

拟南芥 CBF 冷反应通路

杨家森^{1,2} 张洪涛^{1,2} 李新国^{2,*} 毕玉平^{2,**}

¹ 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ² 山东省农业科学院高新技术研究中心, 济南 250100

The CBF Cold Response Pathway in *Arabidopsis*

YANG Jia-Sen^{1,2}, ZHANG Hong-Tao^{1,2}, LI Xin-Guo^{2,*}, BI Yu-Ping^{2,**}

¹College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; ²High-Technology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

摘要 就植物在遭受冷胁迫时被激活的应对冷胁迫伤害的两种反应通路中的 CBF 冷反应通路, 从 CBF 的发现到调控机制以及通路组成的研究进展作了介绍。

关键词 CBF; 冷反应通路; 冷胁迫; 抗逆性

在自然界中, 植物不可避免地遭受各种环境因子的胁迫, 其中低温是影响植物生存的主要环境胁迫因子之一(李新国等 2005)。在冷胁迫时, 植物不仅能够进行相应的形态改变, 而且还会通过一定的生理变化来抵御胁迫(Joglo-ottoson 等 1998; Gilmour 等 2000; McKown 等 1996; Wanner 和 Junntila 1999)。据统计, 世界上每年因冷害造成的农业损失高达数千亿美元(利容千和王建波 2002), 植物抗冷性研究一直是植物抗逆性研究中的热点之一(Li 等 2003, 2004)。人们很早就发现, 许多植物在遭受严寒前, 若经过一个缓慢的降温过程, 其抗冷性会逐渐提高, 这一过程称为冷驯化或冷锻炼(Guy 1990; Hughes 和 Dunn 1996)。在此过程中, 主要有两种反应通路被激活(Chinnusamy 等 2003b; Kanaya 等 1999): 一是依赖于 ABA 的通路, 在这个通路中包括 ABA 应答元件和 ABA 应答结合蛋白; 另一个是独立于 ABA 的通路, CRT/DRE (C repeat/dehydration responsive element) 和 CBF (CRT/DRE-binding factor) 认为是这一通路的主要元件。在这些反应通路被激活的过程中涉及许多基因的调控表达, 这些基因直接或间接地参与反应通路。正是这些基因对植物的抗冷起一定作用, 才引起研究者致力于分离鉴定此类基因的兴趣。但研究发现此类基因中大部分对植物抗冷性的影响并不明显, 直至发现 CBF 后, 植物抗冷性研究才有了很大进展(Storckinger

等 1997)。CBF 是一类反式作用因子, 它能调控一大类与抗冷相关基因的表达, 从而较大地提高植物的抗冷性。因而 CBF 通路成为抗冷性研究的热点问题, 其通路成分也日渐明晰。

1 CBF 因子的发现

冷驯化过程涉及多种基因的调控表达, 包括 *COR* (cold-regulated) 基因(Hajela 等 1990)。而许多 *COR* 基因的协同诱导表达则表明可能存在调节 *COR* 基因表达的调控因子(Joglo-ottoson 等 1998; Hajela 等 1990)。人们进一步研究发现, 这些 *COR* 基因的启动子中存在一个共同序列 CCGAC, 称为 CRT 或 DRE 序列, Liu 等(1998)推测可能是反式作用因子的结合部位。随后, Stockinger 等(1997)通过酵母单杂交从拟南芥 cDNA 文库中分离出 *CBF1*。*CBF1* 在拟南芥中过量表达, 在非寒冷情况下可诱导 *COR* 基因的表达, 并能提高拟南芥的抗冷性、抗旱性和抗盐性, 但 *CBF1* 基因的表达只受低温诱导, 并不受干旱和高盐的调控(Joglo-ottoson 等 1998)。Medina 等(1999)的研究也表明, 提高 ABA 水平并不能提高 *CBF* 基因的表达量, 表

收稿 2005-07-22 修定 2005-11-21

资助 国家自然科学基金项目(30571126)、山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2005BS06003)和山东省作物生物学重点实验室项目。

*通讯作者(E-mail: lixinguo@tom.com, Tel: 0531-83179047)。

** 通讯作者(E-mail: yupingbi@vip.sina.com, Tel: 0531-83179842)。

明此通路为独立于ABA的途径。拟南芥 *CBF1* 在酵母中表达, 可诱导带有 CRT/DRE 序列报告基因的表达 (Storckinger 等 1997)。以上这些研究表明, *CBF1* 可能是调控植物抗冷基因 (主要是 *COR* 基因) 表达的“总开关”, 在拟南芥 CBF 冷反应通路中起作用。

后来又陆续发现了 *CBF2*、*CBF3*。与 *CBF1* 基因包含 642 个核苷酸相比, *CBF2* 和 *CBF3* 基因各含有 651 个核苷酸, 与 *CBF1* 基因的核苷酸同源性分别达 81% 和 84%, 高度同源。这 3 个 *CBF* 基因的可读框中都没有内含子 (Medina 等 1999; Shinwari 等 1998)。进一步研究表明, *CBF2*、*CBF3* 与 *CBF1* 基因具有相似的功能, 3 个基因串联排列在拟南芥第四染色体上, 其中 *CBF3* 位于 *CBF1* 下游 3 kb 处, *CBF2* 位于 *CBF1* 下游 7 kb 处 (Medina 等 1999)。尽管 *CBF* 基因的启动子并不含有 CRT/DRE 序列, 但它仍然能被低温诱导, 并先于 *COR* 基因表达, 因此推测可能还有其他因子调控 *CBF* 基因的表达。基因表达分析表明, *CBF* 基因表达并无组织特异性 (Medina 等 1999; Shinwari 等 1998), 且呈瞬时表达, 当植株处于 4℃ 条件下, 40 min 内即可检测到 *CBF* 基因的表达, 2 h 达到最大, 其后逐渐减弱, 5 h 内含量仍然较高 (Shinwari 等 1998)。这也充分说明, CBF 只起反式作用因子功能, 而无直接改善植物抗冷性的作用。

2 CBF 因子的结构特点

自从发现 CBF1 具有反式作用因子功能后, 人们就致力于 CBF 的序列分析。通过 CBF 家族内 3 个基因的比较, 发现了许多序列信息。

2.1 CBF 基因序列的结构特点 *CBF* 基因能被低温诱导, 说明其启动子中必然存在被调控的位点。所以, 对 *CBF* 基因序列的研究主要集中于启动子部分。*CBF* 虽然也能被低温诱导, 但其启动子中并不含有 CRT/DRE 序列, 即 CCGAC, 而是含有其相反序列 CAGCC; 另外, 与 CRT/DRE 只有 1 个碱基差别的序列 CCGTC 则存在于 *CBF1* 基因启动子中 (Medina 等 1999; Gilmour 等 1998)。进一步分析表明, Myc 蛋白的识别序列 CANNTG 也存在于 *CBF* 基因启动子中 (Gilmour 等 1998;

Blackwell 等 1993)。值得注意的是, 一个重复序列 ACAATTANNNACAATTT 存在于 *CBF* 基因启动子中, 每个基因只有 1 个, 并且位置大体一致, 这意味着它是极有可能起作用的 (Gilmour 等 1998)。但以上这些潜在的识别序列基本上是通过序列比较得出的, 很少有实验验证, 因此它们是否真正起作用以及起多大作用, 还需进一步研究。

2.2 CBF 蛋白序列的结构特点 CBF 作为反式作用因子, 起调控作用的主要是蛋白质, 因此对 CBF 蛋白一级序列结构以及其空间结构的研究也比较多, 其中对 *CBF1* 的研究尤其深入。*CBF1* 由 213 个氨基酸组成, 分为 4 个区域 (Kanaya 等 1999; Storckinger 等 1997): 氨基末端区域 (氨基酸 1~132)、潜在核酸定位信号区 (氨基酸 33~47)、AP2 区域 (氨基酸 48~106) 和酸性区 (氨基酸 107~213)。研究表明, CBF 因子的 AP2 区域能与 *COR* 基因启动子的 CRT/DRE 序列结合, 刺激 *COR* 基因的表达 (Kanaya 等 1999; Gilmour 等 1998)。将缺失部分氨基酸的 *CBF1* 导入大肠杆菌中, 并进行下游报告基因检测时发现, AP2 区和酸性区对 CBF 执行功能来说都至关重要, 而氨基末端区域则不是必需的 (Kanaya 等 1999)。CBF 蛋白中还存在蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶 II 的潜在识别位点, 据此, Medina 等 (1999) 推测这些潜在识别位点对 CBF 执行反式作用因子功能可能起作用。

二级结构预测表明, *CBF1* 蛋白有 2 个 α 螺旋, 一个 α 螺旋位于氨基末端, 另一个位于 AP2 域内 (Kanaya 等 1999)。AP2 域内的 α 螺旋已通过 CD 光谱分析得到证实, 它对于 AP2 域结合 CRT/DRE 序列来说至关重要。还有 6 个 β 折叠, 其中 3 个位于 *CBF1* 蛋白的 AP2 域内, 另外 3 个位于 C 末端酸性区域, 推测其对 CBF 因子结合顺式作用元件可能起作用 (Kanaya 等 1999)。

通过 CD 光谱对 *CBF1* 完整和截短的蛋白进行二级结构分析表明, *CBF1* 蛋白在 -5~30℃ 范围内表现出可逆的冷变性, 在 40~60℃ 范围内表现为热变性 (Kanaya 等 1999)。冷变性主要存在于氨基末端区和酸性区, 而热变性存在于 AP2 域。冷变性是 CBF 蛋白的一个重要特征 (Kanaya 等 1999), 它是由水与暴露于溶液中的蛋白质非极性基团相互

作用产生的。在常温下, 非极性基团通过氢键相互作用存在于蛋白质分子内部; 温度降低时, 氢键作用力减小导致低温下 CBF 蛋白分子延伸。AP2 区在 $-5\sim 30^{\circ}\text{C}$ 范围内稳定性很强, 这就保证了其在低温下与 CRT/DRE 序列结合, 实现 CBF1 蛋白低温下的调控功能。

CBF2、CBF3 与 CBF1 蛋白具有相似的结构和功能 (Medina等1999; Shinwari等1998; Gilmour等2004), 它们调控的机制也大体相同。

3 CBF通路及其调控因子

自从发现冷调控反式作用因子 CBF 后, 人们就开始致力于对其通路的研究, 并分离鉴定该通路的作用因子。CBF 通路非常复杂, 涉及的因子很多。Vogel 等 (2005) 通过基因芯片杂交发现, 至少有 85 个冷诱导基因和 8 个冷抑制基因与 CBF2 有关; Maruyama 等 (2004) 也用类似的方法鉴定了 38 个 CBF3 的下游基因, 其中 20 个为尚未报道的基因, 这些基因都参与 CBF 通路, 但对其研究相当肤浅。就目前研究情况来看, CBF 通路主要包括两步级联放大步骤 (Thomashow等2001): 第一步, CBF 基因的诱导表达, 即正常生长温度下存在的一些未知激活因子 (如: ICE) 能在低温下诱导 CBF 基因家族的表达; 第二步, COR 基因的诱导表达, 即 CBF 诱导下游逆境基因的表达。这种级联放大能使植物迅速启动多种生理变化, 以应对低温对植物造成的伤害。另外, 抗冷植物 CBF 通路与非抗冷植物的 CBF 通路可能并不相同, Zhang 等 (2004) 的实验表明, 将番茄 CBF1 基因导入抗冷植物拟南芥中, 拟南芥的抗冷性可提高; 但在番茄中过量表达自身的 CBF1 则不能提高其抗冷性。此现象可能是由于两类植物的 CBF 通路不同所致。以下重点介绍拟南芥 CBF 通路中几种研究得比较清楚的调控因子。

3.1 CBF上游调控因子 CBF基因本身是冷诱导的, CBF 通路的上游调控对 CBF 基因的表达及其抗冷性至关重要, 相关作用因子较多, 如: HOS1 (high expression of osmotic stress-regulated gene expression 1)、ICE1 (inducer of CBF expression 1) 和 CAX1 (cation exchanger 1) 等均能调控 CBF 基因的表达。这些调控因子既有正调控也有负调控, 相

互协调共同维持 CBF 通路的畅通。

ICE1 是一个上游调控因子, 早在 1998 年, Gilmour 等 (1998) 就预测到它的存在, 并认为 CBF 基因启动子中存在 ICE 结合位点 (ICE 盒)。ICE 在常温下处于非激活状态, 当有冷信号存在时, 可能在某个 (或某些) 未知因子介导下, ICE 由非活化状态转变为活化状态, 并结合于 CBF 基因启动子的 ICE 盒处, 从而激活 CBF 基因的转录。后来, Chinnusamy 等 (2003a) 分离并鉴定了 ICE1 基因。他们将一个 CBF3-LUC 基因 (一个含有 CBF3 基因启动子与发光荧光素酶基因 LUC 的重组 DNA 分子) 导入到拟南芥的基因组中, 目的是创造出能够在寒冷环境下生物发光的植物。进而对这些低温应答的生物发光植物进行诱变, 筛选出低温条件下不再发光的植株, 从而得到了一个突变体 *ice1*。结果发现这个突变体阻止了 CBF3 的表达, CBF 下游基因的表达量也减少。生物芯片分析也表明, 在 *ice1* 拟南芥突变体中, 超过 70% 的低温应答基因被错误调控, 以致植物的耐寒性和耐冻性大大降低 (Chinnusamy 等 2003a)。表达分析表明, ICE1 基因为组成型表达, 并且过量表达 ICE1 基因的植株与野生型植株相比较, 在常温下并没有提高 CBF3 基因的表达量, 但在低温下却提高了 CBF3 基因的表达量, 符合 Gilmour 等 (1998) 的设想。ICE1 基因编码一个类似 MYC-bHLH (MYC-like basic helix-loop-helix) 的蛋白, 由 494 个氨基酸组成, DNA 结合实验表明它能与 CBF 基因启动子的 MYC 识别序列 CANNTG (即 Gilmour 预测的 ICE 盒) 结合 (Chinnusamy 等 2003a), 而 ICE 盒正是激活 CBF 基因转录的重要顺式作用元件 (Zarka 等 2003)。

HOS1 是另一个重要的上游调控因子, 在拟南芥中为组成型表达, 常温下位于细胞质内, 受冷胁迫后迅速积累到细胞核内, 这种质-核穿梭在冷环境下可能介导一定的冷反应信息。Ishitani 等 (1998) 筛选分离了一个 *hos1-1* 突变体, 此突变体可提高 CBF 基因及下游冷应答基因的表达, 如: RD29A (responsive to dehydration 29a)、COR49、COR15、KIN1 (cold induced 1) 和 ADH (alcohol dehydrogenase)。正常植株的这些基因都能被 ABA、高盐和寒冷诱导, 但该突变体只有寒

冷条件下明显提高这些基因的诱导量, 因此推测 *HOS1* 是通过负向调控 *CBF* 从而调控 *COR* 基因表达的。*HOS1* 基因表达量在冷胁迫 10 min 内有所下降, 1 h 后即恢复至原初水平 (Ishitani 等 1998), 即瞬时减少, 与 *CBF* 基因表达量瞬时增加是相对应的, 这种变化在时间上也早于后者, 从而更充分地说明 *HOS1* 是处于 *CBF* 上游的。*HOS1* 基因编码一种环指蛋白。业已证实许多类似的环指蛋白都具有泛素 E3 连接酶作用, 也就是说, E3 负责将泛素连接到异源底物或/和环指蛋白本身上。E3 的这种介导非常重要, 它还有辨认特定蛋白质的功能, 其作用关系到许多特定蛋白的降解。于是, 有人据此推测, 低温下 *HOS1* 能介导某个(或某些)未知 *CBF* 上游激活因子的降解 (Lee 等 2001)。在野生型拟南芥中异位表达 *HOS1* 基因可导致 *HOS1* 共抑制现象的发生, 出现与突变体 *hos1* 相似的表型 (Lee 等 2001), 这似乎表明 *HOS1* 具有泛素 E3 连接酶的作用(即介导自身降解)。尽管有人推测 *HOS1* 可能控制着 ICE 状态的转变 (Lee 等 2001; Thomashow 1999), 但 *HOS1* 是否具有泛素 E3 连接酶作用以及对哪种(或哪些)蛋白的降解起介导作用还不明确, 尚有待进一步研究。综合以上结果, 可以认定 *HOS1* 通过降解某个(或某些)未知 *CBF* 激活因子负向调控 *CBF* 基因的转录。除此之外, *HOS1* 基因似乎还调控其他基因, 如 *hos1* 突变体对乙醇脱氢酶基因的冷诱导有影响, 而这个基因并不在 *CBF* 因子的调控之下; *HOS1* 也是目前所发现的唯一的一个既调控抗冷性又调控春化作用的基因 (Ishitani 等 1998)。

另外, 还有许多其他上游调控因子, 如 *LOS4* (low expression of osmotically responsive gene 4) (Gong 等 2002), 它编码含 DEAD 结构域的 RNA 解旋酶蛋白。功能研究的结果表明, 此种 RNA 解旋酶参与 mRNA 由核内向核外运输的过程, 能正向调控 *CBF* 及其下游基因的表达。拟南芥的 Ca^{2+}/H^+ 反向共同运输蛋白 *CAX1* 对寒冷反应行负调控, 若破坏 *CAX1* 的功能, 即可提高突变株的耐寒性, *CAX1* 可能通过调节 *CIPK3* (CBL-interacting protein kinase 3) 和 *CDPKs* (calcium-dependent protein kinases) 基因来开启低温反应基因 *CBF/DREB*

及其下游应答基因的表达 (Catala 等 2003)。

3.2 CBF 自身调控 *CBF* 基因家族中, 各基因成员之间的表达是否存在一定的相互调控作用, 还存在争论。Gilmour 等 (1998) 认为 *CBF* 基因的冷诱导表达并不涉及自身调节, 其主要依据是: (1) 过量表达 *CBF1* 的拟南芥转基因植株中没有检测到 *CBF3* 基因转录的改变; (2) 3 个 *CBF* 基因的启动子中都不含有 CRT/DRE 序列。而 Novillo 等 (2004) 则认为 *CBF2* 能负调控 *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达。他们通过 T-DNA 插入缺失突变的方法, 获得了 *cbf2* 缺失突变植株, 分析 *cbf2* 突变体时发现 T-DNA 插到了 *CBF2* 基因启动子的 TATA 框中, 以致 *CBF2* 基因转录的缺失。但拟南芥 *cbf2* 突变体比野生型更具抗冷性, 且突变体的 *CBF1* 和 *CBF3* 基因表达量比野生型的更高, 其下游冷应答基因的表达量也是如此。因此推测, *CBF2* 负调控 *CBF1* 和 *CBF3* 基因, 并先于 *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达。进一步对低温条件下拟南芥 *CBF* 基因的瞬时表达情况分析表明, *CBF1* 和 *CBF3* 都比 *CBF2* 基因表达得早, 当 *CBF2* 基因表达量在低温处理 2.5 h 达到最大时, *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达量已经降低了很多。这与 *CBF2* 负调控 *CBF1* 和 *CBF3* 的推测相一致。微阵列实验也表明, 在常温下, *CBF2* 基因的转录水平比 *CBF1* 和 *CBF3* 高 5~8 倍 (Chinnusamy 等 2003a; Fowler 和 Thomashow 2002; Chen 等 2002)。因此, 这些研究者认为, 当植物处于常温下时, *CBF2* 基因的表达水平足以抑制 *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达; 当植物遭受寒冷时, 某些特异的上游激活因子(如: ICE 因子)

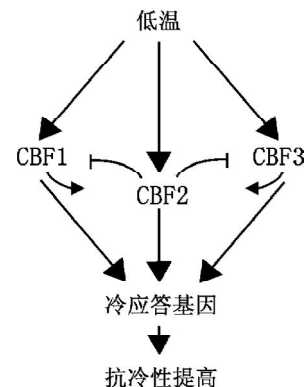


图1 *CBF2* 负调控 *CBF1* 和 *CBF3* 机制示意 (Novillo 等 2004)

迅速激活 *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达而逃脱 *CBF2* 的抑制, 当 *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达量达到一定水平时, *CBF2* 基因被诱导表达, 进而抑制 *CBF1* 和 *CBF3* 基因的表达。据此, Novillo 等(2004)还提出如图 1 所示的 *CBF* 基因自身调控模式。此调控模式结合 *CBF* 基因能调控下游应答基因的事实, 同时提出 *CBF1* 和 *CBF3* 能够正向调控 *CBF2* 基因表达的假设, *CBF1* 和 *CBF3* 基因的瞬时表达可以用 *CBF2* 抑制来解释, 而 *CBF2* 基因的瞬时表达可能是某个(或某些)下游未知调控因子的反馈抑制, 但这还缺少足够的实验依据, 尚待进一步探讨。

3.3 CBF下游调控因子 *CBF* 的下游调控因子众多, 主要有 *COR*、*LOS2*、*SFR6* (*sensitive to freezing 6*) 等, 这些因子往往与植物的低温抗性直接相关, 如维持生物膜稳定性, 消除活性氧等。

COR 基因是一类在低温条件下高度表达(是正常生长温度下的 50~100 倍), 并在抗冷中直接发挥作用的基因。Thomashow 实验室(Hajela 等 1990; Lin 和 Thomashow 1992)分离了 4 个 *COR* 基因, 分别是 *COR6.6*、*COR15a*、*COR47* 和 *COR78*; 另外, Yamaguchi-shinozaki 和 Shinozaki (1994) 也在拟南芥中发现一组抗旱基因 *RD*。DNA 序列分析表明, *COR78* 与 *RD29A*、*COR47* 与 *RD17* 分别为同一基因。由 DNA 推导出的蛋白质序列表明, *COR6.6*、*COR15a* 和 *COR78* 编码亲水肽类, 而 *COR47* 则编码脱水肽类, 这些蛋白可能在抗旱及抗冷中起作用。启动子分析表明, 这些 *COR* 基因中含有共同的核心序列 CCGAC, 称为 DRE 或 CRT, 并认为此序列为寒冷和干旱的顺式调控元件, 随后 *CBF/DREB1* 基因得到分离。这些 *COR* 基因中, 以 *COR15a* 研究得最为清楚(Artus 等 1996), 它编码一个分子量为 15 kDa 的多肽, 在其转运到叶绿体时, *COR15a* 被加工为 9.4 kDa 的多肽, 命名为 *COR15am*, 定位在叶绿体的基质中。为了确定 *COR15a* 是否在抗冷过程中起作用, Artus 等(1996)获得了一个组成型表达 *COR15a* 基因的拟南芥转基因植株, 通过比较发现转基因植株叶绿体在 1~2°C 时比野生型更具有抗冷性。他们进一步研究表明, 未经冷驯化的拟南芥转基因植株中 *COR15a* 的过量表达可减少冷诱导

的叶绿体膜双分子层结构向六角形 II 相结构的转变, 从而避免膜伤害(Artus 等 1996; Steponkus 等 1998)。*COR15a* 通过阻止冷害时膜系统向内弯曲和稳定膜的脂双层结构来提高植物的抗冷性。但单个 *COR* 基因的过量表达似乎并不能提高植株的整体抗冷能力, 必须联合其他 *COR* 基因共同作用, 这也许是通路末端基因的普遍特征之一。

Boyce 等(2003)用化学诱变法获得一个拟南芥冷驯化不敏感型突变体 *sfr6*。在 *sfr6* 突变体中, *CBF1*、*CBF2*、*CBF3* 在低温下的积累均达到正常水平, 而 *COR* 基因却没有受诱导表达。显然, *sfr6* 对冷驯化的不敏感不是由于 *CBF* 基因对低温的不响应, 而是由于 *COR* 基因没有被有效激活所致。所以, 他们推测 *SFR* 基因编码的蛋白介导了 *CBF* 蛋白与 *COR* 基因顺式作用元件 CRT/DRE 的结合。

Lee 等(2002)通过对 *RD29A-LUC* (*RD29A* 启动子与发光荧光素酶 *LUC* 的重组 DNA 分子) 植株进行甲烷乙磺酸盐(ethyl methane sulphonate, EMS) 诱变, 获得了一个 *los2* 突变体。通常情况下, *RD29A-LUC* 转基因植株在寒冷、渗透胁迫和 ABA 诱导下都有较强的荧光, 与 ABA、高盐和 PEG (polyethylene glycol) 等胁迫条件相比, 突变体 *los2* 只在冷胁迫条件下荧光较弱, 表明它只阻断低温对 *RD29A-LUC* 基因的诱导。他们深入研究的结果表明, 低温胁迫条件下, 突变体 *los2* 与正常植株中 *CBF* 基因的表达量变化没有区别, 这意味着 *LOS2* 为 *CBF* 下游功能因子, 直接或间接介导 *CBF* 对 *COR/RD* 基因的激活。他们进一步研究发现, *LOS2* 基因编码一种烯醇酶(Lee 等 2002), 常温下也有表达, 但低温条件下大量积累, 其启动子中也含有 CRT 序列, 这进一步表明 *LOS2* 基因可能受 *CBF* 因子的直接调控。相关实验表明, 烯醇酶定位于细胞核, 并与 C-Myc 启动子结合, 反向调控 C-Myc 的表达(Feo 等 2000), 这一结果有助于 *LOS2* 功能的研究。

下游基因受 *CBF* 调控的同时也能对 *CBF* 基因表达起反馈抑制。Guo 等(2002)筛选出一个突变体 *los1*, 此突变体中的 *CBF* 基因表达量增加, 但其下游基因表达量却减少, 表明下游基因能够反馈抑制 *CBF* 基因的表达。在 *LOS1* 基因缺失的条

件下, 下游基因的反馈抑制作用丧失, 从而出现 *CBF* 基因超表达的情况。

4 结语

低温是影响温带地区作物产量的一个主要因素, 大多数研究都致力于寻找提高作物耐低温的方法, 以期能提高产量和扩大种植的地理范围。但植物抗冷性属于复杂的数量性状, 靠单个基因很难彻底改善植物抗冷性(Thomashow 1990)。CBF 通路的发现和研究已经取得可喜进展, 从而为人们改善植物的抗冷性提供了可能。通过过量表达通路中的某些基因, 尤其是关键基因, 能在很大程度上提高植物抗冷性。但对植物细胞如何感受低温胁迫, 又如何将这些胁迫信号传递到细胞核中诱导转录因子 *CBF* 的表达, 并调控下游的各种功能基因的表达等一系列的分子机制迄今知之甚少, 有待探讨。

参考文献

- 李新国, 毕玉平, 赵世杰, 孟庆伟, 何启伟, 邹琦(2005). 短时低温胁迫对甜椒叶绿体超微结构和光系统的影响. 中国农业科学, 38 (6): 1226~1231
- 利容千, 王建波(2002). 植物逆境细胞及生理学. 武汉: 武汉大学出版社, 141
- Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin CT, Thomashow MF (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 13404~13409
- Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, Weintraub H (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. Mol Cell Biol, 13 (9): 5216~5224
- Boyce JM, Knight H, Deyholos M, Openshaw MR, Galbraith DW, Warren G, Knight MR (2003). The *sfr6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. Plant J, 34 (4): 395~406
- Catala R, Santos E, Alonso JM, Ecker JR, Martinez-Zapater JM, Salinas J (2003). Mutations in the Ca^{2+}/H^{+} transporter *CAX1* increase *CBF/DREB1* expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. Plant Cell, 15 (12): 2940~2951
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA et al (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell, 14 (3): 559~574
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK (2003a). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. Genes Dev, 17 (8): 1043~1054
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2003b). Molecular genetic perspective on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plant. J Exp Bot, 55: 225~236
- Feo S, Arcuri D, Piddini E, Oassantino R, Giallongo A (2000). *ENO1* gene product binds to the *c-myc* promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). FEBS Lett, 473: 47~52
- Fowler S, Thomashow MF (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. Plant Cell, 14 (8): 1675~1690
- Gilmour SJ, Fowler SG, Thomashow MF (2004). *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. Plant Mol Biol, 54 (5): 767~781
- Gilmour SJ, Seblot AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000). Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimic multiple biochemical changes associated with cold acclimation. Plant Physiol, 124: 1854~1865
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. Plant J, 16 (4): 433~442
- Gong ZZ, Lee H, Xiong LM, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. Proc Natl Acad Sci USA, 99 (17): 11507~11512
- Guo Y, Xiong LM, Ishitani M, Zhu JK (2002). An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 7786~7791
- Guy CL (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 41: 187~223
- Hajela RK, Horvath DP, Gilmour SJ, Thomashow MF (1990). Molecular cloning and expression of *COR* (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 93: 1246~1252
- Hughes M, Dunn M (1996). The molecular biology of plant acclimation to low temperature. J Exp Bot, 47: 291~305
- Ishitani M, Xiong L, Lee H, Zhu JK (1998). HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10: 1151~1161
- Joglo-ottoson KR, Gilmour SJ, Thomashow MF (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. Science, 280: 104~106
- Kanaya E, Noboru N, Morikawa K, Okada K, Shimura Y (1999). Characterization of the transcriptional activator CBF1 from *Arabidopsis thaliana*: evidence for cold denaturation in regions outside of the DNA binding domain. J Biol Chem, 274: 1043~1054

- 16068~16076
- Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong LM, Stevenson B, Zhu JK (2002). LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J*, 21: 2692~2702
- Lee H, Xiong L, Ishitani M (2001). The *Arabidopsis HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a ring finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning. *Genes Dev*, 15: 912~924
- Li XG, Duan W, Meng QW, Zou Q, Zhao SJ (2004). The function of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. *Plant Cell Physiol*, 45 (1): 103~108
- Li XG, Meng QW, Jiang GQ, Zou Q (2003). The susceptibility of cucumber and sweet pepper to chilling under low irradiance is related to energy dissipation and water-water cycle. *Photosynthetica*, 41 (2): 259~265
- Lin C, Thomashow MF (1992). A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 183: 1103~1108
- Liu Q, Kasuga Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 1391~1406
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J*, 38 (6): 982~993
- McKown R, Kuroki G, Warren G (1996). Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance. *J Exp Bot*, 47: 1919~1925
- Medina J, Bargas M, Terol J, Perez-Alonso M, Salinas J (1999). The *Arabidopsis CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol*, 119 (2): 463~470
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3985~3990
- Shinwari ZK, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 250: 161~170
- Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ, Thomashow MF (1998). Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 14570~14575
- Storckinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes a domain-containing transcriptional activator that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1035~1040
- Thomashow MF (1990). Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv Genet*, 28: 99~131
- Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 571~599
- Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR, Zarka DG (2001). Role of *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiol Plant*, 112: 171~175
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J*, 41 (2): 195~211
- Wanner LA, Junttila O (1999). Cold induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 120: 391~400
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251~264
- Zarka DG, Vogel JT, Cook D, Thomashow MF (2003). Cold induction of *Arabidopsis CBF* genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol*, 133 (2): 910~918
- Zhang X, Fowler SG, Cheng HM, Lou YG, Rhee SY, Stockinger EJ, Thomashow MF (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J*, 39 (36): 905~919