



植物防御反应早期信号事件研究进展

陈迎迎^{1,2,#}, 蓝金宣^{1,#}, 王姝瑶², 梁圣华¹, 梁文汇¹, 李宝财¹, 赖登产³, 许勇⁴, 李开祥^{1,*},
沈应柏^{2,*}

¹广西壮族自治区林业科学研究院, 广西特色经济林培育与利用重点实验室, 国家林业和草原局八角肉桂工程技术研究中心, 广西木本香料工程技术研究中心, 南宁530002

²北京林业大学, 林木育种国家工程实验室, 北京100083

³广西大容山自治区级自然保护区管理处, 广西北流537400

⁴北流市大里镇乡村建设综合服务中心, 广西北流537400

#并列第一作者

*共同通信作者: 李开祥(lkx202@126.com)、沈应柏(ybshen@bjfu.edu.cn)

摘要: 植食性昆虫是威胁植物生长和发育的重要生物胁迫。植物的固着特性决定了其无法像动物一样逃避外界不良环境因子。在与昆虫长期的协同进化过程中, 植物形成了精细、复杂的防御反应机制以应对昆虫取食。快速信号识别并产生有效的信号转导是植物成功启动防御反应(防御基因表达、促进防御物质积累)的关键。本文对昆虫取食诱导的早期信号事件进行了综述, 包括膜电位(V_m)、 Ca^{2+} 、ROS、 K^+ 、 H^+ 信号, 系统阐述了早期信号事件在植物防御反应中的作用机理, 对现有研究中存在的问题进行了讨论, 旨在为未来植物虫害防御反应研究提供新思路。

关键词: 昆虫取食; 防御反应; 早期信号事件; 膜电位; 第二信使

Advances in early signaling events of plant defense response

CHEN Yingying^{1,2,#}, LAN Jinxuan^{1,#}, WANG Shuyao², LIANG Shenghua¹, LIANG Wenhui¹,
LI Baocai¹, LAI Dengchan³, XU Yong⁴, LI Kaixiang^{1,*}, SHEN Yingbai^{2,*}

¹Guangxi Key Laboratory of Special Non-wood Forests Cultivation and Utilization, Illicium and Cinnamomum Engineering Technology Research Center of National Forestry and Grassland Administration, Guangxi Xylophyta Spices Research Center of Engineering Technology, Guangxi Forestry Research Institute, Nanning 530002, China

²National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

³Guangxi Darongshan Autonomous Region Level Nature Reserve Management Office, Beiliu, Guangxi 537400, China

⁴Village construction Comprehensive Service Center of Beiliu Dali Town, Beiliu, Guangxi 537400, China

#Co-first authors

*Co-corresponding authors: Li KX (lkx202@126.com), Shen YB (ybshen@bjfu.edu.cn)

Abstract: Herbivore insects, as important biotic stress, threaten the growth and development of plants. Due to their fixation characteristics, plants cannot escape from adverse environmental factors like animals. In the long-term co-evolution with insects, plants have formed an elaborate defensive mechanism to

收稿 2022-06-19 修定 2023-02-27

资助 广西特色经济林培育与利用重点实验室课题(JA-20-02-03)、广西基本科研业务费专项(林科202101号)、广西重点研发计划项目(桂科AB22080082)、广西博士后创新支持计划项目(桂科财字[2020]21号)、广西特聘专家专项和广西特色经济林培育与利用重点实验室课题(JA-20-03-03)。

cope with insect feeding. Rapid recognition and effective signal transduction are key to successful initiation of defense responses in plants (defense gene expression promotes accumulation of defense substances). In this paper, we review the early signaling events induced by insect feeding, including membrane potential (V_m), Ca^{2+} , ROS, K^+ and H^+ signals. The mechanism of early signal events in plant defense against herbivore was systematically described. And the existing problems in the current research were discussed, aiming to provide new insights for future research on defense response.

Key words: herbivore feeding; defense response; early signaling events; transmembrane potential; second messenger

昆虫是地球上最丰富的真核生物,种类繁多,数量庞大,其中大约有一半是植食性的,严重威胁着植物生长和发育(Van Poecke 2007)。为抵御昆虫取食,植物在与昆虫数百万年协同进化过程中形成了独特而复杂的防御信号网络。张庆花等(2019)对植物防御反应进行了定义,强调了外界刺激识别和刺激信号转导在实现植物防御中的关键作用。植物防御反应可分为直接防御和间接防御。直接防御主要表现为具有或形成阻碍昆虫取食的物理屏障,或合成对害虫有毒杀作用的次生代谢物质等。间接防御主要表现为释放具有引诱害虫天敌作用的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)等(Maffei等2007a; Baldwin 2010; Zebelo等2012, 2014; 王姝瑶等2021; 李舒雯等2021)。植物能否快速识别外界刺激并做出有效的、可持续的防御反应,决定了植物在复杂环境中的生存能力,区分昆虫取食和产卵以及机械损伤等不同胁迫信号(Zebelo和Maffei 2015; 陈迎迎2020),可能也是植物的节能策略。

昆虫口腔分泌物(oral secretions, OSs)中含有一系列影响植物防御的分子(效应器),其中可能包括触发植物防御反应的激发子,也可能是抑制防御反应的抑制子。Kallure等(2022)对口腔分泌物的组分及其在植物防御反应中的作用进行了综述,认为OSs的特征性组分是蛋白质(比如葡萄糖氧化酶, GOX)和一些小分子物质(脂肪酸氨基酸偶联物, FACs)。OSs特征性组分的差异与昆虫和寄主植物的种类有关,比如甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*) OS中的volicitin (17-hydroxylinolenoyl-L-Gln)可通过与质膜上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)结合触发玉米的防御反应(Truitt等2004);而

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)可有效诱导玉米(*Zea mays*)和豇豆(*Vigna unguiculata*)的防御反应则是因为其OSs中含有一种来自叶绿体ATP合酶的多肽片段(Schmelz等2006)。在自然界中,一种植物往往遭受多种害虫的侵袭,那么植物是如何启动防御反应并避免资源浪费的呢?早期信号事件是植物整合资源的重要方式,不管是生物胁迫还是非生物胁迫均会诱导早期信号的发生,包括电信号、离子/分子跨膜转运、 Ca^{2+} 结合蛋白介导的信号传递等过程。我们可以将昆虫诱导的早期信号理解为是植物在识别持续性机械损伤和OS中所携带的激发子后形成的特异性“防御语言”,这一过程涉及到“化学信号-电信号-化学信号”之间的相互转换。当植物遭受昆虫取食时,细胞膜电位(transmembrane potential, V_m)首先发生变化,随后胞内 Ca^{2+} 、活性氧(ROS)水平迅速升高,之后几分钟内植物的激酶活性和茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号途径(调控植物响应生物和非生物胁迫中最重要的植物内源激素之一,被认为是植物抵御咀嚼式昆虫的核心信号通路)就被启动,防御基因表达和防御物质的积累在1 h左右就可检测到(Zebelo和Maffei 2012a, 2015; Fürstenberg-Hägg等2013)。本文对以 V_m 、 Ca^{2+} 、ROS、 K^+ 和 H^+ 为代表的早期信号进行了综述,旨在通过分析早期信号事件在植物防御反应中的发生规律,建立早期信号间的联系,有助于阐明昆虫诱导防御反应的生理和分子作用机制。

1 电信号

在植物体内,电信号比化学信号传递更快,是进行远距离信号传递的重要形式。植物电信号主要分为4种类型:局部电位(local electrical potential,

LEP)、动作电位(action potentials, APs)、变异电位(variation potentials, VPs)和系统电位(system potentials, SPs)。LEP是一种由环境因子引起的局部电位反应,不能扩散到植物的其他部位,其与受刺激的细胞类型有关(Li等2021)。APs的产生源于环境胁迫引起细胞膜透性的变化导致 V_m 去极化(Ebel和Mithöfer 1998),当 V_m 去极化达到一定的临界阈值时,就产生了APs(Pyatygin等2008)。APs是高等植物中细胞间和细胞内通讯的信息载体(Maffei等2007a; Zebelo和Maffei 2012a),介导了宿主植物对病原体或植食性动物的早期识别。昆虫取食首先在受损部位诱导APs产生,然后沿着维管束传递至其他部位(Ebel和Mithöfer 1998; Volkov和Mwesigwa 2001; Felle和Zimmermann 2007; Maffei等2007b; Zebelo和Maffei 2012a)。APs具有自我传递特性,受损部位细胞产生的APs通过改变邻近细胞的膜电位触发电压敏感的离子通道介导离子跨膜转运,从而使邻近细胞产生APs。因此,APs的传递需要在具有代谢能力的活细胞中进行,在坏死的组织或经过抑制剂处理的组织中无法传递APs (Evans和Morris 2017)。

变异电位(VPs),也称慢波电位(slow wave potential, SWP),与APs不同的是VPs的传递不受组织坏死或抑制剂的影响。长期以来,关于VPs的传递方式有两种理论:一种认为是可扩散化学信号在木质部中的运输触发了远端应激反应;另一种则认为是木质部中的液压信号(蒸腾流)通过激活机械敏感的离子通道触发VPs的长距离传递(Evans和Morris 2017; Nguyen等2018)。但这两种理论都不足以解释VPs的传递。一般而言,VPs在植物中的传递速度约为 $1\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$,但是化学物质扩散速度要慢2个数量级,而液压信号的传递速度要快4~5个数量级。有研究认为,VPs去极化时间较长可能是因为 Ca^{2+} 通道的长期开启,伤信号传递可能与离子通道类型有关。损伤诱导 Ca^{2+} 经由 Ca^{2+} 通道内流,导致损伤诱导的局部VP变化,而采用EGTA (Ca^{2+} 螯合剂)则会抑制这一反应(Katicheva等2015),说明VP的传递依赖于 Ca^{2+} 。在拟南芥中,类谷氨酸受体(glutamate receptor, GLR)被认为在VPs信号传递过程发挥重要作用,*glr3.3 glr3.6*双突变体阻断了

叶片间的VPs传递,而GLR3.3和GLR3.6分别定位于韧皮部和木质部,也说明VPs传递是在木质部和韧皮部进行的(Mousavi等2013; Nguyen等2018)。有报道发现,昆虫取食会引起远端未受损叶片向下运动和叶柄形变,这一过程与VP是同时发生的,而*glr3.3 glr3.6*突变体叶柄形变减弱,肯定了VP的传递与GLR的内在联系(Kurenda等2019)。

SPs是植物响应损伤时产生的一种远距离电信号,作为APs和VPs的备份发挥作用。野豌豆、蚕豆、烟草经海灰翅夜蛾和烟草天蛾取食后,可在茎和叶片中检测到SPs,说明昆虫取食触发了SPs的远距离传递(Zimmermann等2016)。在蚕豆(*Vicia faba*)和大麦(*Hordeum vulgare*)中,对机械损伤的叶片施加一系列的阳离子,可诱导其产生SP,这一过程依赖于 H^+ -ATPase的活性,采用壳梭孢菌素(fusicoccin)激活 H^+ -ATPase活性可以引起SP变化,而施加 H^+ -ATPase抑制剂钒酸盐则会显著抑制SP的传递(Zimmermann等2009)。

植株受损的频率和强度决定了早期信号发生的时间,在植物应激反应中最早被检测到的信号事件是 V_m 和 Ca^{2+} 。昆虫取食释放激发子,会触发植物受损部位强烈的 V_m 去极化,促进局部电信号从受损部位向系统部位的传递。 V_m 去极化与宿主植物、寄生生物种类有关(Zebelo和Maffei 2012a),比如,拟南芥在响应海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)、桃蚜(*Myzus persicae*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)时的 V_m 去极化程度和持续时间上差异很大(Bricchi等2012)。当植物遭受昆虫攻击时,受损部位引入昆虫OS中携带的激发子,电信号从受损部位传递到系统部位依赖于 V_m 的变化。目前认为, V_m 的变化是由于 Ca^{2+} 、 H^+ 、 K^+ 和 Cl^- 离子在质膜内外的不平衡分布导致的,当阳离子(如 K^+ 和 Ca^{2+})进入细胞或阴离子流出细胞时,就会发生质膜去极化(Maffei和Bossi 2006; Maffei等2007a; Zebelo和Maffei 2012a)。此外,昆虫OSs的激发子也参与调节各种通道的活性,触发电信号的产生(Maffei等2007a)。

2 Ca^{2+} 信号

静息状态的细胞质中 Ca^{2+} 浓度较低($\sim 0.000\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), Ca^{2+} 多被储存于质外体、线粒体、液泡、

内质网(ER, 约 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)等细胞器中(Reddy等2011)。当遭受昆虫取食时, 植物细胞通过调节胞内钙库、 Ca^{2+} 通道、 Ca^{2+} -ATPase或 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运体以及各种 Ca^{2+} 结合蛋白活性来平衡 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (cytosolic Ca^{2+} concentration, 胞质 Ca^{2+} 浓度) (Zebelo和Maffei 2012)。质膜和内膜系统上的 Ca^{2+} 特异性通道是促进 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的主要途径。超极化激活的 Ca^{2+} 通道、去极化激活的 Ca^{2+} 通道和电压不敏感的 Ca^{2+} 通道是植物细胞质膜上常见的具有电压依赖特性的 Ca^{2+} 通道(White 2000; Maffei等2004)。其中, 去极化激活的 Ca^{2+} 通道(DACCs)在植物应对昆虫取食时发挥重要作用, 且DACCs对 La^{3+} 、 Gd^{3+} 、异搏定(verapamil)、钌红(ruthenium red)较为敏感(White 2000)。Maffei等(2004)发现, 当利马豆(*Phaseolus lunatus*)遭受海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)取食时, 受损部位发生质膜去极化和强烈的 Ca^{2+} 内流, 当加入电压门控的 Ca^{2+} 通道抑制剂异搏定, Ca^{2+} 内流显著降低, 说明电压门控的 Ca^{2+} 通道参与了*S. littoralis*诱导的利马豆叶肉细胞 Ca^{2+} 内流。而采用 Ca^{2+} 螯合剂EGTA处理后, Ca^{2+} 内流和防御基因表达均被抑制(Maffei等2007a), 说明 Ca^{2+} 内流在启动防御基因表达过程中发挥重要作用。

在植物防御反应中, 环核苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGCs)和GLR在调节 Ca^{2+} 信号中的作用也是不容忽视的。CN-GCs是一类非特异性的阳离子通道(Moeder等2011; Luo等2017; 李可新等2021), 在拟南芥中已鉴定出20个成员, 其中CNGC19可通过介导 Ca^{2+} 内流, 启动植物防御反应, 促进芥子油苷积累, 而*cngc19*突变会导致植株抗虫性下降(Meena等2019; Breeze 2019)。CNGCs家族蛋白其他成员大部分可介导 Ca^{2+} 跨膜转运, 比如AtCNGC5、AtCNGC6、AtCNGC7、AtCNGC8、AtCNGC9、AtCNGC10、AtCNGC14、AtCNGC16、AtCNGC18; 目前报道的只有AtCNGC1和AtCNGC2编码的蛋白对 Ca^{2+} 和 K^{+} 均有通透性(Wang等2019)。GLR在损伤诱导的电信号传递过程中发挥重要作用。当谷氨酸与GLR结合后, 会触发 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高, 受损部位的电信号和 Ca^{2+} 信号随之经由韧皮部和胞间连丝传递至植物远端部位, 促进JA合成, 触发植物系统性防御(Mousavi等2013; Toyo-

ta等2018)。而在拟南芥*glr3.3*突变体中, 损伤诱导的电信号和植株抗虫性均减弱(Nguyen等2018), 也证实了GLR在昆虫诱导的植物电信号的传递和植物防御反应中的关键作用。

植物如何对昆虫取食诱导的 Ca^{2+} 信号进行传递和解码一直是解析植物防御反应机制的重要前沿问题。众所周知, 不同外界刺激引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化在亚细胞定位、滞后时间、振幅和频率方面具有特异性, 因此 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 在空间和时间上的变化也被称为“钙指纹”(Maffei等2007a)。“钙指纹”的解码依赖钙传感器, 比如钙调蛋白(calmodulin, CaM)和AtSR1 (*SIGNAL RESPONSIVE1*)。CaM可通过自身EF-hand与 Ca^{2+} 特异性结合(Dodd等2010); AtSR1属 Ca^{2+} /CaM信号通路蛋白, *atsr1*突变后植株SA(广泛存在于植物体内的重要的内源激素信号分子, 能够调节植物的某些生长发育过程, 逆境条件下可以提高植物抗逆性, 抵抗不良因素造成的伤害)升高拮抗JA途径而使其更易感虫, 在*atsr1*突变体中超表达AtSR1, 植株抗虫性恢复, 而抑制*atsr1*的CaM结合能力, 突变体植株抗虫性不因AtSR1蛋白超表达而恢复(Galon等2008, Laluk等2012, Qiu等2012)。类钙调蛋白(calmodulin-like protein, CML)是植物另一类重要的钙传感器。据报道, 拟南芥中的CML43、CML42均参与植物防御/免疫应答反应(Bender等2014; Vadassery等2012)。类钙调磷酸酶B蛋白(calcineurin B-like protein, CBLs)和CBL互作蛋白激酶(CBL-interacting protein kinases, CIPKs)常以CBL-CIPK复合体的形式在植物防御反应中发挥作用, 比如CIPK26与CBL1或CBL9互作, 增强NADPH氧化酶RBOHF的活性, 促进细胞内ROS迸发(Drerup等2013; Kimura等2013)。因此, CBL-CIPK系统具有多样性、特异性和复杂性, 响应不同胁迫时调控机制极为复杂, 这一过程不仅涉及了 Ca^{2+} 信号的解码, 还涉及 Ca^{2+} 信号与ROS信号的串扰。

3 ROS信号

目前已证实ROS也与昆虫取食诱导的信号长距离传递, 比如促进昆虫取食引起的植物细胞 V_m 去极化(Zebelo和Maffei 2015; Miller等2009)。 H_2O_2 是昆虫取食诱导的常见的ROS活性形式, 其产生依

赖于NADPH氧化酶(respiratory burst oxidase homologs, RBOHs)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase; SOD)。经由NADPH氧化酶和SOD作用产生的 H_2O_2 跨膜进入胞内, 导致胞内ROS迸发, 随后与离子通道等蛋白互作, 比如通过影响 Ca^{2+} 通道促进 V_m 去极化, 进而促进植物细胞信号传导。但RBOHs家族成员在功能上具有一定差异, 比如拟南芥中的RBOHD在响应昆虫和病原菌过程发挥作用, *rbohD*突变会使植株更易受桃蚜(*Myzus persicae*)感染(Miller等2009; Chaouch等2012); 在烟草(*Nicotiana attenuata*)中, 沉默RBOHD会显著降低烟草天蛾(*Manduca sexta*) OSs诱导的ROS水平, 沉默*NarbohD*则易感海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*) (Wu等2013)。不同于RBOHD, RBOHC则负责ATP诱导的ROS生成(Demidchik等2009)。

RBOHs在维持植物免疫与发育的平衡方面发挥重要作用(Hu等2020; Santamaria等2018)。一方面, RBOHs整合 Ca^{2+} 信号, 利用CBL1/9-CIPK26复合体磷酸化RBOH, 促进ROS的产生(Suzuki等2011; Drerup等2013)。ROS的产生又可能进一步促进 Ca^{2+} 内流和钙依赖性蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPKs)互作来增强RBOHs活性。但是, 外界刺激下植物体内的ROS并不会无限积累, 比如CIPK26可直接作用于RBOH负调控ROS的产生(Kimura等2013)。另一方面, *RbohA*和*RbohC*作为HBI1 (homolog of bee2 interacting with ibh 1, 生长相关转录因子)的靶基因作用于HBI1下游, 二者在调控细胞生长方面的作用完全相反。前者参与植物防御反应, *RbohA*突变不影响叶片生长, 但增加了植株丁香假单胞菌感染率; 后者则与植物生长相关, *RbohC*与HBI1结合促进植物生长, *RbohC*突变叶片生长明显被抑制, 但不影响植株丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)敏感性。除*RbohA*和*RbohC*外, *RbohD*、*RbohE*、*RbohF*和*RbohG*在拟南芥叶片生长阶段的表达量较稳定; *RbohB*和*RbohI*则在叶片增殖期表现出高表达, 在扩张期降低(Neuser等2019)。这与“钙指纹”的形成也许有相似之处, 精细的分工模式体现了植物在权衡生长和防御时所启动信号组分的特异性和复杂性, 更多RBOHs成员特异性功能还有待深入解析(陈迎迎2020)。

4 K^+ 信号

K^+ 是植物生长必不可少的大量营养元素, 既可作为植物渗透调节组分发挥作用, 也是植物响应昆虫取食过程重要的早期信号事件, 且 V_m 去极化也依赖于 K^+ 跨膜内流(Wang等2004; Lebaudy等2007; Zebelo和Maffei 2015; Adem等2019)。植物对 K^+ 的选择性吸收和转运依赖于细胞膜上的离子通道或转运体, 这对植物生长、细胞扩增、酶活性和离子平衡等过程至关重要(Mäser等2001)。目前从拟南芥中鉴定出3个 K^+ 通道家族和3个 K^+ 转运体家族, 至少涉及了35个编码基因。在植物体中, K^+ 选择性通道可被分为: Shaker、TPK和Kir-like三种类型, 其中Shaker类型的 K^+ 选择性通道对电压敏感(Lebaudy等2007)。*AKT2*属于Shaker类型弱电压依赖性内向整流 K^+ 通道, 在拟南芥中主要定位在韧皮部、保卫细胞和根中, 调控 K^+ 在这些组织部位的装载。在大豆中, 超表达GmAKT2可以提高植株对大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV)的抗性(Zhou等2013)。在葡萄中, CIPK9与CBL3互作形成CBL-CIPK复合体, 调控Shaker家族 K^+ 通道活性, 进而控制植物细胞 K^+ 稳态(Cuellar等2013; Liu等2013)。这些证据都表明, 内向 K^+ 通道介导的 K^+ 内流参与调节昆虫取食和病毒侵染引起的植物防御反应, Ca^{2+} 信号通过调控 K^+ 通道活性控制细胞对 K^+ 的吸收和转运。

5 H^+ 信号

离子和溶质在植物中的主动运输依赖于跨膜的质子浓度梯度, 质子浓度梯度的产生则依赖于 H^+ -ATPases和 H^+ -PPase (Hasegawa和Bressan 2000; Gaxiola等2007)。 $PM H^+$ -ATPase、 V -ATPase、 V -PPase是植物中主要的质子转运蛋白。其中, $PM H^+$ -ATPase和 V -ATPase利用ATP水解驱动质子转运, V -PPase则利用焦磷酸水解驱动质子转运(Gaxiola等2007; Fuglsang等2010)。静息状态下, $PM H^+$ -ATPase产生的质子动力在很大程度上使细胞膜维持负电位(-120~-180 mV), 这对于吸收养分、气孔运动、韧皮部装载和细胞生长等过程都至关重要(Haruta等2015)。

在番茄中, PM H^+ -ATPase可作为负调节因子参与调控损伤诱导的JA响应基因表达, 抑制或激活 H^+ -ATPase活性可促进或抑制损伤应答相关基因表达(Schaller和Oecking 1999), 但会导致水杨酸(salicylic acid, SA)和病程相关蛋白的积累(Schaller和Frasson 2001)。Kumari等(2019)认为 H^+ -ATPase与GLR功能有相似之处, 可能作用于GLR的下游, 参与调节电信号在韧皮部中的长距离传递。该研究发现, 受损伤的拟南芥叶肉细胞膜会经历迅速去极化和较慢的复极化阶段; 相比于野生型拟南芥, *ahal*需要更长时间复极化, 而功能回补*AHA1*复极化时间又缩短。拟南芥*ahal*突变更有利于植株抵抗海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)的取食, 这可能与*ahal*-7的远端叶片中JA-Ile积累和*JAZ10* (*jasmonate ZIM-domain 10*)基因表达量上调有关(Kumari等2019), 这也进一步证实了损伤诱导的AHA1可作为负调节因子在植物防御反应中发挥作用。但在植物免疫反应和气孔运动过程中, AHA1又具有正向调节作用。比如, 丁香假单胞菌效应蛋白AvrB能够激活JA信号途径是因为其提高了AHA1的泵活性, 促进JA阻遏蛋白JAZ降解(Zhou等2015); Yan等(2015)也发现, 外源MeJA处理拟南芥, 可促进保卫细胞 H^+ 经由 H^+ -ATPase排出胞外, 加速 Ca^{2+} 内流和质膜去极化, 激活外向整流 K^+ 通道, 最终导致气孔关闭。 H^+ -ATPase还参与机械损伤等诱导的系统电位(SPs)的产生(Zimmermann等2009, 2016), 但其在昆虫取食诱导的SP中的作用仍未明晰。

Palmgren等(1988)发现, 外源施加JA合成前体物质亚麻酸和动物源磷脂酶A2 (PLA2), 均可激活PM H^+ -ATPase活性; Haruta等(2015)发现PM H^+ -ATPase羧基末端存在约100-氨基酸长度的R (regulatory) 或自抑制结构域, 是 H^+ -ATPase发生磷酸化较为集中的区域, 这很大程度上决定了 H^+ -ATPase活性。说明, 脂肪酸、磷脂酶的释放以及 H^+ -ATPase的磷酸化是激活 H^+ -ATPase活性的重要因素。

6 总结与展望

综上所述, 在长期进化过程中, 植物形成了自身独特且复杂的防御策略应对生物或非生物胁迫。植物之所以能区分不同的刺激因子, 一是因为细

胞质膜上存在大量的激发子识别受体或感受器, 二是植物识别刺激后可通过早期信号事件形成特异性“语言”进行信号转导, 比如钙指纹。对于植食性昆虫, 植物细胞通过质膜上的特异性模式受体蛋白识别昆虫口腔分泌物中释放的激发子, 进而促进 Ca^{2+} 经由质膜上的各种 Ca^{2+} 通道进入细胞, 胞内 Ca^{2+} 水平的升高一方面促进内向 K^+ 通道的打开造成更强程度的质膜去极化, 进一步促进受去极化激活的 Ca^{2+} 通道和胞内钙库释放 Ca^{2+} ; 另一方面胞内 Ca^{2+} 增加通过激活下游钙响应蛋白和蛋白激酶激活NADPH氧化酶, 促进了 H_2O_2 的产生, 进入胞内的 H_2O_2 可进一步促进胞内 Ca^{2+} 水平升高。增加的 Ca^{2+} 通过下游钙响应蛋白启动JA信号途径促进防御基因的表达。受损部位的胞内 Ca^{2+} 信号通过胞间连丝传递到邻近细胞, 导致邻近细胞离子平衡和膜电位失调, 早期信号得以传递(图1)。

带电离子或分子在细胞膜内外的不均衡分布导致膜电位的变化, 电压敏感的通道蛋白或转运体随之被激活或关闭, 这对于植物应激反应和启动下游防御策略是至关重要的。因此, 我们认为早期信号是植物识别昆虫取食并快速作出防御反应的基础。在过去的几十年, 研究人员一直致力于解码以第二信使 Ca^{2+} 和 H_2O_2 为代表的早期信号事件。相比于 Ca^{2+} 和 H_2O_2 得到的关注, K^+ 、 H^+ 、 Cl^- 等离子在植物防御反应中的作用未得到充分重视。但膜电位、胞内pH、蛋白活性的变化等生物学过程是多种信号离子和分子综合作用的结果。目前针对植物防御反应的研究依然集中在下游防御基因表达和代谢物质积累的分子调控机制方面。尽管已有研究人员提出 K^+ 或可作为第二信使在植物应激反应中发挥重要作用, 但仍然缺乏离子信号间的互作机理研究。早在2003年, Lahner等(2003)就提出了离子组(ionome)的概念, 但近20年过去, 离子组的概念并未得到充分的重视, 加之检测技术的限制加大了解析这些元素生物学功能的难度。比如传统的大量或微量元素的检测多依赖于电感耦合等离子体(inductively coupled plasma, ICP)等方法, 这些方法可实现对不同元素的组织定位和相对含量检测, 但无法确定这些元素的作用形式和动态过程。而可用于实时动态检测离子或分子跨膜转

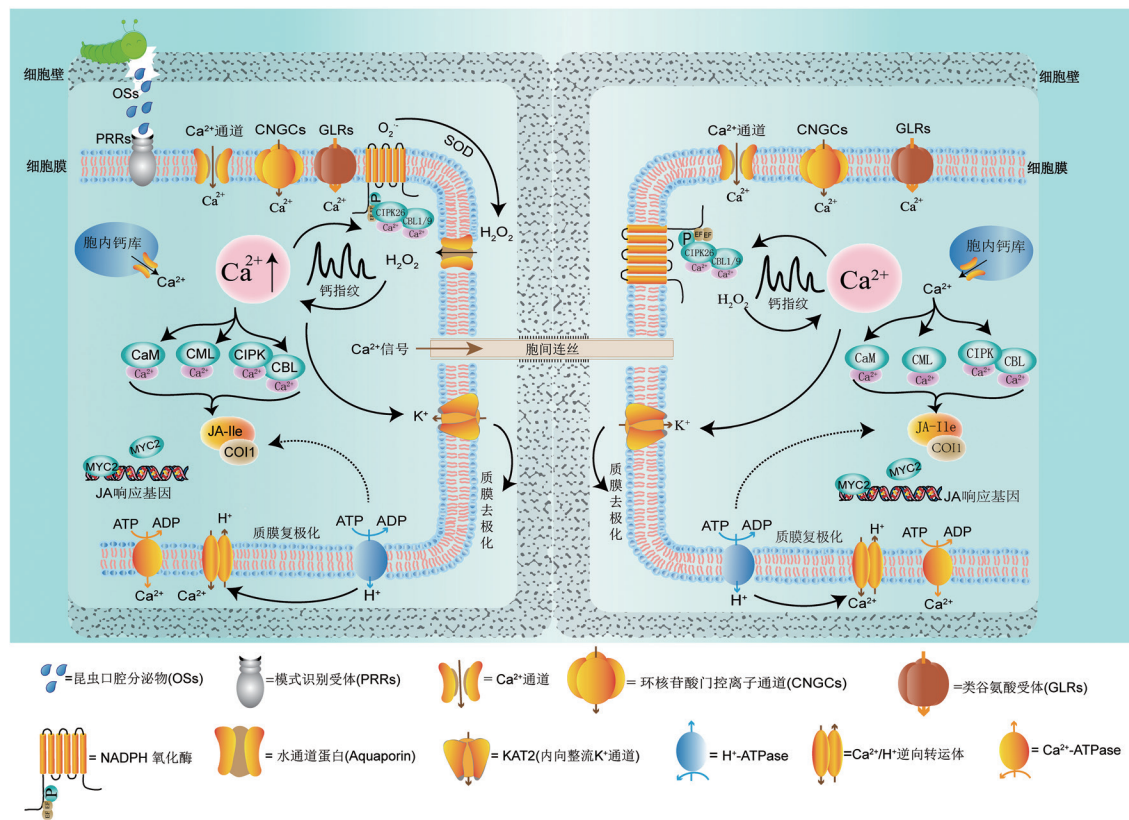


图1 植食性昆虫诱导的植物早期信号传递模式

Fig. 1 The transmission pattern of early signaling events induced by herbivore

SOD: 超氧化物歧化酶; 图中箭头表示在信号传递中的促进作用。

运的非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique), 虽然在一定程度上可实现对 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 H^{+} 、 Cl^{-} 等离子的跨膜转运检测, 但受限于离子交换剂的种类和测试液成分对传感器的干扰, 想要实现离子的高通量测试依然很困难。在未来的研究中, 开发更多经济高效的检测方法, 加速具有重要生物学功能的离子或分子的动态检测, 重视 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 H^{+} 等离子“语言”的解析, 构建早期信号串扰网络, 不仅有助于阐明植物精确识别和响应外界刺激的生理和分子机制, 也将对揭示植物其他生物学过程发生规律具有重要意义。

参考文献(References)

Chen YY (2020). Cross resistance in *Ammopiptanthus nanus* response to salt stress and Herbivore feeding (dissertation). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [陈迎迎(2020). 矮沙冬青响应昆

虫取食和盐胁迫交互抗性研究(学位论文). 北京: 北京林业大学]

Chen YY, Cao CJ, Guo ZJ, et al (2020). Herbivore exposure alters ion fluxes and improves salt tolerance in a desert shrub. *Plant Cell Environ*, 43: 400–419

Baldwin IT (2010). Plant volatiles. *Curr Biol Cb*, 20 (9): R392–R397

Bender KW, Dobney S, Ogunrinde A, et al (2014). The calmodulin-like protein CML43 functions as a salicylic-acid-inducible rootspecific Ca^{2+} sensor in *Arabidopsis*. *Biochem J*, 457 (1): 127–136

Breeze C (2019). State of (In) flux: action of a CNGC Ca^{2+} channel in defense against herbivory. *Plant Cell*, 31 (7): 1423–1424

Bricchi I, Berteau CM, Occhipinti A, et al (2012). Dynamics of membrane potential variation and gene expression induced by *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, and *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *PLOS One*, 7 (10): e46673

Chaouch S, Queval G, Noctor G (2012). AtRbohF is a crucial

- modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J*, 69 (4): 613–627
- Cuellar T, Azeem F, Andrianteranagna M, et al (2013). Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K^+ channel VvK1.2 is activated by CIPK-CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. *Plant J*, 73 (6): 1006–1018
- Demidchik V, Shang ZL, Shin R, et al (2009). Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca^{2+} channels. *Plant J*, 58 (6): 903–913
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61 (1): 593–620
- Drerup MM, Schlucking K, Hashimoto K, et al (2013). The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. *Mol Plant*, 6 (2): 559–569
- Ebel J, Mithöfer A (1998). Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 206 (3): 335–348
- Erb M, Reymond P (2019). Molecular interactions between plants and insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 70 (1): 4.1–4.31
- Evans MJ, Morris RJ (2017). Chemical agents transported by xylem mass flow propagate variation potentials. *Plant J*, 91 (6): 1029–1037
- Felle HH, Zimmermann MR (2007). Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta*, 226 (1): 203–214
- Fuglsang AT, Paez-Valencia J, Gaxiola RA (2010). Plant proton pumps: regulatory circuits involving H^+ -ATPase and H^+ -PPase. *Signal Commun Plants*, 7: 39–64
- Fürstenberg-Hägg J, Zagobelny M, Bak S (2013). Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci*, 14 (5): 10242–10297
- Galon Y, Nave R, Boyce JM, et al (2008). Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 582 (6): 943–948
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007). Plant proton pumps. *FEBS Lett*, 581 (12): 2204–2214
- Haruta M, Gray WM, Sussman MR (2015). Regulation of the plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) by phosphorylation. *Curr Opin Plant Biol*, 28: 68–75
- Hasegawa PM, Bressan RA (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51 (1): 463–499
- Hu CH, Wang PQ, Zhang PP, et al (2020). NADPH oxidases: the vital performers and center hubs during plant growth and signaling. *Cells*, 9 (2): 437–478
- Katicheva L, Sukhov V, Bushueva, et al (2015). Evaluation of the open time of calcium channels at variation potential generation in wheat leaf cells. *Plant Signal Behav*, 10 (3): e993231
- Kimura S, Kawarazaki T, Nibori H, et al (2013). The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of *Arabidopsis* NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *J Biochem*, 153 (2): 191–195
- Kumari A, Chételat A, Nguyen CT, et al (2019). *Arabidopsis* H^+ -ATPase AHA1 controls slow wave potential duration and wound-response jasmonate pathway activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116 (40): 20226–20231
- Kurenda A, Nguyen CT, Chételat A, et al (2019). Insect-damaged *Arabidopsis* moves like wounded *Mimosa pudica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115 (51): 26066–26071
- Lahner B, Gong JM, Mahmoudian M, et al (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 21: 1215–1221
- Laluk K, Prasad KVS, Savchenko T, et al (2012). The calmodulin-binding transcription factor SIGNAL RESPONSIVE1 is a novel regulator of glucosinolate metabolism and herbivory tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 53 (12): 2008–2015
- Lebaudy A, Véry AA, Sentenac H (2007). K^+ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Lett*, 581 (12): 2357–2366
- Li JH, Fan LF, Zhao DJ, et al (2021). Plant electrical signals: a multidisciplinary challenge. *J Plant Physiol*, 261: 153418
- Li KX, Zhao Q, Ding Y, et al (2021). Research progress in plant cyclic nucleotide-gated channels. *Plant Physiol J*, 57 (12): 2235–2246 (in Chinese with English abstract) [李可新, 赵芊, 丁一等(2021). 植物内环核苷酸门控离子通道的研究进展. 植物生理学报, 57 (12): 2235–2246]
- Li SW, Guo ZJ, Jiao CY, et al (2021). Plant defense reaction induced by green leaf volatile cis-3-hexen-1-ol. *Plant Physiol J*, 57 (5): 1001–1006 (in Chinese with English abstract) [李舒雯, 郭洙鹏, 焦春阳等(2021). 绿叶挥发物顺式-3-己烯醇诱导的植物防御反应. 植物生理学报, 57 (5): 1001–1006]
- Liu LL, Ren HM, Chen LQ, et al (2013). A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 161 (1): 266–277
- Luo ST, Zhang X, Wang JF, et al (2017). Plant ion channels and transporters in herbivory-induced signalling. *Funct Plant Biol*, 45 (2): 111–131
- Maffei M, Bossi S (2006). Electrophysiology and plant responses to biotic stress. In: *Plant Electrophysiology-The*

- ory and Methods. Berlin: Springer-Verlag, 461–481
- Maffei M, Bossi S, Spiteller D, et al (2004). Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiol*, 134: 1752–1762
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W (2007a). Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci*, 12 (7): 310–316
- Maffei ME, Mithöfer A, Boland W (2007b). Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68 (22–24): 2946–2959
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, et al (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126 (4): 1646–1667
- Meena MK, Prajapati R, Krishna D, et al (2019). Cyclic nucleotide gated channel 19 (CNGC19) is an important Ca^{2+} channel regulating *Arabidopsis* defense against *Spodoptera* herbivory. *Plant Cell*, 31 (7): tpc.00057.2019
- Miller G, Schlauch K, Tam R, et al (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal*, 2 (84): ra45
- Moeder W, Urquhart W, Ung H, et al (2011). The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity. *Mol Plant*, 4 (3): 442–452
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, et al (2013). GLUTAMATE RECEPTOR LIKE genes mediate leaf to leaf wound signalling. *Nature*, 500 (7463): 422–426
- Nguyen CT, Kurenda A, Stolz S, et al (2018). Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115 (40): 10178–10183
- Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskov P, et al (1988). Modulation of plasma membrane H^+ -ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A2. *Physiol Plant*, 74 (1): 11–19
- Pyatygin SS, Opritov VA, Vodeneev VA (2008). Signaling role of action potential in higher plants. *Fiziologiya Rastenii*, 55 (2): 312–319
- Qiu YJ, 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
- Reddy ASN, Ali GS, Celesnik H, et al (2011). Coping with stresses: roles of calcium-and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 23 (6): 2010–2032
- Santamaría ME, Arnaiz A, Blanca VA, et al (2018). *Arabidopsis* response to the spider mite *Tetranychus urticae* depends on the regulation of reactive oxygen species homeostasis. *Sci Rep*, 8 (1): 9432–9443
- Schaller A, Frasson D (2001). Induction of wound response gene expression in tomato leaves by ionophores. *Planta*, 212 (3): 431–435
- Schaller A, Oecking C (1999). Modulation of plasma membrane H^+ -ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell*, 11 (2): 263–272
- Schmelz EA, Carroll MJ, LeClere S, et al (2006). Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (23): 8894–8899
- Truitt CL, Wei HX, Pare PW (2004). A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell*, 16 (2): 523–532
- Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, et al (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361 (6407): 1112–1115
- Vadassery J, Reichelt M, Hause B, et al (2012). CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera* herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 159 (3): 1159–1175
- Van PRMP (2007). *Arabidopsis*-insect interactions. The *Arabidopsis* Book, 5 (5): e0107
- Volkov AG, Mwesiwa J (2001). Electrochemistry of soybean: effects of uncouplers, pollutants, and pesticides. *J Electroanal Chem*, 496 (1–2): 153–157
- Wang JC, Liu X, Zhang A, et al (2019). A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice. *Cell Res*, 29 (10): 1–12
- Wang SM, Wan CG, Wang YR, et al (2004). The characteristics of Na^+ , K^+ and free proline distribution in several drought-resistant plant of the Alxa Desert. *China J Arid Environ*, 56 (3): 525–539
- Wang SY, Hao X, Qu Y, et al (2021). The role of trans-2-hexenal in plant defense responses. *Chin Bull Bot*, 56 (2): 232–240 (in Chinese with English abstract) [王姝瑶, 郝鑫, 曲悦等(2021). 反式-2-己烯醛在植物防御反应中的作用. *植物学报*, 56 (2): 232–240]
- White PJ (2000). Calcium channels in higher plants. *BBA Biomembranes*, 1465 (1–2): 171–189
- Wu JS, Wang L, Wünsche H, et al (2013). Narboh D, a respiratory burst oxidase homolog in *Nicotiana attenuata*, is required for late defense responses after herbivore attack. *J Integr Plant Biol*, 55 (2): 187–198
- Yan SL, McLamore ES, Dong SS, et al (2015). The role of plasma membrane H^+ -ATPase in jasmonate-induced ion fluxes and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 83 (4): 638–649
- Zebelo SA, Maffei ME (2012). Signal transduction in plant-insect interactions: from membrane potential variations to

- metabolomics. In: Volkov A (ed). Plant Electrophysiology. Berlin, Heidelberg: Springer, 143–172
- Zebelo SA, Maffei ME (2015). Role of early signalling events in plant-insect interactions. *J Exp Bot*, 66 (2): 435–448
- Zebelo SA, Matsui K, Ozawa R, et al (2012). Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicum*) plant-to-plant communication. *Plant Sci*, 196: 93–100
- Zebelo S, Piorkowski J, Disi J, et al (2014). Secretions from the ventral eversible gland of *Spodoptera exigua* caterpillars activate defense-related genes and induce emission of volatile organic compounds in tomato, *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol*, 14 (1): 140
- Zhang QH, Chen YY, Zhang HL, et al (2019). The role of 1-penten-3-one in plant defense responses. *Plant Physiol J*, 55 (3): 225–231 (in Chinese with English abstract) [张庆花, 陈迎迎, 张海龙等(2019). 1-戊烯-3-酮在植物防御反应中的作用. *植物生理学报*. 55 (3): 225–231]
- Zhou L, He HL, Liu RF, et al (2014). Overexpression of GmAKT2 potassium channel enhances resistance to soybean mosaic virus. *BMC Plant Biol*, 14 (1): 154–165
- Zimmermann MR, Maischak H, Mithöfer A, et al (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiol*, 149 (3): 1593–1600
- Zimmermann MR, Mithöfer A, Will T, et al (2016). Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification. *Plant Physiol*, 170 (4): 2407–2419