

水稻胰蛋白酶抑制剂对褐飞虱产卵刺激的响应*

解晓军, 高媛媛, 戚舒, 周强

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//昆虫学研究所, 广东 广州 510275)

摘要: 昆虫产卵过程对寄主植物的直接刺激包括产卵器的机械损伤和卵表面物质带来影响, 这些刺激是启动植物诱导抗虫性的重要途径。通过对褐飞虱产卵处理后水稻植株内胰蛋白酶抑制剂 (BBPI) 合成酶基因的表达量及物质含量的测定, 对比褐飞虱取食和机械损伤处理, 发现褐飞虱产卵能够诱导水稻 BBPI 合成酶基因的表达和 BBPI 物质的生成。处理后 6 h, 12 h, 水稻 BBPI 表达量显著高于取食和机械损伤处理; 产卵诱导的 BBPI 物质含量显著高于正常水稻。褐飞虱产卵诱导水稻启动 BBPI 表达和物质合成表明, 与取食危害类似, 水稻同样会对褐飞虱产卵刺激产生响应, 启动相应的植物防御体系, 进而达到阻滞褐飞虱危害的目的。

关键词: 水稻; 褐飞虱; 产卵; 胰蛋白酶抑制剂

中图分类号: Q966 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 05-0104-06

Rice Bowman Birk Proteinase Inhibitor Response to Oviposition Stimulation of *Nilaparvata lugens* (Stål)

XIE Xiaojun, GAO Yuanyuan, QI Shu, ZHOU Qiang

(Institute of Entomology & State Key Laboratory for Biological Control,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Physical damage caused by ovipositor and chemicals attached on the surface of insects' eggs are both included in the direct stimulus of insects' oviposition in the host plants which are the most important factors in inducing a wide range of defensive responses in plants. This article found that compare with feeding and physical treatments, oviposition of Brown Planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* (Stål)) can induce the expression of BBPI (Bowman Birk Proteinase Inhibitor) synthetase gene and cause the production of BBPI. Both of the expression levels of BBPI with oviposition treatment after 6 h and 12 h are higher than those of feeding and physical treatments. The results described above indicate that as to feeding damage, the rice can react to egg deposition of BPH and induce defensive responses, therefore control the further damage of BPH.

Key words: *Oryza sativa*; *Nilaparvata lugens* (Stål); oviposition; bowman birk proteinase inhibitor

植食性昆虫与寄主植物的接触包括取食和产卵两个方面。取食既对植物组织造成了物理损伤, 也掠夺了寄主的营养, 因而是普遍关注的焦点。近 10 多年来, 随着植物对昆虫取食反应的分子机理方面研究的深入, 植物诱导抗虫性机理越来越清楚。植物在遭受植食性昆虫取食为害后, 通过以莱

菲酸、水杨酸和乙烯为主的一系列信号途径, 启动植物的直接或者间接防御体系^[1-5]。

植食性昆虫无论是将卵产在植物表面还是组织内, 卵本身对寄主植物并没有直接危害。但产卵过程导致的机械损伤或是卵壳表面携带的化学物质会对植物产生影响, 尤其是将卵产在组织内的昆虫,

* 收稿日期: 2010-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31071680, 30771458)

作者简介: 解晓军 (1986 年生), 男, 硕士; 通讯作者: 周强; E-mail: lsszhou@mail.sysu.edu.cn

不仅其产卵器会对寄主组织造成伤害, 而且产卵液会进入植物组织, 植物也势必对这些外来刺激产生反应。从生态策略上来说, 产卵刺激为寄主植物提供了进攻者后代数量等方面的信息, 因此, 植物完全有可能对植食性昆虫的产卵行为产生反应。植物对昆虫产卵诱导产生的防御反应的最大收益在于通过减少卵的存活数, 阻滞幼虫或正在产卵的雌虫的生长发育, 从而避免将来更大规模的取食为害^[6]。

对双子叶模式植物拟南芥 *Arabidopsis* 的研究表明, 植食性昆虫的产卵与取食一样也能诱导植物产生各种防御反应^[7-9], 主要表现为通过产生挥发物吸引天敌, 起到间接防御作用^[10]。Dawn 等通过基因芯片技术研究两种菜粉蝶产卵对拟南芥的影响时, 发现产卵特异性诱导了拟南芥的全面防御反应^[11]。但目前尚无昆虫产卵诱导单子叶模式植物水稻 *Oryza sativa* 产生防御反应方面的研究报道, 而从褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 产卵特点来看, 其危害方式完全有可能诱导水稻产生更强的防御反应。褐飞虱的产卵方式与蝶类不同, 蝶类将卵产在叶表面, 不会直接对叶片产生机械损伤; 而褐飞虱用产卵器刺破水稻植株表皮, 将卵块产在叶鞘组织内, 其危害部位和深度与其对水稻的取食过程有高度的相似性, 有可能像水稻应对褐飞虱取食一样^[12-14], 启动水稻的防御反应。

胰蛋白酶抑制剂 (Bowman Birk Proteinase Inhibitor, BBPI) 是一种典型的植物防御相关蛋白, 也是研究最为详细的植物防御物质, 它通过影响昆虫对食物的消化而达到防御目的^[15], 并被认为是一种有效的防御物质而在转基因抗虫植物中得到了广泛应用^[16-17]。此外, BBPI 合成酶基因也是茉莉酸信号途径的标志基因^[18-21]。本研究以单子叶模式植物水稻及其主要害虫褐飞虱产卵为切入点, 以典型的植物防御相关蛋白水稻 BBPI 为指标, 分析水稻对褐飞虱产卵刺激响应, 以期研究水稻应对褐飞虱产卵的防御反应提供证据, 并为深入了解产卵诱导植物产生防御反应的分子机理提供信息。

1 材料与与方法

1) 水稻品种: 选用标准感性品种 TN1, 种子于室内催芽后, 分期单株移至塑料杯内 (直径 5 cm × 7 cm), 在人工气候箱内培养, 温度 (27 ± 1) °C、相对湿度 80%、光照 14 L: 10 D。秧龄 20 d 时供试。

2) 虫源: 褐飞虱于采自广东省华南农业大学农场稻田, 在室内感性品种七袋占上饲养多代。温

度 (27 ± 1) °C、相对湿度 80%、光照 14 L: 10 D。

3) 水稻处理: 取盆栽水稻进行如下处理, 褐飞虱产卵处理: 在每株水稻幼苗的叶鞘部位接 3 头剪除口针的羽化后 3 天的褐飞虱怀卵雌虫 (处于产卵高峰期), 分别处理水稻 0 (对照), 6, 12, 24, 36, 48 h。褐飞虱取食处理: 在每株水稻幼苗的叶鞘部位接 3 头 3 龄的褐飞虱若虫, 分别处理水稻 0 (对照), 6, 12, 24, 36, 48 h。机械损伤处理: 在每株水稻幼苗的叶鞘部位用已消毒的 4 号昆虫针刺 20 下, 分别处理水稻 0 (对照), 6, 12, 24, 36, 48 h。以上每个处理重复 3 次。

4) 基因表达的测定: 用 RT-PCR 的方法测定不同处理对水稻防御相关基因表达的影响。取不同处理的水稻叶片 100 mg, 在液氮冷冻条件下碾成粉末, 在液氮挥发完全前将其移入 2 mL 的离心管, Trizol 试剂盒 (GibcoBRL) 提供的方法提取水稻总 RNA。取 1 g 不同处理的水稻叶片总 RNA, Invitrogen 公司的 SuperScript II 逆转录 (RT) 试剂盒合成 cDNA 第一链。PCR 扩增用 rTaq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 扩增条件: 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 30 个循环后于 72 °C 延伸 8 min。逆转录及 PCR 所用特异性引物见表 1。取 5 L PCR 产物进行琼脂糖 ($w = 1\%$) 电泳。每个处理设 3 个重复。荧光定量 PCR 的方法测定不同处理对水稻蛋白酶抑制剂基因表达的影响。水稻 RNA 的提取方法同上, 取 1 g 不同处理的水稻叶片总 RNA, TaKaRa 公司的 PrimeScript™ 逆转录 (RT) 试剂盒合成 cDNA 第一链。用于荧光定量 PCR 的 *BBPI* 的特异引物和内参基因 *Actin* 引物分别设计为: QPI-F: 5'-GCTCATCTGCGAGGACATCT-3', QPI-R: 5'-TTCCTCATGGTCCACACAAG-3', QActin-F: 5'-ACTGTC-CCCATCTATGAAGGA-3', QActin-R: 5'-CTGCTG-GAATGTGCTGAGAGA-3'。据 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) Kit 提供的方法, 用 ABI Prism 7900HT 进行荧光定量 PCR, 运行条件为: 预变性: 95 °C, 30 s, 1 个循环; PCR 反应: 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 ~ 34 s, 40 个循环。每个处理取 3 个样品, 每个样品的 RNA 反转录的 cDNA 在每次荧光定量 PCR 时进行 3 个重复, 重复运行 3 次。蛋白酶抑制剂基因的相对拷贝数根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[22] 进行分析。

5) 水稻蛋白酶抑制剂 PI 含量的测定: 酶液的提取: 参照 Ward 等^[23] 的方法。取处理后的水稻幼苗植株, 称量, 按 $m:v = 1:10$ 的比例加入 0.2 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8) 内含 $w =$

0.1% Tween-20, 冰浴匀浆, 匀浆液在 4 °C, 1 500 r/min 离心 15 min, 上清液作为粗酶液。BBPI 含量测定: 取 0.2 mL 酶液和 0.5 mL 的 0.1 μg/μL 的胰蛋白酶溶液在室温下振荡混合 10 min, 加入 100 μL 的 25 mg/mL 偶氮酪蛋白, 37 °C 培育 30 min,

再在 12 000 r/min 下离心 10 min, 取 100 μL 的上清液和 100 μL 的 0.5 mol/L 的 NaOH, 在 DLAB 全自动酶标仪上于 450 nm 下检测吸光度值, 以 BBPI 绘制标准曲线, 结果以 μg/mg 蛋白表示, 总蛋白含量用 Bradford 方法测定^[24]。

表 1 PCR 所用基因特异引物
Table 1 Gene specific primer for PCR

基因名称	GenBank 登录号	已知功能	特异引物
<i>BBPI</i>	U76004	蛋白酶抑制剂, 杀虫	F: 5'-GCTCATCTGCGAGGACATCT-3' R: 5'-TTCCTCATGGTCCACACAAG-3'
<i>PR-1</i>	AJ278436	病原相关蛋白, 抗病	F: 5'-GTGGACCCGACACAACGCG-3' R: 5'-GCCGATCGCCGTCGAGTC-3'
<i>PR-2</i>	AF443600	病原相关蛋白, 抗病	F: 5'' -ACATCGCCGTCGCAACGAG-3' R: 5'-GGTTCTCGTTGAACATGGCG-3'
<i>PR-3</i>	AB006188	几丁质酶, 杀虫和抗病	F: 5'-GGCGTCCGACTTCGACATCGA-3'' R: 5'-CATGATGCCGCCGCTACTTGG-3''
<i>Actin</i>	X15865	肌动蛋白 (对照)	F: 5'-ACTGTCCCATCTATGAAGGA-3' R: 5'-CTGCTGGAATGTGCTGAGAGA-3'

2 结 果

2.1 褐飞虱产卵诱导水稻蛋白酶抑制剂合成酶基因 (*BBPI*) 的表达

BBPI 通过影响昆虫对植物进行消化的蛋白酶的活性而在植物虫害防御中去重要作用。褐飞虱产卵能诱导水稻 *BBPI* 的表达, 机械损伤和褐飞虱取食也都能诱导蛋白酶抑制剂 *BBPI* 的表达, 其中褐飞虱产卵和取食的诱导作用要强于机械损伤 (图 1)。

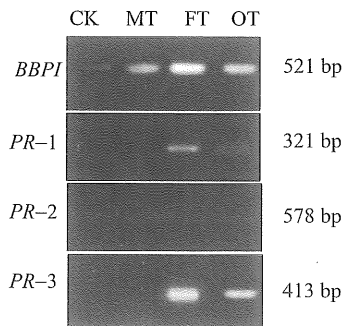


图 1 防御物质相关基因在褐飞虱产卵水稻中的表达

Fig. 1 Defense chemical gene expression after the treatment with BPH oviposition in rice

BBPI: 蛋白酶抑制剂合成酶基因; *PR-1*: 酸性病原相关蛋白基因; *PR-2*: 葡聚糖酶基因; *PR-3*: 几丁质酶基因; *Actin*: 肌动蛋白基因. CK: 健康植株; MT: 机械损伤植株; FT: 取食为害植株; OT: 产卵为害植株

PR1, *PR2*, *PR3* 均属病原相关蛋白, 在植物抗病虫防御体系中起重要作用。褐飞虱产卵对病原相关基因 *PR1* 和 *PR3* 的表达都有诱导作用, 但是对 *PR2* 的表达没有诱导作用。褐飞虱取食也能诱导 *PR2* 和 *PR3* 的表达, 而机械损伤对这三个基因的表达都没有诱导作用 (图 1)。

水稻植株 *BBPI* 的定量检测表明: 褐飞虱产卵能比较显著的诱导 *PI* 基因的表达, 并且基因的表达量随处理时间的延长呈先上升后下降的趋势。产卵刺激后 12 h 的 *PI* 基因的表达量最高, 为对照的 2.99 倍, 并且显著高于 6 h 和 24 h 的表达量, 但是 6 h 与 24 h 之间的表达量差异不显著, 而 36 h 和 48 h 时, *BBPI* 的表达量基本上回复到了对照的水平 (图 2)。

将褐飞虱产卵对 *BBPI* 的定量诱导表达作用与其它处理方式进行对比, 产卵刺激的前期 (6 h 和 12 h), 叶片胰蛋白酶抑制剂基因的表达均显著高于取食和机械损伤。处理后 6 h, 褐飞虱产卵与褐飞虱取食和机械损伤之间对基因的定量诱导表达作用差异显著, 褐飞虱产卵处理的诱导作用显著强于取食处理; 处理后 12 h, 褐飞虱产卵的诱导作用与其它两种处理方式差异显著。

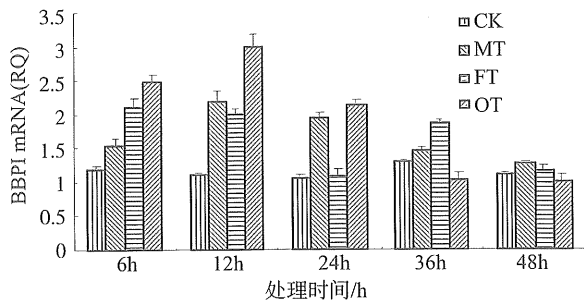


图2 定量PCR检测不同处理方式对水稻BBPI的诱导表达

Fig. 2 Rice BBPI expression measured by Real-time PCR in different treatments

CK: 健康植株; MT: 机械损伤植株; FT: 褐飞虱取食处理植株; OT: 褐飞虱产卵处理植株; 6-48 h: 产卵分别处理6~48 h; 同组不同字母之间代表差异显著, Student-Newman-Keuls 检验 ($P < 0.05$)

2.2 褐飞虱产卵对水稻蛋白酶抑制剂 (BBPI) 含量变化的影响

水稻植株 BBPI 含量检测表明: 与对照相比, 褐飞虱产卵能比较显著的诱导 BBPI 含量上升, 对照植株与褐飞虱产卵处理后 6, 12, 24, 36, 48 h 水稻 BBPI 的含量分别为每 g 蛋白 10.77, 11.13, 13.05, 12.47, 10.92 和 10.97 mg。褐飞虱产卵诱导下 BBPI 的含量逐渐上升, 12 h 时达到最大值, 含量上升状态一直持续到处理后 24 h, 随后开始下降, 处理后 36 h, BBPI 的含量基本上回复到对照水平 (图3)。

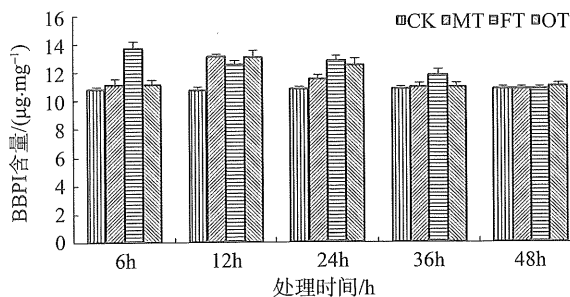


图3 不同处理方式对水稻 BBPI 含量变化的影响

Fig. 3 Rice BBPI level changes in different treatments

CK: 健康植株; MT: 机械损伤植株; FT: 褐飞虱取食处理植株; OT: 褐飞虱产卵处理植株; 6-48 h: 产卵分别处理6~48 h; 同组不同字母之间代表差异显著, Student-Newman-Keuls 检验 ($P < 0.05$)

将褐飞虱产卵对水稻 BBPI 含量的诱导作用与其它处理方式进行对比发现: 褐飞虱产卵, 取食和

机械损伤处理下 BBPI 的含量都是先上升后下降, 产卵处理下的 BBPI 含量的最高值要低于褐飞虱取食处理下的最高值, 并且达到最高值的时间 (处理后 12 h) 晚于取食处理的 6 h; 褐飞虱产卵与机械损伤处理下 BBPI 的含量差异不显著, 但是褐飞虱取食处理下 BBPI 的含量为每 g 蛋白 13.68 mg, 明显高于前两种处理 ($d_f = 3$, $F = 1185$, $P = 0.001$) (图3)。

3 讨论

昆虫在和植物的长期协同进化过程中, 发展了许多独特的保护及适应机制^[25]。植食性昆虫产卵行为有丰富的生态学功能, 如雌性昆虫的产卵液中含有雄性个体在交配过程中传递的附腺分泌物和雌性自身的分泌物, 能同时表达雌雄个体的信息; 通过在卵表面增加覆盖物以防卫来自捕食者、寄生者、病原微生物等自然天敌的攻击和防止水分散失过多的作用^[26]。最近的研究发现多种昆虫卵内含有与抗病虫相关的信号物质茉莉酸和水杨酸^[27], 这表明产卵在植物与昆虫相互关系中可能起着重要而又复杂的作用。

对水稻诱导抗虫反应的研究表明: 褐飞虱取食和产卵刺激都能诱导水稻产生 BBPI, 但是二者之间的诱导强度以及发挥诱导作用的时间存在着一定的差异, 产卵处理下, BBPI 量的变化呈先上升后下降的趋势; 而取食处理诱导的变化趋势没有这么明显, 持续时间更长。褐飞虱产卵为害诱导 BBPI 的表达量达到最大值的时间基本上都晚于褐飞虱取食为害, 并且产卵处理下防御基因表达量的最高值一般都低于取食处理。其原因可能是褐飞虱产卵处理的为害程度较小从而造成了诱导作用的延后发挥, 或者是由于褐飞虱取食和产卵分别是通过不同的途径来激活水稻的防御, 从而导致基因表达量达最大值时诱导时间的差异, 这需要进一步的深入研究。

产卵诱导水稻 BBPI 的产生, 并可能参与启动植物的超敏反应。由于产卵诱导的 BBPI 在 36 h 后就下降到对照水平, 而幼虫可能需要 9~10 d 才能孵化^[28], 因此, 卵诱导产生的 BBPI 也就无法起到抑制幼虫取食的作用。实验中发现: 褐飞虱将卵产在水稻组织内后形成产卵痕, 产卵痕周围的水稻组织会出现细胞坏死的现象, 从而形成明显的产卵斑, 这与在不相容的植物-病原物互作中寄主受病原物侵染的部位出现的坏死斑相似。由于 BBPI 不仅是植物抵抗昆虫取食的一个重要因子, 而且还能

限制微生物对植物的入侵行为^[29]。因此推测,褐飞虱产卵诱导的 BBPI 可能首先参与水稻产生超敏反应,抵抗伤口感染微生物。褐飞虱将卵产在水稻的叶鞘组织内的过程中,水稻受到双重伤害,即褐飞虱的产卵器不仅伤害了水稻组织,而且将卵留在了水稻组织内。产卵痕周围组织的坏死可能有两方面的原因,一是产卵器的直接伤害而导致组织细胞失水枯死;二是水稻对褐飞虱产卵或留在组织内的卵产生超敏反应,水稻组织出现程序性坏死。褐飞虱卵与水稻组织被隔离开来,胚胎发育因缺少水分供应受到影响,最终对卵产生直接防御作用。

植物能够及时的启动防御反体系应对昆虫产卵,从而有效的阻止孵化出的幼虫对其造成的取食为害,这种早期预警行为消耗的时间和能量比较少,所以在一年生植物中比在多年生植物中常见,具体阐述一年生植物如何平衡这种“成本-收益”,可能需要更多的对发育和生殖参数方面的研究^[30]。

产卵诱导植物产生防御反应的激发子特性现在仍然不知道,但是推测和包被在卵表面的输卵管分泌物有关^[31]。如果昆虫卵只是与植物表面接触并且产卵过程中没有对植物造成伤害,则能诱导植物做出防御的与卵有关的诱导因子需要与植物的表皮细胞相接触,然后诱导因子要么是高亲脂性的以透过植物表面的蜡层,要么需要具有切开植物表皮的功能。一旦诱导因子到达表皮细胞后,它会通过受体或者形成通道的方式进入细胞。如果昆虫产卵时对植物造成了伤害,诱导因子就会通过被破坏的细胞膜进入细胞。因此,深入对昆虫产卵液中的信号刺激物的研究是解决植物-昆虫产卵相互关系的突破口。

参考文献:

- [1] 娄永根,程家安.植物的诱导抗虫性[J].昆虫学报,1997,40(3):320-331.
- [2] ARIMURA G, KOST C, BOLAND W. Herbivore-induced indirect plant defences[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005,1734(2): 91-111.
- [3] LEITNER M, BOLAND W, MITHÖFER A. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula* [J]. *New Phytologist*, 2005,167(2): 597-606.
- [4] CHEN M S. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review[J]. *Insect Science*, 2008, 15(2): 101-114.
- [5] 卢凯,李欣,周嘉良,等.虫害诱导的水稻挥发物抑制水稻病原菌的生长[J].科学通报,2010,55(30):2925-2930
- [6] HILKER M, KOB S C, VARAMA M, et al. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids[J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(4): 455-461.
- [7] DOSS R P, OLIVER J E, PROEBSTING W M, et al. Bruchins: insectderived plant regulators that stimulate neoplasm formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 6218-6223.
- [8] BALBYSHEV N F, LORENZEN J H. Hypersensitivity and egg drop: a novel mechanism of host plant resistance to *Colorado potato beetle* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *J Econ Entomol*, 1997, 90(2): 652-657.
- [9] HILKER M, MEINERS T. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense[J]. *J Chem Ecol*, 2006, 32(7): 1379-1397.
- [10] KÖPKE D, SCHRÖDER R, FISCHER H M, et al. Does egg deposition by herbivorous pine sawfly affect transcription of sesquiterpene synthases in pine? [J]. *Planta*, 2008, 228(3): 427-438.
- [11] DAWN L, CAROLINE G D, FRIEDERIKE B, et al. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 784-800.
- [12] 徐涛,周强,夏嫄,等.虫害诱导的水稻挥发物对褐飞虱寄主选择行为的影响[J].科学通报,2002,47(11):849-853.
- [13] LOU, Y G, HUA X Y, TURLINGS T C J, et al. Differences in induced volatile emissions among rice varieties result in differential attraction and parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* in the field [J]. *J Chem Ecol*, 2006, 32(11): 2375-2387.
- [14] HAO P, LIU C, WANG Y, et al. Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1810-1820.
- [15] BHATTACHARYYA A, LEIGHTON S M, BADU C R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2007, 145(4): 669-677.
- [16] TAMHANE V A, CHOUGULE N P, GIRI A P, et al. In vivo and in vitro effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005,1772(2): 156-167.
- [17] OLIVEIRA A S, MIGLIOLO L, AQUINO R O, et al.

- Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45 (10): 858 - 865.
- [18] RYAN C A. The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477(1-2): 112 - 121.
- [19] BOTELHO J S, SIQUEIRA J C L, JARDIM B C, et al. Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves; accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding and herbivory [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (20): 9404 - 9409.
- [20] HUMMEL G M, SCHURR U, BALDWIN I T, et al. Herbivore-induced jasmonic acid bursts in leaves of *Nicotiana attenuata* mediate short-term reductions in root growth [J]. *Plant Cell and Environment*, 2009, 32 (2): 134 - 143.
- [21] ZHOU G X, QI J F, REN N, et al. Silencing OsHILOX makes rice more susceptible to chewing herbivores, but enhances resistance to a phloem feeder [J]. *Plant J*, 2009, 60(4): 638 - 648.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 - 408.
- [23] WARD K A, TUNG P, LAMB N, et al. Structural requirements for biologically active jasmonates: Induction of protease inhibitors and cotyledon senescence [J]. *Plant Growth Regul*, 1999, 27(1): 49 - 56.
- [24] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [25] BALDWIN I T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(4): 1449 - 1458.
- [26] HILKER M, MEINERS T. *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition* [M]. Malden: Wiley Blackwell, 2002: 3 - 31.
- [27] TOOKER J F, DE MORAES C M. Jasmonate in lepidopteran eggs and neonates [J]. *J Chem Ecol*, 2005, 31(11): 2753 - 2759.
- [28] 程遐年, 吴进才, 马飞. 褐飞虱研究与防治 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 47 - 48.
- [29] TAMAYO M C, RUFAT M, BRAVO J M, et al. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(1): 62 - 71.
- [30] HAILE F J, HIGLEY L G. Changes in soybean gas-exchange after moisture stress and spider mite injury [J]. *Environ Entomol*. 2003, 32(3): 433 - 440.
- [31] SCHRÖDER R, FORSTREUTER M, HILKER M. A plant notices insect egg deposition and changes its rate of photosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(1): 470 - 477.