

转录激活因子 CBF 在植物调节冷驯化中的作用

任艳丽^{1,2} 崔百明^{1,2} 卫海滨¹ 彭明^{1,*}

¹中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101; ²石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003

Role of CBF in Regulating Cold Acclimation in Plants

REN Yan-Li^{1,2}, CUI Bai-Ming^{1,2}, WEI Hai-Bin¹, PENG Ming^{1,*}

¹State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; ²College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China

提要 某些植物经过一段时间的非冻低温作用后, 抗冻性增强, 这种现象称为冷驯化。CBF 转录激活因子在其中起关键性的调节作用。最近, 基因组学和代谢组学的研究表明, CBF 冷响应途径在植物低温响应中占主导地位。文章介绍相关的研究进展。

关键词 CBF; 冷驯化; CRT/DRE DNA 调控元件; 抗冻

低温冻(寒)害是农业生产中的一种严重的自然灾害, 是限制农作物的地理分布和造成农作物产量和质量下降的因素之一(Thomashow 1999)。许多植物经过一段时间的非冻低温作用后, 抗冻性增强, 这种现象称为冷驯化(cold acclimation, CA) (Guy 1990)。1985年, Guy 等首次报道菠菜在冷驯化过程中基因表达会发生改变以后, 冷调控基因(cold-regulated gene, *COR*)的克隆及其功能、表达、调控遂成为研究热点(Hughes 和 Dunn 1996), 并因此促成在冷驯化中起关键作用的 CRT/DRE 结合因子(C-repeat binding factor/dehydration-responsive element binding protein, CBF/DREB1)家族的发现(Medina 等 1999)。在拟南芥中, CBF/DREB1 通过与 CRT (C-repeat) (Baker 等 1994)/DRE (dehydration responsive element) (Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki 1994)元件的特异结合, 调节包括 *COR15a*、*COR6.6*、*COR47* 和 *COR78* 等近 40 个低温响应基因的协同表达(Fowler 和 Thomashow 2002), 产生一系列的生理生化反应: 脯氨酸合成增加, 可溶性糖积累, 并提高拟南芥的抗冻能力(Gilmour 等 2000)。

1 CBF 基因家族

Stockinger 等(1997)采用酵母单杂交方法从拟南芥中分离出一个 cDNA 克隆, 其编码一种转录激活因子, 能与 *COR* 基因启动子区的 CRT/DRE 元件(Jiang 等 1996)特异结合, 命名为 *CBF1* (CRT/

DRE binding factor 1) (Stockinger 等 1997)。1998 年, Gilmour 等又从拟南芥 cDNA 文库中鉴定出 *CBF2* 和 *CBF3*。与此同时, 在另一个实验室中, Liu 等(1998)独立鉴定出 5 种 DRE 蛋白, 其中, *DREB1b*、*c*、*a* 分别对应于 *CBF1*、2、3。3 个 *CBF/DREB* 基因连锁组成一个小型基因家族, 同向串连重复排列在拟南芥 4 号染色体的短臂上, 与分子标记 m600 和 PG11 紧密相连(图 1) (Gilmour 等 1998)。2002 年, Haake 等鉴定出受干旱而非低温诱导表达的 *CBF4*, 它位于 5 号染色体上, 和其它 3 个 *CBF* 基因相似, 也是 *COR* 基因表达的一个调节因子。

CBF 转录激活因子属于 AP2 类转录因子 (Gilmour 等 1998; Liu 等 1998), 其一级结构中含有 AP2 DNA 结合域、碱性核定位信号区和酸性转录激活域(Kanaya 等 1999)。AP2 DNA 结合域, 由大约 60 个氨基酸残基组成, 是迄今仅在植物蛋白中发现的 DNA 结合基序, 在其后半部的高度保守核心区域能够形成亲水和亲脂性 α 螺旋(Gao 等 2002), 参与同其它转录因子及 DNA 间的相互作用(Kanaya 等 1999)。碱性核定位信号区位于 N 末端区域, 富含精氨酸和赖氨酸残基, CBF 转录激

收稿 2005-11-21 修定 2006-03-08

资助 国家自然科学基金(30460114)。

*通讯作者(E-mail: mmpeng_2000@yahoo.com, Tel: 0898-66890981)。

活因子进入细胞核的过程受该区域的控制。位于C末端的转录激活区酸性氨基酸含量较高,其pI在3.6~3.8之间,这一区域被认为在转录激活中起主导作用。

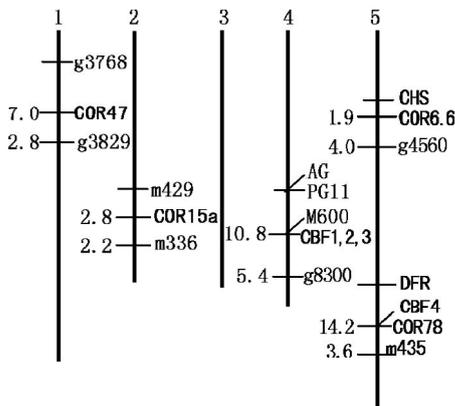


图1 *CBF*基因和 *COR*基因在拟南芥染色体中的位置(Gilmour等1998)

2 CBF对抗冻基因的调控

CBF通过与CRT/DRE顺式作用元件的结合激活低温和脱水响应基因的表达,从而提高植物的抗逆性。当拟南芥处于低温下时,*CBF*基因的转录水平能在15 min内迅速提高,2 h后含有CRT/DRE元件的一组*COR*基因得以表达,即*COR*基因的表达包括一个低温信号转导过程(Thomashow 1999)。CBF对低温的快速响应,说明*CBF*基因的冷诱导表达无需新蛋白质的合成。Gilmour等(1998)推测,在正常温度下,植物体内存在一种转录因子能识别*CBF*启动子,这一转录因子称为CBF表达诱导剂(inducer of CBF expression, ICE)。2003年,Chinnusamy等首次分离到*ICE1*基因。其编码一个类似MYC的bHLH转录激活因子,能特异地与*CBF3*启动子中的MYC识别序列结合。拟南芥*ice1*突变体抑制*CBF3*及其下游基因的表达,*ICE1*超表达转基因植株则能增强CBF调节子的表达。但ICE1如何调节CBF的表达尚不清楚。常温下,ICE1处于非活性状态;只有在低温条件下,ICE1才表现出对*CBF*基因的转录活性。ICE1的转录活性可能受磷酸化或去磷酸化作用以及其它转录因子的调节(Chinnusamy等2003)。尽管拟南芥*ice1*突变体抑制CBF3的表达,

但对CBF1和CBF2的低温诱导特性影响不大,甚至在低温处理6~8 h后CBF2的表达还有所增加,说明不同CBF的低温诱导表达受不同调节因子的调节,CBF启动子中包含多个MYC和MYB的结合位点,暗示可能存在MYC类和MYB类转录因子的共同调节机制。

除了MYC类转录因子ICE1外,DEAD盒蛋白家族中的某些RNA解旋酶也参与低温响应过程。拟南芥*Los4-1*突变体对冷害敏感,该突变体的*CBF*及其下游基因表达量均下降。超表达CBF3可恢复突变体的抗寒性(Gong等2002)。*LOS4*编码一个DEAD盒蛋白家族中的RNA解旋酶,该酶在mRNA从细胞核外运中起作用,并影响拟南芥的发育和逆境胁迫反应(Gong等2005)。非常有趣的是,*LOS4*的另一个突变体*Los4-2*增加*CBF2*及其下游基因的表达,并比野生型具有更强的抗冻能力,但同时*Los4-2*对热敏感(Gong等2005)。*LOS4*为组成型表达,*Los4-1*和*Los4-2*均为单个氨基酸的突变,但二者在相反的方向上改变拟南芥对温度响应的基因表达,说明RNA解旋酶可能在温度响应中起重要作用。到目前为止,还不清楚RNA解旋酶是如何调节温度响应过程的,然而,RNA易形成二级结构,这种二级结构受温度影响,因而使其可能起温度传感器的作用(Johansson等2002)。RNA解旋酶又可能通过对RNA二级结构的调节而改变植物对温度的响应反应。

除*CBF4*受干旱和ABA诱导表达外,*CBF1*、*2*、*3*均受低温诱导表达(Knight等2004)。有趣的是,温度快速下降并不是*CBF*诱导表达所必需的。Zarka等(2003)在梯度降温的实验中发现,*CBF*的表达量与绝对温度有关,温度越低,*CBF*表达量越高,即*CBF*基因的表达需要的是低温程度而不是降温过程。植物似乎可以精确地感知环境温度,并严格控制对环境胁迫的响应程度。是什么分子充当了温度传感器的作用?迄今知之甚少。也许上述的RNA解旋酶对低温响应基因的调控现象给我们对这问题的认识提出了一个值得思考的方向。

与*COR*基因在低温下持续表达不同,*CBF*受低温诱导表达是瞬时的,将拟南芥从20℃移至4℃

3 h后, *CBF* 转录水平达到最大值, 随后显著下降, 说明 *CBF* 和 / 或其下游基因产物能反馈抑制 *CBF* 基因的表达。拟南芥 *ice1* 突变体抑制 *CBF3* 基因的表达, 但在低温处理 6~8 h后, *CBF2* 的表达反而增加, 间接反映了 *CBF* 家族内部有自我抑制作用 (Zarka 等 2003)。拟南芥 *cbf2* 缺失突变体出乎意料地具有更强的抗逆性, 研究发现, 突变体中 *CBF1* 和 *CBF3* 及其下游基因的表达均高于野生型拟南芥, 说明 *CBF2* 是 *CBF1* 和 *CBF3* 的负调节因子 (Novillo 等 2004)。拟南芥翻译延伸因子 *EF2* 的突变体 *los1-1* 在低温下丧失翻译蛋白质的能力, 不能诱导低温响应基因的表达, 因而对冻害敏感, 但 *CBF* 在转录水平的表达则显著增强, 表明 *CBF* 的转录水平受其自身及其下游基因产物的反馈抑制 (Guo 等 2002)。

3 CBF低温响应途径在冷驯化中的主导地位

在 CA 过程中, *CBF* 激活大量 *COR* 基因的表达, 从而提高植物的抗冻能力。但遗传学分析表明, *CBF* 途径并不是植物抗冻机制中的唯一系统。拟南芥 *eskimo1* 突变体比野生型具有更强的抗冻性, 但并不组成型表达 *COR* 基因, 说明突变发生在 *CBF* 途径之外 (Xin 和 Browse 1998)。同样特征的突变体还有 *ada2* (Vlachonasios 等 2003)。

近年来, 基因组学和代谢组学的发展, 使人们能够更全面地了解 *CBF* 途径在植物抗冻中所起的作用。Fowler 和 Thomashow (2002) 采用 DNA 芯片分析了拟南芥 8 000 个基因对低温处理的反应, 发现低温响应基因有 306 个, 其中转录上调的有 218 个, 下调的 88 个。41 个基因在 *CBF* 转基因拟南芥中上调, 其中 30 个基因同时受低温和 *CBF* 超表达所诱导, 包括 2 个转录因子 *RAP2.1* 和 *RAP2.6*, 均属 *CBF* 调节子。至少有 28% 的低温响应基因不受 *CBF* 调节, 其中包含 15 个转录因子基因, 说明除 *CBF* 途径外, 还存在多个低温调节途径 (Fowler 和 Thomashow 2002)。与代谢相关的低温响应基因包括棉子糖家族寡糖 (raffinose family oligosaccharide, RFO) 途径的 *AtGoIS3* 基因、11 个与花青素代谢相关基因、7 个与细胞壁多糖有关的基因、脯氨酸合成酶基因 *P5CS* 等。*AtGoIS3* 和 *P5CS* 同时也在 *CBF* 转基因拟南芥中高表达。RFO 途径的 *AtGoIS3* 和脯氨酸合成酶基因 *P5CS* 的

高表达可以分别用来解释果糖、葡萄糖、半乳糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖等寡糖和脯氨酸的积累 (Gilmour 等 2000), 这些细胞相容物质具有冰晶保护作用。

最近, Vogel 等 (2005) 使用包含了 24 000 个拟南芥基因探针的“Affymetrix GeneChip[®]”, 再次研究了拟南芥低温响应转录本, 发现有 514 个基因对低温响应, 其中, 302 个表达上调, 212 个下调。85 个低温诱导基因和 8 个低温抑制基因受 *CBF2* 调节, 占低温响应基因的 18%, 高于此前 12% 的报道。值得关注的是, 受低温诱导高表达 (大于 15 倍) 的 25 个基因中, 有 19 个 (84%) 受 *CBF2* 诱导, 另有 2 个 (18%) 受 *CBF2* 和 *ZAT12* 共同诱导, 即 92% 的低温诱导高表达基因属于 *CBF2* 和 *ZAT12* 调节子 (Vogel 等 2005)。

Cook 等 (2004) 比较了抗冻性有明显差别的 2 个拟南芥生态型——*Wassilewskija-2* (*Ws-2*) 和 *Cape Verde Islands-1* (*Cvi-1*) 在低温处理时物质代谢的变化。在测试的 434 个代谢物中, 有 325 个 (75%) 在抗性较强的 *Ws-2* 中含量增加, 其中有 256 个 (79%) 在常温下的转 *CBF* 基因的 *Ws-2* 中增加; 有 269 个在抗性较差的 *Cvi-1* 中含量增加, 其中 244 个 (91%) 在低温下的 *Ws-2* 中也增加。尽管大多数在低温下含量增高的代谢物同时也出现在 *Ws-2* 和 *Cvi-1* 中, 但有 30% (96 个) 代谢物在 *Cvi-1* 的积累水平是低于 *Ws-2* 的, 其中 83% (80 个) 在 *CBF3* 超表达时积累, 这包括 RFO 途径的蜜二糖、肌醇、果糖、葡萄糖和蔗糖, 以及 *P5CS* 基因相关的脯氨酸。基因表达分析的结果表明, *Cvi-1* 中 *CBF* 及其下游基因 *COR15a*、*COR78*、*AtGoIS3* 的表达量明显低于 *Ws-2*, 而非 *CBF* 途径的 3 个冷响应基因——蔗糖合成酶基因 (*SuSy*)、苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL2*) 和查尔酮合成酶基因 (*ChS*) 的表达量与 *Ws-2* 相当。因此, 认为 *Cvi-1* 抗冻能力下降可能是 *CBF* 表达较弱所致。*CBF* 途径在 CA 过程中占据主导地位 (Cook 等 2004)。

4 CBF低温响应途径的广泛存在

CBF 广泛存在于各种植物中, 这包括大麦、苜蓿、葡萄、油菜等可冷驯化的植物以及水稻、玉米、番茄、橡胶等热带起源的不可冷驯化的植物 (Jaglo 等 2001)。与拟南芥相似, 油菜的 *CBF*

基因和 *COR* 基因 (*Bn115*) 也受低温诱导表达, 超表达拟南芥 *CBF* 基因可以诱导 *Bn115* 的表达, 并提高油菜的抗冻能力, 说明油菜在功能上有与拟南芥类似的 *CBF* 低温响应途径 (Jaglo 等 2001)。已知的番茄 *CBF* 基因有 3 个, 和拟南芥一样, 3 个基因串联排列成一簇, 但只有 *LeCBF1* 是低温诱导表达的。超表达 *LeCBF1* 同样可以激活 *COR* 基因的表达, 并提高转基因拟南芥的抗冻能力, 说明 *LeCBF1* 和 *AtCBFs* 是同功的, 但超表达 *LeCBF1* 和 *AtCBF3* 并不能提高番茄的抗冻能力。分析 8700 个番茄基因时发现, 受 *LeCBF1* 和 *AtCBF3* 诱导表达超过 2.5 倍的仅有 4 个基因, 其中 3 个属 *CBF* 调节子, 包括 2 个脱水素基因和 1 个可能编码蛋白酶抑制剂的基因, 而属拟南芥 *CBF* 调节子的棉子糖合成酶、脯氨酸合成酶和转录因子 *RAP2.1* 均不在番茄 *CBF* 调节子之列。说明番茄同样具有 *CBF* 途径, 但与拟南芥的有较大区别 (Zhang 等 2004)。

5 用 *CBF* 转录激活因子提高作物抗逆性

植物的抗逆性属于复杂的数量性状, 是多种抗逆机制共同作用的结果, 用单一的功能基因转化植物, 难以达到理想效果。而逆境调节的转录因子能够激活大量抗逆功能基因的表达, 产生一系列代谢和发育上的表型变化, 从而提高植物的抗冻、耐旱和耐盐特性。由于 *CBF* 及其调节子广泛存在于各类作物中, 并在植物冷适应性反应中起着类似开关的关键作用, 因此, 通过转单个 *CBF* 基因就有可能同时表达一组抗性基因, 从而提高作物的抗冻性 (Kasuga 等 1999)。除了低温耐

性外, *CBF* 转录激活因子过量表达也增强了某些植物对干旱和高盐胁迫的抗性 (表 1)。

CBF 过量表达在转基因作物中引发了广泛的生理变化: 蔗糖、棉子糖、果糖、葡萄糖以及脯氨酸等细胞相容性物质积累; 产生多种晚期胚胎丰富蛋白 (late embryogenesis abundant, LEA) 和亲水多肽 (Jaglo 等 2001); 过氧化氢含量下降 (Hsieh 等 2002a, b); 促进叶绿体发育, 增强光合作用和糖代谢效率 (Savitch 等 2005) 等。这些生理变化被认为与非生物胁迫抗性有关。

超量表达 *CBF* 基因在提高作物抗逆性的同时, 也普遍存在转基因作物生长发育受阻、植株矮化及减产等问题。使用胁迫诱导型启动子或中等强度的启动子可能是有效解决该问题的方法之一。例如, *CBF3* 基因在胁迫诱导型 *RD29a* 基因的启动子控制下, 可在拟南芥和烟草中诱导表达 (Kasuga 等 1999, 2004; 押辉远等 2005), 转基因拟南芥的抗冻和抗旱能力均有所提高, 而生长发育受到的影响十分轻微。然而, 除表达强度外, 最近的报道表明, *CBF* 在影响植物发育方面尚存在其它不明机制。Hsieh 等 (2002a, b) 报道, 赤霉素可恢复转 *AtCBF3* 番茄的正常生长表型而不影响其获得的抗性。Oh 等 (2005) 报道 *AtCBF3* 在水稻中呈组成型表达而无发育迟滞的状况。

6 结语

CBF 在植物冷驯化过程中起关键性的调节作用, 深入研究 *CBF* 低温响应途径对揭示植物抗冻机制有重要意义。*CBF* 广泛存在于各种高等植物

表 1 转 *CBF* 转录激活因子的抗逆基因工程

基因名称	基因来源	转基因植物	研究方法	性状	参考文献
<i>CBF1</i> 、 <i>DREB1a</i> (<i>CBF3</i>)	拟南芥	拟南芥	超表达; 胁迫诱导表达	抗冻、抗旱、耐盐	Jaglo-Ottosen 等 1998; Liu 等 1998; Haake 等 2002; 押辉远等 2005
<i>CBF1</i> 、 <i>CBF2</i> 、 <i>CBF3</i>	拟南芥	油菜	超表达	抗冻、抗旱	Jaglo 等 2001
<i>CBF1</i>	拟南芥	番茄	超表达	抗旱、抗寒、抗氧化胁迫	Hsieh 等 2002a, b; Lee 等 2003
<i>CBF1</i>	拟南芥	草莓	超表达	抗冻	Owens 等 2002
<i>ZmCBF</i>	玉米	玉米	超表达	抗冻	Chaiappetta 2002
<i>DREB1a</i> (<i>CBF3</i>)	拟南芥	小麦	超表达	抗旱	Pellegrineschi 等 2002
<i>OsDREB1A</i>	水稻	拟南芥	超表达	抗冻、抗旱、耐盐	Dubouzet 等 2003
<i>DREB1a</i> (<i>CBF3</i>)	拟南芥	烟草	超表达; 胁迫诱导表达	抗旱、抗寒	Kasuga 等 2004
<i>CBF/DREB1</i>	油菜	油菜	超表达	抗冻	Savitch 等 2005
<i>CBF3</i>	拟南芥	水稻	超表达	抗非生物胁迫	Oh 等 2005

中, 包括抗冻和不抗冻植物, 因此, 通过比较 CBF 途径在这两类植物中的区别, 可以更深刻地理解植物抗冻 / 寒的分子机制。转录组学、代谢组学和生物信息学等高通量的分析方法使该研究成为现实。

已有研究证明, 许多代谢途径属于 CBF 调节子。除了与抗性相关的途径外, 某些与发育相关途径可能也在其中。对 CBF 调节子的全面理解将我们在提高作物抗逆性的同时, 可最大程度地降低 CBF 在发育中带来的负作用。

参考文献

- 押辉远, 秦广雍, 霍裕平 (2005). Prd29A 及 DREB1A 的克隆和干旱诱导型植物表达载体的构建与鉴定. 植物生理学通讯, 41 (3): 371~375
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF (1994). The 5' region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis acting elements that confer cold, drought and ABA regulated gene expression. Plant Mol Biol, 24: 701~713
- Chaiappetta L (2002). Ottenimento di piante transgeniche di mais tolleranti al freddo [PhD thesis]. Bologna, Italy: University of Bologna
- 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*. Genes Dev, 17 (8): 1043~1054
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF (2004). A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 101 (42): 15243~15248
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *OsdREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant J, 33: 751~763
- 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: 1675~1690
- Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM, Singh J (2002). Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. Plant Mol Biol, 49: 459~471
- 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 (4): 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 Z, Dong CH, Lee H, Zhu JH, Xiong L, Gong D, Stevenson B, Zhu JK (2005). A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. Plant Cell, 17: 256~267
- Gong Z, Lee H, Xiong L, 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: 11507~11512
- Guo Y, Xiong L, 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 (11): 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
- Guy CL, Niemi KJ, Brambl R (1985). Altered gene expression during cold acclimation of spinach. Proc Natl Acad Sci USA, 82 (11): 3673~3677
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 130 (2): 639~648
- Hsieh TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002a). Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiol, 130: 618~626
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT (2002b). Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. Plant Physiol, 129: 1086~1094
- Hughes MA, Dunn MA (1996). The molecular biology of plant acclimation to low temperature. J Exp Bot, 47: 291~305
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. Plant Physiol, 127 (3): 910~917
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. Science, 280: 104~106
- Jiang C, Iu B, Singh J (1996). Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BNI15* gene from winter

- Brassica napus*. Plant Mol Biol, 30 (3): 679~684
- Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell, 110: 551~561
- Kanaya E, Nakajima 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 (23): 16068~16076
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat Biotechnol, 17: 287~291
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. Plant Cell Physiol, 45 (3): 346~350
- 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 JT, Prasad V, Yang PT, Wu JF, Ho THD, Charng YY, Chan MT (2003). Expression of *Arabidopsis* CBF1 regulated by an ABA/stress promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. Plant Cell Environ, 26: 1181~1190
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, 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
- Medina J, Bagues 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 (11): 3985~3990
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim MJ, Kim YK, Nahm BH, Kim JK (2005). *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiol, 138: 341~351
- Owens CL, Thomashow MF, Hancock JF, Iezzoni AF (2002). CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry. J Am Soc Hortic Sci, 127: 489~494
- Pellegrineschi A, Ribaut JM, Trethowan R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D (2002). Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. JIRCAS Working Report, 55~60
- Savitch LV, Allard G, Seki M, Robert LS, Tinker NA, Huner NA, Shinozaki K, Singh J (2005). The effect of overexpression of two *Brassica* CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. Plant Cell Physiol, 46 (9): 1525~1539
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proc Natl Acad Sci USA, 94 (3): 1035~1040
- Thomashow MF (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 571~599
- Vlachonasios KE, Thomashow MF, Triezenberg SJ (2003). Disruption mutations of *ADA2b* and *GCN5* transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. Plant Cell, 15: 626~638
- 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
- Xin Z, Browse J (1998). *Eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 7799~7804
- 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 (2): 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 S, Cheng H, Lou Y, 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 (6): 905~919