生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):153-159

过表达葡萄*VaHY5*基因增强拟南芥低温胁迫耐受性

薛孟孟 耿艺轩 韩煦乐 杨始锦*
（宁夏大学葡萄酒与园艺学院，银川 750021）

摘 要： 【目的】探究葡萄*VaHY5*基因抗寒功能，为培育具有优良抗寒性状的葡萄新种质提供基因资源和理论依据。【方法】通过农杆菌介导的花序浸染法在拟南芥中异源过表达*VaHY5*基因，在-6 ℃低温胁迫下观察野生型（WT）和转基因株系的表型，测定H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量、抗氧化酶活性及膜损伤相关指标，并通过RT-qPCR检测相关抗寒基因的相对表达量变化。【结果】在-6 ℃低温胁迫下，过表达*VaHY5*株系的生长状态明显优于WT；过表达株系叶绿素荧光比WT更为明显，*Fv*/*Fm*值超过0.62，比WT高0.14以上。DAB和NBT染色结果显示，低温胁迫后3个过表达株系比WT颜色更浅，过表达植株H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量比WT低，与染色结果一致。过表达植株的可溶性糖含量及抗氧化酶活性均高于WT，但相对电导率（REL）、丙二醛（MDA）含量均低于WT，表明过表达株系细胞膜损伤程度减轻。此外，*VaHY5*过表达显著诱导了低温胁迫下*AtCBF2*（C-repeat binding factor 2）、*AtCBF3*（C-repeat binding factor 3）、*AtCOR15a*（cold-regulated 15a）和*AtCOR47*（cold-regulated 47）的表达，*AtCBF2*和*AtCOR47*的表达量是WT的2倍左右，*AtCBF3*和*AtCOR15a*的表达量约是WT的3-4倍，表明*VaHY5*可能通过激活CBF-COR抗寒通路增强拟南芥的低温耐受性。【结论】过表达*VaHY5*通过增强活性氧（ROS）的清除能力，提高抗氧化酶的活性和可溶性糖的含量，上调冷胁迫相关基因*CBFs*和*CORs*的表达，增强转基因拟南芥对低温胁迫的耐受性。

关键词： *VaHY5*；过表达；拟南芥；低温胁迫；葡萄；CBF-COR通路；抗寒性
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1326

Overexpression of *VaHY5* Gene from *Vitis amurensis* Enhances Tolerance to Cold Stress in *Arabidopsis thaliana*

XUE Meng-meng GENG Yi-xuan HAN Xu-le YANG Shi-jin*
（*College of Enology and Horticulture, Ningxia University, Yinchuan* 750021）

Abstract: 【Objective】The aim is to explore the function of the *VaHY5* gene from *Vitis amurensis* in response to low-temperature stress, providing genetic resources and a theoretical basis for the breeding of new grape varieties with enhanced cold resistance. 【Method】*VaHY5* was overexpressed in *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium*-mediated floral dip method. Under -6 ℃ cold stress, the phenotypes of wild-type (WT) and transgenic lines were observed. The contents of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$, antioxidant enzyme activities, and membrane damage-related indicators were measured, and the relative expression levels of cold-tolerance genes were detected by RT-qPCR. 【Result】Under low-temperature stress at -6 ℃, the growth status of the *VaHY5* overexpressing line was significantly superior to that of the wild-type (WT); chlorophyll fluorescence in the overexpressing line was more pronounced than in WT, and the *Fv*/*Fm* ratio exceeded 0.62, which was 0.14 higher than the WT. DAB and NBT staining results showed that the three overexpressing lines exhibited lighter coloration than the WT after cold stress. The H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents in the overexpressing plants were lower than those in the WT, consistent with the staining results. The soluble sugar content and antioxidant enzyme activities in the overexpressing plants were higher than those in the WT, but the relative electrical conductivity (REL) and malondialdehyde (MDA) content were lower than those in the WT. The results indicate that the degree of cell membrane damage in the overexpressing line was significantly reduced. Furthermore, *VaHY5* overexpression significantly induced the

收稿日期：2025-12-05
基金项目：国家自然科学基金项目（32560703），宁夏自然科学基金项目（2023AAC03067），宁夏回族自治区重点研发计划项目（2025BBF02019），宁夏大学研究生创新项目（CXXM2025069）
*通信作者：杨始锦 yangsj@nxu.edu.cn

expression of *AtCBF2* (C-repeat binding factor 2), *AtCBF3* (C-repeat binding factor 3), *AtCOR15a* (cold-regulated 15a), and *AtCOR47* (cold-regulated 47) under low-temperature stress. The expression levels of *AtCBF2* and *AtCOR47* were approximately doubled compared to the wild-type (WT), while those of *AtCBF3* and *AtCOR15a* were about 3-4 times higher than the WT. This suggests that *VaHY5* may enhance cold tolerance of *Arabidopsis* by activating the CBF-COR cold response pathway.【Conclusion】Overexpression of *VaHY5* enhances the scavenging of reactive oxygen species (ROS), increases the activity of antioxidant enzymes and the content of soluble sugars, and upregulates the expression of cold-stress-related genes (*CBFs* and *CORs*), thereby improving the tolerance of transgenic *Arabidopsis* to cold stress.

Keywords: *VaHY5*; overexpression; *Arabidopsis*; low-temperature stress; grape; CBF-COR pathway; cold resistance

葡萄（*Vitis* spp.）作为全球广泛栽培的重要经济果树之一，其生长发育易受低温影响。在我国北方地区，冬季严寒常导致葡萄发生冻害，为确保安全越冬，每年需耗费大量人力物力进行埋土防寒，制约了葡萄产业的可持续发展[1]。因此探究葡萄响应低温胁迫的机制对于葡萄抗寒育种和栽培具有重要意义，相关基因功能验证也可为葡萄品种抗性改良和新品种培育提供重要理论依据。

研究发现，WRKY、MYB等多种转录因子在植物低温胁迫响应中发挥调控作用[2-4]，通过介导下游抗寒基因表达、清除活性氧、维持细胞膜稳定性等途径增强植物耐冷性。在葡萄中，已鉴定并解析了多个抗寒相关基因的功能。如*VaWRKY65*通过可溶性糖和活性氧的“双调控”途径增强葡萄抗寒性[5]；*VaMYB4a*通过磷酸化依赖的方式，抑制*VaPIF3*和激活*VaCBF4*，正向调控葡萄的冷应激响应[6]。CBF-COR通路是低温信号传递的核心模块，CBF转录因子可识别*COR*基因启动子的CRT/DRE元件并激活其转录，修复膜损伤、稳定渗透压[7-8]。目前在葡萄中发现了6个*CBF*基因，*VvCBF2*、*VvCBF3*、*VvCBF4*和*VvCBF6*的表达可以被低温诱导[9]。

HY5作为bZIP家族的重要成员[10]，最初被鉴定为光形态建成的关键正调控因子，通过结合靶基因启动子的G-box元件，广泛参与植物光信号传导、色素合成及激素信号交叉调控[11-13]。近年来，HY5在植物抵抗低温胁迫中的功能逐渐被揭示，且在不同物种中呈现保守的抗寒调控作用。例如，番茄（*Solanum lycopersicum* L.）*SlHY5*通过整合光、温度与激素信号来正向调控番茄低温耐受性[14-16]。长豇豆（*Vigna unguiculata* L.）*VunHY5*在低温胁迫下通过*HY5-MED2-ERD14*级联正向调控耐冷性[17]。葡萄中bZIP转录因子已被充分鉴定。尽管*VvbZIP22*通过增加*VvFLS1*活性来增强槲皮素合成，促进ROS的清除，进而增强葡萄的抗寒性[18]，但葡萄bZIPs在冷胁迫响应中的功能仍不清晰。因此，山葡萄中bZIP基因*HY5*在抗寒应答中的功能对葡萄抗寒遗传规律研究及抗寒葡萄新种质的培育至关重要。

本研究通过农杆菌介导的花序浸染法获得*VaHY5*过表达拟南芥，观察其在低温胁迫下表型、生理生化指标变化以及抗寒相关基因的表达量变化，深入探究低温胁迫条件下*VaHY5*过表达拟南芥的抗寒特性。研究结果将为阐明葡萄*VaHY5*基因的耐低温分子机制提供新见解，同时也为基因工程技术定向培育耐低温葡萄品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用拟南芥［*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.］为Columbia（Col-0），播种于营养土（草炭∶蛭石=3∶1）中，在温度为18-22 ℃，光周期为16 h/8 h，光照强度为12 000 lx，湿度为75%的人工气候箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥转化与检测 用含有重组质粒pCAMBIA2300-*VaHY5*-GFP的农杆菌，通过花序浸染法转化拟南芥[19]，待其成熟收获种子记为T_0代。经卡那霉素筛选后得到T_1代植株，将播种后长出的幼苗使用CTAB法[20]提取DNA进行PCR检测，单株收取种子，重复上述操作，直至获得转基因纯合系（T_3代）。PCR检测具体步骤如下：使用20 μL的反应体系，7.0 μL ddH_2O、1.0 μL pCAMBIA2300-GFP-35S-F、1.0 μL pCAMBIA2300-GFP-R（附表1）、1.0 μL DNA和10.0 μL 2×Fast qPCR Master Mix。反应程序为94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，35个循环；72 ℃ 10 min；4 ℃保存。取经PCR检测的不同株系叶片进行活体成像分析（植物活体成像

系统PlantView100，广州博鹭腾）。

1.2.2　基因相对表达量分析　取4周龄野生型（wild type, WT）和T_3代转基因拟南芥叶片，加入液氮研磨，使用Omega Bio-Tek公司（E.Z.N.A. Plant RNA Kit I）RNA提取试剂盒进行RNA的提取，随后使用艾科瑞Evo M-MLV反转录试剂盒反转录合成cDNA。使用艾科瑞SYBR®Green Premix Pro-Taq HS qPCR试剂盒检测*VaHY5*不同株系的相对表达水平。基因特异性引物由上海生工公司（上海，中国）设计和合成（附表1）。所有RT-qPCR的反应体系均为20 μL，该体系包括上下游引物各1 μL、2 μL cDNA、10 μL 2× SYBR® Green Pro Taq HS Premix和6 μL无酶ddH_2O。反应条件为：95 ℃ 30 s；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，40个循环。每个样品包括3个生物学重复，每个生物学重复有3个技术重复。*AtActin1*作为内参基因，*VaHY5*基因的相对表达水平通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

1.2.3　转基因拟南芥的抗寒性鉴定　选择4周龄的WT和T_3代转基因株系。将WT和转基因拟南芥植株在4 ℃驯化3 d后，-6 ℃低温处理6 h，常温恢复培养3 d，观察并拍照记录-6 ℃低温处理前后WT和转基因拟南芥植株的形态变化，同时取样测定叶绿素荧光（叶绿素荧光活体成像系统PlantView230F，广州博鹭腾）和理化指标并完成组织染色，每个处理设3次生物学重复。

相对电导率的测定[21]。取大小均匀的植物叶片鲜样，自来水清洗后用蒸馏水冲洗3次，用滤纸吸干表面水分，用剪刀将叶片剪成均匀小块，快速称取3份，每份0.1 g，分别置于10 mL试管中，注入7 mL蒸馏水。盖上塞子置于室温下处理4 h，其间摇晃5次，使用电导率仪（DDS-11A型，上海雷磁）测电导率S_1。沸水浴20 min，待其冷却至室温后，摇匀，测电导率S_2（S_0为蒸馏水电导率）。

相对电导率（%）=（S_1–S_0）/（S_2–S_0）×100%。

过氧化氢酶（catalase, CAT）活性、过氧化物酶（peroxidase, POD）活性、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）活性、可溶性糖含量、丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量、H_2O_2含量、$O_2^{\cdot-}$含量的测定参照南京建成生物工程研究所检测试剂盒（附表2）说明书完成。

DAB（3,3′-二氨基联苯胺）组织化学染色[22]步骤如下：配制1 mg/mL的DAB溶液，取低温处理前后的WT及转基因拟南芥叶片洗净，将其完全浸入溶液中，避光静置直至叶片有褐色沉积物，倒掉DAB染色液，之后经无水乙醇多次脱色处理，直至叶绿素完全褪去，拍照记录试验结果。NBT（氯化硝基四氮唑蓝）染色步骤同上。

1.2.4　冷胁迫相关基因的表达分析　为了分析抗寒相关基因的表达水平，幼苗在4 ℃驯化3 d后转入-6 ℃低温处理，在处理0、3、6 h采集WT和转基因株系的叶片，完成CBF-COR通路*AtCBF2*、*AtCBF3*、*AtCOR15a*和*AtCOR47* 4个基因的表达量分析，具体参照1.2.2，相关引物见附表1。

1.2.5　数据处理　数据整理用Excel 2016，采用IBM SPSS Statistics 27进行单因素方差分析。使用Origin 2021软件绘制图表，不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

2　结果

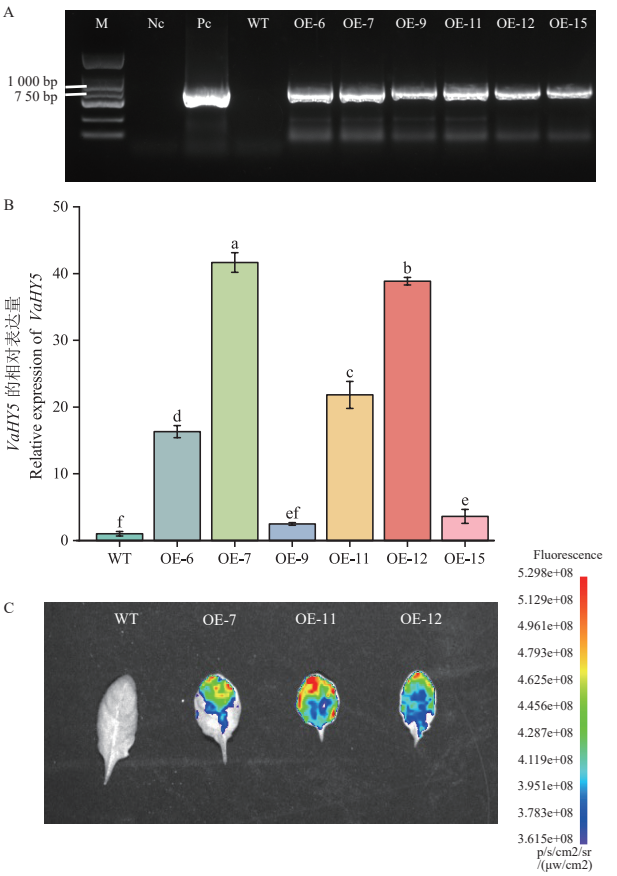
2.1　转基因株系的鉴定

将获得的6个T_3代过表达株系OE-6、OE-7、OE-9、OE-11、OE-12、OE-15进行PCR检测，发现均可检测到与阳性对照一致的条带（507 bp+ 276 bp）（图1-A）。进一步RT-qPCR结果表明，6个过表达株系相对表达量均高于WT，表明目的基因已成功转化至拟南芥中，OE-7、OE-11、OE-12 3个株系其表达量分别为WT的41.66倍、21.82倍和38.86倍（图1-B）。活体成像结果显示WT没有荧光，而OE-7、OE-11、OE-12具有明显的荧光（图1-C），因此选取这3个株系进行后续试验。

2.2　过表达植株及野生型在低温下的表型分析及叶绿素荧光测定

为了研究在拟南芥中过表达*VaHY5*的作用，首先观察WT和过表达株系在-6 ℃处理前后的表型变化，结果表明（图2-A），-6 ℃处理前WT和转基因株系的表型没有明显差异。然而，-6 ℃处理后，WT比过表达株系的叶片萎蔫更严重，经过3 d的常温恢复培养后，WT部分叶片死亡，而转基因拟南芥恢复了绿色。

在-6 ℃处理前，WT和过表达*VaHY5*拟南芥3个株系的叶绿素荧光没有显著差异，均有强烈荧光信号。但-6 ℃处理后，WT荧光几乎全部淬灭，而3个



A：PCR检测；B：拟南芥WT和转基因不同株系RT-qPCR检测；C：活体成像；M：DNA marker DL2000；Nc：阴性对照；Pc：阳性对照；WT：野生型拟南芥；OE-6–OE-15：转基因拟南芥不同株系；图中误差线表示标准误，不同小写字母表示显著性差异（P<0.05），下同

A: PCR detection. B: RT-qPCR detection of WT and transgenic *Arabidopsis* lines. C: Live imaging. M: DNA marker DL2000. Nc: Negative control. Pc: Positive control. WT: Wild-type *Arabidopsis*. OE-6–OE-15: different lines of transgenic *Arabidopsis*. Error bars represent standard error. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05). The same below

图1 过表达*VaHY5*拟南芥的鉴定及*VaHY5*表达量检测

Fig. 1 Identification of *Arabidopsis* overexpressing *VaHY5* and detection of *VaHY5* relative expression

过表达株系叶片还能观察到部分荧光（图2-B）。*Fv*/*Fm*值的变化也证实了这一结果，即WT和过表达*VaHY5*株系在-6 ℃处理前没有显著差异，而-6 ℃处理显著降低了光系统II（PSII）的最大光化学效率，但*VaHY5*过表达植株的*Fv*/*Fm*值仍显著高于WT植株（图2-C）。

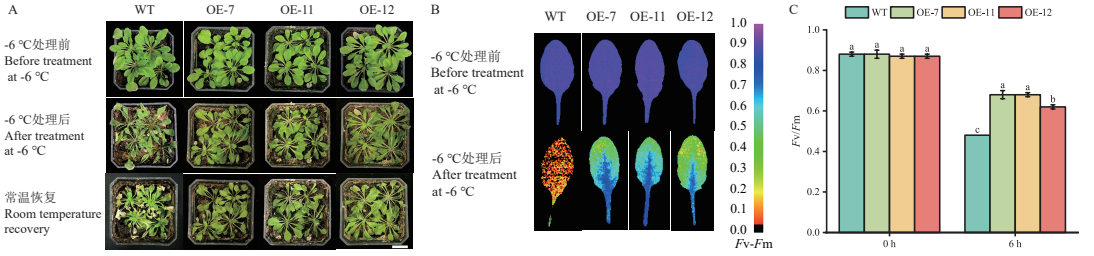
2.3 过表达植株及野生型在低温下的耐寒性分析

为探究*VaHY5*过表达对ROS积累的影响，通过DAB和NBT染色检测叶片中活性氧积累发现，在-6 ℃处理前，WT及过表达株系的叶片染色程度没有明显差异（图3-A、C），这表明在-6 ℃处理前WT及过表达株系叶片中ROS积累基本是一致的；但-6 ℃处理后，WT叶片DAB和NBT染色比过表达株系要深，且染色区域在叶片中分布更广泛，说明过表达株系中的活性氧ROS积累比WT植株要低（图3-A、C）。在-6 ℃处理前，WT及过表达株系的H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$的含量无明显差异（图3-B、D），而-6 ℃处理后，WT植株的H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量均显著高于过表达株系（图3-B、D），这与DAB、NBT染色结果一致，充分证实了*VaHY5*过表达能够增强植株在低温胁迫下的ROS清除能力，减少活性氧的积累。

为深入探究*VaHY5*基因在拟南芥抗寒响应中的调控功能，本研究系统测定了与植物抗寒密切相关的生理指标，包括抗氧化酶POD、SOD、CAT活性（图4-A–C），可溶性糖（图4-D）及膜损伤相关指标MDA、相对电导率（relative electrolytic leakage, REL）（图4-E、F）等。在-6 ℃处理前，WT与*VaHY5*过表达株系在上述所有测定指标中均未表现出显著差异。但在-6 ℃处理后过表达株系中的POD、SOD、CAT 3种抗氧化酶活性均显著高于WT，可溶性糖含量也高于WT；MDA含量和REL均显著低于WT，表明过表达株系中的膜透性物质含量要低于WT植株。

2.4 冷胁迫相关基因的表达量

为深入解析*VaHY5*调控拟南芥耐寒性的分子机制，选取拟南芥CBF-COR通路基因*AtCBF2*、*AtCBF3*、*AtCOR15a*和*AtCOR47*分析其在低温胁迫下的相对表达水平变化。结果表明，-6 ℃低温胁迫后上述抗寒相关基因均表现出不同程度的上调。在*VaHY5*过表达株系中上述抗寒基因的转录水平均显著高于野生型植株，且不同基因的响应特征存在差异：*AtCBF3*、*AtCOR15a*和*AtCOR47*（图5-B–D）在-6 ℃处理后3 h即呈现快速且强烈的表达上调，响应速度明显快于*AtCBF2*（图5-A），而野生型植株中各基因的表达峰值出现时间更晚、表达量更低。这一结果表明，*VaHY5*过表达能够显著增强低温胁迫下CBF-COR冷信号通路中抗寒关键基因的转录水平，从而增强拟南芥的冷防御机制，最终提高植株的耐寒能力。



A：WT和转基因株系在低温胁迫下的表型(比例尺为1 cm)；B：叶绿素荧光成像；C：*Fv*/*Fm*值

A: Phenotypes of WT and transgenic lines under low-temperature stress (scale is 1 cm). B: Chlorophyll fluorescence imaging. C: *Fv*/*Fm* value

图2　过表达*VaHY5*拟南芥的表型及叶绿素荧光测定

Fig. 2　Phenotype of *VaHY5* overexpressing *Arabidopsis* and chlorophyll fluorescence measurements

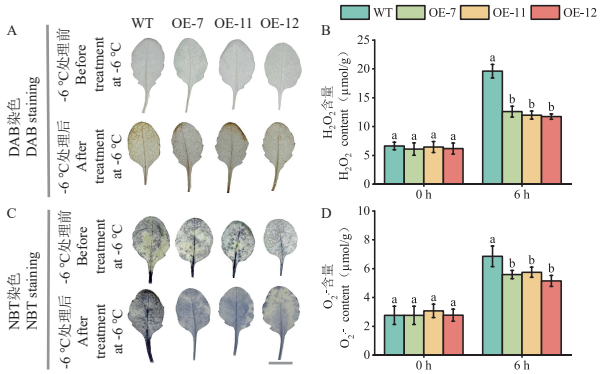


图3　组织化学染色及H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量测定

Fig. 3　Histochemical staining and determination of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ content

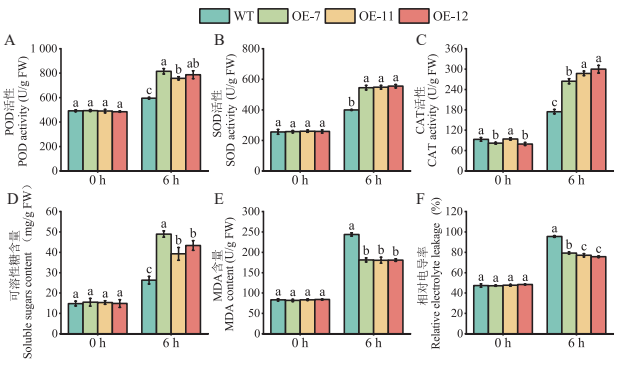


图4　低温胁迫下野生型和转基因拟南芥生理指标测定

Fig. 4　Measurement of physiological indicators in wild-type and transgenic *Arabidopsis* under cold stress

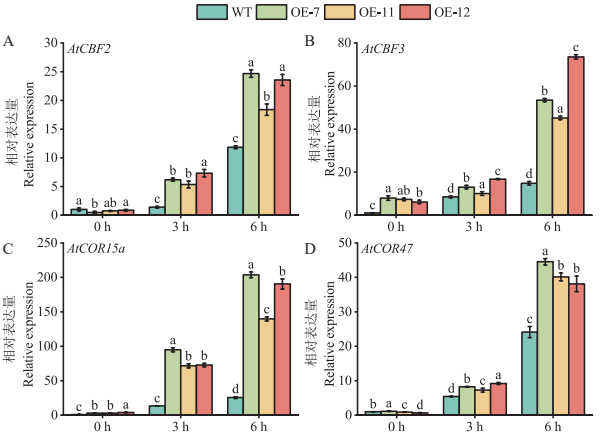


图5　低温胁迫下野生型和转基因拟南芥冷胁迫相关基因的表达量分析

Fig. 5　Expression analysis of cold stress-related genes in wild-type and transgenic *Arabidopsis* under low-temperature stress

3　讨论

HY5作为bZIP类转录因子，不仅是植物光形态建成的关键调控因子，近年来也被证实广泛参与包括低温在内的多种非生物胁迫。本研究通过将葡萄*VaHY5*基因在拟南芥中过表达，研究了该基因在拟南芥低温抗性中的功能，并对其潜在机制进行了初步探讨。

低温胁迫对植物的危害主要体现在细胞膜损伤、光合系统抑制和氧化胁迫等方面[23]。本研究发现，在低温处理后，野生型植株叶片严重萎蔫且恢复较慢，而*VaHY5*过表达株系叶片表现出轻微卷曲及较强的恢复能力，说明*VaHY5*能增强细胞在低温下的稳定性。低温可能会导致光合效率降低[24]，同样，本研究叶绿素荧光成像也显示低温胁迫下*VaHY5*过表达株系和WT叶片的*Fv*/*Fm*值较低温处理前有一定程度降低，但过表达株系的*Fv*/*Fm*下降幅度较小且

显著高于WT，表明*VaHY5*过表达可以增强拟南芥PSII光系统在环境胁迫下的稳定性，从而提高拟南芥的低温耐受性。多项生理指标的测定结果与表型相符，表现为过表达植株中REL和MDA含量显著低于WT，证明过表达植株其细胞膜受损程度较轻，膜透性维持较好。这一发现与前人的研究一致，即植物通过调节抗氧化防御可有效缓解低温引起的膜损伤[25]。这些研究结果初步表明过表达*VaHY5*可以增强拟南芥的抗寒能力。

冷应激诱导大量ROS产生，如H_2O_2和$O_2\cdot^-$，而ROS水平升高可导致氧化损伤[26]，植物可以通过增强抗氧化酶SOD、POD和CAT活性来去除多余的ROS[27]，但是否直接调控抗氧化酶基因的表达，还需更深入的研究来确定。在应对氧化胁迫方面，*VaHY5*过表达植株表现出更高效的活性氧清除能力。低温胁迫下，过表达株系中SOD、POD和CAT等抗氧化酶活性显著高于野生型，同时H_2O_2和$O_2\cdot^-$含量比WT显著降低，表明*VaHY5*可增强ROS清除能力，这与前人的研究结论一致[28-30]。这些结果进一步表明过表达*VaHY5*促进拟南芥的抗寒性。

CBF转录因子作为冷信号传递途径中的中心枢纽，在植物响应冷胁迫过程中起着重要作用。有研究表明，拟南芥受到低温胁迫时，*CBF1*、*CBF2*和*CBF3*能够快速地被诱导表达[31]。本研究通过分析*AtCBF2*和*AtCBF3*的表达水平发现，低温显著诱导了过表达拟南芥中*AtCBF2*和*AtCBF3*的表达。CBF转录因子作为低温应答的核心调节因子，可启动一系列下游冷响应基因（*CORs*）的表达，从而增强植物的抗寒性[32]。HY5调控拟南芥约1/3的基因，包括*CORs*基因[7]，该研究表明，与WT相比，转基因拟南芥中的*AtCOR15a*和*AtCOR47*基因在低温胁迫下表达量均显著升高。本研究结果与番茄中发现的*HY5-MYB15-CBF*调控模块相呼应[15]，表明*VaHY5*基因在拟南芥中可能通过激活CBF-COR冷响应通路增强拟南芥抗寒性。

综上所述，本研究通过异源过表达*VaHY5*，证实葡萄*VaHY5*基因能够显著提升拟南芥的低温耐受性。该研究不仅为阐明HY5转录因子在葡萄低温应答中的分子机制提供理论依据，同时表明葡萄*VaHY5*基因可作为极具应用价值的抗寒候选基因资源，为基因工程改良栽培葡萄抗寒性、培育抗寒新品种奠定理论基础。后续将进一步在葡萄中开展稳定遗传转化，验证*VaHY5*的抗寒功能；并筛选和验证与VaHY5蛋白互作的DNA和蛋白，解析其上下游信号通路或代谢调控网络，为葡萄抗寒分子育种提供更直接的理论与技术支撑。

4 结论

在低温胁迫下，*VaHY5*过表达植株通过提高活性氧的清除能力、增强抗氧化酶的活性及提升相关抗寒基因表达来增强转基因拟南芥抗寒性，为葡萄抗寒育种提供基因资源。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260424135752_NewsFile_39.pdf）。

参考文献

[1] 薛婷婷, 张佳佳, 聂榕博, 等. 中国酿酒葡萄越冬特性与保护措施研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(5): 83-95.
Xue TT, Zhang JJ, Nie RB, et al. Research progress on winter survival characteristics and protection measures of wine grapes in China [J]. J China Agric Univ, 2025, 30(5): 83-95.

[2] Kidokoro S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses [J]. Trends Plant Sci, 2022, 27(9): 922-935.

[3] Xi ZM, Wang ZZ, Fang YL, et al. Effects of 24-epibrassinolide on antioxidation defense and osmoregulation systems of young grapevines (*V. vinifera* L.) under chilling stress [J]. Plant Growth Regul, 2013, 71(1): 57-65.

[4] Ma JH, Yan XX, Qi XC, et al. The transcription factor VaWRKY72 from *Vitis amurensis* positively regulates cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* and grapevine [J]. Plant Mol Biol, 2025, 115(5): 109.

[5] Meng L, Zhou HM, Tan LS, et al. VaWRKY65 contributes to cold tolerance through dual regulation of soluble sugar accumulation and reactive oxygen species scavenging in *Vitis amurensis* [J]. Hortic Res, 2025, 12(4): uhae367.

[6] Yu QH, Zheng QL, Liu C, et al. Phosphorylation-dependent VaMYB4a regulates cold stress in grapevine by inhibiting VaPIF3 and activating VaCBF4 [J]. Plant Physiol, 2025, 197(2): kiaf035.

[7] Ritonga FN, Chen S. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants [J]. Plants, 2020, 9(5): 560.

[8] Thomashow MF. PLANT COLD ACCLIMATION freezing tolerance

genes and regulatory mechanisms [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 571-599.

[9] Rubio S, Noriega X, Pérez FJ. Abscisic acid (ABA) and low temperatures synergistically increase the expression of CBF/DREB1 transcription factors and cold-hardiness in grapevine dormant buds [J]. Ann Bot, 2019, 123(4): 681-689.

[10] 窦雪婷, 朱熙, 张宁, 等. 马铃薯低温胁迫相关基因*StHY5*的功能分析 [J]. 园艺学报, 2025, 52(7): 1745-1757.
Dou XT, Zhu X, Zhang N, et al. Functional analysis of *StHY5* associated with low-temperature stress in potato [J]. Acta Hortic Sin, 2025, 52(7): 1745-1757.

[11] Jing YJ, Zhang D, Wang X, et al. *Arabidopsis* chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation [J]. Plant Cell, 2013, 25(1): 242-256.

[12] Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS. The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways [J]. Plant J, 2004, 38(2): 332-347.

[13] Lee J, He K, Stolc V, et al. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development [J]. Plant Cell, 2007, 19(3): 731-749.

[14] Wang F, Zhang LY, Chen XX, et al. SlHY5 integrates temperature, light, and hormone signaling to balance plant growth and cold tolerance [J]. Plant Physiol, 2019, 179(2): 749-760.

[15] Zhang LY, Jiang XC, Liu QY, et al. The HY5 and MYB15 transcription factors positively regulate cold tolerance in tomato via the CBF pathway [J]. Plant Cell Environ, 2020, 43(11): 2712-2726.

[16] Lin R, Zhang WJ, Tian R, et al. CPK27 enhances cold tolerance by promoting flavonoid biosynthesis through phosphorylating HY5 in tomato [J]. New Phytol, 2025, 246(5): 2174-2191.

[17] Liang L, Sui XY, Xiao JC, et al. ERD14 regulation by the HY5- or HY5-MED2 module mediates the cold signal transduction of *Asparagus* bean [J]. Plant J, 2025, 121: e17172.

[18] Liu GC, Zhang Z, Tian Y, et al. VvbZIP22 regulates quercetin synthesis to enhances cold resistance in grape [J]. Plant Sci, 2025, 350: 112293.

[19] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.

[20] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物DNA提取方法 [J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.
Li JL, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction [J]. Chin Bull Bot, 2013, 48(1): 72-78.

[21] Patwari P, Salewski V, Gutbrod K, et al. Surface wax esters contribute to drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2019, 98(4): 727-744.

[22] 郑一羽, 王仕玉, 罗富寻, 等. 茄梨*HY5*基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 中国南方果树, 2025, 54(1): 117-121.
Zheng YY, Wang SY, Luo FX, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *HY5* gene of Clapp's favorite [J]. South China Fruits, 2025, 54(1): 117-121.

[23] 张瑶瑶, 吕晓元, 赵方贵, 等. 葡萄*VvZF-HD11*基因克隆及表达特性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2025, 33(3): 547-560.
Zhang YY, Lyu XY, Zhao FG, et al. Cloning and expression characteristics analysis of *VvZF-HD11* gene in grape (*Vitis vinifera*) [J]. J Agric Biotechnol, 2025, 33(3): 547-560.

[24] Shi YT, Ding YL, Yang SH. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation [J]. Plant Cell Physiol, 2015, 56(1): 7-15.

[25] Qian ZF, He LL, Li FS. Understanding cold stress response mechanisms in plants: an overview [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1443317.

[26] Li SH, Liu S, Zhang Q, et al. The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1050132.

[27] Gangappa SN, Botto JF. The multifaceted roles of HY5 in plant growth and development [J]. Mol Plant, 2016, 9(10): 1353-1365.

[28] Zhang Y, Liu X, Shi YJ, et al. The B-box transcription factor BnBBX22.A07 enhances salt stress tolerance by indirectly activating *BnWRKY33.C03* [J]. Plant Cell Environ, 2024, 47(12): 5424-5442.

[29] Ali Z, Sun YZ, Ma ZD, et al. VvHY5 and VvBEE1 antagonistically control resveratrol biosynthesis to mitigate high light-induced damage in grapevine [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(4): 993-1008.

[30] Liu JY, Shi YT, Yang SH. Insights into the regulation of C-repeat binding factors in plant cold signaling [J]. J Integr Plant Biol, 2018, 60(9): 780-795.

[31] Gilmour SJ, Fowler SG, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities [J]. Plant Mol Biol, 2004, 54(5): 767-781.

[32] Zhang YJ, Yang JS, Guo SJ, et al. Over-expression of the *Arabidopsis CBF1* gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance [J]. Plant Biol, 2011, 13(2): 362-367.

（责任编辑　高洁）