

## 综述 Reviews

## 烟草损伤信号分子机制及其相关基因表达的研究进展

解敏敏, 程廷才, 王根洪, 夏庆友\*

重庆大学农学及生命科学研究院, 重庆 400044

**摘要:** 植物在遭受机械损伤或食草动物伤害时, 体内的信号应答防御系统立即被激活, 从而激活防御相关基因的表达, 达到自我保护的目的。信号分子如系统素、系统素糖肽前体物质, 是茄科植物中具有信号传导功能的一类多肽, 在损伤信号传导方面起着重要的作用。近年来, 对系统素家族以及茉莉酸等信号传导方面的研究有了很大的进展, 本文着重对烟草中的主要损伤信号分子进行系统的阐述, 并且对损伤后烟草相关基因的表达变化做了简单的归纳与分析, 旨在为烟草的抗虫性、烟叶的储存与加工等方面的研究提供参考。

**关键词:** 系统素; 机械损伤; 食草动物; 茉莉酸

## The Research in Wound Signaling Molecular Mechanism and Wound-Related Genes of Tobacco

XIE Min-Min, CHENG Ting-Cai, WANG Gen-Hong, XIA Qing-You\*

Institute of Agriculture and Life Science, Chongqing University, Chongqing 400044, China

**Abstract:** When suffering from mechanical wounds or herbivore injuries, the signal response defense systems of plants will be activated promptly, which activates the expression of defense-related genes to self-protection. Systemin and HypSys, a group of peptides in Solanaceous family, play important roles in wounding signal transduction. Recently, researches on the signal transduction of systemins and jasmonic acid have a big progress. This review provided references for the research of insect resistance, storage and processing of tobacco leaves, introduced the main wound signaling molecules, and summarized the expression of wounding defense-related genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*).

**Key words:** systemin; mechanical wounding; herbivore; jasmonic acid

当植物遭受机械损伤或食草动物等的伤害时, 会诱导特异的防御应答, 一系列的信号分子在防御应答中合成并相互协调起作用。植物不仅仅对由损伤和食草动物侵袭引起的局部叶片损伤产生应答, 而且也诱导远距离的未损伤叶片的防御应答。这些系统性的防御应答已在番茄(*Solanum lycopersicom*)中广泛地被研究, 番茄中对驱动流动性的损伤信号起着重要作用的是一个叫做系统素(systemin)的18肽小分子(Pearce等1991)。然而, 系统素仅存在于部分茄科植物中, 2001年, Pearce等从烟草叶片中分离出了1个富含羟脯氨酸的系统素糖肽(HypSyspeptides, HypSys)前体物质, 这个含164个氨基酸的前体物质编码2个烟草多肽, 与含200个氨基酸的番茄系统素前体没有序列相似性, 仅与番茄系统素有很弱的序列相似性(Pearce等2001; McGurl等1992)。Pearce和Ryan(2003)在番茄中也分离出了HypSys多肽, 研究发现它们均

参与抗食草动物的防御应答。近年来, 对于系统素家族的研究有了很大的进展, 对其下游茉莉酸类(jasmonic acid, JA)的合成和信号传导途径也有了深入的了解, 茉莉酸信号途径已经证实介入伤害和昆虫侵害防御反应中起着重要的作用。烟草是重要的模式植物以及经济作物, 研究烟草因害虫、物理及采摘引起的机械损伤对其基因表达的影响, 对烟草的抗虫性、烟叶的储存与加工、烟碱及致香成分等研究都有重要意义。本文着重对烟草中的主要损伤信号分子及其相关基因的表达情况进行综述, 以期为其进一步的研究提供参考。

## 1 系统素家族的研究

植物中的防御信号多肽包括系统素(Pearce等

收稿 2010-02-08 修定 2010-04-26

资助 中国烟草总公司科技重大专项(110200902037)。

\* 通讯作者(E-mail: xiaqy@cqu.edu.cn; Tel: 023-65112533)。

1991)、HypSys 多肽(Pearce 等 2001, 2007; Pearce 和 Ryan 2003)以及来自拟南芥的 AtPep1 及其同源物。这些多肽长度为 18~23 个氨基酸残基, 在损伤和茉莉酸诱导下由前体蛋白加工产生, 通过放大信号传导而激活防御相关基因的表达(Huffaker 等 2006; Huffaker 和 Ryan 2007; Pearce 等 2007; Ryan 等 2007)。系统素和 AtPep1 的细胞表面受体已经被分离鉴定(Scheer 和 Ryan 1999; Yamaguchi 等 2006; Holton 等 2007), 但是 HypSys 多肽的受体至今还未被鉴定, 虽然 HypSys 多肽的生物学活性表明它们是通过细胞表面受体进行信号传递的。

系统素首先在番茄叶片中分离得到, 然后在马铃薯(*Solanum tuberosum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)和龙葵(*Solanum nigrum*)等其他几种茄科作物中也相继分离得到了系统素。烟草中分离到的防御信号多肽, 是一种富含羟脯氨酸的系统素糖肽物质, 其在番茄中也含有同源体, 如表 1 所示(Schaller 1999; Ryan 2000; Pearce 等 2001, 2007; Pearce 和 Ryan 2003)。目前研究得最多的仍是最初分离到的番茄系统素。在结构上, 系统素包含碱性氨基酸和酸性氨基酸, 除了烟草和番茄之外, 其他物种的系统素结构具有高度相似性, 如N-端是丙氨酸残基(A)和C-端都是甲硫氨酸-谷氨酰胺-苏氨酸-天冬氨酸(M-Q-T-D)等(表 1)。在烟草、番茄和矮牵牛HypSys多肽序列中都富含羟脯氨酸残基(hydroxyproline), 该糖肽成分对维持其生物活性是必需的(Pearce 和 Ryan 2003; Pearce 等 2007)。

自从 Pearce 等(1991)从被昆虫噬食的番茄叶片中首次发现一个18肽的系统素以来, 人们对系统素及其在损伤信号传导等方面的研究取得了很大的进展。该物质是植物受到外界伤害时产生的多肽分子, 具有信号传导功能, 在植物局部和系统性损伤应答中起着关键作用, 对植物伤害生理方面的研究具有重大意义。系统素的前体物质——系统素原(prosystemin)是一个由 200 个氨基酸残基组成的蛋白质, 具有亲水性, 它包含比较多的极性氨基酸, 如天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和赖氨酸(Lys)(Dombrowski 等 1999)。叶片损伤后, 系统素原转录本被系统性的诱导, 3~4 h后达到峰值(McGurl 等 1992)。因此, 当植物遭受机械损伤或食草动物取食等刺激后, 会诱导系统素原基因的表达, 系统素原进一步被加工为成熟的系统素。系统素与膜表面受体SR160结合后, 会引起一系列的细胞学反应, 例如质膜去极化及离子流形成, 质子及钙离子浓度的增加, 钾离子产生, 钙调蛋白转录本增加, 有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)活化及磷脂酶A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)活性的增强(Scheer 和 Ryan 1999; Stratmann 等 2000)。PLA<sub>2</sub> 作用于膜磷脂使之释放亚麻酸(Narváez-Vásquez等1999), 然后, 亚麻酸在一系列酶的作用下释放产生JA, 激活JA信号途径, 从而使植物体产生抗性。

激活植物防御基因的信号肽被认为是系统素家族的成员(Pearce 和 Ryan 2003), 然而, 一直到现在也没有发现它们具有共同的表现形式。2001年,

表 1 植物中系统素和系统素糖肽物质的氨基酸序列

Table 1 Amino-acid sequences of systemin and HypSys peptides in plants

植物种类	系统素和系统素糖肽	氨基酸序列
番茄( <i>Solanum lycopersicom</i> )	Systemin	AVQSKPPSKRDPPKMQTD
马铃薯( <i>Solanum tuberosum</i> )	Systemin I	AVHSTPPSKRDPPKMQTD
马铃薯( <i>Solanum tuberosum</i> )	Systemin II	AAHSTPPSKRDPPKMQTD
龙葵( <i>Solanum nigrum</i> )	Systemin	AVRSTPPSKRDPPKMQTD
辣椒( <i>Capsicum annuum</i> )	Systemin	AVHSRPPSKRPPPKMQTD
烟草( <i>Nicotiana tobacum</i> )	TobHypSys I	RGANLPOOSOASSOOSKE
烟草( <i>Nicotiana tobacum</i> )	TobHypSys II	NRKPLSOOSOKPADQPR
番茄( <i>Solanum lycopersicom</i> )	TomHypSys I	RTOYKTOOOOTSSSOHQ
番茄( <i>Solanum lycopersicom</i> )	TomHypSys II	GRHDYVASOOOQPKQDEQRQ
番茄( <i>Solanum lycopersicom</i> )	TomHypSys III	GRHDSVLPOOSOKTD
矮牵牛( <i>Petunia hybrida</i> )	PhHypSys I	RSLHKSOOOTOKPSDEQGQ
矮牵牛( <i>Petunia hybrida</i> )	PhHypSys II	RHDYHLSOOOAOOKPADHTGQ
矮牵牛( <i>Petunia hybrida</i> )	PhHypSys III	RGKRLPOOAOEYDPOYHQ

Pearce等从烟草叶片中分离出了一个激活植物防御基因的含164个氨基酸的信号肽前体物质,然而此信号肽前体物质富含羟脯氨酸,是由分泌系统合成的,与含200个氨基酸的番茄系统素前体没有序列相似性,后来将此前体物质称作系统素糖肽前体物质(Pearce等2001; McGurl等1992)。转基因烟草分析表明,通过35S启动子驱动烟草HypSys前体基因表达,烟草叶片中胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitors, TPIs)的水平会升高并且对食草动物的抗性增强(Ren和Lu2006)。系统素家族以及HypSys亚家族中的某些成员作为植物损伤信号途径的早期应答基因,在植物应答于损伤和食草动物侵袭的早期信号传导中起着重要的作用。

烟草系统素糖肽前体HypSys在介导抵抗食草动物烟草天蛾幼虫(*Manduca sexta*)的伤害中的作用已得到了深入的研究(Baldwin2001; Kessler和Baldwin2002)。烟草植株能识别来自天蛾幼虫的侵袭,当其口腔分泌物(oral secretion, OS)中的脂肪酸氨基酸结合体(fatty-acid amino-acid conjugates, FACs)侵入损伤处时,会诱导JA的释放,然后JA诱导二级代谢产物参与直接防御(Halitschke和Baldwin2004),例如TPIs(Zavala等2004)和尼古丁(Baldwin1999);同时会诱导挥发性有机化合物的释放,这种化合物能吸引烟草天蛾幼虫的天敌(Kessler和Baldwin2001)。近来, Berger和Baldwin(2007)通过在二倍体粘毛烟草(*Nicotiana attenuata*)中沉默HypSys和异位超表达来自普通四倍体烟草(*Nicotiana tabacum*)的HypSys,结果显示食草动物刺激和茉莉酸甲酯(methyl-jasmonate, MeJA)诱导都不能增加野生型或转化植株中的HypSys转录本。沉默该基因的植株和野生型植株的表现没有不同;超表达植株与野生型植株相比, HypSys有低水平的组成性表达并诱导少量的TPIs和尼古丁。研究结果显示,富含羟脯氨酸的糖肽前体HypSys在粘毛烟草的抗食草动物防御信号中不起中心作用。Berger和Baldwin(2009)在最近的研究中表明沉默粘毛烟草中的HypSys有可能改变花的形态和自花授粉率。Pearce和Ryan(2003)在番茄中也分离出了HypSys多肽,它参与抗食草动物的防御应答; Narváez-Vásquez等(2007)研究表明番茄HypSys前体和系统素原应答于损伤的协同表达对强烈的系统性信号都是必需的,该研究

首次证实2种毫无关联的多肽共同参与调节长距离损伤信号的传递。因此,对于HypSys潜在多样的功能仍需进一步的探索研究。

番茄中的系统素多肽通过诱导JA信号途径来激活TPIs和其他防御基因的表达(Schillmiller和Howe2005),而它在龙葵中的同源类似物似乎是增强植物的耐受性,并不参与胰蛋白酶抑制剂的激活(Schmidt和Baldwin2008)。来自栽培烟草和番茄中的HypSys多肽被发现能够介导抗食草动物防御信号,而从矮牵牛中分离的HypSys多肽却不能诱导抗食草动物的蛋白酶抑制剂和多酚氧化酶的活性,但它可以激活一个叫做防御素1(*defensin1*)的抗病原菌防御相关基因(Pearce等2007)。系统素基因家族之间以及HypSys亚家族之间功能上的变异性,改变了以前普遍认为其功能保守的看法。

## 2 茉莉酸在损伤信号中的作用

大量的研究资料表明系统素通过激发JA的合成来诱导防御基因的表达(Howe等1996; Ryan2000; Li等2003; Stenzel等2003)。Stenzel等(2003)的研究结果显示系统素水平影响一个植株的JA水平,与野生型植株和反义抑制系统素原的转基因植株相比,损伤超表达系统素原的植株的叶片会引起更多更快的JA水平的增加。Chen等(2006)也观察到在超表达系统素原植株中组成性水平的JA含量比野生型植株高3倍。JA和MeJA作为潜在信号的发现为蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)的诱导表达提供了证据,即茉莉酸类在植物抵抗食草动物诱导防御中起着重要的作用(Farmer和Ryan1992; Howe等1996)。随着研究的不断深入,大量资料显示茉莉酸类是损伤防御应答中的主要信号。学者们正利用多种多样的研究手段,来探讨更多关于茉莉酸类在植物防御中的作用。关于这种信号途径的知识大部分来自于对茄科植物(如番茄、烟草、马铃薯等)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究。

来自野生型植株和缺失突变株如JA合成突变株(*acx1*)、JA感知突变株(*jai1*)和系统素失活株(*spr1*)之间的嫁接试验数据,以及来自超表达系统素原转基因番茄植株的数据显示了茉莉酸类化合物的重要性。JA水平极大的影响防御应答的质量,在嫁接试验中JA缺失会导致接穗中PI合成受阻。系

统素在损伤位点产生JA, 诱导局部的防御应答; JA信号途径中的流动性信号转移到系统性远距离叶片中, 激活系统性的防御应答, 这些流动性的信号诱导远距离未损伤叶片中的PI活性。由于植物体能产生很多生物活性的茉莉酸, 因此目前还未能确定是哪一种茉莉酸从损伤处运输到未损伤组织来激活防御应答(Howe 2004; Li等2004; Schilmiller和Howe 2005)。

JA和它的挥发物MeJA以及JA-氨基酸结合体统称为茉莉酸类物质, 通过级联途径合成。如图1所示(Schilmiller 和 Howe 2005), JA的合成涉及多种酶的参与, 如质体酶脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, FAD)、脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、丙二烯氧合酶(allene oxide synthase, AOS)、丙二烯氧化物环化酶(allene oxide cyclase, AOC), 以及过氧化物酶体中的酰基辅酶A合成酶(acyl-CoA synthetase, ACS)、酰基辅酶A氧化酶(acyl-CoA oxidase, ACX1)、多功能蛋白(multifunctional protein, MFP)、3-酮脂酰辅酶A硫解酶(3-ketoacyl-CoA thiolase, KAT)、硫酯酶(thioesterase, TE)等等。植物在遭受机械损伤或食草动物伤害时, 释放出系统素, 系统素与膜受体的结合会激活亚麻酸(18:3)的合成, 亚麻酸从叶绿体膜中被释放出来, 被13-LOX氧化, 其产物接着被AOS水解和AOC环化, 产生12-氧-植物二烯酸(12-oxo-phytodienoic acid, OPDA), 这个环戊烯酮通过OPDA还原酶(OPDA reductase 3, OPR3)在过氧化物酶体中催化还原, 在3个 $\beta$ -氧化之后得到JA, 然后进入JA途径, 经过一系列复杂的细胞间信号级联反应最终诱导大量防御相关基因的表达。它本身作为JA衍生物的前体可以代谢出很多的衍生物, 如MeJA和JA-Ile(Schaller等2005; Wasternack 2007; Paschold 2008)。在不同的植物种类中, 多个参与JA合成的基因已被分离鉴定(Wasternack 2007)。在拟南芥或番茄中, 某些基因的突变(如LOX、FAD、AOS、AOC等)会导致JA的缺乏。

COI1在茉莉酸类化合物信号传导过程中具有重要的作用, JA信号通路对基因表达的调控均依赖于COI1基因(*coronatine insensitive 1*), 主要存在2种机制。一种是依赖于损伤诱导的JA的生物合成, 然后通过COI1传递信号。COI1是一个富含亮氨

酸重复序列的约66 kDa的F-box蛋白(Kloek等2001)。在拟南芥中, COI1蛋白能够将Skp类似蛋白ASK1和ASK2、CUL1和RING-box蛋白1(AtRbx1)连接成具有生物活性的SCF<sup>COI1</sup>泛素连接蛋白降解复合体(Devoto等2002; Xu等2002), 通过降解某些具有抑制作用的蛋白, 来激活信号传导。另一种则只涉及OPDA, 它通过改变环戊酮环上的电子活性来调节某些伤诱导基因的表达(Farmer等2003)。

近年来, 茉莉酸类化合物信号途径中的其他一些重要组分也已经鉴定出来, 如COP9信号体、JAZ蛋白、转录因子等。遗传研究表明COP9信号体是一些茉莉酸应答的上游调节子(Schwechheimer等2002), 转基因研究显示, 降低COP9信号体功能的转基因植株比野生型植株对MeJA的敏感性降低。近来还发现JAZ蛋白家族中的一些成员是SCF<sup>COI1</sup>复合体的靶蛋白(Thines等2007), JAZ1和JAZ3被认为是茉莉酸诱导的负转录调控子, JA-Ile可促进JAZ和COI1蛋白的相互作用, 引导JAZ蛋白进入泛素-26S蛋白体降解途径(Staswick和Tiryaki 2004), 从而解除其抑制作用。其他伤诱导信号的不断发现增加了茉莉酸信号途径的复杂性, 研究表明其他伤诱导信号如图1中的脱落酸(ABA)、乙烯、一氧化氮(NO)、活性氧类(ROS)、寡聚半乳糖醛酸(OGAs)和FACs等, 它们正面或负面的影响JA信号传导途径。

目前, 有关JA合成的生化途径已有深入的了解, 但是有关JA的受体、JA信号如何传导及如何调控防御基因表达的具体细节等方面还需要进一步的研究。

### 3 损伤后烟草中涉及的分子事件

茉莉酸信号途径研究的第一个突破就是有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的鉴定发现, 它介导烟草中损伤应答基因的表达(Seo等1995)。转录因子在调节基因转录水平上的变化起着重要作用, WRKY家族是植物中一类特异的锌指型转录调控因子, 某些WRKYs是MAPKs的主要靶标, 调节植物发育和胁迫应答的多个方面(Yang等2003; Ülker和Somssich 2004)。当烟草植株遭受损伤或食草动物侵扰后, 会诱导一系列的级联反应(图2): 当烟叶被损伤或食



的防御应答,为植物的损伤防御体系又增添了另一个视角。

除了损伤位点的防御应答,被侵扰叶片的未损伤部分是如何引起应答反应的也已研究清楚。Howe等(1996)发现在损伤番茄叶片的顶部后,高水平的PI转录本在叶片的基部积累,而不是在被损伤叶片的顶端区域。最近, Wu等(2007)研究表明将烟草天蛾幼虫的口腔分泌物涂于烟草叶片的某个损伤区域后,在叶片的损伤位点和未损伤区域都会激活MAPK信号和JA合成,但在相连的邻近叶片中未被激活。因此认为在植物遭受伤害时,一个流动性的短距离信号从叶片损伤位点移动到未损伤部位,并激活激酶信号;另外一个不同的信号被维管系统运输到系统性叶片中激活防御应答,这种信号可能是流动性短距离信号的下游成分。这种流动的短距离信号的鉴定将不仅极大地丰富激酶信号途径的知识,也将为理解植物如何在空间和时间模式上应答于外界刺激提供帮助。

在损伤或食草动物侵袭后,植物在损伤叶片和完整的远距离叶片中都积累防御成分,会诱导系统性的防御应答(Green和Ryan 1972; Wu和Baldwin 2009)。因此,植物体中肯定存在着信号传递,这种流动性信号的性质长期受到争议。最初有人提出这是电子和水压信号(Malone等1994; Stanković和Davies 1997);也有试验证明该信号传递过程有维管运输系统的参与(Orians等2000; Schittko和Baldwin 2003); 1997年, Zhang和Baldwin通过在烟草中使用放射性的JAs表明放射性的 $^{14}\text{C}$ -JA应用到单个叶片上,而后被运输到根部,在那里合成应答于叶片损伤的尼古丁。 $^{14}\text{C}$ -JA运输的时间和数量都与损伤诱导的JA含量变化相似。而且试验还证明外源JA是通过韧皮部来运输的。Li等(2002)研究表明系统素仅参与产生局部伤诱导的JA信号,并不参与长距离的信号传播,系统性的长距离信号可能是JA本身或JA诱导信号。与此相一致的是, Wang等(2008)通过沉默粘毛烟草中的JA-氨基酸结合体(JA-Ile) *jar4/6*, 试验证明JAR和JA在对食草动物防御中的作用不完全相同, JAR活性对局部和系统性的PI诱导都是必需的; 研究还指出JA-Ile在食草动物侵扰后在局部和系统叶片中都合成,但不可能是系统性的长距离信号,这种信号很可能是

JA 或其他的JA代谢物。

综上所述,未来对植物损伤应答领域方面的研究很可能集中在损伤信号的鉴定和分析上,对伤诱导信号途径和其他信号途径相互作用的研究也是很重要的一个方面。对指导伤诱导基因表达的启动子元件和相应的转录因子的研究,也将为通过遗传操作提高植物对胁迫的抗性提供有用的工具。

#### 4 损伤后烟草相关基因的表达

1993年, Pearce等在烟草中分离出了应答于损伤的防御相关蛋白——蛋白酶抑制剂(Pis),但是有关烟草的损伤信号传导网络却知之甚少。直到2001年在烟草中发现了类似系统素的糖肽物质,该物质与番茄系统素结构上的同源性很小,但是在损伤信号传导途径中却起着相似的作用(Pearce等2001)。虽然Berger和Baldwin(2007)研究显示该系统素糖肽前体HypSys在粘毛烟草的抗食草动物防御信号中不起中心作用,但是烟草系统素糖肽物质的发现为烟草防御相关信号网络的研究提供了新的思路,而且补充了茄科植物中的损伤信号途径。因此,对烟草损伤信号途径的研究可以为了了解不同信号传导途径以及不同途径的协调作用提供重要的参考。早在1986年, Ryan等就发现了来自于番茄的蛋白酶抑制剂,之后其他植物中的蛋白酶抑制剂也不断被分离出来。植物蛋白酶抑制剂是分子量较小的多肽或蛋白质,能与相应的酶作用而防止外源性酶对细胞组织的破坏。研究表明,这些蛋白酶抑制剂能与昆虫消化道中的蛋白酶形成酶抑制复合物,从而减弱消化酶的蛋白水解作用而影响昆虫对食物蛋白的消化,影响昆虫体内水分平衡、酶活力调节等,最终导致昆虫非正常发育或死亡,使植物达到自我保护的目的(马建平和牟志美2006)。由此可以推测蛋白酶抑制剂可能是植物抵御外界伤害的一种天然防御体系,是一种具有良好开发前景的新型杀虫剂。但目前,只有大豆、马铃薯、番茄及豇豆中的蛋白酶抑制剂具有较强的抗虫作用(马建平和牟志美2006)。因此,仍需要对植物蛋白酶抑制剂进行更广泛更深入的研究,以期发现更多抗性较强更有效的蛋白酶抑制剂。

到目前,部分防御相关基因已经在多种植物中发现,例如病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PR)、蛋白酶体、壳多糖和多酚氧化酶

类等。PR 蛋白是 1970 年 van Loon 等在 TMV 感染的烟草叶片中发现, 是由 TMV 诱导产生的蛋白 (van Loon 等 1994)。此后, 在多种物种中也相继检测出这种蛋白。PR 蛋白共分为 17 个家族, 种类繁多, 是植物自我防御机制中的可诱导成分, 与植物对病原菌等的诱导抗性有关, 在不同植物中表现为几丁质酶、葡聚糖酶、内肽酶和过氧化物酶等。在烟草中已发现 20 多种酸性 PR 蛋白, 但是有关 PR 蛋白的生物学功能和作用机制仍需进一步的研究。酚类化合物是植物王国中很有影响且分布较广的二级代谢产物, 是衡量烟草质量的一个因素, 它对烟叶色泽和调制特性等方面有着重要的影响。多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是一种可以氧化酚类化合物的氧化还原酶, 分布极广。很多因素如食草动物伤害、病原菌侵染和机械损伤等均可诱导 PPO 的表达 (雷东锋等 2004)。烟草中的 PPO 介导的褐变会影响烟叶和烟丝的色泽和内在品质, 而且 PPO 在烟叶烤制过程中也起着重要的作用。因此, 控制 PPO 的活性, 抑制由它引起的烟叶褐变可以很大程度上提高烟叶的内在品质。PPO 还可以将酚类物质氧化成相应的醌类物质, 这种物质对昆虫类是有毒性的, 因此, PPO 常常被称作对病原菌产生抗性的生化指示剂 (雷东锋等 2004)。Takemoto 等 (2003) 通过抑制性差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 构建了烟草中激发子诱导基因 (*N. tabacum* elicitor-inducible genes, *NtEIGs*) 的 cDNA 库, 该库含丰富的胁迫应答基因如 PR 蛋白基因, 细胞壁蛋白基因等。*NtEIGs* 中某些基因是应答于损伤、伤信号分子 JA 和 MeJA 表达的 (表 2), 其产物参与到植物防御途径的不同阶段及不同过程中。

另外, Nishiuchi 等 (2002) 发现对烟草进行机械

损伤可以激活早期的乙烯应答转录因子 (ethylene-responsive transcription factors, ERFs) 基因转录本等。ERFs 是乙烯应答元件结合蛋白, 特异地结合于 GCC 框, 在烟草中, 乙烯应答元件是由乙烯调节的转录所必须的。烟草中已经有 4 个 ERFs (ERF1~4) 被鉴定。研究发现除 ERF3 是转录抑制子外, 其他 3 个均是转录激活子, 而且编码 ERFs 的基因在损伤诱导的情况下似乎是典型的即时应答或主要应答基因。因此, 通过对 ERFs 的损伤应答表达调节机制的研究, 对理解高等植物中主要损伤应答基因的分子机制以及这些基因在防御应答中的作用是很重要的。Hermsmeier 等 (2001) 从野生型烟草中分离出了应答于损伤、MeJA 和食草动物侵扰的苏氨酸脱氨酶 (threonine deaminase, TD) 基因, 该酶参与异亮氨酸 (Ile) 的合成, 在遭受损伤和食草动物侵扰时表达量增加; TD 基因启动子也已分离出来, 并鉴定了启动子中应答于损伤和 MeJA 的顺式作用元件 (Kang 和 Baldwin 2006)。Kurata 等 (2002) 利用损伤和 TMV 诱导从烟草中分离出了核糖核酸酶基因, 其启动子也已克隆出来 (Hayashi 等 2003); 徐立新等 (2003) 从烟草中分离出伤诱导型过氧化物酶基因 (*tpoxNI*) 及其启动子; 总之, 植物体在应答于机械损伤或食草动物伤害时, 会引起大量的相关基因的表达变化, 到目前, 仍有大量的防御相关基因未被鉴定。虽然关于防御相关基因及其信号传导中化学信号的大量相关信息已经在很多植物种类中被鉴定, 但是在具体植物中防御相关基因详细的工作网络仍未阐明, 因此, 研究植物损伤和食草动物侵袭等引起的基因表达广泛大量的变化是非常必要的。研究植物损伤等胁迫引起的基因表达广泛的变化对防御相关基因工作网络的阐明, 对信号传导途径的研究具有重要的意义。

表 2 抑制性差减杂交法利用激发子诱导构建的烟草 cDNA 库中分离出的损伤诱导基因 (Takemoto 等 2003)

Table 2 Summary of the wound-inducible genes isolated from a cDNA library generated by subtractive hybridization for genes induced in tobacco treated with oomycete elicitor (Takemoto et al 2003)

克隆名称	来自数据库的比对序列 (登录号)	激发子
NtEIG-C08	probable glutathione peroxidase (X60219)	MeJA, SA, 损伤
NtEIG-C29	extensin-like protein (D83226)	MeJA, SA, 损伤
NtEIG-D10	wound-induced protein 1, WUN1 (A01609)	MeJA, 损伤
NtEIG-E17	glycine-rich protein NT16 (D86629)	MeJA, SA, 损伤
NtEIG-E76	$\beta$ -1,3-glucanase-like protein (AAM66024)	MeJA, SA, 损伤

## 5 结语

随着人们对系统素家族以及茉莉酸类化合物等研究和认识的不断深入, 损伤信号传导研究的不断发展, 有关系统素家族和茉莉酸类等信号传导途径有了多方面的了解, 极大地帮助了人们对信号传导网络在植物对逆境胁迫中的作用的认知。虽然很多损伤信号分子已被确定, 但是仍有许多问题需要进一步的阐明, 例如茉莉酸类的受体, 茉莉酸信号通路与其他信号通路的关系等很多方面仍需要进一步的研究。随着研究的深入, 这些问题将会得到解决, 也将为农业增产和病虫害防治等方面提供理论依据。烟草是重要的模式植物和经济作物, 它是茄科植物的代表之一, 具有较高的经济价值, 被誉为“工程植物”。它不仅在细胞及基因工程技术中起着关键性的作用, 而且在遗传育种、植物病虫害研究和大田作物栽培等方面处于重要地位。对植物防御机制的研究, 将来有可能应用在增强农作物对不良环境的抗性, 用于提高产品的质量和品质等方面, 对农业生产的作物病虫害保护方面也是很有意义的。开展研究烟草对机械损伤或病虫害抵抗等的基因表达的特异性, 获得这些生物过程信号传导、基因调控的重要信息, 可为烟叶采摘后储存条件的优化, 以及通过基因工程操作改良烟草的品质、提高烟草的产量和对病虫害的抗性提供重要参考。

## 参考文献

- 雷东锋, 冯怡, 梅建生(2004). 烟草中多酚氧化酶(PPO)的特征. 西北植物学报, 24 (1): 161~166
- 马建平, 牟志美(2006). 植物蛋白酶抑制剂的研究进展. 中国蚕业, 27 (3): 4~8
- 徐立新, 罗越华, 彭世清(2003). 烟草伤诱导型过氧化物酶基因(*tpoxNI*)启动子的克隆及分析. 热带作物学报, 24 (2): 37~41
- Baldwin IT (1999). Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *J Chem Ecol*, 25: 3~30
- Baldwin IT (2001). An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiol*, 127: 1449~1458
- Berger B, Baldwin IT (2007). The hydroxyproline-rich glycopeptide systemin precursor *NapreproHypSys* does not play a central role in *Nicotiana attenuata*'s anti-herbivore defense responses. *Plant Cell Environ*, 30: 1450~1464
- Berger B, Baldwin IT (2009). Silencing the hydroxyproline-rich glycopeptide systemin precursor in two accessions of *Nicotiana attenuata* alters flower morphology and rates of self-pollination. *Plant Physiol*, 149 (4): 1690~1700
- Chen H, Jones AD, Howe GA (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Lett*, 580: 2540~2546
- Devoto A, Nieto-Rostro M, Xie D, Ellis C, Harmston R, Patrick E, Davis J, Sherratt L, Coleman M, Turner JG (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J*, 32: 457~466
- Dombrowski JE, Pearce G, Ryan CA (1999). Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (22): 12947~12952
- Farmer EE, Alméras E, Krishnamurthy V (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol*, 6 (4): 372~378
- Farmer EE, Ryan CA (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129~134
- Green TR, Ryan CA (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*, 175: 776~777
- Halitschke R, Baldwin IT (2003). Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant J*, 36: 794~807
- Halitschke R, Baldwin IT (2004). Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *J Plant Growth Regul*, 23: 238~245
- Hayashi T, Kobayashi D, Kariu T, Tahara M, Hada K, Kouzuma Y, Kimura M (2003). Genomic cloning of ribonucleases in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection, and characterization of their promoters. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 (12): 2574~2583
- Hermesmeier D, Schittko U, Baldwin IT (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol*, 125: 683~700
- Holton N, Caño-Delgado A, Harrison K, Montoya T, Chory J, Bishop GJ (2007). Tomato *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1* is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. *Plant Cell*, 19 (5): 1709~1717
- Howe GA (2004). Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul*, 23: 223~237
- Howe GA, Lightner J, Browse J, Ryan CA (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell*, 8: 2067~2077
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (26): 10098~10103



- Huffaker A, Ryan CA (2007). Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (25): 10732~10736
- Kang JH, Baldwin IT (2006). Isolation and characterization of the threonine deaminase promoter in *Nicotiana attenuata*. *Plant Sci*, 171: 435~440
- Kessler A, Baldwin IT (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2141~2144
- Kessler A, Baldwin IT (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 299~328
- Kessler D, Diezel C, Baldwin IT (2010). Changing pollinators as a means of escaping herbivores. *Curr Biol*, 20 (3): 237~242
- Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, Klessig DF, Kunkel BN (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J*, 26: 509~522
- Kurata N, Kariu T, Kawano S, Kimura M (2002). Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66 (2): 391~397
- Li C, Liu G, Xu C, Lee GI, Bauer P, Ling HQ, Ganai MW, Howe GA (2003). The tomato *suppressor of prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell*, 15: 1646~1661
- Li L, Li C, Lee GI, Howe GA (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (9): 6416~6421
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*, 16: 126~143
- Malone M, Alarcon JJ, Palumbo L (1994). An hydraulic interpretation of rapid, long-distance wound signaling in the tomato. *Planta*, 193: 181~185
- McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1992). Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*, 255: 1570~1573
- Meldau S, Wu J, Baldwin IT (2009). Silencing two herbivory-activated MAP kinases, SIPK and WIPK, does not increase *Nicotiana attenuata*'s susceptibility to herbivores in the glasshouse and in nature. *New Phytologist*, 181: 161~173
- Narváez-Vásquez J, Florin-Christensen J, Ryan CA (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell*, 2 (11): 2249~2260
- Narváez-Vásquez J, Orozco-Cárdenas ML, Ryan CA (2007). Systemic wound signaling in tomato leaves is cooperatively regulated by systemin and hydroxyproline-rich glycopeptide signals. *Plant Mol Biol*, 65 (6): 711~718
- Nishiuchi T, Suzuki K, Kitajima S, Sato F, Shinshi H (2002). Wounding activates immediate early transcription of genes for ERFs in tobacco plants. *Plant Mol Biol*, 49 (5): 473~482
- Orians CM, Pomerleau J, Ricco R (2000). Vascular architecture generates fine scale variation in systemic induction of proteinase inhibitors in tomato. *J Chem Ecol*, 26: 471~485
- Paschold A, Bonaventure G, Kant MR, Baldwin IT (2008). Jasmonate perception regulates jasmonate biosynthesis and JA-Ile metabolism: the case of COI1 in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell Physiol*, 49 (8): 1165~1175
- Pearce G, Johnson S, Ryan CA (1993). Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase isoinhibitors of the potato inhibitors II family. *Plant Physiol*, 102: 639~644
- Pearce G, Moura DS, Stratmann J, Ryan CA (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*, 411 (6839): 817~820
- Pearce G, Ryan CA (2003). Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *J Biol Chem*, 278 (32): 30044~30060
- Pearce G, Siems WF, Bhattacharya R, Chen YC, Ryan CA (2007). Three hydroxyproline-rich glycopeptides derived from a single petunia polyprotein precursor activate *defensin 1*, a pathogen defense response gene. *J Biol Chem*, 282: 17777~17784
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 253 (5022): 895~897
- Ren F, Lu YT (2006). Overexpression of tobacco hydroxyproline-rich glycopeptide systemin precursor A gene in transgenic tobacco enhances resistance against *Helicoverpa armigera* larvae. *Plant Sci*, 171: 286~292
- Ryan CA (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, 1477 (1-2): 112~121
- Ryan CA, Huffaker A, Yamaguchi Y (2007). New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiol*, 9 (8): 1902~1908
- Schaller A (1999). Oligopeptide signaling and the action of systemin. *Plant Mol Biol*, 40 (5): 763~769
- Schaller F, Schaller A, Stintzi A (2005). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J Plant Growth Regul*, 23: 179~199
- Scheer JM, Ryan CA (1999). A 160-kD systemin receptor on the surface of *lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell*, 11 (8): 1525~1535
- Schillmiller AL, Howe GA (2005). Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (4): 369~377
- Schittko U, Baldwin IT (2003). Constraints to herbivore-induced

- systemic responses: bidirectional signaling along orthostichies in *Nicotiana attenuata*. *J Chem Ecol*, 29: 763~770
- Schmidt S, Baldwin IT (2008). Down-regulation of systemin after herbivory is associated with increased root allocation and competitive ability in *Solanum nigrum*. *Oecologia*, 159 (3): 473~482
- Schwechheimer C, Serino G, Deng X-W (2002). Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. *Plant Cell*, 14: 2553~2563
- Seo S, Okamoto M, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y (1995). Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science*, 270: 1988~1992
- Stanković B, Davies E (1997). Intercellular communication in plants: electrical stimulation of proteinase inhibitor gene expression in tomato. *Planta*, 202: 402~406
- Staswick PE, Tiryaki I (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2117~2127
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C (2003). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J*, 33: 577~589
- Stratmann J, Scheer J, Ryan CA (2000). Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a  $\beta$ -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (16): 8862~8867
- Takemoto D, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2003). Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. *Physiol Plant*, 118 (4): 545~553
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>CO11</sup> complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448: 661~665
- Ülker B, Somssich IE (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 491~498
- van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep*, 12 (3): 245~264
- Wang L, Allmann S, Wu J, Baldwin IT (2008). Comparisons of LIPOXYGENASE3- and JASMONATE-RESISTANT4/6-silenced plants reveal that jasmonic acid and jasmonic acid-amino acid conjugates play different roles in herbivore resistance of *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol*, 146: 904~915
- Wasternack C (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction, and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, 100: 1~17
- Wu J, Baldwin IT (2009). Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ*, 32: 1161~1174
- Wu J, Hettenhausen C, Meldau S, Baldwin IT (2007). Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell*, 19: 1096~1122
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D (2002). The SCF<sup>CO11</sup> ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 1919~1935
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA (2006). The cell surface leucine-rich repeat receptor for *AtPep1*, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (26): 10104~10109
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, 320: 3~21
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui DQ, Baldwin IT (2004). Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiol*, 134: 1181~1190
- Zhang ZP, Baldwin IT (1997). Transport of [2-<sup>14</sup>C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. *Planta*, 203: 436~441