

植物钙调素结合转录因子CAMTA/SR功能的研究进展

曾后清¹, 王国平¹, 王慧中¹, 林金星^{2,3}, 杜立群^{1,*}

¹杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州310036; ²中国科学院植物研究所, 北京100093; ³北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: 在钙信号转导途径中, 钙调素(CaM)作为一种主要的钙感受器, 通过与下游靶蛋白结合调节植物一系列的生理活动。信号响应蛋白(SR)是一类广泛存在于多细胞真核生物中结构保守的钙调素结合型转录因子(CAMTA)。近年来, 人们在植物CAMTA/SR功能的研究上取得了重要的进展。CAMTA/SR在植物的生长发育、防卫反应、通用胁迫反应、抗冻性、抗旱性和激素信号途径等方面发挥了重要的调控作用。本文总结了植物CAMTA/SR的结构特征及生物学功能, 并展望了其研究前景。

关键词: CAMTA/SR; 钙信号; 钙调素; 转录因子; 逆境胁迫; 防卫反应

Functions of Calmodulin-Binding Transcription Activators (CAMTAs) in Plants

ZENG Hou-Qing¹, WANG Guo-Ping¹, WANG Hui-Zhong¹, LIN Jin-Xing^{2,3}, DU Li-Qun^{1,*}

¹College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: As a primary calcium sensor in all eukaryotes, calmodulin (CaM) regulates a wide range of cellular processes by binding to its effector proteins in plants. Among the target proteins of CaM, signal responsive proteins, also named as calmodulin-binding transcription activators (CAMTAs/SRs) comprise a conserved family of transcription factors in all the multicellular eukaryotes examined so far. In recent years, major progresses have been made in the functional analyses of CAMTAs in plants. In this review, we summarize the domain structures of CAMTAs and the functional significance of CAMTAs in defenses against pathogen and herbivore attacks, in regulation of general stress responses, in tolerance to abiotic stresses such as low temperature and drought, and in growth and development of plants. Perspective on future research is also suggested based on our understanding in this topic.

Key words: CAMTA/SR; Ca²⁺ signal; calmodulin; transcription factor; environmental stress; defense response

钙离子(Ca²⁺)是一种广泛存在于真核生物中的重要细胞信使。Ca²⁺介导的信号参与植物生长发育过程以及很多其他生理过程的调控。生物和非生物因子, 如光胁迫、温度胁迫、盐胁迫、植物激素和病原菌等都会引起细胞内Ca²⁺浓度的短暂升高, 从而形成细胞钙信号(Dodd等2010)。不同外界刺激引发的细胞内Ca²⁺浓度变化的持续时间、变化频率和变化幅度各不相同, 这种与具体刺激特异耦联的钙信号也被称为钙签(calcium signature)。钙签编码不同刺激引起的特异信号, 被细胞解读后从而产生不同的生理响应。通常情况下, 细胞内Ca²⁺浓度的变化由Ca²⁺感受蛋白(Ca²⁺ sensor)感知, 再通过调控下游靶蛋白来调节各种细胞

反应(Dodd等2010)。绝大多数Ca²⁺感受蛋白通过一种“螺旋-环-螺旋”结构的EF手单元(EF-hand motif)与Ca²⁺结合。目前, 植物中含EF手单元的Ca²⁺感受蛋白主要有钙调素(calmodulin, CaM)及类钙调素(calmodulin-like protein, CML)(毛国红等2004; Yang和Poovaiah 2003; Poovaiah等2013)、钙依赖型蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)和类钙调神经素B (calcineurin B-like pro-

收稿 2015-01-23 修定 2015-04-27

资助 国家自然科学基金(U1130304和31201679)和浙江省自然科学基金(LY15C020006)。

* 通讯作者(E-mail: liqundu@hznu.edu.cn; Tel: 0571-28865199)。

tein, CBL)(Luan 2009)。

作为真核生物中最重要的Ca²⁺感受蛋白之一, CaM可与下游一系列蛋白相互作用, 从而调节下游靶蛋白的活性。CaM含有4个EF手单元, 它们成对分布在N端和C端, 中间由一个柔性的螺线管结构相连。CaM在结合Ca²⁺后构象会发生显著变化, 两端的EF手单元呈球状, 中间的螺线管结构伸展, 整个CaM显现出标志性的哑铃状结构(Yang和Poovaiah 2003)。植物CaM是一个多基因家族, 比如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有7个编码4种不同CaM蛋白(CaM1/4、CaM2/3/5、CaM6和CaM7)的基因和50个编码CML的基因(McCormack和Braam 2003)。绝大多数情况下, CaM自身没有酶的活性, 但Ca²⁺/CaM复合体可以通过调控下游多种靶蛋白的活性来调节一系列的细胞活动。目前, 人们至少鉴定了50多种不同类型的CaM结合蛋白, 它们的功能涉及到细胞生理活动的各个方面, 如代谢调节、细胞骨架功能、植物激素信号、离子运输、蛋白折叠、蛋白磷酸化和去磷酸化、磷脂代谢和转录调控等(Snedden和Fromm 2001; Yang和Poovaiah 2003; Du和Poovaiah 2005; Bouche等2005; Kim等2009; Poovaiah等2013)。

调控基因的转录被认为是包括Ca²⁺信号在内的很多细胞信号转导的终端。到目前为止, 至少有90个转录因子被鉴定为CaM结合蛋白, 包括CAMTA/SR、MYB、WRKY、NAC、bZIP、CBP60和MADS-box等家族(Du和Poovaiah 2004; Park等2005; Finkler等2007; Popescu等2007; Du等2009; Kim等2009; Reddy等2011; Poovaiah等2013)。CAMTA (calmodulin-binding transcription activator)/SR (signal responsive)是一类广泛存在于真核生物中的含有CaM结合位点的转录因子家族, 也是目前研究得最多的一类CaM结合的转录因子。烟草(*Nicotiana tabacum*)中受乙烯诱导的*NtER1*是最早发现的CAMTA/SR基因(Yang和Poovaiah 2000)。植物CAMTA/SR基因响应一系列环境胁迫(如干旱、盐害、冷害和伤害等)和激素信号[如乙烯、脱落酸(abscisic acid, ABA)、生长素、水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)等](Reddy等2000; Yang和Poovaiah 2000, 2002; Galon等2010; Yang等2013; Wang等2015)。

近年来, 研究表明CAMTA/SR在植物生物胁迫和非生物胁迫反应以及植物生长发育方面发挥了重要的调控作用。本文就植物CAMTA/SR转录因子功能的研究进展进行了总结。

1 植物CAMTA/SR转录因子的结构特征

植物中CAMTA/SR转录因子是一个多基因家族, 拟南芥基因组有6个CAMTA/SR成员, 水稻(*Oryza sativa*)有7个, 大豆(*Glycine max*)有15个, 番茄(*Solanum lycopersicum*)至少有7个(Bouche等2002; Choi等2005; Yang等2012; Wang等2015)。所有CAMTA/SR家族的转录因子都具有保守的功能域模块结构: 从N端依次排列着一个CG-1 DNA结合结构域、一个TIG (transcription factor immunoglobulin)结构域、ANK重复(ankyrin repeat)结构域、一个Ca²⁺依赖型CaM结合结构域(Ca²⁺-dependent CaM binding domain, CaMBD)和串联重复的IQ基序(IQ motif, IQXXXRGXXX)等功能性结构域(Bouche等2002; Poovaiah等2013; Wang等2015)。在这些结构域中, TIG结构域与转录因子的DNA非特异性接触有关, ANK重复与蛋白互作有关, IQ基序可以与CaM或CML结合并且可能不需要依赖Ca²⁺ (Bouche等2002)。有报道表明, AtSR2/CAMTA1中CG-1和TIG结构域之间的区域在酵母细胞中具有转录激活功能(Bouche等2002)。生物信息学分析表明, CAMTA转录因子基本上都含有核定位信号肽(Bouche等2002; Choi等2005; Wang等2015)。亚细胞定位的分析进一步证实AtCAMTA1、AtCAMTA3、AtCAMTA5和OsCBT等植物CAMTA蛋白定位在细胞核(Bouche等2002; Mitsu-da等2003; Choi等2005; Yang和Poovaiah 2002)。

CAMTA转录因子所含有的结构域CG-1是一种选择性DNA结合结构域。最早在欧芹(*Petroselinum crispum*)中克隆到了一个不完整的cDNA克隆CG-1, 其所编码的蛋白可以结合含CGCG的DNA序列(da Costa e Silva 1994)。随后的研究表明, AtCAMTA3/SR1和OsCBT可以结合CG盒(CG-box), 即[A/C/G]CGCG[T/C/G]和[A/C]CGTGT (Yang和Poovaiah 2002; Choi等2005)。值得注意的是, 第一种元件与ABRE的耦合元件(ABRE coupling element, ABRE-CE, [C/A]ACGCG[T/G/C])重叠, 而第二种元件与ABA响应元件(ABA-responsive ele-

ment, ABRE, CACGTG[T/C/G])重叠。有趣的是, ABRE和ABRE-CE这两个元件也被报道为Ca²⁺响应元件(Hobo等1999; Kaplan等2006; Whalley等2011)。CAMTA转录因子结合的顺式作用元件与ABRE之间存在相似性是否意味着CAMTA参与ABA信号转导过程, 这个问题还有待进一步的研究。

2 CAMTA调节植物的生长发育

Galon等(2010)认为拟南芥CAMTA1与生长素信号途径有关。启动子融合*GUS*报告基因表明CAMTA1细胞特异表达的部位与DR5::*GUS*指示的生长素响应位置相似; 生长素运输抑制剂NPA处理使CAMTA1在生长素积累的叶边缘诱导表达, 说明CAMTA1对生长素特异性响应。利用基因芯片进行研究的结果表明, *camta1*突变体中有17个与生长素相关的基因表达上调, 占上调基因总数的27%。另外, *camta1*突变体和RNAi介导的CAMTA1抑制型转基因株系的下胚轴伸长都表现出对生长素超敏的表型。因此, CAMTA1可能参与生长素信号转导途径并调节植物的生长与发育(Galon等2010)。液泡膜H⁺焦磷酸酶AVP1 (vacuolar H⁺-pyrophosphatase)除了可以维持液泡膜的pH, 还可以通过调控生长素的运输调节植物的生长发育(Li等2005)。Mitsuda等(2003)发现, AVP1的转录受CAMTA1和CAMTA5的调控。果实成熟与乙烯信号和Ca²⁺信号都有很大的关系。最近, Yang等(2012)的研究表明, CAMTA可能参与番茄果实的发育和成熟过程的调控。7个番茄CAMTA基因在番茄发育和果实成熟过程中都呈差异性表达, 如*SISR3L*和*SISR4*只在果实组织中表达; 另外, 这些CAMTA基因都受乙烯诱导表达, 并且它们在成熟缺陷突变体*rin* (ripening-inhibitor) 中的表达也都发生了变化(Yang等2012)。

3 CAMTA/SR调节植物对病虫害的免疫反应

植物先天免疫反应包括病原相关分子表征(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)激发的免疫反应(PAMP triggered immunity, PTI)和效应蛋白(effector)激发的免疫反应(effector triggered immunity, ETI), 而诱导性免疫反应包括系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)和诱导性系统抗性(induced systemic resistance, ISR) (Fu和

Dong 2013; Pieterse等2014)。SA在植物先天免疫和SAR中发挥了非常核心的作用(Vlot等2009; An和Mou 2011; Fu和Dong 2013)。近年来, 研究人员发现CAMTA3/SR1在SA介导的植物防卫反应中发挥负向调节作用(Du等2009; Nie等2012; Zhang等2014)。拟南芥SR1功能缺失突变体具有组成性抗病的表型, 如生长受到抑制、叶片黄化并带自发坏死斑点、抗病相关基因*PR1*等的组成性表达和抗病性显著增强等(Galon等2008; Du等2009)。研究表明这些抗病表型与防卫激素SA的过量积累有关。在*sr1*背景下, 过量表达SA降解酶基因*NahG*或者敲除SA合成途径的正向调控因子PAD4 (phytoalexin deficient 4)或ICS1 (isochorismate synthase 1)都可以消除*sr1*组成性抗病的表型(Du等2009)。抗病性分析表明, *sr1*突变体对假单胞菌属致病菌(*Pseudomonas syringae*)和真菌性灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的抗性增强。基因芯片结果表明, *sr1*突变体中32个抗病相关基因(如*WRKY33*、*PR1*、*Chitinase*)的表达上调, 占上调基因总数的32% (Galon等2008)。EDS1 (enhanced disease susceptibility 1)是一个位于SA信号途径上游的免疫调节因子, 可以和PAD4形成复合体并正向调节SA介导的防卫反应(Falk等1999; Feys等2001)。EDS1和PAD4还受到SA的正向反馈调节。进一步的研究表明, SR1可以与EDS1基因启动子区域的CG盒结合, 并抑制EDS1的表达, 从而降低SA的积累及其介导的防卫反应(Du等2009)。此外, 通过改变SR1中CaMBD的氨基酸序列, 发现降低SR1与CaM的结合能力, 可以削弱SR1对EDS1基因和植物免疫反应的抑制。依此推断, Ca²⁺/CaM的结合对于SR1调节植物免疫反应的功能至关重要(Du等2009)。

EDR2 (enhanced disease resistance 2)是植物防御白粉病(powdery mildew, *Golovinomyces cichoracearum*)信号途径中的一个负调节子(Tang等2005)。拟南芥*edr2*突变体对白粉病的抗性增强, 并且抗性的增强与SA途径有关。Nie等(2012)通过筛选*edr2*的抑制子, 发现SR1的功能获得性突变*sr1-4D*可以抑制*edr2*的抗病表型。在*sr1-4D*显性突变体中, *SR1*基因第2564位的C突变成了T, 使得SR1位于第一个IQ基序中的855位的丙氨酸突变成了缬氨酸(A855V)。有趣的是, Jing等(2011)通过大

规模筛选SAR缺失突变体,几乎在同一时间也找到了一个与*sr1-4D*突变位点相同的突变体*camta3-3D*。*camta3-3D*突变体表现出强烈的SAR缺陷,并且对毒性病原细菌(*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326)和卵菌(*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2)的抗性也减弱。*SR1*超表达株系的表型与*camta3-3D*相同。这些结果说明*SR1*可以同时调节植物的防卫反应和SAR (Jing等2011)。但A855V位点的突变为何会增强*sr1-4D/camta3-3D*突变体抗病的能力,目前还不清楚。可能是因为*SR1-4D*与CaM的结合能力增强,也可能是因为*SR1-4D*与CaM结合所需Ca²⁺的浓度更低,这个问题还需要进一步的研究。与EDS1类似,NDR1 (non-race-specific disease resistance 1)也是SA介导的防卫反应的正向调控因子,并且*NDR1*的表达受病原菌的诱导(Century等1997; Shapiro和Zhang 2001)。有趣的是,*SR1*除了调控EDS1的表达,还调控*NDR1*的表达(Nie等2012)。*NDR1*基因启动子区域含有*SR1*所结合的CG盒,并且凝胶迁移实验和染色质免疫沉淀实验都证实了*SR1*与*NDR1*启动子区域的结合。在*sr1*突变体中*NDR1*的表达升高,而在*sr1-4D*突变体*NDR1*的表达降低。在*sr1*背景下*ndr1*的突变还会抑制*sr1*突变体抗病的表型(Nie等2012)。尽管*sr1-4D*突变抑制了*edr2*的抗病表型,但是*SR1*和EDR2之间并没有直接的调控关系(Nie等2012)。一种可能的原因是,*sr1-4D*通过抑制EDS1和*NDR1*基因的表达,阻碍了SA介导的抗病信号途径,从而抑制了*edr2*依赖SA的抗病性。因此,*SR1*通过负向调控植物抗病反应中的两个重要的基因EDS1和*NDR1*,从而在植物免疫系统中发挥重要的调节作用(Du等2009; Nie等2012)。

乙烯在植物的不同发育阶段,如种子萌发、幼苗生长、器官衰老和果实成熟,以及生物和非生物环境胁迫响应等方面发挥了重要的调节作用(李文阳等2013; Merchante等2013)。内质网上的乙烯受体在结合乙烯后将信号传递至蛋白激酶CTR1 (constitutive triple response 1),使CTR1对乙烯信号核心蛋白EIN2 (ethylene-insensitive 2)的磷酸化受抑制,从而使EIN2的C端被切开并转运至细胞核,这样EIN2的C端就可以使EIN3和EIL (EIN3-like)稳定,最终引发乙烯响应基因的表达并产生乙烯信

号反应(Merchante等2013)。研究表明*SR1*除了调节SA介导的防卫反应,还调控乙烯诱导的植物衰老(Nie等2012)。EIN3是乙烯信号反应途径中的一个非常重要的转录因子。体内和体外结合实验都证实了*SR1*与EIN3启动子区域的结合(Yang和Poovaiah 2002; Nie等2012)。EIN3基因在*sr1*突变体中表达升高,但在*sr1-4D*中降低,说明*SR1*负向调节EIN3的表达(Nie等2012)。*sr1*突变体中乙烯诱导的衰老增强,而功能获得的*sr1-4D*突变体则相反。此外,*ein3*突变还可以抑制*sr1*的乙烯诱导衰老的表型,说明*sr1*突变体中乙烯促进衰老的表型与*SR1*对EIN3的调控有关(Nie等2012)。但是*ein3*突变并不能抑制*sr1*突变体对白粉病(活体营养型病原菌, biotrophic pathogen)的抗性,说明*SR1*通过不同的方式调控植物防卫反应和乙烯诱导的衰老(Nie等2012)。一般来说,SA信号在植物防御活体营养型病原菌中发挥重要作用,而JA和乙烯在植物防御死体营养型病原菌(necrotrophic pathogen)中发挥重要作用(Glazebrook 2005)。研究表明*sr1*突变体对活体营养型病原菌(如*Pseudomonas syringae*和*Golovinomyces cichoracearum*)死体营养型病原菌(如*Botrytis cinerea*)的抗性都增强,这可能与*SR1*同时调节SA和乙烯信号途径有关(Galon等2008; Nie等2012)。可见,*SR1*通过调控EDS1、*NDR1*和EIN3基因的表达,同时参与SA和乙烯信号转导途径。

由于*SR1*在植物免疫系统中起负向调节的作用,这就产生了一个疑问,即当病原菌入侵时,植物如何克服这种负向调控。最近,Zhang等(2014)通过酵母双杂交体系在拟南芥中找到了一个*SR1*的互作蛋白SR1IP1 (SR1 interaction protein 1),并且发现SR1IP1是一个基于cullin 3的泛素连接酶E3的底物接头蛋白(substrate adaptor of cullin 3-based E3 ligases),可以调节*SR1*的泛素化和降解。SR1IP1功能缺失突变体对病原菌更敏感,而SR1IP1过量表达植物抗病性增强,说明SR1IP1正向调节植物对病原菌的防卫。病原菌可以促进SR1IP1-cullin 3-E3介导的泛素化途径对*SR1*蛋白的降解,从而解除了*SR1*对植物防卫反应的抑制(Zhang等2014)。但病原菌如何激活SR1IP1-cullin 3-E3的泛素化降解途径还有待进一步的研究。

水稻中CAMTA3/SR1的同源基因OsCBT在植物对病原菌的防卫反应中也发挥相似的功能(Koo等2009)。OsCBT功能缺失突变体生长受到明显抑制,但对水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)和稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)的抗性增强,表明OsCBT也是植物防卫反应的一个负调控因子。但OsCBT在水稻防卫反应中的具体的调控机理仍有待进一步的研究。最近,研究人员通过病毒诱导基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)敲除番茄CAMTA基因,发现其中SISR1和SISR3L负向调节植物抗病反应(Li等2014)。可见,高等植物中CAMTA调节抗病反应的功能具有普遍性。

此外, CAMTA还调节植物对虫害的反应(Laluk等2012; Qiu等2012)。SA积累的*sr1*突变体对食草昆虫真菌蚊(*Bradysia impatiens*)和粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的抗性都显著低于野生型(wild type, WT)。JA是植物防御食草动物的重要激素,并且虫咬会引起JA含量的升高(Howe和Jander 2008),而在*sr1*突变体中虫咬促进JA的升高显著的低于WT(Laluk等2012; Qiu等2012)。在植物防卫反应方面, SA和JA信号之间既可以相互协同,也可以相互拮抗(Bari和Jones 2009),比如SA可以抑制JA生物合成过程中关键的脂氧合酶(lipoxygenase)基因LOX2的表达(Spoel等2003)。因此, SR1可能通过调控内源SA含量调节植物JA的生物合成(Qiu等2012)。在*sr1*突变体中, JA响应型损伤标志基因VSP1(vegetative storage protein 1)的表达显著降低, JA响应基因JR2(jasmonate-responsive 2)也略微降低,而非JA依赖型的伤害响应基因NAR2.1(编码硝酸盐转移蛋白的伴侣蛋白,也称为NRT3.1或WR3)却显著升高(Qiu等2012)。此外, SR1对植物虫害反应的调节还需要CaM的结合;失去CaM结合能力的SR1并不能恢复*sr1*对虫害敏感的表现型(Qiu等2012)。可见, SR1以CaM依赖的方式调节JA依赖型和非依赖型的虫害反应。Laluk等(2012)的研究结果表明, SR1还可能通过调节具备驱虫活性的葡萄糖异硫氰酸盐(glucosinolate, GS)的生物合成来调节植物对虫害的防卫。在对虫害敏感的*sr1*突变体中, GS的含量显著降低,并且参与GS代谢的基因(如IQD1和MYB51)的表达也发生显著变化。

4 CAMTA调节植物的通用胁迫反应

植物具有感受和转导外界环境信号的一系列精巧的机制,通过调整体内生理和代谢水平来适应外界环境的变化。通用胁迫反应(general stress response, GSR),也曾被称为核心逆境响应,是普遍存在于不同物种中进化上保守的应答各种环境胁迫时产生的一系列迅速的基本响应(Kültz 2005; Lopez-Maury等2008)。最新的研究表明,植物GSR受到CAMTA/SR转录因子的正向调控(Benn等2014; Bjornson等2014)。Walley等(2007)首先在拟南芥中发现机械损伤快速响应基因的启动子区富含RSRE元件(rapid stress response element, CGC-GTT);用含RSRE元件的合成启动子驱动融合荧光素酶(luciferase, LUC)报告基因($4 \times RSRE::LUC$)后,发现很多胁迫如机械伤害、冷和病虫害都会快速和瞬时激发RSRE下游荧光素酶基因的表达。因而,这种RSRE被认为是一种胁迫快速响应的GSR元件(Walley等2007)。通过分析已经公开的基因芯片数据, Benn等(2014)发现RSRE元件高度富集在对各种胁迫瞬时和快速响应的基因的启动子区内;具备钙爆发诱导(Ca^{2+} burst)能力的鞭毛蛋白(flagellin 22)和低半乳糖醛酸(oligogalacturonic acid)可以强烈地激发RSRE元件下游荧光素酶基因的表达。另外, Ca^{2+} 的螯合剂EGTA则显著抑制机械伤害对RSRE::LUC的诱导,可见, RSRE的活性与 Ca^{2+} 信号有关。鉴于环境胁迫对 Ca^{2+} 信号途径的快速诱导、 Ca^{2+} 信号激发含RSRE启动子驱动基因表达以及RSRE与CG盒(CAMTA结合的元件,也是 Ca^{2+} 信号调控元件)的相似性, Benn等(2014)进一步通过烟草叶片瞬时表达实验和CAMTA基因的双突变体,发现CAMTA3可以通过RSRE激活下游报告基因的表达,并且RSRE介导的损伤响应受到CAMTA2、CAMTA3和CAMTA4的协同促进。为了进一步发掘GSR信号途径的调节因子, Bjornson等(2014)以 $4 \times RSRE::LUC$ 为背景材料,经过甲磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)突变后筛选到两个LUC活性失控的突变体。其中一个为CAMTA3的功能缺失突变体*camta3-4*,其RSRE活性降低,这也证实了Benn等人(2014)的研究结果,即CAMTA3正向调控RSRE活性。另一个为MEKK1(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1)功

能部分缺失突变体*mekk1-5*, 其RSRE活性升高并且RSRE活性高峰出现的时间提前。*mekk1-5 camta3-4*双突变体分析结果表明CAMTA3处于MEKK1下游, 并且它们在GSR调控上具有不同的作用(Bjornson等2014)。然而CAMTA3与MEKK1介导的MAPK信号级联之间的联系还有待进一步的研究。

5 CAMTA/SR调节植物的低温胁迫反应

低温是一种主要的影响植物生长发育的环境因素。生长在温带的植物在经历适度低温的处理后抗冻性增强, 这种现象称为低温驯化(cold acclimation)(Thomashow 2010)。CBF1-3 (C-repeat/dehydration-responsive element binding factor 1-3)在植物低温驯化过程中发挥了非常重要的调节作用(Medina等2011)。CBF1-3 (也分别称为DREB1b、DREB1c、DREB1a)属于AP2/ERF家族的一类转录因子, 可以与很多冷害响应基因启动子区的CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element)元件(rCCGAC)结合并且调控这些基因的表达(Medina等2011)。Doherty等(2009)发现CBF2启动子区中一段长度为27 bp的序列足以诱导CBF2对低温的响应, 其中保守基序CCGCGT与CAMTA/SR所结合的CG盒(vCGCGb)相符。进一步分析发现, 这个27 bp的片段对低温的响应受到CAMTA3/SR1的正向调控。另外, 其他两个低温快速诱导的基因CBF1和ZAT12 (编码一种锌指蛋白)也可能受到CAMTA3/SR1的直接调控; 它们的启动子区都含有CAMTA3/SR1所结合的CG盒, 并且在*camta3/sr1*中低温对它们的诱导受到部分的抑制。但是, *camta3/sr1*单突变体的抗冻性并没有显著变化, 而*camta1/sr2-camta3/sr1*双突变体的抗冻性则大量降低, 说明CAMTA3/SR1和CAMTA1/SR2可能共同调节植物对低温胁迫的反应(Doherty等2009)。

冻结温度之上的寒冷虽然不会对植物造成直接伤害, 但是会显著影响植物的生长。Scott等(2004)的研究表明, 拟南芥经受5 °C寒冷处理1周后, 体内SA开始显著积累。表达*NahG*基因清除体内SA后, 寒冷温度下植物个体明显增大, 说明SA是导致寒冷状况下植物生长受抑的关键因素(Scott等2004)。拟南芥CAMTA3/SR1功能突变体在25 °C左右的室温下生长状况和野生型没有明显区

别, 体内不积累SA, 但是当温度稍微下降到20 °C左右时, 野生型植株生长正常, 但*camta3/sr1*突变体生长受抑, 体内SA积累显著上升, 说明*camta3/sr1*突变体对温度下降非常敏感(Du等2009)。此外, 在*camta3/sr1*突变体中过量表达*NahG*基因, 或者破坏SA信号通路上的*PAD4*、*EDS5*或*ICS1*基因, 都可以消除其对温度敏感的表型, 说明SA是导致这种温度敏感表型的关键因子(Du等2009)。遗传学证据表明CAMTA3/SR1调控SA的合成位于SA信号通路中PAD4节点的上游, 进一步的分子生物学证据表明CAMTA3/SR1对*EDS1*的调控在其中起到关键作用(Du等2009)。Kim等(2013)的研究表明, 拟南芥CAMTA1-3 (分别对应SR2/4/1)在功能上重叠, 它们都可以抑制SA的生物合成, 并正向调节CBF1-3的表达, 进而影响植物对低温的耐受性; 寒冷温度下SA的增加是通过ICS1合成途径实现的。此外, 在22 °C下, *camta1/2/3*三突变体与双突变体(*camta1/2*、*1/3*、*2/3*)和单突变体(*camta1*、*2*、*3*)相比, SA含量大量增加, 并且与SA积累有关的基因, 如*ICS1*、*CBP60g*和*SARD1*的表达量也升高(CBP60g和SARD1是正向调节*ICS1*的转录因子)。显然, CAMTA1-3都有抑制SA合成的功能。Kim等(2013)的研究还发现3个功能冗余的CAMTA基因中只有CAMTA3的表达受低温诱导, 这或许能解释为什么单基因缺失时, 只有*camta3*突变体对温度下降敏感(Du等2009)。虽然SA是导致寒冷状况下植物生长迟滞的关键因素, 但是SA积累并不能增加植物对冷冻的抗性, 因为不管低温驯化与否, SA缺失突变体*ics1*对冷冻的抗性与WT相比都没有显著的差异。通过比较WT和*ics1*在低温处理下(在低温处理3周, 也即SA积累最高时期)的基因表达谱, 发现有264个低温诱导基因受SA诱导, 占到所有低温诱导基因的27% (Kim等2013)。在常温下, 这些基因在SA积累的*camta1/2/3*三突变体中也诱导表达, 其中很多与SA信号有关, 比如先天免疫反应等。因此, 低温下SA的积累虽然不能提高抗冻性, 但可能会通过启动抗病基因的表达增强植物在低温下对病原菌的防御能力(Kim等2013)。通过比较*camta*双突变体(*1/2*、*1/3*、*2/3*)中CBF1、CBF2和CBF3基因的表达, 研究人员还发现CAMT1-3协同促进CBF1-3对低温的快速响应。此外, 通过比较

WT和*camta1/2/3*在低温处理24 h后的转录谱, 发现有15%的低温诱导基因(128个)受CAMTA1-3的正向调节, 并且这些基因的启动子区富含CAMTA结合的CG盒和CBF结合的CRT/DRE元件, 但只有9个基因属于之前报道的CBF调节子(Vogel等2005)。可见, 受环境温度影响的细胞Ca²⁺信号, 可以通过CAMTA快速重置转录组, 调节植物对低温和冻害等胁迫的反应。

6 CAMTA调节植物的干旱胁迫反应

干旱是农作物产量下降的一个主要原因。Pandey等(2013)认为, 拟南芥CAMTA1参与调节植物对干旱的响应。拟南芥*camta1*突变体在干旱条件下, 表现出对干旱更加敏感、水分利用率降低、光合效率降低和相对含水量下降等的表型。Pandey等(2013)借助基因芯片表达谱分析, 发现干旱条件下*camta1*中很多与渗透平衡、细胞凋亡、DNA甲基化和光合作用有关的基因发生了显著变化, 并且大部分CAMTA1正向调节的基因与细胞质膜和叶绿体相关, 这表明CAMTA1可能在干旱恢复过程中起调节作用。此外, 很多胁迫相关的基因, 如*RD26*、*ERD7*、*RAB18*、*LTPs*、*COR78*、*CBF1*和*HSPs*等在*camta1*中也发生了显著变化, 并且这些基因的启动子区域都富含CAMTA识别的顺式作用元件, 即CG盒(Pandey等2013)。但是, 在干旱反应中CAMTA1所调控的起主要作用的基因还有待进一步的鉴定。最近, Li等(2014)发现番茄*SISRIL*受干旱胁迫诱导表达并正向调节植物抗旱。在VIGS诱导的*SISRIL*沉默的番茄中, 叶片失水增加并且根系生物量下降。植物CAMTA家族的其他成员是否也参与抗旱, 仍需要进一步探究。

7 展望

CAMTA/SR作为CaM结合的一类重要的转录因子, 在植物逆境反应和生长发育中具有重要的调节功能。CAMTA在SA介导的防卫反应和乙烯信号途径中发挥重要作用, 但其是否调节这些激素介导的植物生长发育过程, 目前还不清楚。除了病虫害、通用胁迫、冻害和干旱等逆境外, CAMTA是否还调控其他逆境胁迫反应, 也期待更多的研究。Tokizawa等(2015)最近的研究表明, 拟南芥CAMTA2正向调节了铝激活的苹果酸转运子基因*ALMT1* (aluminum-activated malate transporter

1)的表达, 因而可能调控植物抗铝毒。植物有多个CaM和几十个CML蛋白, 但CAMTA与CaM或CML的结合是否存在偏好性仍然不清楚。CAMTA基因的启动子区含有很多胁迫相关的元件, 但调控CAMTA基因表达的上游调控因子具体有哪些仍不清楚。SR1IP1是抗病诱导CAMTA3泛素化降解途径所需要的E3接头蛋白, 其是否还调节其他生理过程中CAMTA的降解, 也值得进一步研究。虽然通过基因芯片已经发现*camta1*、*camta3*、*camta1/3*和*camta1/2/3*等突变体中有很多基因的表达发生了显著变化, 但是目前所明确的CAMTA调控的下游基因仍非常有限。进一步通过各种途径, 如染色质免疫沉淀-测序(ChIP-seq), 在全基因组范围内鉴定CAMTA调控的靶基因显得非常必要, 这可为全方位挖掘CAMTA的功能或全面分析CAMTA在植物逆境反应和生长发育过程中的调控作用建立基础。植物CAMTA是一个多基因家族, 不同的成员具有功能的特异性也具有功能的冗余性。利用多重突变体和人工microRNA介导的基因家族沉默的方法(Hauser等2013), 有助于分析植物CAMTA家族不同成员各自的功能。此外, 鉴于CAMTA在植物抗病和抗逆中的重要作用, 用TALEN和CRISPR/Cas9方法对重要农作物CAMTA基因的特定位置点进行基因组编辑(Mahfouz等2014), 有助于农业生产上改良作物的抗病性和抗逆性。

参考文献

- 李文阳, 马梦迪, 郭红卫(2013). 植物激素乙烯作用机制的最新进展. 中国科学: 生命科学, 43: 854-863
- 毛国红, 宋林霞, 孙大业(2004). 植物钙调素结合蛋白研究进展. 植物生理与分子生物学报, 30: 481-488
- An C, Mou Z (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. J Integr Plant Biol, 53: 412-428
- Bari R, Jones JD (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol Biol, 69: 473-488
- Benn G, Wang CQ, Hicks DR, Stein J, Guthrie C, Dehesh K (2014). A key general stress response motif is regulated non-uniformly by CAMTA transcription factors. Plant J, 80: 82-92
- Bjornson M, Benn G, Song X, Comai L, Franz AK, Dandekar AM, Drakakaki G, Dehesh K (2014). Distinct roles for mitogen-activated protein kinase signaling and CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR3 in regulating the peak time and amplitude of the plant general stress response. Plant Physiol, 166: 988-996
- Bouche N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm H (2002). A

- novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem*, 277: 21851~21861
- Bouche N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 435~466
- Century KS, Shapiro AD, Repetti PP, Dahlbeck D, Holub E, Staskawicz BJ (1997). NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science*, 278: 1963~1965
- Choi MS, Kim MC, Yoo JH, Moon BC, Koo SC, Park BO, Lee JH, Koo YD, Han HJ, Lee SY et al (2005). Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.). *J Biol Chem*, 280: 40820~40831
- da Costa e Silva O (1994). CG-1, a parsley light-induced DNA-binding protein. *Plant Mol Biol*, 25: 921~924
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 593~620
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF (2009). Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21: 972~984
- Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy ASN, Poovaiah BW (2009). Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, 457: 1154~1158
- Du L, Poovaiah BW (2004). A novel family of Ca²⁺/calmodulin-binding proteins involved in transcriptional regulation: interaction with fsh/Ring3 class transcription activators. *Plant Mol Biol*, 54: 549~569
- Du L, Poovaiah BW (2005). Ca²⁺/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature*, 437: 741~745
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JD, Daniels MJ, Parker JE (1999). *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 3292~3297
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA, Parker JE (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J*, 20: 5400~5411
- Finkler A, Ashery-Padan R, Fromm H (2007). CAMTAs: calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *FEBS Lett*, 581: 3893~3898
- Fu ZQ, Dong X (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol*, 64: 839~863
- Galon Y, Aloni R, Nachmias D, Snir O, Feldmesser E, Scrase-Field S, Boyce JM, Bouche N, Knight MR, Fromm H (2010). Calmodulin-binding transcription activator 1 mediates auxin signaling and responds to stresses in *Arabidopsis*. *Planta*, 232: 165~178
- Galon Y, Nave R, Boyce JM, Nachmias D, Knight MR, Fromm H (2008). Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 582: 943~948
- Glazebrook J (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43: 205~227
- Hauser F, Chen W, Deinlein U, Chang K, Ossowski S, Fitz J, Hannon GJ, Schroeder JI (2013). A genomic-scale artificial microRNA library as a tool to investigate the functionally redundant gene space in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 2848~2863
- Hobo T, Asada M, Kowiyama Y, Hattori T (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant J*, 19: 679~689
- Howe GA, Jander G (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 41~66
- Jing B, Xu S, Xu M, Li Y, Li S, Ding J, Zhang Y (2011). Brush and spray: a high throughput systemic acquired resistance assay suitable for large-scale genetic screening. *Plant Physiol*, 157: 973~980
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight MR, Fluhr R, Fromm H (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive *cis* elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 2733~2748
- Kim MC, Chung WS, Yun DJ, Cho MJ (2009). Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Mol Plant*, 2: 13~21
- Kim Y, Park S, Gilmour SJ, Thomashow MF (2013). Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis*. *Plant J*, 75: 364~376
- Koo SC, Choi MS, Chun HJ, Shin DB, Park BS, Kim YH, Kim MC (2009). The calmodulin-binding transcription factor OsCBT1 suppresses defense responses to pathogens in rice. *Mol Cells*, 27: 563~570
- Kültz D (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol*, 67: 225~257
- Laluk K, Prasad KV, Savchenko T, Celesnik H, Dehesh K, Levy M, Mitchell-Olds T, Reddy AS (2012). The calmodulin-binding transcription factor SIGNAL RESPONSIVE1 is a novel regulator of glucosinolate metabolism and herbivory tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 53: 2008~2015
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Gaxiola R (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310: 121~125
- Li X, Huang L, Zhang Y, Ouyang Z, Hong Y, Zhang H, Li D, Song F (2014). Tomato SR/CAMTA transcription factors SISR1 and SISR3L negatively regulate disease resistance response and SISR1L positively modulates drought stress tolerance. *BMC Plant Biol*, 14: 286
- Lopez-Maury L, Marguerat S, Bahler J (2008). Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet*, 9: 583~593
- Luan S (2009). The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci*, 14: 37~42
- Mahfouz MM, Piatek A, Stewart CN (2014). Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnol J*, 12: 1006~1014
- McCormack E, Braam J (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytol*, 159: 585~598
- Medina J, Catalá R, Salinas J (2011). The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Sci*, 180: 3~11
- Merchant C, Alonso JM, Stepanova AN (2013). Ethylene signaling:

- simple ligand, complex regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 16: 554~560
- Mitsuda N, Isono T, Sato MH (2003). *Arabidopsis* CAMTA family proteins enhance V-PPase expression in pollen. *Plant Cell Physiol*, 44: 975~981
- Nie H, Zhao C, Wu G, Wu Y, Chen Y, Tang D (2012). SR1, a calmodulin-binding transcription factor, modulates plant defense and ethylene-induced senescence by directly regulating *NDR1* and *EIN3*. *Plant Physiol*, 158: 1847~1859
- Pandey N, Ranjan A, Pant P, Tripathi RK, Ateek F, Pandey HP, Patre UV, Sawant SV (2013). CAMTA1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 14: 216
- Park CY, Lee JH, Yoo JH, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee SM, Kim HS, Kang KY, Chung WS et al (2005). WRKY group IIId transcription factors interact with calmodulin. *Febs Lett*, 579: 1545~1550
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, 52: 347~375
- Poovaliah BW, Du L, Wang H, Yang T (2013). Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant Physiol*, 163: 531~542
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Seay M, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 4730~4735
- Qiu YJ, Xi J, Du LQ, Suttle JC, Poovaliah BW (2012). Coupling calcium/calmodulin-mediated signaling and herbivore-induced plant response through calmodulin-binding transcription factor AtSR1/CAMTA3. *Plant Mol Biol*, 79: 89~99
- Reddy AS, Ali GS, Celesnik H, Day IS (2011). Coping with stresses: roles of calcium and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 23: 2010~2032
- Reddy ASN, Reddy VS, Golovkin M (2000). A calmodulin binding protein from *Arabidopsis* is induced by ethylene and contains a DNA-binding motif. *Biochem Biophys Res Commun*, 279: 762~769
- Scott IM, Clarke SM, Wood JE, Mur LA (2004). Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135: 1040~1049
- Shapiro AD, Zhang C (2001). The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127: 1089~1101
- Snedden WA, Fromm H (2001). Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol*, 151: 35~66
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelijs JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K et al (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15: 760~770
- Tang D, Ade J, Frye CA, Innes RW (2005). Regulation of plant defense responses in *Arabidopsis* by EDR2, a PH and START domain-containing protein. *Plant J*, 44: 245~257
- Thomashow MF (2010). Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiol*, 154: 571~577
- Tokizawa M, Kobayashi Y, Saito T, Kobayashi M, Iuchi S, Nomoto M, Tada Y, Yamamoto YY, Koyama H (2015). SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and other transcription factors are involved in *ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1* expression. *Plant Physiol*, 167: 991~1003
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47: 177~206
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J*, 41: 195~211
- Walley JW, Coughlan S, Hudson ME, Covington MF, Kaspi R, BanuG, Harmer SL, Dehesh K (2007). Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element. *PLoS Genet*, 3: 1800~1812
- Wang G, Zeng H, Hu X, Zhu Y, Chen Y, Shen C, Wang H, Poovaliah BW, Du L (2015). Identification and expression analyses of calmodulin-binding transcription activator genes in soybean. *Plant Soil*, 386: 205~221
- Whalley HJ, Sargeant AW, Steele JF, Lacoere T, Lamb R, Saunders NJ, Knight H, Knight MR (2011). Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 4079~4095
- Yang T, Peng H, Whitaker BD, Conway WS (2012). Characterization of a calcium/calmodulin-regulated SR/CAMTA gene family during tomato fruit development and ripening. *BMC Plant Biol*, 12: 19
- Yang T, Peng H, Whitaker BD, Jurick WM (2013). Differential expression of calcium/calmodulin-regulated SRSRs in response to abiotic and biotic stresses in tomato fruit. *Physiol Plant*, 148: 445~455
- Yang T, Poovaliah BW (2000). An early ethylene up-regulated gene encoding a calmodulin-binding protein involved in plant senescence and death. *J Biol Chem*, 275: 38467~38473
- Yang T, Poovaliah BW (2002). A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem*, 277: 45049~45058
- Yang T, Poovaliah BW (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci*, 8: 505~512
- Zhang L, Du L, Shen C, Yang Y, Poovaliah BW (2014). Regulation of plant immunity through ubiquitin-mediated modulation of Ca²⁺-calmodulin AtSR1/CAMTA3 signaling. *Plant J*, 78: 269~281