

转录激活因子 *CBF* 基因在植物抗冷分子机制中的作用

张丽丽, 李景富, 王傲雪*

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 综述了转录激活因子 *CBF* 基因的发现过程、调控机制及其在植物抗冷性方面的主要功能, 并对受 *CBF* 基因调控的抗冷机制与受 ABA 调控抗冷信号传导途径的相关性进行了详细阐述。

关键词: *CBF*; 耐低温; 分子机制

中图分类号: S 6Q Q 948.112⁺.2 Q 789 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 05-0765-07

The Role of the Transcription Factor *CBF* Genes in Cold-responsive Molecular Mechanism

ZHANG Lili, LI Jing-fu, and WANG Ao-xue*

(Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract In this paper, the history, the regulation mechanism and key function of the transcription factors CRT/DRE-binding factor (*CBF*) genes in cold response were reviewed. The relationship between cold tolerant regulated by *CBF* and ABA was also discussed.

Key words *CBF*; cold tolerance; molecular mechanism

草本植物因其生活地域和种类的不同具有不同的抗寒能力, 某些植物甚至在 -5°C 至 -30°C 低温下仍可以生活。多数植物通过一段时间的冷驯化, 都会增强其抗冷性。例如小麦通常 -5°C 致死, 经过一段时间的冷驯化, -20°C 仍可以存活。研究植物的抗冷机制具有广泛的应用价值。

自 1980 年开始, 关于植物抗冷性的研究取得了很大进展, 大量文献报道了对植物抗冷机制的探讨, 但是其具体作用机制尚不明确 (Thomashow, 2001)。近年来, 对于植物抗冷机制有了更加深入的研究, 主要集中在受 *CBF* 基因调控的抗冷机制, 以拟南芥作为研究模型, 其分子调控模式已经大致阐明。

受 *CBF* (CRT/DRE-binding factor) 基因诱导的植物抗冷机制的主要途径为: 当植物受低温驯化后, ICE (Inducer of *CBF* Expression) 转录因子被激活, 与位于 *CBF* 基因上游启动子中的 ICE 盒相结合, 诱导 *CBF* 基因表达, 而后 *CBF* 基因表达产物与下游一系列 *COR* (cold-regulated gene) 基因启动子中的 CRT/DRE (C-repeat binding factor/dehydration-responsive element binding protein) 元件结合, 诱导系列抗冷基因表达, 从而提高植物抗冷性 (Jagb-Ottensen et al., 2001)。*CBF/DREB1* 基因是在植物冷驯化中重要的转录因子 (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2006)。

除此之外, 通过 ABA 调节的抗冷信号传导途径也已经得到了广泛地研究。植物生长调节激素 ABA 对许多外界环境会做出响应, 包括低温和干旱。在外界环境的胁迫下, 植物细胞 ABA 大量积累能够引发一系列生理特征的改变, 以适应外界干旱或低温等环境, 例如气孔关闭, 植物停止生长, 甚

收稿日期: 2008-01-02 修回日期: 2008-04-10

基金项目: 黑龙江省教育厅海外学人项目; 黑龙江省科技厅科技攻关项目 (GA06B103-1); 东北农业大学科技创新团队基金项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangaoxu@yahoo.com)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

至调节一些特殊基因的表达。而这些基因表达的改变不仅受 ABA 的诱导,同时也直接或间接单独受低温或干旱的诱导 (Leung & Giraudat, 1998)。

1 CBF 基因诱导的植物抗冷性

1.1 CBF 基因家族

CBF 基因家族主要包括 4 个成员, CBF1、CBF2、CBF3、CBF4。Stocking 等 (1997) 利用低温诱导表达的基因 *COR15A* 和 *COR78/RD29A* 基因启动子的 CRT/DRE 顺式作用元件和酵母单杂交法,首次克隆出能与 CRT/DRE 结合的转录因子,并命名为 CBF1。

Gilmour 等 (1998) 利用 CBF1 编码框的核苷酸序列做探针,筛选低温处理的拟南芥 cDNA 文库,克隆出 CBF1 的同源序列 CBF2 和 CBF3。且 CBF2、CBF3 与 CBF1 核苷酸序列具有较高的同源性, CBF2 与 CBF1 同源性达 81%, CBF3 与 CBF1 同源性达 84%, 5' 区域也有中等程度的相似性。CBF1、CBF2、CBF3 经 DNA 序列分析证明, 3 种 CBF 基因的读码框中均不含内含子, 启动子中都含有核心序列 CANNTG。3 种 CBF 蛋白均具有同一种 DNA 结构域, 即 AP2 基元, 在许多植物中该结构域是保守的 (Stocking et al., 1997; Medina et al., 1999)。

来自拟南芥、油菜、小麦、黑麦和番茄的 CBF 蛋白都含有两段短多肽序列, 即 PKK/RP-AGR_xKFxETRHP 序列, 直接位于 AP2 DNA 结合域的上游, 可能与蛋白质运输相关; DSAWR 序列位于 AP2 DNA 结合域的下游 (Jaglo-Ottosen et al., 2001)。CBF 基因家族按 CBF1-CBF3-CBF2 同向排列于拟南芥第 4 号染色体短臂上 (Liu et al., 1998)。根据核苷酸和氨基酸序列的高度同源性, 在染色体上的紧密连锁性, 且转录方向相等等, 推测 CBF1、CBF2、CBF3 基因具有共同的起源, 可能是一个祖先基因连续重复 2 次, 通过突变或群体选择演变而成 (Gilmour et al., 1998; Medina et al., 1999)。

CBF/DREB1 蛋白属于 DNA 结合蛋白 AP2/ERF 家族, 这个家族都含有 AP2 DNA 基序。(Badawi et al., 2007)。拟南芥 122 个 ERF 家族成员都含有一个 AP2DNA 基序, 并分成 12 组, 其中几组被分成了亚组 (Nakano et al., 2006)。拟南芥的 6 种 CBF/DREB1 蛋白隶属于第 ④c 亚组, 是 5 个第 ④亚组之一。含有 AP2 DNA 结合域的氨基酸保守序列 (CM ④4) 将 CBF 蛋白与其他第 ④组成员区别开。在 CBF 蛋白中发现的其他的基序 (CM ④1, CM ④2 和 CM ④4) 也存在于一个或多个第 ④亚组, 亚组之间分子功能是保守的 (Badawi et al., 2007)。

Novillo 等 (2004) 的研究表明, CBF2 与 CBF1、CBF3 的功能不完全相同, 且在拟南芥抗冷性中起主要作用。尤其是经冷驯化后的拟南芥 CBF2 突变体, 除了抗冷性提高外, 其耐旱性和耐盐性均强于野生植株。该研究采用拟南芥 CBF2 突变体与野生植株进行对比, 发现未经冷驯化和经冷驯化的 CBF2 突变体的抗冷性均强于相应的野生植株。冷驯化前后, CBF2 突变体和野生植株的抗冷性增强一致。事实上, 以未经冷驯化的突变体和野生植株进行对照, 发现 CBF2 突变体和野生植株分别在 -5.7℃ 和 -4.8℃ 引起 50% 的死亡率。而冷驯化的 CBF2 突变体和野生植株, 分别在 -10.9℃ 和 -9.4℃ 引起 50% 的死亡率。这个结果表明, CBF2/DREB1C 在拟南芥抗冷性中起着负调控作用 (Novillo et al., 2004)。

在转基因拟南芥中过量表达 CBF1/DREB1B 和 CBF3/DREB1A, 能够诱导一系列抗性基因的表达, 从而提高植株的耐冷性、耐旱性、耐盐性。然而, 将拟南芥 CBF2 突变体和野生植株进行对照, 无论在低温、干旱还是高盐条件下, 拟南芥 CBF2 突变体的 CBF1 和 CBF3 的表达水平均高于野生植株, 说明 CBF2 调控 CBF1 和 CBF3 的表达。同样证明了在野生植株中, CBF2 同样负调控 CBF1 和 CBF3 的表达 (Novillo et al., 2004)。

CBF4 是 CBF 基因家族中的第 4 个成员, 位于第 5 号染色体。在拟南芥中超表达能引起 COR 基

因和 *RD* (response to dehydration) 基因的活化, 能被干旱和 ABA 所诱导, 但不被低温诱导, 可是转基因植物却如转 *CBF* 1 一样, 抗冷性显著提高, 证明干旱和 ABA 诱导的基因表达与低温诱导的基因表达有相关性 (Haake et al., 2002)。CBF4 蛋白由 224 个氨基酸组成, 与其他 CBF 蛋白有 63% 的同源性。在 AP2/ERF DNA 结合区域中则有 91% ~ 94% 的同源性 (Haake et al., 2002)。

1.2 低温诱导的 *CBF* 基因表达

冷胁迫能够影响植物 RNA 和 DNA 的二级结构, 影响其正常转录、翻译而导致生理功能异常。在一定程度冷胁迫下, 植物能够通过不同机制维持抗冷基因的高效表达和翻译产物的转运。Guy 等 (1985) 提出了关于植物抗冷基因表达机制的假设。假设认为低温能够诱导植物系列抗冷基因的表达, 这些基因功能的鉴定有利于更加深入的研究植物抗冷机制, 这在植物抗冷性研究中开辟了新的领域。Guy 等 (1985) 首次报道了菠菜在冷驯化过程中基因表达会发生改变, 并且发现了在冷驯化中起关键作用的 CRT/DRE 结合因子家族。通过对拟南芥冷调控基因表达的研究, 发现了转录激活因子 CBF/DREB1 蛋白, 并且确定 CBF/DREB1 蛋白在植物抗冷机制中起关键作用。CBF 虽然能被低温诱导, 但启动子中并不含有 CRT/DRE 顺式作用元件, 即 CCGAC 序列, 而是含有其相反序列 CAGCC (Gilmour et al., 1998; Medina et al., 1999)。进一步分析表明, Myc 蛋白的识别序列 CANNTG 也存在于 CBF 基因启动子中 (Blackwell et al., 1993; Liu et al., 1998)。值得注意的是, CBF 基因启动子中存在一个重复序列 ACAATTANNACAATTT, 每个基因只有 1 个这样的重复序列, 并且位置基本相同, 这意味着它极有可能是起作用的启动子序列 (Gilmour et al., 1998)。

Yamaguchi 等 (1992) 采用示差筛选法, 证明植物体内存在一条不依赖 ABA 的逆境胁迫途径, 许多植物在抗冷性上属于这种途径。并鉴定出由 9 bp (TACCGACAT) 组成的干旱应答 DRE 元件 (Yamaguchi & Shinozaki, 1994)。同时, Baker 等 (1994) 从拟南芥低温应答基因 *COR15a* 的启动子鉴定出与 DRE 极为相似的序列 TGGCCGAC, 命名为 CRT 元件, CRT/DRE 元件位于 *COR* 基因启动子中, 植物冷诱导后, CBF 基因表达产物便与 CRT/DRE 元件相结合, 激活 *COR* 基因表达。

Thomashow (2001) 从拟南芥中分离鉴定了 4 个抗冷 *COR* 基因分别是 *COR6.6*、*COR15a*、*COR47* 和 *COR78* (Hajela et al., 1990; Lin & Thomashow, 1992)。启动子分析表明, 这些 *COR* 基因中含有共同的核心序列 CCGAC, 称为 CRT 或 DRE, 并认为此序列为寒冷和干旱的顺式调控元件, 能够对寒冷和干旱做出响应, 随后 CBF/DREB1 基因得到分离。迄今为止, 另外 2 个 *COR* 基因已经被鉴定, 分别是 *KIN1* 和 *ERD10* (Jaglo-Ötösén et al., 1998; Kasuga et al., 1999)。虽然编码的蛋白质不同, 但这些蛋白质都具有极强的亲水性和热稳定性, 并能提高植物的抗冷性。*COR* 基因编码的多肽具有两性 α 螺旋结构域, 在低温诱导下使得磷脂双分子层向内弯曲, 来抵抗低温引起细胞脱水造成的膜损伤。

CBF 转录因子的基本功能就是使植物细胞耐低温和脱水相关基因表达。*COR15a* 的作用模式已经被完全鉴定, *COR15a* 编码与叶绿体间隔基质相关的蛋白质, 没有经冷驯化的拟南芥在 1~2 °C 时, 过量表达 *COR15a* 能够提高叶绿体的抗冷性, 因为 *COR15a* 编码的成熟多肽 *COR15am* 在低温诱导下, 能够形成六边形多肽 C_6 。Steponkus 等 (1993) 发现, 在 -4~ -8 °C 低温下所造成的膜系统伤害主要是由于形成了六角形 C_6 相脂, 因此推断 *COR15a* 基因的表达可减少膜遇冷时所产生的由脂双层向六角形 C_6 相转变的发生率, 但对“膨胀诱发的细胞破裂”很少或几乎没有作用, 由此能够防止低温引起的细胞脱水 (Urmata et al., 1992; Steponkus et al., 1993)。在拟南芥中, CBF/DREB 基因表达产物通过与 CRT/DRE 元件的特异性结合, 能够调节 *COR15a*、*COR6.6*、*COR47* 和 *COR78* 等近 40 个低温响应基因的协同表达 (Fowler & Thomashow, 2002), 产生一系列生理生化反应, 如可溶性糖积累、脯氨酸合成增加 (Gilmour et al., 2000), 这些变化可能与提高拟南芥的抗冷性并稳定细胞膜有关。

CBF 转录激活因子与 CRT/DRE 调控元件特异性结合, 激活启动子中目的基因表达, 这是 CBF 转录

激活因子的最主要的功能。

1.3 植物抗冷机制中调控 CBF 因子的相关基因

CBF 基因本身是冷诱导的, CBF 基因的上游调控对 CBF 基因的表达及其抗冷性至关重要, 相关作用因子也比较多, 如: ICE1 (inducer of CBF expression1)、HOS1 (high expression of osmotic stress-regulated gene expression1) 和 CAX1 (cation exchanger1) 等均能调控 CBF 基因的表达。这些调控因子既有正调控也有负调控, 相互协调共同维持 CBF 基因诱导抗冷途径的畅通。

1.3.1 ICE 基因

Gilmour等 (1998) 提出一种模型: 正常温度下, 植物体内存在一种转录因子, 该转录因子能够识别 CBF 启动子, 并在低温下被激活。他们将此推测的转录因子命名为 ICE, ICE是一个上游调控因子。Chinnusamy等 (2003) 已经从拟南芥中得到 ICE1 基因序列, 并且连上 CaMV35S 启动子转入拟南芥, 获得了含 ICE1 的转基因拟南芥植株, 通过低温检测证实转基因拟南芥植株的抗冷性有很大的提高 (Kiegl et al., 2000)。ICE 基因是在低温时诱导 CBF 基因家族表达的转录激活因子, 它能够识别 3 种 CBF 基因启动子中的冷调控元件 ICE 盒。植物在正常温度下, ICE 处于一种不被激活状态。当植物经低温处理后, ICE 被激活, 从而使 ICE 基因转录产物与 CBF 基因启动子中相关顺式元件 ICE 盒相结合, 诱导 CBF 基因的表达。拟南芥 ICE1 结合到 CBF3 基因启动子上的 MYC 识别序列, ICE1 是这个级联反应的一个上游因子。值得注意的是, 在 ICE1 显性失活的拟南芥突变体中发现, 在低温驯化过程中 CBF3 的表达受到抑制, 而 CBF2 的表达则没有受到影响。由此推测 ICE 可能在低温诱导 CBF2 表达中的作用不大 (Zarka et al., 2003)。这说明, 在 CBFs 基因家族中存在着表达机制上的差异, 而这差异主要存在于 CBFs 基因家族的启动子中。Zarka等 (2003) 利用基因融合实验把 CBF2 启动子分为两个部分: 第 1 部分是 -189~-65 共 125 bp 片段, 它是低温敏感所必需的; 第 2 部分是其他启动子剩余部分。而且在必需片段中, 起关键作用的是边缘的两个小片段, 称为 CBF 表达诱导区域 1 和 2 (ICEr1/ICEr2)。Thomashow (2001) 为了鉴定 ICEr1、ICEr2 在冷诱导下对 CBF2 转录的影响, 设计了一段与冷响应基因表达相关的 125 bp 的片段, 在这个片段中包含两个区域: ICEr1、ICEr2。这两个区域单独存在时表达很微弱, 但当两个区域相结合时, 便会提高对冷诱导的响应。在 ICEr2 序列中, 其转录位点尚不明确, 但已确定 ICEr1 序列中含 CACATG 序列, 其中包含 H1H 蛋白的识别位点——CANNTG (Zarka et al., 2003)。

Chinnusamy等 (2003) 研究还发现, ICE1 在低温、高盐和 ABA 轻微诱导下各组织中都表达, 不受干旱诱导, 但是 ICE1 需要低温信号激活。正常条件下, 在超表达 ICE1 的拟南芥中, CBFs 基因及下游 CRT/DRE 元件均不表达; 低温处理后, CBFs 及下游 RD29A 和 COR15A 的表达量明显上升, 超表达 ICE1 拟南芥的耐冷性也增强。但 ICE1 的作用并不只局限于此, 可能还以某种方式调控其它低温应答基因的表达 (Chinnusamy et al., 2003)。

1.3.2 HOS1 基因

除 ICE 基因外, Lee等 (2001) 还发现其他 CBFs 基因的调控蛋白 HOS1 (high expression of osmotic stress-regulated gene expression 1)。HOS1 是另一个重要的上游调控因子, 在拟南芥中为组成型表达。HOS1 编码环指蛋白, 通常位于细胞质中, 经低温刺激、转移并积累于细胞核, 这种质-核穿梭在冷环境下可能介导一定的冷反应信息, HOS1 可能与 CBFs 的泛素化及降解有关 (Lee et al., 2001)。

Shinwari等 (1998) 筛选分离了一个 hos1-1 突变体, 此突变体可提高 CBF 基因及下游冷应答基因的表达, 如: RD29A、COR49、COR15、KN1 和 ADH。正常植株的这些基因都能被 ABA、高盐和低温诱导, 但该突变体只有低温条件下明显提高这些基因的诱导量, 因此推测 HOS1 是通过负向调控 CBF 从而调控 COR 基因表达的 (Shinwari et al., 1998)。

1.3.3 LOS2 基因

Lee等 (2002) 用 *Prd29: LUCy* 荧光筛选法, 鉴定了一个 *los2* (low expression of osmotically responsive gene 2) 突变体, 在 *los2* 突变体中, 转入的 *Prd29: LUCy* 基因通过冷诱导表达量明显降低。除此之外, *los2* 也降低了 *CORs* 基因的表达, 但 *CBF* 基因的表达却未受影响, 说明 *los2* 是 *CBF* 基因的下游调控因子 (Lee et al., 2002)。LOS2 蛋白能够结合到拟南芥锌指蛋白 (*STZ/ZAT10*) 基因启动子序列中, 转录抑制子 *STZ/ZAT10* (salt-tolerance zinc finger) 能抑制 *RD29A::LUC* 基因的表达, 在野生拟南芥中快速被冷诱导并表达, 这种诱导表达在 *los2* 突变体中显著加强并延长, 说明 LOS2 蛋白对 *STZ/ZAT10* 具有负调控功能。通过图位克隆, 发现 *los2* 基因是烯醇化酶基因。烯醇化酶 (2-磷酸-D-甘油酸脱氢酶) 是普遍存在非常重要的酶, 参与生化代谢的糖酵解途径, 催化由 2-磷酸甘油酸 (2-PGA) 转化为磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)。LOS2 是一个双功能酶基因, 它间接地正调控 *COR* 基因, 提高拟南芥的抗冷性 (Lee et al., 2002)。

2 ABA 途径与 *CBF* 基因诱导的植物抗冷性的关系

ABA 可以激活包括低温诱导信号和传导途径在内的多重细胞信号途径。低温胁迫能够刺激植物细胞内 ABA 水平的增加, 从而诱导相关的下游基因 *RD29A*, *COR15A*, *RAB1b* 等完成低温信号传导。目前对 ABA 的生物合成途径研究已经比较清楚 (Koomneef et al., 1998; Lintenberg et al., 1999; Milbrow, 2001)。一般认为胁迫导致 ABA 水平升高是因为编码 ABA 合成体系中的酶基因受胁迫诱导, 从而激活 ABA 生物合成反应。最近有些研究认为, 参与 ABA 合成的酶可能是通过普遍的 Ca^{2+} 依赖蛋白级联途径诱导 (Xiong et al., 2003)。

植物从最初对逆境信号的感受到最后对基因转录水平的调节要激活多条信号传导通路, 包括钙信号传导通路、ABA 信号传导通路、MAPK 级联信号通路等, 各个信号通路之间相互交叉、相互调控, 共同完成植物对逆境的抵抗或适应, 钙信使是各个信号传递途径中的交叉节点 (cross-talk), 其中研究最多的是 ABA 信号通路和钙信号通路之间相互调控的机制。植物在多种非生物逆境胁迫下都能不同程度地刺激体内 ABA 的合成, 积累 ABA 是植物在逆境胁迫条件下的普遍反应, 它作为胞间信使在植物逆境信号传递中起重要调节作用。

在 ABA 依赖途径中, 多数情况下钙信使也参与逆境信号传递。植物细胞内钙离子调节剂 cADPR 受 ABA 信号诱导, cADPR 通过释放钙库中的钙离子使受 ABA 诱导的 *RD29A/KIN2* 基因表达。Sheen 等 (1996) 证实 CDPK 参与 ABA 依赖的转录激活过程。大量的证据证明, Ca^{2+} 是植物作出冷反应的第 2 信使。在冷刺激下, 拟南芥从细胞外摄取 Ca^{2+} , 增加细胞内 Ca^{2+} 水平, 使植物最大程度的适应冷刺激, 并使受 CRT/DRE 元件调控的基因表达。 Ca^{2+} 的摄入过程以及基因如何表达尚不清楚, 但是在这个过程中包含蛋白质的磷酸化是可以确定的。

大多数植物受低温和干旱胁迫转录调控的应答基因都会受到 ABA 诱导 (Liu et al., 1998)。干旱和低温胁迫下, 植物体内 ABA 含量升高, 做为逆境胁迫信号在提高植物抗逆性中的作用已得到广泛认可。研究显示, ABA 介导一系列相关基因表达, 从受 ABA 诱导表达的基因启动子中, 已鉴定出 ABA 应答元件 ABRE (核心序列: PyACGTGGC)、MYBR (核心序列: PyAACT/GC) 和 MYCR (核心序列: CANNTG)。ABA 介导、识别结合相应元件的转录因子 MYB 和 MYC 也已被克隆出来 (Marcotte et al., 1989; Tardien & Davies, 1992; Davies et al., 1994)。

CBF1, *CBF2*, *CBF3*, *CBF4* 基因不仅受冷诱导, 同时也受 ABA 激素诱导。拟南芥在低温或干旱情况下会产生 ABA, ABA 能够通过 CRT/DRE 元件诱导 *COR* 基因表达, 提高 *CBF1*, *CBF2*, *CBF3*, *CBF4* 的转录水平, 在 ABA 的诱导下, CBF 蛋白的含量迅速增加, 诱导 *COR* 基因表达, 提高植物抗冷性 (Guiltinan et al., 1990)。植物受到冷刺激使 ABA 迅速积累, 但其含量不足以诱导 CRT/DRE 响应元件的表达, 而 *CBF* 基因使 ABA 诱导和冷诱导成为一体, 或许 ABA 能够增强冷刺激对 *CBF* 基因

的诱导, 进而提高植物的抗冷能力。

3 展望

植物抗冷性研究一直是当今国内外研究的热点问题。在我国尤其是北方地区, 冬季时间长, 温度低, 作物的种植期短, 将现代生物技术与传统抗冷育种技术相结合, 了解植物抗冷机制, 提高植物抗冷性, 培育转基因抗冷植物新品种, 进而扩大作物和蔬菜的种植面积, 这对农业生产具有十分重要的意义。

CBF转录激活因子的发现为提高植物抗冷抗旱能力提供了新途径, 为进一步发现植物抗冷机制中的关键基因奠定了理论基础, 在作物和蔬菜品质改良方面有广泛的应用前景和重要的利用价值。随着生物技术、生物化学、遗传学、蛋白组学、植物抗逆基因工程的不断发展, 植物抗冻性研究将得到进一步拓展, 对其抗冷基因的调控机制以及调控过程也会有更加深入地了解。

References

- Badawi M, Danyuk J, Boucho B, Houde M, Sahan F. 2007. The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Mol Genet Genomics* 227 (5): 533–554.
- Baker SS, Wilhelm K S, Thomashow M F. 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.
- Blackwell T K, Huang J M a A, Kretzner L, Alt F W, Eisenman R N, Weintraub H. 1993. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* 13 (9): 5216–5224.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B H, Hong X, Agarwal M, Zhu J K. 2003. *ICE1*: a regulator of cold-induced transcription and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 17 (8): 1043–1054.
- Davies W J, Tardieu F, Trejo C L. 1994. Update on long-distance signaling: How do chemical signals work in plants that grow in drying soil. *Plant Physiol* 104: 309–314.
- Fowler S, Thomashow M F. 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.
- Gilmore S J, Sebolt A M, Salazar M P, Everard J D, Thomashow M F. 2000. Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 124 (4): 1854–1865.
- Gilmore S J, Zarka D G, Stockinger E J. 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.
- Guitinan M J, Marcotte W R, Quatrano R S. 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267–271.
- Guy C L, Nimmick J, Brambl R. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc Natl Acad Sci* 82 (11): 3673–3677.
- Haake V, Cook D, Riechmann J L, Pineda O, Michael E. 2002. Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130 (10): 639–648.
- Hajla R K, Horvath D P, Gilmore S J, Thomashow M F. 1990. Molecular cloning and expression of *COR* (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 93: 1246–1252.
- Jaglo-Ottosen K R, Gilmore S J, Zarka D G, Schabenberger O, Thomashow M F. 1998. *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280 (5360): 104–106.
- Jaglo-Ottosen K R, Kleff S, Amundsen K L, Zhang X, Haake V, Zhang J Z, Deits T, Thomashow M F. 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: 910–917.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yanaguchi K, Shinzaki K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287–291.
- Kieffer S, Gardinale F, Siligan C, Gross Baudouin E, Lwosza A, Ekbf S, Till S, Bogre L, Hirt H, Meskine I. 2000. SMKK, an ibogen-activated protein kinase (MAPK), is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SMK. *Plant Cell* 12: 2247–2258.

- Koomneef M, L on-K bosterziel K M, Schwartz S H, Zeevaart J A D. 1998 The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 36 (1–2): 83–89.
- Lee H, Gong X Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu J K. 2001. The *Arabidopsis* *HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING-finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning. *Gene Dev*, 15 (7): 912–924.
- Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B, Zhu J K. 2002. *LOS2*, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bifunctional enolase. *EMBO J*, 21 (11): 2692–2702.
- Leung J, Gaudat J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 199–222.
- Lin C, Thomashow M F. 1992. A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 183 (3): 1103–1108.
- Liotenberg S, North H, Marion A. 1999. Molecular biology regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem*, 37: 341–350.
- 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.
- Marcotte W R, Russell S H, Quatrano R S. 1989. Abscisic acid-responsive sequences from the *Em* gene of wheat. *Plant Cell*, 1 (10): 969–976.
- Medina J, Bagues M, Terol J, Perez 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.
- Milbourn B V. 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plant: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 52 (359): 1145–1164.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. 2006. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 140: 411–432.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol Plant*, 126 (1): 62–71.
- Novillo F, Jose M, Alonso Joseph R, Ecker, Salinas J. 2004. *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *BF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 11: 3885–3900.
- Sheen J. 1996. Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Sciences*, 274 (5294): 1900–1902.
- Shinwari Z K, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, Yamaguchi K, Shinozaki K. 1998. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 250 (1): 161–170.
- Steponkus P L, Uemura M, Webb M S. 1993. Membrane destabilization during freeze-induced dehydration. *Curr Topics Plant Physiol*, 10: 37–47.
- Stocking E T, Gilmour S T, Thomashow M F. 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. *National Academy Sciences*, 94: 1035–1040.
- Tardieu F, Davies W J. 1992. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiol*, 98 (2): 540–545.
- Thomashow M F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots. *Plant Physiol*, 125 (1): 89–93.
- Umutia M E, Duman J G, Knight C A. 1992. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1121 (1–2): 199–206.
- Xiong L, Karen S, Schumaker, Zhu J K. 2003. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14 (Supplement): 165–183.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K. 1992. Molecular cloning and characterization of cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*, 33 (3): 217–224.
- Yamaguchi-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 D G, Vogel J T, Cook D, Thomashow M F. 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.