

植物中 DREBs 类转录因子及其在非生物胁迫中的作用

张梅^{1, 2}, 刘炜², 毕玉平^{1, 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, 山东省作物与畜禽品质改良生物技术重点实验室, 济南 250100

摘要: 低温、干旱、高盐等非生物胁迫能够严重影响植物的生长及作物的产量。最近发现了许多调控多种与逆境相关基因表达的转录因子, 其中DREBs类转录因子能够通过与含有DRE/CRT顺式作用元件的抗逆相关基因启动子区相互作用, 进而调控一系列抗逆基因的表达, 使植物品质得到综合改良从而提高植物对非生物胁迫耐受力。文章通过对DREBs的结构、表达调控、作用方式及机理进行总结, 并结合其在植物胁迫信号通路中的作用以及提高转基因植株胁迫耐受性的最新研究成果加以综述, 并对其在农业生产中的应用前景进行展望。

关键词: 非生物胁迫; DREBs类转录因子; DRE/CRT顺式作用元件; 表达调控

Dehydration-responsive element-binding (DREB) transcription factor in plants and its role during abiotic stresses

ZHANG Mei^{1, 2}, LIU Wei², BI Yu-Ping^{1, 2}

1. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;

2. Hi-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop, Animal and Poultry of Shandong Province, Jinan 250100, China

Abstract: Abiotic stresses such as cold, drought and high salinity are common adverse environmental conditions that seriously influence plant growth and crop productivity worldwide. Some transcription factor(s) (TFs) have been isolated and verified recently to play roles under abiotic stresses. Among them, the TF of DREB (Dehydration Responsive Element Binding) can therefore regulate the expression of many stress-inducible genes in plants and play a critical role in improving abiotic stress tolerance of plants by interacting with specific cis-acting element named DRE/CRT, which are present in the promoter region of various abiotic stress-related genes. In this review, we summarized the current knowledge of DREBs in the structural and functional characters with emphasis on the regulation and mechanisms of DREBs on plant development, as well as new research approaches and complexity of the signal transduction pathway of DREBs. The practical and application value of DREBs in crop improvement engineering was also discussed.

Keywords: abiotic stresses; DREBs transcription factor; DRE/CRT cis-acting element; expression and regulation

干旱、高盐以及低温等极端条件又称为水分胁迫或渗透胁迫, 是植物生长过程中所面临的主要的逆境胁迫因子。植物生长在土壤里, 本身不能自由移动, 以上多种非生物胁迫因素, 极易通过影响气孔开度, 细胞壁或细胞膜成分等生理、生化指标的改变进而对植物造成伤害, 严重影响了作物的产量和种植区域。针对植物的抗性育种, 传统的方法一般具有目的性差、周期性长、工作量大等局限性。基因工程技术的迅速发展及在农业生产中的广泛应用提高并促进了作物抗逆育种及品质的改善, 在提高产量的同时还可减少农业上的灌溉用水, 使作物在干旱和贫瘠的土地上生长出高新品种, 从而产生巨大的经济效益^[1]。目前, 对

收稿日期: 2008-09-10; **修回日期:** 2008-10-18

基金项目: 山东省农科院博士科研启动基金项目 (编号: 2007YBS008) 资助

作者简介: 张梅 (1983—), 女, 硕士, 专业方向: 发育生物学。Tel: 15806417594; E-mail: 200200139@163.com

通讯作者: 刘炜 (1975—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 植物转录因子功能、植物生长发育调节。Tel: 0531-83179572 ; E-mail: wheiliu@163.com

植物抗逆机制的研究及培育作物抗逆新品种已成为广大植物学家和育种学家研究的主要目标。抗逆基因工程采用的基因大致可分为两类，一类是功能基因，其编码产物主要包括LEA蛋白、抗冻蛋白等，同时还包括一些渗透调节因子的合成酶，以及毒性降解酶等^[2]；另一类是与抗逆相关的、其编码产物参与信号传递途径和基因表达调控过程的转录因子，主要分为MYB类、bZIP类、WRKY类、AP2/EREBP类和NAC类5个家族^[3]。其中，DREBs(Dehydration—responsive element binding，与干旱应答元件结合的)转录因子可特异的识别并结合DRE(Dehydration—responsive element，干旱应答元件)，进而参与逆境信号的传递，调控下游逆境应答基因的表达，提高植物在多种逆境条件下的适应性和耐受性，从而对植物抗性进行综合改良。本文对该类转录因子从结构特征，功能，基因的表达调控及生产应用等方面进行了综述，并对其应用前景进行了展望。

1 DREBs类转录因子的结构特征

作为AP2/EREBP(APETALA2/ethylene responsive element binding protein, APETALA2/乙烯应答元件结合蛋白)家族的一类成员，DREBs类转录因子特异的存在于植物中，参与植物对干旱、高盐和低温等非生物胁迫的应答与响应。其典型特征是其DNA结合区含有AP2 / EREBP保守结构域(约 57-70AA)，主要分为AP2、DREB、ERF和RAV 4个主要的亚族，并进一步将DREB亚族分成6个小类(A1-A6)。DREBs类转录因子序列中只含有一个AP2/EREBP结构域，其中包含YRG和RAYD两个保守区^[4]。YRG区为N端富含20个氨基酸残基的碱性亲水区，位于第二个 β 折叠的第14位和第19位的氨基酸残基分别为缬氨酸(V14)和谷氨酸(E19)，是与DRE作用元件相互结合的关键位点，对识别并结合各类顺式作用元件具有重要作用。RAYD区位于AP2 / EREBP结构域的C端，其核心区由大约18个氨基酸残基组成，可形成双亲性的 α 螺旋，其主要行使调节转录因子与DRE顺式作用元件结合能力的功能，通过影响YRG保守区的构象或通过与其它蛋白发生相互作用进而发挥作用^[4]。同时，DREBs类转录因子在序列中存在一段富含Ser/Thr的区域，在基因间的磷酸化及相互作用中起重要的作用^[5]。

2 顺式作用元件DRE/CRT

DRE/CRT顺式作用元件普遍存在于胁迫应答相关基因的启动子中，DREBs转录因子能够特异地识别并结合该顺式作用元件，进而参与调控相关基因的表达及功能行使。

一般情况下，植物处于干旱、高盐和低温等非生物逆境胁迫下，其体内的ABA含量会明显升高，ABA含量的升高进一步诱导下游一系列抗逆相关基因的表达，但之后的研究发现有些受内源ABA诱导表达的基因，如*rd29A*/*lti78*/*cor78*、*kin1*、*cor6.6*/*kin2*、*cor47*/*rd17*、*cor15a*等，在ABA缺失或ABA不敏感的拟南芥突变体中，也可被干旱、高盐和低温所诱导，表现为ABA非依赖型表达模式^[6]。进一步通过启动子缺失实验结合凝胶阻滞分析，Yamaguchi-Shinozaki^[7]发现*rd29A*基因的启动子区除了存在ABA应答元件ABRE(ABA responsive element)，还存在一个核心序列为CCGAC的干旱应答元件DRE(ATCCGACTA)。同年，一段与DRE极为相似的序列TGGCCGAC也被研究者从拟南芥低温应答基因*COR15A*的启动子区中分离并鉴定出来，称之为CRT(C-Repeat)元件^[8]。之后，在*RD17*、*KIN1*和*COR6.6*等拟南芥干旱和低温应答相关基因启动子区、及大麦(*Hordeum vulgare* L.) *Dhn*^[9]、油菜(*Brassica napus* L.) *BN115*^[10]、玉米(*Zea mays* L.) *RAB17*^[11]和小麦(*Triticum aestivum* L.) *WCS120*^[12]等胁迫相关基因的启动子区中，DRE或DRE核心序列(CCGAC)元件均被分离并鉴定。

3 植物中 DREBs 类转录因子

顺式作用元件DRE/CRT的分离并鉴定，揭示出一条ABA非依赖型的逆境信号传导途径。进而使相关特异识别并结合DRE/CRT元件、进一步调控下游基因表达的DRE/CRT结合蛋白的研究也逐渐深入。

3.1 拟南芥中的 DREBs 类转录因子

Yamaguchi-Shinozaki^[7]于1994年首次在拟南芥的核抽提物中检测到能够与DRE作用的蛋白质因子——DRBF1。之后，转录因子CBF1(C-repeat/DRE Binding Factor 1)被Stockinger等^[13]通过酵母单杂交的方法，从拟南芥cDNA文库中首次分离并进行了验证。进而Gilmour等^[14]及Liu等^[5]借助于相似的方法及材料，分别对基因*DREB1A*(或称*CBF3*)、*DREB1B*(或称*CBF1*)和*DREB1C*(或称*CBF2*)进行了克隆；并在干旱处理的拟南芥cDNA文库中克隆到2个受干旱和高盐胁迫诱导的转录因子*DREB2A*和*DREB2B*。Northern杂交结果显示，这5个转录因子具有不同的表达模式，在4℃处理10 min内，*DREB1A*、*DREB1B*和*DREB1C*被迅速、强烈的

诱导；在干旱或250 mmol/L NaCl处理下，*DREB2A*和*DREB2B*基因表达量在10 min内也明显增强，但它们均不受ABA(100 μmol/L)诱导，为ABA非依赖型。

目前，经序列同源检索，在拟南芥全基因组中发现可能存在6个*DREB1*转录因子，8个*DREB2*转录因子。Sakuma等^[15]根据序列专一性，从拟南芥中分离到3个新的*DREB1*(*DREB1D*、*DREB1E*和*DREB1F*)转录因子基因和6个*DREB2*(*DREB2C*–*DREB2H*)转录因子基因，通过对这八种转录因子在干旱、高盐、低温以及ABA处理等多种非生物逆境胁迫下的表达模式进行研究，发现只有*DREB1D*、*DREB1F*、*DREB2C*、*DREB2D*和*DREB2F*在高盐处理下表达量有微弱变化，而*DREB2E*的表达受ABA诱导，表明在*DREB1/CBF*和*DREB2*胁迫响应中可能存在着表达调控途径的交叉。

3.2 其他植物中的 DREBs 类转录因子

随着对拟南芥中DREBs类转录因子研究的深入，对其他植物中DREBs类基因家族的研究也得以不断深入（表1）。2001年，Jaglo等^[16]分别从油菜(*Brassica napus* L.)、黑麦(*Secale cereale* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)和番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)中分离得到与拟南芥*CBF1*同源的CBF/DREBs转录因子，表达模式分析显示*BnCBF*的表达受低温诱导，并对其下游靶基因*BN115*的表达进行调控。后来，Gao等^[17]又从油菜cDNA文库中筛选出4种CBFs基因，即*BnCBF5*、*BnCBF7*、*BnCBF16*和*BnCBF17*，其中部分序列在氨基酸水平上相似性达90%。Choi等^[18]从低温处理的大麦(*Hordeum vulgare* L.)cDNA文库中筛选出与拟南芥*CBF3*同源并受低温诱导的基因*Hvcbf3*。2003年，Shen等^[19]分别从干旱处理的小麦cDNA文库和盐处理的山菠菜(*Atriplex hortensis* L.)cDNA文库中筛选出基因*TaDREB1*和*AhDREB1*，Northern杂交显示，*TaDREB1*可同时受低温(0℃)、盐(200 mmol/L NaCl)、干旱(20%PEG6000)和ABA(25 μmol/L)的诱导，并对温度的响应最强。Dubouzet等^[20]在水稻基因组数据库中，用拟南芥*DREB1A*和*DREB2A*的序列进行同源检索，也分离到DREBs类转录因子*OsDREB1B*、*1C*、*1D*和*OsDREB2A*。

表1 不同植物中的 DREBs 类转录因子

物种	DREBs TF	表达模式			
		冷	干旱	高盐	脱落酸
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	CBF1 ^[13] / <i>DREB1B</i> ^[5]	√	×	—	×
	CBF2 ^[14] / <i>DREB1C</i> ^[5]	√	×	—	×
	CBF3 ^[14] / <i>DREB1A</i> ^[5]	√	×	×	×
	<i>DREB2A</i> ^[5]	×	√	√	×
	<i>DREB2B</i> ^[5]	×	√	√	×
油菜(<i>Brassica napus</i> L.)	<i>BnCBF5</i> ^[17]	√	×	×	×
	<i>BnCBF7</i> ^[17]	√	×	×	×
	<i>BnCBF16</i> ^[17]	√	×	×	×
	<i>BnCBF17</i> ^[17]	√	×	×	×
小麦 (<i>Triticum aestivum</i> L.)	<i>TaDREB1</i> ^[19]	√	√	√	√
山菠菜 (<i>Atriplex hortensis</i> L.)	<i>AhDREB1</i> ^[19]	—	—	√	—
黑麦 (<i>Secale cereale</i> L.)	<i>ScCBF</i> ^[16]	√	—	—	—
番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	<i>LeCBF</i> ^[16]	√	—	—	—
大麦 (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	<i>HvCBF3</i> ^[18]	√	—	—	—
水稻 (<i>Oryza sativa</i> L.)	<i>OsDREB1A</i> ^[20]	√	×	√	×
	<i>OsDREB1B</i> ^[20]	√	×	×	×
	<i>OsDREB1C</i> ^[20]	★	★	★	★
	<i>OsDREB1D</i> ^[20]	×	×	×	×
	<i>OsDREB2A</i> ^[20]	×	√	√	×

辣椒 (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Ca-DREBLP ^[21]	×	√	√	×
	GmDREBa ^[22]	√	√	√	√
大豆 (<i>Glycine max</i> L.)	GmDREBb ^[22]	√	√	√	×
	GmDREBc ^[22]	×	√	√	√

注：√：受诱导；×：不受诱导；—：未知；★：组成型表达。

2003年，Qin等^[23]从玉米 (*Zea mays* L.) 的cDNA文库中分离到一个与DREB1/CBF同源并受低温诱导的基因ZmDREB1A。2005年，Hong和Kim等^[24]从辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 中分离到一种新的与DREB2A的表达模式相似、可被干旱、高盐快速诱导表达、并受机械损伤轻微诱导的转录因子—Ca-DREBLP1，但由于其结构特征更接近于基因DREB1，故把它列为DREB1类^[24]。同年，Li^[22]等从大豆 (*Glycine max* L.) 中分离到3种DREBs类转录因子，即GmDREBa、GmDREBb和GmDREBc。其中GmDREBa受盐、旱、低温和ABA的诱导；GmDREBb受盐、旱和冷诱导，但不受ABA影响；而GmDREBc仅在根中受盐、干旱和ABA的诱导。2006年，笔者在花生(*Arachis hypogaea* L.)未成熟种子的全长cDNA文库中筛选到近15个具有AP2 / EREBP保守结构域的基因，其中已经分离并初步鉴定了3个新的DREBs类转录因子，即PNDREB1(Accession No. FM955398)、AHTINY1(Accession No.FM955394)、AHTINY2(Accession No.FM955395)，其中PNDREB1与DREB亚家族成员的序列同源性较高，而AHTINY1与AHTINY2同该类基因为组成型表达；诱导表达模式分析显示，PNDREB1受干旱及低温诱导；AHTINY1受低温、乙烯及ABA诱导；而AHTINY2仅受乙烯诱导；这种表达模式之间的交叉及差异暗示该类转录因子在对非生物胁迫响应的过程中及功能上存在一定的不同，推测可能在不同胁迫信号传导途径中发挥作用，目前对这类基因理化功能的研究正在进行中^[25]。

4 DREBs 类转录因子的表达调控

4.1 DREB1 类转录因子的表达调控

DREBs类基因的表达受干旱、低温及高盐等非生物胁迫的诱导，其表达量会在短时间内明显增加^[5]。1998年，Gilmour等^[14]提出在细胞中存在一个位于DREB1/CBF基因上游的转录因子ICE(Inducer of CBF Expression)，它在低温条件下被磷酸化修饰或与其他相关蛋白结合而被激活，活化的ICE与位于DREB1启动子区中的特异顺式作用元件结合，从而启动DREB1类基因的表达，而在常温下ICE则以非活性形式存在（图1）。由于DREB1启动子区域中并不含有DRE/CRT元件，故Gilmour等推测ICE不属于DREBs类转录因子。Chinnusamy等^[26]在2003年报道了一种转录因子ICE1(Inducer of CBF Expression 1)，它可在低温下调控其下游DREB1基因的表达，ICE1基因编码一个MYB类型的碱性螺旋-环-螺旋（basic helix-loop-helix, bHLH）转录因子，为组成性表达并定位在核内，受冷刺激后表达稍有增强。在冷胁迫下，它与DREB1A/ CBF3启动子区的MYC顺式元件结合激活DREB1A/ CBF3基因的表达，进而通过与下游RD29A等基因相互作用对植物的抗寒性产生影响。低温敏感型拟南芥ice1，其ICE1多肽链第236位的精氨酸可能会影响第243和245位的丝氨酸（潜在的磷酸化和去磷酸化位点）的磷酸化和去磷酸化，从而影响与DREB1A/ CBF3启动子区域的MYC顺式作用元件结合，致使靶基因（DREB1A/ CBF3）表达量下降，从而导致ice1突变体植株对低温的耐受力明显低于野生型^[26]。

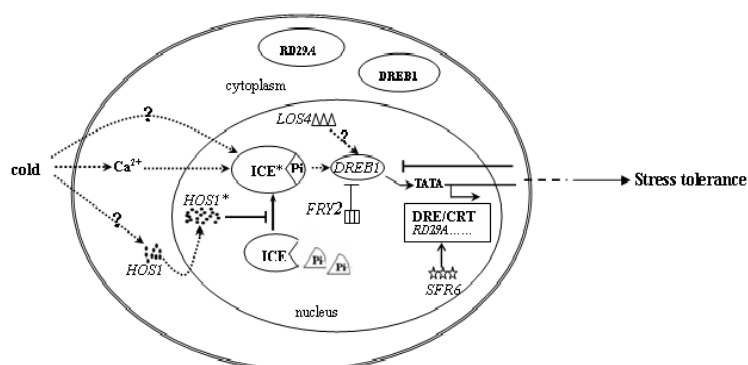


图1 冷胁迫下DREB1s介导的信号传导途径（*所示为活性形式）

拟南芥中的*HOS1*基因编码一个有功能的RING-finger蛋白，在低温处理下转运至核内积累，具有泛素E3的连接酶（Ubiquitin ligases）活性，催化特定的信号蛋白水解^[27]。在*hos1*缺失突变体中，*DREB1*基因过量表达，说明*HOS1*可能是其基因上游的负调节物，*HOS1*与*ICE1*相互作用证明*HOS1*通过催化*ICE1*蛋白的水解来负调节*ICE1*靶基因的表达^[28]。另外，对冷超敏感的*fry*突变体在冷和ABA的处理下*DREB1*和*COR*基因的表达量明显增加，说明*FRY2*也是*DREB1*和*COR*基因的负调节子^[29]。*LOS4*作为*DREB1*的上游基因，其富集于细胞核的边缘，对于*DREB1*基因的表达有促进作用，在*los4*隐性纯合突变株中，*CBF*转录受到削弱或延迟^[30]。拟南芥*sfr6*(Sensitive to freezing 6)突变体在低温条件下，*DREB1*基因的表达水平与野生型相比并未下降，而下游靶基因*kin1*、*lti78*和*cor15a*等的表达却显著减少，推测*SFR6*可能通过DREB1蛋白对靶基因的转录激活能力进行调控^[31]。

2004年，Novillo等^[32]利用T-DNA插入突变体对*DREB1C/CBF2*进行了研究，发现当突变位于*DREB1C/CBF2*起始密码子的上游时，虽然*DREB1C/CBF2*的表达受到了抑制，但其下游胁迫相关基因，如*DREB1B/CBF1*和*DREB1A/CBF3*仍能够受低温诱导并表达增强，从而使突变体对干旱和高盐的耐受力提高，表明*DREB1C/CBF2*对*DREB1B/CBF1*和*DREB1A/CBF3*的表达起负调节作用，并受其本身基因产物及下游靶基因产物的反馈抑制。Fowler等^[33]研究还发现，*CBF1-3*的表达及产物的积累不仅与低温诱导的时间密切相关，而且还受昼夜节律的调节，在黎明后4 h和16 h，处于低温胁迫下的植物其体内*CBF1-3*转录产物积累分别达到最高和最低水平。

4.2 DREB2 类转录因子的表达调控

拟南芥中的DREB2A和DREB2B被认为是在高盐和干旱胁迫条件下起作用的转录因子^[3]，但是DREB2A转基因拟南芥植株既不表现生长迟缓、其胁迫耐受力也未提高^[5]，表明DREB2A可能需要经过诸如磷酸化等转录后修饰才能被激活。2006年，Sakuma等^[21]利用拟南芥原生质体对DREB2A蛋白质进行功能域分析，发现第136-165AA缺失能使DREB2A转变为组成型激活形式DREB2A-CA（DREB2A constitutive active form）；将GFP与DREB2A-CA融合，在非胁迫生长条件下可检测到该融合蛋白在细胞核中发出的很强的荧光信号，而将GFP与DREB2A全长基因融合时，仅检测到很微弱的信号。这个结果表明DREB2A蛋白的稳定性对于蛋白激活具有重要的作用，激活的DREB2A能促进下游干旱胁迫应答基因的表达，从而增强植株的胁迫耐受力。

在植物中过量表达DREB1A或者DREB2A-CA都会对植物产生一定的毒害作用，会导致转基因植物生长迟缓，影响了植物的生长发育^[15]，所以控制植物体内调节蛋白的表达量对于维持植物的内在稳态具有重要作用。1998年，Liu等发现在胁迫处理之前的拟南芥中根本检测不到DREB1A mRNA的存在，但在根和叶子中却能够检测到DREB2A mRNA，表明即使在非胁迫条件下DREB2A蛋白仍会有少量表达。那么植物又是通过什么样的机制维持体内DREB2A蛋白表达量的内在平衡的呢？2008年Qin等^[34]发现在非胁迫条件下这些非必须的DREB2A蛋白会通过RING 泛素连接酶DRIP1、DRIP2介导的26S蛋白酶体途径降解，而在植物体感受到胁迫信号后这种泛素化及蛋白降解过程就会被抑制，DREB2A蛋白会发生某种修饰变成具有活性蛋白，进而识别DRE元件激活下游抗逆相关基因的表达，从而达到提高植物抗逆性的目的。

5 植物 DREBs 类转录因子在抗非生物胁迫中的作用机制

非生物胁迫如干旱、高盐及低温等，是严重影响植物生长发育和农作物产量的限制因子。与病、虫害等生物胁迫相比，干旱、高盐及低温等胁迫对植物造成的伤害要广泛、复杂得多，往往不取决于单个因子，而是受许多因子共同影响，而植物的响应及产生抗性的机制，也要复杂得多。近年来，通过对DREBs类转录因子功能的研究深入，发现DREBs在多种胁迫适应性及抗性中具有重要作用。

Liu等^[5]和Kasuga等^[35]将CaMV35S: *AtDREB1A*转入拟南芥，筛选出*AtDREB1A*表达量不同的a、b、c3种转基因株系。株系a中*AtDREB1A*的表达量最高，但植株矮小；株系c中，*AtDREB1A*的表达量较低，植株表型变化也较小；株系b则介于株系a和c之间。相对于野生型植株，转基因株系中均检测到*RD29A*、*RD17*等启动子中含DRE/CRT元件的胁迫相关基因的表达，并且转基因植株对干旱和低温的耐受力也明显提高。将转基因植株和野生型植株于-6℃处理2 d再放回正常生长条件下培养(22℃)5 d后，野生型全部死亡，而株

系b和株系c的存活率分别为 83.9%和 35.7%。4 周大的 35S:OsDREB1A转基因拟南芥植株于-6℃处理 30 h后,再于正常条件(22℃)下恢复生长 5 d后,其存活率为 28%~45%,而野生型的存活率只有 17%^[20]。与 35S:AtDREB1A 转基因拟南芥相比,35S:OsDREB1A转基因拟南芥植株的胁迫耐受力以及生长迟缓的程度都相对低一些。采用竞争性(ACCGAC和GCCGAC)凝胶移位分析,Dubouzet等^[20]发现OsDREB1A只与GCCGAC有效结合,而不同于AtDREB1A能够与A/GCCGAC皆有效结合,从而推测 35S:AtDREB1A的拟南芥转基因植株与 35S:OsDREB1A的拟南芥转基因植株在表型上的差异可能是由于诱导的胁迫应答基因的个数不同引起的。

Jaglo等^[16]把拟南芥的DREB1A/ CBF3、DREB1B/ CBF1、DREB1C/CBF2 基因分别导入油菜,可组成型的提高转基因油菜的耐寒性。后来,Savitsn等将BnCBF5、BnCBF17 转入油菜后发现BNCBF/DREB1 不仅能够提高转基因植株的冷耐受力,而且还可进一步调控叶绿体发育并增强光化效率和光合能力^[36]。

2002 年Hsieh等^[37]将拟南芥中 35S:CBF1 基因转入番茄后转基因番茄对冻害的耐性增加,同时抗旱和抗氧化能力也明显提高,并且这种抗性可以稳定遗传,其F₁代和F₂代转基因作物的抗寒性均比野生型高,结合外施赤霉素,可使转基因番茄在保持冻害耐受力的基础上克服生长迟缓的缺陷。但外施赤霉素却不能改变 35S:AtDREB1A转基因拟南芥和转基因烟草生长迟缓的表型,推测植株表现出的生长迟缓可能是由于赤霉素生物合成受阻之外的其他机制引起的。

Dubouzet等^[20]在研究水稻OsDREB1A的抗逆功能时,发现OsDREB1A拟南芥转基因植株不仅对冷胁迫的耐受力提高,而且耐盐性也提高了。将 3 周大的野生型及转OsDREB1A的拟南芥经 60 mmol/L NaCl处理 2 h,移于正常条件继续生长 3 周后,转OsDREB1A植株的存活率较野生型高近 45%。2003 年,Shen等将从山菠菜中克隆出的AhDREB1 转入烟草中,3 周大的转基因植株和野生型烟草转入含有 1.5%NaCl的MS培养基上,生长一周后发现AhDREB1 转基因烟草生长状态良好,且其干重比对照植株高 2 倍,表明AhDREB1 转基因烟草的抗盐性明显提高^[38]。

2006 年Sakuma等^[21]将 35S:AtDREB1A和 35S:AtDREB2A CA转化拟南芥,在 2 周干旱处理(停止浇水)过程中,35S:AtDREB1A和 35S:AtDREB2A CA转基因植株的存活率分别为 60%和 83.3%,而野生型全部死亡。2007 年Chen^[39]等从大豆中克隆到一种新的转录因子GmDREB2,并将其转化拟南芥,进行干旱处理(19 d 不浇水)后,野生型全部死亡,35S: GmDREB2 和Rd29A: GmDREB2 转基因植株的成活率分别为 45.9%和 21%^[39]。

最近,Sakuma等^[40]通过对DREB2A-CA过量表达的转基因拟南芥中DREB2A的上调基因做微阵列分析,发现DREB2A-CA不仅可进一步诱导下游干旱和盐胁迫基因、也可诱导热激(Heat-shock HS)相关基因的表达;37℃下DREB2A会被快速、瞬时诱导,其表达量在热处理约30分钟后达到最高,之后DREB2A的表达量锐减到一个相对较低的水平并一直持续到处理10小时后。将35S:AtDREB2A CA转化拟南芥,45℃热激1 h,然后转入22℃复苏7 d,发现对照植株的成活率为13.4%,而35S:AtDREB2A CA转基因植株的成活率高达88%。2007年Lim^[41]等通过RT-PCR发现AtDREB2B受到热激后也会在一个小时后快速诱导表达,并且表达会一直持续12 h,而AtDREB2C受到热激3 h后才缓慢诱导表达,因此推测DREB2A、DREB2B、DREB2C 3种DREB2 基因可能在应答热激胁迫的不同阶段起作用。后来,Qin等将玉米中克隆得到的ZmDREB2A转化拟南芥,发现其过量表达能够激活下游HSPs和HsfA3等热激相关基因的表达,从而进行胁迫信号的传导和响应,提高转基因植株的耐热性^[42]。

在提高植物耐逆性方面,DREB1A/CBF3 基因还可通过其他调控机制来发挥作用。Gilmour等^[43]在 2002 年对低温下转CBF3(同DREB1A)的拟南芥转基因植株的研究中发现,超表达CBF3 不仅调控下游胁迫相关靶基因的表达,还影响到脯氨酸和糖的代谢,使转基因植株中两者含量均有提高。而脯氨酸和可溶性糖作为渗透调节剂,其在提高细胞渗透压、保护细胞膜及增强植物的耐逆性方面的作用已经得到广泛认可。

转入DREBs类转录因子的转基因植株在抗逆性提高的同时,由于外源基因的引入,某些情况下会影响到植株在正常条件下的生长发育,表现为生长的延迟及植株的矮化^[5]。2004年Maruyama等^[44]对35S: AtDREB1A转基因植株生长迟缓的原因进行研究,发现组成型过量表达AtDREB1A能够使诸如STZ和At5g04340的转录因子表达量上调,而这些转录因子的表达会抑制转基因植物的光合作用和碳代谢,因此通常使用Rd29A 诱导型启动子以避免AtDREB1A过量表达引起的生长迟缓;35S: GmDREB2和Rd29A:

*GmDREB2*转基因植株与对照相比并没有明显的表型变化, 而且35S: *GmDREB2*转基因植株比Rd29A: *GmDREB2*转基因植株的成活率高, 故推测*GmDREB2*过量表达不会激活抑制植物生长的基因表达, 因此不会影响植物的生长^[39]。

6 展望

自Yamaguchi-Shinozaki等从拟南芥的核提取物首次检测到了能够与DRE顺式作用元件相互作用的蛋白质到现在, 仅仅十几年的时间, 已经从油菜、小麦、山菠菜、水稻、大豆等多种植物中分离得到DREBs类转录因子。作为该类转录因子的主要成员, DREB1A/B/C和DREB2类转录因子分别参与到不依赖于ABA的低温、干旱或高盐等胁迫应答途径中; 而DREB1D/CBF4则参与到依赖ABA的干旱或高盐等胁迫应答途径中^[45]。这些结果表明, 植物在非生物逆境胁迫应答反应中存在着复杂的信号传导途径, 这些途径即相对独立又通过某些共同的组份有所交叉, 紧密联系在一起构成一个复杂的信号传递网络。就目前的研究状况来看, 对于诸如细胞如何感知外界逆境信号、如何进一步将逆境信号传导给转录因子以及转录因子如何调控其下游基因等问题仍缺乏足够的信息和证据来描述一个相对完整和清晰的植物转录因子胁迫应答的信号通路。在以后的研究中, 利用不断发展和完善的基因工程技术, 如微阵列、蛋白互作、相关突变体分析等, 有望对植物转录因子在非生物逆境抗性中的作用机理进行深入的研究, 为利用转录因子进行植物抗逆基因工程改良提供理论依据。

参考文献 (References):

- [1] Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic Acid. *Plant Physiol*, 2006, 142(3):1065—1074.
- [2] Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, 110(1):249—257.
- [3] 刘欣, 李云. 转录因子与植物抗逆性研究进展. *中国农学通报*, 2006, 22(4): 61—65.
- [4] Okamoto JK, Caster B, Villarreal R. The AP2 domain of APETALA2 define a large new family of DNA binding protein in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13): 7076—7081.
- [5] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 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*, 1998, 10(8): 1391—1406.
- [6] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(3): 217—223.
- [7] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A Novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6(2): 251—264.
- [8] Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF. The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol*, 1994, 24(5): 701—713.
- [9] Choi DW, Zhu B, Close TJ, The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv. Dicktoo. *Theor Appl Genet*, 1999, 98(8): 1234—1247.
- [10] Jiang C, Lu B, Singh J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter Brassica napus. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(3): 679—684.
- [11] Busk PK, Jensen AB, Pages M. Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab17 from maize. *Plant J*, 1997, 11(6): 1285—1295.
- [12] Ouellet F, Vazquez-Tello A, Sarhan F. The wheat wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. *FEBS Lett*, 1998, 423(3): 324—328.
- [13] Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. 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*, 1997, 94(3): 1035—1040.
- [14] Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J*, 1998, 16(4): 433—442.
- [15] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 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*, 2002, 290(3): 998—1009.
- [16] Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF. 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*, 2001, 127(3): 910—917.
- [17] Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM, Singh J. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from Brassica napus. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(5): 459—471.
- [18] Choi DW, Rodriguez EM, Close TJ. Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1781—1787.
- [19] Shen YG, Zhang WK, He SJ, Zhang JS, Liu Q, Chen SY. An EREBP/AP2-type protein in Triticum aestivum was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(5): 923—930.
- [20] Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene

expression. *Plant J*, 2003, 33(4): 751–763.

- [21] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1292–1309.
- [22] Li XP, Tian AG, Luo GZ, Gong ZZ, Zhang JS, Chen SY. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. *Theor Appl Genet*, 2005, 110(8): 1355–1362.
- [23] 秦峰, 李洁, 张贵友, 赵军, 陈受宜, 刘强. 玉米中与 DRE 元件结合的转录因子的克隆和结构分析. *植物学报*, 2003, 45(3): 331–339.
- [24] Hong JP, Kim WT. Isolation and functional characterization of the Ca-DREBLP1 gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Planta*, 2005, 220(6): 875–888.
- [25] LIU Wei, ZHANG Mei, BI Yu-Ping, LI Zhen. PNDREB, a DREBs-like TF in peanut (*Arachis hypogaea*), participate in stress signal transduction under abiotic stresser. In: Proceedings of the 13th International Biotechnology Symposium & Exhibition, China, 2008, S229-S230.
- [26] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2003, 17(8): 1043–1054.
- [27] Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu J K. The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev*, 2001, 15(7): 912–924.
- [28] Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu JK. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(21): 8281–8286.
- [29] Xiong L, Lee H, Ishitani M, Tanaka Y, Stevenson B, Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM, Zhu JK. Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16): 10899–10904.
- [30] Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK. RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Pro Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 11507–11512.
- [31] Boyce JM, Knight H, Deyholos M, Openshaw MR, Galbraith DW, Warren G, Knight MR. The *sfr6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant J*, 2003, 34 (4): 395–406.
- [32] Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J. CBF/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*, 2004, 101(11): 3985–3990.
- [33] Fowler SG, Cook D, Thomashow MF. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiol*, 2005, 137(3): 961–968.
- [34] Qin F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1693–1707.
- [35] Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(3): 287–291.
- [36] Savitch LV, Allard G, Seki M, Robert LS, Tinker NA, Huner NP, Shinozaki K, Singh J. The effect of overexpression of two *Brassica* CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(9): 1525–1539.
- [37] Hsieh TS, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol*, 2002, 129(3): 1086–1094.
- [38] Shen YG, Zhang WK, Yan DQ, Du BX, Zhang JS, Liu Q, Chen SY. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(1): 155–161.
- [39] Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(2): 299–305.
- [40] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18822–18827.
- [41] Lim CJ, Hwang JE, Chen H, Hong JK, Yang KA, Choi MS, Lee KO, Chung WS, Lee SY, Lim CO. Over-expression of the *Arabidopsis* DRE/CRT-binding transcription factor DREB2C enhances thermotolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(2): 431–436.
- [42] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J*, 2007, 50(1): 54–69.
- [43] Gilmour S, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol*, 2000, 124(4): 1854–1865.
- [44] Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J*, 2004, 38(6): 982–993.
- [45] Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 639–648.