

高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌 和氨基酸需求的变化

傅强^{1,2}, 张志涛¹, 胡萃², 赖凤香¹

(1. 中国水稻研究所, 杭州 310006; 2. 浙江大学, 杭州 310029)

摘要: 对卵期高温 (35℃, 72 h) 处理后褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 体内共生酵母菌及该虫氨基酸需求的变化进行了研究, 结果表明: 1) 卵期高温处理后, 若虫期体内的共生酵母菌数量明显低于正常对照试虫; 2) 将若虫饲养于缺少单种氨基酸的 22 种全纯饲料上, 以若虫羽化率为指标, 发现高温处理试虫对组氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和色氨酸等 8 种必需氨基酸的需求明显增加。由此推论, 褐飞虱对上述 8 种必需氨基酸的需求与共生酵母菌有关。

关键词: 褐飞虱; 共生酵母菌; 氨基酸; 高温

中图分类号: Q968 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2001) 04-0534-07

同翅目昆虫体内普遍存在着共生菌, 常包含于脂肪体的含菌细胞中, 有的还聚集形成菌胞体, 以垂直传播的方式直接由母体传给子代^[1,2]。因同翅目昆虫的营养需求与其它许多昆虫不同, 一般认为共生菌与该类昆虫的营养需求有着密切联系^[2-4]。因此, 研究共生菌与同翅目昆虫的营养联系对阐明该类昆虫的营养生理学特性具有重要意义。就主要水稻害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 而言, 其腹部脂肪体内存在着酵母类共生菌^[5]。基于此种昆虫可以在缺少任一种必需氨基酸的全纯饲料上从初孵若虫发育至成虫, Koyama^[6,7]推测共生酵母菌可能与褐飞虱对必需氨基酸的需求有联系, 但迄今尚缺少有关的实验证据。利用无菌或少菌试虫是研究昆虫体内共生菌功能的主要途径之一^[4]。Chen 等^[8]曾报道用抗生素、高温等方法处理褐飞虱初孵若虫可以明显降低试虫体内的共生酵母菌数量, 但未能就其营养需求进行深入研究。本研究中, 我们拟进一步研究褐飞虱卵期高温处理对其体内共生酵母菌的影响, 同时, 利用缺失某种氨基酸组分的全纯饲料, 研究褐飞虱试虫对氨基酸的需求, 以期探明褐飞虱对氨基酸的需求与共生酵母菌的关系。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫的高温处理

在飞虱类昆虫共生酵母菌的研究中通常采用高温处理法, 即将初孵若虫在 35℃ 条件下连

续处理 72 h^[8]。此方法可以显著降低飞虱体内的共生菌数量, 但处理结束后, 若虫已达 3 日龄, 不适于考察整个若虫期营养需求的需要, 为此, 我们改在褐飞虱卵期进行高温处理, 具体方法是: 将羽化后 4~7 天的抱卵褐飞虱雌虫 (配以相同数量雄虫) 笼罩饲养于无虫、无卵、苗龄约 50 天的水稻感虫品种 TN1 上产卵 1 天。带卵的 TN1 苗在室温下放置 3 天之后, 移入 (35.0±0.5)℃ 的培养箱中连续处理 72 h, 然后将苗取出并保持在 (27.0±0.5)℃ 下直至孵化。部分初孵若虫 (<24 h) 用作人工饲料的试验虫源及孵化当天试虫共生菌的观察, 另一部分初孵若虫饲养于无虫、无卵的干净 TN1 苗上, 用于 2 龄以后若、成虫共生菌的观察研究。

1.2 褐飞虱体内共生酵母菌的观察

参照 Noda^[9]的方法, 分别在孵化后 1 (孵化当天)、5、11、16、20 和 24 天观察试虫体内共生酵母菌的数量。即取一定数量的试虫称重, 用 200~400 μL 0.8% 的生理盐水将试虫研磨、匀浆后, 直接吸取少量匀浆液滴于血细胞计数器上, 用双目显微镜 (Olympus BH-2) 在 10×40 倍下观察共生酵母菌的数量。若虫羽化后, 分别观察雌、雄虫, 各重复 3~5 次, 以未经高温处理的相应日龄试虫为对照。

按下列公式计算共生菌数量: 样品共生菌含量 = (镜检共生菌数/镜检体积) × (研磨用生理盐水体积 + 试虫的体积); 单头试虫所含共生菌数 = 样品共生菌含量 / 取样试虫数; 单位体重 (mg) 试虫所含共生菌数 = 样品共生菌含量 / 取样试虫鲜重 (mg)。

1.3 褐飞虱对氨基酸需求的测试

利用缺失单种氨基酸的全纯饲料进行饲养, 以羽化率为指标研究经高温处理的褐飞虱若虫对氨基酸的需求情况, 以未处理试虫为对照。

全纯人工饲料: 以全纯人工饲料 D-97^[10] 作为基本饲料, 除去单种氨基酸组分, 保持其它营养成分及饲料的理化性状, 共配制 22 种饲料。每种饲料的氨基酸总量 (mmol%) 通过按相应比例提高剩余氨基酸的含量而与 D-97 保持一致。另以全组分饲料 D-97 为对照饲料 (CK)。配好的饲料经滤膜法灭菌后分装于 1.5 mL 的灭菌塑料管中, 保存于 -20℃ 条件下备用。

试虫的饲养与观察: 按每管 25 头将初孵若虫 (<24 h) 接入双通玻璃管 (长 15 cm、直径 2.5 cm) 中进行饲养, 每种饲料接处理试虫 150~200 头 (6~8 管), 未处理对照试虫 100~125 头 (4~5 管)。饲养管的一端为食物包, 由双层 Parafilm 膜夹持饲料液滴而成, 1~2 天更换一次; 另一端在接虫后用 100 目尼龙纱扎紧。饲养过程中, 饲养管用湿黑布包裹保湿, 露出饲料端, 使该端朝向光源, 置于 (27±0.5)℃ 的培养箱中, 自然光照。观察并记载试虫的存活与羽化情况。

2 结果与分析

2.1 处理试虫体内共生酵母菌含量的变化

图 1 为褐飞虱体内共生酵母菌的变化动态。可以看出, 35℃ 处理后, 褐飞虱体内的共生菌数量明显不同于对照。从平均每头试虫体内的共生菌含量来看 (图 1: A), 初孵时, 处理试虫的共生菌仅 (1 658±126) 个, 相当于正常试虫的 33.4% (4971±241 个), 二者差异极显著 ($P < 0.001$)。此后, 处理试虫的共生菌增速较慢, 二者的差距进一步扩大。虽然 11 天后, 处理试虫共生菌的增速有所加快, 至末龄若虫期 (20 日龄处理若虫和 11 日龄对照若虫), 处

理试虫的共生菌含量仍只有正常试虫的 16.0%，二者差异极显著 ($P < 0.001$)。羽化后（处理与对照试虫分别在第 21 天和 13 天开始羽化），二者共生菌的差距明显缩小，处理雌、雄成虫（24 天）的共生菌分别相当于对照成虫（16 天）的 61.6% 和 67.9%，两类试虫间无显著差异 ($P > 0.05$)。从单位体重 (mg 鲜重) 试虫的共生菌含量进行比较 (图 1: B)，同样可以看出，若虫期，处理试虫（1~20 天）的共生菌含量明显低于对照（1~11 天），初孵时前者相当于后者的 44.0%，末龄若虫期这一比例降至 13.2%。但羽化后二者的差别明显缩小，处理雌、雄成虫（24 天）分别相当于对照试虫（16 天）的 54.2% 和 70.5%。

上述结果表明：经卵期高温处理的试虫与对照试虫共生菌数量的差距主要表现在若虫期。成虫期二者的差异明显缩小，主要原因可能是处理试虫有较长的若虫期（长 8 天），羽化时共生菌种群数量得以发展到较高的水平；而且，羽化初期处理试虫共生菌数量继续增长，而对照试虫趋于减少（至少单位体重的共生菌含量是如此），雄虫尤为明显。

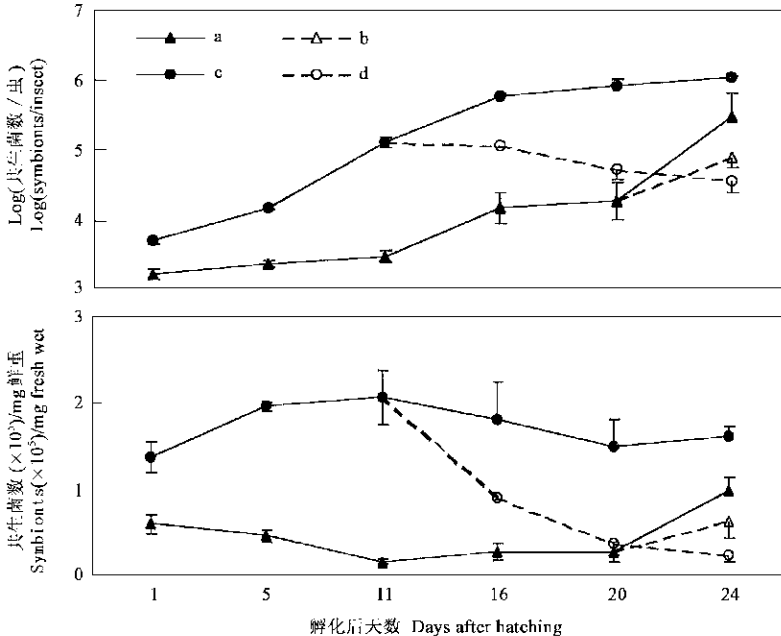


图 1 褐飞虱体内共生酵母菌数量的变化动态 (平均值 \pm 标准差)
Fig. 1 Population curves of yeast-symbionts in *N. lugens* (Mean \pm SD)
a: 处理雌虫 treated female; b: 处理雄虫 treated male;
c: 对照雌虫 untreated female; d: 对照雄虫 untreated male

2.2 处理试虫对氨基酸的需求

高温处理后，除缺少 γ -氨基丁酸 (GABA) 或丙氨酸 (Ala) 的饲料外，其余各饲料上的试虫羽化率均较未处理试虫明显降低 (图 2: A) ($P < 0.01$)，降幅超过 45% (图 2: B)。其中，对照饲料上的试虫羽化率为 20.0%，降幅为 62%。在缺少非必需氨基酸的饲料上，羽化

率介于 8.3% ~ 26.3%，除缺半胱氨酸 (Cys)、天冬酰胺 (Asn)、胱氨酸 (Cyss)、酪氨酸 (Tyr) 的降幅达 70.3% ~ 73.1% 以外，其余仅下降 45.0% ~ 58.4%。而缺必需氨基酸的饲料则明显不同，除缺精氨酸 (Arg) 的羽化率达 17.1% 之外，缺另 9 种必需氨基酸的饲料上的羽化率均不超过 3.5%，试虫极少或不能羽化；羽化率的降幅除缺 Arg 或蛋氨酸 (Met) 的分别为 57.3%、69.3% 之外，缺另 8 种必需氨基酸 (组氨酸 His、赖氨酸 Lys、亮氨酸 Leu、异亮氨酸 Ile、苏氨酸 Thr、缬氨酸 Val、苯丙氨酸 Phe 和色氨酸 Try) 的降幅均在 85.3% 以上，其中缺 Lys、Thr、Ile、Phe 或 Try 的甚至超过 96.8%。显然，高温处理后，缺少上述 8 种必需氨基酸对褐飞虱的影响较大。

考虑到高温处理可能对试虫有某些副作用，我们还对处理试虫在缺少氨基酸的各饲料上的羽化率与在全组分对照饲料上的羽化率进行了比较 (图 3: A)。结果表明：缺非必需氨基酸所导致的羽化率降幅一般不超过 35% (仅缺 Tyr 例外，达 57.0%)，有 5 种饲料上的试虫羽化率甚至有所上升；而缺必需氨基酸时，除 Arg 降幅较小 (14.5%) 外，其余 9 种的降幅均在 82.5% 以上。但是，未经高温处理的试虫则明显不同 (图 3: B)，除缺 Met 引起的降幅达 78.3% 以外，缺其余各种必需氨基酸或非必需氨基酸所导致的羽化率降幅均在 56% 以下。由此同样可以看出，对处理试虫而言，除缺 Arg、Met 之外，缺其余 8 种必需氨基酸引起的羽化率降幅明显大于正常试虫。

因此推知，高温处理后，褐飞虱对 8 种必需氨基酸 (Thr、Lys、Ile、Phe、Try、His、Val 和 Leu) 的需求更为明显。

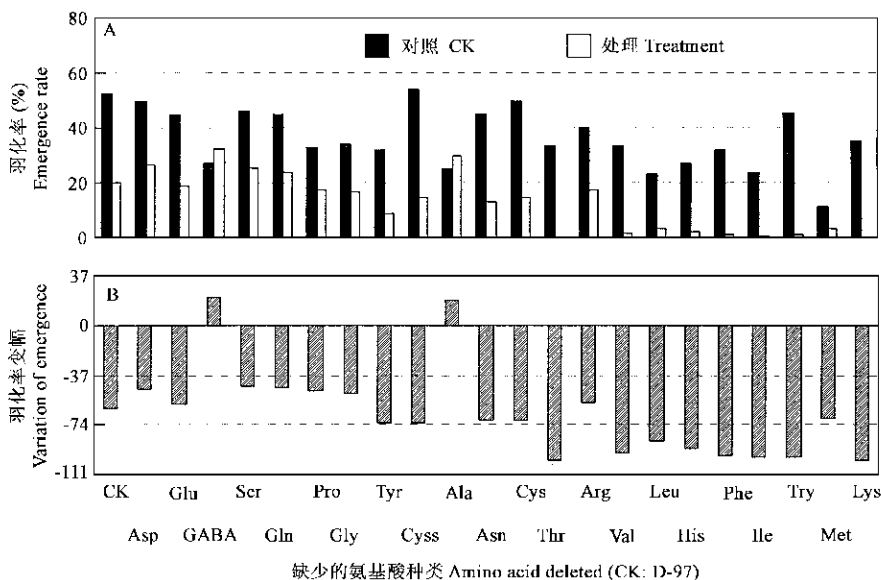


图 2 缺不同氨基酸的全纯饲料上褐飞虱的羽化情况

Fig. 2 Adult emergence of *N. lugens* reared on chemically defined diets with single amino acid deleted

A: 试虫羽化率 emergence rate; B: 同一饲料上处理试虫与对照试虫羽化率的比较 comparison of emergence rate between treated and untreated insects on the same diet;

羽化率变幅 = [(处理试虫的羽化率/同一饲料上对照试虫的羽化率) - 1] × 100

variation of emergence = [(emergence rate of treated insects/emergence rate of untreated insects on the same diet) - 1] × 100

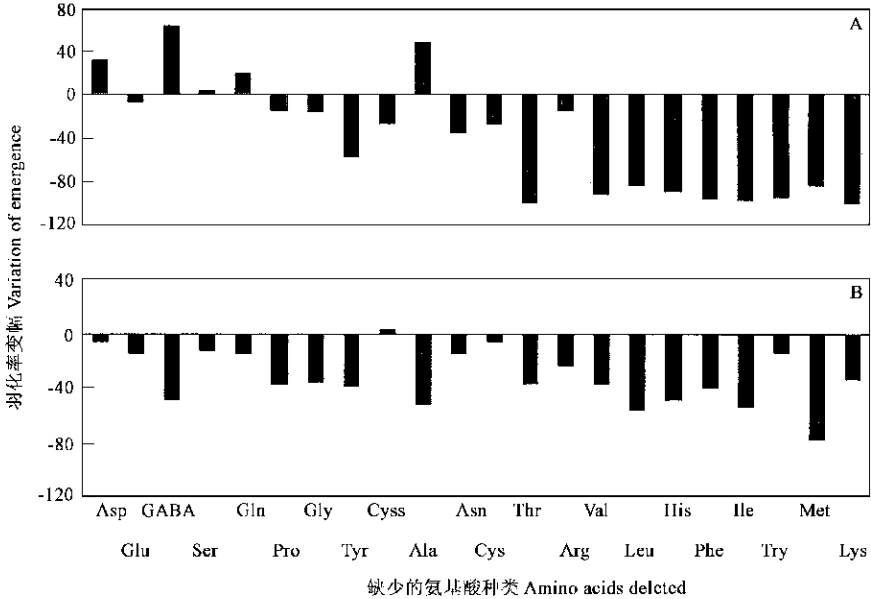


图3 缺少氨基酸的各全纯饲料上褐飞虱羽化率的升降幅度

Fig. 3 Variation of adult emergence of *N. lugens* reared on chemically defined diets with single amino acid deleted

A: 处理试虫 treated insects; B: 对照试虫 untreated insects;

羽化率变幅 = [(缺氨基酸饲料上的试虫羽化率/全组分饲料 D-97 上的试虫羽化率) - 1] × 100

variation of emergence = [(emergence rate of insects on diet deleted amino acid/ emergence rate of insects on complete diet D-97) - 1] × 100

3 讨论

在同翅目昆虫的研究中, 共生菌与寄主昆虫的营养关系受到广泛的关注, 尤其对蚜虫共生细菌的研究较为深入, 已证实共生细菌可以为宿主(蚜虫)提供必需氨基酸营养^[4]。而对飞虱类共生菌的有关研究及了解则相对薄弱。Noda 等^[11]曾报道灰飞虱体内的共生酵母菌可以为其提供脂类营养。Sasaki 等^[12]亦报道褐飞虱的共生酵母菌可能与尿酸的再利用有关。本文作者则通过研究高温处理对共生菌的影响及处理若虫的营养需求特征, 首次证实褐飞虱对必需氨基酸的需求与共生酵母菌有关。

本研究证实卵期高温(35℃)处理可以显著降低褐飞虱体内共生酵母菌的数量, 且处理试虫与对照试虫的差距在若虫期尤为明显, 这与 Chen 等^[8]对初孵若虫期的处理结果一致, 说明无论是在卵期, 还是在若虫初期, 高温(35℃)处理均是一种有效地降低褐飞虱若虫体内共生酵母菌的方法。其中卵期处理的优点是: 可以从初孵若虫开始为营养需求等有关研究提供缺少共生菌的全若虫期试虫。然而, 处理试虫与对照试虫共生酵母菌数量的差距在成虫期明显缩小, 如何有效地降低成虫期共生酵母菌数量尚待今后进一步探索。羽化后对照雄虫共生菌数量下降(雌虫单位体重的共生菌含量亦下降), 处理试虫虽然在羽化初期共生菌仍呈上

升趋势, 但据 Chen 等^[8]的观察, 羽化 4 天后, 处理雄虫共生菌含量亦开始下降。Chen 等^[5]认为这并非共生菌降解所引起, 而可能受某种生理机制的制约, 雌虫还可能与产卵有关。

前人有关氨基酸需求的研究表明, 多数昆虫常表现为对 10 种必需氨基酸 (Arg、His、Lys、Leu、Ile、Met、Thr、Val、Phe、Try) 的需求模式, 但同翅目等含共生菌的昆虫所需的必需氨基酸则少于 10 种^[3]。本研究通过在缺少某种氨基酸的全纯饲料上进行饲养, 发现正常褐飞虱若虫对氨基酸需求与前人的结果一致^[6], 无生长发育所必需的氨基酸; 但同时亦首次证实高温处理后的少菌褐飞虱若虫对 8 种必需氨基酸的需求较为明显。显然, 与正常试虫相比, 少菌褐飞虱若虫表现为明显接近于多数昆虫的 10 种必需氨基酸需求模式。在前人对桃蚜的有关研究中^[13], 这一现象更为明显, 少菌桃蚜表现为标准的 10 种必需氨基酸需求模式。

本研究还发现少菌褐飞虱对 Met、Arg 两种必需氨基酸的需求并没有明显增强, 似表明共生酵母菌与二者的合成无关, 褐飞虱体内还可能存在其它的必需氨基酸供给途径。据 Noda 等^[11]报道, 灰飞虱体内还存在细菌类共生菌, 其数量并不因 35℃ 高温处理而减少。可以推测, 除共生酵母菌之外, 褐飞虱体内亦可能存在其它共生菌, 并与 Met 和 Arg 的合成有关, 对此尚需进一步的研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Buchner P. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms, New York: Interscience, 1965.909
- [2] Houk E J, Griffiths G W. Intracellular symbiotes of the Homoptera. Ann. Rev. Entomol., 1980, 25: 87 ~ 161
- [3] Dadd R H. Nutrition: organisms. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol. 4. Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion, Oxford: Pergamon Press, 1985. 313 ~ 390
- [4] Douglas A E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annu. Rev. Entomol., 1998, 43: 17 ~ 37
- [5] Chen C C, Cheng L L, Kuan C C *et al.* Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. I. Histological observations and population changes of the symbiote. Z. Angew. Entomol., 1981, 91: 321 ~ 327
- [6] Koyama K. Nutritional physiology of the brown rice planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae) II. Essential amino acids for nymphal development. Appl. Entomol. Zool., 1985, 20: 424 ~ 430
- [7] Koyama K. Artificial rearing and nutritional physiology of the planthoppers and leafhoppers on a holidic diet. JARQ. 1988, 22: 20 ~ 27
- [8] Chen C C, Cheng L L, Hou R F. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal II. Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbiotes and their host. Z. Angew. Entomol., 1981, 92: 440 ~ 449
- [9] Noda H. Preliminary histological observation and population dynamics of intracellular yeast-like symbiotes in the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). Appl. Entomol. Zool., 1974, 9: 275 ~ 277
- [10] Fu Q, Zhang Z T, Hu C *et al.* A chemically defined diet enables the continuous rearing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). Appl. Entomol. Zool., 2001, 36: 111 ~ 116
- [11] Noda H, Wada K, Saito T. Sterols in *Laodelphax striatellus* with special reference to the intracellular yeastlike symbioses as a sterole source. J. Insect Physiol., 1979, 25: 443 ~ 447
- [12] Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. J. Insect Physiol., 1996, 42: 125 ~ 129
- [13] Mittler T E. Dietary amino acid requirement of the aphid *Myzus persicae* affected by antibiotic uptake. J. Nutr., 1971, 101: 1 023 ~ 1 028

The effects of high temperature on both yeast-like symbionts and amino acid requirements of *Nilaparvata lugens*

FU Qiang^{1,2}, ZHANG Zhi-tao¹, HU Cui², LAI Feng-xiang¹

(1. China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;

2. Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, was subject to a 35°C treatment for 72 h at the egg stage, and the development of yeast-like symbionts and amino acid requirements of both heat-treated and untreated *N. lugens* were studied. The results indicated that heat-treated *N. lugens* harbored substantially fewer symbionts at the nymphal stage as compared with untreated one. By rearing on 22 chemically defined diets, with single amino acid deleted for each diet, only the requirements of heat-treated *N. lugens* for 8 essential amino acids, i. e. His, Lys, Leu, Ile, Thr, Val, Phe, Try, increased obviously with the rate of adult emergence as indicator. It was proposed that the yeast-like symbionts be closely related to the requirements of above 8 essential amino acids for *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; yeast-like symbiont; amino acid; high temperature