



临沂大学博士教授文库
LINYIDAXUE BOSHI JIAOSHOU WENKU

激发子诱导的 沙冬青悬浮细胞的 防御响应

JIFAZI YOUDAO DE SHADONGQINGXUANFU
XIBAO DE FANGYUXIANGYING

高海波 著

山东人民出版社

全国百佳图书出版单位 国家一级出版社



临沂大学博士教授文库
LINYIDAXUE BOSHI JIAOSHOU WENKU

激发子诱导的 沙冬青悬浮细胞的 防御响应

高海波 著



山东人民出版社

全国百佳图书出版单位 国家一级出版社

图书在版编目(CIP)数据

激发子诱导的沙冬青悬浮细胞的防御响应/高海波
著. —济南:山东人民出版社,2013.6

ISBN 978-7-209-07364-6

I. ①激… II. ①高… III. ①冬青科-悬浮培养-细胞-防御 IV. ①Q949.754.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第145725号

激发子诱导的沙冬青悬浮细胞的防御响应

高海波 著

山东出版集团

山东人民出版社出版发行

社址:济南市经九路胜利大街39号 邮编:250001

网 址:<http://www.sd-book.com.cn>

发行部:(0531)82098027 82098028

新华书店经销

山东省东营市新华印刷厂印装

规格 16开(169mm×239mm)

印 张 8

字 数 165千字

版 次 2013年6月第1版

印 次 2013年6月第1次

ISBN 978-7-209-07364-6

定 价 32.00元

如有质量问题,请与印刷厂调换。(0546)6441693

前 言

沙冬青属豆科、沙冬青属，是古老的第三纪残遗种，国家三级重点保护珍稀濒危植物。沙冬青现存种群数量日益减少，病虫害是导致植物濒危的重要因素之一。过去对沙冬青病虫害防治的研究主要侧重于化学防治；而植物在进化过程中形成了包括组成型防御和诱导防御在内的多种抵御取食者的攻击的方式，利用植物自身形成的防御策略进行病虫害的生物防治是最有效的途径之一。

本书是国家自然科学基金面上项目“沙冬青叶组织细胞跨膜离子流对昆虫取食的初始响应机理（30871727）”研究的阶段性成果。实验借助于无损微测技术及激光共聚焦荧光显微镜技术，研究沙冬青悬浮细胞经 MeJA、昆虫口腔分泌物及机械刺激等不同激发子诱导后， Ca^{2+} 、 H^{+} 流、 H_2O_2 与质膜电位等早期防御响应事件的变化规律及它们之间的内在联系，以期揭示沙冬青细胞对不同激发子的识别机理，研究结果和主要结论如下：

1. 在 MeJA 诱导的沙冬青悬浮细胞防御响应中， Ca^{2+} 跨膜内流并不是 MeJA 诱导信号事件； H_2O_2 的含量增加、 H^{+} 内流及质膜电位发生的去极化反应是早期响应事件。MeJA 诱导的沙冬青细胞内 H_2O_2 的积累，是通过位于质膜上的 NADPH 氧化酶的作用来完成的，而 H_2O_2 的积累促进了 H^{+} 内流；MeJA 诱导的 H_2O_2 的产生依赖于胞内 Ca^{2+} 的释放，胞内钙库在 MeJA 诱导的 H^{+} 内流中起着关键的作用。

2. 杨扇舟蛾诱导的沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流，除通过质膜上的 Ca^{2+} 通道外，还有其他途径，昆虫口腔分泌物中的成分与沙冬青质膜结合成允许离

子通过的孔道, Ca^{2+} 可以通过离子孔道内流。并非所有的激发子均诱导 Ca^{2+} 内流, 不同激发子诱导的 Ca^{2+} 流具有特异性。

美国白蛾口腔分泌物诱导的沙冬青细胞内 H_2O_2 的持续积累不依赖于胞外 Ca^{2+} 的内流; 诱导的质膜去极化反应依赖于 H_2O_2 的积累, 不依赖于 Ca^{2+} 信号的变化, 说明 Ca^{2+} 是发生于质膜去极化反应的下游信号。

蛋白质磷酸化事件位于 H_2O_2 信号的上游, NADPH 氧化的激活需磷酸化过程。灰斑古毒蛾口腔分泌物中的某些化学成分通过引起 NADPH 氧化酶发生磷酸化的作用而得到活化, 导致 H_2O_2 含量在处理 after 快速升高。

3. 短期机械刺激触发沙冬青细胞 Ca^{2+} 、 H^+ 内流。持续性机械刺激诱导沙冬青 Ca^{2+} 内流具有周期性特点。两种机械刺激诱导的沙冬青 H^+ 内流依赖于胞外 Ca^{2+} 的内流及胞内 Ca^{2+} 库中 Ca^{2+} 的释放。机械刺激作为一种物理激发子, 诱导沙冬青细胞 H^+ 的内流依赖于 H_2O_2 的产生, 说明活性氧信号作用于 H^+ 内流的上游, H_2O_2 细胞内的积累, 一方面抑制了质膜上 H-ATP 酶的活性, 另一方面促进了质膜上 H^+ 的内流。

缩略词与专有名词明细

缩略词	英文名	中文名
ACF	Autocorrelation function	自相关函数
ALA	Alamethicin	丙甲甘肽
$[Ca^{2+}]_{cyt}$	Cytosolic Free Calcium Concentration	细胞质游离 Ca^{2+} 浓度
CaM	Calmodulin	钙调素
CDPKs	Ca^{2+} - dependent protein kinases	钙依赖型蛋白激酶
CLCs	voltage-dependent chloride channels	电压门控氯离子通道
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope	激光扫描共聚焦显微镜
CYA	Calyculin A	花萼海绵诱癌素 A
DiBAC ₄ (3)	Bis- (1, 3-dibutylbarbituric acid) -tri-methine oxonol	双 (1, 3 - 二巴比妥酸) - 三次甲基氧烯洛尔
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DPI	Diphenyleneiodonium chloride	二苯基氯化碘盐
EGTA	Ethylene glycol-bis- (2-aminoethyl) - N, N, N', N'-tetraacetic acid	乙二醇二乙醚二胺四乙酸
FACs	Fatty acidamino acid conjugates	脂肪酸与氨基酸缀合物
HAMPs	herbivore-associated molecular patterns	昆虫相关分子模式
H ₂ DCF-DA	2', 7' - Dichlorofluorescein diacetate	2', 7' - 二氯二氢荧光素二乙酯
HR	Hypersensitive Response	超敏反应
JA	Jasmonic acid	茉莉酸
LIX	Liquid Ion Exchanger	液态离子交换剂
MAMPs	microbe-associated molecular patterns	微生物相关分子模式
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MeJA	Methyl jasmonate	茉莉酸甲酯

续表

缩略词	英文名	中文名
MeSA	Methyl Salicylate	水杨酸甲酯
MP	membrane potential	膜电位
NO	Nitric Oxide	一氧化氮
NSCCs	nonselective cation channels	非选择性阳离子通道
NMT	Non-invasive Micro-test Technique	非损伤微测技术
OS	Insect Oral Secretions	昆虫口腔分泌物
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	病程相关分子模式
PRRs	pattern recognition receptors	模式识别受体
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
RR	Ruthenium Red	钌红
SA, SAR, SIPK	Salicylic acid, systemic acquired resistance, salicylate-induced protein kinase	水杨酸, 系统获得性抗性, 水杨酸诱导蛋白激酶
SIET	Scanning Ion-selective Electrode Technique	扫描离子选择电极技术
STS	Staurosporine	星孢菌素
TEA ⁺	tetra-ethyl-ammonium	四乙铵
VDACs	voltage-dependent gated anion channels	电压门控阴离子通道
WIPK	wound-induced protein kinase	伤诱导蛋白激酶

目 录

前 言	1
缩略词与专有名词明细	1
1 文献综述	1
1.1 引文	1
1.2 植物对昆虫取食的感知	4
1.2.1 对昆虫口腔分泌物中激发子的识别	4
1.2.2 对昆虫取食引起的特定的机械伤害的识别	6
1.3 离子流在植物防御反应中的作用	8
1.3.1 钙离子流在植物防御反应中的作用	8
1.3.2 阴离子外流在植物防御反应中的作用	13
1.4 活性氧信号在植物防御反应中的作用	14
1.5 电信号是植物快速响应昆虫取食的传感系统	17
1.6 蛋白质可逆磷酸化在激发子诱导的植物防御反应中的作用	18
1.7 非损伤性扫描离子选择电极技术 (SIET) 原理及优势	20
1.7.1 非损伤性扫描离子选择电极的工作原理	20
1.7.2 非损伤性扫描离子选择电极的优势	21
1.8 研究内容和意义	21
1.9 研究的技术路线	23

2	MeJA 对沙冬青细胞防御反应的诱导	24
2.1	前言	24
2.2	材料与方法	26
2.2.1	植物材料	26
2.2.2	细胞贴壁	27
2.2.3	离子流测定方法	28
2.2.4	离子流测定实验方案	28
2.2.5	H ₂ O ₂ 测定	29
2.2.6	质膜电位测定	30
2.3	结果与分析	31
2.3.1	MeJA 诱导的 Ca ²⁺ 、H ⁺ 流的变化	31
2.3.2	MeJA 诱导 H ₂ O ₂ 的产生	34
2.3.3	MeJA 诱导质膜的变化	37
2.4	结论与讨论	38
2.4.1	MeJA 诱导的细胞 H ⁺ 内流依赖于胞内 Ca ²⁺ 的释放	38
2.4.2	H ₂ O ₂ 参与了 MeJA 诱导的沙冬青细胞 H ⁺ 内流	40
2.4.3	蛋白质磷酸化参与了 MeJA 诱导的沙冬青细胞 H ₂ O ₂ 产生	40
2.4.4	H ⁺ 内流是 MeJA 诱导的沙冬青细胞膜电位去极化的原因	41
3	昆虫口腔分泌物对沙冬青细胞防御反应的诱导	43
3.1	前言	43
3.2	材料与方法	44
3.2.1	植物材料	44
3.2.2	昆虫口腔分泌物的收集	44
3.2.3	离子流的测定方法	45
3.2.4	H ₂ O ₂ 的测定	45
3.2.5	质膜电位的测定	45
3.2.6	实验设计	46

3.3 结果与分析	47
3.3.1 昆虫口腔分泌物诱导的沙冬青细胞 Ca^{2+} 流的变化	47
3.3.2 昆虫口腔分泌物诱导的沙冬青细胞 H^+ 流的变化	51
3.3.3 昆虫口腔分泌物诱导的沙冬青细胞 H_2O_2 的变化	52
3.3.4 昆虫口腔分泌物诱导的沙冬青细胞质膜电位的变化	56
3.4 结论与讨论	59
4 沙冬青细胞对机械刺激诱导的离子流响应	65
4.1 前言	65
4.2 材料与方法	67
4.2.1 植物材料	67
4.2.2 离子流的测定方法	68
4.2.3 机械刺激细胞的方法	68
4.2.4 实验设计	68
4.3 结果与分析	69
4.3.1 短期机械刺激后沙冬青细胞 Ca^{2+} 流的变化	69
4.3.2 蛋白质磷酸化参与了短期机械刺激诱导的 Ca^{2+} 内流	71
4.3.3 持续机械刺激对沙冬青细胞 Ca^{2+} 流的影响	73
4.3.4 短期机械刺激对沙冬青细胞 H^+ 流的影响	76
4.3.5 持续机械刺激对沙冬青细胞 H^+ 流的影响	78
4.4 结论与讨论	80
5 结论与展望	84
5.1 主要结论	84
5.1.1 MeJA 诱导的沙冬青悬浮细胞 H^+ 内流依赖于胞内 Ca^{2+} 的释放	84
5.1.2 H_2O_2 参与了 MeJA 诱导的沙冬青悬浮细胞 H^+ 内流	85
5.1.3 蛋白质磷酸化参与了 MeJA 诱导的沙冬青悬浮细胞 H_2O_2 产生	86

5.1.4	H ⁺ 内流是 MeJA 诱导的沙冬青悬浮细胞膜电位去极化的原因	86
5.1.5	昆虫口腔分泌物诱导的沙冬青悬浮细胞跨膜 Ca ²⁺ 流	87
5.1.6	昆虫口腔分泌物诱导的沙冬青悬浮细胞跨膜 H ⁺ 内流 依赖 NADPH 氧化酶	88
5.1.7	沙冬青细胞 H ₂ O ₂ 的积累与跨膜 Ca ²⁺ 流的关系	89
5.1.8	质膜电位去极化与 H ₂ O ₂ 的积累及 Ca ²⁺ 流的关系	89
5.1.9	沙冬青悬浮细胞对机械刺激诱导的离子流响应	90
5.2	展望	94
参考文献		95
后 记		119

1 文献综述

1.1 引 文

植物生长发育过程中始终面临着病原菌侵染和昆虫取食的威胁。植物成功防御生物胁迫的关键在于植物能够快速准确地识别昆虫取食所带来的信息，并且能对这些信息进行正确的“解释”，从而对不同的生物胁迫做出响应的防御反应。昆虫取食引起的植物的整体反应过程，从发生的时间顺序上可区分为早期事件和后期事件（Bruinsma et al. , 2009）。目前植物与昆虫的相互作用的研究，主要集中在基因组学和蛋白质组学领域，这些领域属于植物后期的防御反应；植物早期的防御反应包括一系列由昆虫取食激发的早期的级联信号转导事件。这些早期信号事件的激活，诱导植物在恰当的时间产生与植物生长发育相协调的防御反应，从而使植物在生长发育和诱导防御之间做出合理的资源分配。昆虫取食引起质膜上离子通道活性的改变和离子不平衡的跨膜运输，属于发生在质膜上的、导致质膜电位和细胞内游离 Ca^{2+} 浓度发生快速变化的最早的信号事件（Jih et al. , 2003）。这些信号事件通过与下游的激酶和植物激素信号网络相互作用，调节相应的防御基因的表达，最终导致植物产生直接和间接防御反应。图 1-1 描述了昆虫取食植物叶片诱导后细胞内发生的早期信号转导事件。

迄今为止，人们对植物如何对昆虫取食的行为进行识别的，知之甚少。但是在信号转导途径的研究中发现，植物与昆虫间的作用关系与植物与病原菌的作用关系间存在着惊人的相似之处（Laloi et al. , 2007）。例如，植物遭受病原菌侵染后，植物细胞产生的离子跨膜流动性的增加、侵染部位附近细胞的膜结构遭受伤害（Garcia-Brugger et al. , 2006；Taylor et al. , 2004）、蛋白激酶激

活 (Maffei et al., 2004)、积累活性氧 (Wu et al., 2007) 等典型的特征, 遭受昆虫取食的植株也会发生。这些防御反应发生在受侵染的部位, 并局限在受害叶片中。此外, 植物的系统性部位也可以产生茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA) 及乙烯 (ETH) 等植物激素 (Maffei et al., 2006)、激活防御相关基因 (Kessler et al., 2001) 和合成次级代谢产物 (Zavala et al., 2004)。因此, 人们推测植物对昆虫取食的识别过程与植物对病原菌的侵染的识别过程应该是非常相似的。

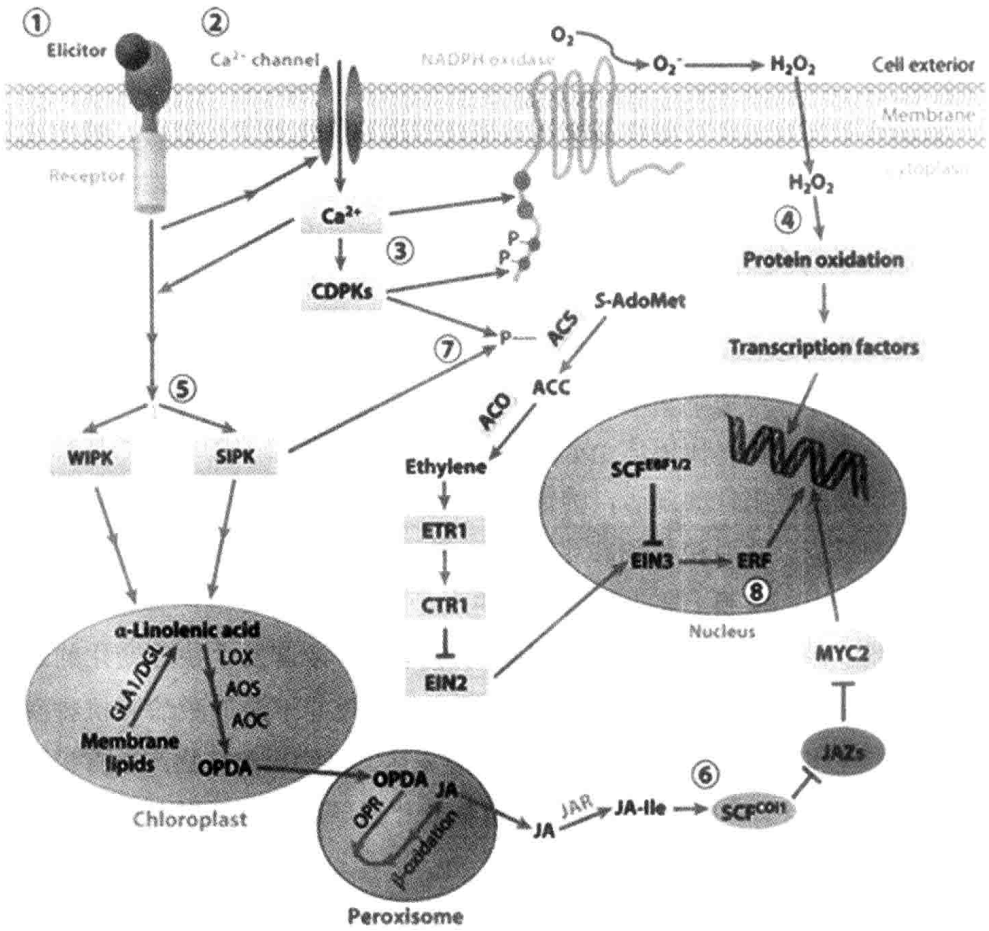


图 1-1 昆虫取食植物叶片诱导后细胞内发生的早期信号转导事件 (Orozco-Cárdenas et al., 2001)

①昆虫口腔分泌物中的某种激发子与细胞质膜上的未知受体结合, 完成细胞对昆虫取食进行识别。② Ca^{2+} 通道被激活导致 Ca^{2+} 内流。③ Ca^{2+} 与 CDPKs

及 NADPH 氧化酶结合, CDPKs 使 NADPH 氧化酶磷酸化增强了 NADPH 氧化酶活性, ROS 产生。④ROS 通过氧化蛋白质, 改变了活性氧响应的转录因子的活性。⑤MAPKs 也被迅速激活, SIPK 与 MIPK 诱导 JA 和 JA-Ile 的合成。⑥JA-Ile 与 COI1 受体结合引起 JAZ 蛋白的快速降解, 释放 JAZ 蛋白上对转录因子抑制的影响。⑦SIPK 及某种 CDPK 引 ACS 蛋白磷酸化, ACS 稳定性增强, 乙烯合成增加。⑧一系列信号转导过程引起响应乙烯的转录因子活性升高。这些早期信号事件, 最终引起植物防御代谢物质在体内的积累。

实际在昆虫对植物取食过程中, 经常提到的激发子 (elicitor) 这个词汇, 就是从病原菌的研究中借鉴而来的。植物对病原菌的成功防御, 依赖于植物对组成性存在于病原菌中或病原菌侵染植物过程中产生的激发子的正确识别, 这个识别过程是通过细胞表面的特异受体来完成的 (Leitner et al., 2005), 这些激发子被称为病程相关分子模式 (PAMPs), 相应的识别受体称为模式识别受体 (PRRs)。最近, 从微生物中分离鉴定出大量的激发子, 称为微生物相关分子模式 (MAMPs) (Jones et al., 2006)。

植物对非常低浓度的 MAMPs/PAMPs 进行识别后, 产生防御反应。MAMPs/PAMPs 的分子结构具有多样性, 它们多数组成性的存在于病原菌的外层, 例如寡聚糖、Pep-13 等 (Bittel et al., 2007)。目前大量的微生物相关分子模式的受体 (Brunner et al., 2002) 或者结合的位点已被分离鉴定出来, 例如几丁质 (chitin) 的受体是跨膜具有 LysM 结构域的受体样蛋白 CEBiP (Bittel et al., 2007; Mithöfer et al., 2008), β -寡聚糖的受体是位于胞外的寡聚糖结合蛋白 (Kaku et al., 2006)。MAMP 触发的典型反应快速而短暂, 与昆虫取食植物所诱导的反应非常相似; MAMP 结构的多样性导致触发的防御反应具有多样性, 而来自于昆虫口腔的激发子也具有多样性的特点。因此, 推测植物对昆虫取食的基本识别过程类似于植物对病原菌的识别过程 (Fliegmann et al., 2004)。正是基于上述认识, 把来自于昆虫口的激发子称为昆虫相关分子模式 (HAMPs), 相对于 MAMPs 来说, 目前仅有少数 HAMPs 被分离鉴定出来。

1.2 植物对昆虫取食的感知

虽然机械伤害和昆虫取食均引起植物组织的伤害，但植物对两种胁迫的响应明显不同 (Garcia-Brugger et al., 2006)。在植物与微生物或病原菌的相互作用过程中，多种微生物相关分子模式 (MAMPs) 和病程相关分子模式 (PAMPs) 被鉴定出来，它们作为重要的信号分子，诱导植物对微生物及病原菌的侵染产生抗性反应 (Lecourieux et al., 2006)。植物在进化过程中形成了准确快速感知昆虫相关分子类型 (herbivory associated molecular patterns, HAMPs) 的能力，从而把昆虫取食与其他生物胁迫区分开来 (Reymond et al., 2004; Wu et al., 2007)。目前，把昆虫相关分子类型分为两类：来自昆虫口腔分泌物 (OS) 或者卵液中的激发子及特异的机械损伤方式 (the specific patterns of wounding) (Besson-Bard et al., 2008)。植物次生代谢的产物 MeJA 和 MeSA 等也可以诱导植物产生防御反应，它们在植株内部及植株间伤害信息的传递上具有重要的作用 (Altuzar-Molina et al., 2011; Mallinger et al., 2011; Munemasa et al., 2011)。

1.2.1 对昆虫口腔分泌物中激发子的识别

相对于庞大的植食性昆虫的数量来说，仅有少数昆虫口腔分泌物中的激发子被分离鉴定出来。脂肪酸与氨基酸的缀合物 (FACs) 是研究最多的一类激发子，其中挥发物诱导素 volicitin ($[N - (17 - \text{羟基亚麻基}) - L - \text{谷氨酰胺}]$)，是最早从甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 口腔分泌物中分离出来的一种 FAC，其诱导玉米幼苗挥发物释放的作用 (Wu et al., 2010)。随后，在其他种类的鳞翅目昆虫中发现了不同类型的 FACs。除了鳞翅目昆虫以外，FACs 也存在于蟋蟀 (*Teleogryllus taiwanemima*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 OS 中 (Felton et al., 2008)。FACs 结构上由两部分组成，一部分由亚麻酸、亚油酸或者它们的衍生物组成，另一部分来由谷氨酰胺或者谷氨酸组成，两部分分别来自于植物和昆虫，并且在昆虫中肠内结合成具有活性的缀合物 (Alborn et al., 1997; Pohnert et al., 1999; Spiteller et al., 2003a; Spiteller et al.,

2003b)。近年来研究发现, FACs 在昆虫体内的氮代谢中起着不可替代的作用, 因此昆虫为了其取食行为不被植物感知而不产生 FACs 是不现实的。在玉米 (*Zea mays*) 幼苗上外源涂抹 volicitin, 增强了玉米幼苗挥发物的释放, 起到吸引寄生蜂的作用 (Alborn et al., 1997)。烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 是取食茄属植物专一食性昆虫, 机械损伤后的烟草 (*Nicotiana attenuata*) 叶片涂抹烟草天蛾的 FACs 后, 诱导植株丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 的激活及茉莉酸 (JA) 与乙烯 (ET) 的合成与 JA 与 ET 信号转导途径的启动, 导致烟草植株产生直接和间接防御反应 (Yoshinaga et al., 2007)。

目前植物识别 FACs 的分子机制还有待研究。 [^3H] - L - volicitin 与玉米细胞的质膜快速可逆的结合, 同时结合具有饱和性; 并且 MeJA 预处理玉米幼苗后, 结合能力得到增强 (Alborn et al., 1997)。这说明在玉米膜上存在着 FAC 特异性受体, 并且受体的数量依赖于 JA 信号转导途径。Maischak 等 (Giri et al., 2006) 学者认为, OS 与细胞质膜结合后可以形成类似离子通道的小孔, 从而诱导离子跨膜流动及膜电位的去极化反应; 但是多种植物经过 volicitin 处理后, 并不能引起 JA 和 ET 含量的增加, 表明 FACs 在质膜上形成小孔的行为不是它的主要的功能。

除 FACs 外, 一些其他类型的 OS 也被分离鉴定出来。谷实夜蛾 (*Helicoverpa zea*) 口腔分泌物中的葡萄糖氧化酶 (GOT) 具有抑制植物防御反应的作用 (Truitt et al., 2004b); 大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 幼虫口腔分泌物中的 β -葡萄糖苷酶 (β -Glucosidase) 具有诱导甘蓝挥发物释放的作用 (Mattiacci et al., 1995)。除了蛋白质外, 某些多肽分子也能被植物识别, 激活虫害诱导的植物反应。豇豆 (*Vigna unguiculata*) 遭受草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 取食后, 乙烯释放增加的同时, 内源茉莉酸 (JA) 和水杨酸 (SA) 含量升高, 从而增加伤害诱导挥发物的释放 (Carroll et al., 2008)。研究表明, 秋季夜盗蛾 (*fall armyworm*) 口腔分泌物中一种称为 inceptin 的多肽激发子诱导了该反应 (Peiffer et al., 2009)。Inceptin 是叶绿体 ATP 合酶 γ 亚基 (cATPC) 水解的产物, 非常低量 ($1 \text{ fmol} \cdot \text{leaf}^{-1}$) 的 inceptin 就可以诱导豇豆乙烯、茉莉酸和水杨酸的积累。进一步研究表明, cATPC 在昆虫的中肠内水解成为 inceptin, inceptin 释放到昆虫取食后的伤口处被植物识别, 诱导植物产生防御反应 (Carroll et al., 2008)。然

而豇豆识别 inceptin 的机制以及离子流的变化、促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 等是否参与了随后的信号转导过程是值得进一步研究的问题。虽然, 目前的研究加深了人们对植物识别昆虫的机制及识别后植物产生的一系列防御反应理解。但是与 HAMPs 结合的受体蛋白及编码受体蛋白的基因的分离鉴定, 是未来研究需要解决的问题 (Wu et al., 2009)。

1.2.2 对昆虫取食引起的特定的机械伤害的识别

虽然昆虫取食必然造成植物组织的伤害, 但植物组织的受害并不一定是植物遭受植食性昆虫攻击的可靠信号。植物为了减少防御成本, 植物必须把昆虫取食引起的机械伤害与自然界中风及冰雹等引起的伤害区别开来。

不同取食习性的昆虫, 对植物组织伤害的程度和强度存在差异。昆虫取食对植物造成的机械伤害可以作为另外一种类型的激发子, 引起植物产生防御反应, 但植物具有识别这类激发子的能力长期被低估 (Bricchi et al., 2010; Mithöfer et al., 2005)。多数模拟昆虫取食对植物组织伤害的研究, 主要采取对植物叶片进行擦伤 (Maischak et al., 2007)、粉碎植物叶片 (Reymond et al., 2000) 或在叶片上打孔 (Reymond et al., 2000) 来模拟昆虫取食对植物组织的伤害, 这些模拟实验虽然诱导了植物防御相关基因的表达, 但并不能诱导植物释放出与昆虫取食有关的伤诱导挥发物的释放 (Halitschke et al., 2001)。

然而, 昆虫取食对植物组织的伤害是一个持续的过程, 模拟昆虫取食的控制实验并不能完全模拟昆虫取食对植物产生的伤害。目前已经证实, 植物具有分辨单一的机械伤害与持续的机械伤害的能力。昆虫对植物的取食行为具有高度的特异性, 即植物组织受害的方式、程度及受害的频率可以作为昆虫取食的特异性信号被植物进行识别。在利马豆的研究中, 采用程序化的机械刺激 MecWorm 来模拟昆虫取食的强度及频率, 发现持续的机械刺激诱导利马豆植株释放出的挥发物在量上与海灰翅夜蛾及蜗牛 (*Cepaea hortensis*) 取食利马豆植株释放出的挥发物极其相似。因此, 昆虫取食引起植株的机械伤害具有时间和空间上的特异性, 这是诱导植物产生防御反应的关键因素。并不是所有的植物经过机械伤害后, 都释放出与昆虫取食有关的伤诱导挥发物, 表明机械伤害及昆虫的激发子在防御反应的诱导过程中所起的贡献并不相同 (Mithöfer et al., 2005)。