

文章编号:2095-7386(2021)03-0029-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2021.03.006

共生菌 *Wolbachia* 对宿主黑腹果蝇取食行为节律的影响

文明明,赵治恒,毕洁,贺艳萍,舒在习,肖安红
(武汉轻工大学 食品科学与工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要:沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)作为最成功的胞内共生菌之一,它能感染很多节肢动物与线虫,并影响宿主的繁殖来增加其自身的传播。目前,有关 *Wolbachia* 与宿主相互作用的研究主要集中在其对宿主生殖功能的调控上。除了生殖系统外, *Wolbachia* 也能感染宿主的体细胞,对宿主嗅觉、取食、学习与记忆、睡眠等多方面行为产生影响。然而, *Wolbachia* 对宿主取食节律的影响还未见报道。本研究通过透射电镜和荧光原位杂交实验发现, *wMel Wolbachia* 广泛分布于黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的大脑中。同时,我们利用 Multibeam (MB5-MB) 果蝇活性监测器检测果蝇取食节律。结果发现,不论是感染 *Wolbachia*,还是未感染 *Wolbachia* 对照组的果蝇,雌性果蝇比雄性果蝇出现在靠近食物端的次数更多,即取食偏好更高;感染 *Wolbachia* 的雌性果蝇,与对照组相比,在夜晚(ZT19-23)的取食偏好更高;相反的,感染 *Wolbachia* 的雄性果蝇,与对照组相比,在下午至夜晚(ZT15-23)的取食偏好更低,而在上午(ZT1-9)的取食偏好更高,表明 *Wolbachia* 感染对果蝇的取食节律有影响,本文为 *Wolbachia* 对无脊椎动物宿主行为影响的研究提供一定参考价值。

关键词: *Wolbachia*; 果蝇; 取食; 节律

中图分类号: S436.46

文献标识码: A

The effects of *Wolbachia* on the feeding rhythm of *Drosophila melanogaster*

WEN Ming-ming, ZHAO Zhi-heng, BI Jie, HE Yan-ping, SHU Zai-xi, XIAO An-hong

(School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, 430023, China)

Abstract: *Wolbachia* are genus of bacteria found within the tissues of several groups of arthropods and nematode, they can control the host's reproductive behavior to increase its own spread. At present, the research on the interaction between *Wolbachia* and the host is mainly focused on the regulation of the host's reproduction. In addition to the reproductive system, *Wolbachia* can also infect the host's somatic cells and affect the host's sense of olfactory, feeding, learning and memory, sleep and many other behaviors. However, the influence of *Wolbachia* on the host's feeding rhythm has not been reported yet. In this study, we found that *wMel Wolbachia* is widely distributed in the brain of *Drosophila melanogaster* through transmission electron microscopy and fluorescence in situ hybridization. At the same time, we used Multibeam (MB5-MB) *Drosophila* Activity Monitor System to detect the feeding rhythm of them. The results showed that whether the *Wolbachia* infected flies or uninfected flies, female flies appeared near

收稿日期:2021-04-21.

作者简介:文明明(1997-),女,硕士研究生,E-mail:2237424773@qq.com.

通信作者:毕洁(1990-),女,讲师,博士,E-mail:bj15926225191@163.com.

基金项目:武汉轻工大学大宗粮油精深加工教育部重点实验室开放课题(2019GYBQGDKFB07,2020JYBQGDKFA01).

the food side more frequently than male flies, that is, showed a higher feeding preference; *Wolbachia* infected female flies, compared with the uninfected female flies, the feeding preference was higher at night (ZT19–23); on the contrary, *Wolbachia* infected male flies had lower feeding preference from afternoon to night (ZT15–23) compared with the control group, while the feeding preference was higher in the morning (ZT1–9). It shows that *Wolbachia* has an effect on the feeding rhythm of *Drosophila*. This study provides reference for the study of the influence of *Wolbachia* on the behavior of invertebrate hosts.

Key words: *Wolbachia*; *Drosophila melanogaster*; feeding; rhythm

1 引言

沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 是一种由 Cowdry、Hertig 和 Wolbach 于 1923 年首次发现的, 存在于节肢动物的种系和体细胞中的立克次氏体样的细胞内共生菌。*Wolbachia* 能感染各种节肢动物和丝虫线虫。据估计, 在现阶段地球上存在的 300 0 万种昆虫种类中, 至少有几百万种有 *Wolbachia* 共生。*Wolbachia* 因其调控宿主生殖而闻名, 如诱导昆虫宿主产生精卵胞质不亲和、雌性化、孤雌生殖和杀雄等, 以此有助于通过宿主群体增强 *Wolbachia* 传播^[1-3]。因此, *Wolbachia* 被认为是最具发展潜力的害虫防治工具之一。

Wolbachia 不仅存在于宿主的生殖细胞, 还存在于各种体细胞中。例如, *Wolbachia* 在果蝇消化代谢、神经、免疫等系统中广泛存在^[4], 并且在这些体细胞中调节宿主的免疫功能、适合度、对抗病原体的干扰及其他多种行为^[5,6]。已有研究发现 *Wolbachia* 可以影响雄性果蝇的打斗行为^[7]。在果蝇和蜘蛛中, *Wolbachia* 可以改变交配偏好、交配时间、频率以及产卵量^[2,8]。作者前期研究发现, 与未感染 *Wolbachia* 的果蝇相比, 感染 *wMel Wolbachia* 的黑腹果蝇和感染的 *wRi Wolbachia* 拟果蝇的学习与记忆能力显著增强。进一步, 我们找到了一种微小 *dme-miR-92b* 靶向负调控 *crebA* 基因的表达来增强宿主果蝇的学习与记忆能力^[8]。此外, 我们还发现, *Wolbachia* 感染能增加其宿主黑腹果蝇的睡眠时间^[9]。

除了上述行为外, *Wolbachia* 感染后, 宿主取食行为也发生了改变, 例如感染 *Wolbachia* 的老龄蚊子吸血成功率降低, 这使得蚊媒传播的登革热病毒传播几率降低。同时, 感染 *Wolbachia* 可以缩短埃及伊蚊的寿命, 而只有老龄伊蚊能传播登革热, 这又能间接地减少登革热病毒的传播效率^[10]。因而, 这成为了一项很有发展前景的生物防治策略。*Wolbachia* 感染后, 宿主摄食模式也发生了改变。例如, He 等发现, 与感染 *Wolbachia* 的雄性果蝇交配后, 雌性果

蝇 (不论感染 *Wolbachia* 与否) 取食频率降低, 且寿命也会延长^[2]。

昆虫的一系列重要的生命活动, 例如: 体色变化、迁徙、取食、产卵、羽化等过程都会呈现周期性的变化, 这是昆虫的行为节律^[11-13]。了解害虫或者益虫的取食节律, 可以作为发展害虫防治、益虫利用的有效途径之一。另一方面, 取食行为也会极大的影响昆虫的产卵、交配等其他重要生命活动。因此, 了解各种模式的昆虫对果蝇的取食节律具有重要理论指导意义; 然而, *Wolbachia* 对昆虫取食节律方面的影响还未见报道。本文比较了感染与未感染 *Wolbachia* 的黑腹果蝇在取食节律方面的差异, 能帮助人们更好地了解共生菌 *Wolbachia* 对宿主取食行为偏好的影响, 为害虫生物的防治提供了一定的理论依据。

2 材料与方法

2.1 供试昆虫

Dmel *wMel* 品系: 感染了 *Wolbachia* (*wMel*) 的黑腹果蝇, 由澳大利亚莫纳什大学 Scott O'Neill 教授赠送。Dmel T (Dmel *wMel* T, 即不含 *Wolbachia* 的对照组果蝇) 品系: 对 Dmel *wMel* 用四环素 (0.3 mg/mL) 连续喂养 3 代以上, 去除 *Wolbachia*。收集 10 头用四环素处理过的果蝇, 提取 DNA, 并用 *wsp* (*Wolbachia* surface protein) 基因引物 PCR 扩增检验, 确保 *Wolbachia* 去除干净。再用普通的红糖-玉米粉-琼脂培养基喂养 6 代以上, 得到未感染 *Wolbachia* 的果蝇品系 Dmel T^[14]。实验中所用果蝇品系均在恒温光照培养箱中, 25℃、光照 12 h: 黑暗 12 h, 湿度 70% 条件下饲养, 并控制果蝇生长密度 (每个 150 mL 的锥形瓶中果蝇产卵 200 左右)。

2.2 果蝇取食偏好检测实验

采用 Multibeam (MB5-MB) 果蝇活性监测器 (Trikinetics, Waltham, MA) 以监控果蝇活动行为, 此装置含有 17 个独立红外光束分别监测每个独立玻璃管中的果蝇的活动。一个单独的玻璃管放置一只果蝇。活性监测器中的每个玻璃管里含有 5% 蔗

糖,2%琼脂糖的培养基,玻璃管长 80 mm,直径为 5 mm 大小。数据每分钟采集 1 次。所有监测实验在 12 h:12 h(L-D)培养箱中进行。

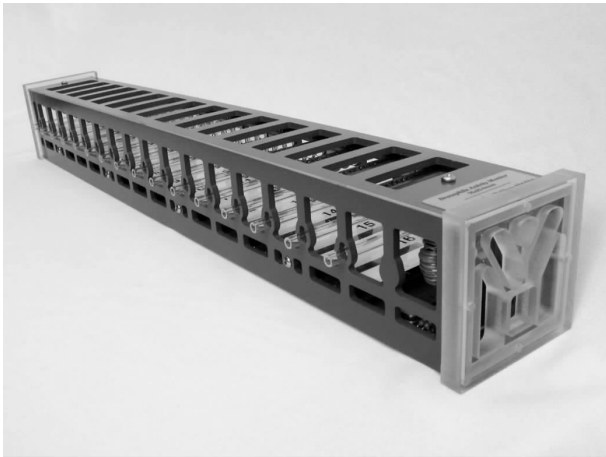


图 1 Multibeam (MB5-MB) 果蝇活性监测器

2.3 果蝇脑荧光原位杂交

用乙醇浸泡果蝇 1 min,除去表面的疏水性物质。将果蝇移到 PBS 溶液中,小心的解剖果蝇大脑。解剖完成后,将样品转移到 Carnoy's 固定液(氯仿:乙醇:醋酸,6:3:1),固定 3 h。固定完毕后用 70%酒精清洗 2 次,每次 5 min。在 45 °C 下,样品置于 Enzo 杂交缓冲液中预杂交 30 min,后加入 1 μL W1/W2 荧光探针继续杂交 3 h。采用的探针为:

W1:5' -/5Cy3/AATCCGGCCGARCCGACCC - 3;

W2:5' -/5Cy3/CTTCTGTGAGTACCGTCAT-TATC - 3

2.4 果蝇脑透射电镜超薄切片制备

首先需要制备 2.5%戊二醛溶液,具体方法如下:2.6 g NaH_2PO_4 ,29 g Na_2HPO_4 ,ddH₂O 定容至 500 mL,调节 pH 至 7.4,配成 0.2 M 磷酸缓冲液。另外取 1 mL 25%戊二醛,4 mL ddH₂O,5 mL 0.2 M 磷酸缓冲液,戊二醛终浓度 2.5%。戊二醛放置容易发生聚合反应,影响固定效果,应该现用现配。透射电镜超薄切片制备在中国科学院武汉病毒所平台完成:先用 2.5%戊二醛固定样本,然后经 0.1 M 磷酸缓冲液(pH=7.4)漂洗 3 次,每次 15 min,用 1%的钨酸,0.1 M 磷酸缓冲液室温固定 2 h,然后再经 0.1 M 磷酸缓冲液(pH=7.4)洗 3 次,每次 15 min。接着,酒精梯度脱水(30%、50%、70%、80%、85%、90%、95%、100% 2 次),每次 15 min。然后用丙酮环氧树脂(2:1)、丙酮环氧树脂(1:1)、环氧树脂,37 °C 渗透 10 h。将渗透好的样品放入胶囊中,加入

包埋剂环氧树脂,在 60 °C 温箱聚合 48 h,而后超薄切片,再进行双染色,干燥过夜后观察。

2.5 果蝇基因组 DNA 提取

需要检测的果蝇:Dmel T、Dmel wMel 果蝇是否含有 *Wolbachia*。提取方法如下:取 10 只果蝇于 1.5 mL EP 管中,加入 200 μL 溶液 A(100 mM Tris-HCl、100 mM EDTA、100 mM NaCl、0.5% SDS、pH=7.5),在冰上充分匀浆,再加入 200 μL 溶液 A,继续匀浆,直至仅存表皮。向匀浆后的溶液中加入 4 μL 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL),65 °C 水浴 30 min。加入预冷 800 μL LiCl/KAc 溶液 B,在涡旋仪上剧烈震荡 20 s,混匀,冰上静置 10 min。室温、130 00 r/min、离心 15 min。吸取上清液,转移至新的 1.5 mL EP 管中,不能含有杂质。向上清中加入 600 μL 异丙醇,反复颠倒,混匀。室温 25 °C、130 00 rpm、离心 15 min。弃上清,加入预冷的 75%乙醇(新鲜配置)洗涤沉淀。4 °C、离心 1 min、130 00 r/min。弃上清,将 EP 管倒置于滤纸上,室温 25 °C、干燥 5~10 min。加入 20 μL DNase-free 水溶解沉淀。取 5 μL 进行电泳检测,其余的存放于 -20 °C 备用。

3 结果与分析

3.1 *Wolbachia* 在果蝇脑中分布

四环素处理果蝇后,用 PCR 检测黑腹果蝇中 *Wolbachia* 感染情况,如图 2 所示,四环素处理后果蝇中 *Wolbachia* 已去除。同时,针对 *Wolbachia* 的 16S rRNA 设计了 Cy3 标记的特异性引物 W1/W2,并采用荧光原位杂交实验确定 *Wolbachia* 在果蝇脑中的分布状况。结果显示 *Wolbachia* 广泛分布于 Dmel wMel 的脑中(图 3C 和 D),而在对照组果蝇脑中未观察到 *Wolbachia* 信号(图 3A 和 B)。为了进一步观察 *Wolbachia* 在果蝇脑细胞中分布,我们采用透射电镜观察果蝇脑细胞,如图 4B 黑色箭头所示为突触间隙。而在图 4D 中红色箭头所示,我们能清晰地观察到 *Wolbachia* 在果蝇脑神经细胞中有分布,箭头所示完整的圆形结构就是细菌 *Wolbachia*。

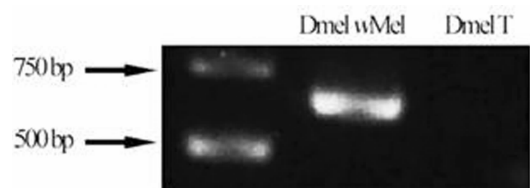


图 2 四环素处理后检测果蝇体内 *Wolbachia*

注:第 1,2,泳道分别是 Dmel wMel;Dmel T。

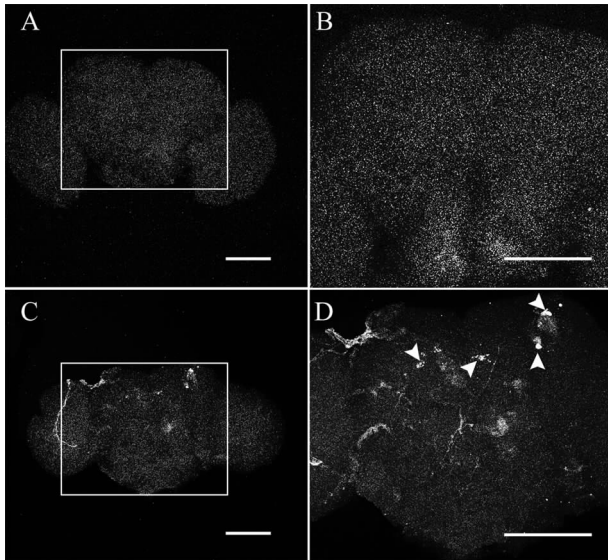


图3 荧光原位杂交确定 *Wolbachia* 在果蝇脑中定位
注: A, B 为 Dmel T, 未发现信号 *Wolbachia* 信号; C, D 为 Dmel *wMel*, 箭头所示为 *Wolbachia* 所在, 标尺为 100 μm 。

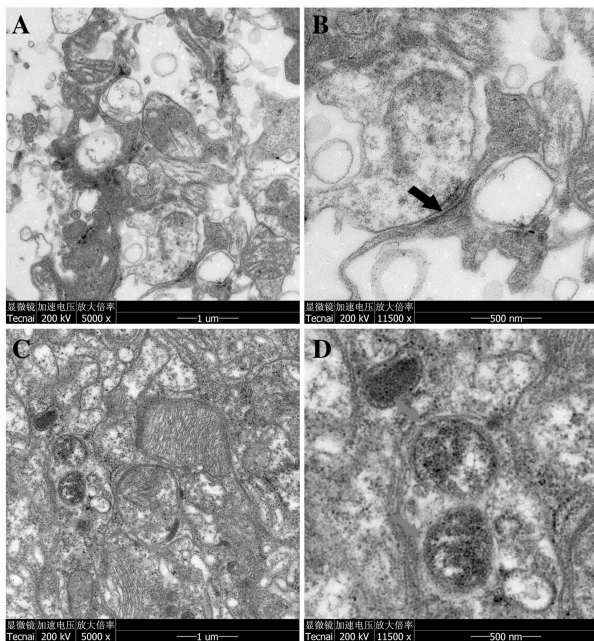


图4 *Wolbachia* 在果蝇神经细胞中定位
注: A, B 为 Dmel T, 未发现 *Wolbachia*, B 图中黑色箭头为突触间隙, B 为 A 局部放大; C, D 为 Dmel *wMel*, 深色箭头所示为 *Wolbachia* 细胞所在, D 为 C 局部放大。

3.2 *Wolbachia* 改变果蝇取食节律

确定 *Wolbachia* 存在于果蝇神经系统后, 我们采用 Multibeam 果蝇活性监测器探究 *Wolbachia* 对果蝇取食节律的影响。如图 5 显示, 统计连续 5 d 内, 果蝇每小时在玻璃管所处位置的情况。如图 5 所示每一列从上到下为 0 ~ 24 h。每一行从左到右分别

代表果蝇所处玻璃管中不同位置, 最右边一列显示的是食物所在的地方。在每个位置, 彩色条颜色越趋于红色代表此处出现的果蝇越多。利用 Excel 分析计算出果蝇取食偏好的结果, 从图 6B、6D 可知, 不论是感染还是未感染 *Wolbachia* 的果蝇, 雌性果蝇比雄性果蝇出现在靠近食物端的次数更多, 即取食偏好更高。换言之, 相比于雄性果蝇, 雌性果蝇取食需求更大, 尤其是在 ZT13:00 – ZT23:00 (夜晚时段) 阶段。同时, 雌性果蝇在 ZT13:00 – 15:00 时段的取食偏好一天中达到最高峰 (图 6A), 雄性果蝇在 ZT5:00 – 7:00 时段的取食偏好最高 (图 6C)。另一方面, 如图 6A 所示, 单独比较雌性果蝇, 相对于未感染 *Wolbachia* 的果蝇, 感染 *Wolbachia* 的雌性果蝇在 ZT19:00 – 23:00 时段的取食偏好更高 (图 6A); 相反的, 对于雄性果蝇, 感染 *Wolbachia* 的果蝇, 相对于未感染 *Wolbachia* 果蝇, 在 ZT15:00 – 23:00 时段的取食偏好更低, 而在 ZT1:00 – 9:00 时段的取食偏好更高 (图 6C)。这一结果提示, 改变了 *Wolbachia* 果蝇的取食节律。

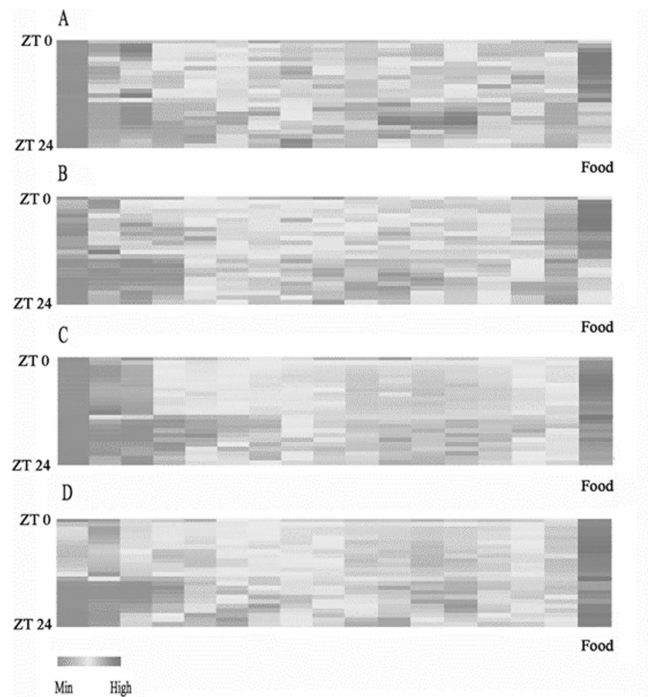


图5 果蝇活动热图

注: 如图显示 5 天内果蝇每小时在玻璃管所处位置的比例。每一列从上到下是 0 到 24 小时。每一行从左到右分别代表玻璃管不同位置, 最右边一列显示的是食物所在。颜色越深代表出现的果蝇越多 (A, B, C, D 分别代表未感染雄性, 感染 *Wolbachia* 雄性, 未感染雌性, 感染 *Wolbachia* 雌性果蝇)。

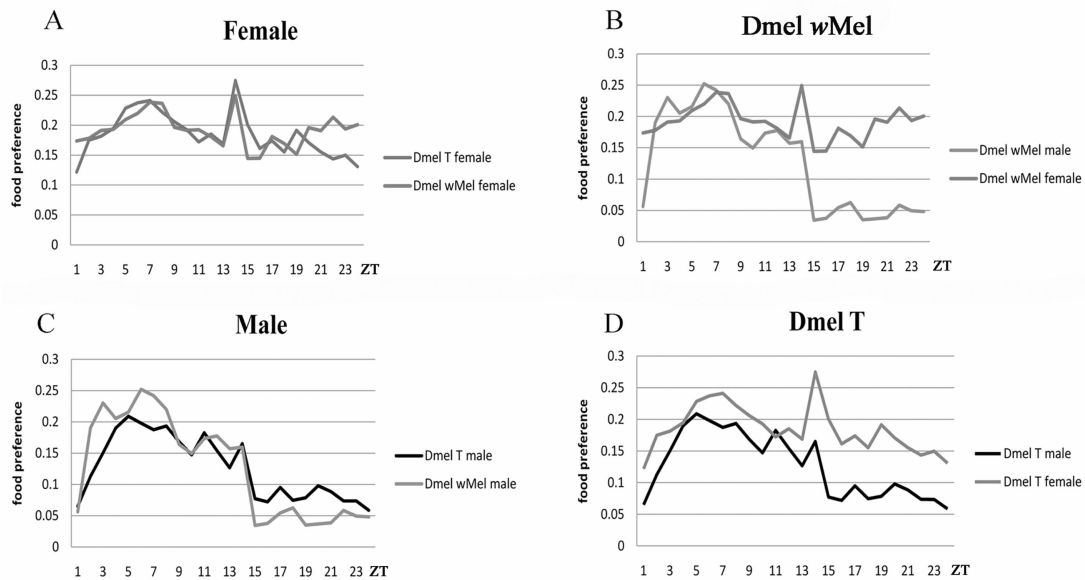


图6 果蝇取食偏好节律图

注:Dmel wMel为感染 *Wolbachia* 的黑腹果蝇,Dmel T是未感染 *Wolbachia* 的果蝇。

4 结论

地球自转和公转引起了自然环境的昼夜波动和季节变化,生物体因内源性的生物钟引发昼夜节律。从简单的蓝藻细菌到高级哺乳动物都具有生物钟,生物钟可以使生物预判外界环境的日常变化而作出相应准备以最大程度地适应环境变化,因此,昼夜节律作为生物最基本的特征之一,是生物生命活动中最常见的一类生物节律^[15,16]。昆虫的许多行为活动,例如:产卵、羽化、交配、取食等行为也会呈现相应的周期性,即在一天之内的不同时段活跃程度会发生波动^[17];果蝇的羽化过程在时间上具有典型的选择性,它们会更倾向选择在早上或者下午2:00左右羽化^[18]。掌握昆虫的行为规律可以更好的帮助我们防控有害昆虫的种群数量和密度,而不同种类的昆虫取食规律也不相同,所以,研究不同昆虫的取食规律具有很大的实践价值。

彭瀚等^[19]发现,星天牛成虫在光照及黑暗条件下(光周期 15 L: 9 D)均存在取食行为,且两种条件下的取食量没有差异。在光照条件下,雌成虫取食高峰出现在 13:00–14:30,且雄成虫无明显的取食高峰期。这一结果与本文的结果是一致的,我们发现,雌性果蝇在 ZT 13:00–15:00 时段的取食偏好一天中是最高的;相反的,雄性果蝇在 ZT 5:00–7:00 时段的取食偏好最高,这体现了雌雄果蝇在取食上的节律差异。另外,本文发现不论是感染还是未感染 *Wolbachia*,雌性果蝇比雄性果蝇出现在靠近食物端

的次数更多,即取食偏好更高。这一结果提示我们,相比于雄性而言,雌性果蝇需要更多的能量来维持基本的代谢活动,例如产卵等耗能行为^[20]。本文分析了感染与未感染 *Wolbachia* 的黑腹果蝇在取食节律方面的差异,有助于我们更好地了解共生菌 *Wolbachia* 对宿主取食等重要行为的影响,为害虫生物防治提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Beckmann J F, Ronau J A, Hochstrasser M. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(5): 329-374.
- [2] He Z, Zhang H B, Li S T, et al. Effects of *Wolbachia* infection on the postmating response in *Drosophila melanogaster* [J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2018, 72(9): 1-12.
- [3] Bi J, Wang Y. The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts [J]. *Insect Science*, 2020, 27(5): 846-858.
- [4] Albertson R, Tan V, Leads R R, et al. Mapping *Wolbachia* distributions in the adult *Drosophila* brain [J]. *Cellular Microbiology*, 2013, 15(9): 1527-1544.
- [5] Roman Z, Peter H. *Wolbachia* and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-host interactions [J]. *Frontiers in Microbiology*,

- 2015,6:1201.
- [6] Pietri J E, Debruhl H, Sullivan W J. The rich somatic life of *Wolbachia* [J]. John Wiley & Sons, Ltd, 2016, 5(6):923-936.
- [7] Rohrscheib C E, Bondy E, Josh P, et al. *Wolbachia* influences the production of octopamine and affects *Drosophila* male aggression [J]. Applied and environmental microbiology, 2015, 81(14):4573-80.
- [8] Bi J, Zheng Y, Wang R F, et al. *Wolbachia* infection may improve learning and memory capacity of *Drosophila* by altering host gene expression through microRNA [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 106:47-54.
- [9] Bi J, Sehgal A, Williams J A, et al. *Wolbachia* affects sleep behavior in *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of insect physiology, 2018, 107:81-88.
- [10] Turley A P, Moreira L A, O'Neill S L, et al. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti* [J]. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2009, 3(9):516.
- [11] Panda S, Hogenesch J B, Kay S A. Circadian rhythms from flies to human [J]. Nature, 2002, 417(6886):329-35.
- [12] Tataroglu O, Emery P. Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster* [J]. Methods, 2014, 68(1):140-150.
- [13] Patke A, Young M W, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020, 21(2):67-84.
- [14] Hoffmann A A, Turelli M, Simmons G M. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans* [J]. Evolution, 1986, 40(4):692-701.
- [15] Dubowy C, Sehgal A. Circadian rhythms and sleep in *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 2017, 205(4):1373-1397.
- [16] Bulthuis N, Spontak K R, Kleeman B, et al. Neuronal activity in Non-LNV clock cells is required to produce free-running rest: activity rhythms in *Drosophila* [J]. Journal of Biological Rhythms, 2019, 34(3):249-271.
- [17] Antle M C, Silver R. Circadian insights into motivated behavior [J]. Current topics in behavioral neurosciences, 2016, 27:137-69.
- [18] Pittendrigh C S. Circadian Systems, I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967, 58(4):1762-1767.
- [19] 彭瀚, 刘亚宁, 耿显胜, 等. 星天牛成虫的取食节律及对两种苦楝粗提物行为趋性 [J]. 生态学杂志, 2020, 39(04):1206-1213.
- [20] Kunz S O, Thomas H K. Reproduction, energy costs of [J]. Encyclopedia of Energy, 2004, 29(4):423-442.