



综述 Reviews

植物CaMs/CMLs家族研究进展

赵芊^{1,2}, 赵雪萌¹, 宋聪^{1,2}, 黄媛媛^{1,2}, 贾振华^{1,2}, 宋水山^{1,2,*}

¹河北省科学院生物研究所, 石家庄050051

²河北省主要农作物病害微生物控制技术创新中心, 石家庄050051

*通信作者(shuishans620@163.com)

摘要: 钙离子作为真核细胞中重要的第二信使, 介导了真核生物对几乎所有环境和发育相关刺激信号的响应。在长期进化过程中, 植物进化出多种钙信号解码器以实现细胞对特异刺激作出恰当的响应。钙调素(calmodulins, CaMs)与类钙调蛋白(calmodulin-like proteins, CMLs)家族蛋白是Ca²⁺感受器, 在植物生长发育和胁迫抗性中发挥重要调控作用。本文总结了植物CaMs/CMLs家族蛋白的结构、遗传进化、作用机制、生物学功能等方面的最新研究进展, 以期为钙信号网络研究提供参考。

关键词: 钙调素; 类钙调蛋白; 钙离子; 植物

Research progress of CaMs/CMLs family in plant

ZHAO Qian^{1,2}, ZHAO Xuemeng¹, SONG Cong^{1,2}, HUANG Yuanyuan^{1,2}, JIA Zhenhua^{1,2}, SONG Shuishan^{1,2,*}

¹Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050051, China

²Hebei Technology Innovation Center of Microbiological Control on Main Crop Disease, Shijiazhuang 050051, China

*Corresponding author (shuishans620@163.com)

Abstract: As a vital second messenger in eukaryotic cell, Ca²⁺ almost participates in the transduction of all stimuli signals related to environment, growth and development. Various Ca²⁺ decoders are evolved and confer plants to respond to these stimuli specifically and appropriately. Calmodulins/calmodulin-like proteins (CaMs/CMLs) family, which is considered as Ca²⁺ sensor, plays important roles in plant growth and stress resistance. This paper reviews the current research progress on the protein structure, genetic evolution, biological functions and acting molecular mechanism of CaMs/CMLs family, so as to provide reference for the further research of Ca²⁺ signaling.

Key words: calmodulin; calmodulin-like protein; calcium ion; plant

钙离子作为真核细胞中重要的第二信使, 介导了真核生物对几乎所有与发育和环境适应相关的刺激信号的响应, 不同的刺激信号激发植物细胞产生具有不同时间和空间特征的钙信号, 被称为钙指纹(Ca²⁺ signatures)。植物进化出多种钙信号解码器(Ca²⁺ decoders), 植物细胞通过钙信号解

码器感受不同的钙指纹, 进而与下游众多的激酶、通道蛋白、转运蛋白、代谢酶类和转录因子等蛋白相互作用, 实现细胞对特异刺激的恰当响应(Ji-

收稿 2024-03-19 修定 2024-06-19

资助 河北省中央引导地方科技发展资金项目(226Z6501G)和河北省科学院高层次人才培养与资助项目(2023G03)。

ang和Ding 2023)。植物中的钙解码器是含有EF-手性结构域的 Ca^{2+} 结合蛋白,主要包括钙调素(calmodulins, CaMs)与类钙调蛋白(calmodulin-like proteins, CMLs)、类钙调神经磷酸酶B蛋白(calcineurin B-like proteins, CBLs)及其互作蛋白激酶(CBL-interacting protein kinases, CIPKs),以及钙依赖的蛋白激酶(Ca^{2+} -dependent protein kinases, CDPKs/CPKs)(Jiang和Ding 2023)。其中CAMs/CMLs是真核生物中保守性最强的蛋白家族之一,其结构中只含有EF-手性结构域,不含有其他功能结构域,在感受、传送和解码钙信号中起着至关重要的作用。本文主要从CAMs/CMLs蛋白的结构与遗传进化、作用机制和参与调节的生物学功能等方面综述植物CAMs/CMLs家族的最新研究进展。

1 植物CaMs/CMLs蛋白的结构与遗传进化

1.1 CaMs/CMLs蛋白的结构

典型的CaM蛋白含有148个氨基酸, X-射线晶体学研究发现蛋白的N端和C端形成大致对称的球状结构, EF-手性结构域两两成对嵌入其中; 球状结构之间由一条富有弹性的 α 螺旋区域连接, 使蛋白整体呈现哑铃形状(Zeng等2023)。典型的EF-手性结构域由29个氨基酸形成特殊的螺旋-环-螺旋结构, 第1~10个氨基酸为E-螺旋, 其保守序列为E-X₂-E; 第10~21个氨基酸为结合 Ca^{2+} 的环状区域, 其保守序列为D-X-D-X-D/N; 第19~29个氨基酸为F-螺旋, 其保守序列为E-F/L-X₃-M-X₂-L (Li等2023)。作为CaMs的同源蛋白, CMLs的结构与CaMs相似, 但两个球状结构之间具有更长的连接区域, N端和C端也比CaMs的长。CMLs的E-螺旋结构为E-X₄-F/I, 与CaMs的E-X₂-E-M/A-F/I有所不同, F-螺旋与CaMs的几乎一样, 而环状区域在序列和长度上与CaMs差异很大, 这使得CMLs在结构和功能上具有更大的灵活性和多样性(Zeng等2023)。

未结合 Ca^{2+} 的CaM (称为apo-CaM)无生物学活性, 其N端和C端的两个EF-手性结构域紧凑排列。CaM通过EF-环与 Ca^{2+} 结合进入活化状态, 结合 Ca^{2+} 的CaM (称为holo-CaM)构象会从闭合状态变为打开的状态, 导致其暴露出疏水表面, 以利于与下游靶蛋白发生相互作用(La Verde等2018)。绝大部分

CaMs含有4个EF-手性结构域, 分布在蛋白C端的一对EF-环结合 Ca^{2+} 的亲性和高, 而分布在N端的则对 Ca^{2+} 的亲性和相对较低(Zeng等2023)。凝胶阻滞分析、等温滴定量热分析和核磁共振分析证实CMLs也通过EF-手性结构域与 Ca^{2+} 结合(Zeng等2023)。CMLs含有1~6个不等的EF-手性结构域, 其中超过一半的CMLs (57.42%)含有4个EF-手性结构域(Li等2023)。与CaMs不同, CMLs并不是每一个EF-手性结构域都具有 Ca^{2+} 结合活性, 例如拟南芥AtCML14拥有的3个EF-手性结构域中只有1个能够结合 Ca^{2+} (Vallone等2016)。CaMs/CMLs结构上的细微差异导致它们形成不同的空间构象, 进而影响它们与 Ca^{2+} 的亲性和与下游靶蛋白的互作, 从而实现了对植物广泛而多样的生物功能的调控。

1.2 CaMs/CMLs蛋白的遗传进化

Li等(2023)利用蛋白质同源比对BLASTP和CaM/CML的隐马尔科夫模型(Hidden Markov Model, HMM), 分析了从藻类、藓类、蕨类、裸子植物到被子植物共1 230个绿色植物物种的基因组和转录组数据, 鉴定出2 133个CaMs和23 094个CMLs基因家族成员, 显示植物中CMLs的数量远远多于CaMs。CaMs在不同物种中的数量较少并相对稳定, 通常少于5个; 而CMLs一般在10~30个, 并且其数量随着植物物种的进化而逐渐增多。CMLs的数量变化经历了3个激增期, 分别发生在藻类植物到苔藓类植物、蕨类植物到裸子植物和裸子植物到被子植物的进化过程中。在第一个激增期, 植物基因组加倍事件发生, 导致植物基因组大小和基因数量倍增, 相关性分析表明CMLs基因家族的大小与物种基因组大小和总基因数量正相关, 因此认为这一时期CMLs数量的激增主要是由基因组加倍事件造成的。此外, 伴随着植物从藻类到藓类以及从蕨类到种子植物的进化过程, 植物由单细胞生物进化到多细胞生物, 由水生生活演变为陆生生活, 因此, 这些时期CMLs数量的激增与植物生活习性变迁和适应更加复杂的环境相关(Li等2023)。

对EF-手性结构域的序列特征进行系统进化分析, 发现绿藻、苔藓类、蕨类和裸子植物CaM的EF-手性结构域均由29个氨基酸组成, 序列高度保守; 被子植物的EF-手性结构域均由31个氨基酸组

成,但依然存在相同的保守位点,此外还含有2个特有的保守氨基酸L和S(或C),暗示其可能存在新的功能。不同植物CML的EF-手性结构域中E-螺旋和EF-环的长度和保守位点存在一定差异,陆生植物比藻类含有更多保守的E和D,EF-环的长度也随着植物的进化而逐渐增加。有趣的是,苔藓类植物CML和CaM的EF-手性结构域序列高度保守,对其功能的探索有助于了解CaM和CML发生功能分化的进化时期(Li等2023)。

系统进化分析结合基因表达分析显示植物CaMs的基因表达丰度普遍高于CMLs,而在响应外界刺激时CaMs的转录本表达变化明显低于CMLs,暗示CaMs可能在钙信号通路中发挥着类似管家基因的关键功能,而CMLs更适于灵活多变的解码各种复杂环境刺激引起的钙信号(Li等2023)。

早期进化的物种包括甲藻、色藻、红藻和灰藻不含有CaM基因,直到绿藻出现才检测到CaM基因,而CML基因最早在海洋原甲藻中被检测到(Li等2023)。基因组数据表明大部分CML基因(约71%)不含有内含子,大部分CaM基因(约95%)富含内含子,而基因中内含子的获得是较近的进化事件,因此认为CML的起源要早于CaM,二者的进化是相互独立的(Mohanta等2017)。基于蛋白序列的系统发育分析把植物CaM/CML家族分为7类:第I类为CaMs,其余六类为CMLs。来源于藻类的CMLs位于系统进化树的基部,继而逐步出现其他陆生植物分支成员。来源于裸子植物和早期分支的被子植物的CMLs归为第VI类,第VII类CMLs主要来源于被子植物(Li等2023)。CaMs进一步分成了5类,大部分来源于低等植物如绿藻、角苔类、苔类、藓类和石松类植物的CaMs被聚类于第IV类,暗示这一类是CaMs进化上的初始祖先;来源于裸子植物的CaMs主要分布在第II和第V类,被子植物的早期分支物种的CaMs也属于第V类,而大部分被子植物的CaMs归为第III类(Li等2023)。这种系统发育分类有助于人们了解CaMs/CMLs家族的进化规律。CaMs与第II类和第III类CMLs相似性极高,人们不禁猜测CaMs是否起源于CMLs,但CaMs进化过程的独立性使得CaMs起源问题仍存在争议。

2 植物CaMs/CMLs蛋白的作用机制

植物CaMs/CMLs蛋白的结构中只含有EF-手性结构域,而不含有其他功能结构域,除了AtCaM7被报道具有钙依赖的转录因子活性(Kumar等2016)以外,其他CaMs/CMLs被认为不具备酶催化活性和转录激活活性,需要通过调控其下游的钙调素结合蛋白来实现对不同钙信号的传输与解码(Zeng等2023)。钙调素结合蛋白可以通过2种特征结构实现与CaM的结合,一个是钙调素结合结构域(CaMBD),通过钙依赖的方式结合CaMs;另一个是IQ基序([I/L/V]QXXXRGXXX[R/K]),可以通过Ca²⁺依赖或Ca²⁺不依赖的方式与CaMs发生相互作用。对钙调素结合蛋白CAMTA3的IQ基序进行突变,能够得到功能获得突变表型,而突变CAMTA3的CaMBD结构域得到功能缺失突变表型(Yuan等2021),表明CaMBD和IQ与CaMs的相互作用可能介导不同的钙解码机制。CMLs也可以与钙调素结合蛋白相互作用调控其活性,但目前其作用机制还不清楚(Zeng等2023)。

2.1 CaMs/CMLs调控转录因子活性

CBP60家族蛋白是参与调控植物免疫的重要转录因子,在拟南芥中共有8个成员,其中CBP60a~CBP60f均在蛋白C端含有CaMBD, CBP60g的CaMBD在蛋白N端, SARD1不含有CaMBD(Zeng等2023)。CBP60g以Ca²⁺/CaM依赖的方式结合到异分支酸合酶基因ICS1的启动子上参与调控水杨酸(salicylic acid, SA)的生物合成(Zhang等2010)。CBP60g还可以调控ALD1和FMO1基因的表达[分别催化吡可酸(Pip)和羟基双酚酸(NHP)的合成],进而影响植物系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)(Jiang等2021)。此外, TCH3(CML12)还可以结合钙依赖性蛋白激酶5(CPK5),解除其活性自抑制,进而磷酸化CBP60g,使植物对大丽轮枝菌引起的黄萎病等土传病害产生免疫抗性(Sun等2022)。CBP60a负调控水杨酸生物合成和植物免疫,结合CaM是CBP60a发挥功能所必需的(Truman等2013)。CBP60b通过激活SARD1启动子正调控植物免疫(Huang等2021)。

CAMTAs是另一类结合钙调素的转录因子。

CAMTA3结合到水杨酸通路相关基因如*EDS1*、*NPR1*、*CBP60g*的启动子上,抑制这些基因的表达,从而负调控细菌和真菌触发的植物免疫响应(Zeng等2023)。CAMTA3激活RNAi途径的关键酶基因*RDR6*和*BN2*的转录,从而增强植物RNAi介导的对病毒的免疫抗性;而棉花叶卷曲木尔坦双生病毒和番茄黄叶卷曲病毒的效应子V2蛋白通过干扰CaM3与CAMTA3的互作来抑制植物的抗病毒活性(Wang等2021)。CML13和CML14被证实能够与CAMTAs相结合(Teresinski等2023)。Ca²⁺/CaM-CAMTA3通过调节水杨酸和茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号的交叉互作来调控植物对食草昆虫的抗性(Qiu等2012)。

WRKY IID亚家族成员是含有保守CaMBD的钙调素结合蛋白,WRKY53能够与多个CaM亚型蛋白互作,在植物应对病原菌和食草昆虫时起着双向调节作用(Jiao等2022b)。MAPK磷酸酶(MKP)是MAPK级联信号系统的负调控子,拟南芥AtMKP1的磷酸酶活性受到Ca²⁺依赖的CaM的正向调控(Lee等2008)。IQD是定位在细胞核的钙调素结合蛋白,IQD14可以Ca²⁺依赖和不依赖的方式与CaM、CML13和CML14互作(Teresinski等2023)。

2.2 CaMs/CMLs调控钙通道活性

Ca²⁺/CaM通过调节钙通道活性来反馈调节外界刺激引发的Ca²⁺信号(Zeng等2023)。环腺苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGCs)是位于质膜上的Ca²⁺透性阳离子通道,同时含有CaMBD结构域和IQ基序,与CaMs发生相互作用,进而调节CNGCs的通道活性。在环境Ca²⁺浓度低时,AtCaM1 (apo-CaM1)结合在CNGC12的IQ基序上作为感受Ca²⁺的配体,参与钙通道的打开;随着Ca²⁺浓度升高,apo-CaM1与Ca²⁺相结合,随后被招募到CNGC12 N端的CaMBD上,促进通道的关闭(Zhang等2019)。apo-CaM2可以结合到CNGC18/CNGC8异聚体上,解除CNGC8对CNGC18的抑制,使通道开放;随着Ca²⁺浓度升高, Ca²⁺与apo-CaM2结合, Ca²⁺/CaM2与异聚体亲和力降低,使CaM2从通道复合物上解离,导致通道关闭(Pan等2019)。此外, AtCaM7被证实能够抑制CNGC2/CNGC4异聚体的通道活性参与植物免疫反应(Tian等2019),

CaM2、CaM3、CaM5和CaM7可以抑制CNGC6的通道活性参与热激信号的转导(Niu等2020), AtCaM7还可以结合在AtCNGC14的C末端负调控该通道的活性来参与植物根毛的发育(Zeb等2020)。

植物特异性抗霉菌基因座O (MLO)是另一类Ca²⁺通道蛋白,包含7个跨膜域和1个保守的CaMBD, CaM的结合是MLO发挥正常功能所必需的。辣椒CaCaM1能够特异结合CaMLO2,抑制黄单胞菌效应子触发的Ca²⁺内流(Kim等2014)。自抑制Ca²⁺-ATPase (ACA)是含有CaMBD的钙泵, CML36能够与质膜上ACA8互作,激活ACA8的泵活性,介导Ca²⁺的外流(Astegno等2017)。

2.3 CaMs/CMLs调控ROS平衡

植物的Ca²⁺信号和ROS信号之间存在着广泛的相互作用。Ca²⁺通过结合CaM依赖的蛋白激酶CCaMKs磷酸化RBOHs来促进ROS的产生(Wang等2023)。Ca²⁺/CaM依赖的NAD⁺激酶NADKc催化合成NADPH氧化酶的辅因子NADP,在ROS的催化合成过程中发挥重要作用(Dell'Aglia等2019)。ROS的过量积累会对细胞产生毒性,植物进化出ROS清除系统来维持细胞ROS稳态。许多ROS清除酶含有CaMBD,受到Ca²⁺/CaM的调控。例如,拟南芥过氧化氢酶CAT3被Ca²⁺/CaM激活进而催化水解H₂O₂(Yang和Poovaiah 2002)。拟南芥在受到机械损伤时MPK8可以被CaM4激活,然后通过转录调控RBOHD来抑制ROS的积累;同时,MPK8的活性还受上游MAPKK的磷酸化调控,因此Ca²⁺/CaM和MAPK级联系统协同调控MPK8的活性进而实现对细胞ROS水平的精细调控(Takahashi等2011)。拟南芥谷氨酸脱羧酶GAD4与CML8结合,催化合成γ-氨基丁酸(GABA),进而抑制ROS的积累(Jiao等2022a)。

3 CaMs/CMLs蛋白参与调节的生理功能

近年来, CaMs/CMLs在调节植物生长发育、非生物胁迫和生物胁迫抗性方面的生理功能被越来越多揭示出来,主要包括参与调控花粉萌发、花粉管伸长、花期调节、根系生长、叶片表皮毛发育、根瘤发育及固氮共生等发育过程,参与调控植物对盐、干旱、冷、热、脱落酸(abscisic acid, ABA)、

光和机械触碰等非生物胁迫抗性以及对细菌、真菌、卵菌、病毒及食草昆虫侵染的免疫调节。本实验室在研究植物与细菌跨界信号转导时发现细菌群体感应信号分子*N*-酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl homoserine lactones, AHLs)通过诱导多个CaMs的活性促进拟南芥主根伸长(Zhao等2015)。转录组分析发现AHL可以诱导多个*CaM/CML*基因表达发生变化(Liu等2022), 暗示它们在调控植物主根生长和抗病性方面发挥重要作用。表1列出了近年来已报道的不同植物不同*CaMs/CMLs*基因参与调节

表1 植物CaMs/CMLs参与调节的生理功能

Table 1 Physiological functions regulated by CaMs/CMLs in plants

功能分类	植物物种	基因	生理功能	参考文献
生长发育	拟南芥	<i>AtCaM2</i>	参与花粉管萌发	Pan等2019
		<i>AtCaM7</i>	参与调控根毛发育	Zeb等2020
		<i>AtCML3</i>	参与过氧化物酶体代谢	Dolze等2013
		<i>AtCML4</i>	参与植物内膜囊泡运输	Ruge等2016
		<i>AtCML5</i>	参与植物内膜囊泡运输	Ruge等2016
		<i>AtCML7</i>	负调控根毛的伸长	Won等2009
		<i>AtCML9</i>	参与调控植物根系生长	Magnan等2008
		<i>AtCML15</i>	参与花粉萌发	Ogunrinde等2017
		<i>AtCML16</i>	参与花粉萌发	Ogunrinde等2017
		<i>AtCML23</i>	调控NO水平和成花转变	Tsai等2007
		<i>AtCML24</i>	参与调控花粉管生长、昼夜节律、开花时间; 参与调节自噬过程	Delk等2005; Tsai等2013; Yang等2014
		<i>AtCML25</i>	参与调控花粉萌发和花粉管生长	Wang等2015
		<i>AtCML38</i>	参与抑制根系生长	Campos等2018
		<i>AtCML39</i>	在光信号转换过程中参与种苗的建植	Bender等2013
		<i>AtCML42</i>	参与调控叶片表皮毛发育	Dobney等2009
非生物胁迫响应	拟南芥	<i>AtCaM2</i>	参与植物热激信号转导	Niu等2020
		<i>AtCaM3</i>	参与植物热激信号转导	Niu等2020
		<i>AtCaM4</i>	通过激活MPK8响应机械损伤	Takahashi等2011
		<i>AtCaM5</i>	参与植物热激信号转导	Niu等2020
		<i>AtCaM7</i>	参与植物热激信号转导	Niu等2020
		<i>AtCML9</i>	依赖ABA负调控植物对盐和干旱的抗性	Magnan等2008
		<i>AtCML10</i>	参与调控抗坏血酸的合成和抗氧化胁迫	Cho等2016
		<i>AtCML12</i>	响应机械触碰	Zha等2016
		<i>AtCML15</i>	通过与Na ⁺ /H ⁺ 反转运蛋白AtNHX1互作参与调控细胞pH和离子稳态, 响应盐胁迫	Yamaguchi等2005
		<i>AtCML19</i>	响应UV刺激, 参与DNA早期修复	Liang等2006
		<i>AtCML20</i>	在干旱胁迫响应中负调控ABA信号转导	Wu等2017
		<i>AtCML24</i>	参与调节Co ²⁺ 、Mo ²⁺ 、Zn ²⁺ 和Mg ²⁺ 等离子平衡; 响应机械触碰	Delk等2005; Zha等2016
		<i>AtCML37</i>	正调控ABA依赖的干旱响应, 与AtCML42存在拮抗作用	Heyer等2022
		<i>AtCML38</i>	参与植物对盐和干旱的响应	Vanderbeld和Snedden 2007
		<i>AtCML39</i>	参与植物对盐和干旱的响应	Vanderbeld和Snedden 2007
		<i>AtCML42</i>	负调控ABA依赖的干旱响应	Heyer等2022

表1 (续)

功能分类	植物物种	基因	生理功能	参考文献
非生物胁迫响应	水稻	<i>OsCML4</i>	正调控水稻耐旱性	Yin等2015
		<i>OsCML16</i>	正调控水稻耐旱性, 响应冷胁迫	Jung等2017; Yang等2018
		<i>OsCML31</i>	响应ABA, 正调控植物耐旱和耐盐性	Xu等2011
	大豆	<i>GmCaM4</i>	正调控耐盐性	Rao等2014
	野生大豆	<i>GsCML27</i>	正调控碳酸氢盐抗性, 负调控盐和渗透胁迫抗性	Chen等2015
生物胁迫响应	多毛番茄	<i>ShCML44</i>	正调控对冷、干旱和盐胁迫的抗性	Munir等2016
	拟南芥	<i>AtCaM1</i>	负调控植物JA合成及对海灰翅夜蛾的抗性, 参与植物免疫	Jiao等2022b
		<i>AtCaM3</i>	参与调控RNAi介导的病毒抗性	Wang等2021
		<i>AtCaM7</i>	参与植物免疫反应	Tian等2019
		<i>AtCML8</i>	正调控植物对丁香假单胞菌和小菜蛾的抗性	Zhu等2017; Jiao等2022a
		<i>AtCML9</i>	正调控植物对丁香假单胞菌的抗性	Leba等2012
		<i>AtCML12</i>	参与调控对大丽轮枝菌的抗性	Sun等2022
		<i>AtCML24</i>	调控NO合成和植物免疫	Ma等2008
		<i>AtCML37</i>	正调控植物对海灰翅夜蛾和甘蓝链格孢霉的抗性, 与AtCML42存在拮抗作用	Heyer等2022
		<i>AtCML41</i>	参与植物免疫反应中胞间连丝的关闭	Xu等2017
		<i>AtCML42</i>	负调控植物对海灰翅夜蛾和甘蓝链格孢霉的抗性	Heyer等2022
		<i>AtCML43</i>	作为根尖特异性Ca ²⁺ 感受器参与SA介导的植物免疫	Bender等2014
		<i>AtCML46</i>	通过与CBP60a互作负调控植物SA的积累和抗病性	Lu等2018
		<i>AtCML47</i>	通过与CBP60a互作负调控植物SA的积累和抗病性	Lu等2018
	辣椒	<i>CaCaM1</i>	与CaMLO2互作, 抑制黄单胞菌效应子激发的Ca ²⁺ 内流和细胞死亡	Kim等2014
	番茄	<i>CaCML13</i>	正调控对青枯雷尔氏菌的抗性	Shen等2020
		<i>SlCaM2</i>	正调控对烟草脆裂病毒、瓜果腐霉和灰霉的抗性	Peng等2014
		<i>SlCaM6</i>	正调控对烟草脆裂病毒和瓜果腐霉的抗性	Peng等2014
		<i>SlCML55</i>	负调控对辣椒疫霉菌的抗性	Zhang等2022
	大豆	<i>SLAPR134</i>	正调控对丁香假单胞菌的抗性	Chiasson等2005
		<i>GmCaM4</i>	正调控对大豆疫霉、极细链格孢菌、大豆拟茎点种腐病菌	Rao等2014
	烟草	<i>NtCaM13</i>	正调控对烟草花叶病毒、青枯雷尔氏菌、立枯丝核菌和瓜果腐霉的抗性	Takabatake等2007
		<i>RgsCaM</i>	正调控对烟草蚀纹病毒和黄瓜花叶病毒的抗性	Jeon等2017
	陆地棉	<i>GhCML11</i>	正调控对大丽轮枝菌的抗性	Cheng等2016
	小麦	<i>TaCML36</i>	正调控对禾谷丝核菌的抗性	Lu等2019

的生理功能。

4 总结与展望

随着近年来生物技术手段的迭代发展, 科学家们联合应用多组学、结构生物学和生物信息技术, 发现了越来越多植物物种的CaMs/CMLs基因家族, 解析了其系统进化规律、生物学功能、结构和调控机制, 在植物CaMs/CMLs家族的研究中取得了长足的进展, 为完善钙信号网络系统提供了理论基础。但是仍有许多问题还没有阐述清楚。例如CaMs/CMLs是一个庞大而高度保守的基因家族, 不同物种的众多CaMs/CMLs家族成员的结构和功能还远远没有解析完全, CaMs/CMLs的起源和进化问题也没有揭示清楚。细微的结构差异会导致CaMs/CMLs形成不同的空间构象, 进而影响它们与Ca²⁺的亲及性与下游靶蛋白的互作。不同的CaMs/CMLs如何精准地识别不同刺激产生的钙信号? 又如何选择并作用于更加庞大的下游靶蛋白? 这种选择的偏好性和灵活性是怎样的? 还有哪些靶蛋白? 它们的作用机制如何? 这需要我们对CaMs/CMLs蛋白的结构进行更加精细和广泛的解析。科学家需要利用X射线衍射、核磁共振、电子显微镜和质谱等技术进一步解析蛋白质高分辨率的结构信息。例如: 应用蛋白质质谱学鉴定蛋白质的氨基酸序列和翻译后修饰明确蛋白质的组成信息; 应用结构质谱学分析蛋白质的折叠状态、碎片之间的连接方式以及可能的构象变化以解析蛋白质的立体结构; 应用质谱成像技术分析蛋白质在组织和细胞中的空间分布, 揭示蛋白质在生物体内的作用位置和相互关系。随着质谱技术的发展, 以及中心反向质谱(CID/ETD)和电子转移解离(ETD)技术的出现, 我们相信更多的CaMs/CMLs蛋白的更高分辨率和更丰富的结构信息将会得到解析, 而基于结构基础的钙解码机制也将得到更全面的阐释。

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 (36): 15049–15061
- 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, Rosenbaum DM, Vanderbeld B, et al (2013). The *Arabidopsis* calmodulin-like protein, CML39, functions during early seedling establishment. *Plant J*, 76 (4): 634–647
- Campos WF, Dressano K, Ceciliato PHO, et al (2018). *Arabidopsis thaliana* rapid alkalization factor 1-mediated root growth inhibition is dependent on calmodulin-like protein 38. *J Biol Chem*, 293 (6): 2159–2171
- Chen C, Sun X, Duanmu H, 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
- Delk NA, Johnson KA, Chowdhury NI, et al (2005). CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, day length, and ion stress. *Plant Physiol*, 139: 240–253
- Dell'Aglio E, Giustini C, Kraut A, et al (2019). Identification of the *Arabidopsis* calmodulin-dependent NAD⁺ kinase that sustains the elicitor-induced oxidative burst. *Plant Physiol*, 181 (4): 1449–1458
- 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
- Dolze 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
- Heyer M, Scholz SS, Reichelt M, et al (2022). The Ca²⁺ sensor proteins CML37 and CML42 antagonistically regulate plant stress responses by altering phytohormone signals.

- Plant Mol Biol, 109 (4–5): 611–625
- Huang W, Wu Z, Tian H, et al (2021). *Arabidopsis* CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60b plays dual roles in plant immunity. Plant Commun, 2 (6): 100213
- Jeon EJ, Tadamura K, Murakami T, et al (2017). Rgs-CaM detects and counteracts viral RNA silencing suppressors in plant immune priming. J Virol, 91 (19): e00761-17
- Jiang SC, Engle NL, Banday ZZ, et al (2021). ALD1 accumulation in *Arabidopsis* epidermal plastids confers local and non-autonomous disease resistance. J Exp Bot, 72 (7): 2710–2726
- Jiang Y, Ding P (2023). Calcium signaling in plant immunity: a spatiotemporally controlled symphony. Trends Plant Sci, 28 (1): 74–89
- Jiao C, Guo Z, Gong J, et al (2022a). CML8 and GAD4 function in (Z)-3-hexenol-mediated defense by regulating γ -aminobutyric acid accumulation in *Arabidopsis*. Plant Physiol Biochem, 186: 135–144
- Jiao C, Li K, Zuo Y, et al (2022b). CALMODULIN1 and WRKY53 function in plant defense by negatively regulating the jasmonic acid biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. Int J Mol Sci, 23 (14): 7718
- 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
- Kim DS, Choi HW, Hwang BK (2014). Pepper mildew resistance locus O interacts with pepper calmodulin and suppresses *Xanthomonas* AvrBsT-triggered cell death and defense responses. Planta, 240 (4): 827–839
- Kumar S, Mazumder M, Gupta N, et al (2016). Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* calmodulin7 and insight into its mode of DNA binding. FEBS Lett, 590 (17): 3029–3039
- La Verde V, Dominici P, Astegno A (2018). Towards understanding plant calcium signaling through calmodulin-like proteins: a biochemical and structural perspective. Int J Mol Sci, 19 (5): 1331
- 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 signaling pathway. Plant J, 71 (6): 976–989
- Lee K, Song EH, Kim HS, et al (2008). Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 283 (35): 23581–23588
- Li Q, Gao L, Yu F, et al (2023). Evolution and diversification of CaM/CML gene family in green plants. Plant Physiol Biochem, 202: 107922
- 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
- Liu F, Zhao Q, Jia Z, et al (2022). N-3-oxo-octanoyl homoserine lactone primes plant resistance against necrotrophic pathogen *Pectobacterium carotovorum* by coordinating jasmonic acid and auxin-signaling pathways. Front Plant Sci, 13: 886268
- Lu L, Rong W, Zhou R, et al (2019). TaCML36, a wheat calmodulin-like protein, positively participates in an immune response to *Rhizoctonia cerealis*. Crop J, 7 (5): 608–618
- Lu Y, Truman W, Liu X, et al (2018). Different modes of negative regulation of plant immunity by calmodulin-related genes. Plant Physiol, 176: 3046–3061
- Ma W, Smigel A, Tsai YC, et al (2008). Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} 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: 575–589
- Mohanta TK, Kumar P, Bae H (2017). Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. BMC Plant Biol, 17: 38
- Munir S, Liu H, Xing Y, et al (2016). Overexpression of calmodulin-like (*ShCML44*) stress-responsive gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses. Sci Rep, 6: 31772
- Niu WT, Han XW, Wei SS, et al (2020). *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated channel 6 is negatively modulated by multiple calmodulin isoforms during heat shock. J Exp Bot, 71: 90–104
- 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
- Pan Y, Chai X, Gao Q, et al (2019). Dynamic interactions of plant CNGC subunits and calmodulins drive oscillatory Ca^{2+} channel activities. Dev Cell, 48: 710–725
- Peng H, Yang T, Jurick II WM (2014). Calmodulin gene expression in response to mechanical wounding and *Botrytis cinerea* infection in tomato fruit. Plants, 3 (3): 427–441
- Qiu Y, Xi J, Du L, et al (2012). Coupling calcium/calmodulin-mediated signaling and herbivore-induced plant response through calmodulin-binding transcription factor

- AtSR1/CAMTA3. *Plant Mol Biol*, 79 (1–2): 89–99
- Rao SS, El-Habbak MH, Havens WM, et al (2014). Overexpression of *GmCaM4* in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress. *Mol Plant Pathol*, 15 (2): 145–160
- 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
- Shen L, Yang S, Guan D, et al (2020). *CaCML13* acts positively in pepper immunity against *Ralstonia solanacearum* infection forming feedback loop with CabZIP63. *Int J Mol Sci*, 21 (11): 4186
- Sun L, Qin J, Wu X, et al (2022). TOUCH 3 and CALMODULIN 1/4/6 cooperate with calcium-dependent protein kinases to trigger calcium-dependent activation of CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G and regulate fungal resistance in plants. *Plant Cell*, 34 (10): 4088–4104
- Takabatake R, Karita E, Seo S, et al (2007). Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. *Plant Cell Physiol*, 48 (3): 414–423
- Takahashi F, Mizoguchi T, Yoshida R, et al (2011). Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 41 (6): 649–660
- Teresinski HJ, Hau B, Symonds K, et al (2023). *Arabidopsis* calmodulin-like proteins CML13 and CML14 interact with proteins that have IQ domains. *Plant Cell Environ*, 46: 2470–2491
- Tian W, Hou C, Ren Z, et al (2019). A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature*, 572: 131–135
- Truman W, Sreekanta S, Lu Y, et al (2013). The CHLMODULIN-BINDING PROTEIN60 family includes both negative and positive regulators of plant immunity. *Plant Physiol*, 163 (4): 1741–1751
- 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
- Vallone R, La Verde V, 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: 683–697
- Wang Q, Shen T, Ni L, et al (2023). Phosphorylation of OsRbohB by the protein kinase OsDMI3 promotes H₂O₂ production to potentiate ABA responses in rice. *Mol Plant*, 16 (5): 882–902
- 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: 2372–2386
- Wang Y, Gong Q, Wu Y, et al (2021). A calmodulin-binding transcription factor links calcium signaling to antiviral RNAi defense in plants. *Cell Host Microb*, 29 (9): 1393–1406
- 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: 1459–1473
- Wu X, Qiao Z, Liu H, 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: 77–84
- Xu GY, Rocha PSCF, 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
- 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 Ca²⁺- and pH-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 16107–16112
- Yang J, Ji L, Zhu B, et al (2018). OsCML16 interacts with a novel CC-NBS-LRR protein OsPi304 in the Ca²⁺/Mg²⁺ dependent and independent manner in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, 504: 346–351
- Yang T, Poovaiah BW (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (6): 4097–4102
- 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 Ca²⁺ concentration. *Plant Mol Biol*, 86: 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

- Yuan P, Tanaka K, Poovaiah BW (2021). Calmodulin-binding transcription activator AtSR1/CAMTA3 fine-tunes plant immune response by transcriptional regulation of the salicylate receptor NPR1. *Plant Cell Environ*, 44: 3140–3154
- Zeb Q, Wang XH, Hou CC, et al (2020). The interaction of CaM7 and CNGC14 regulates root hair growth in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 62: 887–896
- Zeng H, Zhu Q, Yuan P, et al (2023). Calmodulin and calmodulin-like protein-mediated plant responses to biotic stresses. *Plant Cell Environ*, 46 (12): 3680–3703
- Zha G, Wang B, Liu J, et al (2016). Mechanical touch responses of *Arabidopsis* TCH1-3 mutant roots on inclined hard-agar surface. *Int Agrophys*, 30: 105–111
- Zhang J, Zou A, Wen Y, et al (2022). *SICML55*, a novel *Solanum lycopersicum* calmodulin-like gene, negatively regulates plant immunity to *Phytophthora* pathogens. *Sci Hort*, 299: 111049
- Zhang Y, Xu S, Ding P, et al (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (42): 18220–18225
- Zhang Z, Hou C, Tian W, et al (2019). Electrophysiological studies revealed CaM1-mediated regulation of the *Arabidopsis* calcium channel CNGC12. *Front Plant Sci*, 10: 1090
- Zhao Q, Zhang C, Jia Z, et al (2015). Involvement of calmodulin in regulation of primary root elongation by *N*-3-oxo-hexanoyl homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 5: 807
- 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