

分类号: Q78  
学 号: 20222006048

密 级: 公开  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 转天山雪莲 *SiCBF1/2/3* 基因棉花的耐冷性生理 机制研究

学 位 申 请 人	张佳佳
指 导 教 师	祝建波
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研 究 方 向	生物化学与分子生物学
所 在 学 院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2025年6月

分类号: Q78  
学号: 20222006048

密级: 公开  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 转天山雪莲 *SiCBF1/2/3* 基因棉花的耐冷性生理 机制研究

学位申请人	张佳佳
指导教师	祝建波
申请学位门类级别	理学硕士
学科、专业名称	生物学
研究方向	生物化学与分子生物学
所在学院	生命科学学院

中国·新疆·石河子

2025年6月

**Cold Tolerance Mechanisms in Transgenic Cotton with  
*SiCBF1/2/3* Genes from *Saussurea involucrata***

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Natural Science**

By

**Zhang Jia-jia**

**(Biochemistry and Molecular Biology)**

Dissertation Supervisor: Prof. Zhu Jian-bo

June, 2025

## 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

### 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张传传

时间：2025年5月20日

### 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张传传

时间：2025年5月20日

导师签名：张世明

时间：2025年5月20日

## 摘要

低温胁迫严重制约植物生长发育，CBF 转录因子作为植物抗寒调控核心，通过激活下游冷响应基因 COR 增强植物低温适应性。前期研究表明，天山雪莲 (*Saussurea involucrate*) 作为高寒极端环境适应物种，其 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因在低温胁迫下显著上调，表明 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因参与天山雪莲低温适应过程。因此，探究 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因在不同作物中的逆境适应中的功能，可为利用基因工程技术改良作物的逆境耐受性提供重要的基因资源。

主要方法：(1) 通过生物信息学分析 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因的蛋白结构特征。(2) 构建 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因的植物表达载体，通过农杆菌转化法导入棉花，获得 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因过表达的棉花阳性株系，并结合 qRT-PCR 验证基因表达水平。(3) 对田间种植的转 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因棉花进行主要的农艺性状调查。(4) 利用人工模拟低温胁迫，通过表型观察和相关生理测定，综合评价 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 棉花在冷胁迫下的抗逆功能。

研究结果：(1) 天山雪莲 *SiCBF1* 基因的序列最大开放阅读框 573 bp，编码 187 个氨基酸的亲水性蛋白。*SiCBF2* 基因序列最大开放阅读框 664 bp，编码 217 个氨基酸的亲水性蛋白。*SiCBF3* 基因序列最大开放阅读框 642 bp，编码 213 个氨基酸的亲水性蛋白。克隆到的天山雪莲 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 与拟南芥序列相似性为：37.98%，39.53%，39.92%，与棉花序列相似性为：15.50%，14.73%，18.99%。(2) 成功构建了天山雪莲 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因的过表达载体，并利用农杆菌介导技术将其转入棉花，得到了相应的转基因阳性株系。表达量分析显示：在转基因棉花中，*SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 在转录水平上有显著的表达。(3) 在花铃期，对种植在大田的受体棉花和转基因棉花进行主要田间农艺性状的调查研究，发现转基因株系在单株结铃数、铃重，果枝数等关键指标上与对照组无明显差别，这说明 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因的过量表达并未对植物的正常生长发育造成影响。(4) 在模拟的低温冷胁迫环境下，通过观察表型和分析生理指标，研究发现转基因棉花在低温胁迫下，通过调节渗透保护物质（如脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白）的生物合成与积累，有效地增强了叶绿体结构的稳定性以及组织的保水能力。细胞膜的完整性分析揭示了脂质过氧化产物的累积量减少，膜损伤程度也相应降低。在抗氧化防御系统中，关键的防御酶（包括 SOD、POD、CAT）的活性得到了显著提升，这有助于在低温条件下维持氧化还原平衡，提高自由基的清除效率。

本研究结果表明，过表达天山雪莲 *SiCBF1*、*SiCBF2*、*SiCBF3* 基因能够提高棉花植株耐冷性。

**关键词：***SiCBF1*；*SiCBF2*；*SiCBF3*；棉花；耐冷性

## Abstract

Low-temperature stress severely restricts plant growth and development. CBF transcription factors, as the core of plant cold resistance regulation, enhance plant low-temperature adaptation by activating downstream cold-responsive genes COR. Previous studies have shown that the *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* genes of Tianshan snow lotus (*Saussurea involucrate*), as an alpine extreme environment-adapted species, are significantly up-regulated under low-temperature stress, indicating that *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* genes are involved in low-temperature acclimatization process of Tianshan snow lotus. Therefore, exploring the functions of *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* genes in adversity acclimation in different crops can provide important genetic resources for using genetic engineering technology to improve the adversity tolerance of crops.

Main methods: (1) Analyze the protein structural features of *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* genes by bioinformatics. (2) Constructed plant expression vectors of *SiCBF1*, *SiCBF2*, *SiCBF3* genes, introduced them into cotton by *Agrobacterium* transformation method, obtained cotton positive lines overexpressing *SiCBF1*, *SiCBF2*, *SiCBF3* genes, and verified the gene expression levels by qRT-PCR. (3) Investigate the main agronomic traits of field-grown cotton with transgenic *SiCBF1*, *SiCBF2* and *SiCBF3* genes. (4) Using an artificial simulation of low-temperature stress, we comprehensively evaluated the resistance functions of *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* cotton under cold stress through phenotypic observation and related physiological measurements.

Results: (1) The sequence of *SiCBF1* gene of Tianshan snow lotus had a maximum open reading frame of 573 bp, encoding a hydrophilic protein of 187 amino acids; the sequence of *SiCBF2* gene had a maximum open reading frame of 664 bp, encoding a hydrophilic protein of 217 amino acids; the sequence of *SiCBF3* gene had a maximum open reading frame of 642 bp, encoding a hydrophilic protein of 213 amino acids. The sequence similarity of *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* cloned from Tien Shan snow lotus with *Arabidopsis thaliana* was 37.98%, 39.53% and 39.92%, and with cotton was 15.50%, 14.73% and 18.99%. (2) Overexpression vectors for *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* genes of Tianshan snow lotus were successfully created and transferred into cotton using *Agrobacterium*-mediated technology, and the corresponding transgenic positive lines were obtained. Expression analysis showed that *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* were significantly expressed at the transcript level in transgenic cotton. (3) At the flowering stage, the main field agronomic traits were investigated and studied on the recipient cotton and transgenic cotton planted in the field, and it was found that there was no significant difference between the transgenic lines and the control

group in the number of bolls and boll weight of a single plant, the number of fruiting shoots and other key indexes, which indicated that the overexpression of the *SiCBF1*, *SiCBF2*, *SiCBF3* genes did not have any impact on the normal growth and development of the plants.(4) Under the simulated low-temperature cold stress environment, by observing the phenotypes and analyzing the physiological indexes, it was found that transgenic cotton effectively enhanced the stability of the chloroplast structure as well as the water-holding capacity of the tissues by regulating the biosynthesis and accumulation of osmoprotecting substances (e.g., proline, soluble sugar, and soluble proteins) under the low-temperature stress. Analysis of cell membrane integrity revealed a decrease in the accumulation of lipid peroxidation products and a corresponding reduction in the degree of membrane damage. In the antioxidant defense system, the activities of key defense enzymes (including SOD, POD, and CAT) were significantly enhanced, which helped to maintain the redox balance and improve the scavenging efficiency of free radicals under low-temperature conditions.

The results of this study indicated that overexpression of *SiCBF1*, *SiCBF2*, and *SiCBF3* genes from Tien Shan Snow Lotus was able to improve the cold tolerance of cotton plants.

**Key words:** *SiCBF1*; *SiCBF2*; *SiCBF3*; *Gossypium hirsutum*; cold tolerance

# 目录

摘要.....	I
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
目录.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 低温胁迫对植物的影响.....	1
1.1.1 低温胁迫对植物生长发育的影响.....	2
1.1.2 低温胁迫对植物生理生化的影响.....	2
1.2 植物 CBF 转录因子研究概述.....	4
1.2.1 CBF 转录因子的发现.....	4
1.2.2 CBF 转录因子的结构与功能特征.....	4
1.2.3 CBF 转录因子的调控机制.....	5
1.2.4 CBF 转录因子的表达及在植物耐冷中的作用.....	6
1.3 研究目的及意义.....	8
1.4 技术路线.....	9
第 2 章 <i>SiCBF1</i> 、 <i>SiCBF2</i> 、 <i>SiCBF3</i> 基因生物信息学分析.....	10
2.1 材料与方法.....	10
2.2 结果与分析.....	10
2.2.1 基因的一级结构分析及理化性质分析.....	10
2.2.2 基因的二级结构分析.....	11
2.2.3 基因的三级结构预测.....	14
2.2.4 基因功能结构域预测.....	14
2.2.5 基因跨膜结构预测.....	15
2.2.6 基因信号肽预测.....	16
2.2.7 基因编码蛋白的磷酸化位点分析.....	16
2.2.8 基因的疏水性分析.....	18
2.2.9 基因系统发育分析.....	20
2.3 讨论.....	20
2.4 小结.....	22
第 3 章 <i>SiCBF1</i> 、 <i>SiCBF2</i> 、 <i>SiCBF3</i> 基因克隆及在棉花中的遗传转化.....	23

3.1 试验材料.....	23
3.1.1 植物材料.....	23
3.1.2 载体质粒与菌种.....	23
3.1.3 试验试剂.....	23
3.1.4 试验仪器.....	23
3.1.5 培养基.....	24
3.2 实验方法.....	24
3.2.1 目的基因克隆.....	24
3.2.2 克隆载体构建.....	24
3.2.3 表达载体构建.....	27
3.2.4 农杆菌转化.....	28
3.2.5 棉花外植体准备.....	29
3.2.6 棉花外植体的侵染与转化.....	29
3.2.7 转基因棉花的获得.....	30
3.2.8 转基因棉花的检测.....	30
3.3 结果分析.....	32
3.3.1 目的基因的克隆及过表达载体的构建.....	32
3.3.2 棉花的遗传转化过程.....	35
3.3.3 转基因棉花鉴定及表型分析.....	35
3.3.4 转基因棉花表达分析.....	37
3.4 讨论.....	37
3.5 小结.....	38
第4章 天山雪莲 <i>SiCBF1</i> 、 <i>SiCBF2</i> 、 <i>SiCBF3</i> 基因功能验证.....	39
4.1 试验材料.....	39
4.2 试验方法.....	39
4.2.1 材料处理.....	39
4.2.2 田间农艺性状调查.....	39
4.2.3 相对电导率测定.....	40
4.2.4 相对含水量测定.....	40
4.2.5 叶绿素测定.....	40
4.2.6 丙二醛含量测定.....	40
4.2.7 脯氨酸含量测定.....	41
4.2.8 可溶性糖含量的测定.....	41

4.2.9 可溶性蛋白含量测定 .....	42
4.2.10 抗氧化物酶活性测定 .....	43
4.3 试验结果 .....	44
4.3.1 <i>SiCBF1</i> 耐冷性结果分析 .....	44
4.3.2 <i>SiCBF2</i> 耐冷性结果分析 .....	50
4.3.3 <i>SiCBF3</i> 耐冷性结果分析 .....	55
4.4 讨论 .....	61
4.5 小结 .....	62
第 5 章 结论与展望 .....	63
5.1 结论 .....	63
5.2 展望 .....	63
参考文献 .....	64
致谢 .....	73

## 第1章 绪论

在植物的生长发育过程中，极端气候频繁发生，而低温胁迫往往给植物带来严峻的生存考验<sup>[1]</sup>。处于极端低温环境下，植物体内会引发一系列显著的生理以及分子层面变化，进而影响植物的正常生长与代谢<sup>[2-4]</sup>。特别是对于植物细胞而言，低温胁迫会造成细胞膜流动性降低，细胞器功能遭受损害，同时还会致使活性氧大量产生，严重威胁细胞的完整性与稳定性<sup>[5-9]</sup>。因此，植物必须启动一系列复杂的细胞以及分子响应机制，以此来协调细胞各区室功能，维持细胞稳态，从而增强自身在低温环境下的适应性<sup>[10]</sup>。

CBF 转录因子 (C-repeat binding factors)，作为植物应对低温胁迫的关键调控因子，在植物的抗寒反应当中发挥着至关重要的作用<sup>[11]</sup>。CBF 转录因子通过特异性结合冷响应基因启动子区域内的 CRT/DRE 顺式作用元件，能够激活下游 *COR* 基因的表达，从而在调控植物抗寒性方面发挥关键作用。这种机制确保了植物在寒冷环境下的适应能力得到增强<sup>[12]</sup>。CBF 家族成员在低温胁迫下会被快速诱导表达，其表达受到多种信号通路的调控，涵盖了低温信号、植物激素脱落酸 (ABA) 以及蛋白激酶等<sup>[13-15]</sup>。这些调控机制相互配合，共同保障了 *CBF* 基因在低温胁迫下能够适时、适量地表达，从而有效提升植物的抗寒性。具体来说，CBF 转录因子激活的冷响应基因参与了诸多生理过程，例如调节细胞膜的稳定性、清除活性氧、积累渗透调节物质等，通过这些方式增强植物在低温环境下的适应性与生存能力<sup>[16-18]</sup>。

### 1.1 低温胁迫对植物的影响

低温胁迫主要分为冷胁迫 ( $0^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$ ) 和冻胁迫 ( $< 0^{\circ}\text{C}$ ) 两种类型。冷胁迫对植物的影响体现在多个方面，包括细胞膜的结构、酶活性及抗氧化能力，这些因素共同作用会干扰植物正常的生长和发育过程。与冷胁迫相比，冻害对植物的作用机制显示出明显的不同。当气温下降到冰点以下时，植物细胞内外的水分开始形成冰晶，这类冰晶能够引起细胞机械性损伤，在极端情况下可导致植物死亡。当植物遭受低温胁迫时，其生长发育和生理生化过程都会受到一定程度的影响<sup>[19,20]</sup>。

### 1.1.1 低温胁迫对植物生长发育的影响

种子的萌发对温度条件有特定需求。若处于低温条件下，种子的发芽进程会被显著延迟，其生长活力与发育潜力也会受到抑制，严重时可导致发芽失败<sup>[21]</sup>。此外，低温环境还会减慢种子的吸水速度，由于水分压力的变化，细胞膜可能受损，从而影响其选择性通透性<sup>[22]</sup>。低温胁迫对植物外观有着明显的影响，具体表现形式多样，包括但不限于萎蔫、叶片出现类似水渍的症状、果实表面斑点增多、植株矮小、生长速率降低、叶片变黄、产量减少及品质下降等现象<sup>[23]</sup>。其中，萎蔫是最常见的低温伤害症状之一，这主要是因为低温削弱了根系向地上部分输送水分的能力，并且在面临水分缺乏时，植物调节气孔关闭的能力也有所下降，最终因缺水而导致萎蔫<sup>[24]</sup>。同时，低温引起的组织损伤（如水渍状或斑点）更易遭受病虫害侵袭，造成局部组织坏死<sup>[25]</sup>。低温还会影响叶绿体结构和叶绿素合成酶活性，减少了叶绿素含量，使叶片呈现黄色<sup>[26]</sup>。光合作用效率因此而降低，进一步限制了植物的生长，导致苗木质量下降，产量减少<sup>[27,28]</sup>。另外，低温环境下植物吸收水分的能力减弱，进而影响矿物质和营养物质的摄取，这对植物的整体生长状况以及果实的产量和品质产生了负面影响<sup>[29]</sup>。综上所述，低温胁迫通过干扰植物内部的光合作用、水分平衡、矿物质及营养吸收等关键过程，阻碍了正常的生长发育，引发了多种变化。

### 1.1.2 低温胁迫对植物生理生化的影响

#### 1.1.2.1 低温胁迫对生物膜系统的影响

研究表明，细胞膜上存在一种名为 Cold 1 (chilling-tolerance divergence 1) 的跨膜蛋白，它能够感知寒冷信号<sup>[30,31]</sup>。此外，冷胁迫还会对细胞膜结构产生影响，改变膜脂的状态，从而增加膜的通透性，引起电解质渗漏率上升，并导致细胞膜损伤<sup>[32]</sup>。这一过程还可能导致蛋白质变性现象的发生，干扰与膜结合的蛋白质功能<sup>[33]</sup>。随着温度下降，这些效应变得更加明显。一般来说，低温抗性较强的植物通常具有较低的膜脂相变温度，且其变化幅度较小，同时表现出更强的恢复能力<sup>[34]</sup>。膜脂相变温度与膜内不饱和脂肪酸的含量密切相关，不饱和脂肪酸含量的提升不仅能够增强膜的流动性，还能进一步提高其稳定性，从而降低了质膜发生相变的温度<sup>[35]</sup>。因此，增强细胞膜稳定性对于提升植株抵御低温逆境的能力具有关键意义<sup>[36]</sup>。

### 1.1.2.2 低温胁迫对细胞渗透调节物质的影响

植物细胞质基质中储存多种渗透调节因子，当遭遇低温环境时，这些物质既能稳定胞内渗透压，又具备抑制胞液结晶的功能，从而增强植株耐寒能力<sup>[37]</sup>。

作为典型渗透调节剂的脯氨酸具有强亲水性及电中性特性，通常以溶解态存在于胞质溶胶中<sup>[38]</sup>。该物质除调节渗透平衡外，还能保护蛋白质构象完整性<sup>[39]</sup>。在常规生理状态下，植物细胞内游离脯氨酸浓度维持在基础水平，但在逆境胁迫下其合成量会急剧上升<sup>[40]</sup>。由于植株耐寒性与低温诱导的脯氨酸积累量存在显著正相关，该物质浓度常被作为评估植物抗冻能力的重要参数<sup>[41]</sup>。

可溶性碳水化合物及可溶性氮化合物同样参与渗透调节过程<sup>[42]</sup>。低温条件下，植物组织内可溶性糖类与蛋白浓度通常与其耐寒特性存在显著正相关性，这类物质通过改变胞内溶质组成，协同维持细胞在低温胁迫下的生理活性<sup>[43,44]</sup>。

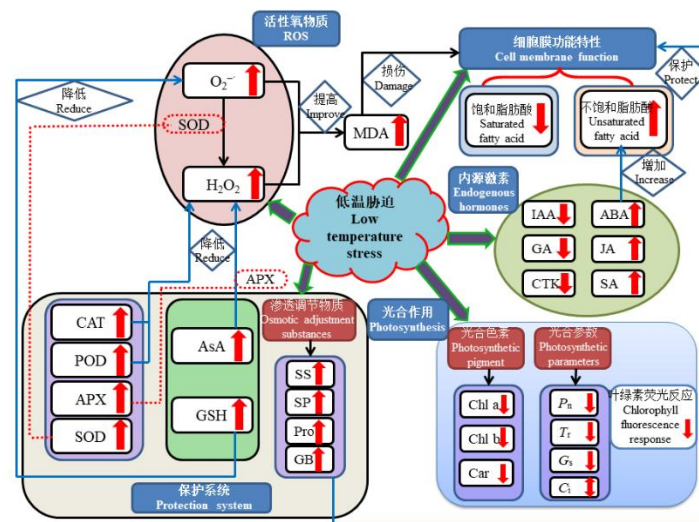


图 1-1 低温胁迫对植物生理代谢的影响<sup>[42]</sup>

Figure 1-1 Impact of Low-Temperature Stress on Plant Physiological Metabolism

### 1.1.2.3 低温胁迫对植物抗氧化系统的影响

当植物遭遇低温逆境时，其光合作用效率显著降低，同时光合电子传递链功能受阻<sup>[45]</sup>。低温引发的冰晶形成会导致质膜机械损伤，并引发脂质过氧化反应加剧，促使胞内活性氧水平急剧上升，进而激活植物抗氧化防御系统<sup>[46]</sup>。

超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）及过氧化氢酶（CAT）构成植物抗氧化防御系统的核心组分，通过协同清除 ROS 降低氧化损伤。这些保护性酶类的活性变化呈现先增强后减弱的动态特征：在胁迫初期，植物通过快速提升酶活性建立抗氧

化屏障以应对 ROS 爆发；当胁迫持续时间延长或强度超过阈值时，酶活性逐渐受到抑制，导致抗氧化效能衰退<sup>[47,48]</sup>。耐寒性种质资源在同等低温条件下展现出更强的抗氧化维持能力，其保护性酶类能够保持基础活性水平，从而有效控制 ROS 累积量<sup>[49]</sup>。

## 1.2 植物 CBF 转录因子研究概述

### 1.2.1 CBF 转录因子的发现

CBF (C-repeat Binding Factor) 转录因子最初是在拟南芥中被鉴定，在植物对冷胁迫响应的过程中发挥着至关重要的作用<sup>[50]</sup>。后续的基因功能分析证实，CBF 家族在多种植物中均有广泛分布，涵盖了小麦、水稻、玉米、大豆等<sup>[51,52]</sup>。并且，CBF 家族成员在植物的多个组织，如叶片、茎和根等的细胞核中，参与调控冷胁迫响应过程<sup>[53]</sup>。在冷胁迫信号传导途径中，CBF1、CBF2 和 CBF3 是主要的调控因子，负责调控植物的初级冷响应<sup>[54]</sup>。AP2/ERF 和 DREB 是 CBF 类转录因子的两个关键保守结构域<sup>[55]</sup>。其中，AP2/ERF 结构域主要负责与 DNA 的结合，已知 CBF 含有该结构域，并在拟南芥中参与调控冷胁迫信号传导途径。DREB 结构域则位于蛋白质的氨基端，参与蛋白质之间的相互作用<sup>[56]</sup>。

### 1.2.2 CBF 转录因子的结构与功能特征

CBF 基因，作为植物 AP2/ERF 转录因子家族的关键成员，在植物应对外界不良环境胁迫，尤其是低温胁迫时，发挥着极为重要的作用<sup>[57,58]</sup>。AP2/ERF 家族的转录因子因具备保守的 AP2 结构域而得名，该结构域大约由 60-70 个氨基酸残基构成，主要负责与 DNA 结合，进而能够特异性地识别并结合到靶基因启动子区域的顺式作用元件上<sup>[59]</sup>。依据 AP2 结构域的数量以及序列特点，AP2/ERF 家族可进一步划分为 AP2、ERF、DREB/CBF、RAV 和 Soloist 等亚家族<sup>[60]</sup>。CBF 基因归属于 DREB 亚家族，其显著特征在于能够识别并结合处于冷响应基因启动子区的脱水响应元件重复序列 (DRE/CRT, A/GCCGAC) <sup>[61]</sup>。

植物 CBF 家族包含多个成员，例如在拟南芥中存在 *CBF1*、*CBF2* 和 *CBF3* 三个高度同源的基因。这些基因的氨基酸序列具有高度一致性，均包含典型的 AP2 结构域以及核定位信号，这表明它们具备转录因子的特性以及在细胞核内定位的功能<sup>[55,62]</sup>。功能研究显示，在不同植物物种中克隆得到的 CBF 基因，如水稻的 *OsDREB1A* 和

*OsDREB1B*<sup>[63,64]</sup>, 茶树的 *CsCBF1-6*<sup>[65]</sup>, 以及梨树的 *PbeDREB1* 和 *PbeDREB2A*<sup>[66]</sup>等, 都在植物应对低温胁迫的过程中发挥着关键作用。这些 *CBF* 基因的表达通常会被低温快速诱导, 而且其转录激活活性会显著增强。以茶树 *CBF* 家族为例, 转录激活实验结果表明, 除 *CsCBF1* 之外, 其余 *CsCBFs* 均具有较为明显的转录激活活性, 这一发现进一步证实了 *CBF* 家族成员作为转录因子在植物低温响应过程中的重要功能<sup>[65]</sup>。

### 1.2.3 *CBF* 转录因子的调控机制

#### 1.2.3.1 上游调控因子

*CBF* 基因的表达调控过程极为复杂且精细, 受到多种上游转录因子的调控。*ICE1* 是首个被发现的 *CBF* 上游正调控因子<sup>[67]</sup>。*ICE1* 归属于 MYC 型 bHLH 转录因子家族, 能够与 *CBF* 基因启动子区的 MYC 识别元件结合, 激活 *CBF* 基因的转录<sup>[68]</sup>。在低温胁迫条件下, *ICE1* 蛋白的稳定性提升, 转录活性也随之增强, 进而更高效地激活 *CBF* 基因的表达<sup>[69]</sup>。

除 *ICE1* 之外, 许多转录因子逐渐被发现参与 *CBF* 基因的调控过程。例如, *CCA1* 和 *LHY*, 作为植物生物钟的核心组成部分, 也被报道参与 *CBF* 基因的调控。相关研究显示, *CCA1* 和 *LHY* 能够直接与 *CBF* 基因启动子结合, 正向调控 *CBF* 基因的表达, 且这种调控呈现出昼夜节律性特征, 这暗示 *CBF* 基因对低温的响应可能受到生物钟的调控<sup>[70-72]</sup>。这些转录因子之间可能存在复杂的相互作用关系, 共同构建一个精细的调控网络, 以确保 *CBF* 基因在适宜的时空条件下进行表达, 并能够响应不同程度的低温胁迫。

#### 1.2.3.2 下游靶基因

*CBF* 转录因子通过调控下游靶标基因的表达, 在植物低温应答过程中起关键作用<sup>[73]</sup>。*COR* 基因类型多样, 功能各异, 编码的蛋白涉及植物耐寒性的多个方面, 包括渗透调节、膜保护、抗氧化防御以及碳水化合物代谢等<sup>[74]</sup>。研究人员借助转录组学与蛋白质组学分析, 鉴定出大量 *COR* 基因, 并对其功能机制展开了深入探究。

在渗透调节方面, *COR* 基因编码的脯氨酸合成酶基因 (*P5CS*) 和脯氨酸脱氢酶基因 (*PDH*) 参与脯氨酸的合成与分解, 进而调控细胞内脯氨酸的含量。同样地, *COR* 基因编码的可溶性糖合成酶基因, 参与可溶性糖的合成, 提高细胞内可溶性糖的含量, 发挥渗透调节和膜保护作用<sup>[75]</sup>。在抗氧化防御方面, *COR* 基因编码超氧化物歧化酶 (*SOD*)、过氧化物酶 (*POD*) 和过氧化氢酶 (*CAT*) 等抗氧化酶, 能够清除低温胁迫

下产生的活性氧，从而减轻氧化损伤<sup>[76]</sup>。低温胁迫往往会导致植物细胞内 ROS 的积累<sup>[77]</sup>。ROS 的过量积累会对细胞膜、蛋白质和核酸等造成氧化损伤，进而影响细胞的正常功能<sup>[78,79]</sup>。在光合系统的保护机制中，*COR* 基因通过产生叶绿体 a/b 结合蛋白（CAB）及光系统 II（PSII）核心组分，参与调控光合作用过程。当遭遇低温环境时，这种调节作用显得尤为重要，因为寒冷条件容易造成光合效率下降<sup>[80]</sup>。*COR* 基因的活跃表达有助于稳定叶绿体色素浓度，保护光合复合体结构免受破坏，从而维持光能转化效率，确保植物在寒冷环境中持续获得生长所需能量<sup>[81,82]</sup>。该基因家族能够提升植物应对低温逆境的适应能力与抗性水平。

### 1.2.3.3 信号通路

*CBF* 基因的低温响应受到复杂的信号通路调控，包括钙信号、活性氧信号、激素信号以及糖信号等。钙信号是植物响应多种环境胁迫的重要信号分子。钙信号作为植物应对多种环境胁迫的关键信号分子，当遭遇低温胁迫时，细胞内的钙离子浓度会迅速升高<sup>[83]</sup>。作为第二信使，钙离子的这种变化能够激活位于其下游的信号传导路径，进而促使 *CBF* 基因表达上调。在植物细胞内部，钙依赖蛋白激酶（CPKs）以及钙调蛋白（CaM）是主要的钙信号受体<sup>[84,85]</sup>。

在植物针对低温胁迫的响应过程中，活性氧信号同样发挥着关键作用。低温胁迫状况下，植物细胞内极易出现 ROS 的积累现象<sup>[86]</sup>。一定量的 ROS 能够充当信号分子的角色，将下游信号通路激活，诱导抗逆基因进行表达，从而使植物的耐冷性得以提升<sup>[87]</sup>。相关研究表明，ROS 有可能通过 MAPK（丝裂原活化蛋白激酶）信号通路，对 *CBF* 基因的表达进行调控<sup>[88]</sup>。然而，ROS 若过度积累，则会对细胞造成氧化损伤<sup>[89]</sup>。因此，植物需要精准地调控 ROS 的产生与清除过程，以维持细胞内氧化还原平衡状态。

在植物抵御低温胁迫的过程中，植物激素同样发挥着关键作用。脱落酸（ABA）作为植物应对干旱、高盐以及低温等多种逆境的关键激素，低温胁迫能够促使植物体内 ABA 合成与积累<sup>[90]</sup>。ABA 通过激活下游信号通路，对 *CBF* 基因的表达以及植物的耐冷性进行调控<sup>[91]</sup>。除此之外，茉莉酸甲酯（MeJA）、乙烯（ET）以及生长素（IAA）等植物激素在植物应对低温响应的过程中扮演了重要角色<sup>[92]</sup>。此外，糖信号作为调控植物能量代谢及信号转导的重要因子，也被报道参与植物的低温响应过程<sup>[93]</sup>。

### 1.2.4 CBF 转录因子的表达及在植物耐冷中的作用

*CBF* 基因在植物应对低温的过程中，起着至关重要的调控作用，它通过调节下游冷响应基因 *COR* 的表达，从而使植物具备更强的耐寒能力<sup>[94]</sup>。*CBF* 调控网络的关键机