

参与植物非生物逆境响应的 DREB/CBF 转录因子研究进展

刘坤¹ 李国婧² 杨杞²

(1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古农业大学生命科学院, 呼和浩特 010019)

摘要: DREB/CBF 转录因子是植物 AP2/ERF 转录因子超家族的一个亚家族, 具有 AP2 保守结构域, 能特异性结合植物抗逆基因启动子区域 DRE/CRT 顺式作用元件。目前, 越来越多研究表明, DREB/CBF 转录因子参与调控植物响应干旱、盐、冷、热以及其他逆境胁迫的应答反应, 是植物抗逆的关键调节因子。综述了近年来国内外 DREB 转录因子的研究进展, 从 DREB 转录因子的结构、分类、家族及在非生物逆境胁迫中的功能等方面进行了总结, 并结合当前研究的瓶颈, 讨论了研究植物 DREB/CBF 转录因子的意义及存在的问题, 并提出了今后的突破方向, 以期筛选优质抗逆植物资源, 培育抗逆农林草新品种提供理论依据和指导。

关键词: 转录因子; DREB/CBF; 基因家族; 非生物胁迫

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1219

Research Progress in DREB/CBF Transcription Factor Involved in Responses in Plant to Abiotic Stress

LIU Kun¹ LI Guo-jing² YANG Qi²

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019; 2. College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019)

Abstract: Dehydration responsive element binding (DREB)/CBF is a subfamily of the AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) superfamily in plant, having AP2 conserved domain and binding specifically to the dehydration response element/C-repeat (DRE/CRT) cis-elements (also known as the DNA sequence motif G/ACCGAC) found in the promoter region of stress resistance genes. Recent studies demonstrate that DREB transcription factors are involved in plant responses to drought, salt, cold, heat and other abiotic stresses, and is a key regulator in plant stress resistance. In this paper, recent progress in DREB is reviewed and several key aspects including structure, classification, family and function in abiotic stress are summarized. Combining the current bottlenecks of studying DREB transcription factors in plants, the prospects and issues in this field are also discussed. Finally, the breakthrough directions for future works are emphasized, aiming to provide a theoretical basis and guidance in screening high-quality plant resources and breeding novel varieties of crops, forests and grasses.

Key words: transcription factor; DREB/CBF; gene family; abiotic stress

植物生长和发育的环境十分复杂, 常常遭受如干旱、涝害、高盐碱、重金属 (铅、 Al^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{2+})、极端温度以及对流层臭氧等逆境胁迫, 严重

时甚至会导致植物死亡, 造成农作物大量减产, 从而严重影响农业生产效益和生态环境。因此, 提高植物抗逆性, 降低逆境对植物的伤害, 阐明植物抗

收稿日期: 2021-09-22

基金项目: 内蒙古农业大学高层次人才引进科研启动项目 (NDYB2019-17), 内蒙古自然科学基金项目 (2019ZD05), 内蒙古自治区科技计划 (2019GG007)

作者简介: 刘坤, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物抗逆生理与分子生物学; E-mail: liukun@imau.edu.cn

通讯作者: 杨杞, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物抗逆生理与分子生物学; E-mail: atp_yangqi@imau.edu.cn

逆机理意义重大。为应对外界不利环境,提高对逆境的适应性,在进化过程中,植物通过调节相关基因和功能蛋白的表达,激活体内免疫防御应答机制,提高自身对外界环境的适应性^[1]。转录因子(反式作用因子)是植物中最重要的一类DNA结合蛋白,能够与启动子区域顺式作用元件(即特定的DNA序列)特异性结合,在时间和空间上协同调控下游基因的表达;或者通过转录因子之间以及与其他相关蛋白之间的相互作用,激活或抑制基因转录^[2]。近几十年来,科学家们已经相继从许多种植物中分离出一系列调控生物以及非生物胁迫基因表达的转录因子,包括AP2/ERF、bHLH、bZIP、MYB、WRKY、NAC、TCP等,其中,AP2/ERF是植物中广泛存在的一类转录因子超家族,含有AP2/ERF结构域,具有DNA结合功能,与植物的生长发育及逆境胁迫响应密切相关^[3]。DREB转录因子属于AP2/ERF转录因子超家族的一个亚家族,能够与DRE/CRT(dehydration responsive element/C-repeat)顺式作用元件或具有DRE元件的核心序列(CCGAC)特异结合,故DREB转录因子又被称作CBF(C-repeat binding factor)转录因子。已有研究表明,DREB转录因子参与调控逆境响应基因表达,介导非生物胁迫信号的转导^[4]。本文将从DREB转录因子结构特征、分类以及逆境胁迫应答等多个角度,对近几十年特别是近5年来国内外有关DREB类转录因子在植物抗逆领域中的作用及研究进行综述,以期全面了解植物抗逆分子机制提供参考。

1 AP2/EREBP 转录因子家族的结构特征

AP2/EREBP(APETALA2/ethylene responsive element binding protein)或AP2/ERF(APETALA2/ethylene responsive factor)参与植物的生长发育、激素调控、病原反应、逆境胁迫应答等相关生物学过程,这类转录因子的DNA结合域均为保守的AP2/EREBP结构域(简称AP2结构域),因而统称为AP2/EREBP或者AP2/ERF转录因子^[5-6]。AP2结构域长度为57-70个氨基酸残基,其典型的三维结构是由1个双亲性的 α -螺旋和3个反向平行的 β -折叠所构成^[7-8]。此外,在AP2结构域的N-末端和C-末端上还分别含有YRG和RAYD保守元件,长度分别为

19-22个和43个氨基酸残基。这两个元件对于AP2/ERF转录因子识别下游特异性DNA序列非常重要^[8]。Sakuma等^[9]依据AP2结构域的相似性以及数量将拟南芥AP2/ERF转录因子家族分为5个亚家族,包括AP2、DREB(dehydration responsive element binding protein)、ERF(ethylene response factor)、RAV(related to ABI3/VP1)和Soloist类。AP2亚家族含有2个相似度很高的且串联的AP2结构域,DREB和ERF亚家族均含有1个AP2结构域,其中DREB亚家族AP2结构域第14位和第19位氨基酸为Val和Glu,而ERF亚家族AP2结构域第14位和第19位氨基酸为Ala和Asp,序列的细微差别直接影响到转录因子与下游DNA序列结合的特异性^[10-12]。DREB转录因子能够与启动子区域DRE/CRT元件结合,参与植物逆境胁迫应答过程。DRE/CRT基序含有6bp的保守核心序列:A/GCCGAC,该序列在干旱响应基因RD29A(responsive to desiccation 29A)的启动子上首次被发现,并且已有研究表明,RD29A能够在干旱、高盐和低温的诱导下表达水平升高^[13]。而ERF亚家族能够特异性识别GCC-box(A/GCCGCC),从而调控植物对乙烯、病菌侵害以及非生物胁迫的应答反应^[14]。另外,DREB和ERF亚家族又各进一步分别细分为6个组,A1-A6组和B1-B6组^[9]。RAV亚家族包含1个AP2结构域和1个B3结构域,Soloist类中也含有1个AP2结构域,但是其氨基酸序列和结构与其他亚组相差甚远,且Soloist类的AP2结构域中不含有WLG基序^[15]。

2 DREB 转录因子的特点与分类

不同物种间DREB转录因子的AP2结构域具有较高的相似性,尤其是在序列的中间位置相似性较高,而在结构域的两端相似性较差。DREB A1组转录因子羧基末端包含高度保守的LWSY序列,在AP2结构域的上游具有核定位信号(NLS)PKK/RPAGR_xK-F_xETRHP,在结构域的下游包含DSAWR基序^[16]。DREBA2组与A1组相比略有不同,在序列的羧基端包含保守GDDGFSLF_xY序列,在AP2结构域上游包含保守PKK-like核定位信号,序列为RK_xPAKGSKKGCM_xGKGGP EN_{xx},结构域下游没有出现特异性序列。DREB A3组转录因子在

序列的羧基端包含高度保守的 GSIWDxxDPFF 序列, 同时在 AP2 结构域上游包含 RKxxxxKGGPxNxKF 保守序列。DREB A4 和 A5 组结构域中无特异性序列出现。DREB A6 组转录因子在羧基末端包含保守 KYPSxEIDW 序列^[17-18], 在基因结构中间位置富含丝氨酸和苏氨酸, 并且与 AP2 结构域相邻, 在特定条件下可被磷酸化^[17, 19]。

不同组的 DREB 转录因子对于识别下游 DRE/CRT 基序核心序列 A/GCCGAC 的特异性不同, 有学者研究发现, 将序列中第二个 A 突变为 C 或者 T 时, 或者将第 3 位 C 突变为 T 时, DREB1A 依然可以结合 DRE 核心序列, 而 DREB2A 则失去结合能力^[9]。此外, 将 DREB1A AP2 结构域上的谷氨酸 (E) 突变为谷氨酰胺 (D) 后, 其依然能够结合 DRE/CRT 元件, 但不能识别 GCC-box; 如果将缬氨酸 (V) 突变为丙氨酸 (A), 则不能特异性识别 DRE/CRT 元件和 GCC-box。结果表明, DREB 1A 转录因子第 14 位缬氨酸 (V) 在识别下游启动子作用元件中具有十分重要的作用。然而, 如果将 DREB2A 中第 14 位的 V 和第 19 位的 E 任意突变一个, DREB2A 就失去了与 DRE/CRT 元件结合的能力, 表明这两个氨基酸在调控 DREB2A 基因特异性结合下游 DNA 序列上均具有重要的作用^[9]。

有学者根据 DREB 转录因子序列的结构与特点, 对拟南芥中 DREB A1 组成员进行了更为细致的分类, 其中, DREB A1 组共包含 6 个成员, 分别为 CBF1 (C-repeat-binding factor 1) /DREB1C、CBF2/DREB1B、CBF3/DREB1A、CBF4/DREB1D、DDF1 (dwarf and delayed-flowering 1) /DREB1E 和 DDF2/DREB1F。根据基因功能的不同, 这 6 个成员又被分为两组: 其中一组 CBF1/DREB1C、CBF2/DREB1B、CBF3/DREB1A 为第 1 类, 另一组 CBF4/DREB1D、DDF1/DREB1F 和 DDF2/DREB1E 为第 2 类^[20-23]。DREB A2 组有 8 个成员, 按照基因间亲缘关系可以被分为 3 小组, 第 1 小组为 DREB2A、DREB2B、DREB 2C、DREB 2E 和 DREB 2H, 第 2 小组为 DREB2D 和 DREB2G, 第 3 小组为 DREB2F。与拟南芥相比, 水稻 (*Oryza sativa*) DREB A2 组包含 6 个成员, 其中, OsDREB2A 和 OsDREB2B 为第 1 类, OsDREB2C 为第 2 类, OsDREB2E 为第 3

类, OsABI4 为第 4 类, 而 *OsDREB2D* 基因的序列明显不同于其他 *OsDREB2s* 基因序列, 故未将其进行分类^[24-25]。拟南芥 DREB A3 组只有一个成员 ABI4, 但由于其与水稻 DREB A2 组中第 4 类成员 OsABI4 相似性较高, 有人也将其归为 DREB A2 组的第 4 类^[24]。拟南芥 DREB A4 组有 16 个成员, 包括 TINY 和 TINY2 等^[26]。DREB A5 组也有 16 个成员, 包括 RAP2.1 (related to AP2 1)、RAP2.9 (related to AP2 9) 和 RAP2.10 (related to AP2 10) 等^[8]。DREB A6 组有 9 个成员, 其中包括 RAP2.4 (related to AP2 4) 等^[9]。

3 DREB 转录因子家族鉴定与分析

早在 2002 年, Sakuma 等^[9]就报道拟南芥中含有 145 个 AP2/ERF 转录因子, 其中, DREB 亚家族共 56 个成员, 占总数的 38.6%, 其中 A1-A6 组成员数量分别为 6、8、1、16、16 和 9 个。另外, ERF 亚家族共有 65 个成员, AP2 亚家族共有 17 个成员, RAV 亚家族共有 6 个, 以及 1 个 Soloist 成员: AL079349。2006 年, Nakano 等^[15]又在 Sakuma 的研究基础上进行了更进一步分析, 发现在拟南芥中共有 147 个 AP2/ERF 转录因子成员, 其中包含在 Sakuma 等研究中未发现的 AP2 亚家族成员 At5g60120 以及 ERF 亚家族成员 At1g22190。Soloist 亚家族基因为 At4g13040, 这与 Sakuma 等^[9]的研究结果一致。另外, Nakano 等^[15]将 Sakuma 等分类中的 DREB 和 ERF 2 个亚家族分为 1 个家族, 命名为 ERF 家族, 其中 Group I-Group IV 为 DREB 亚家族成员, 数量为 57 个, Group I (A6)、Group II (A5)、Group III (A1、A4、A5)、Group IV (A2、A3) 组成员数量分别为 10、15、23 和 9 个。

目前, 国内外学者对 DREB 转录因子家族的报道较多, 涉及的植物种类较为广泛, 涵盖了禾本科、豆科、十字花科、杨柳科等。然而, 对于同一种植物, 不同学者可能有不同的看法, 例如 Song 等^[27]研究发现, 油菜 (*Brassica rapa*) 中 AP2/ERF 转录因子超家族成员的数量为 291 个, 其中 DREB 转录因子的数量为 107 个, 占 36.77%; 而其他学者则认为, 油菜中 AP2/ERF 转录因子超家族成员的数量是 281 个, 其中 DREB 转录因子为 105 个, 占

37.37%^[28]。苟艳丽等^[1]、邵文靖等^[29]和张麟等^[3]认为茄科作物马铃薯含有 246 个 AP2/ERF 转录因子家族成员,其中 DREB 类转录因子为 58 个,占 23.58%;番茄中共含有 190 个 AP2/ERF 转录因子家族成员,DREB 类转录因子占 23.16%,数量为 44 个。而 Charfeddine 等^[30]和 Sharma 等^[31]研究表明,马铃薯和番茄中分别含有 181 和 112 个 AP2/ERF 转录因子,其中 DREB 类分别为 65 和 25 个,占比为 35.91% 和 22.32%。Nakano 等^[15]研究表明,在水稻中 AP2/ERF 转录因子家族基因共有 157 个,其中 DREB 转录因子共有 56 个,占 35.67%;而 Sharnoi 等^[32]持不同观点,他认为水稻中有 163 个 AP2/ERF 转录因子,其中 DREB 转录因子共有 57 个,占 34.97%(表 1)。另外,二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 等植物中也存在类似问题,究其原因可能是:第一,存在可变剪接。有学者认为,虽然来源相同,但是可变剪接体在 DNA 序列上就存在差异,每一种剪接体都应该被认为是单独的一个基因家族成员,而有的学者则认为只要可变剪接体的来源是相同的,就认为是家族中的一个基因。第二,AP2 结构域的差异。AP2/ERF 转录因子基因结构上含有典型的 AP2 结构域,对于只含有 AP2 结构域的基因均归为 AP2/ERF 转录因子家族成员,但一些人认为,基因结构上除了含有 AP2 结构域之外,如果还具有其他的结构域,那么也要归为 AP2/ERF 转录因子家族中。第三,AP2 结构域的完整性。对于一些 AP2/ERF 结构域完整性较低的基因,一些学者认为也可以归为家族成员中,而有的学者只对具有完整 AP2 结构域的基因进行了统计。

4 DREB 转录因子在非生物胁迫中的功能

植物 DREB 类转录因子能够响应非生物胁迫,能够在逆境条件下提高植物的抗逆性。同时,DREB 类转录因子对植物激素信号也非常敏感,在植物激素信号转导通路中具有重要作用^[13]。

4.1 低温及冷胁迫响应机理及功能

农作物遭受低温及冷害后会大幅减产,作物的品质也会受到影响,如何提高植物在冷害胁迫条件下的抗性一直以来备受人们关注。近几年,人们对于植物冷胁迫耐受调控机理也进行了深入研究。外

界冷信号刺激质膜上钙离子通道 (Ca^{2+} channel)、蛋白激酶 (protein kinases) 以及 COLD1 (cold sensor chilling-tolerance divergence 1) 冷响应受体。蛋白激酶 OST1 (open stomata 1)、MPK3/6 (mitogen-activated protein kinase 3/6) 以及 BIN2 (brassinosteroid-insensitive 2), E3 连接酶 HOS1 (high expression of osmotically responsive genes)、PUB25/26 (U-box type E3 ubiquitin ligases 25/26) 和 SUMO E3 (small ubiquitin-related modifier E3) 连接酶 SIZ1 (SAP and MiZ1) 等在翻译后水平参与调控 ICE1 (inducer of CBF expression 1) 和 MYB15 (myeloblastosis 15) 等关键转录因子的活性。ICE1 属于 bHLH 转录因子家族,能够识别 CBFs 基因启动子区域的 MYC 元件^[48],激活 CBFs 基因的表达,激活后的 CBFs 可以直接与冷防御基因如 *CORs* (*Cold regulated*) 上的 DRE/CRT 元件结合,激活 *CORs* 基因的表达,最终通过激活抗冷蛋白或 ROS 清除系统,增强植物的抗冷性^[49]。MYB15 是 MYB 转录因子家族中的一个抑制子,其可以与 ICE1 相互作用,进而识别 CBF 基因启动子区域的 Myb 识别元件,抑制 CBFs 基因表达^[50]。

在冷胁迫下,COLD1 能够与 RGA1 (rice G-protein α subunit 1) 亚基互作,激活下游第二信使,如 Ca^{2+} 信号等,随后将信号级联传递给蛋白激酶,如 OST1 等。OST1 磷酸化 ICE1,使 ICE1 变为激活态,最终激活 CBFs 基因表达^[51]。除了 ICE1 外,近期研究发现,BTF3 (basic transcription factor 3) 和 BTF3L (BTF3-like) 也是 OST1 的催化底物。BTF3 蛋白是新生多肽相关复合物的 β 亚基,能够提高植物的抗冷性。OST1 能够磷酸化 BTF3 和 BTF3L,促使 BTF3 蛋白与 CBFs 转录因子互作,使 CBFs 蛋白在冷胁迫下更稳定^[52]。另外,在外界冷信号到来时,OST1 也同样受到 ERG2 (clade E growth regulating 2) 的调控。ERG2 属于 PP2C (type 2C (clade E) protein phosphatase) 蛋白家族,该蛋白家族在植物响应非生物胁迫以及激素调节过程中发挥着重要作用,但其行使功能不依赖于 ABA^[51]。

研究发现,冷信号途径中的一些重要组分可能会被 E3 泛素连接酶识别,进而使其泛素化并且通过 26S 蛋白酶体途径降解。然而最近有研究报道,CBF 转录因子同样也会经过 26S 蛋白酶体途径而降解。

表 1 不同植物 AP2/ERF 类转录因子总结

Table 1 Summary of AP2/ERF transcription factors in different plants									
科 Family	植物 Plant	DREB 分类 DREB classification						总数 Total	
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	DREB	AP2/ERF
禾本科 Gramineae	水稻 <i>Oryza sativa</i> ^[32]	10	6	5	12	15	9	57	163
	玉米 <i>Zea mays</i> ^[33]	10	4	1	11	13	10	49	167
	小麦 <i>Triticum aestivum</i> ^[34]	39	5	0	1	4	8	57	117
	大麦 <i>Hordeum vulgare</i> ^[35]	9	3	2	1	1	2	18	53
	毛竹 <i>Phyllostachys edulis</i> ^[36]	7	6	0	14	6	14	47	142
	二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i> ^[37]	22	5	6	11	11	10	65	149
	高粱 <i>Sorghum bicolor</i> ^[38]	8	11	5	2	20	6	52	126
豆科 Leguminosae	鹰嘴豆 <i>Cicer arietinum</i> ^[39]	6	5	1	14	10	7	43	147
	木豆 <i>Cajanus cajan</i> ^[39]	5	9	1	18	10	7	50	176
	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> ^[39]	4	7	1	14	11	4	41	131
	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> ^[39]	8	8	1	19	10	8	54	179
	百脉根 <i>Lotus japonicus</i> ^[39]	7	4	1	18	11	7	48	140
	大豆 <i>Glycine max</i> ^[39]	3	6	1	11	7	9	37	148
十字花科 Brassicaceae	油菜 <i>Brassica rapa</i> ^[27]	10	16	2	36	26	19	109	291
	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> ^[15]	6	8	1	16	16	10	57	147
	欧洲油菜 <i>Brassica napus</i> ^[40]	35	42	81	33	23	0	214	515
	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i> ^[41]	8	9	1	33	23	17	91	226
杨柳科 Salicaceae	毛白杨 <i>Populus trichocarpa</i> ^[42]	6	18	2	26	14	11	77	200
	绦柳 <i>Salix matsudana</i> ^[43]	10	31	3	45	26	20	135	364
	红皮柳 <i>salix purpurea</i> ^[43]	10	16	2	26	13	10	77	189
	钻天柳 <i>S. arbutifolia</i> ^[43]	4	8	2	19	15	9	57	173
大戟科 Euphorbiaceae	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> ^[44]	6	5	1	10	7	5	34	114
蔷薇科 Rosaceae	苹果 <i>Malus domestica</i> ^[45]	3	25	2	18	18	10	76	260
	月季 <i>Rosa chinensis</i> ^[45]	7	11	1	15	7	3	44	135
葡萄科 Vitaceae	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> ^[46]	7	4	0	13	7	5	36	132
伞形科 Umbelliferae	胡萝卜 <i>Daucus carota</i> ^[5]	15	7	2	21	12	14	71	267
葫芦科 Cucurbitaceae	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i> ^[47]	5	10	20	7	0	0	42	131

在冷胁迫下,CRPK1 (cold-responsive protein kinase 1) 磷酸化 14-3-3 蛋白使其从质膜转移到细胞核,进入细胞核的 14-3-3 蛋白与不稳定的 CBFs 转录因子结合,从而减弱 CBF 通路的表达,避免对冷胁迫产生过度响应^[53]。此外,在冷胁迫下,有活性的 OST1 可以磷酸化 2 个 U-box 型 E3 泛素连接酶 PUB25 和 PUB26,增强其泛素连接酶活性,激活 MYB15 的泛素化降解途径,从而正调控冷胁迫^[54]。

植物 DREB 转录因子的 6 个亚家族中, A1 亚家族成员 (CBF/DREB1s) 对冷胁迫敏感,几乎都能够受到冷胁迫的诱导,能够调控冷胁迫相关基因的表达,如 *COR47* 和 *COR15a* 等^[55-57]。研究表明

A1 亚家族成员在拟南芥 4 号染色体上是串联排列的^[20, 58], 为阐明 DREB/CBF 转录因子抗冷机理提供了思路。有学者通过 CRISPR-Cas9 技术获得拟南芥 *cbf123* 三突变体株系, 经冷冻胁迫后证实 *cbf123* 株系不耐受冷冻胁迫^[59], 而 *CBFs* 双突变体的表型则略有差异。拟南芥 *cbf23* 双突变体对冷胁迫十分敏感, 而 *cbf13* 双突变体对冷胁迫没有响应。Jia 等^[60] 利用相同技术获得拟南芥 *CBFs* 三突变体幼苗, 也命名为 *cbf123*, 并发现三突变体 *cbf123* 在低温驯化后对冷冻胁迫的敏感性要比单突变体 *cbf2*、*cbf3* 以及双突变体 *cbf13* 强, 以上结果表明, 拟南芥 DREB A1 家族 *CBF/DREB1s* 参与植物应对冷胁迫信号, 且

由于 *CBF1*、*CBF2*、*CBF3* 在染色体上属于串联排列,所以在冷胁迫信号响应过程中存在一定的功能冗余,且 *CBF2* 要比 *CBF1* 和 *CBF3* 在冷驯化依赖的冷冻耐受方面发挥更重要的作用。但是,目前对于 CBFs 基因功能的研究存在不同的观点,如 Novillo 等^[61] 结果表明,将拟南芥 *CBF2* 突变掉后,植株对冷胁迫的耐受力增强,而将拟南芥 *CBF1* 和 *CBF3* 一起突变后,植株对冷胁迫的耐受力减弱^[62],该结果与 Jia 等^[60] 结果一致。Zhao 等^[59] 则认为 *cbf2* 突变体对冷胁迫稍有敏感,而拟南芥双突变体 *cbf1cbf3* 对冷胁迫不敏感。作者对可能的原因进行了分析,拟南芥 CBFs 基因在染色体上的排列方式是串联的,对其中 1 或 2 个基因进行突变时,其他基因可能会受到影响。另外,在 CBFs 基因的周围含有许多基因表达调控的关键元件,基因的突变会影响关键调控元件的激活,进而影响拟南芥突变体的表型。所以,CBFs 基因间复杂的调控关系还有待进一步的研究和验证^[51, 63]。

除了 DREB A1 组外,其他组 DREB 转录因子则对冷胁迫不十分敏感。*DREB 2A* 不受低温诱导,但受干旱和高盐诱导^[19]。过表达 *DREB 2A* 转基因拟南芥轻微提高对冷害的抗性,显著提高对干旱的耐受性^[64]。狼尾草 (*Pennisetum glaucum*) 中 DREB A2 型转录因子 *PgDREB2A* 在冷胁迫下的表达水平明显比盐和干旱处理后要高,在处理 12 h 时表达量最高,是对照组的 3 倍^[65]。水稻 *OsDREB2B* 受冷胁迫快速诱导,而 *OsDREB2A* 受热、干旱和高盐的诱导,却不受冷诱导^[24]。胡杨 (*Populus euphratica*) DREB A2 组成员 *PeDREB2* 受冷、干旱和高盐的诱导^[66]。另外,狗牙根 (*Cynodon dactylon*) *BeDREB1* 和 *BeDREB2*、银新杨 (*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*) *PaDREB2*、小麦 *TaWDREB2* 以及玉米 *ZmDREB2A* 等多种 DREB A2 组基因均能够受到冷胁迫的诱导^[67-70]。拟南芥 *AtTINY* 属于 DREB A3 型,受到干旱胁迫、冷胁迫、乙烯、ABA 的强烈诱导,过表达 *AtTINY* 后,拟南芥植株矮小且发育迟缓,冷胁迫相关基因 *COR6.6*、*COR15A* 和 *COR78* 等上调表达^[71]。大豆 *GmDREB2* 和 *GmDREB3* 均属于 DREB A5 组成员,均受低温胁迫的诱导,其中, *GmDREB3* 对冷胁迫响应较为迅速,处理 0.5 h

后即有明显响应,且不受干旱,高盐和 ABA 的诱导,与 DREB A1 组基因的表达模式较为相似。过表达 *GmDREB3* 拟南芥在冷胁迫下的存活率高于野生型^[72-73]。Figuerola-Yañez 等^[74] 研究发现,番木瓜 (*Carica papaya*) *CpRap2.1*、*CpRap2.4a*、*CpRap2.4b* 和 *CpRap2.10* 受冷胁迫快速诱导,冷胁迫 15 min 后,基因表达量即有明显提升,将这 4 个基因转化烟草发现,在冷胁迫处理下,转基因烟草的耐冷性明显优于野生型。以上结果表明,DREB 类转录因子在植物响应冷胁迫信号应答途径中具有十分重要的功能。

4.2 干旱、盐和热响应机理及功能

DREB 转录因子在响应干旱、盐及热胁迫的过程中发挥着重要的作用,尤其是 DREB A2 组成员,如 *DREB2A* 对干旱和高盐诱导较为敏感,而对低温诱导不敏感,过表达 *DREB2A* 拟南芥显著提高植株对干旱的耐受性^[64]。DREB A2 组转录因子的表达水平在 PI-PLC/PA 阻遏途径或 DRIP1/2 参与的泛素化途径的作用下能够维持在一个相对稳定的水平^[75],当遭遇干旱、盐以及热胁迫时,核内 AREB (ABA-responsive element-binding proteins)、HSF (heat shock transcription factor) 及 GRF (growth regulation factor) 等相关转录调控因子与 *DREB2s* 调控元件相结合,启动其转录并翻译成无活性的蛋白,同时被运出细胞核。无活性的蛋白在去磷酸化或者是将 PEST 序列移除后变成有活性的蛋白。PEST 是脯氨酸 (proline, P)、谷氨酸 (glutamic acid, E)、丝氨酸 (serine, S)、苏氨酸 (threonine, T) 的缩写^[76],该序列存在于 AP2 结构域周围,较为保守,是一种负调控因子 (negative regulatory domain, NRD)^[64],富含丝 / 苏氨酸和磷酸化位点,可被蛋白激酶 C 或酪蛋白激酶 2 磷酸化^[76]。当 NRD 上的丝 / 苏氨酸位点被磷酸化后^[77],其可充当 DREB2 类转录因子降解的信号肽,蛋白将被迅速降解^[78]。相反,有研究发现,从拟南芥 *DREB2A* 蛋白上移除 NRD,该蛋白变成一种稳定且激活的状态,能够与下游多种调控因子如 HSF、AREB 等相结合,调控植物的级联反应,提高植物的抗逆性。由于是组成型过表达,所以转基因拟南芥植株出现生长退化的表型^[79]。

在干旱胁迫方面, 东京大学 Kazuko Yamaguchi-Shinozaki 教授团队做出了重要贡献。在正常生长条件下, 拟南芥 DREB2A 蛋白稳定性较差, 而干旱和热胁迫下, BPM (BTB/POZ AND MATH DOMAIN proteins) 敲除株系中 DREB2A 蛋白明显积累, 且其靶基因表达量明显升高, 进一步研究发现 BMP 能够识别 DREB2A 蛋白上的 NRD (negative regulatory domain) 结构域, 从而通过 E3 泛素连接酶途径降解 DREB2A, 该结果探明了拟南芥 DREB2A 依赖于 NRD 降解的主要原因^[80]。Kudo 等^[81]研究表明, 过表达 DREB1A 和 OsPIL1 拟南芥抗旱性明显提高, 表型类似于过表达 DREB1A 植株, 且转录组和代谢组数据表明, 双过表达株系中非生物胁迫相关基因 (如 RD29A、COR15A 等) 表达量明显升高, 可溶性固形物如糖类、氨基酸等均有明显积累。Kidokoro 等^[82]分析了大豆基因组数据库, 鉴定出 14 个 DREB1 型转录因子 (GmDREB1s), 结果表明, 多数 GmDREB1 受多种非生物胁迫 (包括冷、干旱、高盐和热等) 诱导, 另外, 通过分析转录组数据发现, 过表达 GmDREB1B、GmDREB1C、GmDREB1F 拟南芥 RD29A、RD17、COR15A 等表达量明显上调, 这与过表达 GmDREB1A 转基因拟南芥的结果类似, 且干旱胁迫处理下, 转 GmDREB1F 拟南芥存活率明显高于对照。在水分缺乏条件下, 转拟南芥 AtDREB2A 大豆中, AtDREB2A 表达量明显升高, 尤其是在大豆根部, 基因表达量最高, 且稳定性最强^[83]。Mizoi 等^[84]发现一个新的大豆 DREB A2 组基因 GmDREB2A; 2, 其受到干旱、热和低温胁迫的诱导, 干旱胁迫下转 GmDREB2A; 2 拟南芥存活率明显高于转空载体拟南芥。Reis 等^[85]和 Souza 等^[86]在甘蔗中过表达 AtDREB2A, 并在温室和大田条件下进行干旱胁迫处理, 与对照相比, 转基因甘蔗下游干旱胁迫相关基因表达量升高, 且叶片相对含水量、水势以及光合速率也显著高于对照, 植株蔗糖含量和出芽率也明显提高, 大田试验结果表明, 转基因甘蔗表现出更高的产量和生产力。综上所述, 室内和室外田间试验结果均证实, DREB1 型和 DREB2 型转录因子参与调控植物响应干旱胁迫应答。

在盐胁迫下, 水稻根特异性诱导 DREB 转录因子 SERF1 (salt responsive ERF1) 通过 MAPK 级

联信号通路介导植物对高盐胁迫的响应, 过表达 OsSERF1 后, 植株耐盐性明显提高^[87]。水稻 OsDREB1A 和 OsDREB1B 能够被冷胁迫诱导, 且 OsDREB1B 也受甘露醇、NaCl 和 PEG 的诱导, 过表达水稻 OsDREB1A 能够提高拟南芥的耐盐性和抗旱性, 同时, 过表达 OsDREB1B 能够显著提高转基因烟草的抗逆性^[88-89]。转拟南芥 AtDREB1C 丹参与野生型相比抗旱性更强, SOD、POD、叶绿素含量显著升高, MDA 含量显著降低^[90]。木薯 MeDREB1B 受盐、PEG 强烈诱导, 过表达 MeCBF1/DREB1B 明显增强了转基因木薯对于冷害、氧化胁迫以及干旱胁迫的耐受性^[91]。马铃薯 StDREB1 和 StDREB2 分别属于 DREB A4 和 A5 组, 受干旱、盐及渗透胁迫诱导, 与对照相比, 转 StDREB1 和 StDREB2 马铃薯具有更强的耐盐性, 且转 StDREB1 的马铃薯抗旱性更强, 同时, 两种转基因马铃薯中胁迫相关基因表达水平明显升高^[92-93]。除了 DREB 1 型转录因子外, 棉花 DREB A4 组成员 GhDPB3 与拟南芥 AtTINY2 的表达模式类似, 受到干旱和盐胁迫的快速诱导^[94]。Liang 等^[95]在真藓 (*Bryum argenteum*) 中发现一种苔藓类物种中特有的 DREB 转录因子, 命名为 BaDBL1。从结构分类上看, BaDBL1 不属于 DREB A1-A6 组。BaDBL1 受干旱、盐、冷、ABA 的诱导。盐胁迫下, 转 BaDBL1 基因拟南芥耐盐性、抗氧化酶系统 (SOD、POD、CAT) 以及下游胁迫相关基因 (AtRD29A、AtCOR15A 和 AtLEA) 表达水平明显上调。此外, Liang 等^[96]和 Li 等^[97]发现, 在拟南芥中过表达真藓 DREB A5 组基因 ScDREB8 和 ScDREB10 能增强拟南芥种子萌发率和耐盐性, 究其原因主要是下游胁迫相关基因的表达水平升高以及 ROS 清除系统酶活性的增强。

此外, DREB 转录因子对热胁迫也有明显的响应, 大豆 GmDREB2A、苜蓿 MtDREB2A 和拟南芥 AtDREB2A 受干旱、盐和热胁迫诱导, 转基因植株对干旱、盐以及热胁迫的耐受性明显增强^[64, 84, 98]。玉米 ZmDREB2A 受热胁迫诱导, 转基因株系耐热性明显提升^[68]。转基因拟南芥中超表达 DREB2C 后, 热响应相关基因表达量升高, 说明 DREB2C 参与植株热胁迫应答途径^[99]。木瓜 CpRap2.1、CpRap2.10、CpRap2.4a 和 CpRap2.4b 均对热胁迫敏感, 其中

CpRap2.4a 和 *CpRap2.4b* 也受到冷胁迫的诱导。在热胁迫下, 转 *CpRap2.4a*、*CpRap2.4b*、*CpRap2.1* 和 *CpRap2.10* 烟草幼苗存活率明显高于野生型^[74]。将禾本科植物穆子 (*Eleusine coracana*) *DREB2A* 转入烟草中发现, 转基因烟草耐 42℃ 高温, 不耐盐和渗透胁迫, 其耐热机制主要是通过增强体内抗氧化酶 (SOD、CAT、GR 和 POD 等) 活性, 从而提高植株耐热性。此外, 在热胁迫下, 转基因烟草生长发育、形态以及生理生化指标都优于野生型^[100]。过表达和基因沉默番茄 (*Solanum lycopersicum*) *DREB A4* 组基因 *SiDREBA4* 后, 转基因微型番茄通过调节渗透物质含量、耐逆激素水平和抗氧化酶活性, 从而改变植物的耐热性, 且 *SiDREBA4* 还能够参与调控下游许多热激蛋白 (Hsp) 的表达^[101]。与番茄类似, 同源过表达菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) *DREB A6* 组基因 *CiDREB6* 后, 与野生型相比, 植株耐热性和存活率显著提高, 下游 *CmHsfA4*、*CmHSP90* 以及活性氧清除基因 *CmSOD* 和 *CmCAT* 表达水平明显提高^[102]。这些结果表明, *DREB* 转录因子家族参与植物响应干旱、盐以及热胁迫应答过程, 并发挥重要作用。

4.3 其他逆境胁迫响应

除上述逆境胁迫之外, *DREB* 转录因子还能够调控植物对其他逆境胁迫的响应。植物叶片衰老过程受到内源因素以及外界环境的影响, *DREB* 转录因子也参与植物叶片衰老途径。拟南芥 *DREB A1* 组成员 *DEAR4* 受黑暗胁迫诱导, 过表达 *AtDEAR4* 拟南芥在正常以及黑暗条件下均能够明显延缓叶片的衰老, 说明其参与植株衰老响应途径中。另外, 通过研究发现, *DEAR4* 是通过诱导 ROS 的产生, 最终减轻衰老以及其他胁迫对植物产生的毒害^[103]。Liu 等^[104] 在烟草中异源表达川桑 (*Morus notalilis*) *MnDREB4A*, Schwager 等^[105] 在拟南芥中过表达 *AtDREB1C* 后也得到类似的结果, 说明 *DREB* 类转录因子参与植物衰老调控途径并发挥重要功能。*DREB* 类转录因子也参与到植物应对氧化胁迫过程。在 H_2O_2 和百草枯等处理下, 转 *AtCBF2* 拟南芥抗氧化性显著提高, 对 *AtCBF2* 拟南芥进行转录组分析表明, 下游 WRKY、NAC 等转录因子差异表达, 而

SOD 和 *CAT* 等基因表达量不变, 说明 *DREB* 结合下游 NAC 等转录因子, 参与植株的抗氧化过程^[106]。另外, 拟南芥 *DREB* 转录因子 *CRF6* 也受到氧化胁迫的快速诱导^[107]。二色补血草 (*Limonium bicolor*) *LbDREB* 受到盐、渗透以及碱胁迫的诱导, 在 $CuSO_4$ 胁迫下, 转 *LbDREB* 烟草与对照相比可溶性蛋白和脯氨酸含量升高, 且 K/Na 值升高, 同时胁迫相关基因包括 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (Cu/Zn SOD)、过氧化物酶 (POD)、晚期胚胎发育富集蛋白 (LEA) 以及脂转运蛋白 (LTP) 等表达升高, 说明 *LbDREB* 增强转基因烟草对重金属离子胁迫的耐受性^[108]。辣椒 (*Capsicum annuum*) *DREB A1* 组成员 *CaDREBLP1* 受干旱、高盐以及机械损伤的不同程度的诱导^[109]。此外, 水稻 *OsDREB1A* 受机械损伤短暂而迅速地诱导^[89]。水对于植物的生长发育至关重要, 但是过多的水分比如水淹或者洪水等则会导致植物低氧胁迫, 影响植物正常的生理过程。Du 等^[110] 在基因组水平上分析了玉米 AP2/ERF 转录因子家族的表达模式发现, 在不同水淹时间胁迫下, 有 38 个 AP2/ERF 家族基因响应较为显著, 其中包含 10 个 *DREB* 类亚家族基因, 大部分 *DREB* 类基因响应较为迅速, 在水淹胁迫 1 h 后, 表达量即有明显升高, 且随着水淹胁迫处理时间的延长, *DREB A1* 组成员表达量越高, 说明 *DREB* 类转录因子参与植物应对多种非生物胁迫过程。

5 展望

目前, 已对 *DREB* 转录因子的结构、类型、表达特性、逆境胁迫下的功能进行了大量的研究工作, 为阐明植物抗逆分子机制, 进行农林草抗逆新品种的培育提供理论依据。但是, 依然存在许多问题, 有待进一步研究。

DREB 类转录因子的抗逆性和转录调控的研究大部分还只能依赖于异源表达模式植物拟南芥或者烟草, 跨物种的异源表达在一定程度上会影响试验结果, 导致规律不一致。如果能实现 *DREB* 转录因子同源基因表达, 将对揭示植物抗逆分子机制, 筛选优质农林草资源, 完善 *DREB* 转录因子在木本植物中的调控网络具有十分重要的意义。另外, 对于多年生、体型高大、生命周期长、自身结构复杂、

难以进行遗传转化的木本植物来说,大部分根、茎属多年生,而叶为一年生,还有少部分木本植物的根、茎、叶均为多年生,而大部分草本植物均为一年生,木本和草本植物生命特征和周期截然不同,抗逆机制必然存在差异,且与草本植物相比,木本植物的进化程度更高,分子机制也更为复杂。

转入 DREB 转录因子受体植物不够广泛,所研究的对象主要集中在拟南芥、油菜、甘蓝、蒺藜苜蓿、小立碗藓等植物上,对于大田作物如马铃薯、甜菜、番茄等研究相对较少。如何将植物抗逆基因工程技术有效地应用于田间种植推广,并且被大众普遍接受,还是一个十分漫长的过程。另外,对于一些亲缘关系较远的植物是否有效,还有待深入研究。

植物对胁迫应答的反应是由多基因协同控制的,在整个信号转导网络中,从感知胁迫信号到胁迫应答基因表达都需要各种转录因子与顺式元件间互作与调控才能完成,DREB 转录因子所介导的基因表达调控在植物抵御各种环境胁迫应答中发挥重要功能,然而目前的研究方向主要集中在对 DREB 转录因子家族成员的功能研究上,对其上下游基因的挖掘还有待进一步加强。

总之,对 DREB 转录因子结构、功能以及作用机理研究的逐步深入,为利用 DREB 转录因子改良植物抗逆性的基因工程技术,筛选优质抗逆林木和牧草资源,培育抗逆农林草新品种提供了理论依据。

参考文献

- [1] 苟艳丽,张乐,郭欢,等.植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J].草业科学,2020,37(6):1150-1159.
Gou YL, Zhang L, Guo H, et al. Research progress on the AP2/ERF transcription factor in plants[J]. Pratacultural Sci, 2020, 37(6): 1150-1159.
- [2] 李科友,朱海兰.植物非生物逆境胁迫 DREB/CBF 转录因子的研究进展[J].林业科学,2011,47(1):124-134.
Li KY, Zhu HL. Research progress of DREB/CBF transcription factor in response to abiotic-stresses in plants[J]. Sci Silvae Sin, 2011, 47(1): 124-134.
- [3] 张麒,陈静,李俐,等.植物 AP2/ERF 转录因子家族的研究进展[J].生物技术通报,2018,34(8):1-7.
Zhang Q, Chen J, Li L, et al. Research progress on plant AP2/ERF transcription factor family[J]. Biotechnol Bull, 2018, 34(8):1-7.
- [4] 柏星轩,闫雪,要宇晨,等.DREB/CBF 转录因子在植物非生物胁迫中的作用及研究进展[J].生物学杂志,2017,34(4):88-93.
Bai XX, Yan X, Yao YC, et al. The role and research progress of DREB/CBF transcription factors in plant abiotic stress[J]. J Biol, 2017, 34(4): 88-93.
- [5] Li MY, Xu ZS, Huang Y, et al. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in carrot (*Daucus carota* L.) reveals evolution and expression profiles under abiotic stress[J]. Mol Genet Genom, 2015, 290(6): 2049-2061.
- [6] Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P. APETALA2/Ethylene responsive factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs[J]. New Phytol, 2013, 199(3): 639-649.
- [7] Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, et al. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA[J]. EMBO J, 1998, 17(18): 5484-5496.
- [8] Okamuro JK, Caster B, Villarroel R, et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. PNAS, 1997, 94(13): 7076-7081.
- [9] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(3): 998-1009.
- [10] Amalraj A, Luang S, Kumar MY, et al. Change of function of the wheat stress-responsive transcriptional repressor TaRAP2. 1L by repressor motif modification[J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14(2): 820-832.
- [11] Eini O, Yang N, Pyvovarenko T, et al. Complex regulation by Apetala2 domain-containing transcription factors revealed through analysis of the stress-responsive TdCor410b promoter from durum wheat[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58713.
- [12] Xue GP. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF₁ using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(15): e77.
- [13] Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants[J]. J Exp Bot, 2011, 62(14): 4731-4748.

- [14] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. *Plant Cell*, 1995, 7 (2): 173-182.
- [15] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140 (2): 411-432.
- [16] Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127 (3): 910-917.
- [17] Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25 (12): 1263-1274.
- [18] Xiong Y, Fei SZ. Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Planta*, 2006, 224 (4): 878-888.
- [19] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. 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* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10 (8): 1391-1406.
- [20] Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J*, 1998, 16 (4): 433-442.
- [21] Fowler S, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway [J]. *Plant Cell*, 2002, 14 (8): 1675-1690.
- [22] Haake V, Cook D, Riechmann JL, et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130 (2): 639-648.
- [23] Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, et al. Dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor [J]. *Plant J*, 2004, 37 (5): 720-729.
- [24] Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes [J]. *Mol Genet Genom*, 2010, 283 (2): 185-196.
- [25] 祝娟娟. 桑树 DREB 基因家族生物信息学分析及功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- Zhu JJ. Bioinformatics analysis and functional study of DREB genes from *Morus* spp [D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [26] Wilson K, Long D, Swinburne J, et al. A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2 [J]. *Plant Cell*, 1996, 8 (4): 659-671.
- [27] Song X, Li Y, Hou X. Genome-wide analysis of the AP2/ERF transcription factor superfamily in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 573.
- [28] Liu Z, Kong L, Zhang M, et al. Genome-wide identification, phylogeny, evolution and expression patterns of AP2/ERF genes and cytokinin response factors in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e83444.
- [29] 邵文靖, 敖特根白音, 郎明林. AP2/ERF 转录因子对植物非生物胁迫的应答机制研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18 (15): 4981-4988.
- Shao WJ, Ao T, Lang ML. Research advances on the mechanism of AP2/ERF transcriptional factors in response to abiotic stresses in plants [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, 18 (15): 4981-4988.
- [30] Charfeddine M, Saïdi MN, Charfeddine S, et al. Genome-wide analysis and expression profiling of the ERF transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Mol Biotechnol*, 2015, 57 (4): 348-358.
- [31] Sharma MK, Kumar R, Solanke AU, et al. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284 (6): 455-475.
- [32] Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, et al. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52 (2): 344-360.
- [33] Zhuang J, Deng DX, Yao QH, et al. Discovery, phylogeny and expression patterns of AP2-like genes in maize [J]. *Plant Growth Regul*, 2010, 62 (1): 51-58.
- [34] Zhuang J, Chen JM, Yao QH, et al. Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38 (2): 745-753.
- [35] Zhuang J, Anyia A, Vidmar J, et al. Discovery and expression

- assessment of the AP2-like genes in *Hordeum vulgare* [J]. Acta Physiol Plant, 2011, 33 (5): 1639-1649.
- [36] Huang Z, Zhong XJ, He J, et al. Identification and characterization of AP2/ERF transcription factors in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. Mol Biol : Mosk, 2016, 50 (5): 785-796.
- [37] Chen L, Han J, Deng X, et al. Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon* [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21623.
- [38] Yan HW, Hong L, Zhou YQ, et al. A genome-wide analysis of the ERF gene family in *Sorghum* [J]. Genet Mol Res, 2013, 12 (2): 2038-2055.
- [39] Agarwal G, Garg V, Kudapa H, et al. Genome-wide dissection of AP2/ERF and HSP90 gene families in five legumes and expression profiles in chickpea and pigeonpea [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14 (7): 1563-1577.
- [40] Song X, Wang J, Ma X, et al. Origination, expansion, evolutionary trajectory, and expression bias of AP2/ERF superfamily in *Brassica napus* [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1186.
- [41] Thamilarasan SK, Park JI, Jung HJ, et al. Genome-wide analysis of the distribution of AP2/ERF transcription factors reveals duplication and CBFs genes elucidate their potential function in *Brassica oleracea* [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 422.
- [42] Zhuang J, Cai B, Peng RH, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371 (3): 468-474.
- [43] Zhang J, Shi SZ, Jiang Y, et al. Genome-wide investigation of the AP2/ERF superfamily and their expression under salt stress in Chinese willow (*Salix matsudana*) [J]. PeerJ, 2021, 9: e11076.
- [44] Xu W, Li F, Ling L, et al. Genome-wide survey and expression profiles of the AP2/ERF family in *Castor bean* (*Ricinus communis* L.) [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 785.
- [45] Zhang H, Pan X, Liu S, et al. Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors in pineapple reveals functional divergence during flowering induction mediated by ethylene and floral organ development [J]. Genomics, 2021, 113 (2): 474-489.
- [46] Zhuang J, Peng RH, Cheng ZM, et al. Genome-wide analysis of the putative AP2/ERF family genes in *Vitis vinifera* [J]. Sci Hortic, 2009, 123 (1): 73-81.
- [47] Sun ZM, Zhou ML, Xiao XG, et al. Genome-wide analysis of AP2/ERF family genes from *Lotus corniculatus* shows LcERF054 enhances salt tolerance [J]. Funct Integr Genomics, 2014, 14 (3): 453-466.
- [48] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes Dev, 2003, 17 (8): 1043-1054.
- [49] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Cold stress regulation of gene expression in plants [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12 (10): 444-451.
- [50] Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (49): 37636-37645.
- [51] Shi Y, Ding Y, Yang S. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation [J]. Trends Plant Sci, 2018, 23 (7): 623-637.
- [52] Ding YL, Jia YX, Shi YT, et al. OST 1-mediated BTF 3L phosphorylation positively regulates CBFs during plant cold responses [J]. EMBO J, 2018, 37 (8): e98228.
- [53] Liu Z, Jia Y, Ding Y, et al. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response [J]. Mol Cell, 2017, 66 (1): 117-128. e5.
- [54] Wang X, Ding Y, Li Z, et al. PUB25 and PUB26 promote plant freezing tolerance by degrading the cold signaling negative regulator MYB15 [J]. Dev Cell, 2019, 51 (2): 222-235. e5.
- [55] Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [J]. Plant Cell, 2001, 13 (1): 61-72.
- [56] 刘坤, 王光霞, 王瑞刚, 等. 中间锦鸡儿 *CiDREB1C* 基因增强转基因拟南芥抵抗非生物胁迫的能力 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26 (10): 1688-1697.
- Liu K, Wang GX, Wang RG, et al. *CiDREB1C* gene from *Caragana intermedia* enhances abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. J Agric Biotechnol, 2018, 26 (10): 1688-1697.
- [57] Zhang ZY, Yang Q, Zhang CL, et al. A *CkDREB1* gene isolated from *Caragana korshinskii* Kom. enhances *Arabidopsis* drought and cold tolerance [J]. Braz J Bot, 2019, 42 (1): 97-105.
- [58] Medina J, Bagues M, Terol J, et al. 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 [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119 (2): 463-470.
- [59] Zhao C, Zhang Z, Xie S, et al. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2016, 171 (4): 2744-2759.
- [60] Jia Y, Ding Y, Shi Y, et al. The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2016, 212 (2): 345-353.
- [61] Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, et al. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *PNAS*, 2004, 101 (11): 3985-3990.
- [62] Novillo F, Medina J, Salinas J. *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon [J]. *PNAS*, 2007, 104 (52): 21002-21007.
- [63] Hua J. Defining roles of tandemly arrayed CBF genes in freezing tolerance with new genome editing tools [J]. *New Phytol*, 2016, 212 (2): 301-302.
- [64] Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (5): 1292-1309.
- [65] Agarwal P, Agarwal PK, Nair S, et al. Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity [J]. *Mol Genet Genom*, 2007, 277 (2): 189-198.
- [66] Chen J, Xia X, Yin W. Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378 (3): 483-487.
- [67] Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, et al. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat [J]. *Genes Genet Syst*, 2006, 81 (2): 77-91.
- [68] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, et al. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L [J]. *Plant J*, 2007, 50 (1): 54-69.
- [69] 秦红霞, 贾志平, 张海超, 等. 银新杨中与 DRE 元件结合的转录因子的克隆及鉴定分析 [J]. *生物工程学报*, 2005, 21 (6): 906-910.
- Qin HX, Jia ZP, Zhang HC, et al. Isolation and Characterization of a DRE-binding Transcription Factor from Yinxin Poplar (*Populus alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*) [J]. *Chin J Biotechnol*, 2005, 21 (6): 906-910.
- [70] 谢永丽, 王自章, 刘强, 等. 草坪草狗牙根中抗逆基因 *BeDREB* 的克隆及功能鉴定 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21 (4): 521-527.
- Xie YL, Wang ZZ, Liu Q, et al. Cloning and functional identification of stress-resistant *BeDREB* genes from *Bermuda* grass [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2005, 21 (4): 521-527.
- [71] Sun S, Yu JP, Chen F, et al. Tiny, a Dehydration-responsive element (dre)-binding protein-like transcription factor connecting the dre- and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (10): 6261-6271.
- [72] Chen M, Wang QY, Cheng XG, et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353 (2): 299-305.
- [73] Chen M, Xu Z, Xia L, et al. Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60 (1): 121-135.
- [74] Figueroa-Yañez L, Pereira-Santana A, Arroyo-Herrera A, et al. RAP2. 4a is transported through the phloem to regulate cold and heat tolerance in *Papaya* tree (*Carica papaya* cv. *maradol*): implications for protection against abiotic stress [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (10): e0165030.
- [75] Qin F, Sakuma Y, Tran LS, et al. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression [J]. *Plant Cell*, 2008, 20 (6): 1693-1707.
- [76] Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis [J]. *Science*, 1986, 234 (4774): 364-368.
- [77] Zhou ML, Ma JT, Pang JF, et al. Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription

- factors [J] . Afr. J. Biotechnol, 2010, 9 (54) : 9255-9269.
- [78] Salmerón A, Janzen J, Soneji Y, et al. Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the IkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis [J] . J Biol Chem, 2001, 276 (25) : 22215-22222.
- [79] Agarwal PK, Gupta K, Lopato S, et al. Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance [J] . J Exp Bot, 2017, 68 (9) : 2135-2148.
- [80] Morimoto K, Ohama N, Kidokoro S, et al. BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis* [J] . PNAS, 2017, 114 (40) : E8528-E8536.
- [81] Kudo M, Kidokoro S, Yoshida T, et al. Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants [J] . Plant Biotechnol J, 2017, 15 (4) : 458-471.
- [82] Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, et al. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression [J] . Plant J, 2015, 81 (3) : 505-518.
- [83] Engels C, Fuganti-Pagliarini R, Marin SRR, et al. Introduction of the *rd29A : AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration [J] . Genet Mol Biol, 2013, 36 (4) : 556-565.
- [84] Mizoi J, Ohori T, Moriwaki T, et al. GmDREB2A ; 2, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression [J] . Plant Physiol, 2013, 161 (1) : 346-361.
- [85] Reis RR, da Cunha BA, Martins PK, et al. Induced over-expression of *AtDREB2A* CA improves drought tolerance in sugarcane [J] . Plant Sci, 2014, 221/222 : 59-68.
- [86] Souza WR, Oliveira NG, Vinecky F, et al. Field evaluation of *AtDREB2A* CA overexpressing sugarcane for drought tolerance [J] . J Agro Crop Sci, 2019, 205 (6) : 545-553.
- [87] Schmidt R, Mieulet D, Hubberten HM, et al. Salt-responsive ERF1 regulates reactive oxygen species-dependent signaling during the initial response to salt stress in rice [J] . Plant Cell, 2013, 25 (6) : 2115-2131.
- [88] Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression [J] . Plant J, 2003, 33 (4) : 751-763.
- [89] Gutha LR, Reddy AR. Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance [J] . Plant Mol Biol, 2008, 68 (6) : 533-555.
- [90] Wei T, Deng K, Zhang Q, et al. Modulating *AtDREB1C* expression improves drought tolerance in *Salvia miltiorrhiza* [J] . Front Plant Sci, 2017, 8 : 52.
- [91] An D, Ma Q, Wang H, et al. Cassava C-repeat binding factor 1 gene responds to low temperature and enhances cold tolerance when overexpressed in *Arabidopsis* and cassava [J] . Plant Mol Biol, 2017, 94 (1/2) : 109-124.
- [92] Bouaziz D, Pirrello J, Ben Amor H, et al. Ectopic expression of dehydration responsive element binding proteins (StDREB2) confers higher tolerance to salt stress in potato [J] . Plant Physiol Biochem, 2012, 60 : 98-108.
- [93] Bouaziz D, Pirrello J, Charfeddine M, et al. Overexpression of StDREB1 transcription factor increases tolerance to salt in transgenic potato plants [J] . Mol Biotechnol, 2013, 54 (3) : 803-817.
- [94] Huang B, Liu JY. Cloning and functional analysis of the novel gene *GhDBP3* encoding a DRE-binding transcription factor from *Gossypium hirsutum* [J] . Biochim et Biophys Acta BBA Gene Struct Expr, 2006, 1759 (6) : 263-269.
- [95] Liang YQ, Li XS, Yang RR, et al. BaDBL1, a unique DREB gene from desiccation tolerant moss *Bryum argenteum*, confers osmotic and salt stress tolerances in transgenic *Arabidopsis* [J] . Plant Sci, 2021, 313 : 111047.
- [96] Liang Y, Li X, Zhang D, et al. ScDREB8, a novel A-5 type of DREB gene in the desert moss *Syntrichia caninervis*, confers salt tolerance to *Arabidopsis* [J] . Plant Physiol Biochem, 2017, 120 : 242-251.
- [97] Li XS, Liang YQ, Gao B, et al. ScDREB10, an A-5c type of DREB gene of the desert moss *Syntrichia caninervis*, confers osmotic and salt tolerances to *Arabidopsis* [J] . Genes, 2019, 10 (2) : 146.
- [98] Chen JR, Lü JJ, Wang TX, et al. Activation of a DRE-binding transcription factor from *Medicago truncatula* by deleting a Ser/Thr-

- rich region [J]. *Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2009, 45 (1) : 1-11.
- [99] Lim CJ, Hwang JE, Chen H, et al. Over-expression of the *Arabidopsis* DRE/CRT-binding transcription factor DREB2C enhances thermotolerance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362 (2) : 431-436.
- [100] Singh S, Chopperla R, Shingote P, et al. Overexpression of *EcDREB2A* transcription factor from finger millet in tobacco enhances tolerance to heat stress through ROS scavenging [J]. *J Biotechnol*, 2021, 336 : 10-24.
- [101] Mao L, Deng M, Jiang S, et al. Characterization of the DREBA4-type transcription factor (SIDREBA4), which contributes to heat tolerance in tomatoes [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11 : 554520.
- [102] Du X, Li W, Sheng L, et al. Over-expression of *Chrysanthemum* *CmDREB6* enhanced tolerance of *Chrysanthemum* to heat stress [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18 (1) : 178.
- [103] Zhang Z, Li W, Gao X, et al. DEAR4, a member of DREB/CBF family, positively regulates leaf senescence and response to multiple stressors in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11 : 367.
- [104] Liu XQ, Liu CY, Guo Q, et al. Mulberry transcription factor MnDREB4A confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12) : e0145619.
- [105] Sharabi-Schwager M, Lers A, Samach A, et al. Overexpression of the CBF2 transcriptional activator in *Arabidopsis* delays leaf senescence and extends plant longevity [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61 (1) : 261-273.
- [106] Porat R, Sharabi-Schwager M, Samach A. Overexpression of the CBF₂ transcriptional activator enhances oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* plants [J]. *Int J Biol*, 2011, 3 (2) : 94.
- [107] Zwack PJ, Robinson BR, Risley MG, et al. Cytokinin response factor 6 negatively regulates leaf senescence and is induced in response to cytokinin and numerous abiotic stresses [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54 (6) : 971-981.
- [108] Ban Q, Liu G, Wang Y. A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168 (5) : 449-458.
- [109] 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) [J]. *Planta*, 2005, 220 (6) : 875-888.
- [110] Du HW, Huang M, Zhang ZX, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in maize waterlogging stress response [J]. *Euphytica*, 2014, 198 (1) : 115-126.

(责任编辑 李楠)