

## 综述 Reviews

## CBF转录因子在植物抗逆和生长发育中的重要功能

李健, 王雅晴, 刘洋, 杨兴洪\*

山东农业大学生命科学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

**摘要:** CBF/DREB转录因子属于AP2 (APETALA2)转录因子家族, 能够识别下游COR (*cold-regulated*)基因启动子上的CRT/DRE顺式作用元件。在低温等非生物胁迫条件下, CBF (C-repeat binding factor)转录因子通过结合在CRT/DRE元件上激活COR基因的表达, 从而提高植物抗逆能力。另外, CBF转录因子也会影响植物的生长和发育。本文从CBF转录因子的结构、调控CBF的上游调节因子、在应对非生物胁迫过程中激素信号与CBF通路的关系、CBF在植物适应逆境胁迫中的作用、不同CBF之间作用的共性与特异性, 以及CBF对植物生长发育的影响等方面, 阐述了CBF转录因子的调控机制及其在植物适应逆境胁迫和生长发育等方面的重要作用。

**关键词:** CBF; DREB; 非生物胁迫; 抗逆性; 生长发育

随着全球对粮食和能源的不断需求, 迫切需进一步提高作物产量(Borlaug 2007)。然而作物在栽培过程中经常受到诸如低温、高温、干旱等环境胁迫的影响, 使农作物大面积减产, 造成严重的经济损失。植物在长期的进化过程中形成了两种对抗环境胁迫的机制: 一是胁迫避免机制, 即植物在恶劣的环境中不进行发育生长, 如冬季植物种子的休眠机制; 二是胁迫忍耐机制, 当植物在生长过程中受到逆境胁迫时会启动一些保护机制, 提高植物的抗逆能力, 如植物在遭受冷胁迫时, 植物体内通过积累脯氨酸、可溶性糖等渗透调节物质以降低冰点, 从而提高了植物的抗冷能力(Chew和Halliday 2001)。植物应答非生物胁迫是一个高度复杂的过程, 涉及到胁迫相关、生物合成相关、代谢相关以及酶相关基因的表达(图1)(Zhao等2016)。

转录因子属于调控蛋白, 它可以调控下游大量基因的表达。因此转录因子可以作为一个有效的基因工程工具, 可以通过改变胁迫相关的转录因子基因表达, 从而改变植物的抗逆能力(Agarwal等2006)。到目前为止, 已经发现了多种胁迫相关的转录因子, 这些转录因子可以应答干旱、低温、高温、高盐等非生物胁迫。根据不同转录因子DNA结合结构域的不同可以将这些胁迫应答转录因子分为以下几种: 乙烯响应因子(ethylene-responsive factor, ERF)、亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)、髓细胞组织增生蛋白(myelocytomatosis protein, MYC)、v-myb禽成髓细胞瘤病毒癌基因同源物(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB)、脱

水应答元件结合蛋白(dehydration responsive element binding protein, DREB)、WRKY、NAC (NAM, ATAF1/2, CUC1/2)和DELLA转录因子(Agarwal等2006)。在这些转录因子中, 由于DREB转录因子在植物应答多种非生物胁迫时发挥着重要作用而被广泛关注(Agarwal等2006)。目前关于DREBs转录因子在植物应答非生物胁迫方面研究得比较清楚, DREBs受多种上游调控因子的调控, 同时DREBs又能够调控下游大量基因表达(Mohammad等2011)。虽然大多数DREB转化植株增强了抵抗非生物胁迫的能力, 但超表达DREB转录因子会对植物的生长发育造成一定的影响。本文主要阐述DREB转录因子在植物应答非生物胁迫时发挥的核心作用, 以及DREB转录因子对植物生长发育的影响。

### 1 CBF转录因子

DREB又称C-端重复结合因子(C-repeat binding factor, CBF), 含有AP2 (APETALA2)保守结构域, 属于AP2/ERF家族的转录因子, 它能够识别下游COR (*cold-regulated*)基因启动子上的C-端重复/脱水应答元件(C-repeat/dehydration responsive element, CRT/DRE) (核心基序: G/ACCGAC)顺式作用元件, 并且调控这些基因的表达(Thomashow 1999)。AP2/ERF家族是最大的基因家族, 该家族基因参与

收稿 2017-10-10 修定 2017-11-29

资助 国家自然科学基金(31470341)。

\* 通讯作者(E-mail: xhyang@sdau.edu.cn)。

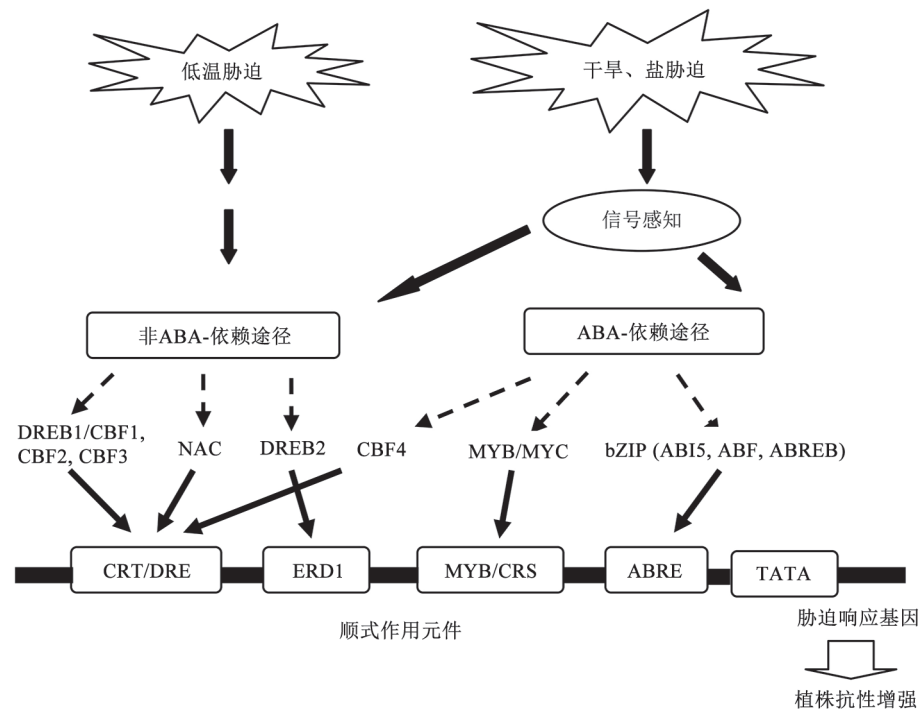


图1 植物应答低温、干旱等非生物胁迫的调控网络

Fig.1 The regulatory networks of plant responding to low temperature, drought and other abiotic stresses  
根据Khan (2011)文献修改。

调控多种生物过程, 包括开花、种子发育以及应答多种非生物胁迫。在拟南芥中, 将AP2/ERF家族划分为5个亚家族, 分别为AP2亚家族、RAV (related to ABI3/VP1)亚家族、DREB/CBF亚家族、ERF亚家族、soloist亚家族(Sakuma等2002)。许多研究已经表明DREB/CBF亚家族在植株应答非生物胁迫方面发挥着重要作用。CBF/DREB蛋白通常包含一个AP2结构域, 一个CBF信号基序DSAWR, 并且在AP2区域还有两个非常保守的氨基酸——缬氨酸(V)和谷氨酸(E) (Gamboa 等2007)。DREB亚家族又被进一步划分为6个亚组, 即A1~A6亚组(图2) (Sakuma等2002)。DREB A1亚组基因主要被低温、干旱等非生物胁迫诱导, 进而激活下游诸多冷相关基因表达(Gilmour等2000; Wang等2008)。DREB A2亚组基因编码的转录因子在植物应答高温和水分胁迫方面发挥着重要作用(Matsukura等2010; Reis等2014)。DREB A1和DREB A2亚组的转录因子主要参与非脱落酸(abscisic acid, ABA)-依赖的胁迫应答途径(Roychoudhury等2013; Yamaguchi等2005)。目前DREB A1和DREB A2亚组基因已经

在多种植物中被发现, 包括拟南芥、油菜、小麦、水稻、甘蔗、玉米等。A5亚组成员被研究得较少, 其亚组成员的功能还未被清晰地阐释。最近, Li等(2016)在沙漠赤藓中发现了一些A5亚组成员, 发现这些A5亚组成员能够应答多种非生物胁迫(高盐、干旱、低温), 这些成员大多数参与ABA-依赖的胁迫应答途径, 也有一些参与非ABA-依赖的胁迫应答途径; 还有一些不参与上述两种途径, 但也可以应答多种非生物胁迫。一些研究表明A6亚组的成员在植物抗旱中发挥着重要作用。在拟南芥中, 两个DREB A6亚组成员RAP 2.4和RAP2.4B能够调节多种基因的表达(Rae等2011), 植物中的AQP蛋白属于内在蛋白家族, 在植物维持水稳态方面发挥着重要作用(Chaumont和Tyerman 2014)。最近在苹果中发现的*MsDREB6.2*基因也属于DREB A6亚组, *MsDREB6.2*基因调节在苹果不定根的发育和应答干旱胁迫方面发挥着重要作用(Liao等2016)。

## 2 调控CBF的上游转录因子

植物的抗逆机制涉及到一个复杂的调控网

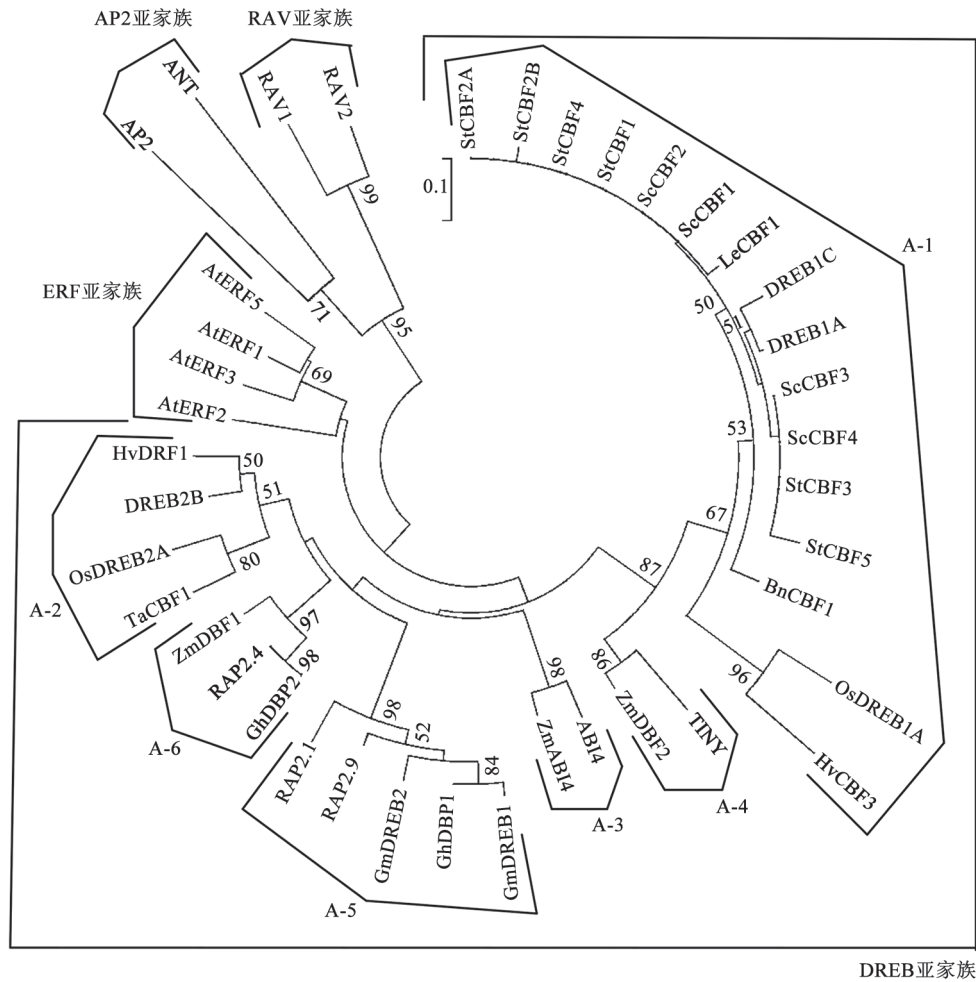


图2 不同物种CBF蛋白同源关系及其聚类分析

Fig.2 Phylogenetic tree of CBF proteins from different species and clustering analysis

络。Park等(2015)研究发现植物在应答冷胁迫时有许多基因先于CBF基因被诱导,也有一些基因与CBF基因同时被诱导。这表明CBF基因很可能不是直接的应答冷信号,而是通过某些通路将冷信号间接传递给CBF基因。Chinnusamy等(2003)研究发现,在拟南芥中ICE1 (induce of CBF expression 1)转录因子可以特异性地结合到CBF3基因的启动子上,并且正调控CBF3基因的表达。ICE1转录因子属于MYC类基本螺旋-环-螺旋转录因子,能识别CBF3基因启动子上的MYC顺式作用元件(CANNTG)。在拟南芥中超表达ICE1基因可增强CBF基因的表达,从而促进下游冷相关基因的表达,增强植株的抗冻能力;在拟南芥ice1突变体中,CBF3基因的表达量显著降低,并且下游冷相关基

因的表达量下降,植株的抗冻性降低(Chinnusamy等2003)。

Lee和Seo (2015)发现MYB96转录因子(属于R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-type MYB转录因子家族)参与ABA和冷信号途径,它不仅参与ABA-依赖的干旱应答反应,而且也参与到非ABA-依赖的冷应答途径。研究发现,MYB96转录因子可调节HHP (heptahelical protein)基因的表达,HHP蛋白与CBF的上游调节子相互作用,如ICE1、ICE2、钙调蛋白结合转录激活因子3 (calmodulin binding transcription activator 3, CAMTA3),MYB96-HHP最终通过调节CBF基因表达,调节冷相关基因的表达,从而改变植株的抗冻能力(Lee和Seo 2015)。Agarwal等(2006)研究发现在CBF (*AtCBF1*、*AtCBF2*、*AtCBF3*)基因的启动子

上也存在MYB顺式作用元件,表明MYB转录因子可能直接作用于*CBF*基因启动子上,从而调控*CBF*基因表达。MYB15属于MYB转录因子家族,它能负调控*CBF*基因的表达,MYB15可以与*CBF*基因的启动子相互作用。在低温条件下,相对于野生型植株,超表达*MYB15*基因植株的*CBF*表达量下降,MYB15的突变体中*CBF*基因表达量上升(Agarwal等2006),进一步的实验证明MYB蛋白能够抑制*CBF*基因的表达。酵母双杂和免疫共沉淀(pull down)实验证实MYB15也可以与ICE蛋白相互作用,当ICE蛋白与MYB15蛋白相互作用时能解除MYB15蛋白对*CBF*基因表达的阻遏作用(Agarwal等2006)。Zhang等(2016)研究发现,MYB3转录因子负调控*MtCBF4*基因表达,MYB61蛋白能够增强*MtCBF4*基因表达。Zhang等(2016)利用酵母单杂和凝胶迁移阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)证实MYB3蛋白可直接作用于*MtCBF4*基因的启动子上,利用瞬时侵染实验证实MYB3负调控*MtCBF4*基因的表达;利用酵母双杂和免疫共沉淀等实验证实MYB61蛋白与MYB3蛋白相互作用,并且利用瞬时侵染等实验证实MYB61能够正调控*MtCBF4*基因的表达,利用EMSA实验证明MYB61不与*MtCBF4*基因的启动子相互作用。MYB3蛋白直接作用于*MtCBF4*基因的启动子上并抑制该基因的表达,MYB61蛋白能够通过MYB3相互作用解除MYB3的抑制作用,促进*MtCBF4*基因的表达(Zhang等2016)。

Dong等(2006)研究发现高表达的渗透响应基因1 (*high expression of osmotically responsive gene 1*, *HOS1*)对*CBF*基因起负调控作用。*HOS1*作为植物冷响应的负调控因子被识别,它能够编码包含915个氨基酸的蛋白,在N-端存在一个短的类似“RING finger”的结构域,在动物中含有该结构域的蛋白作为细胞凋亡的抑制子(Lee等2001);在植物中,含有该结构域的蛋白一般发挥与泛素E3连接酶相似的作用。Dong等(2006)通过体外酵母双杂实验和体内免疫共沉淀实验证实HOS1蛋白与ICE蛋白相互作用,并能够介导ICE蛋白的泛素化,从而导致ICE蛋白被蛋白酶体降解,最终导致*CBF*和*COR*基因表达量降低。突变拟南芥的*HOS1*基因,*CBF*和*COR*基因的表达量上升,植株的抗冻性增强;在拟南芥

中超表达*HOS1*基因,*CBF*和冷相关基因的表达量下调,植株的抗冻性降低(Dong等2006)。

Miura等(2007)研究发现, SIZ1通过介导ICE1蛋白的类泛素化(SUMO)调控*CBF3/DREB1A*基因的表达,进而影响拟南芥的抗冻性。SIZ1是一种SUMO E3连接酶,能促进底物蛋白的SUMO化, SIZ1介导ICE1蛋白的SUMO,减少ICE蛋白的多聚泛素化,从而维持ICE1转录因子的稳定,进而抑制*MYB15*基因的表达(Miura等2007)。在拟南芥中突变*SIZ1*基因, *ICE1*基因的表达量没有变化,但*CBF*基因尤其是*CBF3*基因的表达量显著降低(Miura等2007)。Doherty等(2009)研究发现, CAMTA3转录因子能结合到*AtCBF2*基因启动子的CM2基序上,并且正调控*CBF*基因的表达。在低温条件下,拟南芥*camta1 camta3*双突变体的*AtCBF2*基因表达量显著降低,植株的抗冻能力明显下降(Doherty等2009)。总之, *CBF*转录因子在应答多种非生物胁迫时,不能直接应答胁迫刺激信号,而是受诸多上游因子的调控(图3)。

### 3 光信号对CBF的调控

大多数研究表明*CBF*是与温度密切相关的转录因子,其表达调控主要受温度调控。然而,一些研究表明光信号对*CBF*也有一定的调控作用,并且揭示了光对*CBF*调控的分子机制(图4)。Kidokoro等(2009)发现,拟南芥*CBF*基因在一天中的表达量伴随着生物节律发生有规律的变化。在温暖条件下,*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*基因的表达在黎明后8 h达到顶峰,在黎明后20 h下降到最低水平;如果将植物暴露在低温条件下,*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*基因的表达量在黎明后4 h达到顶峰,在黎明后16 h下降到最低水平。这表明在正常和低温条件下拟南芥*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*基因的表达受生物节律的调控(Fowler等2005)。Franklin和Whitelam (2007)在拟南芥中发现,光质显著影响*CBF*基因的表达;不同的红光/远红光比能通过生物钟调节植物体内*CBF*基因的表达。较低的红光/远红光比促进植物体内*CBF*基因的表达,从而增加*COR*基因的表达,进而增强植物的抗冻性。

Kidokoro等(2009)研究发现光敏色素相互作用因子(phytochrome-interacting factor, PIF7)能够通过直接结合到*DREB1B*和*DREB1C*基因启动子上

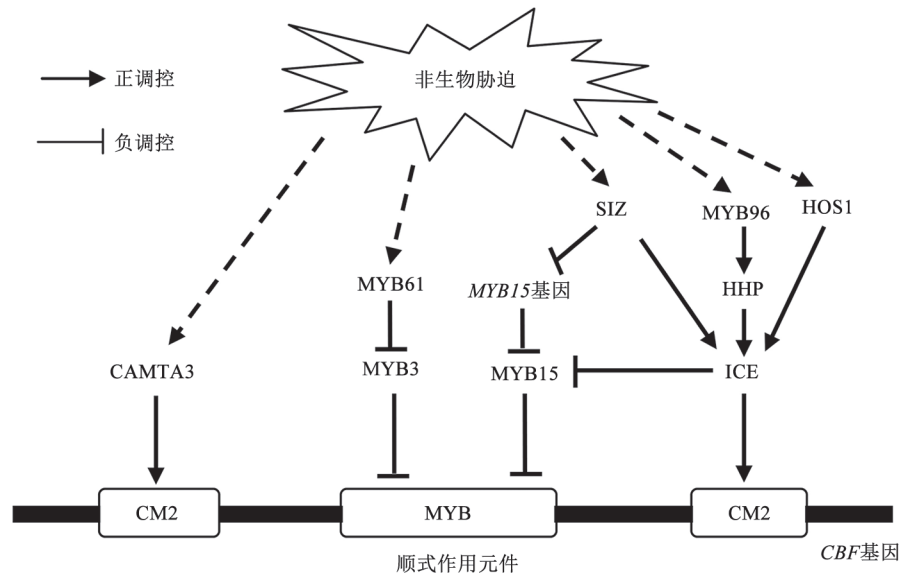


图3 CBF上游转录因子对CBF基因调控示意图

Fig.3 CBF upstream transcription factor regulates CBF gene expression

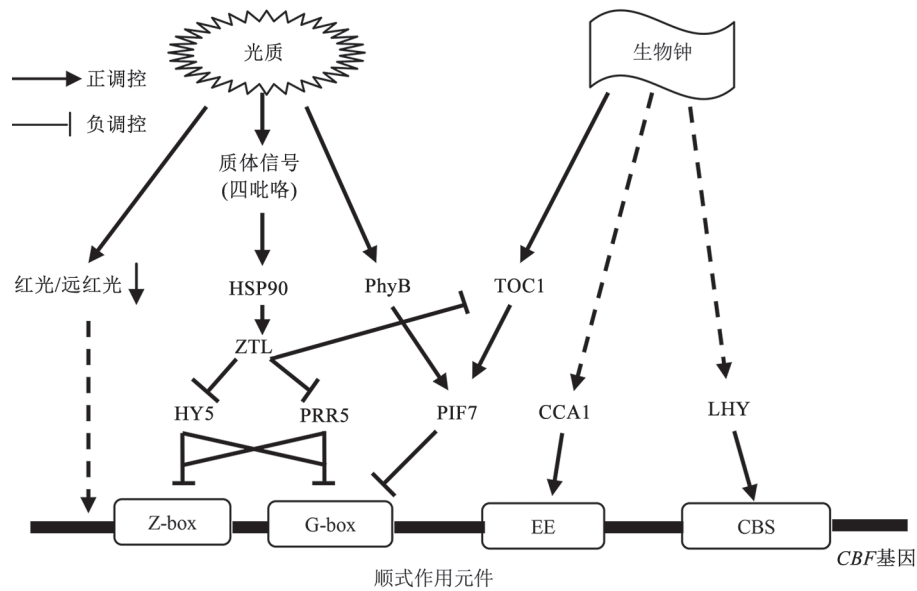


图4 光信号和生物钟对CBF基因的调控

Fig.4 Light signal and biological rhythm regulate CBF gene expression

的G-box顺式作用元件, 并且抑制DREB1B和DREB1C基因的表达; 在光照条件下, *pif7*突变体植株的DREB1B和DREB1C基因表达没有被抑制。这表明在生物节律中PIF7负调控DREB1B和DREB1C基因的表达。PIF家族蛋白属于基本螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)类转录因子, 是光信号途径的重要组分, 能够负调控光敏色素介导的信号途

径, 如下胚轴的延伸和叶绿体的发生。Kidokoro等(2009)还发现PIF7可以与成花途径整合因子(time of CAB expression 1, TOC1)和光敏色素B (phytochrome B, PhyB)相互作用而被激活, 其中TOC1是生物钟的核心组分, PhyB是红光受体。Dong等(2011)通过遗传学分析和ChIP实验分析发现昼夜节律生物钟相关因子1 (circadian clock-associated 1, CCA1)和

晚期下胚轴延伸因子(late elongated hypocotyl, LHY)这两个转录因子可以分别直接作用于*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*基因启动子的EE (序列: AAAATATCT)和CBS (序列: AATAT)顺式作用元件上,并且正调控*CBF*基因的表达。在拟南芥*cca1/lhy*双突变体中,冷诱导*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*基因的表达量显著降低,*CBF1*和*CBF3*基因表达的生物节律完全消失,*CBF2*基因表达仍然存在生物节律,但其生物节律没有野生型植株显著(Dong等2011)。

Noren等(2016)的最新研究发现,生物钟可以通过质体信号途径负调控*CBF*基因的表达。光信号通过质体信号途径引发叶绿体中四吡咯(tetrapyrrole)积累,四吡咯能够抑制细胞中热激蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)的活性。HSP90已被报道参与生物钟调控,HSP90对于ZTL(zeitlupe)的成熟和稳定起着重要作用,ZTL是生物钟的关键组件(Kim等2007)。ZTL是一个晚期生物钟组分,负责蛋白酶体依赖的TOC1和伪-响应调节器(pseudo-response regulator 5, PRR5)蛋白的降解,TOC1和PRR5是两个晚期生物钟组分(Kiba等2007)。ZTL与下胚轴延伸因子(long hypocotyl 5, HY5)和PRR5蛋白相互作用并促进HY5或PRR5降解,HY5和PRR5能够识别*CBF*基因启动子的G-box (CACGTG)或Z-box (TACGTG)顺式作用元件并且分别负调控*CBF3*和*CBF1/2*基因的表达(Noren等2016)。四吡咯通过一系列的负调控过程最终实现了光信号对*CBF*基因的负调控。铜响应缺陷基因(*copper response defect, crd*)突变能够引发质体(叶绿体)内四吡咯的积累(Bang等2008)。Noren等(2016)研究发现*crd*突变体植株中的四吡咯积累量明显增多,*CBF*基因的表达受到严重抑制。在白天植物体通过积累四吡咯来减少*CBF*基因的表达可能对解除CBF蛋白引起的生长迟滞现象起着重要作用。总之,光信号和生物钟可以通过多种途径实现对CBF转录因子的调控,进而影响下游COR基因的表达(图4)。这为在生产实践中,通过调节光信号(包括光质和光周期),以实现植物抗冷性的调节,提供了理论指导意义。

#### 4 激素信号与CBF通路的联系

植物受到环境胁迫时,会引发植物体内许多生理和代谢的变化。激素在植物体内含量少,代

谢快,发挥作用迅速,在植物应对环境胁迫时发挥着重要作用。低温抑制植物的生长是通过调节植物激素的合成或降解实现的(Achard等2008)。Jia等(2016)研究发现在低温非冷冻条件下*cbf*突变体比野生型植株长得更大一些,这表明CBF可能参与到激素的代谢和信号途径中。Kang等(2002)证明ABA在植物应对环境胁迫时发挥着重要作用。ABA调控下游基因的表达是通过作用于下游基因的脱落酸响应元件(ABA response element, ABRE)(Kang等2002; Yoshida等2010)。目前普遍认为ABA与植物的抗盐和耐旱有关,大多数高盐和干旱诱导的基因包含有ABRE元件(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 2005)。虽然ABA途径与CBF通路在应答环境胁迫中都发挥重要作用,以前人们经常认为ABA和CBF途径是两个相互独立的通路,但近期研究表明这两条信号通路存在紧密的联系。Knight等(2004)研究发现*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*基因的表达可以被外源施加的ABA所诱导。虽然*CBF*基因启动子上不含有ABRE元件,但ABA可以与*CBF*基因启动子上的CRT顺式作用元件相互作用,进而激活*CBF*基因表达。许多冷应答基因的启动子上既含有ABRE元件又含有CRT元件(Nakashima等2009),即一些COR基因既能够被CBF调控,又能够被ABA调控。Ding等(2015)研究发现开放气孔因子(open stomata 1, OST1)能够通过激活ICE蛋白进而增强*CBF*基因的表达。OST1是ABA信号通路中的一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在胁迫条件下,ABA积累,然后ABA与ABI1(ABA受体)结合,解除ABI1对OST1的抑制作用。OST1能介导ICE蛋白磷酸化从而稳定和激活ICE蛋白,同时OST1与ICE和HOS1蛋白复合体相互作用,抑制HOS1介导的ICE蛋白降解(Ding等2015)。拟南芥*ost1*突变体表现为冷冻敏感型,而*OST*基因超表达株系表现出更强的抗冻性(Ding等2015)。Lee和Seo(2015)研究发现MYB96可以应答ABA和冷信号,MYB96直接作用于*HHP1*、*HHP2*、*HHP3*基因的启动子上,HHP蛋白又可以与CBF的上游调节子相互作用,如ICE1、CAMTA3、ICE2。这些证据表明ABA途径和CBF途径存在着复杂紧密的相互作用,它们一起参与植物的抗逆过程。

乙烯是一种重要的植物激素,广泛参与到细

胞和植物发育过程中,并且在植物应答生物和非生物胁迫中发挥着重要作用(Shi等2012)。Shi等(2012)研究发现乙烯信号能够通过抑制*CBF*和*ARR*基因的表达从而负调控植株的抗冻能力。他们通过超表达乙烯前体——1-氨基环丙烷-1-羧酸基因来增强植物体内的乙烯水平,结果发现植株的抗冻性显著下降;但外源施加乙烯生物合成抑制剂——氨基乙氧基乙烯甘氨酸或乙烯受体抑制剂 $Ag^{2+}$ ,植株的抗冻性显著增强。乙烯-不敏感突变体(包括*etr1*、*ein4*、*ein2*、*ein3*单突变体和*ein3 eil1*双突变体)植株的抗冻性显著增强(Shi等2012)。在拟南芥中乙烯响应因子1(ethylene response 1, *ETR1*)、*ETR2*、乙烯响应感受器1(ethylene response sensor 1, *ERS1*)、*ERS2*都可以作为乙烯信号的受体,并且发挥着不同的功能。在缺乏乙烯时乙烯受体与组成型三重反应应答因子1(constitutive triple response 1, *CTR1*)相互作用,*CTR1*是一个丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶,能够被乙烯受体正调控(Gao等2003)。*CTR1*反过来直接或间接负调控乙烯信号正调控因子*EIN2*。*EIN2*通过降解*EIN3*结合F-box(*EIN3 binding F-box 1*, *EBF1*)和*EBF2*来稳定和激活*EIN3*。Shi等(2012)通过遗传学分析和生物化学分析证实*EIN3*可以直接作用于*CBF*和*ARR*基因启动子的EBSs顺式作用元件上,并且负调控*CBF*和*ARR*基因的表达,因此乙烯负调控植物的抗冻性至少部分是通过调控*CBF*途径实现的。

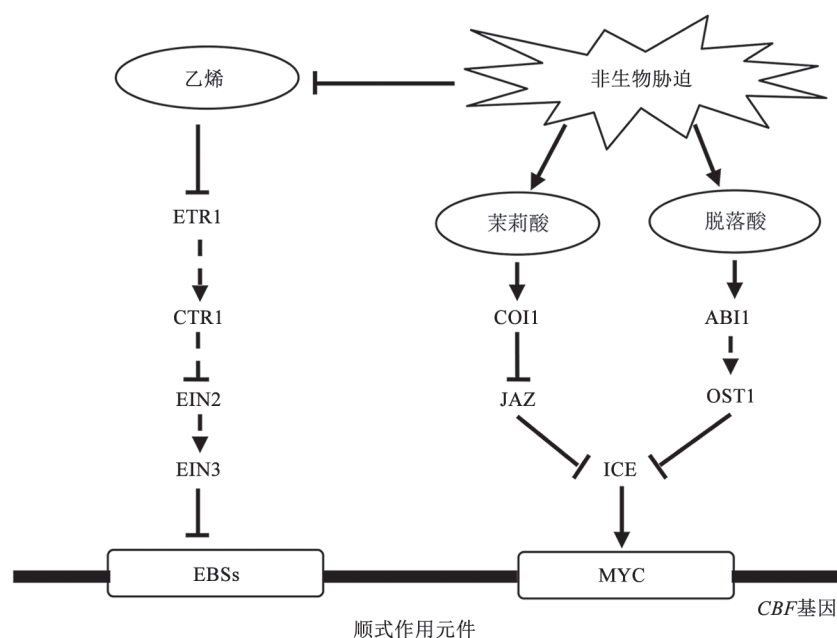
茉莉酸甲酯是较晚发现的一种植物激素,研究发现茉莉酸甲酯提高植物的抗冷性也是通过*CBF*途径实现的。Hu等(2013)研究发现茉莉酸甲酯可以提高拟南芥的耐冷性而不需要通过冷驯化途径。*ICE*元件是*CBF*的上游调控元件,能激活*CBF*基因的表达。Hu等(2013)发现几个茉莉酸ZIM-结构域(jasmonate ZIM-domain, *JAZ*)蛋白在茉莉酸信号通路中起到阻遏作用,*JAZ1*或*JAZ4*与*ICE1*和*ICE2*相互作用抑制*ICE*的功能,使其不能激活*CBF*基因的表达。当茉莉酸甲酯含量升高时,茉莉酸甲酯会介导*JAZ*降解,从而解除*JAZ*对*ICE*-*CBF*通路的抑制作用,进而*CBF*基因的表达量上升。

水杨酸(salicylic acid, SA)是重要的能够激活植物过敏反应和系统获得性抗性的内源信号子。除了参与植物抵抗病害等生物胁迫外,外施SA还

可提高植物对高温、干旱、盐渍以及重金属离子等多种非生物胁迫的抵抗能力(张俊环等2014)。张俊环等(2014)研究发现,在正常或低温胁迫条件下外源施加SA,杏花的*CBF*基因表达量显著高于未施加SA的;同时还发现在低温条件下,外源施加SA的杏花能够维持较高的抗氧化酶活性,降低细胞膜的破损程度,从而保护杏花免受低温损伤。植物应答非生物胁迫是一个复杂的网络系统,多种激素信号介导的植物应答非生物胁迫途径与*CBF*介导的应答途径存在一定的联系(图5)。

### 5 CBF途径增强植物的抗逆能力

*CBF*途径既存在于耐冷的物种(例如小麦、大麦、黑麦等),也存在于不耐冷的物种(例如番茄、水稻、玉米)中。*CBF*途径不仅在植物的抗冷中发挥着重要的作用,而且在植物的抗旱、抗盐中也发挥一定的作用。通过对拟南芥转录组分析发现,*CBF*转录因子调控大量冷相关基因的表达(Zhao等2016; Jia等2016)。Pino等(2008)研究发现在马铃薯中过量表达*AtCBF1*基因可以增强马铃薯的耐冷性。Oakenfull等(2013)发现,将欧洲越桔中的*CBF1*基因在拟南芥中超表达可增强拟南芥的耐冷性。Kidokoro等(2015)发现,大豆中的*DREB1*基因在增强作物的耐热性和抗旱性中发挥重要作用。Chen等(2010)发现,大豆的耐热途径是通过*DREB1*激活HSF,然后HSF再激活HSP实现的。Pino等(2013)研究发现在马铃薯中过量表达*ScCBF1*基因可以增强马铃薯的耐旱性。周伟等(2014)在山葡萄中克隆到一个*VaDREB*转录因子的基因,重组酵母菌株与表达*VaDREB*基因的转基因拟南芥株系均表现出明显增强的盐、干旱、低温和高温胁迫耐受性表型,基因表达分析的结果表明,转基因拟南芥株系中抗逆相关功能基因的表达量出现明显上调,这些结果证明*VaDREB*转录因子在植物抗逆调控过程中起着重要作用。Zhao等(2016)通过拟南芥*CBF*基因缺失分析进一步证实*CBF*在植物抗冷冻胁迫中所发挥的重要作用。Zhao等(2016)通过Cas9技术获得*CBF*基因突变植株,通过分析发现突变株中*COR*基因的表达量明显降低,其抗冷冻能力也明显减弱。另外,Zhao等(2016)也发现在*cbf*突变体中,植株侧根对盐更敏感,这表明*CBF*在植物的抗盐中也发挥着重要作用。Dou等(2014)研究

图5 激素信号对*CBF*基因表达的调控Fig.5 Multiple hormone signals are involved in the regulation of *CBF* gene expression

发现在马铃薯中超表达拟南芥*CBF3*基因可以提高马铃薯的耐热性,转*AtCBF3*基因的马铃薯在受到热胁迫时能保护光系统II。Jia等(2016)通过研究拟南芥*cbf*突变体,发现*CBF*基因在拟南芥的冷驯化过程中发挥关键作用,拟南芥*cbf*突变体几乎失去了冷驯化能力,其冷驯化前后的抗冻性差异不大。这些研究结果充分证明*CBF*通路在植物应答逆境胁迫中发挥着重要作用。

## 6 *CBF*作用的共性和特异性

*CBF*转录因子存在一定的共性,一方面表现在不同种属的开花植物中大都存在*CBF*通路,它们在DNA序列上高度保守,在功能上相近,例如,拟南芥的*CBF1*和欧洲越桔中的*CBF1*在抗冷中都发挥着重要的作用;另一方面表现在同一物种的不同*CBF*基因,DNA序列相似,功能相近,如拟南芥的*CBF1*、*CBF2*、*CBF3*在植物抗冷中都发挥着重要作用。

*CBF*虽然在功能上存在一定的共性,但不同*CBF*之间,其功能还存在明显的差异。首先,不同的种属间*CBF*的功能存在着差异,拟南芥、马铃薯、欧洲越桔中的*CBF1*在作物的抗冷中发挥着重要作用;然而大豆中的*CBF1*在作物的耐热、抗旱中发挥着重要作用,但在作物抗冷性中的作用却

不明显。其次,同一物种中的不同*CBF*也存在着明显的功能差异,虽然这些*CBF*转录因子的序列相似。Novillo等(2003)研究发现在拟南芥中*CBF2*负调控*CBF1*和*CBF3*基因。他们构建了拟南芥*cbf2*突变体,发现与对照植株相比,*cbf2*突变体植株表现出更强的耐冷性、抗旱性和耐盐性。低温条件下,分析拟南芥*cbf2*突变体、野生型中*CBF1*和*CBF3*基因的表达量后发现,*cbf2*突变体中*CBF1*和*CBF3*基因的表达量比对照组高,进一步证明*CBF2*对*CBF1*和*CBF3*起负调控作用。Siddiqua和Nasuth (2011)通过对葡萄中*VrCBF1*和*VrCBF4*基因的研究发现,与转*VrCBF4*基因的拟南芥相比,转*VrCBF1*基因的拟南芥具有更强的抗冷性。

不同物种中的*CBF*以及同一物种中的不同*CBF*,其作用既存在共性,又有显著的差异。目前关于不同*CBF*之间其特异型的内在原因,以及不同的*CBF*在植物抗逆中的具体作用机制还不是很清楚,需要进一步深入研究。

## 7 *CBF*对植物生长发育的影响

虽然提高*CBF*基因的表达水平可以提高植物的抗冷性,但*CBF1*和*CBF3*基因的高表达水平却导致植物的生长迟缓,开花延迟,产量降低(Gilmour 2000)。An等(2016)在木薯中超表达拟南芥*CBF3*



基因,虽然提高了转基因木薯的抗冷性和耐旱性,但也产生了一系列不利影响,如生长迟滞、叶片卷曲、根长变短、产量降低、花青素含量降低等。Siddiqua和Nassuth (2011)在对转*VrCBF1*基因拟南芥表型的研究中发现,所有转基因的植株表现出植株矮小,叶片变小、变厚,叶片匍匐,抽苔和开花时间晚,叶片的海绵组织细胞变大、变长,栅栏细胞层变薄,气孔、表皮毛的数量增多等表型。Pino等(2008)在对超表达*AtCBF1*基因马铃薯的研究中,也发现了类似转*VrCBF1*基因拟南芥的表型变化,过量表达*AtCBF1*不仅造成植株生长迟滞、矮小,而且马铃薯的产量显著降低。Siddiqua和Nassuth (2011)分析了一些与植物生长发育相关基因——赤霉素氧化酶基因(*AtGA2ox3/7*)、赤霉素信号抑制蛋白基因(*AtRGL3*)、开花时间调节基因(*FLC*)的表达量,发现这3个基因在转基因株系中的表达量显著上调,这可能是造成转*VrCBF1*基因拟南芥生长迟缓、开花延迟的内在原因。

Pino等(2008)利用35S启动子在马铃薯持续表达*AtCBF1*基因造成马铃薯显著减产,减产可达到60%以上,然而利用诱导性启动子RD29A代替35S启动子,不仅可以提高马铃薯的抗冷性,而且对马铃薯的生长和产量几乎没有负面影响。利用干旱诱导的玉米启动子Rab17代替35S启动子,可以减少因*TaDREB2*或*TaDREB3*基因过量表达对植物生长造成的不利影响(Morran等2010)。另外,研究还发现,可以通过超表达异源*CBF*基因来避免过量表达*CBF*所造成的不利影响,例如在烟草中过量表达小麦的*CBF2*基因,在水稻中过量表达大麦的*CBF4*基因都可以提高转基因作物的抗逆性又不影响作物的生长(Takumi等2008)。由于大多*CBF*基因在植物中超表达在提高植物抗逆性的同时,也会影响植物的生长发育,因此,在研究中,既要发挥*CBF*提高作物抗逆性的功能,又要尽可能减少*CBF*带来的不利影响。而通过异源超表达*CBF*基因,选用不同类型的启动子等,可以降低或减轻*CBF*造成的不利影响。

## 8 展望

*CBF*不仅在植物的抗逆应答过程中具有重要作用,而且广泛参与到植物的各种代谢过程。Zhao等(2016)通过*CBF*功能缺失分析发现,许多

*CBF*直接或间接调控的基因参与到许多生理代谢过程,例如,碳水化合物代谢、脂类代谢、细胞壁修饰、调控其他转录因子、转运蛋白、激酶、钙信号、激素信号等过程。由此可见,*CBF*在植物应对非生物胁迫中的抗逆作用可能是其所具有的功能之一,*CBF*在植物代谢等其他方面的功能还有待进一步研究和探索。

## 参考文献

- Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008). The cold-inducible *CBF1* factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing *DELLA* proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell*, 20: 2117–2129
- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006). Role of *DREB* transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25: 1263–1274
- An D, Ma Q, Yan W, Zhou W, Liu G, Zhang P (2016). Divergent regulation of *CBF* regulon on cold tolerance and plant phenotype in cassava overexpressing *Arabidopsis CBF3* gene. *Front Plant Sci*, 7: 1866
- Bang WY, Jeong IS, Kim DW, Im CH, Ji C, Hwang SM, Kim SW, Son YS, Jeong J, Shiina T, et al (2008). Role of *Arabidopsis* *CHL27* protein for photosynthesis, chloroplast development and gene expression profiling. *Plant Cell Physiol*, 49: 1350–1363
- Borlaug N (2007). Feeding a hungry world. *Science*, 318: 359
- Chaumont F, Tyerman SD (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol*, 164: 1600–1618
- Chen H, Wang JE, Lim CJ, Kim DY, Lee SY, Lim CO (2010). *Arabidopsis* *DREB2C* functions as a transcriptional activator of *HsfA3* during the heat stress response. *Biochem Biophys Res Commun*, 401: 238–244
- Chew YH, Halliday KJ (2001). A stress-free walk from *Arabidopsis* to crops. *Curr Opin Biotechnol*, 22: 281–286
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK (2003). *ICE1*: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Gene Dev*, 17: 1043–1054
- Ding YL, Li H, Zhang XY, Xie Q, Gong ZZ, Yang SH (2015). *OST1* kinase modulates freezing tolerance by enhancing *ICE1* stability in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 32: 278–289
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF (2009). Roles for *Arabidopsis* *CAMTA* transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21: 972–984
- Dong CH, Agarwal M, Zhang YY, Xie Q, Zhu JK (2006). The negative regulator of plant cold responses, *HOS1*, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of *ICE*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 8281–8286
- Dong MA, Farre EM, Thomashow MF (2011). Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (*CBF*) pathway in *Arabidopsis*. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 108: 7241–7246
- Dou HO, Xu KP, Meng QW, Li G, Yang XH (2014). Potato plants ectopically expressing *Arabidopsis thaliana* *CBF3* exhibit enhanced tolerance to high-temperature stress. *Plant Cell Environ*, 38: 61–72
- Fowler SG, Cook D, Thomashow MF (2005). Low temperature induction of *Arabidopsis* *CBF1*, *2*, and *3* is gated by the circadian clock. *Plant Physiol*, 137: 961–968
- Franklin KA, Whitelam GC (2007). Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 39: 1410–1413
- Gamboia MC, Rasmussen-Poblete S, Valenzuela PD, Krauskopf E (2006). Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globules*. *Plant Physiol Biochem*, 45 (1): 1–5
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE (2003). Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, 278: 34725–34732
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000). Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol*, 124: 1854–1865
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 290: 2110–2113
- 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*. *Plant Cell*, 25 (8): 2907–2924
- Jia YX, Ding YL, Shi YT, Zhang XY, Gong ZZ, Yang SH (2016). The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 212: 345–353
- Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 14: 343–357
- Khan MS (2011). The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnol Biotec Eq*, 25: 2433–2442
- Kiba T, Henriques R, Sakakibara H, Chua NH (2007). Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCF<sup>ZTL</sup> complex regulates clock function and photo morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 19: 2516–2530
- Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari ZK, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K, et al (2009). The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 151: 2046–2057
- Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Myint Phyu Sin Htwe N, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K, et al (2015). Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *Plant J*, 81: 505–518
- Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, 449: 356–360
- Knight H, Zarka DG, Okamoto H, Thomashow MF, Knight MR (2004). Abscisic acid induces *CBF* gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiol*, 135: 1710–1717
- Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK (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
- Lee HG, Seo PJ (2015). The MYB96–HHP module integrates cold and abscisic acid signaling to activate the CBF–COR pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 82: 962–977
- Li HY, Zhang DY, Li XS, Guan KY, Yang HL (2016). Novel DREB A-5 subgroup transcription factors from desert moss (*Syntrichia caninervis*) confers multiple abiotic stress tolerance to yeast. *Plant Physiol*, 194: 45–53
- Liao X, Guo X, Wang Q, Wang YT, Zhao D, Yao LP, Wang S, Liu GJ, Li TH (2017). Overexpression of *MsDREB6.2* results in cytokinin-deficient developmental phenotypes and enhances drought tolerance in transgenic apple plants. *Palnt J*, 89: 510–526
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010). Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics*, 283: 185–196
- Miura KJ, Jin JB, Lee JY, Yoo CY, Stirn V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (4): 1403–1414
- Mohammad S, Mesbah B, Siamak K, Domingo MR, Fabián G, María S, Daniel V (2011). Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem*, 124: 964–970
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Ellyby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S (2010). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnol J*, 9 (2): 230–249
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol*, 149: 88–95
- Norén L, Kindgren P, Stachula P, Rühl M, Eriksson ME, Hurry V, Strand Å (2016). Circadian and plastid signaling pathways are integrated to ensure correct expression of the *CBF* and *COR* genes during photoperiodic growth. *Plant Physiol*, 171: 1392–1406
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J (2003). *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 (11): 3985–3990

- Oakenfull RJ, Baxter R, Knight MR (2013). A C-repeat binding factor transcriptional activator (CBF/DREB1) from European bilberry (*Vaccinium myrtillus*) induces freezing tolerance when expressed in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 8 (1): e54119
- Park SC, Lee CM, Doherty CJ, Gilmour SJ, Kim SJ, Thomashow MF (2015). Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. Plant J, 82: 193–207
- Pino MT, Avila A, Molina A, Jeknic Z, Chen THH (2013). Enhanced *in vitro* drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the *ScCBF1* gene. Cien Inv Agric, 40 (1): 171–184
- Pino MT, Skinner JS, Jeknić Z, Hayes PM, Soeldner AH, Thomashow MF, Chen TH (2008). Ectopic *AtCBF1* over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. Plant Cell Environ, 31: 393–406
- Rae L, Lao NT, Kavanagh TA (2011). Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. Planta, 234: 429–444
- Reis RR, Cunha BA, Martins PK, Martins MT, Alekcevetch JC, Chalfun A, Andrade AC, Ribeiro AP, Qin F, Mizoi J, et al (2014). Induced over-expression of *AtDREB2A CA* improves drought tolerance in sugarcane. Plant Sci, 221–222: 59–68
- Roychoudhury A, Paul S, Basu S (2013). Cross-talk between abscisic acid dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. Plant Cell Rep, 32: 985–1006
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. Biochem Biophys Res Commun, 290: 998–1009
- Shi Y, Tian S, Hou L, Huang X, Zhang X, Guo H, Yang S (2012). Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of *CBF* and type-A *ARR* genes in *Arabidopsis*. Plant Cell, 24: 2578–2595
- Siddiqua M, Nassuth A (2011). *Vitis CBF1* and *Vitis CBF4* differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression. Plant Cell Environ, 34: 1345–1359
- Takumi S, Shimamura C, Kobayashi F (2008). Increased freezing tolerance through up-regulation of downstream genes via the wheat *CBF* gene in transgenic tobacco. Plant Physiol Biochem, 46: 205–211
- Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 571–599
- Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C (2008). Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. Plant Mol Biol, 67: 589–602
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005). Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. Trends Plant Sci, 10 (2): 88–94
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. Plant J, 61 (4): 672–685
- Zhang JH, Wang YZ, Sun HY, Yang L, Jiang FC (2014). Effects of exogenous salicylic acid on antioxidant enzymes and CBF transcription factor in apricot (*Prunus armeniaca* L.) flowers under chilling stress. Plant Physiol J, 50 (2): 171–177 (in Chinese with English abstract) [张俊环, 王玉柱, 孙浩元, 杨丽, 姜凤超 (2014). 外源水杨酸对低温下杏花抗氧化酶和CBF转录因子表达的影响. 植物生理学报, 50 (2): 171–177]
- Zhang ZZ, Hu XN, Zhang YQ, Miao ZY, Xie C, Meng XZ, Deng J, Wen JQ, Mysore KS, Frugier F, et al (2016). Opposing control by transcription factors MYB61 and MYB3 increases freezing tolerance by relieving C-repeat binding factor suppression. Plant Physiol, 172: 1306–1323
- Zhao CZ, Zhang ZJ, Xie SJ, Si T, Li YY, Zhu JK (2016). Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 171: 2744–2759
- Zhou W, Wu X, Jia CG, Hu RX, Du Q, Li QY, Pan HY (2014). Cloning and analysis of resistance function of *VaDREB* transcription factor from *Vitis amurensis*. Plant Physiol J, 50 (10): 1563–1573 (in Chinese with English abstract) [周伟, 吴宪, 贾承国, 胡瑞雪, 杜茜, 李启云, 潘洪玉 (2014). 山葡萄转录因子基因 *VaDREB* 的克隆及其抗逆功能分析. 植物生理学报, 50 (10): 1563–1573]

## The important function of CBF transcription factors in plant stress tolerance, growth and development

LI Jian, WANG Ya-Qing, LIU Yang, YANG Xing-Hong\*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

**Abstract:** The CBF/DREB transcription factor belongs to the APETALA2 (AP2) family and interacts with the CRT/DRE *cis*-acting element which is located the downstream *cold-regulated* (*COR*) gene promoter. C-repeat binding factor (CBF) transcription factor activates the expression of the *COR* gene by combining with CRT/DRE element under low temperature and other adversity conditions, so as to enhance the stress tolerance in plants. In addition, CBF transcription factors affect plant growth and development. In this paper, the important role of CBF transcription factors in plant responding to abiotic stress and affecting growth and development are summarized. These include the structure of CBF transcription factors, the upstream transcription factors that regulate CBF, the internal relation between hormone signaling and CBF pathway responding to abiotic stress, the role of CBF in plant stress resistance and growth and development. Meanwhile, the similarities and differences of CBFs in their functions are also discussed.

**Key words:** CBF; DREB; abiotic stress; stress tolerance; growth and development

---

Received 2017-10-10 Accepted 2017-11-29

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470341).

\*Corresponding author (E-mail: xhyang@sdau.edu.cn).