

ISSN 1000-0933

CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第 32 卷 第 20 期 Vol.32 No.20 2012

中国生态学学会

中国科学院生态环境研究中心

科学出版社

主办

出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报 (SHENTAI XUEBAO)

第32卷 第20期 2012年10月 (半月刊)

目 次

太湖流域源头溪流氧化亚氮(N_2O)释放特征	袁淑方,王为东(6279)
闽江河口湿地植物枯落物立枯和倒伏分解主要元素动态	曾从盛,张林海,王天鹅,等(6289)
宁夏荒漠草原小叶锦鸡儿可培养内生细菌多样性及其分布特征	代金霞,王玉炯(6300)
陕西省栎黄枯叶蛾蛹的空间分布	章一巧,宗世祥,刘永华,等(6308)
模拟喀斯特生境条件下干旱胁迫对青冈栎苗木的影响	张中峰,尤业明,黄玉清,等(6318)
中国井冈山生态系统多样性	陈宝明,林真光,李贞,等(6326)
鄂西南木林子常绿落叶阔叶混交林恢复过程中优势树种生态位动态	汤景明,艾训儒,易咏梅,等(6334)
不同增温处理对夏蜡梅光合特性和叶绿素荧光参数的影响	徐兴利,金则新,何维明,等(6343)
模拟长期大风对木本猪毛菜表观特征的影响	南江,赵晓英,余保峰(6354)
雷竹林土壤和叶片N、P化学计量特征对林地覆盖的响应	郭子武,陈双林,杨清平,等(6361)
利用树木年轮重建赣南地区1890年以来2—3月份温度的变化	曹受金,曹福祥,项文化(6369)
川西亚高山草甸土壤呼吸的昼夜变化及其季节动态	胡宗达,刘世荣,史作民,等(6376)
火干扰对小兴安岭白桦沼泽和落叶松-苔草沼泽凋落物和土壤碳储量的影响	周文昌,牟长城,刘夏,等(6387)
黄土丘陵区三种典型退耕还林地土壤固碳效应差异	佟小刚,韩新辉,吴发启,等(6396)
岩质公路边坡生态恢复土壤特性与植物多样性	潘树林,辜彬,李家祥(6404)
坡位对东灵山辽东栎林土壤微生物量的影响	张地,张育新,曲来叶,等(6412)
太湖流域典型入湖港口景观格局对河流水质的影响	王瑛,张建锋,陈光才,等(6422)
基于多角度基尼系数的江西省资源环境公平性研究	黄和平(6431)
中国土地利用空间格局动态变化模拟——以规划情景为例	孙晓芳,岳天祥,范泽孟(6440)
世界主要国家耕地动态变化及其影响因素	赵文武(6452)
不同氮源下好氧反硝化菌 <i>Defluvibacter lusatiensis</i> str. DN7 的脱氮特性	肖继波,江惠霞,褚淑祎(6463)
基于生态足迹方法的南京可持续发展研究	周静,管卫华(6471)
基于投入产出方法的甘肃省水足迹及虚拟水贸易研究	蔡振华,沈来新,刘俊国,等(6481)
浦江县土壤碱解氮的空间变异与农户N投入的关联分析	方斌,吴金凤,倪绍祥(6489)
长江河口潮间带盐沼植被分布区及邻近光滩鱼类组成特征	童春富(6501)
深圳湾不同生境湿地大型底栖动物次级生产力的比较研究	周福芳,史秀华,邱国玉,等(6511)
灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流及 H_2O_2 积累	高海波,张淑静,沈应柏(6520)
濒危物种金斑喙凤蝶的行为特征及其对生境的适应性	曾菊平,周善义,丁健,等(6527)
细叶榕榕小蜂群落结构及动态变化	吴文珊,张彦杰,李凤玉,等(6535)
专论与综述	
流域生态系统补偿机制研究进展	张志强,程莉,尚海洋,等(6543)
可持续消费的内涵及研究进展——产业生态学视角	刘晶茹,刘瑞权,姚亮(6553)
工业水足迹评价与应用	贾佳,严岩,王辰星,等(6558)
矿区生态风险评价研究述评	潘雅婧,王仰麟,彭建,等(6566)
研究简报	
围封条件下荒漠草原4种典型植物群落枯落物枯落量及其蓄积动态	李学斌,陈林,张硕新,等(6575)
密度和种植方式对夏玉米酶活性和产量的影响	李洪岐,蔺海明,梁书荣,等(6584)
期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 312 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 35 * 2012-10	



封面图说:草丛中的朱鹮——朱鹮有着鸟中“东方宝石”之称。洁白的羽毛,艳红的头冠和黑色的长嘴,加上细长的双脚,朱鹮历来被日本皇室视为圣鸟。20世纪前朱鹮在中国东部、日本、俄罗斯、朝鲜等地曾有较广泛地分布,由于环境恶化等因素导致种群数量急剧下降,至20世纪70年代野外已认为无踪影。1981年5月,中国鸟类学家经多年考察,在陕西省洋县重新发现朱鹮种群,一共只有7只,也是世界上仅存的种群。此后对朱鹮的保护和科学的研究做了大量工作,并于1989年在世界首次人工孵化成功。

彩图提供:陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201112292008

高海波, 张淑静, 沈应柏. 灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流及 H_2O_2 积累. 生态学报, 2012, 32(20): 6520-6526.

Gao H B, Zhang S J, Shen Y B. Regurgitant from *Orgyia ericae* Germar induces calcium influx and accumulation of hydrogen peroxide in *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. cells. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(20): 6520-6526.

灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流及 H_2O_2 积累

高海波¹, 张淑静^{2,*}, 沈应柏²

(1. 临沂大学生命科学学院, 临沂 276005; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 植物对昆虫取食活动进行成功防御的关键, 取决于对昆虫口腔反吐物的激发子的快速识别。实验利用无损伤微测系统及激光共聚焦显微镜, 研究了沙冬青细胞经灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导后 Ca^{2+} 流及 H_2O_2 的变化。结果发现: 灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流及 H_2O_2 的积累, 表明 Ca^{2+} 内流及 H_2O_2 的积累是沙冬青细胞对口腔反吐物产生应答的早期响应事件; Ca^{2+} 钙通道阻断剂仅部分抑制 Ca^{2+} 内流, 说明 Ca^{2+} 内流除经过质膜上的 Ca^{2+} 通道进入细胞外, 尚存在其他的内流途径; 灰斑古毒蛾口腔反吐物中的某些成分与沙冬青细胞的质膜结合后, 诱导质膜上形成允许 Ca^{2+} 通过的孔道, 而 GdCl_3 不能抑制这类孔道的活性。胞外 Ca^{2+} 融合剂 EGTA 完全抑制 H_2O_2 的积累, GdCl_3 预处理仅部分抑制了 H_2O_2 的积累, 说明灰斑古毒蛾诱导的沙冬青细胞内 H_2O_2 的积累依赖于 Ca^{2+} 内流; 抑制剂实验表明, H_2O_2 的积累主要来源于质膜上 NADPH 氧化酶的作用。

关键词: 沙冬青; 非损伤微测系统; 灰斑古毒蛾; Ca^{2+} 流; H_2O_2

Regurgitant from *Orgyia ericae* Germar induces calcium influx and accumulation of hydrogen peroxide in *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. cells

GAO Haibo¹, ZHANG Shujing^{2,*}, SHEN Yingbai²

1 College of Life Science, Linyi University Linyi 276005, China

2 College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University Beijing 100083, China

Abstract: The battle between plants and phytophagous insects has lasted for hundreds of millions of years. Over time, plants have evolved sophisticated defence systems to counteract attacks from insects. After being attacked by herbivores, plants quickly generate herbivory-specific signals, and, through complicated networks, these signals then trigger large-scale biochemical and physiological changes. The success of plants in withstanding herbivore attacks depends on their ability to quickly recognize elicitors in insect regurgitant. When herbivorous insects feed on plants, their regurgitant inevitably comes in contact with the wounded plant tissue. Thereby, the insects provide chemical signals that might be involved in the interaction between the attacking insect and the defending plant. In general, the earliest detectable signalling events in plants defence responses include transmembrane ion fluxes and production of reactive oxygen species. In plant cells, the calcium ion is a ubiquitous intracellular second messenger involved in numerous signalling pathways. It is widely acknowledged that calcium flux across cellular membranes plays a key role in triggering and mediating defence mechanisms. Hydrogen peroxide is a common component of the defence responses of plants against herbivore attacks. The non-invasive

基金项目: 国家自然科学资助项目(30871727); 高等学校博士学科点专项科研基金(200900141100/4)

收稿日期: 2011-12-29; 修订日期: 2012-05-31

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangshj@bjfu.edu.cn

microelectrode ion flux measurement technique, which can monitor ion/molecule-specific activities non-disruptively, has become a popular tool for studying adaptive responses of plant cells and tissues to a large number of abiotic stresses. Using a non-invasive micro-test system and a confocal laser scanning microscope, Ca^{2+} influx and variation in hydrogen peroxide production induced by the regurgitant of *Orgyia ericae* Germar were investigated in *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. cells. Experiments were conducted in the Key Laboratory of Forest Silviculture of the State Forestry Administration from June 2010 to April 2011. The results showed that Ca^{2+} influx and hydrogen peroxide accumulation were induced by the regurgitant, indicating that Ca^{2+} influx and variation in hydrogen peroxide production were early signalling events in response to the regurgitant. Ca^{2+} influx was incompletely inhibited by the Ca^{2+} channel blocker GdCl_3 , demonstrating that the Ca^{2+} channel on the plasma membrane was not the only route of Ca^{2+} into the cell. Alamethicin, a voltage-gated ion channel-forming peptide mixture derived from the soil fungus *Trichoderma viride* Pers., induced Ca^{2+} influx, but this alamethicin-induced Ca^{2+} influx was not inhibited by the Ca^{2+} channel blocker GdCl_3 . These results provided indirect evidence that one or more components of regurgitant exhibited ion channel-forming activities in the cell plasma membrane, and that the activity of those channels was not inhibited by GdCl_3 . Hydrogen peroxide accumulation was completely inhibited by the extracellular calcium chelator EGTA, but GdCl_3 incompletely inhibited hydrogen peroxide production, demonstrating that Ca^{2+} influx was necessary for the production of hydrogen peroxide. Some compounds in oral secretions from *O. ericae* induced NADPH oxidase activity. The application of regurgitant from *O. ericae* resulted in immediate and rapid hydrogen peroxide accumulation. The accumulation of hydrogen peroxide in cells in response to the regurgitant of *O. ericae* was inhibited by the NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium, demonstrating that hydrogen peroxide was primarily generated from the activation of NADPH oxidase on the plasma membrane.

Key Words: *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.; non-invasive micro-test system; *Orgyiae ricae* Germar; Ca^{2+} flux; hydrogen peroxide

昆虫取食植物的同时将口腔反吐物中的成分引入受害的植物组织,植物细胞通过对这些来自昆虫的化学激发子进行识别后触发一系列级联信号事件,产生诱导防御反应^[1]。这些化学激发子可以直接与质膜作用或与质膜上的受体结合,随后触发细胞发生包括离子流变化、活性氧积累、膜电位变化等早期信号事件^[2]。目前已经从昆虫口腔反吐物中分离鉴定出多种具有诱导植物产生防御反应的激发子,如葡萄糖氧化酶、 β -葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶及诱导素等脂肪酸氨基酸缀合物;从甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)口腔反吐物分离出的诱导素涂抹在机械损伤后的玉米叶片上,幼苗释放出吸引害虫天敌的挥发性有机物,而单纯机械损伤后的幼苗却不能释放出这样的挥发性有机物^[3]。

在玉米(*Zea mays*)的质膜上已经发现诱导素的受体分子,并证明诱导素是与受体结合后触发了玉米幼苗防御反应产生;但系统素却不能诱导利马豆(*Phaseolus lunatus*)及棉花(*Gossypium hirsutum*)植株产生防御反应^[4],表明昆虫口腔反吐物中的化学激发子诱导的植物防御反应具有特异性。

离子流的变化及活性氧的积累是植物与病原菌及植物与昆虫相互作用的早期信号事件,这些事件直接或间接触发植物细胞内的多条信号网络途径,起到放大信号并最终诱导植物产生特异的生理响应^[5]。拟南芥植株遭受病原菌 *Pseudomonas syringae* 侵染后,胞内 Ca^{2+} 浓度迅速升高,随后胞内依赖于 Ca^{2+} 的激酶及磷脂酶被激活,进而将胞内 Ca^{2+} 浓度升高的信号转化为植物的防御反应的最终形成^[6]。

产生并积累活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)是植物对多种生物及非生物胁迫的响应之一。ROS 作为信号分子,在植物与病原菌的相互作用过程中起到的作用已经得以证明^[7]。目前研究表明,ROS 也参与了昆虫取食诱导的植物响应过程^[8]。

“非损伤微测系统”是通过计算机和精密运动控制系统的自动控制,在不接触被测样品的情况下进行三维、实时、动态地测量,对被测对象不会产生任何伤害的情况下获取进出样品的各种分子/离子浓度、流速及其

运动方向信息的设备;非损伤微测技术,以其特有的时间和空间分辨率,对现有的电生理技术如膜片钳技术及荧光染色技术做出了重要补充,并为鉴定或验证某些生物膜运输系统的功能提供了非常有力的工具^[9-10]。

灰斑古毒蛾(*Orgyia ericae* Germar)危害包括沙冬青在内的多种沙生植物,对荒漠地区的防护林构成严重威胁^[11]。本研究利用非损伤微测系统及激光共聚焦显微镜,检测了沙冬青细胞经灰斑古毒蛾诱导后胞内Ca²⁺及H₂O₂两种早期信号的变化情况,并对二者间的作用关系进行了研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.)种子在超净工作台上用0.1%升汞消毒15 min,无菌水冲洗3次。去除种皮,将种子接种在商品固体B₅培养基(6-BA 1 mg/L, NAA 1 mg/L, 20 g/L蔗糖,pH值5.8)中,暗培养。待子叶展平后将下胚轴剪成0.8—1 cm的小段接种在B₅培养基上(成分同上),持续黑暗,进行愈伤组织的诱导。

沙冬青悬浮细胞的培养:愈伤组织接种于商品液体B₅培养基(6-BA 1 mg/L, NAA 1 mg/L, 20 g/L蔗糖,pH值5.8)中,摇床运行条件为:160 r/min, 25 °C,持续黑暗。每隔12 d按照体积1:10的比例对细胞进行1次继代培养。实验的前3 d对所用细胞进行继代培养,以保证实验用细胞处于指数生长期。

实验前对沙冬青细胞悬浮进行离心洗涤,消除细胞培养液对测量结果的影响。5 mL沙冬青悬浮细胞300 g离心5 min后,去上清;然后分别加入5 mL测试液,对细胞进行离心洗涤2次;最后加入5 mL测试液平衡2 h后备用。

1.2 昆虫口腔反吐物的收集

灰斑古毒蛾(*Orgyiae ricae* Germar)由宁夏盐池森防站提供。口腔反吐物的收集方法:镊子轻压灰斑古毒蛾四龄幼虫(2—3 cm)头部,用玻璃毛细管(I. D. 0.9—1.1 mm)收集挤压出来的口腔反吐物,10000 r/min、4 °C离心10 min,取上清每管10 μL(每头虫子约收集1.5—2 μL上清)分装,保存在-80 °C低温冰箱中直至使用时取出^[12]。实验过程中,每管10 μL的昆虫口腔反吐物稀释至3 mL后使用。

1.3 Ca²⁺流测定方法

Ca²⁺流测定采用非损伤微测技术中的扫描离子选择电极技术(SIET)(SIET系统型号为BIO-IM-008,Younger USA Sci. & Tech. Corp., USA)。扫描离子选择电极方法的具体操作步骤如下:提前拉制好并经过二甲基三甲基硅胺烷化处理的毛细管(尖端直径2—4 μm, XYPG120-2; Xuyue Sci. 和 Tech. Co., Ltd.)的后端灌入距离毛细管尖部长度约1 mm的Ca²⁺的灌充液(Ca²⁺:100 mmol/L CaCl₂);然后通过离子选择性微电极制备装置在毛细管的前端吸入长度约20 μm的相应液态离子交换剂(LIXs, Liquid Ion Exchanger)(Sigma 21048, Sigma-Aldrich);制作好的离子选择性电极套入Ag/AgCl电极线基座(XYEH01-1; Xuyue Sci. and Tech. Co., Ltd.),使氯化好的银丝与灌充液接触;参比电极为MI-402(Microelectrodes, INC.)。测量前对制作好的离子选择性电极进行校正。校正液的成分:0.05 mmol/L和0.5 mmol/L的CaCl₂;测试液的成分:0.1 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L Na₂SO₄, 0.3 mmol/L MES, 0.1% Sucrose, pH值5.8。使用能斯特斜率大于25 mV的离子选择性电极。

测量前,首先使细胞粘附在玻璃底培养皿(Glass bottom dishes, P35G-1.5-10-C, MatTek Corporation)底部,以避免测量过程中由于中间进行药物处理或测定过程中电极的往返运动造成细胞的移动。玻璃底培养皿使用前需要进行处理:玻璃底培养皿用酒精浸泡2 h后,去离子水反复冲洗,然后在烘箱中50 °C烘2 h烘干。玻璃底培养皿的底部滴约10 μL浓度为0.0008 mg/mL的多聚赖氨酸(Poly-L-lysine, P7890-25MG, sigma)水溶液,5 min后用移液器吸走多聚赖氨酸,用去离子水清洗玻璃底培养皿的底部3次,然后50 °C烘2 h烘干,室温储藏在干燥器中备用。50 μL洗涤后的沙冬青悬浮细胞滴在玻璃底培养皿的中部,约20 s后用测试液洗涤皿底部3次,去除没有粘附的细胞。

细胞贴壁后,玻璃底培养皿加入3 mL相应离子的测试液,放入非损伤微测系统的载物台上。通过调节系

统的铅制螺杆并结合显微镜的焦距调节,使离子选择性电极的尖端靠近被测细胞。然后,通过扫描离子选择电极系统自带的 ASET 软件并结合显微成像系统,精确调节选择离子电极的尖端距离被测细胞 2—5 μm 。首先进行 5 min 稳态 Ca^{2+} 流的测量,然后加入含有相应浓度药物或昆虫口腔反吐物的测试液 3 mL 后继续测量约 30 min。

通过 SIET 系统自带的 ASET 软件,控制运动控制器(CMC-4)来调节选择离子电极尖端接近细胞的表面约 2—5 μm ,利用预先设置好的程序使电极的移动距离为 10 μm ,测量两点间的电位差值,采样频率为 0.2 Hz。采集的数据导入 EXCEL 表格,利用原点电位及电极移动的两点间电位差值,通过旭月公司的软件 MageFlux 进行离子流的计算。药物处理后开始测量的前 2 min 采集的信号在数据处理时删除,以便消除加药干扰对 Ca^{2+} 的影响^[13]。

1.4 H_2O_2 的测定

通过 H_2O_2 特异的荧光探针 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)检测沙冬青细胞内 H_2O_2 含量的变化^[14]。不发光的 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 进入细胞后,经酯酶的作用脱去二酯(DA),生成不发光的 H_2DCF , H_2DCF 被 H_2O_2 氧化生成发荧光的 DCF; H_2O_2 含量与 DCF 荧光强度成正比,因此可以通过检测 DCF 的荧光强度,定性及定量监测细胞内 H_2O_2 的动态变化^[15]。

每个处理,首先进行 0 时间的对照测量,随后加入含有相应浓度药物或昆虫口腔反吐物的测试液 3 mL 后立即开始计时,每隔 5 min 进行 1 次 DCF 荧光测量,测量 30 min。

激光共聚焦荧光显微镜(Leica TCS SP5)的扫描参数为:激发波长 488 nm,发射光波长 510—530 nm,扫描速度 512×512 像素。沿 Z 轴进行层面厚度 3 μm 的层面扫描,用 Lecia ApplicationSuit Adanvance Fluorescence 软件采集荧光图像,三维重建图像获得每个细胞的最大荧光强度。Lecia ApplicationSuit Adanvance Fluorescence 软件采集的荧光图像,用 ImageJ 软件进行荧光像素值(0—255)的测量^[16]。每次独立测量的 0 时间荧光强度为 100%,计算处理后同一细胞其他各时间相对荧光强度值。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 流变化

灰斑古毒蛾口腔反吐物处理沙冬青细胞后,与对照相比在测量时间内 Ca^{2+} 持续内流;100 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 通道抑制剂 GdCl_3 预处理沙冬青细胞 30 min 后,仅部分抑制了灰斑古毒蛾口腔反吐物触发的 Ca^{2+} 内流(图 1)。

丙甲甘肽(ALA,Alamethicin)是来自绿色木霉(*Trichoderma viride*)的一种电压门控的离子通道形成肽的混合物,可作为激发子通过激活茉莉酸信号转导途径促进利马豆(*Phaseolus lunatus*)植挥发性有机物的合成与释放;ALA 与人工膜或与轮藻植物(*Chara corallina*)的液泡膜结合后,具有在膜上形成跨膜运输离子的孔道能力^[17]。

2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ALA 瞬时处理沙冬青细胞后诱导快速 Ca^{2+} 内流,流速明显高于灰斑古毒蛾口腔反吐物的处理(图 1),100 $\mu\text{mol/L}$ GdCl_3 预处理后,并未抑制 ALA 引起的 Ca^{2+} 内流。

2.2 H_2O_2 含量的变化

灰斑古毒蛾口腔反吐物处理沙冬青细胞后, H_2O_2 含量在处理后的 5 min 内快速升高,在测量的时间内一直维持较高的水平(图 2)。结果表明,灰斑古毒蛾口腔反吐物处理沙冬青细胞后,快速激活了胞内的 H_2O_2 的合成系统导致 H_2O_2 含量的升高。

二苯基氯化碘盐(DPI,Diphenyleneiodonium chloride)是质膜上 NADPH 氧化酶的专一性抑制剂。DPI 预处理后的沙冬青细胞,基本抑制了灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 H_2O_2 积累。结果表明,灰斑古毒蛾诱导的细胞内 H_2O_2 合成与质膜上 NADPH 氧化酶有关(图 2)。

为了研究灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的沙冬青细胞 H_2O_2 的积累是否与 Ca^{2+} 内流有关,采用 2 mol/L 胞外 Ca^{2+} 钩合剂 EGTA 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 GdCl_3 预处理沙冬青细胞 30 min。EGTA 预处理,彻底抑制了灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 H_2O_2 的积累,在测量时间内 H_2O_2 含量持续下降,30 min 后基本检测

不到 DCF 荧光;广普型胞外 Ca^{2+} 通道抑制剂 GdCl_3 预处理沙冬青细胞后,仅部分抑制了灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 H_2O_2 含量的升高(图 2)。实验结果表明,灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 H_2O_2 积累依赖于胞外介质中 Ca^{2+} 的存在。 GdCl_3 具有广普型的特点,对不同类型的质膜 Ca^{2+} 通道均产生抑制作用^[18-19],实验结果说明,灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 Ca^{2+} 内流不完全是通过质膜上的 Ca^{2+} 通道来完成的;胞外介质中 Ca^{2+} 内流在灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 H_2O_2 积累中起到关键作用。

3 讨论

跨膜离子流在触发及调节植物防御反应中起着重要的作用^[20]。多种环境刺激可以快速地调节质膜上离子通道的活性,跨膜离子流动是植物对病原菌侵染及对昆虫取食活动进行识别后产生的早期的信号事件。 Ca^{2+} 作为植物体内普遍存在的第二信使分子参与了植物生长发育过程中的各种信号事件的转导过程,胞质内 Ca^{2+} 浓度的变化起到传递并放大信号的作用^[21],从而将植物细胞表面接受的信息传递给细胞质内的靶分子后,激活植物的防御响应^[22]。

无损伤微测技术可以实时、无损伤的研究离子进出细胞的情况,结果更加直观。本次实验通过该技术研究发现,灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流。药理学实验表明, GdCl_3 部分抑制了灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 Ca^{2+} 内流;说明灰斑古毒蛾口腔反吐物触发的 Ca^{2+} 内流,除了通过质膜上的 Ca^{2+} 通道进入沙冬青细胞外,还有另外进入细胞的途径。

海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)口腔反吐物中的肽分子与丙甲甘肽类似,能与轮藻植物液泡膜结合形成跨膜的离子通道,并且证明昆虫口腔反吐物中的寡肽分子具有与质膜结合后形成允许离子通过的孔道的能力;多种鳞翅目昆虫口腔反吐物中的成分具有与人工膜结合形成离子孔道的特点^[12]。海灰翅夜蛾口腔反吐物处理表达了 Ca^{2+} 敏感水母发光蛋白的大豆悬浮细胞后,细胞内 Ca^{2+} 浓度持续快速升高;并证明昆虫口腔反吐物中的未知成分与质膜结合后,在膜上形成了跨膜的离子孔道,从而引起的 Ca^{2+} 内流、质膜发生去极化反应,膜电位的变化又激活了质膜上的电压依赖型 Ca^{2+} 通道蛋白,进而引起 Ca^{2+} 通过该类通道蛋白持续内流^[23]。

ALA 处理沙冬青细胞后 Ca^{2+} 内流,说明非损伤微测技术测量沙冬青细胞 Ca^{2+} 流的可行性。灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流,表明 Ca^{2+} 内流是沙冬青细胞对口腔反吐物产生应答的早期信号。由于

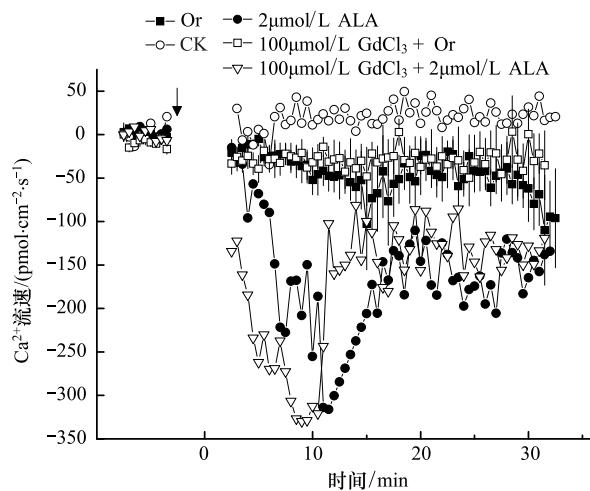


图 1 灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的沙冬青细胞 Ca^{2+} 流的变化

Fig. 1 Changes of Ca^{2+} fluxes induced by regurgitant of *Orgyiae ricae* Germar in *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. Cell Suspensions

箭头指示灰斑古毒蛾口腔反吐物加入时间;在所有离子流测量的实验中,离子内流为负值,外流为正值;数据为平均值±标准误($n=9-12$);Or:灰斑古毒蛾口腔反吐物;CK:对照;ALA:丙甲甘肽

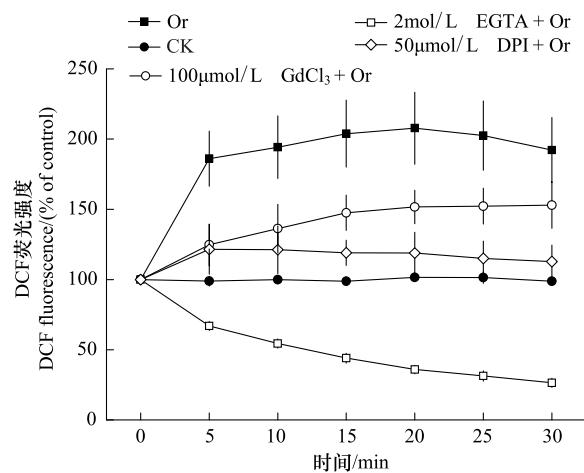


图 2 灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的沙冬青细胞 H_2O_2 的时序性变化

Fig. 2 Time course of H_2O_2 induced by regurgitant of *Orgyiae ricae* Germar of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. Cell Suspensions

每个数值为 6—9 个细胞(至少 3 次重复)所测得的平均值±标准误

GdCl_3 具有广谱性的特点,对细胞质膜上不同类型的 Ca^{2+} 通道均产生显著抑制作用^[18-19]。 GdCl_3 处理后未能彻底抑制灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的沙冬青细胞 Ca^{2+} 内流,说明部分 Ca^{2+} 的内流不是通过质膜上的通道来完成的,间接表明灰斑古毒蛾口腔反吐物中的某种/些成分,具有与沙冬青细胞的质膜结合后诱导质膜上形成允许 Ca^{2+} 通过的孔道,而 GdCl_3 不能抑制这类孔道的活性。

多种胁迫条件均引起植物持续产生 ROS,不同类型 ROS 分子激活植物体内不同的信号途径^[24]。植物细胞内存在 ROS 分子感受器,在这些感受器的作用下,将 ROS 中包含的信息通过一些列级联信号事件转化为植物的生理响应^[25]。病原菌侵染或昆虫取食均激活质膜上 NADPH 氧化酶复合体,引起细胞膜的外侧产生超氧阴离子(O_2^-), O_2^- 随后快速被超氧化物歧化酶歧化为 H_2O_2 , H_2O_2 可以积累在胞外基质或扩散进入胞内,引起包括质膜去极化在内的早期防御事件^[26]。

H_2O_2 在植物细胞内具有双重作用,较低浓度的 H_2O_2 可作为信号分子诱导植物产生抵御生物或非生物胁迫的抗性反应,高浓度的 H_2O_2 会破坏胞内的蛋白质、脂类及核酸等大分子的结构,引起细胞程序性死亡^[27]。灰斑古毒蛾口腔反吐物处理引起沙冬青细胞内 H_2O_2 的持续积累,然而用 NADPH 氧化酶专一性抑制剂 DPI 预处理后,虽然很大程度上抑制了昆虫口腔反吐物触发的 H_2O_2 积累,但仍高于对照。说明灰斑古毒蛾口腔反吐物诱导的 H_2O_2 积累除了主要与质膜上 NADPH 氧化酶的作用有关外,尚存在其他的合成途径。

但 ROS 的产生与 Ca^{2+} 内流之间存在着复杂的关系, Ca^{2+} 信号可以位于 ROS 信号的上游或者下游,与植物的种类和激活的信号途径有关;昆虫取食诱导的 Ca^{2+} 内流是否是 ROS 产生的必要条件尚不清楚^[28]。钙离子螯合剂 EGTA 显著抑制了灰斑古毒蛾引起的 H_2O_2 的积累; GdCl_3 预处理仅部分抑制了 H_2O_2 的积累。结合前面灰斑古毒蛾激发的 Ca^{2+} 内流的药理实验,说明灰斑古毒蛾诱导的沙冬青细胞内 H_2O_2 的积累依赖于 Ca^{2+} 内流; Ca^{2+} 内流是作用于 H_2O_2 的积累上游的信号。

References:

- [1] Truitt C, Paré P. *In situ* translocation of volicitin by beet armyworm larvae to maize and systemic immobility of the herbivore elicitor *in planta*. *Planta*, 2004, 218(6): 999-1007.
- [2] Klüsener B, Weiler E W. Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes. *FEBS Letters*, 1999, 459(2): 263-266.
- [3] Alborn H T, Turlings T C J, Jones T H, Stenhammar G, Loughrin J H, Tumlinson J H. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 1997, 276(5314): 945-949.
- [4] Felton G W, Korth K L. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3(4): 309-314.
- [5] Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinsot B, Wendehenne D, Pugin A. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(7): 711-724.
- [6] Yamakawa H, Katou S, Seo S, Mitsuhashi I, Kamada H, Ohashi Y. Plant MAPK phosphatase interacts with calmodulins. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(2): 928-936.
- [7] Ward J M, Pei Z M, Schroeder J I. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 833-844.
- [8] Simon-Plas F, Elmaya T, Blein J P. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *The Plant Journal*, 2002, 31(2): 137-147.
- [9] Newman I A. Ion transport in roots: measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant Cell and Environment*, 2001, 24(1): 1-14.
- [10] Shabala S N, Newman I A, Morris J. Oscillations in H^+ and Ca^{2+} ion fluxes around the elongation region of corn roots and effects of external pH. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 111-118.
- [11] Xu S L, Liu Z X, Yan F, Wang L Y, Guo Z H. Threshold temperature and effective accumulated temperature of *Orgyia ericae* Germar. *Forest Pest and Disease*, 2010, 29(6): 28-30.
- [12] Luhring H, Nguyen V D, Schmidt L, Rose U S R. Caterpillar regurgitant induces pore formation in plant membranes. *FEBS Letters*, 2007, 581(28): 5361-5370.
- [13] Maffei M, Bossi S, Spiteller D, Mithöfer A, Boland W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on Lima bean leaves. I. Membrane potentials,

- intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1752-1762.
- [14] Shabala L, Shabala S, Ross T, McMeekin T. Membrane transport activity and ultradian ion flux oscillations associated with cell cycle of *Thraustochytrium* sp. *Functional Plant Biology*, 2001, 28(2): 87-99.
- [15] Allan A C, Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell*, 1997, 9(9): 1559-1572.
- [16] Konrad K R, Hedrich R. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *The Plant Journal*, 2008, 55(1): 161-173.
- [17] Engelberth J, Koch T, Schüller G, Bachmann N, Rechtenbach J, Boland W. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendril coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology*, 2001, 125(1): 369-377.
- [18] Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55(1): 373-399.
- [19] Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 21-39.
- [20] Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 2001, 411(6839): 848-853.
- [21] Hann D R, Rathjen J P. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, 2007, 49(4): 607-618.
- [22] Mazars C, Bourque S, Mithofer A, Pugin A, Ranjeva R. Calcium homeostasis in plant cell nuclei. *New Phytologist*, 2009, 181(2): 261-274.
- [23] Maischak H, Grigoriev P A, Vogel H, Boland W, Mithofer A. Oral secretions from herbivorous lepidopteran larvae exhibit ion channel-forming activities. *FEBS Letters*, 2007, 581(5): 898-904.
- [24] Laloi C, Apel K, Danon A. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(3): 323-328.
- [25] Pitzschke A, Hirt H. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 351-356.
- [26] Peiffer M, Felton G W. The host plant as a factor in the synthesis and secretion of salivary glucose oxidase in larval *Helicoverpa zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, 58(2): 106-113.
- [27] Bienert G P, Møller A L B, Kristiansen K A, Schulz A, Møller I M, Schjoerring J K, Jahn T P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2): 1183-1192.
- [28] Torres M A, Dangl J L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(4): 397-403.

参考文献:

- [11] 许胜利, 刘朝霞, 同锋, 王立宇, 郭志红. 灰斑古毒蛾发育起点温度和有效积温研究. *中国森林病虫*, 2010, 29(6): 28-30.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 32 ,No. 20 October ,2012(Semimonthly)
CONTENTS

Characteristics of nitrous oxide (N_2O) emission from a headstream in the upper Taihu Lake Basin	YUAN Shufang, WANG Weidong (6279)
Nutrient dynamics of the litters during standing and sediment surface decay in the Min River estuarine marsh	ZENG Congsheng, ZHANG Linhai, WANG Tian'e, et al (6289)
Diversity and distribution of endophytic bacteria isolated from <i>Caragana microphylla</i> grown in desert grassland in Ningxia	DAI Jinxia, WANG Yujiong (6300)
Spatial distribution of <i>Trabala vishnou gigantina</i> Yang pupae in Shaanxi Province, China	ZHANG Yiqiao, ZONG Shixiang, LIU Yonghua, et al (6308)
Effects of drought stress on <i>Cyclobalanopsis glauca</i> seedlings under simulating karst environment condition	ZHANG Zhongfeng, YOU Yeming, HUANG Yuqing, et al (6318)
Ecosystem diversity in Jinggangshan area, China	CHEN Baoming, LIN Zhenguang, LI Zhen, et al (6326)
Niche dynamics during restoration process for the dominant tree species in montane mixed evergreen and deciduous broadleaved forests at Mulinzi of southwest Hubei	TANG Jingming, AI Xuenru, YI Yongmei, et al (6334)
Effects of different day/night warming on the photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of <i>Sinocalycanthus chinensis</i> seedlings	XU Xingli, JIN Zexin, HE Weiming, et al (6343)
The effect of simulated chronic high wind on the phenotype of <i>Salsola arbuscula</i>	NAN Jiang, ZHAO Xiaoying, YU Baofeng (6354)
Responses of N and P stoichiometry on mulching management in the stand of <i>Phyllostachys praecox</i>	GUO Ziwu, CHEN Shuanglin, YANG Qingping, et al (6361)
Tree-ring-based reconstruction of the temperature variations in February and March since 1890 AD in southern Jiangxi Province, China	CAO Shoujin, CAO Fuxiang, XIANG Wenhua (6369)
Diel variations and seasonal dynamics of soil respirations in subalpine meadow in western Sichuan Province, China	HU Zongda, LIU Shirong, SHI Zuomin, et al (6376)
Effects of fire disturbance on litter mass and soil carbon storage of <i>Betula platyphylla</i> and <i>Larix gmelinii</i> - <i>Carex schmidtii</i> swamps in the Xiaoxing'an Mountains of Northeast China	ZHOU Wenchang, MU Changcheng, LIU Xia, et al (6387)
Variance analysis of soil carbon sequestration under three typical forest lands converted from farmland in a Loess Hilly Area	TONG Xiaogang, HAN Xinhui, WU Faqi, et al (6396)
Soil-property and plant diversity of highway rocky slopes	PAN Shulin, GU Bin, LI Jiaxiang (6404)
Effects of slope position on soil microbial biomass of <i>Quercus liaotungensis</i> forest in Dongling Mountain	ZHANG Di, ZHANG Yuxin, QU Laiye, et al (6412)
Responses of water quality to landscape pattern in Taihu watershed: case study of 3 typical streams in Yixing	WANG Ying, ZHANG Jianfeng, CHEN Guangcai, et al (6422)
Study on the fairness of resource-environment system of Jiangxi Province based on different methods of Gini coefficient	HUANG Heping (6431)
Simulation of the spatial pattern of land use change in China: the case of planned development scenario	SUN Xiaofang, YUE Tianxiang, FAN Zemeng (6440)
Arable land change dynamics and their driving forces for the major countries of the world	ZHAO Wenwu (6452)
Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium <i>Defluvibacter lusatiensis</i> str. DN7 using different sources of nitrogen	XIAO Jibo, JIANG Huixia, CHU Shuyi (6463)
Study on sustainable development in Nanjing based on ecological footprint model	ZHOU Jing, GUAN Weihua (6471)
Applying input-output analysis method for calculation of water footprint and virtual water trade in Gansu Province	CAI Zhenhua, SHEN Laixin, LIU Junguo, et al (6481)
Correlation analysis of spatial variability of Soil available nitrogen and household nitrogen inputs at Pujiang County	FANG Bin, WU Jinfeng, NI Shaohang (6489)
Characteristics of the fish assemblages in the intertidal salt marsh zone and adjacent mudflat in the Yangtze Estuary	TONG Chunfu (6501)
A comparison study on the secondary production of macrobenthos in different wetland habitats in Shenzhen Bay	ZHOU Fufang, SHI Xiuhua, QIU Guoyu, et al (6511)
Regurgitant from <i>Orgyia ericae</i> Germar induces calcium influx and accumulation of hydrogen peroxide in <i>Ammopiptanthus mongolicus</i> (Maxim. ex Kom.) Cheng f. cells	GAO Haibo, ZHANG Shujing, SHEN Yingbai (6520)
Behavior characteristics and habitat adaptabilities of the endangered butterfly <i>Teinopalpus aureus</i> in Mount Dayao	ZENG Juping, ZHOU Shanyi, DING Jian, et al (6527)
Community structure and dynamics of fig wasps in syconia of <i>Ficus microcarpa</i> Linn. f. in Fuzhou	WU Wenshan, ZHANG Yanjie, LI Fengyu, et al (6535)
Review and Monograph	
Review and trend of eco-compensation mechanism on river basin	ZHANG Zhiqiang, CHENG Li, SHANG Haiyang, et al (6543)
Definition and research progress of sustainable consumption: from industrial ecology view	LIU Jingru, LIU Ruiquan, YAO Liang (6553)
The estimation and application of the water footprint in industrial processes	JIA Jia, YAN Yan, WANG Chenxing, et al (6558)
Research progress in ecological risk assessment of mining area	PAN Yajing, WANG Yanglin, PENG Jian, et al (6566)
Scientific Note	
Litter amount and its dynamic change of four typical plant community under the fenced condition in desert steppe	LI Xuebin, CHEN Lin, ZHANG Shuoxin, et al (6575)
Effects of planting densities and modes on activities of some enzymes and yield in summer maize	LI Hongqi, LIN Haiming, LIANG Shurong, et al (6584)

《生态学报》2013 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的生态学专业性高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,300 页,国内定价 90 元/册,全年定价 2160 元。

国内邮发代号:82-7,国外邮发代号:M670

标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅

执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 32 卷 第 20 期 (2012 年 10 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 20 (October, 2012)

编 辑 《生态学报》编辑部
地址:北京海淀区双清路 18 号
邮政编码:100085
电话:(010)62941099
www.ecologica.cn
shengtaixuebao@rcees.ac.cn

主 编 冯宗炜
主 管 中国科学技术协会
主 办 中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
地址:北京海淀区双清路 18 号
邮政编码:100085

出 版 科 学 出 版 社
地址:北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:1000717

印 刷 北京北林印刷厂
行 销 科 学 出 版 社
地址:东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717
电话:(010)64034563
E-mail:journal@cspg.net

订 购 全国各地邮局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址:北京 399 信箱
邮政编码:100044

广 告 经 营 京海工商广字第 8013 号
许 可 证

Edited by Editorial board of
ACTA ECOLOGICA SINICA
Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
Tel: (010) 62941099
www.ecologica.cn
Shengtaixuebao@rcees.ac.cn

Editor-in-chief FENG Zong-Wei
Supervised by China Association for Science and Technology
Sponsored by Ecological Society of China
Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS
Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

Printed by Beijing Bei Lin Printing House,
Beijing 100083, China

Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North
Street, Beijing 100717, China
Tel: (010) 64034563
E-mail: journal@cspg.net

Domestic All Local Post Offices in China
Foreign China International Book Trading
Corporation
Add: P. O. Box 399 Beijing 100044, China

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q
2.0
9 771000093125