

植物抗病防卫反应中的特异性钙信号

张蓓 刘刚 王冬梅*

(河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要 在植物细胞中, 钙离子是普遍存在的第二信使, 参与多种信号途径。大量研究表明, 钙信使系统参与植物与病原菌互作的信号转导过程。近些年来, 特异性钙信号在抗病中的作用越来越受到关注。文章综述了近年来在植物表达防卫反应过程中特异性钙信号的形式及其形成的生理机制的研究进展。

关键词 钙信号; 防卫反应; 钙通道

钙离子(Ca^{2+})是普遍存在的信号分子, 它通过浓度的时空变化, 把胞外信号传递到胞内。植物细胞在众多因素刺激下, 都使用细胞内 Ca^{2+} 作为第二信使来调节植物生长、发育、抗逆等生理反应^[1]。这种简单的胞质 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)变化为什么能够调控如此多的生理反应? 植物细胞内的钙信号系统是如何感受、区分不同的外界刺激, 并调节下游特异性生理反应的? 如脱落酸(abscisic acid, ABA)和生长素都可以诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 水平上升, 但ABA最终会引起气孔关闭, 而生长素的作用却与之正好相反^[2]。这种由不同刺激引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 水平上升为什么产生的效果会有如此大的差异^[3]? 根据近年来的研究结果, 人们推测不同的外界刺激因素能够产生特异性钙信号或有 Ca^{2+} 介导的特异性信号通路, 并提出了这种特异性产生的两种可能模式: 一种模式是 Ca^{2+} 可以独立诱导细胞反应, 钙信号本身具有特异性, 特异性的 Ca^{2+} 变化决定生理反应的特异性, 被称为钙指纹假说^[4]。另一种模式是刺激因素除引起钙信号外还可以产生其他介导因子, 胞质中不同的介导因子组合起来决定反应特异性, 这与核苷酸组成密码子的方式极其相似^[5]。钙信号本身不具有特异性, 它只是起到一个化学开关的作用, 真正的特异性体现在不同的介导因子间组合的方式不同, 这称为钙化学开关假说。

近些年来, 人们认识到钙信使系统参与植物抗病性表达过程并已证实钙信号是病原菌侵染后产生的早期反应之一。本文将结合近几年的研究进展, 着重介绍植物在表达抗病防卫反应过程中特异性钙信号的形式及其形成的生理机制。

1. 特异性的钙信号

植物能够利用 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化的时空特征信号途径

来感受一些外来刺激^[1], 根据刺激的性质和强度 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 发生变化的形式有多种, 如 Ca^{2+} 瞬变(calcium transient)^[6]、钙振荡(calcium oscillation)^[7]、钙波(calcium wave)^[8]等, 人们把这些不同形式的钙信号统称为 Ca^{2+} 签名(Ca^{2+} signature), 即特异性的钙信号。在植物与病原菌互作过程中, 不同体系所呈现的钙信号也有所不同(表1)。

1.1 Ca^{2+} 瞬变

Ca^{2+} 浓度先升高后降低的变化模式称为钙瞬变, 是最为常见的一种 Ca^{2+} 签名模式^[1]。许多刺激因素, 如冷胁迫、缺氧胁迫、低渗透压胁迫等都能引起植物细胞内单一 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的瞬时变化。这种细胞内 Ca^{2+} 瞬变在变化幅度、动力学特征、空间分布特征上各不相同, 表现出巨大差异。不同刺激类型导致不同特征形式的钙瞬变, 钙瞬变的幅度受刺激强度的影响并决定最终的反应水平。

人们发现, 在不同的研究体系中, Ca^{2+} 能以钙瞬变的形式参与植物防卫反应的表达。如激发子寡聚半乳糖醛酸在拟南芥幼苗细胞中能够诱导一个快速、明显、瞬间的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高, 大约15 s达到高峰, 这种钙信号能够引起防卫相关基因CHS、GST、PAL和PR-1的表达^[9]; 而从洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)细胞壁外部提取的脂多糖类激发子只能在烟草细胞中引起弱的、瞬间的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高^[10]。以上这些研究表明, Ca^{2+} 的确能以钙瞬变

收稿日期: 2008-03-27 接受日期: 2008-06-30

国家自然科学基金(No.30671244), 植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(No.PPB04006), 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(No.08965505D), 河北省自然科学基金(No.303180, No.C2005000220, No.C2007000515)资助

* 通讯作者。Tel: 0312-7528276, E-mail: dongmeiwang63@hotmail.com

表1 不同植物-激发子互作体系中特异性的钙信号

病原菌	寄主植物	特异性的钙信号	参考文献
寡聚半乳糖醛酸(oligogalacturonic acid)	拟南芥幼苗	快速升高	[9]
脂多糖类激发子(lipopolysaccharides)	烟草悬浮细胞	快速升高	[10]
内切壳多糖酶(endochitinase)	大豆悬浮细胞	快速升高	[11]
Pep-13	欧芹	缓慢升高	[12]
结瘤因子(Nod factor)	大豆根毛细胞	钙振荡	[13]
脱乙酰壳多糖(chitosan)	拟南芥保卫细胞	钙振荡	[14]
酵母激发子(yeast elicitor)	拟南芥保卫细胞	钙振荡	[14]
隐地蛋白(cryptogein)	烟草	钙波	[15]
β -葡聚糖激发子(β -glucan elicitor)	大豆悬浮细胞	钙波	[16]
多聚半乳糖醛酸内切酶1 (endopolygalacturonase 1)	葡萄藤	钙波	[17]

的信号形式参与植物防卫反应的信号途径。与上述两个结果不同, Blume 等^[12]用激发子 Pep-13 刺激欧芹 (*parsley*) 细胞, 首先出现一个 30~40 s 的停滞期, 之后 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 迅速增加, 2 min 后达到最大, 随后缓慢下降, 10~40 min 内降到 300 nmol/L。作为比较, 他们用从 *P. sojae* 细胞壁中提取的一种 40 kDa 的糖蛋白作为激发子处理欧芹细胞, 来检测 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化。出人意料的是, 这种糖蛋白没有引起像 Pep-13 诱发的钙离子瞬时高峰, 而是缓慢的持续的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高, 但这两种瞬时的钙变化都促使了植保素的合成。作者进而提出瞬时的 Ca^{2+} 高峰并不是诱发防卫反应的关键, 它可能只是一个化学开关, 只要胞质中 Ca^{2+} 浓度达到一定阈值, 就能引发相应的生理反应, 并不体现特异性的作用。

1.2 钙振荡

植物细胞对刺激起反应的另一种钙信号方式是重复性的钙浓度增加, 称为钙振荡。钙振荡是由细胞内钙库的持续性充盈和排空引起的。

钙振荡使钙信号可以用振幅和频率信号双重编码, 从而丰富了信号的多样性。钙振荡方式与外源刺激的类型和强度有关, 不同的刺激因素诱导植物细胞内产生振幅、频率各不相同的特异性的 Ca^{2+} 振荡方式, 最后导致不同的生理学反应^[18]。钙振荡最初发现于玉米胚芽鞘和鸭趾草保卫细胞, 后来在大豆根瘤菌结瘤因子刺激后的根毛细胞内也发现了钙振荡。用结瘤因子处理根毛细胞后, 会产生特异性的钙振荡, 进而促进根毛质膜的去极化、根毛细胞的碱性化及细菌的侵染^[13]。使用 10 μ g/ml 脱乙酰壳多糖或酵母激发子来刺激拟南芥保卫细胞时, 发现这些刺激能够引起细胞重复性的钙升高, 这种特异性的钙振荡能够产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 并导致气孔关闭^[14]。

1.3 钙波

钙波是细胞内部 Ca^{2+} 在细胞内某一个位点开始升高, 并从该位点沿着一定方向向周围扩散的现象。钙波的产生与 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)有关系。一些刺激可以引起植物细胞内产生 IP_3 , 细胞内钙库膜上对 IP_3 敏感的 Ca^{2+} 通道带有两个位点, 一个是 IP_3 结合位点, 另一个是 Ca^{2+} 结合位点。当一个 IP_3 依赖性通道开放后, 通道周围的 Ca^{2+} 浓度增加, 附近通道上的 Ca^{2+} 结合位点与 Ca^{2+} 结合, 迅速开放。 Ca^{2+} 浓度的升高促使附近其他通道打开, 这种由钙诱导钙的进一步释放, 使钙离子从一个部位开始升高, 并向前推进, 即形成了钙波^[8]。

不同的刺激信号会诱导植物细胞产生形状、形式、动力学各不相同的钙波^[19], 这种特异性的钙信号在植物细胞应答激发子刺激的互作体系中较为常见。用隐地蛋白(cryptogein)和 OGs 两种激发子处理表达水母发光蛋白基因的烟草悬浮细胞后, 检测 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的变化, 观察到不同激发子引起的钙波在强度、动力学形态、持续时间等方面不同^[15]。用隐地蛋白处理 5 min 后 Ca^{2+} 浓度达到最高峰值(2.4 μ mol/L), 之后下降到 0.35 μ mol/L, 马上出现第二次 Ca^{2+} 升高, 20 min 时达到 0.75 μ mol/L, 然后缓慢下降, 但并不回到静息态。相反, 由 OGs 引起的钙波, 在 60~90 s 内瞬间升高到 1.3 μ mol/L, 4 min 时达到第二次 Ca^{2+} 峰, 15~20 min 内回落到静息态水平。这种由隐地蛋白引起的持续的 Ca^{2+} 升高能够激活 MAPK, 继而引起过敏性细胞死亡, 而 OGs 则不能。上述结果表明, 这种持续的 Ca^{2+} 升高可能是一种特异性的钙信号, 它能够引起防卫反应的发生。

类似的现象在很多互作体系中都有发现。用 *P. sojae* 衍生的 β -葡聚糖或甲壳质激发子刺激转水母发光蛋白基因的大豆细胞, 发现两种激发子都能使胞质

Ca^{2+} 出现两个瞬间升高的峰, 但它们诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的动态变化是不同的。β- 葡聚糖诱发的钙信号是长时间的、持续的, 且明显和大豆抗毒素的生成相关。而甲壳质激发子诱发的钙信号却和 β- 葡聚糖相反。这种 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 长时间持续较高水平, 对于防卫相关基因的激活和最终大豆抗毒素的生成是必要的^[16]。此外, 多聚半乳糖醛酸内切酶 1 (BcPG1) 具有葡萄藤防卫反应中典型激发子的特征, 在转水母发光蛋白的葡萄藤细胞中, 它能够引起双相、持续的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增加。这种钙变化引起 NO 的产生, 继而产生 ROS, 激活防卫基因的表达, 促进植保素的合成^[17]。但是 Kadota 等^[20] 在用隐地蛋白处理烟草 BY-2 细胞时, 发现隐地蛋白引起的瞬间的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高具有两个不同的峰, 激发子刺激后经过 (137 ± 5) s 到达第一个峰值, 之后下降, 在 (362 ± 7) s 时到达第二次高峰, 随后逐渐回复到静息态水平。这种特异性的钙反应能够引起过敏性细胞死亡。综合上述研究结果, 在植物细胞应答不同病原物或激发子刺激时, 普遍采用不同形式的特异性钙信号来感应刺激并做出相应的防卫反应。

2 特异性钙信号产生的生理机制

在高度区域化的植物细胞内, 质膜、液泡膜、内质网膜上都存在跨膜的 Ca^{2+} 电化学梯度, 细胞质和细胞核内游离 Ca^{2+} 也呈现不均匀分布, 这些梯度在细胞静息状态下是相对稳定的, 一旦细胞受到刺激会导致胞质 Ca^{2+} 浓度发生变化, 从而产生钙信号。 Ca^{2+} 梯度是钙信号产生的基础。 Ca^{2+} 自细胞外或细胞内钙库进入细胞质的主要路径是质膜和内膜系统中的钙离子通道, 通道中有控制通道开关状态的感受器, Ca^{2+} 向胞质流入的动力学和空间分布特征依赖于 Ca^{2+} 所通过的通道性质和流入的速度。高等植物细胞中存在着多种不同空间分布的、不同开放调控机制的 Ca^{2+} 通道参与到各种不同的刺激-偶联反应中。不同的刺激信号通过活化不同的 Ca^{2+} 通道产生具有特定时间和空间特征的钙信号, 保证刺激与反应之间的高度特异性。所以, 要弄清楚特异性钙信号的形成机制, 明确 Ca^{2+} 来源是关键。钙信号可以直接由质外体钙库内流产生, 也可由胞内钙库释放产生, 还可以由两方面共同作用而形成。

2.1 胞外 Ca^{2+} 在胞质特异性钙信号形成过程中的作用

在跨膜的钙离子电化学梯度区域, 跨越细胞质膜的 Ca^{2+} 梯度最为明显, 未受刺激的细胞胞质中自

由 Ca^{2+} 水平为 10^{-7} mol/L, 质外体 Ca^{2+} 浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/L, 比细胞质高出几个数量级, 这一梯度由 ATP 水解释放的自由能维持, 细胞受到刺激时, 跨越细胞质膜的钙离子内流会明显提高细胞内钙离子浓度。

在许多植物细胞与激发子互作体系中都证明胞外 Ca^{2+} 内流在诱导防卫反应过程中发挥重要作用。比如, 大豆、胡萝卜、欧芹和烟草, 在这些体系中, 胞外 Ca^{2+} 浓度的降低, 使植保素的合成受到部分抑制。在大豆、胡萝卜体系中, 在没有激发子参与的情况下, 使用 Ca^{2+} 载体 A23187 即可诱导细胞合成植保素^[21,22]。在大豆体系中, La^{3+} (质膜钙通道抑制剂) 的存在使激发子处理诱发的植保素合成受到抑制^[21]。上述实验均表明, 激发子诱发的 Ca^{2+} 内流形成钙信号, 并与植保素合成有一定关系。在豇豆-豇豆锈菌的互作体系中, 人们发现 Ca^{2+} 参与了过敏性反应 (hypersensitive response, HR), 而且利用乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸 [ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA] 和 Ca^{2+} 通道抑制剂抑制胞质 Ca^{2+} 浓度的升高, 可延迟过敏反应的发生^[23]。为明确胞外 Ca^{2+} 在防卫反应中的作用, 我们借助 Ca^{2+} 荧光染料的装载和激光共聚焦显微镜观察, 对激发子刺激后原生质体 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化进行了研究。当抗性小麦品种洛夫林 10 叶肉细胞原生质体受到激发子刺激时, 激发子能够诱发 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高, 我们分别使用 Ca^{2+} 螯合药物 EGTA 和质膜钙离子通道抑制剂 La^{3+} , 都明显抑制了激发子诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 峰, 初步表明 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高可能主要依赖于胞外 Ca^{2+} 的内流。接着我们采用焦锑酸钾沉淀法, 并结合电镜观察, 对叶锈菌侵染过程中不同抗性小麦品种叶片胞质 Ca^{2+} 分布进行了亚细胞定位, 较为直观地反映出在不亲和组合中, 小麦-叶锈菌互作早期 Ca^{2+} 由胞间隙通过细胞壁、质膜, 进入胞质的过程, 从原位水平再现了 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的钙来源, 这一结果与在激发子-原生质体互作体系中观察的结果类似(结果未发表)。另外, 我们又利用活体药理学试验证明 EGTA 螯合外源 Ca^{2+} , verapamil 或 La^{3+} 阻断胞外钙的进入, 均明显抑制小麦对叶锈菌侵染诱发的防卫反应, 而且这种抑制作用有浓度依赖性, 而使用 A23187 可以增强相应的防卫反应^[24]。综合上述结果, 我们证明胞外钙内流形成的钙信号是诱发防卫反应的重要条件。

近几年, 随着植物钙通道基因的克隆和质膜钙通道突变体的研究深入, 人们对质膜上钙通道对胞质钙

浓度升高的作用有了更深入的了解。用激发子刺激番茄原生质体,可以激活其质膜上超极化依赖的 Ca^{2+} -渗透性电流。进一步的药理学研究表明,这一激发子激活的 Ca^{2+} -渗透性通道(Ca^{2+} -permeable channel)的活性受到异源三聚体G蛋白依赖的通道蛋白磷酸化的调节^[25]。另外,人们在拟南芥细胞中发现了一种电压门控型的钙离子通道TPC1,它参与由隐地蛋白诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高和防卫反应^[20]。在水稻悬浮细胞中,也发现了这种钙通道家族OsTPC1,它在ROS产生、MAPK的激活以及过敏性细胞死亡中有重要作用^[26]。最近,人们发现植物与细菌互作的体系中,环核苷酸门控的钙通道(cyclic nucleotide-gated channel, CNGC)通过控制 Ca^{2+} 内流参与了植物先天免疫反应的信号转导,注入CNGC通道阻断剂 Gd^{3+} ,拟南芥叶片被细菌侵染后不再发生过敏性反应^[27]。上述结果表明,在植物感受病原菌侵染或激发子刺激信号的过程中,胞外 Ca^{2+} 通过特定的质膜钙通道进入到胞质中,产生特异性的钙信号,可能是引发植物防卫反应的早期事件。到目前为止,在所研究的植物与病原物互作的不同体系中,几乎得到的实验结果都是相似的,即植物的防卫反应表达依赖于胞外 Ca^{2+} 的内流,且这种内流是受特定质膜钙通道调节的。

2.2 胞内钙库在胞质特异性钙信号形成过程中的作用

液泡是植物细胞内贮量最大的钙离子库,其游离钙离子水平估计在 10^{-3} mol/L左右。液泡膜上存在可对刺激因子起反应的钙离子通道,受刺激时释放钙离子到细胞质中,提高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 水平,它是信号转导过程中胞内 Ca^{2+} 信号的重要来源。液泡膜上主要存在三种钙通道:三磷酸肌醇激活的 Ca^{2+} 释放通道(IP_3 -activated Ca^{2+} release channels)、cADPR激活的 Ca^{2+} 释放通道(cADPR-activated Ca^{2+} release channels)、 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放通道(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release channels)。植物细胞内质网、质体和线粒体中 Ca^{2+} 浓度亦高于细胞质。在光暗转变或氧气供应变化时,跨越质体和线粒体膜的 Ca^{2+} 流动非常迅速,参与调节包括能量转化在内的生理反应和基因表达。

目前研究中,由于对植物胞内钙库中的钙通道克隆的还极少,所以在探索 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的胞内钙来源问题上,人们大多采用药理学实验。当用激发子处理豌豆时,能够诱导植保素的合成,用新霉素抑制磷脂酶C(phospholipase C, PLC)后,植保素的合成受到

抑制,说明植保素的合成过程中可能有 PLC-IP_3 信号系统参与,而 IP_3 是胞内钙库钙释放的诱发信号, IP_3 生成受到抑制就会影响胞内钙库的钙释放,从而影响到钙信号的形成^[28]。钙信号诱发植保素合成早已被证实,所以此实验中抑制PLC后,植保素的合成受到抑制,可能是通过影响胞内钙库钙释放使胞质钙信号无法形成而导致的。用激发子多聚半乳糖醛酸处理大豆细胞时,发现PLC参与了活性氧的爆发,新霉素的加入抑制了 IP_3 的产生,同时也抑制了活性氧的爆发^[29],而钙离子信号诱发活性氧的爆发也已证实,所以推测可能是由于胞内钙库钙离子的释放形成的钙信号参与了多聚半乳糖醛酸诱发的活性氧爆发。在小麦-叶锈菌互作体系中,我们也试着解析特异性钙信号的形成机制。在研究胞内钙库对叶锈菌侵染过程中特异性钙信号形成的作用时,给小麦叶片注射不同浓度的胞内 Ca^{2+} 螯合剂BAPTA-AM,对过敏性反应均有一定的抑制作用,且成浓度依赖性。使用肝素对 IP_3 进行抑制,也能明显的抑制过敏性反应的发生;而使用环腺苷二磷酸核糖(cyclic ADP ribose, cADPR)的抑制剂钉红或8-Br-cADPR,对过敏性反应均没有影响。以上结果表明,在小麦被叶锈菌侵染过程中, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的部分升高可能源于胞内钙库的释放,且这一过程主要通过 IP_3 途径来完成(数据待发表)。

除了依赖于 IP_3 的胞质钙升高,依赖于cADPR的 Ca^{2+} 通道也能调节液泡膜或内质网膜上的 Ca^{2+} 释放,参与多种防卫反应。用激发子BcPG1处理葡萄藤细胞时,加入钉红抑制cADPR后,抑制了NO和 H_2O_2 的产生,说明胞内 Ca^{2+} 库可能参与了BcPG1诱发的防卫反应^[17]。

近来人们发现一种新的钙通道TPC1,这一通道在液泡膜上有较高表达,它可以像 IP_3 和cADPR一样调节钙释放系统,把 Ca^{2+} 从胞内钙库释放到胞质中发挥重要作用^[30]。胞质 Ca^{2+} 能够激活此钙通道,从而诱发胞内钙库的 Ca^{2+} 释放,形成特异性的钙信号,这种机制称为钙诱导的钙释放。有研究表明,在烟草和水稻中,TPC1参与了许多病原菌相关的分子模式下 Ca^{2+} 的调节作用^[26,31]。

综合上述结果,胞内钙库钙离子的释放在诱发植物防卫反应的特异性钙信号形成方面发挥着重要的作用。

2.3 胞内其他组分参与形成 Ca^{2+} 信号(钙与细胞骨架的互作)

目前, Ca^{2+} 作为微管骨架解聚的重要因素已被很

多的实验证实。Skalamera 等^[32]以豇豆-豇豆锈菌互作体系为研究对象得出结论: 在侵染的初始阶段, 豇豆抗病品种中细胞骨架的分布与未接种对照及感病品种相似, 伴随过敏性反应的进行, 抗病品种表现微管骨架发生片段化, 并逐渐消失。随后他们证实: 在侵染的初始阶段, 抗病品种胞质 Ca^{2+} 浓度有明显的升高, 推测可能是 Ca^{2+} 的内流诱发了微管的解聚。Binet 等^[33]使用激发子与烟草悬浮细胞为互作体系, 研究在防卫反应过程中 Ca^{2+} 和微管骨架等信号组分的变化及相互关系。他们早些时候的实验证明, 在烟草悬浮细胞中激发子 Cry 比 OGs 能诱发更强的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上升和 MAPK 信号通路的激活^[33-35]。他们使用 OGs 处理烟草悬浮细胞, 发现微管的完整性不受任何影响, 而 Cry 处理后却完全解聚。他们认为, 两种激发子诱发 Ca^{2+} 上升的强度不同, 正是影响微管骨架解聚的关键, Ca^{2+} 内流是 Cry 处理后的早期反应之一。为了证明 Ca^{2+} 的内流与微管的解聚有关, 他们使用了 EGTA 和 La^{3+} 。当用 2 mmol/L EGTA 预处理烟草悬浮细胞 1 h 后, 再用 25 $\mu\text{mol/L}$ Cry 处理, 没有发现微管的解聚, La^{3+} 的结果类似 EGTA 的结果。这说明 Ca^{2+} 的内流确实诱发了微管的解聚, 且在信号通路中钙离子内流是在微管解聚的上游。

另外, 微管骨架的解聚诱发 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的实验也有不少报道。有研究表明, 微管骨架可以作用于质膜钙通道, 并通过自身解聚和聚合的动态变化来调节胞外 Ca^{2+} 内流和胞内钙库的释放, 进而控制 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化, 形成特异性的钙信号^[33]。Thion 等^[36]用微管解聚药物处理野生型拟南芥原生质体时, 发现质膜去极化激活的 Ca^{2+} 通道的活性大幅度提高。这表明细胞骨架中的微管网络参与了细胞质膜上去极化激活的电压依赖性 Ca^{2+} 通道的活性调节过程。为验证在以激发子-原生质体简化的试验系统中微管骨架对 Ca^{2+} 的作用, 我们实验室用黄草消(oryzalin)解聚微管, 可以浓度依赖的方式诱发 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高。为了进一步明确 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高的原因, 我们先用质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 La^{3+} 抑制钙通道, 再用黄草消解聚微管, 发现 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 变化不明显; 而用 EGTA 螯合胞外 Ca^{2+} 后再用黄草消解聚微管, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化也不明显, 但中途补加 Ca^{2+} , 则 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 明显上升。以上结果初步表明微管解聚能够激活质膜钙通道, 诱发胞外的 Ca^{2+} 内流, 导致 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高^[37]。

Ca^{2+} 和微管骨架在信号转导中的关系是很复杂的, 在小麦体系中我们已经证实微管骨架的解聚会

促使胞外 Ca^{2+} 内流, 进而造成 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高; 而 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的升高也能够诱发微管骨架的解聚。根据以上结果推想, 在小麦抵抗叶锈菌侵入的过程中, 很可能是激发子刺激激活质膜钙通道, 使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高, 高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 引起微管解聚, 微管的解聚则更激活质膜钙通道, 促使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 进一步增加。随着新的骨架结合蛋白的不断发现和其他信号分子的确定及信号通路的不断完善, 微管骨架在植物抗病原物侵染的防卫反应信号通路中对特异性钙信号形成的作用将会越来越清晰。

3 小结

大量事例已证明, 在植物-病原菌互作过程中, 钙信号参与了植物防卫反应的表达, 并且面对不同病原物刺激时, 植物细胞表现出特异性的钙信号形式, 即钙签名。但目前由于研究体系的复杂, 检测细胞钙动态变化方法的局限, 使得钙签名种类的深入研究及由此引发特异性生理反应的研究受到一定的影响。并且随着在植物防卫信号途径中其他第二信使的不断鉴定, 如 NO 、 H_2O_2 、 cADPR 、 IP_3 等, 使得特异性钙信号的形成机制变的更加复杂。另外, 在动物细胞中存在一种容积性钙内流(capacitative calcium entry, CCE), 即: 内质网钙池中 Ca^{2+} 浓度降低时, 可以激活细胞质膜上的 Ca^{2+} 通道引发 Ca^{2+} 内流, 这种 Ca^{2+} 内流方式也被有些学者称之为钙池操纵的 Ca^{2+} 内流(store-operated calcium entry, SOCE), 或钙池耗竭诱发的 Ca^{2+} 内流(store-depletion induced calcium influx)^[38]。这种通过钙池中 Ca^{2+} 浓度降低而被激活的细胞质膜 Ca^{2+} 通道则被称为钙池操纵的(store-operated Ca^{2+} channels, SOC)^[39], 是受体激活的 Ca^{2+} 通道(receptor-activated Ca^{2+} channels, RACCs)的一种主要亚型, 广泛存在于多种非兴奋性细胞中^[40]。虽然在植物中类似的生理机制还没有发现, 但这种机制为我们更好的理解和揭示植物防卫反应中特异性钙信号形成的生理学机制提供了新的思路。

在今后的研究中, 钙和其他信号分子的交叉对话将是人们解释特异性钙信号形成机制的一个热点。此外, 要进一步研究钙信号下游靶蛋白的作用, 加强对这些钙信号通路成员的功能分析, 将会使我们更好的了解特异性的钙信号在植物防卫反应中的作用。

参考文献(References)

- [1] Bush DS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95

- [2] Irving HR *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 1790
- [3] Knight H *et al. Plant J*, 1997, **12**: 1067
- [4] Scrase-Field SA *et al. Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**: 500
- [5] McAinsh MR *et al. Trends Plant Sci*, 1998, **3**: 32
- [6] McAinsh MR *et al. Plant Cell*, 1995, **7**: 1207
- [7] Shacklock PS *et al. Nature*, 1992, **358**: 753
- [8] Trewavas A. *Plant Physiol*, 1999, **120**: 1
- [9] Hu XY *et al. Cell Res*, 2004, **14**: 234
- [10] Gerber IB *et al. Planta*, 2004, **218**: 647
- [11] Navazio L *et al. BMC Plant Biol*, 2007, **7**: 41
- [12] Blume B *et al. Plant Cell*, 2000, **12**: 1425
- [13] 张 琴等. *中国农学通报*, 2005, **21**: 233
- [14] Klüsener B *et al. Plant Physiol*, 2002, **130**: 2152
- [15] Lecourieux D *et al. Plant Cell*, 2002, **14**: 2627
- [16] Mithöfer A *et al. Planta*, 1999, **207**: 566
- [17] Vandelle E *et al. Mol Plant Microbe Interact*, 2006, **19**: 429
- [18] 尚忠林等. *植物生理学通讯*, 2003, **39**: 93
- [19] Trewavas AJ *et al. Plant Cell*, 1997, **9**: 1181
- [20] Kadota Y *et al. Plant Cell Physiol*, 2004, **45**: 160
- [21] Staëb M R *et al. Phytochemistry*, 1987, **257**: 416
- [22] Kurosaki F *et al. Phytochemistry*, 1987, **26**: 1919
- [23] Xu H *et al. Plant Cell*, 1998, **10**: 585
- [24] 关春蕾等. *河北农业大学学报*, 2006, **29**: 4
- [25] Gelli A *et al. Plant Physiol*, 1997, **113**: 269
- [26] Kurusu T *et al. Plant J*, 2005, **42**: 798
- [27] Ali R *et al. Plant Cell*, 2007, **19**: 1081
- [28] Toyoda K *et al. Plant Cell Physiol*, 1992, **33**: 445
- [29] Legendre L *et al. J Biol Chem*, 1993, **268**: 24559
- [30] Pottosin II *et al. J Exp Bot*, 2007, **58**: 1559
- [31] Kadota Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **317**: 823
- [32] Skalamera D *et al. Plant J*, 1998, **16**: 191
- [33] Binet MN *et al. Plant Physiol*, 2001, **125**: 564
- [34] Lebrun-Garcia A *et al. Plant J*, 1998, **15**: 773
- [35] Binet MN *et al. Plant Sci*, 1998, **137**: 33
- [36] Thion L *et al. Plant J*, 1998, **13**: 603
- [37] 刘 刚等. *实验生物学报*, 2005, **38**: 331
- [38] Putney JW Jr. *Cell Calcium*, 1986, **7**: 1
- [39] Rychkov G *et al. Hepatology*, 2001, **33**: 938
- [40] Barritt GJ. *Biochem J*, 1999, **337**: 153

The Specificity of Calcium Signal in Plant Defense Response

Bei Zhang, Gang Liu, Dong-Mei Wang*

(College of Life Science, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract In plant cell, the calcium ion is a ubiquitous intracellular second messenger involved in numerous signaling pathway. Numerous recent studies have provided evidence that Ca²⁺ plays a pivotal role in activating the plant's surveillance system against attempted microbial invasion. Recently, more concentration are payed on the role of specificity of calcium signaling in plant defense response. This article is presented to the latest advancement in the pattern and generation of the specificity of calcium signaling in plant defense response.

Key words calcium signal; defense response; calcium channel

Received: March 27, 2008 Accepted: June 30, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671244) and the Foundation of State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry (No.PPB04006) and the Key Basic Research Project of Applied Basic Research Program of Hebei Province (No.08965505D) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303180, No.C2005000220, No.C2007000515)

*Corresponding author: Tel: 86-312-7528276, E-mail: dongmeiwang63@hotmail.com