

综述 Reviews

类钙调蛋白在植物生长发育及逆境胁迫中的功能研究进展

曹绍玉¹, 王艳芳¹, 苏婉玉¹, 张琳², 张应华³, 许俊强^{3,*}¹云南农业大学园林园艺学院, 昆明650201²云南农业大学资源与环境学院, 昆明650201³云南农业大学云南省滇台农业产业化工程研究中心, 昆明650201

摘要: 作为Ca²⁺信号系统的重要家族成员, 类钙调蛋白(CMLs)参与植物的各种生理生化过程, 包括生长发育、生物胁迫、非生物胁迫和激素作用等。本文就类钙调蛋白在植物生长发育过程中功能的研究进展进行系统的综述, 并对类钙调蛋白相关领域的研究进行展望, 以期对CMLs的深入研究提供参考。

关键词: 类钙调蛋白(CML); 生长发育; 生物胁迫; 非生物胁迫

Ca²⁺是生物体中的第二信使, 对各种生物学功能起着重要作用。目前已经发现了三类钙信号系统, 包括钙调蛋白(calmodulin, CaM)/类钙调蛋白(calmodulin-like protein, CML)、钙依赖型蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)和类钙调素B类蛋白(calcineurin B-like, CBL)。CMLs是一类植物特有的Ca²⁺感受器, 已经发现多种植物中含有CMLs基因, 拟南芥中有50个*AtCMLs* (McCormack和Braam 2003), 水稻中有32个*OsCMLs* (Boonburapong和Buaboocha 2007), 大豆中有68个*GmCMLs* (陈超等2015), 番茄中有52个*SlCMLs* (Munir等2016b), 棉花中有60个*GrCMLs* (何永辉2015)、百脉根中有19个*LjCMLs* (Liao等2017), 白菜中有79个*BrCMLs* (Nie等2017), 此外, 在巴西橡胶树中也克隆出*HbCML* (刘辉等2015)。CMLs在植物的各种生长发育过程、激素调控的细胞活动、病原体和诱导子诱导的相关防御机制以及各种胁迫的诱导下进行基因表达(图1) (Bender和Snedden 2013)。虽然目前很多CMLs家族成员的功能还是未知的, 但它们在不同的生长发育过程及环境条件下发挥着重要作用, 具有很高的研究价值。因此, 在前人的基础上, 本文对CMLs在植物生长发育、生物胁迫和非生物胁迫等过程中的功能研究进展进行综述。

1 CMLs在生物胁迫中的作用

1.1 细菌、真菌和病毒的侵染

植物在进化中已形成了有效的机制来感知并抑制病原菌入侵(Zipfel和Felix 2005)。目前发现并

研究的部分CMLs家族成员在病原体侵染植物的过程中起到防御作用, 但作用的方式和途径有着一定的差别。植物通过激活模式识别受体(pattern recognition receptors, PPRs)来感知微生物的特征, 从而触发一系列的细胞防御, 其中之一便是终止胞间连丝, 它减少了细胞间的共质体连接以及与宿主细胞进行直接分子交换的能力。CML41可以在细菌病原体攻击中启用Ca²⁺信号特异性, 并对丁香假单胞菌进行完全的防御响应(Xu等2017)。病原菌、鞭毛蛋白和水杨酸能够诱导*AtCML9*表达(Leba等2012)。CML9和CML37参与植物对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的防御(Leba等2012; Scholz等2014); *AtCML8*通过丁香假单胞菌诱导表达强烈而短暂, 但在其免疫中具有关键作用(Zhu等2017)。同时, CML9在植物中可以通过鞭毛蛋白依赖途径提高对致病细菌的免疫力(Leba等2012)。

Ma等(2008)发现拟南芥中CML24的缺失突变体表现出在致病病原菌侵染中丧失超敏反应的能力, 病原菌致病因子在保卫细胞中诱导产生NO的现象也受到了抑制, 说明CML24在生物胁迫响应中也起到重要作用。由丁香假单胞菌病原体感染诱导CML43在拟南芥叶片中表达, CML43超表达的植株敏感度增强, 能在植物对病原菌的免疫反应中起作用(Chiasson等2005)。此外, CMLs还能在植株抵抗病毒攻击时发挥作用。当烟草蚀纹病毒侵

收稿 2018-03-15 修定 2018-10-09

资助 国家自然科学基金(31560560)和云南省应用基础研究计划项目(2015FD019)。

* 通讯作者(xujunqiang101@163.com)。

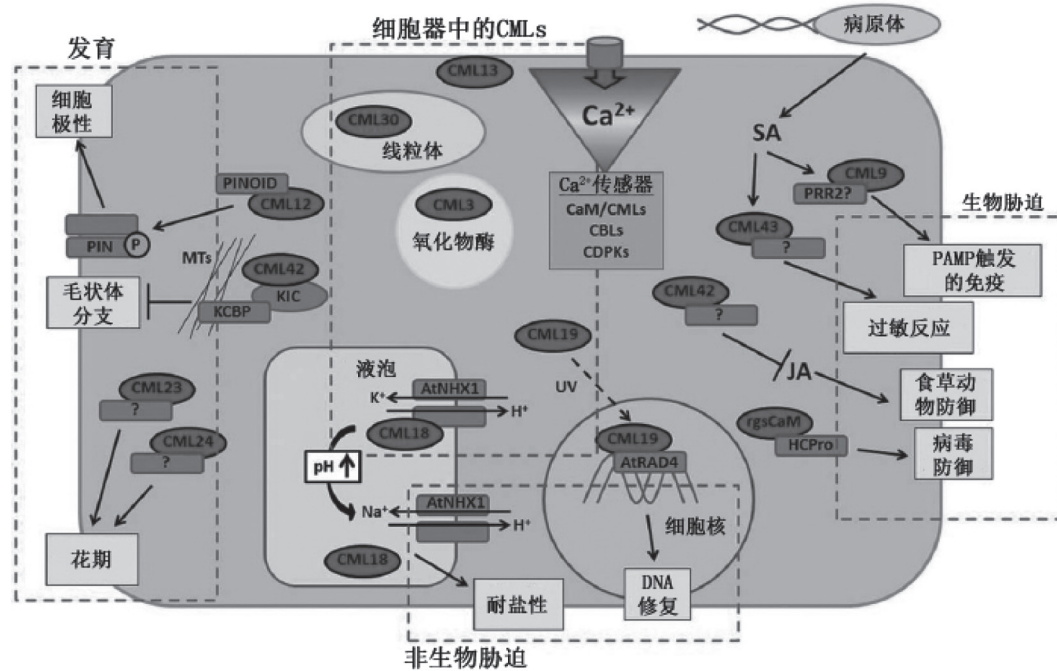


图1 CMLs在植物细胞中的功能模式

Fig.1 Working model of CMLs function in plant cells

本图改编自Bender和Snedden (2013)一文。

染烟草叶片时, *rgsCaM* (*regulator of gene silencing, CaM*) 高量表达, *rgsCaM* 能抑制 HC-Pro (helper component proteinase) 活性而提高对病毒的抵抗力 (Nakahara 等 2012)。旱地棉花中 GhMYB108 (由黄萎病菌诱导表达) 与类钙调蛋白 GhCML11 相互作用, 这两种蛋白质形成了一个正反馈回路, 以提高钙依赖性的方式来提高 *GhCML11* 的转录, 从而对黄萎病菌进行防御 (Cheng 等 2016)。

1.2 昆虫侵袭

植物受到昆虫取食后, 多个 CMLs 高量表达, 并在植物应对昆虫取食的免疫中具有一定的作用。CML9、11、12、16、17、24 和 37 受海灰翅夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 幼虫口器分泌物刺激后上调表达 (Vadassery 等 2012a; Scholz 等 2014)。在含 CML37 的植株中, 次生代谢产物 (配糖体或黄酮类) 中没有发现因昆虫取食而诱发的变异, 但由于 *JARI* (*jasmonate resistant 1*) 的表达和细胞酶活性的降低使得茉莉酸类物质的积累出现大幅降低。这些现象说明 CML37 的功能是虫食过程中 Ca^{2+} 信号的正调控因子, 连接了 Ca^{2+} 和茉莉酮酸酯信号 (Scholz 等 2014)。当拟南芥叶片受夜蛾口腔分泌物刺激或幼

虫直接取食时, Ca^{2+} 和植物激素会诱导升高, CML42 的表达量也迅速升高。CML42 突变体对昆虫取食的抗性强于野生型植株, 表明 CML42 通过降低 *COI1* (*Coronatine Insensitive 1*) 介导的茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 敏感性以及 JA 响应基因的表达对植物的防御反应进行负调控, 并且不依赖于取食所诱导的 JA 的生物合成, 说明 CML42 在食草动物诱发的防御中只是连接 Ca^{2+} 和 JA 信号的重要信号的组分 (Vadassery 等 2012b)。

2 CMLs在非生物胁迫中的作用

植物在复杂多变的环境中生存和生长, 形成了能够敏锐感受环境因素的变化并做出适当的生理响应的能力 (Trewavas 2005)。CMLs 对脱落酸 (abscisic acid, ABA)、茉莉酸甲酯、干旱及盐胁迫等非生物胁迫均表现出一定敏感性 (McCormack 等 2005)。

2.1 盐胁迫

拟南芥 CML9 功能缺失突变体对盐害及干旱的抵抗能力提高, 且对盐害抵抗能力的提高是由非渗透胁迫响应途径引起的, 表明 CML9 是 ABA 依赖

的盐害反应中的负调控因子, NaCl (150 mmol·L⁻¹)和冷(4°C)处理6 h的*AtCML9*的转录水平分别升高10倍和14倍; *CML9*突变体提高了拟南芥对干旱和盐害的耐受性, 并且有支链氨基酸的积累(Magnan等2008; Hirai等2010)。 *AtCML18*在液泡中与Na⁺/H⁺逆向转运蛋白NHX1 (Na⁺/H⁺exchanger 1)互作, 结合在NHX1的C端, 两者互作可能在植物响应盐害反应中起作用(Yamaguchi等2005)。 *AtCML15*也可以与NHX1互作, 能减少Na⁺/H⁺交换的活性, 在逆境胁迫时发挥作用(Yamaguchi等2005)。 *CML24*突变体能够拮抗ABA抑制的种子萌发和生长, 并能提高对CoCl₂、钼酸、ZnSO₄和MgCl₂的抗性(Delk等2005)。当受到盐胁迫时, *AtCML37*、*AtCML38*和*AtCML39*基因均表达上调(Vanderbeld和Snedden 2007)。NaCl胁迫下, 新疆无苞芥中*OpCML13*基因表达明显增强, 并且随着处理时间的延长表达逐渐增强, 胁迫24 h时达到最强, 胁迫48和72 h稍有下降; 4°C、20% PEG模拟干旱和100 μmol·L⁻¹ ABA处理6 h, *OpCML13*基因表达明显上调, 并且直到12 h一直处于较高的表达水平, 这表明*OP-CML13*基因对逆境胁迫的响应非常灵敏, 其在无苞芥响应逆境生理生态环境中可能起着重要的作用(赵云霞等2014)。野生大豆中分离出*GsCML27*, 通过远紫外CD光谱学, 发现碳酸氢盐、盐和渗透压力诱导其表达。拟南芥植株中*GsCML27*的异位表达增强了对碳酸氢盐胁迫的抗性, 但在种子萌发和早期生长阶段降低了盐和渗透耐性。此外, *GsCML27*的异位表达可以通过改变细胞离子(Na⁺、K⁺)含量和调节渗透压力来降低耐盐性(Chen等2015)。

2.2 干旱胁迫

在对拟南芥的研究中发现, *AtCML9*在干旱条件下是一个负调控因子(Magnan等2008)。 *AtCML9*的合成在所有主要的器官内均有发现, 且在根尖、气孔、排水器和毛状体等部位均表达。Magnan等(2008)发现缺水处理诱导*AtCML9*的表达水平迅速且短暂升高, 在10 min之内表达量迅速增加7倍, 这证明*AtCML9*与缺水耐性的提高相关联。干旱条件下, 使用粳米(‘Nipponbare’)秧苗, 诱导*OsCML4*表达, 过表达*OsCML4*植株比野生型植株明显表现出生长速度快和高存活率等优势表型。在转基因植物中清除活性氧(ROS)的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和脯氨酸浓度都明显增强。在干旱条件下, 与

ROS清除相关的基因*APX1* (*Ascorbate peroxidase 1*)、*Cat-B* (*catalase-B*)和应激相关基因*OsP5CS1* (*pyrroline-5-carboxylate synthetase 1*)在植株中的表达均有所增强; 而对ABA的敏感性, 在超表达植株和野生型植株之间是相似的, 表明*OsCML4*产生的耐旱性是通过活性氧的清除和与ABA独立的方式下诱导其它应激相关基因表达而产生的(Xu等2015)。 *OsERF48*是水稻中一种干旱诱导产生的转录因子, 可调节*OsCML16*的表达, 增强植株的根系生长和耐旱性(Jung等2017)。具有*ShCML44*超表达的番茄植株在寒冷和干旱胁迫条件下, 相比野生型植株丙二醛积累量更低, 膜损伤程度降低; 抗氧化酶活性、气体交换和保水性增强; 还表现出ROS减少和相对水含量增加的现象(Munir等2016a)。

保护细胞通过主要由于细胞内离子的流出引起的收缩来响应干旱和ABA。保卫细胞收缩从而减少气孔数量, 提高植物保持水分的能力。 *CML20*是拟南芥中ABA诱导的气孔运动的一个负调控因子。 *CML20*缺失, 植物气孔孔径变小, 叶片的水分损失比野生型更少; 而*CML20*过表达, 植物表现正好相反(Wu等2017)。

2.3 植物生长调节物质处理

ABA在植物的生命周期(包括种子休眠、发芽)和环境压力的响应等各种各样的生理进程中有着关键的作用(Verslues和Zhu 2007)。 *CML24*也称*TCH2* (*touch-induced 2*), 是最先鉴定出的被接触时显著上调表达的一个基因(Braam和Davis 1990)。 *CML24*在所有的主要器官中均有表达, 并且在植物受到触碰、黑暗、高温、寒冷、H₂O₂、ABA和IAA的刺激时, 转录水平逐渐增强2~15倍。有研究表明添加外源ABA和IAA使*CML24*转录水平分别迅速增加5倍和3倍, *CML24*调节ABA延迟限制种子发芽和幼苗生长的过程, *CML24*缺失抑制ABA和IAA的作用, 提高植株对重金属毒害的抵抗能力(Delk等2005)。在ABA条件下, *CML24*缺失的种子发芽和幼苗生长都有提高, ABA促进种子休眠, 抑制种子发芽和幼苗生长, 并且通过气孔管理提高植物的耐旱性(Finkelstein等2002); *CML24*或许是下游的ABA感受器, 参与了细胞对ABA引诱Ca²⁺波动调节反应来延迟种子发芽和幼苗生长(Delk等2005)。

在ABA条件下的转基因植株和野生型植株中

*OsCML4*的转录水平没有差异,表明*OsCML4*的表达在活性氧清除和其他胁迫相关基因的活化作用中的影响不依赖ABA(Xu等2011)。

*AtCML9*的表达在所有主要的器官内都有发现,在幼苗期通过非生物胁迫和添加ABA可迅速诱导*AtCML9*表达,添加NaCl、KCl和ABA的培养基能降低拟南芥植株*CML9*突变体的萌发率,其中ABA的最为明显,这证明*CML9*在调节盐刺激和ABA的响应中是必要的。突变体系的种子发芽和种苗生长表现出对ABA的高度灵敏,这可能与对盐刺激和干旱的忍耐性的提高相关联(Magnan等2008)。

Vanderbeld和Snedden(2007)研究了*CMLs*的表达模式,并在不同生长调节物质条件下对*CML37*、*CML38*和*CML39*进行表达分析,发现ABA对三者的表达水平影响较小,而茉莉酸甲酯诱导*AtCML39*表达。水稻*MSR2*(*Multi-Stress-Responsive gene 2*)与拟南芥*CML37*、*CML38*和*CML39*在序列上高度相似,同时也受多种逆境条件的诱导表达。*OsMSR2*在拟南芥中超表达后,增强植株对ABA的敏感性,推测*OsMSR2*可能是通过调节ABA通路上的基因,从而提高拟南芥对于干旱和盐碱的抗性(Xu等2011)。

3 CMLs在生长发育中的作用

3.1 调控花粉萌发和花粉管伸长

目前已明确以CAM、CDPK、CML、CBL和激酶蛋白(CBL-interacting protein kinases, CIPK)为主的植物钙结合蛋白在调控花粉发育及花粉管生长方面发挥了重要的作用(于晓俊等2016)。崔素娟等(1998)以烟草为材料,通过半体内实验发现存在于花粉和花柱细胞外的CaM对花粉萌发和花粉管伸长均有促进作用。对CML的研究发现至少有18种*CMLs*在花粉粒中表达,有9种是花粉特有的(Wang等2015),9种*CMLs*在花粉中优先表达(Golovkin等2003)。其中*CML39*在花粉萌发期间表达上调,11种*CMLs*(*CML2*、*3*、*14*、*15*、*16*、*20*、*21*、*24*、*39*、*42*、*49*)在花粉管生长期间表达上调;*CML6*、*13*、*25*和*28*均在花粉萌发及花粉管生长期间高度表达(Wang等2008)。在镁过量的情况下,*CML15*和*CML16*对钙具有很高的亲和力。对其启动子的研究表明,*CML16*的启动子活跃在整个拟南芥的组织 and 发育阶段,而*CML15*的启动子

只在花组织中观察到,特别是在花药和花粉中(Ogunrinde等2017),说明*CML15*和*16*可能在花粉萌发中具有一定的作用。

杨雪等(2014)利用*CML24*的2个突变体,解析其在拟南芥花粉管极性生长中的作用。结果发现*CML24*在花粉和花粉管中表达,并定位于细胞质中,*CML24*的功能缺失降低了花粉管生长过程中对胞外Ca²⁺、K⁺的响应;改变了花粉管胞内Ca²⁺浓度,明确了*CML24*可能作为Ca²⁺下游响应元件参与花粉萌发及花粉管生长调控;此外,*CML24*的功能缺失还改变了花粉管微丝骨架的排布,并导致突变体花粉管转向异常,这种异常可能与突变体花粉管胞内NO浓度的升高有关。由*CML24*突变体产生的花粉和花粉管是无组织的肌动蛋白细胞骨架,它降低了对latrunculin b作用的敏感性(Yang等2014)。王双双(2015)利用拟南芥*CML25*的功能缺失突变体和功能恢复株系,研究*CML25*调控花粉萌发及花粉管生长的分子机制,发现*CML25*在成熟花粉和花粉管中高效表达,在未成熟花粉和雌性组织中没有表达,表明其作用的特异性;*CML25*正调控花粉萌发和花粉管生长;并发现*CML25*参与维持胞内Ca²⁺的平衡过程,作为Ca²⁺的下游响应元件,可能反馈调节胞内Ca²⁺信号;此外,*CML25*还介导了钙信号对成熟花粉和花粉管质膜内向K⁺通道的调控作用;*CML25*可能的互作蛋白为CIP1(*CML25-interaction protein 1*)(CIP1为花粉管生长的负调控因子),且互作部位发生在细胞质中。结球甘蓝花粉萌发前后的蛋白双向电泳结果显示*CML49*在花粉萌发后表达下调,说明*CML49*基因可能在花粉萌发和花粉管生长过程中起重要作用(许俊强2014)。

3.2 调节细胞形态

从器官和组织水平对携带*AtCML9*启动子的转基因植物基因谱分析发现,在不同的生长发育时期,*AtCML9*在根系的表达量和表达部位均不同,暗示了*AtCML9*参与调控植物的根系生长过程(Magnan等2008)。*AtCML42*突变体表现为叶片表皮毛异常,分支增多,因此推测*CML42*可能正向调节KIC(KCBP-interacting Ca²⁺ binding protein),进而调控KCBP(kinesin-like calmodulin binding protein)的活性,最终影响表皮毛发育(Dobney等2009)。*RHS1*(*Root hair specific*, AT1G05590)是一种根毛特有的*CML*基因,在之前被称为*CML7*(McCormack

等2005)。RHS1有可能在根毛尖端生长的Ca²⁺相关进程中具有负向调控的功能。*RHS1*缺失突变体有着更长的根毛,超表达突变体长出的根毛则更短(Won等2009)。不同的蛋白激酶和转录因子是CaMs和CMLs的主要作用目标,表明它们参与了细胞信号转导和转录(Popescu等2007)。因此对RHS1的下游目标进一步研究将揭示它如何负向调控Ca²⁺信号来抑制根毛的尖端生长(Won等2009)。*AtRALF1* (*Arabidopsis thaliana* rapid alkalization factor 1)是一种小型分泌肽激素,通过抑制细胞扩增来抑制根生长,使用酵母双杂合系统发现拟南芥中*CML38*与*AtRALF1*相互作用;*CML38*结合*AtRALF1*,对抑制根系生长至关重要(Campos等2017)。

3.3 参与花期调控

*CML23*和*CML24*是一对表达模式和功能上相似性较高的蛋白(Mccormack和Braam 2003),都能控制开花时间(Delk等2005; Tsai等2007)。通过对*CML23/CML24*拟南芥双突变体的研究发现,在叶片中NO浓度过度积累,并且植株出现长日照下晚开花的表型(Delk等2005)。当光周期为16和24 h时,*CML24*缺失植株的花期延后;并且光周期为16 h时,野生型植株都在播种后32 d开花,而*CML24*缺失植株超过播种后40 d开花,100%开花时间则超过播种后60 d。此外,野生型在开花前平均长出9片叶子,而*CML24*缺失植株在开花前平均长出25片莲座叶(Delk等2005)。*CML23/CML24*双突变体在长、短日照条件下开花均延迟,同时*CML23*和*CML24*也受转录因子CO (Constans)、FLC (Flowering Locus C)等共同调控(Tsai等2013)。*AtCML10*可能通过光周期途径调控开花时间,是长日照光周期途径中的负调控因子(Birhaou 2008)。在中国白菜中,假设了一个BrCML蛋白质的相互作用网,结果发现BrCML2、BrCML6、BrCML15和BrCML25 4种基因共同表达,而且有可能在花的发育和其他生物学进程中具有一定的作用(Nie等2017)。

3.4 机械刺激响应

Braam和Davis (1990)首次发现拟南芥受接触诱导表达的4个基因,并将它们命名为*TCH1~4*。序列分析表明:*TCH1*编码*CaM2*,*TCH2*、*TCH3*分别编码*CML24*、*CML12*。在以较硬琼脂层模拟的土壤贯入阻力增加中,*CML24*突变体主根对较硬琼脂层的穿透比例显著小于野生型;在以玻璃障

碍模拟的土壤中岩石等不可穿透结构的出现中,*CML24*突变体主根不能形成野生型典型的阶梯形生长响应行为。这些结果证实*CML24*突变体主根存在接触响应缺陷,表明*CML24*在拟南芥主根对土壤贯入阻力变化的响应及不可穿透结构的躲避中具有重要生理意义(王益川2011)。*CML24*突变体对于微管类物质的差别感受性,表明*CML24*在拟南芥的根系机械反应中的作用,可能通过调节主根伸长区的外表皮细胞皮层中的微管排布从而参与根的机械响应(Wang等2011)。*CML39*受JA影响后表达量升高,而JA已被证实参与机械传导(Chehab等2012),但是具体机制还不清楚。

3.5 调节离子平衡

CMLs调节植物中的离子平衡,*CML24*低表达转基因植株相比野生型植株发芽长势更好,幼苗根系长度更长,因此在响应外源CoCl₂、钼酸、ZnSO₄和MgCl₂时,*CML24*低表达转基因植株的耐受性比野生型有进一步的增强。在这些条件下,通过ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry)分析*CML24*对于正常的种苗生长抑制是必需的,因此,*CML24*低表达转基因植株对这些离子的响应能反映出*CML24*在调节Co²⁺、Mo²⁺、Zn²⁺和Mg²⁺的生理进程中的作用(Delk等2005)。

4 CMLs在植物生长发育其他方面的功能

*CML39*在光信号的转换促进种苗的建植中起很重要的作用。短日照条件下,*CML39*突变体表现出蔗糖诱导下胚轴伸长增加的现象;在黑暗条件下,*CML39*突变体在缺乏蔗糖时下胚轴伸长受损,而且*CML39*在黑暗生长种苗中的表达是明显的(Bender等2013)。*CML39*是位于隐花色素途径中的下游因子,可能参与耦合依赖光的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)过程和ROS (reactive oxygen species)信号过程(Vanderbeld和Snedden 2007)。*CML24*还可以与ATG4b (autophagy related 4 homolog B)互作来调节自我吞噬过程(Tsai等2013)。*ShCML44*超表达的植株具有更高的种子萌发率和更好的幼苗生长势(Munir等2016a)。

冷敏感基因*ShCML44*是从耐寒野生番茄多毛番茄(*Solanum habrochaites*)中分离得到,*ShCML44*在所有的植物组织(包括根、茎、叶、花和果实)中均有不同的表达,在寒冷、干旱和盐碱胁迫下

以及添加植物生长物质条件下也受到了明显的正调节(Munir等2016a)。

通过对CML37、38和39的启动子活性分析及在逆境胁迫和植物生长物质处理后的分析,表明CML37可能在Ca²⁺介导的PCD过程中起作用(Vanderbeld和Snedden 2007)。CML38是MKK2 (MAPK kinase-2)信号的下游因子(Teige等2004),可能参与介导ROS的平衡(Nakagami等2006)。与CML42蛋白序列相似度比较高的CML43主要在根尖起作用,并参与SA介导的植物免疫反应(Bender等2014)。通过黄色荧光蛋白标记对AtCML4、5进行分析,发现其在植物内膜系统的泡膜运输中扮演了潜在角色(Ruge等2016)。在受UV刺激时,AtCML19在DNA修复的早期阶段具有一定作用(Liang等2006)。AtCML3的功能缺失会破坏过氧化物酶体的代谢(Dolze等2013)。SA和NaCl均能诱导AtCMLs的表达,AtCML8在拟南芥中可以激活特定的CaM依赖酶(Park等2010)。HbCML27参与调控橡胶树产排胶过程(Liu等2015)。

CML10通过调节抗坏血酸(一种抗氧化剂,能帮助植物抵抗干旱、臭氧和紫外线)的合成调节拟南芥的应激反应。CML10的缺失表达促进了磷酸甘露糖变位酶(一种调节抗坏血酸生物合成的酶)的活性,与野生型相比,CML10缺失突变体对胁迫条件的敏感性更大(Cho等2016)。CML36拥有2个高亲和力的Ca²⁺/Mg²⁺混合的结合位点和2个低亲和力的Ca²⁺特异位点,结合调节ACA8(拟南芥质膜Ca²⁺-ATP同工型酶),发现CML蛋白家族可能参与植物自动抑制的Ca²⁺泵的调制(Astegno等2017)。有研究采用等温滴定法分析Ca21和Mg21结合到CML14的能量,发现CML14对Ca21离子的亲和力是Mg21离子的5倍;虽然Ca21与CML14的结合增加了蛋白质的稳定性,但它不会导致蛋白质表面疏水性增加,也不会引起特有的Ca21传感器的大量构象重组,只会在具有独特功能的EF-hand中引起局部的结构变化(Vallone等2016)。

百脉根LjCMLs基因在特殊的器官内高度表达。LjCML1、LjCML11和LjCML16在花中表达;LjCML6、LjCML7和LjCML12在根瘤中表达;LjCML14在根里表达;LjCML19在种子里表达。在根瘤形成的不同发育阶段,不同的LjCMLs表达水平显著不同。LjCML6、LjCML7和LjCML12在根瘤

内高度表达,或许参与了固氮共生(nitrogen fixation symbiosis, NFS)。这些结果为进一步研究LjCMLs家族基因在固氮共生关系中的调节机制奠定了基础(Liao等2017)。当然,这些基因和功能的相关性还需要进一步实验研究数据的支持。

5 总结与展望

对CMLs家族进行各方面的研究,将有利于探索CMLs家族成员之间的联系与区别,能够为植物钙信号系统的完善提供依据。Xu等(2011)发现水稻MSR2基因在拟南芥中过度表达引起拟南芥植株的耐旱性和耐盐性的增强,表明CML的功能保持是可以跨越不同物种的。已知至少18种CMLs在花粉及花粉管中表达(Zhou等2009),这些CML基因中到底有几种是影响花粉萌发和花粉管伸长的,它们之间的影响率有多大?虽然近年来对CMLs的研究越来越深入,但还存在许多CMLs家族成员的功能是未知的,包括与其互作的蛋白质、互作机理以及EF-hand的数量与其功能的关系等,这些都值得未来进一步地研究。

参考文献(References)

- Astegno A, Bonza MC, Vallone R, et al (2017). Arabidopsis calmodulin-like protein CML36 is a calcium (Ca²⁺) sensor that interacts with the plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform ACA8 and stimulates its activity. *J Biol Chem*, 292: jbc.M117.787796
- Bender KW, Dobney S, Ogunrinde A, et al (2014). The calmodulin-like protein CML43 functions as a salicylic-acid-inducible root specific Ca²⁺ sensor in *Arabidopsis*. *Biochem J*, 457 (1): 127–136
- Bender KW, Snedden WA (2013). Calmodulin-related proteins step out from the shadow of their namesake. *Plant Physiol*, 163 (2): 486–495
- Bender KW, Rosenbaum DM, Vanderbeld B, et al (2013). The Arabidopsis calmodulin-like protein, CML39, functions during early seedling establishment. *Plant J*, 76 (4): 634–647
- Birhaou B (2008). The control of *Arabidopsis thaliana* flowering time by the calcium binding protein-22/Calmodulin-like 10 gene. Be'er Sheva, The State of Israel: Ben-Gurion University of the Negev
- Boonburapong B, Buaboocha T (2007). Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol*, 7: 4

- Braam J, Davis RW (1990). Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*, 60 (3): 357–364
- Campos WF, Dressano K, Ceciliato PHO, et al (2017). *Arabidopsis thaliana* rapid alkalization factor 1-mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein 38. *J Biol Chem*, 293 (6): 2159–2171
- Chehab EW, Yao C, Henderson Z, et al (2012). *Arabidopsis* touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Curr Biol*, 22 (8): 701–706
- Chen C, Duanmu HZ, Zhu D, et al (2015). Bioinformatics analysis of *GMCML* genes in soybean genome. *Soybean Sci*, 34 (6): 957–963 (in Chinese with English abstract). [陈超, 端木慧子, 朱丹等(2015). 大豆CML家族基因的生物信息学分析. 大豆科学, 34 (6): 957–963]
- Chen C, Sun XL, Duanmu HZ, et al (2015). *GsCML27*, a gene encoding a calcium binding ef-hand protein from *Glycine soja*, plays differential roles in plant responses to bicarbonate, salt and osmotic stresses. *PLoS ONE*, 10 (11): e0141888
- Cheng HQ, Han LB, Yang CL, et al (2016). The cotton MYB108 forms a positive feedback regulation loop with CML11 and participates in the defense response against *Verticillium dahliae* infection. *J Exp Bot*, 67 (6): 1935–1950
- Chiasson D, Ekengren SK, Martin GB, et al (2005). Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Mol Biol*, 58 (6): 887–897
- Cho KM, Nguyen HT, Kim SY, et al (2016). CML10, a variant of calmodulin, modulates ascorbic acid synthesis. *New Phytol*, 209 (2): 664–678
- Cui SJ, Wang HH, Ma LG, et al (1998). The effects of extracellular of style and pollen on pollen germination and pollen tube growth. *Acta Phytophysiol Sin*, 24 (4): 320–326 (in Chinese with English abstract) [崔素娟, 王洪梅, 马力耕等(1998). 花柱和花粉胞外钙调素对花粉萌发和花粉管伸长的影响. 植物生理学报, 24 (4): 320–326]
- Delk NA, Johnson KA, Chowdhury NI, et al (2005). CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol*, 139 (1): 240–253
- Dobney S, Chiasson D, Lam P, et al (2009). The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *J Biol Chem*, 284 (46): 31647–31657
- Dolz E, Chigri F, Höwing T, et al (2013). Calmodulin-like protein AtCML3 mediates dimerization of peroxisomal processing protease AtDEG 15 and contributes to normal peroxisome metabolism. *Plant Mol Biol*, 83: 607–624
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14: S15–S45
- He YH (2015). Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like gene family and ionome analysis of cotton fiber (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [何永辉(2015). 棉花钙调素与类钙调素基因家族表达分析及棉花纤维离子组测定(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Hirai MY, Sawada Y, Kanaya S, et al (2010). Toward genome-wide metabolotyping and elucidation of metabolic system: metabolic profiling of large-scale bioresources. *J Plant Res*, 123 (3): 291–298
- Jung H, Chung PJ, Park SH, et al (2017). Overexpression of *OsERF48* causes regulation of *OsCML16*, a calmodulin-like protein gene that enhances root growth and drought tolerance. *Plant Biotechnol J*, 15 (10): 1295–1308
- Leba LJ, Cheval C, Ortiz-Martín I, et al (2012). CML9, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway. *Plant J*, 71 (6): 976–989
- Liang L, Flury S, Kalck V, et al (2006). CENTRIN2 interacts with the *Arabidopsis* homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol Biol*, 61 (1-2): 345–356
- Liao J, Deng J, Qin Z, et al (2017). Genome-wide identification and analyses of calmodulins and calmodulin-like proteins in *Lotus japonicas*. *Front Plant Sci*, 8: 482
- Liu H, Deng Z, Chen JS, et al (2015). Cloning and expression analysis of calmodulin-like protein gene *HbCML27* from *Hevea brasiliensis*. *Mol Plant Breeding*, 13 (12): 2721–2727 (in Chinese with English abstract) [刘辉, 邓治, 陈江淑等(2015). 巴西橡胶树类钙调素蛋白基因 *HbCML27* 克隆与表达分析. 分子植物育种, 13 (12): 2721–2727]
- Ma W, Smigel A, Tsai YC, et al (2008). Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol*, 148 (2): 818–828
- Magnan F, Ranty B, Charpentreau M, et al (2008). Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J*, 56 (4): 575–589
- Mccormack E, Braam J (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytol*, 159: 585–598

- Mccormack E, Tsai YC, Braam J (2005). Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci*, 10 (8): 383–389
- Munir S, Liu H, Xing Y, et al (2016a). Overexpression of calmodulinlike (*ShCML44*) stress-responsive gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses. *Sci Rep*, 6: 31772
- Munir S, Khan MR, Song J, et al (2016b). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of calmodulin-like (CML) proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Physiol Biochem*, 102: 167–179
- Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, et al (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 281 (50): 38697–38704
- Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, et al (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (25): 10113–10118
- Nie SS, Zhang MJ, Zhang LG (2017). Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin-like (CML) genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics*, 18: 842
- Ogunrinde A, Munro K, Davidson A, et al (2017). *Arabidopsis* calmodulin-like proteins, CML15 and CML16 possess biochemical properties distinct from calmodulin and show non-overlapping tissue expression patterns. *Front Plant Sci*, 8: 2175
- Park HC, Park CY, Koo SC, et al (2010). AtCML8, a calmodulin-like protein, differentially activating CaM-dependent enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 29 (11): 1297–1304
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, et al (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (11): 4730–4735
- Ruge H, Flosdorff S, Ebersberger I, et al (2016). The calmodulin-like proteins AtCML4 and AtCML5 are single-pass membrane proteins targeted to the endomembrane system by an N-terminal signal anchor sequence. *J Exp Bot*, 67 (13): 3985–3996
- Scholz SS, Vadassery J, Heyer M, et al (2014). Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory. *Mol Plant*, 7 (12): 1712–1726
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, et al (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cells*, 15 (1): 141–152
- Trewavas A (2005). Green plants as intelligent organisms. *Trends Plant Sci*, 10 (9): 413–419
- Tsai YC, Delk NA, Chowdhury NI, et al (2007). *Arabidopsis* potential calcium sensors regulate nitric oxide levels and the transition to flowering. *Plant Signal Behav*, 2 (6): 446–454
- Tsai YC, Koo Y, Delk NA, et al (2013). Calmodulin-related CML24 interacts with ATG4b and affects autophagy progression in *Arabidopsis*. *Plant J*, 73 (2): 325–335
- Vadassery J, Scholz SS, Mithofer A (2012a). Multiple calmodulin-like proteins in *Arabidopsis* are induced by insect-derived (*Spodoptera littoralis*) oral secretion. *Plant Signal Behav*, 7 (10): 1277–1280
- Vadassery J, Reichelt M, Hause B, et al (2012b). CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to spodoptera herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 159 (3): 1159–1175
- Vallone R, Verde VL, D’Onofrio M, et al (2016). Metal binding affinity and structural properties of calmodulin-like protein 14 from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci*, 25 (8): 1461–1471
- Vanderbeld B, Snedden WA (2007). Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. *Plant Mol Biol*, 64 (6): 683–697
- Verslues PE, Zhu JK (2007). New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 10 (5): 447–452
- Wang SS (2015). The study of CML25 regulating the pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis* (dissertation). Jinan: Shandong University (in Chinese with English abstract). [王双双(2015). 拟南芥CML25调控花粉萌发及花粉管生长的机理研究(学位论文). 济南: 山东大学]
- Wang SS, Diao WZ, Yang X, et al (2015). *Arabidopsis thaliana* CML25 mediates the Ca²⁺ regulation of K⁺ transmembrane trafficking during pollen germination and tube elongation. *Plant Cell Environ*, 38 (11): 2372–2386
- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, et al (2008). Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 148 (3): 1201–1211
- Wang YC (2011). Functions of CML24 in primary root mechanoresponses in *Arabidopsis* (dissertation). Chongqing: Chongqing University (in Chinese with English abstract). [王益川(2011). CML24在拟南芥主根机械响应中的作用(学位论文). 重庆: 重庆大学]

- Wang YC, Wang BC, Simon GE, et al (2011). CML24 is involved in root mechanoresponses and cortical microtubule orientation in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul*, 30: 467–479
- Won SK, Lee YJ, Lee HY, et al (2009). Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 150 (3): 1459–1473
- Wu XM, Qiao Z, Liu HP, et al (2017). CML20, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, negatively regulates guard cell ABA signaling and drought stress tolerance. *Front Plant Sci*, 8: 824
- Xu B, Cheval C, Laohavisit A, et al (2017). A calmodulin-like protein regulates plasmodesmal closure during bacterial immune responses. *New Phytol*, 215 (1): 77
- Xu GY, Rocha PS, Wang ML, et al (2011). A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Planta*, 234 (1): 47–59
- Xu JQ (2014). Study of cloning and identification of calcium sensor protein-coding gene *CML49* of pollen tube in *Brassica oleracea* L (dissertation). Chongqing: Southwest University (in Chinese with English abstract) [许俊强(2014). 甘蓝花粉管钙感受蛋白编码基因*CML49*的克隆及功能鉴定研究(学位论文). 重庆: 西南大学]
- Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, et al (2005). Vacuolar Na^+/H^+ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca^{2+} - and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (44): 16107–16112
- Yang X (2014). Functional study of CML24 in regulating pollen germination and pollen tube growth (dissertation). Jinan: Shandong University (in Chinese with English abstract). [杨雪(2014). 拟南芥CML24调控花粉萌发及花粉管生长的功能研究(学位论文). 济南: 山东大学]
- Yang X, Wang SS, Wang M, et al (2014). *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca^{2+} concentration. *Plant Mol Biol*, 86 (3): 225–236
- Yin XM, Huang LF, Zhang X, et al (2015). *OsCML4* improves drought tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice. *J Plant Biol*, 58: 68–73
- Yu XJ, Cao SY, Dong YM, et al (2016). Research progress of calcium binding proteins in pollen growth and development. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 36 (10): 2121–2127 (in Chinese with English abstract) [于晓俊, 曹绍玉, 董玉梅等(2016). 钙结合蛋白对花粉生长发育调控研究进展. 西北植物学报, 36 (10): 2121–2127]
- Zhao YX, Wei YL, Huang XZ (2014). Clone and expression analysis of calmodulin-like protein gene *OpCML13* from olim *Arabidopsis pumila* of Xinjiang. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 34 (3): 431–437 (in Chinese with English abstract). [赵云霞, 魏艳玲, 黄先忠(2014). 新疆无苞芥类钙调素蛋白基因*OPCML13*的克隆与分析. 西北植物学报, 34 (3): 431–437]
- Zhou L, Fu Y, Yang Z (2009). A genome-wide functional characterization of *Arabidopsis* regulatory calcium sensors in pollen tubes. *J Integr Plant Biol*, 51 (8): 751–761
- Zhu X, Robe E, Jomat L, et al (2017). CML8, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, plays a role in *Pseudomonas syringae* plant immunity. *Plant Cell Physiol*, 58 (2): 307–319
- Zipfel C, Felix G (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol*, 8 (4): 353–360

Research progress on functions of calmodulin-like proteins in processes of plant growth and developments and stresses

CAO Shao-Yu¹, WANG Yan-Fang¹, SU Wan-Yu¹, ZHANG Lin², ZHANG Ying-Hua³, XU Jun-Qiang^{3,*}

¹College of Landscape Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

²College of Resources and Environmental, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

³Dian-Tai Engineering Research Center for Characteristic Agriculture Industrialization of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: As an important family member of Ca²⁺ signal system, CMLs (calmodulin-like proteins) are involved in various physiological and biochemical processes of plants, including growth and development, biotic stress, abiotic stress, hormone action, etc. This paper reviews the CMLs function in the process of plant growth and development progress of research on systematic, and outlook the type of calmodulin related research, so as to provide reference for the further research of CMLs.

Key words: calmodulin-like protein (CML); growth and developments; biotic stress; abiotic stress

Received 2018-03-15 Accepted 2018-10-09

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31560560) and Yunnan Applied Basic Research Projects (2015FD019).

*Corresponding author (xujunqiang101@163.com).