. These results indicated that *MdCibHLH1* might play an important role in the regulation of dormancy-release in apple seeds and buds.

收稿日期: 2015-04-07; **修回日期:** 2015-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171946); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目 (IRT1155)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: youchunxiang@126.com; Tel: 15069897490)

Key words: apple; *MdCibHLH1*; dormancy; expression analysis

bHLH 蛋白是植物第二大家族转录因子。在拟南芥中已发现有 162 个基因编码 bHLH 蛋白 (Bailey et al., 2003)。bHLH 转录因子家族具有两个保守的 bHLH 功能域: 一是分布在 N 端的碱性区域, 与 DNA 结合有关; 另一是分布在 C 端的由疏水氨基酸残基构成的 HLH 区域 (Carretero-Paulet et al., 2010)。植物中 bHLH 转录因子通常以同源二聚体或异源二聚体的形式结合到基因启动子区域的 E-Box (CANNTG) 顺式作用元件, 从而调控下游基因的表达 (Feller et al., 2011)。例如, Chinnusamy 等 (2003) 研究发现拟南芥 bHLH 转录因子 ICE1 (inducer of *CBF* expression 1) 能特异地与 *CBF3* 启动子区域的 E-Box 结合, 激活 *CBF3* 及其下游靶基因的表达, 在冷胁迫下提高植株的抗寒性。Fursova 等 (2009) 在拟南芥中分离了另一 bHLH 转录因子 ICE2, 过量表达 ICE2 能够促进 *CBF1/DREB1B* 转录因子的表达, 提高植株的抗寒性。植物茉莉酸信号途径中的抑制子 JAZ (Jasmonate ZIM-domain) 蛋白能与 bHLH 转录因子 ICE1、ICE2 相互作用, 抑制其转录功能, 从而抑制下游 CBF 及其下游靶基因的表达, 影响植物的抗冷性 (Hu et al., 2013)。Zhao 等 (2013) 在香蕉的研究中发现, bHLH 转录因子 MaMYC2s 能与 MaICE1 互作, 进而调控下游抗性基因的表达来提高香蕉果实的抗冷性。此外, 光周期相关的 bHLH 转录因子 PIF4 和 PIF7 能同 *CBF1* 和 *CBF2* 启动子区域的 G-box (CACGTG) 及 *CBF3* 启动子区域的 E-box 结合, 从而负调控 *CBFs* 的表达 (Kidokoro et al., 2009; Lee & Thomashow, 2012)。在水稻中, bHLH 转录因子 *rd22BP1* 能够绑定到 *rd22* 基因启动子的 E-box 上, 调控其转录, 提高植物对胁迫的抗性 (Abe et al., 1997); 在野生水稻中, *OsbHLH2* 基因过量表达能提高转基因植物抗氧化胁迫的能力 (Zhou et al., 2009)。在烟草和柠檬中过量表达枳中的 bHLH 转录因子 *PtrbHLH* 能够明显地提高植株的抗寒性, 进一步研究发现 *PtrbHLH* 基因能够结合到 *POD* 基因的启动子上调控其表达, 促进植物在低温胁迫下对 ROS 的清除 (Huang et al., 2013)。

落叶果树休眠的开始和解除是一个循序渐进的过程, 温度、光周期、水分等对芽的休眠及解除都会产生影响, 但温度是最主要的影响因子 (Schmitz et al., 2014), 尤其对苹果和桃等果树而言。果树芽的生理休眠和解除涉及到植物的新陈代谢、激素调节、营养物质的吸收与运输、信号转导等, 这些过程都与基因的表达调控一一对应 (王连荣 等, 2008; Footitt et al., 2013; 付立中 等, 2014)。将 *CBF1* 导入草莓, 发现草莓转基因植株的抗寒性显著强于未转基因植株 (袁维凤 等, 2006; 金万梅 等, 2007)。在苹果中过表达桃 *CBF* 基因 (*PpCBF1*), 不仅提高了对低温的抗性, 同时还表现出了典型的休眠表型, 暗示 *CBF* 基因可能与休眠诱导密切相关 (Wisniewski et al., 2011)。本实验室前期筛选到了一个受低温诱导的 bHLH 转录因子, 转基因拟南芥、烟草、苹果都能够不同程度地提高抗冷性 (Feng et al., 2012), 暗示 bHLH 转录因子可能通过调控 *CBF* 的转录表达参与苹果的休眠及解除。

本研究中对低温响应的 bHLH 转录因子在苹果花芽休眠及解除不同时期的表达进行了分析, 从分子水平揭示苹果花芽休眠及解除机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料的收集与处理

‘嘎啦’苹果 (*Malus × domestica* ‘Royal Gala’) 的花芽取自山东省泰安市夏张镇, 采样时间为 2012 年 12 月 10 日, 2013 年 2 月 12 日、3 月 6 日、3 月 23 日、3 月 30 日、4 月 6 日、4 月 13

日。设 5 个重复。样品取回后将花芽剥出迅速放入液氮中, 速冻后于 -80°C 保存备用。

将苹果种子从充分成熟的果实剥出后选择大小均匀、饱满、无病虫害的, 洗净、阴干、挂标签, 常温备用。干种子洗净用清水浸泡 24 h 后与湿度 50% 的干净细河沙混匀(沙: 种子 = 4: 1, 体积比), 于 4°C 条件下层积, 每隔 10 d 观察和统计 1 次萌发的种子数, 并且取出部分种子 -80°C 保存备用。

1.2 *MdCibHLH1* 的生物信息学分析

通过 Proteomics Server (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测 *MdCibHLH1* 的氨基酸序列、分子质量、等电点、稳定性指数等; 利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>) 进行疏水性分析; 利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 进行跨膜结构域分析; 用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白三级结构; 使用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对蛋白质二级结构进行预测; 利用 MEGA 4.0 软件, 采用 Neighbor-joining (NJ) 法构建系统发育树。

1.3 *MdCibHLH1* 在不同休眠时期的表达分析

分别提取不同时期苹果花芽和层积好种子的总 RNA, 根据大连宝生物公司 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书合成 cDNA。根据 *MdCibHLH1* 序列设计 Semi RT-PCR 引物。*MdCibHLH1*-F: 5'-ATGGACGACAGGGAGGAC-3', *MdCibHLH1*-R: 5'-GGA GGAGGAAGAGTCCAC-3'。选取 *MdActin* (GenBank accession number CN938024) 为内参基因。PCR 反应体系为: 200 ng cDNA 1 μL , 2.5 μL $10\times$ Taq buffer, 2 μL dNTPs ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 上、下游引物各 1 μL ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 0.5 μL ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) Taq 酶 (全式金, 北京), 加去离子水至 25 μL 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 72°C 5 min, 28~32 个循环; PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳。荧光定量 PCR 使用的仪器为 BIO-RAD IQ5, 所有 PCR 反应都设 3 次重复。PCR 反应体系为: SYBR Green I Master 10 μL , 上、下游引物浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板 1 μL , 加去离子水至 20 μL 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 10 min, 94°C 10 s, 60°C 60 s, 40 个循环; 每次循环第 2 步进行荧光采集, 最后退火至 65°C 。

试验结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对数据进行定量分析。

1.4 农杆菌介导的拟南芥的转化

将 *MdCibHLH1* 全长连接到过表达载体 pBI121 载体上。利用农杆菌介导法, 将过量表达载体 pBI121-*MdCibHLH1* 转入拟南芥中, 经过 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan 抗性筛选后, PCR 检测得到阳性转基因植株, 经过连续 3 代筛选得到 T3 代纯合体, 收取种子, 进行表型分析。

2 结果与分析

2.1 *MdCibHLH1* 蛋白生物信息学分析

本实验室前期发现了一个受低温诱导的 bHLH 转录因子, 通过电子克隆和 RACE 技术获得该 bHLH 转录因子的 cDNA 全长, 将该基因命名为 *MdCibHLH1* (Cold-Induced bHLH1; NCBI 序列号为 EF495202.1), 并通过序列分析可知 *MdCibHLH1* 开放阅读框长度 1 596 bp, 可编码 531 个氨基酸 (Feng et al., 2012)。本试验通过 ExPASy Proteomics Server 预测了氨基酸序列的分子质量、等电点、稳定性指数、脂溶性指数、两亲性指数。*MdCibHLH1* 基因分子量为 57.37 kD, 理论等电点

为 5.51, 碱性氨基酸残基 (Arg + Lys) 为 54, 酸性氨基酸残基 (Asp + Glu) 为 64, 分子式可写为 $C_{2460}H_{3920}N_{728}O_{807}S_{24}$, 在溶液中不稳定性指数为 49.52, 脂溶性指数为 71.79, 总平均亲水性指数为 -0.544。

经 SOPMA 对 MdCibHLH1 蛋白二级结构进行预测, 发现蛋白中以 α 螺旋和无规则卷曲为主, β 折叠和延伸链较少, 其中 α 螺旋 145 个 (27.31%)、 β 折叠 19 个 (3.58%)、无规则卷曲 310 个 (58.38%) 和延伸链 57 个 (10.73%)。

利用 SWISS-MODEL Workspace 在线分析工具对 MdCibHLH1 蛋白三级结构进行预测。三级结构预测采用同源建模方法, 搜索蛋白质结构数据库 (PDB), 得到同源序列 1an4.1.C (2.9 Å), 将其作为 MdCibHLH1 蛋白三级结构预测模板, 依据模板调整待预测蛋白序列主链原子位置生成预测蛋白三级结构模型。预测信息显示, 预测模型与同源模板序列同源性为 34.62%。

2.2 MdCibHLH1 保守功能域及进化树分析

Feng 等 (2012) 对 MdCibHLH1 保守功能域分析发现, 其含有典型的 bHLH 结构域, 进化树分析结果表明 MdCibHLH1 和 AtbHLH116 (AtICE1) 以及 AtbHLH033 (AtICE2) 聚在一起。由于 *MdCibHLH1* 基因与拟南芥 ICEs 基因的相似性, 将 MdCibHLH1 与已知的其它植物, 例如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、芥菜 (*Capsella bursa-pastoris*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和甜杨 (*Populus suaveolens*) 等的 ICEs 基因进行进化树和氨基酸序列进行比较, 结果 (图 1) 发现 MdCibHLH1 与 PtICE1、PsICE1、PsICE2 聚在一起, 表明其亲缘关系最近, 并且蛋白质序列上 C 端都包含 Helix-Loop-Helix 保守区。以上结果表明 MdCibHLH1 与其它 ICEs 蛋白在功能结构域上保守性非常高。由此可以推断, 本研究得到的基因是 ICEs 基因在苹果中的一个同源基因。

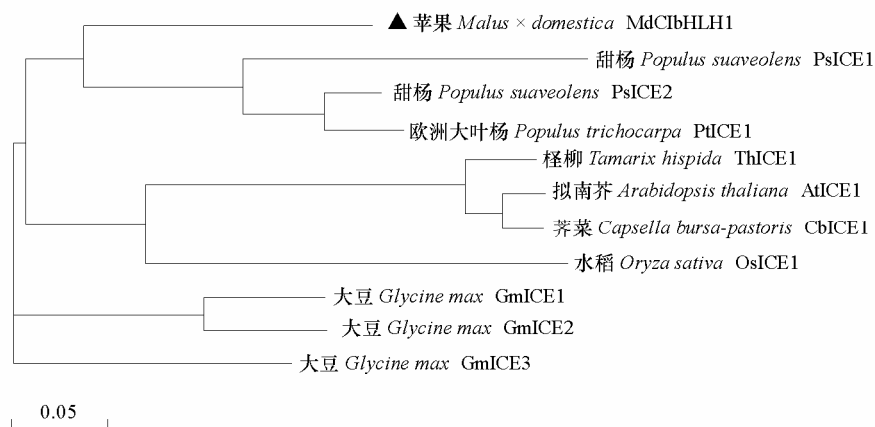


图 1 MdCibHLH1 与其它植物 ICEs 蛋白进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of MdCibHLH1 compared with bHLH proteins of other plants

2.3 MdCibHLH1 在花芽休眠过程中的表达分析

如图 2 所示, 在休眠芽中 *MdCibHLH1* 有很高的积累; 随着花芽休眠的逐渐解除, 表达量逐渐降低, 在花芽打破休眠时 (3 月 23 日) 达到最低值, 在休眠破除后到幼嫩子叶萌动时期 (4 月 6 日) *MdCibHLH1* 基因的表达出现阶段性的升高; 当子叶开始展开时 (4 月 13 日) *MdCibHLH1* 基因的表达下调, 维持一个较低的表达水平。因此推断 *MdCibHLH1* 基因与苹果花芽休眠维持及解除都有一

定的关系。

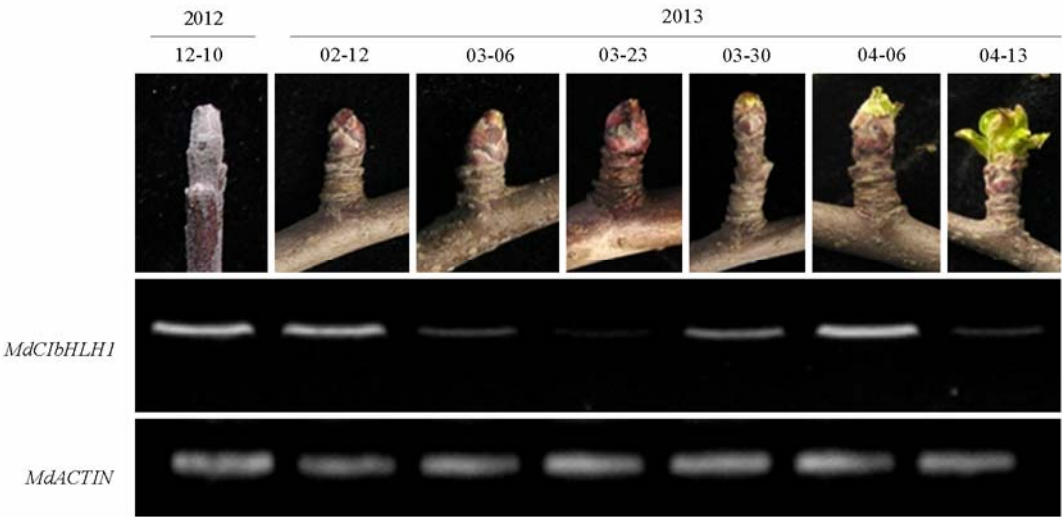


图 2 苹果花芽休眠及解除过程中 *MdCibHLH1* 的表达变化
Fig. 2 Expression change of *MdCibHLH1* of lateral flower buds during the dormancy and release in apple

2.4 *MdCibHLH1* 在种子层积过程中的表达分析

由图 3 可以看出，层积 10 d 的种子基本上无萌发；20 d 后开始萌发；30 d 时发芽率达到 20%左右；40 d 和 50 d 后发芽率分别达到 44%和 83%。*MdCibHLH1* 在干种子中的表达量最高，随着种子的萌发率表达量逐渐降低（图 3）。*MdCibHLH1* 在种子萌发过程中的表达变化与花芽休眠及解除过程中的表达相似，表明了 *MdCibHLH1* 也可能参与种子的休眠以及休眠的解除过程。

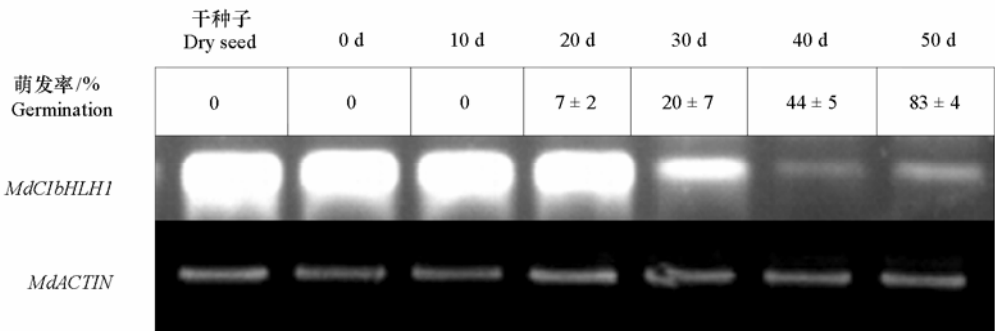


图 3 层积苹果种子休眠解除过程中 *MdCibHLH1* 的表达变化以及种子萌发率
Fig. 3 Expression change of *MdCibHLH1* and seed germination of apple seed in the stratification process

2.5 *MdCibHLH1* 过量表达影响拟南芥种子的萌发

通过观察过表达株系种子萌发情况以及大小和饱满程度，发现过量表达 *MdCibHLH1* 拟南芥种子萌发率明显低于野生型，并且种子干瘪（图 4，图 5）。以上结果进一步证明了 *MdCibHLH1* 可能影响休眠。

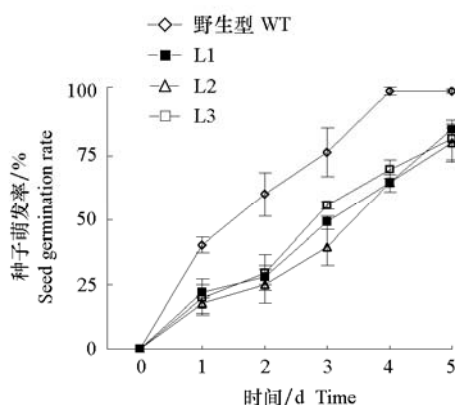


图4 *MdCibHLH1* 转基因拟南芥 (L1~L3) 种子萌发率
Fig. 4 The seed germination rate in *MdCibHLH1* transgenic *Arabidopsis* (L1~L3)

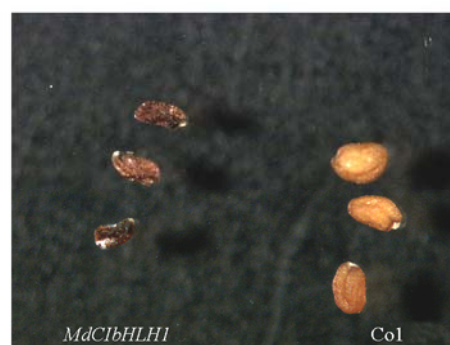


图5 *MdCibHLH1* 转基因拟南芥种子表型
Fig. 5 The seed phenotype in *MdCibHLH1* transgenic *Arabidopsis*

3 讨论

在植物中, 从 bHLH 蛋白的发现到现在已经有一段时间了, 不同的物种研究表明 bHLH 蛋白在植物抗逆性中起着重要的作用。尽管如此, bHLH 蛋白在多年生果树抗寒分子机理研究上还是有些滞后。本试验对前期在苹果中筛选到的受低温诱导的 bHLH 转录因子 *MdCibHLH1* 进行了生物信息学分析, 研究表明 *MdCibHLH1* 具有与其它植物 bHLH 转录因子保守的 bHLH 结构域, 并且与其它植物的低温诱导基因 ICEs 有较高的同源性。2010 年苹果基因组测序完成, 它的基因组比拟南芥基因组更复杂 (Velasco et al., 2010)。本试验前期研究也发现 *MdCibHLH1* 基因与拟南芥 ICEs 基因具有差异, 并且更具复杂性 (Feng et al., 2012)。在拟南芥中, *AtICE1* 能特异的结合到 *AtCBF3* 启动子的 MYC1-MYC4 识别位点上, 并且与 MYC2 的作用最强 (Chinnusamy et al., 2003)。但是 *MdCibHLH1* 只能特异地结合到 MYC4 这一个位点上。这说明 *MdCibHLH1* 与 *AtICEs* 或它们的下游基因具有一定的非保守性, 无论是在基因结构还是在调控机制上都不是完全保守的, 具有部分差异 (Feng et al., 2012)。

在模式植物拟南芥中, bHLH 转录因子 PIL5[PIF3-like 5 (PIL5)]作为一个调控种子萌发分子开关, 连接光信号途径和激素信号途径 (Oh et al., 2004)。前人研究表明, 在暗处理条件下 PIL5 不仅能够结合到 GA 合成或分解基因 (*GA3ox1*、*GA3ox2* 和 *GA2ox2*) 和 ABA 合成或分解代谢基因 (*ABA1*、*NCED6*、*NCED9* 和 *CYP707A2*) 的启动子上, 而且还能够结合到两个 *DELLA* 基因 (*GAI* 和 *RGA*) 的启动子区调控它们的转录表达, 通过影响 GA 和 ABA 的合成或分解来调控种子的萌发 (Oh et al., 2007)。后来研究者利用 ChIP-chip 和基因芯片等技术对 PIL5 的下游靶基因进行了分析, 结果显示 PIL5 还能够结合到与激素相关的转录调节因子, 如 ABI3、ABI5、ARF18、BIM1 和 JAZ1 等, 参与调控脱落酸、生长素、油菜素内酯 (BR) 和茉莉酸 (JA) 等激素的信号途径来影响种子萌发 (Oh et al., 2009)。既然光能够通过 bHLH 转录因子 PIL5 调控种子的休眠, 那么 *MdCibHLH1* 也可能参与苹果种子和花芽的休眠及解除。通过对不同时期层积苹果种子和花芽进行表达分析, 结果显示 *MdCibHLH1* 参与了苹果花芽与种子的休眠以及解除过程; 并且转基因拟南芥种子的萌发试验进一步证明了 *MdCibHLH1* 影响休眠过程。以上结果说明了 *MdCibHLH1* 在调控花芽或者种子休

眠及解除过程中起着非常重要的作用。但是, 不同于层积种子, *MdCibHLH1* 在花芽休眠解除后期出现表达峰值, 可能是由于 3 月底到 4 月初经常出现倒春寒现象, *MdCibHLH1* 表达的升高有利于提高花芽等幼嫩组织的抗冷性。

众所周知, 温度、光照、激素是影响种子萌发的关键因素。Yamauchi 等 (2004) 研究表明 4 °C 低温通过上调 GA 合成代谢基因 (*AtGA20ox1*、*AtGA20ox2* 和 *AtGA3ox1*) 和下调 GA 分解代谢基因 (*AtGA2ox2*) 来提高拟南芥种子内活性 GAs 的含量进而促进萌发。苹果种子必须经过一定时间的低温层积才能萌发。然而关于层积打破休眠的机理仍未清楚, 但已有研究表明层积处理的苹果种子内 GA₃ 和 GA₇ 含量增加, 其增加的时间与种子获得萌发能力的时期相一致, 说明 GA₃ 和 GA₇ 在打破休眠和促进种子萌发方面起着重要作用 (Dębska et al., 2013; El-Yazal et al., 2014)。前期对于苹果中 GA 和 ABA 合成代谢基因的启动子分析发现, 其启动子含有典型的 bHLH 转录因子结合的 E-box 和 G-box。由此可以推断, *MdCibHLH1* 参与苹果花芽和种子休眠及解除的分子调控机制可能是通过结合到 GA 或者 ABA 合成基因的启动子上, 调控花芽或种子内源 GA 或者 ABA 的含量, 进而影响到花芽或种子的休眠及解除。转基因拟南芥种子出现干瘪的表型, 也可能是由于内源 GA 或者 ABA 变化所致。

目前, 对休眠与萌发的研究以休眠较浅的模式植物拟南芥或者水稻等为主, 但这些植物休眠很浅, 不能完全代表深休眠的木本植物。木本植物种子的休眠程度各异、原因复杂多样, 与上述模式植物种子存在一定的差距。本研究中随着苹果花芽和种子休眠的解除, *MdCibHLH1* 的表达量逐渐降低。可见, *MdCibHLH1* 对苹果的种子以及芽的休眠及解除起调控作用。这对研究果树休眠的机理, 结合实践制定出有效的果树栽培措施奠定了理论基础。

References

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell Online*, 9 (10): 1859 - 1868.
- Bailey P C, Martin C, Toledo-Ortiz G, Quail P H, Huq E, Heim M A, Weissshaar B. 2003. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 15 (11): 2497 - 2502.
- Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martínez-García J F, Bilbao-Castro J R, Robertson D L. 2010. Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiology*, 153 (3): 1398 - 1412.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B H, Hong X, Agarwal M, Zhu J K. 2003. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 17 (8): 1043 - 1054.
- Dębska K, Krasuska U, Budnicka K, Bogatek R, Gniazdowska A. 2013. Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H₂O₂, NO production and protein carbonylation level. *Journal of Plant Physiology*, 170 (5): 480 - 488.
- El-Yazal M A S, El-Yazal S A S, Rady M M. 2014. Exogenous dormancy-breaking substances positively change endogenous phytohormones and amino acids during dormancy release in 'Anna' apple trees. *Plant Growth Regulation*, 72 (3): 211 - 220.
- Feller A, Machemer K, Braun E L, Grotewold E. 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 66 (1): 94 - 116.
- Feng X M, Zhao Q, Zhao L L, Qiao Y, Xie X B, Li H F, Hao Y J. 2012. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene *MdCibHLH1* encodes an ICE-like protein in apple. *BMC Plant Biology*, 12 (1): 22.
- Footitt S, Huang Z, Clay H A, Mead A, Finch-Savage W E. 2013. Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *The Plant Journal*, 74 (6): 1003 - 1015.
- Fu Li-zhong, Shen Hai-lin, Zou Li-ren, Chen Lei, Wen Jing-hui. 2014. Research progress of natural dormancy of deciduous fruit tree. *Northern*

- Fruits, (4): 1 - 3. (in Chinese)
- 付立中, 申海林, 邹利人, 陈 蕾, 温景辉. 2014. 落叶果树自然休眠研究进展. 北方果树, (4): 1 - 3.
- Fursova O V, Pogorelko G V, Tarasov V A. 2009. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Gene, 429 (1): 98 - 103.
- Hu Y, Jiang L, Wang F, Yu D. 2013. Jasmonate regulates the inducer of CBF expression-c-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. The Plant Cell Online, 25 (8): 2907 - 2924.
- Huang X S, Wang W, Zhang Q, Liu J H. 2013. A basic helix-loop-helix transcription factor, PtrbHLH, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide. Plant Physiology, 162 (2): 1178 - 1194.
- Jin Wan-mei, Dong Jing, Yin Shu-ping, Yan Ai-ling, Chen Mei-xiang. 2006. CBF1 gene transgenic strawberry and increase freezing tolerance. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 27 (2): 223 - 227. (in Chinese)
- 金万梅, 董 静, 尹淑萍, 闫爱玲, 陈梅香. 2007. 冷诱导转录因子 CBF1 转化草莓及其抗寒性鉴定. 西北植物学报, 27 (2): 223 - 227.
- Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari Z K, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 151 (4): 2046 - 2057.
- Lee C M, Thomashow M F. 2012. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109 (37): 15054 - 15059.
- Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G. 2009. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 21 (2): 403 - 419.
- Oh E, Kim J, Park E, Kim J I, Kang C, Choi G. 2004. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell, 16 (11): 3045 - 3058.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Choi G. 2007. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. The Plant Cell, 19 (4): 1192 - 1208.
- Schmitz J D, Guédon Y, Herter F G, Leite G B, Lauri P É. 2014. Exploring bud dormancy completion with a combined architectural and phenological analysis: The case of apple trees in contrasting winter temperature conditions. American Journal of Botany, 101 (3): 398 - 407.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Chu V T. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) . Nature Genetics, 42 (10): 833 - 839.
- Wang Lian-rong, Li Zhen-xia, Chang Mei-hua. 2008. Research advance of dormancy physiology of deciduous fruit tree. Journal of Anhui Agri Sci, 36 (7): 2657 - 2659. (in Chinese)
- 王连荣, 李振侠, 常美花. 2008. 落叶果树休眠生理研究进展. 安徽农业科学, 36 (7): 2657 - 2659.
- 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 (5): 971 - 983.
- Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. The Plant Cell, 16 (2): 367 - 378.
- Yuan Wei-feng, Yin Shu-ping, Jin Wan-mei, Xu Kai, Gao Gui-zhen. 2006. *Agrobacterium* mediated transformation of strawberry with transcription factor *CBF1* gene. Journal of Biology, 23 (4): 37 - 40. (in Chinese)
- 袁维凤, 尹淑萍, 金万梅, 徐 凯, 高贵珍. 2006. 根癌农杆菌介导转录因子 *CBF1* 基因对草莓的转化. 生物学杂志, 23 (4): 37 - 40.
- Zhao M L, Wang J N, Shan W, Fan J G, Kuang J F, Wu K Q, Li X P, Chen W X, He F Y, Chen J Y, Lu W J. 2013. Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MaICE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. Plant Cell Environment, 36 (1): 30 - 51.
- Zhou J, Li F, Wang J L, Ma Y, Chong K, Xu Y Y. 2009. Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt-and osmotic stress in *Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology, 166 (12): 1296 - 1306.