



研究报告

果蝇共生菌降低有害真菌的毒性

冯婧宇^{Δ1} 王生雷^{Δ2} 刘威³ 周思艺¹ 郭心睿¹ 芦韬¹ 徐本锦³ 陈利荣^{*3} 魏建宏^{*1}

1 山西医科大学汾阳学院基础医学部 山西 汾阳 032200

2 青岛市城阳区农业农村局 山东 青岛 266109

3 山西医科大学汾阳学院检验系 山西 汾阳 032200

摘要:【背景】目前对于如何解决有害真菌对黑腹果蝇的致死性病理研究较少,对共生菌抑制有害真菌的研究引起普遍关注。【目的】检测黑腹果蝇共生菌对病原性真菌的拮抗作用,揭示共生菌提高果蝇的适合度。【方法】利用 PDA 培养基分离黑腹果蝇食物中真菌;利用形态和 rDNA ITS 基因序列比对进行真菌的鉴定;通过测量菌落直径、孢子数量以及菌丝分枝数量以评定真菌的生长;利用存活率评估病原真菌的毒性;建立无菌和悉生模型,通过发育历期验证其共生菌与病原性真菌的竞争作用;利用双向选择食物装置检测共生菌抑制病原真菌的效果。【结果】从果蝇食物中分离出的真菌经鉴定为拟茎点霉(*Phomopsis*),可显著地降低成年果蝇的存活率和延缓果蝇发育。东方醋酸杆菌在体外可明显抑制拟茎点霉的生长,有效地减轻拟茎点霉对果蝇的致死作用,挽救了拟茎点霉导致的果蝇发育延滞,改善了果蝇产卵对拟茎点霉的趋避作用。【结论】拟茎点霉是果蝇的一株条件性病原真菌,而东方醋酸杆菌可以有效地减轻拟茎点霉对果蝇生长发育和存活率的损害,从而提高果蝇适合度。

关键词: 黑腹果蝇, 条件性病原真菌, 拟茎点霉, 东方醋酸杆菌, 存活率, 适合度

Drosophila symbionts attenuate the pathogenicity of fungiFENG Jingyu^{Δ1} WANG Shenglei^{Δ2} LIU Wei³ ZHOU Siyi¹ GUO Xinrui¹ LU Tao¹
XU Benjin³ CHEN Lirong^{*3} WEI Jianhong^{*1}

1 Department of Basic Medicine, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China

2 Agricultural and Rural Bureau of Chengyang District in Qingdao, Qingdao, Shandong 266109, China

3 Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China

Abstract: [Background] At present, there are few studies on how to solve the lethal pathogenicity of

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31501175); Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Shanxi High Education (2018807); Science and Technology Innovation Project of Shanxi High Education (2019L0998); Natural Science Foundation of Shanxi Province (201801D121264)

ΔThese authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: CHEN Lirong: clr928@163.com; WEI Jianhong: wjh5123@163.com

Received: 14-09-2020; **Accepted:** 23-02-2021; **Published online:** 31-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31501175); 山西省高等学校大学生创新创业训练项目(2018807); 山西省高校科技创新项目(2019L0998); 山西省自然科学基金(201801D121264)

Δ对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: 陈利荣: clr928@163.com; 魏建宏: wjh5123@163.com

收稿日期: 2020-09-14; **接受日期:** 2021-02-23; **网络首发日期:** 2021-03-31

harmful fungi to *Drosophila melanogaster*. The intestinal symbiotic bacteria of *Drosophila* are one of the current research hotspots, and the study on the interaction between symbiotic bacteria and harmful fungi has attracted widespread attention. **[Objective]** To assess the competitive interaction between *Drosophila* symbionts and pathogenic fungi, consequently mitigating the toxicity of fungi to their hosts. **[Methods]** Fungi were isolated from fly food using PDA medium. The interaction between *Drosophila* symbionts and pathogenic fungi was examined by means of colony diameter, the number of spores and mycelium branches. The pathogenicity of fungi was examined using *Drosophila* infection. The germ-free and gnotobiotic flies were established to verify the protection of *Drosophila* symbionts against fungi. The 2-choice egg-laying apparatus was employed to assay the oviposition selection of *D. melanogaster* female adults. **[Results]** A fungus was identified as *Phomopsis* FY that was detrimental to the survival and development of *Drosophila* upon infection. *Acetobacter orientalis* hindered the growth of *Phomopsis* FY *in vitro*, and decreased the mortality rate of *Phomopsis* FY-infected flies *in vivo*, consequently mitigating the toxicity of *Phomopsis* FY to the hosts. Additionally, the presence of *A. orientalis* overrode the avoidance of oviposition on *Phomopsis* FY-associated substrates. **[Conclusion]** *Phomopsis* FY was identified as a conditionally potential *Drosophila* pathogen. Commensal *A. orientalis* mitigated the susceptibility of *Drosophila* to pathogenic fungi, providing insight into the natural interplay between commensal and pathogenic microbial communities that contribute to animal health and pathogenesis.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, conditionally pathogenic fungi, *Phomopsis*, *Acetobacter orientalis*, survival rate, fitness

后生动物栖息着大量的共生微生物, 这些微生物影响着宿主的多种生理功能和健康^[1]。新兴的观点认为, 许多宿主表型其实是由宿主基因组和微生物组共同决定的, 所以共生菌也显著地影响宿主适应性, 包括发育、繁殖力和寿命^[2]。然而, 传统上人们对宿主表型的评估通常忽略了共生菌的作用, 很少关注菌群对宿主适应度的影响。宿主微生物组成分复杂和多态性通常会限制我们的研究, 因此需要一个简洁易行的模型, 重新评估共生菌对宿主表型的影响。

共生菌重要的作用之一是与病原菌相互竞争, 协助宿主战胜各种环境病原体。在野外, 果蝇主要以腐烂性水果为食, 因此不可避免地接触和采食多种微生物, 既包括有益的共生菌, 也包括致病性的微生物^[3], 例如潜在致病真菌。真菌广泛存在于植物体内和体表, 部分真菌会与植物宿主形成共生关系^[4]。但是这些真菌与昆虫种族形成资源竞争关系, 可以产生次生代谢物, 对昆虫造成极强毒性^[5]。前人研究多集中于真菌的毒害作用和机理, 而对宿主携带的共生菌如何抑制和降低真菌毒副作用的研究较少, 可能受限于无菌模型的建立。野外

和实验室饲养果蝇体内共含有 20 多种微生物, 主要包括醋酸杆菌属和乳杆菌属^[6]。这些共生微生物群可以与宿主自身协同代谢进化, 协助宿主在环境中战胜各种病原体, 然而其作用机理仍然不是很清楚。黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)因其与人类肠道的菌群和结构具有高度的保守性, 近年来以果蝇作为研究细菌与宿主共生关系模型的应用愈来愈广泛^[7], 因此果蝇提供了一个优秀模型, 以探索宿主-共生菌-病原菌之间错综复杂的关系。

醋酸杆菌是果蝇最常见的共生菌之一^[8], 为革兰氏阴性菌。其在外界广泛存在, 可以通过降解纤维素和合成大量维生素等方式促进宿主消化和吸收营养物质, 有利于果蝇的生存。因此, 本研究尝试分离果蝇相关真菌, 并且选择东方醋酸杆菌(*Acetobacter orientalis*, OAC)作为果蝇共生菌的代表^[7]。本研究利用果蝇-真菌-细菌模型, 研究果蝇共生菌拮抗其病原真菌的现象和机理。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系与饲养

选用黑腹果蝇(*D. melanogaster*)品系 Oregon R

果蝇作为宿主。果蝇饲养在培养箱内(温度 25 °C, 相对湿度 50%–60%, 光周期 12L:12D)^[1], 果蝇饲养采用玉米-酵母常用标准配方: 琼脂 13.00 g, CaCl₂ 0.83 g, 葡萄糖 31.60 g, 蔗糖 63.20 g, 玉米粉 77.70 g, 酵母粉 24.00 g, ddH₂O 1 350 mL。

1.2 主要试剂和仪器

次氯酸钠、青霉素、链霉素, Sigma-Aldrich 公司; Walch 消毒液, 威莱(广州)日用品有限公司; 无水乙醇, 方正医药有限公司; PowerSoil DNA 分离试剂盒, MoBio 公司。

恒温培养箱, 黄石市恒丰医疗器械有限公司; 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 核酸定量仪, 北京普析通用仪器有限责任公司; 显微镜, Nikon 公司; 冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司, 分光光度计, 岛津公司; 高压灭菌锅, Panasonic 公司。

1.3 真菌的分离与鉴定

从果蝇食物中分离出少量菌丝, 转移至 PDA (Potato Dextrose Agar)培养基中, 25 °C 恒温箱里培养 48 h, 再从培养基中挑取少量菌丝放至新的 PDA 培养基中继续培养 48 h。重复上述步骤 5 次进行纯化, 获得纯的菌株。PDA 培养基配方: 马铃薯 200.0 g 加入 1 L 水中煮烂, 8 层纱布过滤后加入葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0–20.0 g, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后分装至培养皿备用。收集菌丝, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。rDNA ITS 序列与 NCBI 的核苷酸数据库(BLASTn)进行比对, 找出与该菌最为相似的序列, 并进行命名。MEGA 3.0 (V46.9.3)软件分析该菌与其他菌的同源性, 构建系统进化树。

1.4 果蝇存活率

将不同剂量的真菌接种在食物小管里, 将 30 只无菌成年果蝇转移至真菌小管里; 对照组添加等量 PBS (pH 7.0)溶液。每 12 h 记录一次存活果蝇数量, 存活率(%)=存活果蝇数量/30×100。将 10⁸ CFU 孢子溶于 0.5 mL 5%蔗糖水里, 然后滴加到 3 层滤纸片上, 置于小管底部。无菌成虫果蝇雌雄

分开, 每管 20 只, 连续 5 d 转移到上述含有真菌孢子的小管里, 通过口服方式进行感染果蝇。真菌感染后的果蝇转移到无菌食物或者接种东方醋酸杆菌的食物上, 每 12 h 记录一次存活果蝇数量, 计算存活率。

1.5 无菌与悉生果蝇模型的建立

在收集器底部抹上酵母膏, 收集常规饲养果蝇(Conventionally Reared, CR) 8 h 之内的卵, 依次用 Walch 消毒液、次氯酸钠、75%乙醇、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline with 0.3% Triton X-100, PBST)对其进行消毒处理, 获得无菌卵。将其转移到灭菌后食物中, 使用透气不透菌的塞子对其密封, 建立无菌果蝇(Germ Free, GF)模型^[9]。真菌采用 PDA 培养基, 28 °C、80 r/min 振荡培养过夜, 将菌液 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 50 mL PBS 清洗 2 次后将离心后孢子加入无菌果蝇体系中, 即可建立悉生果蝇模型。以上操作均在无菌安全柜内进行, 操作完成后置于干净整洁的恒温培养箱内培养。

1.6 果蝇生长发育历期

建立无菌果蝇以及悉生果蝇模型后, 分别记录各个模型中成蛹和羽化阶段的时间和数目。发育历期计算公式: $T = (T_1 \times N_1 + T_2 \times N_2 + \dots + T_m \times N_m) / (N_1 + N_2 + \dots + N_m)$ T 为相应阶段的发育历期, T_m 为卵到对应阶段的天数, N_m 为第 T_m 天形成对应阶段果蝇的数目^[6]。

1.7 真菌孢子、分枝菌丝数量和生长速率

挑取菌丝至 PDA 液体培养基中, 28 °C、80 r/min 振荡条件下培养 48 h 后摇晃瓶身, 避开菌体取 100 μL 菌液移至 900 μL PBS 中, 混合均匀后重复上述步骤进行稀释。使用血细胞计数板记录孢子数量。将稀释后的菌液取 1 μL 点在 PDA 培养基中心, 在距离中心 1 cm 处插入载玻片, 每 12 h 取出一个载玻片放至显微镜下, 统计菌丝数量。同时将上述稀释菌液取 1 μL 点在 PDA 培养基中心, 每 3 h 用直尺测量一次菌落直径进行真菌生长速率的测量^[10]。

1.8 产卵行为检测

选用中空圆柱状果蝇产卵双选择装置, 该装

置高 80 mm、直径 60 mm，将食物培养皿放于装置底部^[11]。果蝇成虫用涂有酵母膏的葡萄汁琼脂板(700 mL 水，30.0 g 琼脂，300 mL 葡萄汁，50.0 g 蔗糖)育肥 2–3 d，然后换为对照与处理食物拼装的产卵选择培养基(一边各一半)，产卵时间为 12 h。对照组食物为玉米-酪蛋白普通食物(水 1 L，玉米粉 70.0 g，蔗糖 50.0 g，酪蛋白 15.0 g，琼脂 15.0 g)，处理组食物为加入目的菌株的玉米-酪蛋白普通食物发酵 48 h。将 20 只雌果蝇和少许雄果蝇放于装置中，观察其产卵行为。12 h 后分别统计两边培养基上卵的数量，计算产卵指数(Oviposition Index, OI)=(实验组卵数-对照组卵数)/(实验组卵数+对照组卵数)。

1.9 数据分析

Excel 软件整理数据，取得平均值(Mean)与标准误(SE)，各组间差异用 SPSS 软件 *t* 检验

(Student's *t*-Test)进行分析。用 GraphPad 和 Adobe Illustrator 作图。

2 结果与分析

2.1 拟茎点霉 FY 的分离与鉴定

按照 1.3 真菌分离方法，从发霉的果蝇食物中分离出一株真菌。该菌株最适宜的生长温度为 28–32 °C，并且生长较为迅速，72 h 内可长满直径为 9 cm 的平板。其是一种典型的丝状真菌，具有白色菌丝(图 1A)。随着生长推移，产生深灰色的分生孢子团(图 1B)。通过 BLASTn 比对，其 rDNA ITS 序列与已发表的拟茎点霉 *Phomopsis* sp. ZLVG 333 序列(Identities=550/558)显示了>99%的相似性，并且与其他拟茎点霉成员比较接近，因此将其命名为拟茎点霉 FY (*Phomopsis* FY)，GenBank 登录号为 MT649479。同时，该菌株与我们以前分

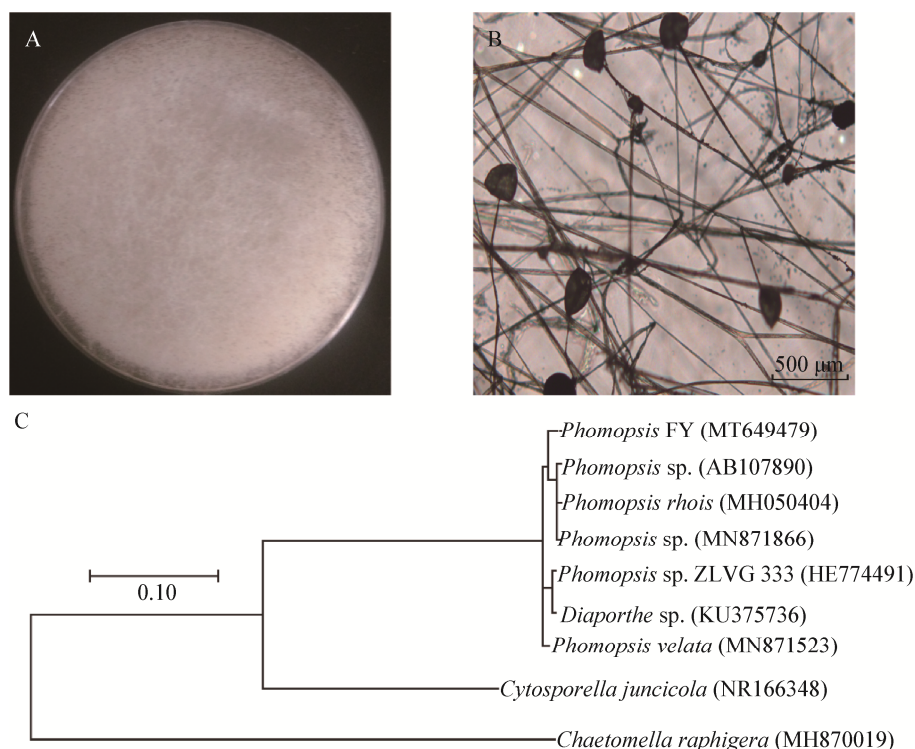


图 1 拟茎点霉 FY 形态与相关真菌的系统进化树

Figure 1 *Phomopsis* FY morphology and phylogenetic tree of its relatives

注：A：拟茎点霉 FY 在 PDA 培养基上培养 72 h 后的菌落形态；B：菌丝体和分生孢子；C：拟茎点霉 FY 与相关真菌的系统进化树。标尺示序列差异的分支长度；括号内为 GenBank 登录号

Note: A: Image showing fungal development of *Phomopsis* FY on the PDA medium; B: Mycelia, conidiophores, and conidia of *Phomopsis* FY; C: Phylogenetic tree of *Phomopsis* FY and its relatives (neighbor-joining method). Scale bar indicates nucleotide divergence. GenBank accession numbers are in parentheses

离到的一株真菌具有较近的亲缘关系^[10], 然而二者之间仍然具有一定差异: 拟茎点霉 FY 相对生长缓慢, 生成孢子数量偏少, 推测二者基因组存在其他差异。

2.2 拟茎点霉 FY 对果蝇毒理作用

为了检测拟茎点霉 FY 是有益真菌还是病原真菌, 将拟茎点霉 FY 的孢子接种到果蝇的饲养食物中使其初始孢子浓度为 10^6 CFU, 让成年果蝇直接采食, 通过存活率评价这株真菌对果蝇的毒力效应。在 144 h 后, 正常食物组果蝇存活率大于 70%, 而接种拟茎点霉 FY 组的存活率仅为 18% (图 2A)。由此说明, 拟茎点霉 FY 对成虫果蝇具有强烈的致死毒性。利用化学试剂消毒法建立无菌果蝇模型, 将拟茎点霉 FY 接种到无菌果蝇中, 建立单悉生果蝇模型, 方法如 1.4 所述^[9]。如图 2B 显示, 在含有多于 4×10^6 CFU 孢子小管中, 孵化出的幼虫迅速死亡, 不能发育为蛹; 在低浓度条件下, 受感染的果蝇羽化时间比对照组果蝇显著延长。由此说明, 高浓度拟茎点霉 FY 对果蝇幼虫具有强烈致死效应, 而低浓度拟茎点霉 FY 则减慢果蝇的发育速率 (图 2B)。基于果蝇对拟茎点霉 FY 敏感性和抑制发育的特性, 说明了拟茎点霉 FY 是果

蝇的一种条件致病真菌。

2.3 东方醋酸杆菌减弱拟茎点霉 FY 对果蝇的毒力

鉴于果蝇拥有大量共生菌, 因此推测这些天然菌群可以与病原菌相互竞争, 从而帮助果蝇抵御真菌感染。果蝇在东方醋酸杆菌单株菌条件下, 卵成蛹时间为 5.8 d 左右 (图 3A), 羽化成虫时间为 9.2 d 左右 (图 3B), 与 GF 果蝇相比时间缩短, 说明东方醋酸杆菌是果蝇的共生菌, 促进果蝇生长发育。与图 2B 结果一致, 高浓度拟茎点霉 FY ($>10^7$ 孢子) 对 GF 果蝇胚胎具有致死作用, 不能发育到蛹和成虫阶段 (图 3A、3B)。然而, 在同时接种拟茎点霉 FY 和东方醋酸杆菌时, 东方醋酸杆菌可以挽救感染拟茎点霉 FY 的果蝇, 解除拟茎点霉 FY 致死效应, 果蝇可以发育到蛹和成虫。随着东方醋酸杆菌浓度增加, 其缓解效果更加明显。结果说明, 东方醋酸杆菌有效地缓解了条件性病原菌拟茎点霉 FY 对果蝇发育的延滞。为了进一步证实东方醋酸杆菌减弱拟茎点霉 FY 对果蝇的毒力, 建立了果蝇口服感染模型, 结果显示, 东方醋酸杆菌提高了拟茎点霉 FY 感染果蝇的存活率 (图 3C、3D)。

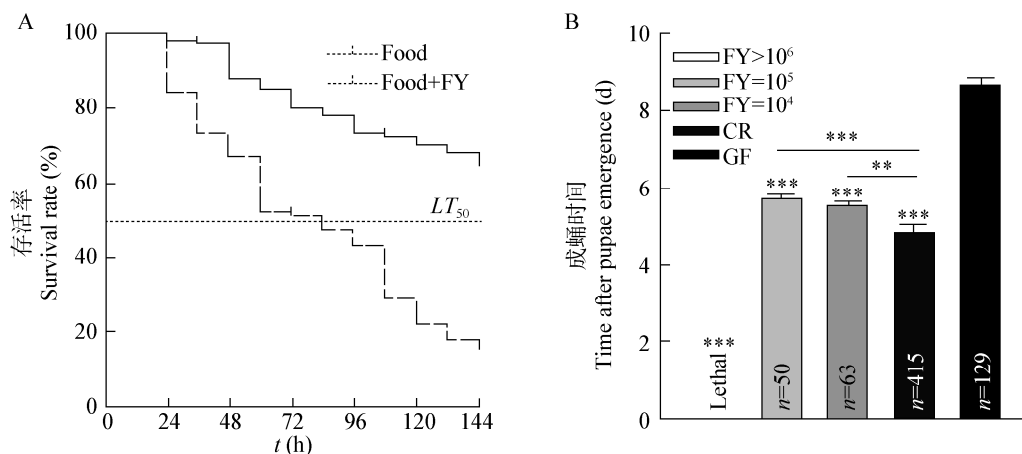


图 2 拟茎点霉 FY 对果蝇存活率和发育历期的影响

Figure 2 The survival and developmental timing of *Drosophila* challenged with *Phomopsis* FY

注: A: 成虫口服拟茎点霉 FY 的存活率; B: 果蝇发育历期被拟茎点霉 FY 延长。图中 n 表示样本数量; 数据为平均值±标准误; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ (单样本 t 检验)

Note: A: The survival of adults fed with *Phomopsis* FY molds in food; B: The timing of pupa formation of the flies associated with *Phomopsis* FY n is the number of each sample; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$ (one-sample t-test)

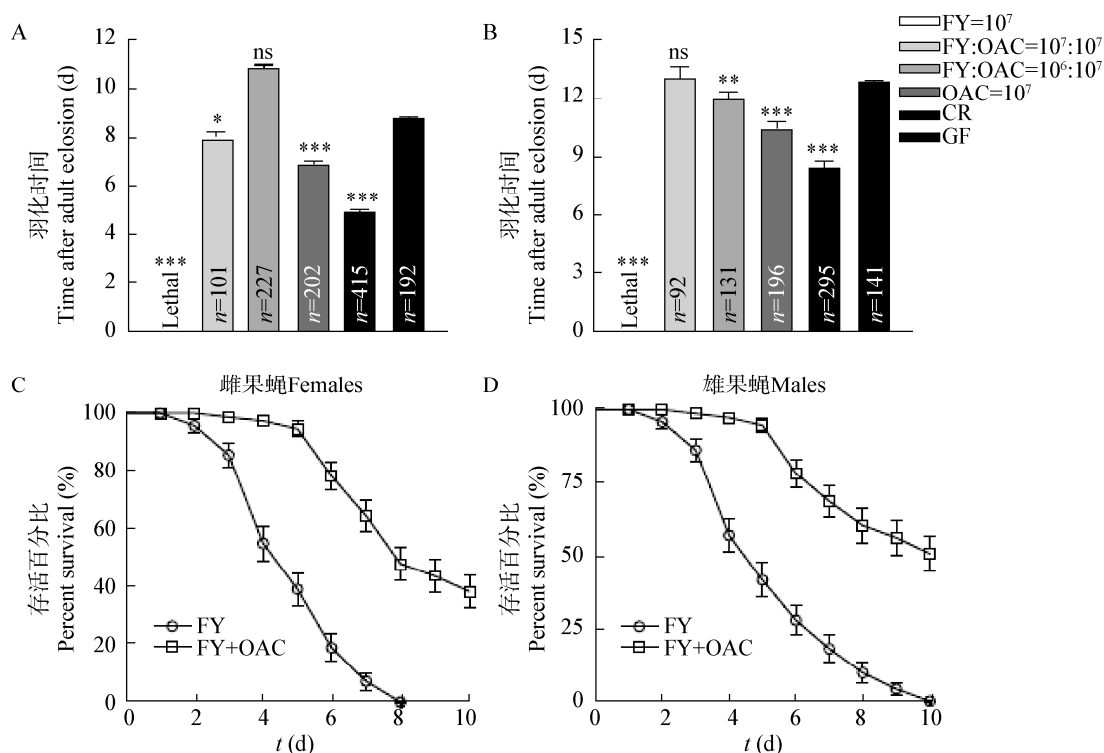


图3 共生菌减轻了拟茎点霉 FY 对寄主的毒性

Figure 3 Commensals alleviate the toxicity of *Phomopsis* FY to hosts

注: A: 不同浓度的 FY 对果蝇成蛹时间的影响; B: 拟茎点霉 FY 与不同浓度的东方醋酸杆菌混合对果蝇成蛹以及羽化成虫时间的影响; C、D: 东方醋酸杆菌增加了雌性(C)和雄性(D)果蝇感染拟茎点霉 FY 后的存活率。图中 *n* 表示样本数量; ns: 无显著差异; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ (单样本 *t* 检验)

Note: A: Effects of different concentrations of FY on the time of pupae emergence in *Drosophila*; B: Effects of mixed with *Phomopsis* FY and different concentrations of *A. orientalis* (OAC) on the time of pupae and adult emergence in *Drosophila*. C and D: *A. orientalis* increases survival of females (C) and males (D) infected with *Phomopsis* FY. *n* is the number of each sample; ns: No significance; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ (one-sample *t*-test)

2.4 东方醋酸杆菌抑制拟茎点霉 FY 生长

在已接种拟茎点霉 FY 平板上再涂布不同计量的东方醋酸杆菌, 观察东方醋酸杆菌对拟茎点霉 FY 生长的抑制作用。单纯培养的拟茎点霉 FY 在 72 h 时菌落直径达到 9 cm (图 4A), 而东方醋酸杆菌(10⁵:10⁷)可以显著地抑制拟茎点霉 FY 生长(图 4B、4C)。显微镜下, 单独培养的拟茎点霉 FY 菌丝茂密, 有大量灰色孢子生长(图 4D)。然而, 东方醋酸杆菌(10⁶:10⁷)显著地抑制拟茎点霉 FY 菌丝分枝, 也减少了其孢子生成数量(图 4E); 随着东方醋酸杆菌比例升高(10⁵:10⁷), 菌落直径仅为 1.5 cm, 菌丝更稀疏, 并且不能产生孢子(图 4F)。菌落直径、菌丝数量和孢子数量统计结果见图 4G-I。结

果说明, 东方醋酸杆菌在体外有效地抑制拟茎点霉 FY 的生长和繁殖。此外, 平板对峙试验同样显示, 东方醋酸杆菌显著地抑制拟茎点霉 FY 生长(图 4J、4K), 其抑菌率达到 50.3% (图 4L)。因此, 东方醋酸杆菌可有效抑制拟茎点霉 FY 生长。

2.5 单株拟茎点霉 FY 与东方醋酸杆菌混合菌影响果蝇的产卵偏嗜性

利用双向选择产卵器检测装置, 检测拟茎点霉 FY 对果蝇的产卵偏嗜性的影响。普通食物为对照组, 不同浓度的拟茎点霉 FY 处理的果蝇食物为实验组。果蝇产卵对高浓度拟茎点霉 FY 有明显的避性(图 5A), 产卵指数为 -0.78, 随着拟茎点霉 FY 浓度的降低, 果蝇产卵避性也随之减少, 说明拟

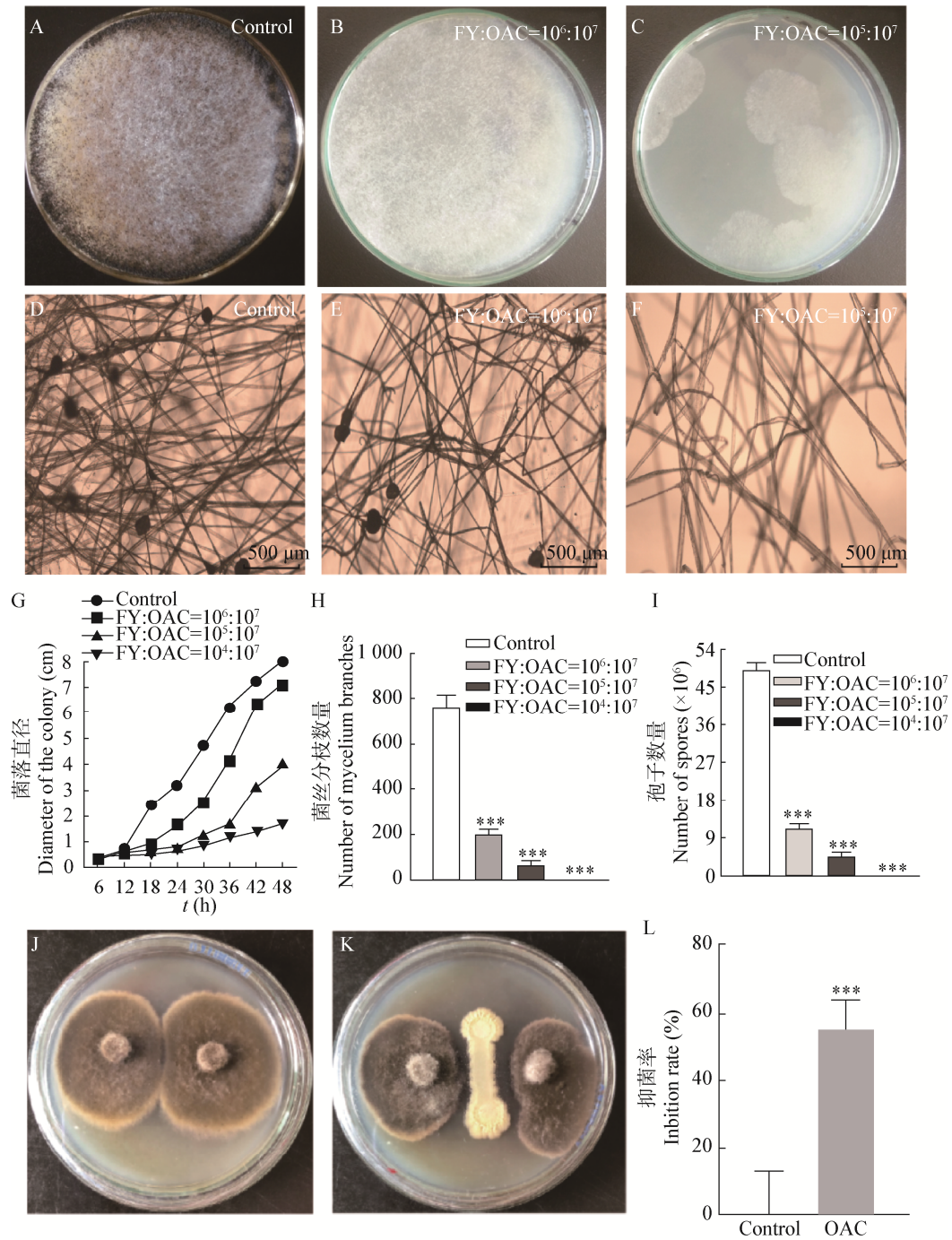


图4 东方醋酸杆菌对拟茎点霉FY的抑制作用

Figure 4 Inhibitory effects of *A. orientalis* on the growth of *Phomopsis* FY

注: A-C: 东方醋酸杆菌对拟茎点霉FY菌落生长的影响; D-F: 东方醋酸杆菌对拟茎点霉FY菌丝和孢子生长的影响; G-I: FY菌落直径、菌丝分枝数量和孢子数量的统计结果; J-L: 对峙法显示, 东方醋酸杆菌抑制拟茎点霉FY菌落生长的代表性图与统计结果。***: $P < 0.001$ (单样本 t 检验)

Note: A-C: The growth of *Phomopsis* FY combined with *A. orientalis* in the medium; D-F: The growth of mycelia and spores was inhibited by *A. orientalis*; G-I: The quantification of the colony growth rate, the number of mycelia, and spores of *Phomopsis* FY combined with *A. orientalis*; J-L: The representative images and quantification of the growth of *Phomopsis* FY that was inhibited by *A. orientalis* in the medium. ***: $P < 0.001$ (one-sample t -test)

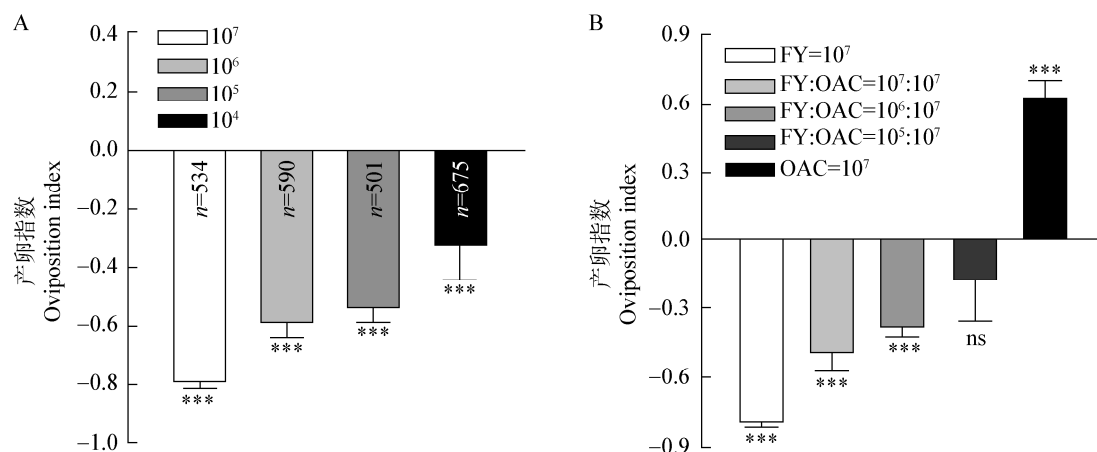


图5 东方醋酸杆菌降低果蝇对拟茎点霉 FY 产卵避性

Figure 5 *A. orientalis* prevented oviposition avoidance towards *Phomopsis* FY

注: A: 果蝇对拟茎点霉 FY 产卵避性, 用双选择装置测定产卵偏好性, 计算产卵偏好指数; B: 东方醋酸杆菌降低果蝇对拟茎点霉 FY 产卵避性。图中 *n* 表示样本数量; ns: 无显著差异; ***: $P < 0.001$ (单样本 *t* 检验)

Note: A: Quantification of egg-laying avoidance to diet fermented with *Phomopsis* FY. Egg-laying preference was assayed using a two-choice chamber, and the oviposition preference was calculated; B: *A. orientalis* reduced oviposition avoidance towards *Phomopsis* FY. *n* is the number of each sample; ns: No significance; ***: $P < 0.001$ (one-sample *t*-test)

茎点霉 FY 危害果蝇后代的生存。为了进一步检测东方醋酸杆菌能够与拟茎点霉 FY 相互竞争, 降低果蝇产卵对拟茎点霉 FY 的避性, 将不同比例的 2 株菌进行混合。如图 5B 所示, 单独 10^7 浓度的拟茎点霉 FY 产卵指数为 -0.81, 随着东方醋酸杆菌比例升高 ($10^5:10^7$), 产卵指数也逐渐增大, 当达到 $10^5:10^7$ 时, 果蝇产卵不再具有明显的偏嗜性, 说明东方醋酸杆菌有效地缓解果蝇对拟茎点霉 FY 的产卵避性作用。

3 讨论与结论

动物的肠道和体表栖息着大量的共生菌, 它们调节着宿主的多种生理功能和健康。本研究从发霉果蝇饲料中分离和鉴定出一株真菌拟茎点霉 FY, 该真菌可显著地降低成年果蝇的存活率, 说明其可能为果蝇条件致病真菌。拟茎点霉在自然界的大部分植物体内广泛存在, 可引起植物溃疡、烂茎、果腐、叶枯、根腐等。由于腐生觅食行为, 果蝇可能从周围的环境和食物中接触和采食这种真菌。果蝇共生菌东方醋酸杆菌在体外与拟茎点霉 FY 竞争, 体外抑制了拟茎点霉 FY 的生

长, 有效地减轻拟茎点霉 FY 对果蝇的致死作用, 从而提高了果蝇适合度。本研究选用了细菌、真菌和动物作为一个微型生态系统, 让我们成功地研究了动物-共生菌互作拮抗病原真菌的基本概念和初步机制。这个现象支持我们的假设, 即在充满病原体的环境中, 自然选择宿主的天然微生物群所赋予的保护特性来提高宿主的存活率。

昆虫病原真菌在调节自然界昆虫种群中起着关键作用, 这些真菌进化出高度多样化的生活方式, 与昆虫争夺营养物质和生态位。宏基因组学分析已经揭示了真菌具有几十个次级代谢基因簇可编码种类惊人的次级代谢产物^[12-14]。本研究从果蝇食物中分离出一株真菌, 其可严重地降低果蝇存活率(图 2), 验证该菌为一株果蝇致病菌。尽管病原真菌严重威胁果蝇在自然界的生存, 但动物也已经进化出抗真菌策略, 确保了种群存在和扩大。首先, 果蝇具有先天免疫系统, 诱导产生抗菌肽和活性氧, 以防止真菌感染^[15]。其次, 真菌毒性的减轻也可以归因于宿主和微生物之间复杂的相互作用。共生和/或益生菌通过化学抑制、

物理和营养竞争等排斥方式胜出病原体。例如, 醋酸杆菌可以产生乙酸, 乙酸可作为防腐剂, 通过降低周围环境 pH 值从而达到抑菌或灭菌的效果^[16]。在东方醋酸杆菌与拟茎点霉 FY 体外共培养实验中(图 3), 清楚地观察到东方醋酸杆菌显著抑制了拟茎点霉 FY 的生长。加入东方醋酸杆菌不仅减轻高浓度拟茎点霉 FY 的致死作用, 并且在低浓度拟茎点霉 FY 环境中, 加入东方醋酸杆菌与不加东方醋酸杆菌相比, 卵发育成蛹和羽化成虫的时间都有所缩短(图 4)。然而, 拟茎点霉 FY 接种的果蝇比无菌果蝇生长更快(图 2B), 因为微生物是果蝇生长必需的条件。接种真菌量少时, 真菌生长潜伏期长, 需要较长时间才到达次生代谢期, 产生的次生代谢毒素少, 或者仅仅处于营养期, 来不及产生次生代谢毒素, 接种拟茎点霉 FY 收益大于毒副作用, 所以会比无菌果蝇生长得更快; 另一方面, 这时果蝇发育到大龄幼虫, 可以产生大量的抗菌肽以抵抗真菌的生长。因此, 果蝇和共生菌群之间的协同作用一起拮抗具有毒性的霉菌。

果蝇为了使自己的后代免受外界有害物质的侵害, 提高后代存活率和健康水平, 会通过自身感官系统对外界环境进行挑选, 选择适宜的场所进行产卵^[11]。以往的研究, 包括我们的研究^[16], 已经揭示了一个现象, 共生菌是果蝇产卵的重要调节因子, 可以吸引果蝇到上面产卵^[17]。然而, 有害的霉菌(例如扩展青霉)却不同, 它们可以强烈地排斥果蝇产卵^[18]。我们的结果和上述的一致, 雌果蝇避免在拟茎点霉 FY 上产卵, 有效地保护孵化的幼虫不受感染。然而, 生存和繁殖策略应在系统生态学的背景下考虑, 需要平衡共生和病原体的利益和威胁。因此, 果蝇具有区分共生菌和病原菌的能力, 并选择了最有利的产卵地点。当共生菌提供的营养作用超过病原体的威胁时, 雌性仍然会选择有霉菌存在的食物上产卵。

利用果蝇模型系统, 我们揭示了一种生态现象, 即共生菌可以保护果蝇免受病原真菌感染。该模型提供了一种还原论的工具, 从系统到分子的层

次上解析宿主-微生物相互作用的内在复杂机制, 将有助于发现新的益生菌, 以促进宿主适应性提高, 其详细作用机制仍有待探索。

REFERENCES

- [1] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier[J]. Gut, 2016, 65(2): 330-339
- [2] Adair KL, Wilson M, Bost A, Douglas AE. Microbial community assembly in wild populations of the fruit fly *Drosophila melanogaster*[J]. The ISME Journal, 2018, 12(4): 959-972
- [3] Markow TA. The natural history of model organisms: the secret lives of *Drosophila* flies[J]. eLife, 2015, 4: e06793
- [4] Barelli L, Moonjely S, Behie SW, Bidochka MJ. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 90(6): 657-664
- [5] Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling[J]. Science, 2011, 334(6056): 670-674
- [6] Liu W, Li YJ, Liu XL, Zhuo P, Yao H. *Clistidium perfringens* promotes the growth and development of *Drosophila melanogaster*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2016, 59(5): 530-537 (in Chinese)
刘威, 李玉娟, 刘晓梁, 卓萍, 姚红. 产气荚膜梭菌促进黑腹果蝇的生长和发育[J]. 昆虫学报, 2016, 59(5): 530-537
- [7] Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing[J]. Cell Metabolism, 2011, 14(3): 403-414
- [8] Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(35): 12974-12979
- [9] Su WZ, Liu JL, Bai P, Ma BC, Liu W. Pathogenic fungi-induced susceptibility is mitigated by mutual *Lactobacillus plantarum* in the *Drosophila melanogaster* model[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 302
- [10] Joseph RM, Devineni AV, King IFG, Heberlein U. Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(27): 11352-11357
- [11] Wang CS, Wang SB. Insect pathogenic fungi: genomics, molecular interactions, and genetic improvements[J]. Annual Review of Entomology, 2017, 62: 73-90

- [12] Kempken F. Fungal defences against animal antagonists—lectins & more[J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20(14): 2876-2877
- [13] Sousa JP, Aguilar-Pérez MM, Arnold AE, Rios N, Coley PD, Kursar TA, Cubilla-Rios L. Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F₂₉₃₄[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1501-1508
- [14] Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ. Innate immune homeostasis by the homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*[J]. *Science*, 2008, 319(5864): 777-782
- [15] Overend G, Luo Y, Henderson L, Douglas AE, Davies SA, Dow JAT. Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27242
- [16] Liu W, Zhang K, Li YJ, Su WZ, Hu KK, Jin S. *Enterococci* mediate the oviposition preference of *Drosophila melanogaster* through sucrose catabolism[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13420
- [17] Stensmyr MC, Dweck HKM, Farhan A, Ibba I, Strutz A, Mukunda L, Linz J, Grabe V, Steck K, Lavista-Llanos S, et al. A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1345-1357
- [18] Raman A, Wheatley W, Popay A. Endophytic fungus-vascular plant-insect interactions[J]. *Environmental Entomology*, 2012, 41(3): 433-447