

褐飞虱体内类酵母共生菌与氨基酸营养的关系

王国超¹, 傅强^{1*}, 赖凤香¹, 陈铭学², 牟仁祥², 张志涛¹

(1. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室 杭州 310006;

2. 中国水稻研究所, 农业部稻米及制品质量监督检验测试中心 杭州 310006)

摘要: 利用全纯人工饲料饲喂技术, 研究了缺失不同氨基酸对高温(35℃)处理后的缺菌褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 相对生长速度、体内共生菌数量的影响, 发现 10 种必需氨基酸对缺菌褐飞虱生长的影响明显大于 10 种非必需氨基酸, 饲料中必需氨基酸的缺少对褐飞虱(特别是高温处理褐飞虱)体内共生菌数量有一定的刺激作用。分析了缺菌试虫体内氨基酸组成和转氨酶活性的变化规律, 发现在摄取的氨基酸营养相同的条件下(用全纯饲料 D-97 饲养), 高温处理试虫体内蛋白质氨基酸组成无明显变化, 而游离氨基酸总量明显上升, 且必需氨基酸所占比例显著下降, 其中组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)和苯丙氨酸(Phe)摩尔百分含量均显著下降, 表明必需氨基酸的相对缺乏可能是体内蛋白质合成受阻的一个重要原因, 推测这可能是由于试虫体内共生菌数减少致使所合成的必需氨基酸减少而引起。处理试虫体内谷氨酰胺合成酶(GS)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性明显提高, 天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性显著降低, 结合游离氨基酸中谷氨酰胺(Gln)显著增多, 推测类酵母共生菌可能利用谷氨酰胺等为原料进行必需氨基酸的合成。

关键词: 褐飞虱; 类酵母共生菌; 氨基酸; 谷氨酰胺合成酶; 氨基转移酶

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)04-0483-08

Relationship between yeast-like symbiotes and amino acid requirements in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae)

WANG Guo-Chao¹, FU Qiang^{1*}, LAI Feng-Xiang¹, CHEN Ming-Xue², MOU Ren-Xiang², ZHANG Zhi-Tao¹ (1. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 2. Rice Product Quality Inspection and Supervision Center, Ministry of Agriculture, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: The aposymbiotic *Nilaparvata lugens* Stål was obtained by three-day high temperature treatment (35°C) and then reared on chemically defined diets with one of 20 amino acids deleted. The relative growth rate and number of yeast-like symbiotes of aposymbiotic *N. lugens* were studied. The results showed that ten essential amino acids were more important for the growth of aposymbiotic *N. lugens* than ten non-essential ones, and the number of yeast-like symbiotes increased in *N. lugens*, especially in aposymbiotic ones, which were reared on diets with one of essential amino acids deleted. The amino acid composition and activity of transaminase in aposymbiotic *N. lugens* reared on the complete diet D-97 were also tested. There was no change in protein composition in aposymbiotic *N. lugens*, but the total amount of free amino acids increased significantly and the ratio of essential amino acids decreased, with the molar percentage of essential amino acids such as histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine and phenylalanine decreased markedly. The results suggested a relative reduction of the essential amino acids be an important factor on hindering protein synthesis. The activity of glutamine synthetase (GS) and alanine aminotransferase (ALT) increased obviously, while aspartate aminotransferase (AST) decreased distinctly. Combined with the result that glutamine increased remarkably, it was inferred that yeast-like symbiotes may use glutamine as resource to synthesize essential amino acids.

Key words: *Nilaparvata lugens*; yeast-like symbiotes; amino acid; glutamate synthase; aminotransferase

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370937); 浙江省自然科学基金人才培养项目(R304466)

作者简介: 王国超, 女, 1975年11月生, 河北衡水人, 博士研究生, 研究方向为昆虫微生物, E-mail: wgch1019@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: qiangfu1@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2004-08-18; 接受日期 Accepted: 2004-11-12

多数昆虫一般需要从食物中摄取精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、蛋氨酸(Met)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)和色氨酸(Trp)等 10 种必需氨基酸(Dadd, 1985),但同翅目昆虫以氨基酸营养较不平衡的植物汁液为食,其中许多必需氨基酸的浓度很低,有的甚至检测不出,各必需氨基酸的总含量常常不及氨基酸总浓度的 20%(Sandstrom and Moran, 1999)。研究表明,该类昆虫对食物中必需氨基酸营养的需求较少,如桃蚜 *Myzus persicae* 仅必需蛋氨酸、组氨酸和异亮氨酸 3 种,这种营养需求特征与该类昆虫体内存在的共生菌有密切关系(Dadd, 1985);业已发现蚜虫体内 *Buchnera* 共生菌的染色体 DNA 或质粒 DNA 中含有 13 个与必需氨基酸合成相关的基因(Douglas, 1998)。

水稻主要害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 是一种重要的同翅目昆虫,其脂肪体内存在大量类酵母共生菌(yeast-like symbiote, YLS),以垂直方式由母体传给子代(Buchner, 1965 ;Noda, 1977 ;Cheng and Hou 2001)。该虫对必需氨基酸的需求具典型的同翅目昆虫氨基酸需求特征,人工饲料饲养实验证实,任何一种氨基酸的缺失,褐飞虱均能由初孵若虫发育为成虫(Koyama, 1985)。连续两个世代的生长发育和繁殖亦表明,多数昆虫所需的 10 种必需氨基酸中,仅蛋氨酸、赖氨酸、色氨酸和异亮氨酸 4 种为必需(傅强等,待发表)。一般认为褐飞虱这种氨基酸需求特点与体内类酵母共生菌有关(Koyama, 1985),但迄今尚缺少足够的实验证据,仅傅强等(2001)报道类酵母共生菌数量减少的褐飞虱对必需氨基酸的需求明显增加。为此,本研究拟从缺少氨基酸对缺菌褐飞虱的生长速率、体内共生菌的影响以及缺菌试虫氨基酸(游离的、含于蛋白质中的)的组成、主要氨基酸代谢酶等方面的研究着手,进一步探明褐飞虱类酵母共生菌与氨基酸营养需求的关系。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫及其处理

供试褐飞虱为中国水稻研究所用感虫水稻品种 TN1 饲养了 70 代以上的室内种群。实验时,将孵化 24 h 内的 1 龄若虫笼罩饲养于 TN1 稻苗上,在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 下连续处理 3 天后,参照 Fu 等(2001)的方法分别接于 21 种全纯人工饲料上,其中包括 1 种全组分的人工饲料 D-97(对照饲料)和 20 种分别比 D-97 少

1 种氨基酸的人工饲料(处理饲料),在 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 下饲养。同时,将未经高温处理的初孵 1 龄若虫用 TN1 在 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下饲养 3 天后接于 21 种人工饲料上作为对照试虫。

1.2 褐飞虱相对生长速度的测定

取 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 下连续处理 3 天后的若虫于分析天平(Mettler AE240 精度 0.01 mg)上称重,作为初始虫重 W_1 ;人工饲料上 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 饲养 10 天后,取各饲料上试虫称重作为终虫重 W_2 。按下式计算相对生长速度(relative growth rate, RGR): $\text{RGR} = [\ln(W_2/W_1)]/10$ (Wilkinson and Ishikawa, 2001)。

1.3 褐飞虱体内共生菌的观察

每次称取在人工饲料上饲养了 10 天的试虫 3 ~ 6 头(约 1.5 mg)参照 Noda(1974)的方法,加 100 ~ 200 μL 0.8% 的生理盐水研磨,匀浆后直接吸取少量匀浆液于血球计数器上,用双目显微镜在 10×40 倍下采用五点取样法观察记录共生菌数量,并换算成单位体重试虫所含共生菌数(菌数/mg)。每种饲料上处理试虫和对照试虫各重复 3 次。

1.4 褐飞虱体内氨基酸含量的测定

取在全组分人工饲料上饲养了 7 天的处理试虫和对照试虫按下述方法处理后分别进行游离氨基酸和水解氨基酸分析。

游离氨基酸测定样品处理:取 5 ~ 6 头试虫(约 2 mg),称重后加入 500 μL 的 75% 甲醇研磨、匀浆,在 $4500 \times g$ 下离心 10 min,取上清液测定。

水解氨基酸测定样品处理:取相似数量的试虫,称重后放入一端烧成细管口的玻璃试管中,加 50% HCl 5 mL,抽真空后将细管封口,再于 110°C 水解 23 h。取水解液加蒸馏水定容至 25 mL,取 1 mL 真空干燥,加 1 mL 1% HCl 溶解,过滤后测定。此水解氨基酸由虫体内游离氨基酸和蛋白质水解后的氨基酸两部分组成。

样品于农业部稻米及制品质量监督检验测试中心进行 HPLC 测定,重复 3 次。HPLC 测定条件为:色谱柱 ZORBAX Eclipse, AAA $4.6 \times 150 \text{ m}$ ($3.5 \mu\text{m}$);流速 2.0 mL/min;流动相 A :40 mmol/L Na_2HPO_4 (pH 7.8);流动相 B :甲醇:乙腈:水 = 45:45:10(V:V:V);柱温 40°C ;柱前衍生,衍生剂为 OPA,FMOC;荧光检测器 0 min 时 EX = 340,EM = 450,PMI(增益)= 10;15 min 时 EX = 266,EM = 306,PMI = 9。

1.5 褐飞虱体内谷氨酰胺合成酶(GS)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性测定

分别取 4 ~ 6 头全组分饲料饲养了 7 天的处理

试虫和对照试虫,在 100 μ L 匀浆液中[0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 0.0001 mol/L EDTA-2Na 0.01 mol/L 蔗糖 0.8% NaCl]匀浆后,离心,取上清液待测。酶活性采用南京建成生物工程研究所生产的谷氨酰胺合成试剂盒(产品号:A047)、丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(赖氏法)(产品号:C009)和天冬氨酸氨基转移酶试剂盒(赖氏法)(产品号:C010)进行,具体测定方法参照各试剂盒说明书。

1.6 数据分析

方差分析和多重比较采用 DPS 软件(唐启义和冯明光,1997),其中百分率类数据在方差分析时进行反正弦平方根转换。

2 结果与分析

2.1 试虫相对生长速度的变化

同一饲料上,高温处理试虫的相对生长速度(RGR)与对照试虫相比都有所下降(图 1:A),除缺谷氨酰胺(Gln)或丙氨酸(Ala)的饲料上未达显著水平($P > 0.05$),缺胱/半胱氨酸(Cys(s))的饲料上达到显著水平($P = 0.012$)外,缺其他氨基酸的饲料上都达到极显著水平($P < 0.01$)。其中,缺必需氨基酸 Arg、His、Lys、Leu、Ile、Met、Thr、Phe、Trp 或 Val 的 10 种饲料上,处理试虫的相对生长速度降幅均在 70% 以上,特别是 Arg、Ile、Leu、Met、Phe 或 Thr 的缺失使处理试虫的相对生长速度降低 80% 以上;而缺非必需氨基酸丙氨酸(Ala)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、胱氨酸(Cys(s))、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)或酪氨酸(Tyr)的 10 种饲料上,相对生长速度的降幅除 Cys(s) 达到 56.7% 外,其余均不超过 45% (图 1:B)。

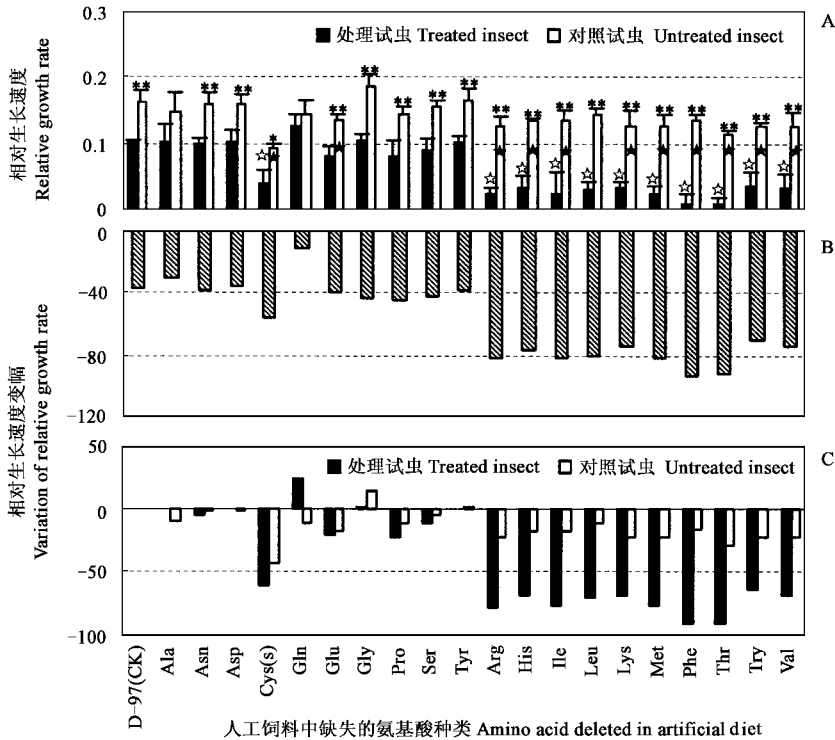


图 1 各饲料上褐飞虱的相对生长速度及其变化

Fig. 1 Relative growth rate of *Nilaparvata lugens* on different artificial diets

A: 相对生长速度(平均值 \pm 标准差) Relative growth rate (mean \pm SD); B: 同一饲料上处理试虫与对照试虫相对生长速度的变幅 = (处理试虫相对生长速度 - 对照试虫相对生长速度) / 对照试虫相对生长速度 $\times 100$ Variation of relative growth rate (RGR) between treated and untreated insects on the same diet = (RGR of treated insects - RGR of untreated insects) / RGR of untreated insects $\times 100$; C: 同一试虫在缺失氨基酸饲料和全组分饲料上相对生长速度的变幅 = (缺失氨基酸饲料试虫相对生长速度 - 全组分饲料试虫相对生长速度) / 全组分饲料试虫相对生长速度 $\times 100$ Variation of relative growth rate (RGR) for the same insects on the deleted artificial diets and complete diet D-97 = (RGR of insects on deleted artificial diet - RGR of insects on complete diet D-97) / RGR of insects on complete diet D-97 $\times 100$; *, ** 分别表示同一饲料上处理试虫与对照试虫间差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$), 图 2、图 3 同 Significant differences between treated and untreated insects on the same artificial diet at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, the same for Fig. 2 and Fig. 3; ☆ 缺失单种氨基酸饲料上的处理试虫与全组分饲料上处理试虫间差异显著 ($P < 0.05$), 图 2 同 Significant differences between treated insects on diets with single amino acid deleted and those on the complete diet D-97 ($P < 0.05$), the same for Fig. 2; ★ 缺失单种氨基酸饲料上的对照试虫与全组分饲料上对照试虫间差异显著 ($P < 0.05$), 图 2 同 Significant differences between the untreated insects on diets with single amino acid deleted and those on the complete diet D-97 ($P < 0.05$), the same for Fig. 2.

从缺失不同氨基酸对两类试虫的影响来看(图 1:A),高温处理试虫在缺失必需氨基酸的 10 种饲料上的相对生长速度均显著低于全组分对照饲料上的试虫 ($P < 0.05$),但在缺失非必需氨基酸的 10 种饲料上,除缺失 Cys(s)外均与全组分饲料试虫无显著差异 ($P > 0.05$)。对照试虫在各饲料上的变化趋势虽然多与处理试虫相似,但变化幅度明显较小(图 1:C)。在缺失必需氨基酸的 10 种饲料上对照试虫的相对生长速度降幅均在 30% 以下,而处理试虫降幅均在 60% 以上。上述结果表明:10 种必需氨基酸的缺失对高温处理后褐飞虱生长的影响明显较缺失 10 种非必需氨基酸的大。

2.2 试虫体内类酵母共生菌数量的变化

同一饲料上,高温处理试虫体内类酵母共生菌数量均显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)低于对照试虫(图 2:A)。而且,不同饲料上处理试虫类酵母共生菌数量的降低幅度有一定的差异,其中缺失 10 种必需氨基酸之一的饲料上,降幅高于 70% 的仅有缺 His、Met 或 Phe 的饲料,降幅介于 60% ~ 70% 间的有缺 Lys 或 Val 的饲料,其余 5 种(缺 Arg、Ile、Leu、Thr 或 Trp)饲料上试虫降幅均低于 60%;而缺失 10 种非必需氨基酸之一的饲料上,除缺 Cys(s)或 Tyr 的饲料外,降幅均超过 70%(图 2:B)。显然,缺失必需氨基酸的饲料上褐飞虱体内类酵母共生菌数量的降低幅度相对较小,共生菌数量与饲料中缺失氨基酸的种类有一定关系。

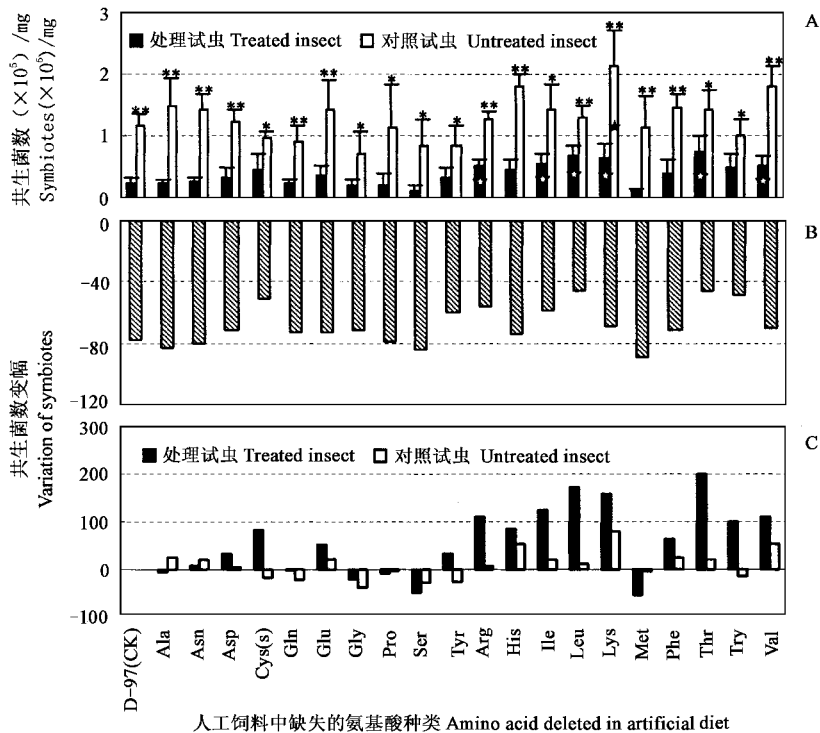


图 2 各饲料上褐飞虱体内类酵母共生菌的数量变化

Fig. 2 Population of yeast-like symbiotes in the *Nilaparvata lugens* on different artificial diets

A: 单位鲜虫重类酵母共生菌数(平均值 \pm 标准差) The number of yeast-like symbiotes per mg insects (mean \pm SD); B: 同一饲料上处理试虫与对照试虫菌数的变幅 = (处理试虫共生菌数 - 对照试虫共生菌数) \times 100 Variation of yeast-like symbiotes (YLS) between treated and untreated insects on the same diet = (YLS number of treated insects - YLS number of untreated insects) / YLS number of untreated insects \times 100; C: 同一试虫在缺失氨基酸饲料和全组分饲料上共生菌数的变化 = (缺失氨基酸饲料试虫共生菌数 - 全组分饲料试虫共生菌数) / 全组分饲料试虫共生菌数 \times 100 Variation of yeast-like symbiotes (YLS) number for the same insects on the artificial diets with single amino acid deleted and the complete diet D-97 = (YLS number of insects on artificial diet with single amino acid deleted - YLS number of insects on the complete diet D-97) / YLS number of insects on the complete diet D-97 \times 100.

将缺失各氨基酸饲料上的试虫与全组分饲料上的试虫进行比较(图 2:C)发现:对于处理试虫来说,缺失必需氨基酸饲料上,试虫共生菌数除缺 Met 时降低外,缺其他 9 种氨基酸时均增多,其中缺 Leu、Lys 或 Thr 的饲料上试虫共生菌的增幅超过全组分对照饲料上试虫的 150%,差异极显著 ($P < 0.01$),

缺 Arg、Ile 或 Val 时共生菌的增幅也超过 100%,差异均达显著水平 ($P < 0.05$),缺失其他 3 种必需氨基酸 His、Phe 或 Try 时共生菌的增幅也在 54% 以上;而缺失非必需氨基酸的饲料中,只有缺失 Cys(s)的饲料上试虫共生菌数增幅达到 83%,其他均介于 -49% ~ 52% 之间,且差异均不显著 ($P > 0.05$)。对

照试虫共生菌含量受饲料中氨基酸缺失的影响相对较小,缺失必需氨基酸的饲料上,除 His、Lys 或 Val 缺失时试虫共生菌分别增加 79.7%、53.6% 和 53.5% 以外,有 5 种 (Arg、Ile、Leu、Phe 或 Thr) 的缺失共生菌仅增加 6% ~ 25%,另 2 种 (Met 或 Val) 的缺失甚至使试虫菌数降低 4% ~ 15%,其中仅缺 Lys 的影响显著 ($P < 0.05$);而缺失非必需氨基酸的饲料上,仅 4 种氨基酸 Ala、Asn、Asp 或 Glu 的缺失使试虫体内共生菌数增加,增幅低于 26%,其他 6 种氨基酸 Cys(s)、Gln、Gly、Pro、Ser 或 Tyr 的缺失,则使试虫共生菌数降低,降幅低于 38%,影响均不显著 ($P > 0.05$)。由此看出,饲料中必需氨基酸的缺少对褐飞虱(特别是高温处理褐飞虱)体内共生菌数量有一定的刺激作用。

2.3 褐飞虱体内氨基酸含量的比较

从试虫体内各游离氨基酸的摩尔含量来看(图 3:A),高温处理试虫较对照试虫含量降低的仅有 4 种必需氨基酸 Ile、Leu、Met 和 Phe,其中仅 Phe 显著

下降,其余 16 种氨基酸含量均上升,达显著水平的有 10 种,包括 Arg、His、Trp 和 Val 等 4 种必需氨基酸及 Ala、Asn、Gln、Gly、Pro 和 Ser 等 6 种非必需氨基酸。而从游离氨基酸的摩尔百分含量来看(图 3:C),处理试虫与对照试虫显著不同的有 14 种氨基酸,但除 Gln、Pro、Arg 和 Trp 含量显著上升外,必需氨基酸中的 His、Ile、Leu、Lys、Met 和 Phe 及非必需氨基酸中的 Asp、Glu、Gly 和 Ser 含量均显著下降 ($P < 0.05$)。显然,高温处理使试虫体内多数游离氨基酸的平衡出现明显变化,但明显下降的以必需氨基酸为多。

高温处理试虫体内水解氨基酸摩尔含量只有 Cys(s) 较对照试虫显著上升,其余无显著差异(图 3:B),而摩尔百分含量除 Gly 明显上升,Ala、Leu、Lys 和 Thr 显著下降外,其余无显著差异(图 3:D) ($P = 0.05$)。处理试虫与对照试虫间水解氨基酸的变化虽不如游离氨基酸明显,但其中显著下降的亦以必需氨基酸较多。

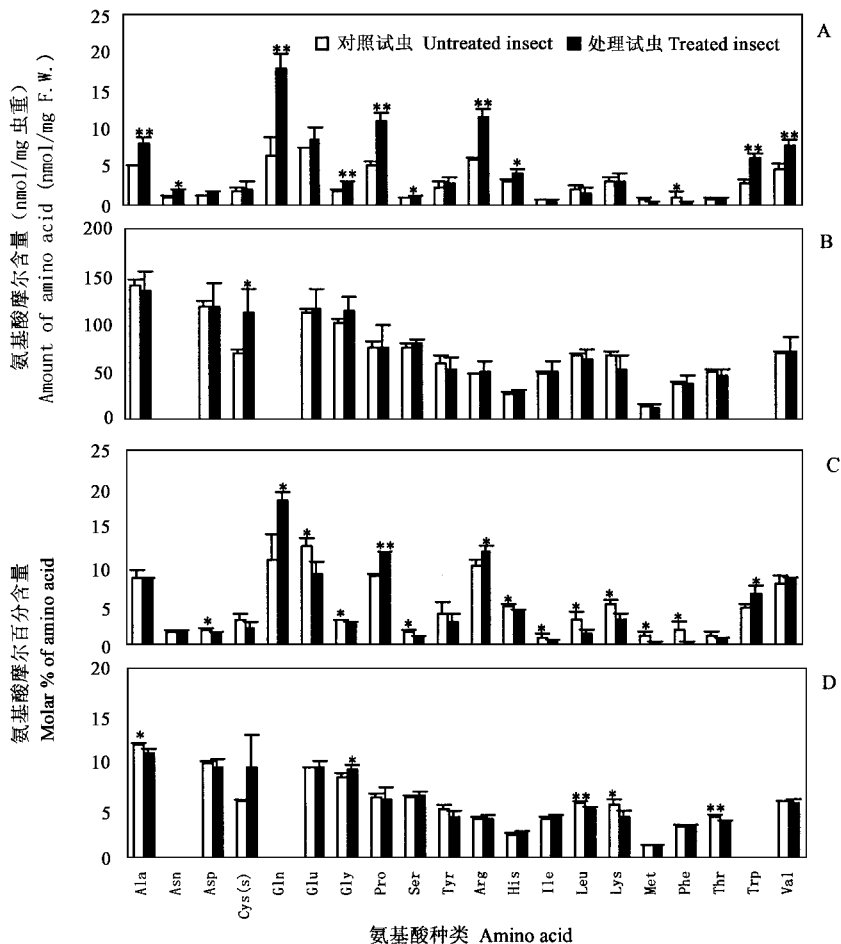


图 3 全组分饲料上处理试虫和对照试虫的氨基酸含量(平均值 ± 标准差)

Fig. 3 Content of amino acid in treated and untreated *Nilaparvata lugens* feeding on the complete diet D-97 (mean ± SD)

A, C: 虫体游离氨基酸 Free amino acid; B, D: 虫体水解氨基酸 Hydrolytic amino acid.

整体上来看(表1),高温处理试虫体内的游离氨基酸总量极显著上升($P < 0.01$),必需氨基酸所占比例则显著下降($P < 0.05$);水解氨基酸总量无显著变化,其中必需氨基酸的比例亦有相当程度的下降($P = 0.051$)。游离氨基酸占水解氨基酸的比例较低,处理试虫和对照试虫分别为7.9%和5.1%,表明褐飞虱体内的多数氨基酸存在于蛋白质中。对照和处理试虫水解氨基酸与游离氨基酸总量的差值分别为1111.7 nmol/mg和1108.6 nmol/mg,二者相差无几,而此差值应主要是褐飞虱体内蛋白

质水解所得氨基酸的量,由此可见,处理试虫与对照试虫蛋白质的氨基酸组成相近,两类试虫氨基酸构成的差异主要体现在游离氨基酸上。

处理与对照试虫体内各游离氨基酸含量占相应水解氨基酸的比例(图4)除Cys(s),Ile、Leu、Met和Phe外,其他氨基酸比例均上升,所得结果与单独游离氨基酸分析中各种氨基酸的变化相似,特别是其中处于下降的必需氨基酸的种类(Ile、Leu、Met和Phe)完全相同。

表1 处理与对照褐飞虱体内氨基酸总量(nmol/mg 试虫鲜重)和必需氨基酸所占比例(平均值±标准差)

Table 1 The total amount of amino acids(nmol/mg fresh weight of insect) and ratio of essential amino acids in treated and untreated *Nilaparvata lugens* (mean ± SD)

	游离氨基酸 Free amino acids		水解氨基酸 Hydrolytic amino acids	
	总量 Total amount	Eaa 比例 Ratio of Eaa	总量 Total amount	Eaa 比例 Ratio of Eaa
对照试虫 Untreated insect	59.603 ± 4.337	0.424 ± 0.015	1171.315 ± 42.141	0.363 ± 0.004
处理试虫 Treated insect	95.570 ± 9.031	0.387 ± 0.014	1204.217 ± 171.758	0.339 ± 0.020
显著水平 Significant level	0.003	0.037	0.720	0.051

注: Eaa 指必需氨基酸。Note: Eaa represents essential amino acids.

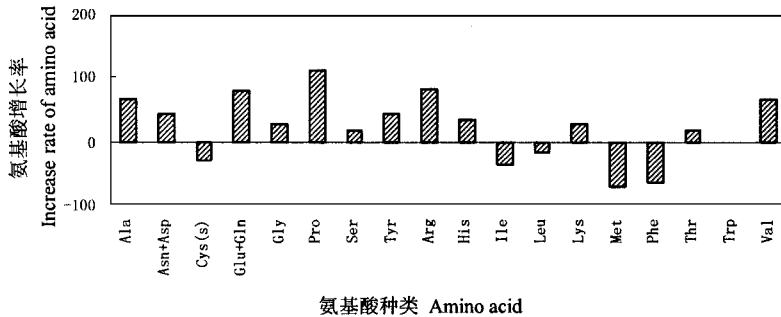


图4 高温处理与对照试虫体内各种游离氨基酸占相应水解氨基酸比例的变化

Fig. 4 Changes of the ratio of each free amino acid to its counterpart of hydrolytic ones between treated and untreated *Nilaparvata lugens*. Increase rate = $(A - B) / B \times 100$; A = 处理试虫的游离氨基酸摩尔含量与水解氨基酸摩尔含量的比率 The ratio of each free amino acid to its counterpart of hydrolytic ones in treated insects; B = 对照试虫游离氨基酸摩尔含量与水解氨基酸摩尔含量的比率 The ratio of each free amino acid to its counterpart of hydrolytic ones in untreated insects.

2.4 褐飞虱体内 GS、ALT 和 AST 活性的变化

处理试虫和对照试虫体内与转氨基作用有关的几种酶的活性测定表明,经高温处理后的缺菌褐飞虱体内的谷氨酰胺合成酶(GS)的活性极显著提高

($P < 0.01$),丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性亦显著提高($P < 0.05$),而天冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性则显著降低($P < 0.05$) (表2)。

表2 处理与对照试虫体内 GS、ALT 和 AST 的活性(U/mg 蛋白)(平均值±标准差)

Table 2 The activity(U/mg protein) of GS, ALT and AST in treated and untreated *Nilaparvata lugens* (mean ± SD)

	谷氨酰胺合成酶活性	丙氨酸氨基转移酶活性	天冬氨酸氨基转移酶活性
	GS activity	ALT activity	AST activity
对照试虫 Untreated insect	136.38 ± 22.19	16.01 ± 2.77	81.56 ± 10.80
处理试虫 Treated insect	296.42 ± 44.72	30.53 ± 4.97	62.64 ± 1.94
显著水平 Significant level	0.005	0.012	0.040

3 讨论

本研究利用褐飞虱的全纯人工饲料饲养技术(Fu *et al.*, 2001),在除去单种氨基酸组分,保持其他营养组分及饲料理化性质不变的条件下,研究了缺失不同氨基酸对高温(35℃)处理后缺菌褐飞虱相对生长速度的影响,发现10种必需氨基酸之一的缺失对缺菌褐飞虱的影响明显大于任何一种非必需氨基酸的缺失,与傅强等(2001)关于氨基酸缺失对缺菌褐飞虱羽化率的影响结果基本一致,进一步证实褐飞虱对必需氨基酸的营养需求与内生类酵母共生菌间存在密切联系。

本研究首次发现饲料中缺失氨基酸对褐飞虱体内的类酵母共生菌数量有一定影响。各种饲料上高温处理试虫体内类酵母共生菌的含量虽然均显著低于未处理对照试虫,但高温处理试虫在多数缺失氨基酸饲料上的共生菌数量明显高于全组分对照饲料上的处理试虫,尤其在缺失必需氨基酸的10种饲料上,除缺Met外,均较缺失任何一种非必需氨基酸的影响大,表明褐飞虱的氨基酸营养与类酵母菌间可能存在一种平衡机制,即当食物中缺失虫体不能自身合成的必需氨基酸营养时,体内类酵母菌存在一种数量增加的补偿机制,尤其当试虫本身共生菌数量较低时补偿更为明显。当然,从各饲料上缺菌褐飞虱生长发育仍不如在全组分对照饲料的情况来看,这种补偿有一定的限度。其中是否存在因共生菌增加而给褐飞虱带来额外负担的机制,褐飞虱生理需求(包括营养需求)与类酵母菌数量间的动态平衡如何维持等问题尚待进一步深入研究。

昆虫体内的氨基酸包括构成蛋白质的氨基酸和游离氨基酸两大类,前者在同一物种的相同虫态相对稳定,后者则受到食物摄入量和体内代谢活动的较大影响。本研究中水解氨基酸实际上是蛋白质水解后的氨基酸与原有游离氨基酸的集合,单位鲜虫重的高温处理试虫和未处理对照试虫水解氨基酸与游离氨基酸的差值(相当于蛋白质水解后的氨基酸量)几乎相同,表明高温处理对虫体组织蛋白的氨基酸组成无明显影响。然而,高温减菌后,游离氨基酸总量显著上升,但其中必需氨基酸的相对比例显著下降,导致虫体内氨基酸的不平衡,势必对有关的代谢反应产生影响,而游离氨基酸是虫体合成蛋白质的直接“原料库”,因此,必需氨基酸含量的下降可能是虫体生长所需蛋白质合成受阻、虫体生长缓慢的

一个重要原因。蚜虫共生菌 *Buchnera* 研究中已有类似报道,缺菌蚜虫体内游离氨基酸测定结果中,游离氨基酸总量上升,必需氨基酸比例下降,其中Phe的百分含量的下降极显著,并且不受虫龄大小的影响,推测Phe可能是缺菌蚜虫蛋白质合成的限速因子(Wilkinson and Douglas, 1996)。而蛋白质正常合成受阻,会进一步降低对氨基酸的利用率,这可能是促进游离氨基酸总量增加的原因之一。本研究中从处理试虫各氨基酸摩尔百分含量的变化来看,必需氨基酸中的His、Ile、Leu、Met、Lys和Phe及非必需氨基酸中的Asp、Glu、Gly和Ser等10种氨基酸均显著下降,可能是制约蛋白质合成的重要原因,其中6种必需氨基酸的减少很可能直接因共生菌缺少而引起,而4种非必需氨基酸虫体自身可以合成,作为氨基酸代谢过程中的重要原料,其降低可能在于被消耗过多。值得注意的是必需氨基酸中的Arg、Trp在高温处理试虫中亦显著上升,这两种必需氨基酸似乎不因共生菌数量减少而减少,它们与该类共生菌的关系亦待进一步研究阐明。

高温处理后的缺菌褐飞虱体内Gln含量显著提高,与其体内谷氨酰胺合成酶活性显著提高相一致,同时,丙氨酸氨基转移酶的活性亦提高,说明经高温处理后褐飞虱体内氨的运转较为频繁,但天冬氨酸氨基转移酶活性显著降低,反映出不同转氨酶活性变化有所不同。由于转氨作用在氨基酸代谢中占有十分重要的地位,因此转氨酶活性的改变,反映出体内氨基酸之间的转换和代谢受到影响,这也许是高温处理褐飞虱体内游离氨基酸失衡、总量增加的一个原因。值得指出的是游离氨基酸中,虽然处理样品Glu的摩尔百分含量(9.2%)比对照样品(12.8%)低,但Gln的摩尔百分含量(18.7%)比对照样品(11.0%)高,处理样品中Glu和Gln之和(27.9%)亦高于对照样品(23.8%);而水解氨基酸中,处理与对照之间Glu(包括Gln转化的Glu)的摩尔百分含量几乎相等(9.5%左右),游离氨基酸中Gln和Glu所占的比重明显较大,体现出其在氨基酸代谢中的重要地位。对蚜虫的研究发现,其体内包含共生细菌 *Buchnera* 的菌胞体可以吸收虫体内的Gln并将其转变为Glu,而后 *Buchnera* 可吸收Glu,并以其为氮源合成一些昆虫自身不能合成的必需氨基酸和虫体需求量较大而自身又难以满足的非必需氨基酸(Douglas and Prosser, 1992; Lai *et al.*, 1994; Sasaki and Ishikawa, 1995; Wilkinson and Ishikawa, 2001)。当蚜虫被抗生素或其他方法减菌后,蚜虫体内的游离

氨基酸总量显著上升,必需氨基酸比例下降,与减菌后的褐飞虱体内的游离氨基酸变化相似,但褐飞虱体内的类酵母共生菌是否具有类似于 *Buchnera* 利用 Glu 或 Gln 的功能还有待于进一步验证。

参 考 文 献 (References)

- Buchner P, 1965. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. New York: Interscience. 909.
- Cheng DJ, Hou RF, 2001. Histological observation on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Tissue & Cell*, 33(3): 273-279.
- Dadd RH, 1985. Nutrition: organisms. In: Kerkut GA, Gilbert LI eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol 4. Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion. Oxford: Pergamon Press. 313-390.
- Douglas AE, 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 17-37.
- Douglas AE, Prosser WA, 1992. Synthesis of the essential amino acid, tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *J. Insect Physiol.*, 38(8): 565-568.
- Fu Q, Zhang ZT, Hu C, Lai FX, 2001. The effects of high temperature on both yeast-like symbionts and amino acid requirements of *Nilaparvata lugens*. *Acta Entomol. Sin.*, 44(4): 534-540. [傅强, 张志涛, 胡萃, 赖凤香, 2001. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化. *昆虫学报*, 44(4): 534-540]
- Fu Q, Zhang ZT, Lai FX, Hu C, 2001. A chemically defined diet enables the continuous rearing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Appl. Entomol. Zool.*, 36(1): 111-116.
- Koyama K, 1985. Nutritional physiology of the brown rice planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae): Essential amino acids for nymphal development. *Appl. Entomol. Zool.*, 20(4): 424-430.
- Lai CY, Baumann L, Baumann P, 1994. Amplification of trpEG: Adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3 819-3 823.
- Noda H, 1974. Preliminary histological observation and population dynamics of intracellular yeast-like symbiotes in the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 9: 275-277.
- Noda H, 1977. Histological and histochemical observation of intracellular yeast like symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 12(2): 134-141.
- Sandstrom J, Moran N, 1999. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomol. Exp. Appl.*, 91: 203-210.
- Sasaki T, Ishikawa H, 1995. Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.*, 41(1): 41-46.
- Tang QY, Feng MG, 1997. Data Process System for Practical Statistical Analysis. Beijing: China Agriculture Press. 46-55. [唐启义, 冯明光, 1997. 实用统计分析及其计算机处理平台. 北京: 中国农业出版社. 46-55]
- Wilkinson TL, Adams D, Minto LB, Douglas AE, 2001. The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid. *J. Exp. Biol.*, 204: 3 027-3 038.
- Wilkinson TL, Douglas AE, 1996. The impact of aposymbiosis on amino acid metabolism of pea aphids. *Entomol. Exp. Appl.*, 80: 279-282.
- Wilkinson TL, Ishikawa H, 2001. On the functional significance of symbiotic microorganisms in the Homoptera: a comparative study of *Acyrtosiphon pisum* and *Nilaparvata lugens*. *Physiol. Entomol.*, 26: 86-93.

(责任编辑: 黄玲巧)