

铜离子对果蝇产卵选择影响及其毒理作用*

郭 敏^{1**} 刘宇虹^{1**} 赵 璐¹ 高 露¹ 周婧婧^{1***} 刘 威^{1,2***}

(1. 山西医科大学汾阳学院, 汾阳 032200; 2. 安徽农业大学, 植物保护学院, 合肥 230036)

摘 要 【目的】为明确铜离子对果蝇 *Drosophila* 产卵选择的影响, 并揭示铜胁迫对果蝇亲本及子代的毒理作用。【方法】采用双向选择产卵装置, 观察果蝇对不同浓度的铜离子的产卵选择性, 并测定果蝇的产卵能力; 在黑暗条件下, 研究视觉系统对铜离子的产卵选择性; 通过外科手术法摘除果蝇触角嗅觉感受器和前足味觉感受器, 分别探究介导该行为的感官系统; 通过设置不同浓度 CuSO_4 的培养基培养果蝇, 检测铜离子对其后代发育历期和存活率的影响; 利用存活率和运动能力装置测定果蝇适合度, 评价铜离子对果蝇成虫毒理作用; 利用荧光染色, 检测肠道 ROS 水平。【结果】果蝇对铜离子有产卵避性反应, 对 3、5 和 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 的产卵偏嗜指数分别为 -0.33、-0.54 和 -0.78, 产卵避性呈现浓度梯度效应。果蝇的视觉和嗅觉系统不影响铜离子对果蝇的产卵避性, 摘除前足的果蝇部分味觉缺失, 对 3、5 和 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 的产卵偏嗜指数分别为 -0.27、-0.42 和 -0.55, 与对照组相比无显著性差异, 但产卵避性有减弱趋势。与对照组相比, 2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 分别延长了后代成蛹时间和羽化时间 2.5 d 和 1.8 d, 后代蛹和成虫存活率分别降低了 13.9% 和 13.7%。与对照组相比, 36 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 也显著地降低了果蝇亲代的存活率和运动能力。铜离子激活机体免疫系统, 肠道 ROS 水平升高。【结论】果蝇雌性成虫对铜离子有产卵避性反应, 并且激活机体免疫系统抵抗铜胁迫的毒理作用。

关键词 果蝇; 铜离子; 产卵避性; 发育历期; 存活率

The toxicity of copper ions to *Drosophila* and their effect on the selection of oviposition sites

GUO Min^{1**} LIU Yu-Hong^{1**} ZHAO Lu¹ GAO Lu¹ ZHOU Jing-Jing^{1***} LIU Wei^{1,2***}

(1. Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China; 2. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract 【Objectives】To determine the effect of copper ions on the selection of oviposition sites by *Drosophila*, and the toxicity of copper ions to both parents and progeny. 【Methods】The effect of copper ions on the choice of oviposition sites by adult female *Drosophila* were evaluated using a two-choice apparatus. To determine the role of vision in female oviposition preferences some choice experiments were carried out in darkness. The sensory systems mediating this behavior were investigated by surgically removing the taste receptors from the forelegs and the olfactory receptor from the antennae. *Drosophila* were also cultured on media containing various concentrations of CuSO_4 and the developmental duration and survival of offspring from each treatment were compared to evaluate the biological significance of avoidance of copper ions during oviposition. Fitness was assessed on the basis of survival rate and locomotion. Levels of ROS in the gut were measured with DHE staining. 【Results】Adult female *Drosophila* avoided laying eggs on media containing 3, 5 and 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 . Oviposition indices on these media were -0.33, -0.54 and -0.78, respectively, indicating that oviposition declined in a concentration-dependent manner. Darkness and olfaction did not affect the avoidance of copper ions by female *Drosophila*. Partial taste-impaired and taste-impaired flies avoided laying eggs on the media containing 3, 5 and 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 ; oviposition indices on these media were -0.27, -0.42 and -0.55, respectively. There was no significant difference in the

*资助项目 Supported projects: 山西省高等学校大学生创新创业训练项目 (2020783); 安徽农业大学人才基金 (RC342201)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 3276675163@qq.com; 1981899912@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: fxyxzzj@163.com; liuweis5@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-11-05; 接受日期 Accepted: 2022-07-08

oviposition indices of taste-impaired flies and the control, but there was a tendency for taste-impaired flies to be less averse to copper ions. Raising larvae on media containing $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 prolonged puparium formation and adult emergence by 2.5 d and 1.8 d, respectively, relative to the control, and larval and adult survival rates of offspring raised on this media decreased by 13.9% and 13.7%, respectively. Flies had lower survival and locomotion rates on media containing $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 . **[Conclusion]** Copper ions activate the *Drosophila* immune system by elevating ROS levels in the gut. Adult female *Drosophila* avoid ovipositing on media containing copper ions, and activate their immune system when exposed to these, in order to resist copper stress.

Key words *Drosophila*; copper ion; oviposition avoidance; developmental duration; survival rate

果蝇 *Drosophila* 是最常用的模式生物之一。雌果蝇对产卵地点的选择受多种因素的影响,包括温度、湿度、光照、天敌和营养等(李燕平和戈峰, 2010; Vesterberg *et al.*, 2021)。为使物种繁衍延续,雌果蝇需要在复杂的自然环境中选择适宜的产卵地点,以提高后代存活能力(Richmond and Gerking, 1979; Yang *et al.*, 2008; 高露等, 2019)。果蝇具有天生的趋利避害的行为能力,雌果蝇利用视觉、嗅觉和味觉等多种感觉系统,判断产卵地点是否适宜后代生存,从而避免对后代的危害(Joseph *et al.*, 2009)。

铜是机体所必需的微量金属元素之一,在很多生物学过程中具有重要的功能(宋明明和黄凯, 2014)。它是许多酶和蛋白质重要的辅助因子,与新陈代谢、抗氧化和神经调节等密切相关(Danks, 1988)。然而,过量的铜也会对细胞产生毒害作用,诱发铜中毒现象。临床上,急性铜中毒可引起恶心、呕吐、溶血性贫血和肝肾衰竭等症状(Gamakaranage *et al.*, 2011)。同时,慢性铜中毒不仅引起威尔逊氏病(Gitlin, 1998)和印度儿童肝硬化(Tanner *et al.*, 1979)等罕见性疾病,还会增加氧化应激、自由基形成和线粒体功能障碍(Brewer, 2010)。因此,铜稳态平衡对机体的健康有重要的意义。近年来,随着铜矿的开采、“三废”的排放及含铜垃圾的不合理排放等,严重污染周围水体和农田土壤,导致环境中铜含量增加,超出环境容纳能力。作为生态系统食物链结构中不可或缺的一员,昆虫是铜离子积累和传递的重要媒介。多数研究结果表明,铜胁迫下昆虫的生长发育与浓度呈抛物线关系,即过量的铜离子抑制昆虫的生长和繁殖(柳琳和夏婧, 2016),如铜离子浓度达到 100 mg/kg 时,

亚洲玉米螟的存活率显著降低,且当亲代玉米螟受铜胁迫后,若其子一代持续受铜离子影响,会导致生殖能力完全丧失(王玉宏等, 2014),严重影响昆虫种类的均匀度和多样性(董鑫, 2020)。同时高浓度的铜离子不仅使昆虫血淋巴细胞中化合物浓度降低(Tylko *et al.*, 2005),抑制免疫系统,还可导致体内 DNA 损伤及突变(Paris *et al.*, 2007),造成细胞和基因毒性,干扰其正常的生理代谢。

目前关于铜离子对昆虫行为影响及毒性的研究越来越多,俨然成为研究热点。如夏婧等(2014)通过测定黑水虻体内铜离子含量发现高浓度胁迫下的迁移规律,并利用昆虫毒理学方法研究其生长发育的影响。另有研究通过气味和疼痛刺激配对并结合果蝇存活率等因素分析,认为高浓度的铜离子会导致果蝇认知功能障碍,使果蝇联想学习和记忆能力退化(Zamberlan *et al.*, 2020)。但是,果蝇是否可以感知铜离子,并主动地避开铜离子的产卵行为仍然未知。因此,本实验利用产卵双选装置,探究了铜离子对果蝇的产卵决策行为,并进一步研究介导该行为的感观系统、作用机制及对后代的影响。本研究丰富了铜离子对果蝇毒性影响的内容,同时对于揭示昆虫毒理学机制有较大的科研价值。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系与培养

野生型果蝇品系为 Oregon R (OR) 和 Canton S (CS), 突变体 *Orco*², *IR76b* 和 *Ctr1B* 来自 Bloomington 果蝇品系库。所有果蝇均使用标准玉米粉-酵母食物,在温度为 $25-30^\circ\text{C}$, 相对湿

度为 50%-60%，光周期为 12L : 12D 的恒温箱中饲养 (Liu *et al.*, 2012)。通常情况下，果蝇饲养使用玉米粉-酵母培养基，由于酵母成分较复杂，为避免其对果蝇产卵行为的影响，本实验产卵行为分析使用的食物均以水解酪蛋白作为蛋白来源 (刘威等, 2017)。

1.2 果蝇实验培养基及溶液配制

1.2.1 果蝇双选择产卵培养基配制 将 3、5 和 6 mmol CuSO₄ 分别加入果蝇玉米-酪蛋白食物 (1 000 mL 水, 70 g 玉米粉, 50 g 蔗糖, 15 g 酪蛋白, 15 g 琼脂), 搅拌加热成糊状后倒入培养皿中。冷却后用刀片沿每种固体培养基中线均匀划开, 培养皿左半侧放置普通食物 (对照组), 右半侧为添加了 CuSO₄ 的食物 (实验组), 将实验组与对照组食物手工拼装成双选择产卵培养基。

1.2.2 果蝇发育历期培养基配制 卵对环境的敏感性更高, 对铜离子毒性的耐受性更小, 在用 3 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 探究后代的情况时发现不利于后代的发育和存活, 于是降低浓度寻找适合后代生长的浓度。将 1.2 mmol 和 2.4 mmol CuSO₄ 分别加入玉米粉-酵母食物 (1 000 mL 水, 70 g 玉米粉, 50 g 蔗糖, 5 g 酵母粉, 15 g 琼脂), 搅拌加热成糊状, 将熬制好的培养基分装到小管中, 盖上瓶塞, 进行灭菌。

1.2.3 果蝇存活率的溶液配制 较低剂量的铜对果蝇没有致死作用, 而高剂量的铜才会显著影响果蝇的生存能力, 于是提高浓度探究铜离子对果蝇寿命的影响。将 12、24 和 36 mmol CuSO₄ 分别加入 5% 蔗糖溶液 (100 mL 水, 5 g 蔗糖), 煮沸, 取 200 μL 加入含滤纸片的小管中。

1.3 果蝇产卵选择性实验

1.3.1 果蝇产卵行为检测 选用中空透明圆柱体 (高度 80 mm, 直径 60 mm) 为产卵双向选择装置, 将用于果蝇产卵的培养皿嵌入圆柱体底部。将 25 头雌果蝇和 5 头雄果蝇放于装置中, 涂有酵母膏的葡萄汁琼脂板 (700 mL 水, 30 g 琼脂, 300 mL 葡萄汁, 50 g 蔗糖) 育肥果蝇 1-2 d, 且不用 CO₂ 麻醉果蝇, 直接换为双选择产卵培养

基, 分别统计产卵 8 h 后两侧食物培养基上卵的数量。实验重复 4 次。产卵指数 (OI) = (实验组卵数 - 对照组卵数) / (实验组卵数 + 对照组卵数) (高露等, 2019)。强迫产卵试验则是果蝇在含 3、5 和 6 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 培养基中饲养 8 h, 然后转移到正常培养基上产卵 8 h, 统计总产卵数, 单雌产卵量 = 总产卵数量 / 雌成虫个体数。

1.3.2 除去前足的果蝇产卵行为检测 解剖镊除去 OR 果蝇前足的 1/4, 使其部分味觉感受器丧失, 用涂有酵母膏的葡萄汁琼脂板育肥 24 h 后检测其产卵选择行为 (同 1.3.1 节)。实验重复 4 次。

1.3.3 除去触角的果蝇产卵行为检测 解剖镊除去 OR 果蝇触角, 使其部分嗅觉感受器丧失, 用涂有酵母膏的葡萄汁琼脂板育肥 24 h 后检测其产卵选择行为 (同 1.3.1 节)。实验重复 4 次。

1.4 果蝇毒理学实验

1.4.1 果蝇后代适合度的检测 用酵母膏育肥 1-2 d 果蝇后, 令其在葡萄汁琼脂板上产卵, 收集 8 h 内新产的卵, 将 30 粒卵放入含 0、1.2 和 2.4 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 食物的小管中饲养, 每日分别记录每组小管成蛹和成虫的数目 ($n=30$), 并分别记录成蛹时间 (卵产出至成蛹时间) 和成虫羽化时间 (卵产出至成虫羽化时间)。实验重复 4 次。 $T = (T_1 \times N_1 + T_2 \times N_2 + \dots + T_m \times N_m) / (N_1 + N_2 + \dots + N_m)$ (高露等, 2019), 其中 T 表示对应阶段发育历期, T_m 表示从产卵后到对应阶段的天数, N_m 表示第 T_m 天对应阶段的数目。存活率 = 成蛹或羽化的数目 / 30 × 100%。

1.4.2 果蝇存活率的统计 将果蝇成虫用 CO₂ 麻醉, 分别挑取 20 只雌、雄果蝇置于含不同浓度 CuSO₄ 溶液的小管中, 每天记录小管中果蝇数目 ($n=20$)。实验重复 4 次。存活率 = 果蝇存活的数目 / 20 × 100%。

1.4.3 果蝇运动能力的检测 运动能力实验采用玻璃量筒 (高度 35 cm) 和刻度吸管 (长度 26 cm) 分别测定果蝇的攀爬和奔跑能力 (赵璐等, 2020)。挑取雌性果蝇分别置于含 5% 蔗糖溶液 (对照组) 和 36 mmol·L⁻¹ CuSO₄-5% 蔗糖溶

液(实验组)的小管中,每组果蝇分为5管,每管20只,采用运动能力装置分别测定两组处理3 d后每管的攀爬速度和奔跑速度。实验重复4次。

1.4.4 果蝇肠道荧光染色 分别用5%蔗糖溶液, $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 -5%蔗糖溶液饲喂雌果蝇,2 d后解剖肠道,将其置于磷酸盐缓冲溶液中。室温下用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二氢乙锭(Dihydroethidium, DHE)染色30 min,然后用PBS洗涤样品,以及在4%多聚甲醛溶液中固定10 min,再用PBS洗涤样品,之后将肠道转移到载玻片上,封片剂封片,在荧光显微镜下采集图像并通过ImageJ软件对荧光强度进行定量分析(Li *et al.*, 2020)。

实验重复4次。

1.5 数据处理与分析

获得的数据以平均值 $\pm$ 标准误表示,采用SPSS软件对实验数据进行独立样本 t 检验分析(One-sample t -test, $P < 0.05$)。使用Graphpad和Adobe Illustrator软件制图。

2 结果与分析

2.1 铜离子对果蝇的产卵选择性

铜离子对果蝇产卵选择性的影响装置如图1(A)。结果显示,野生型OR果蝇品系对3、

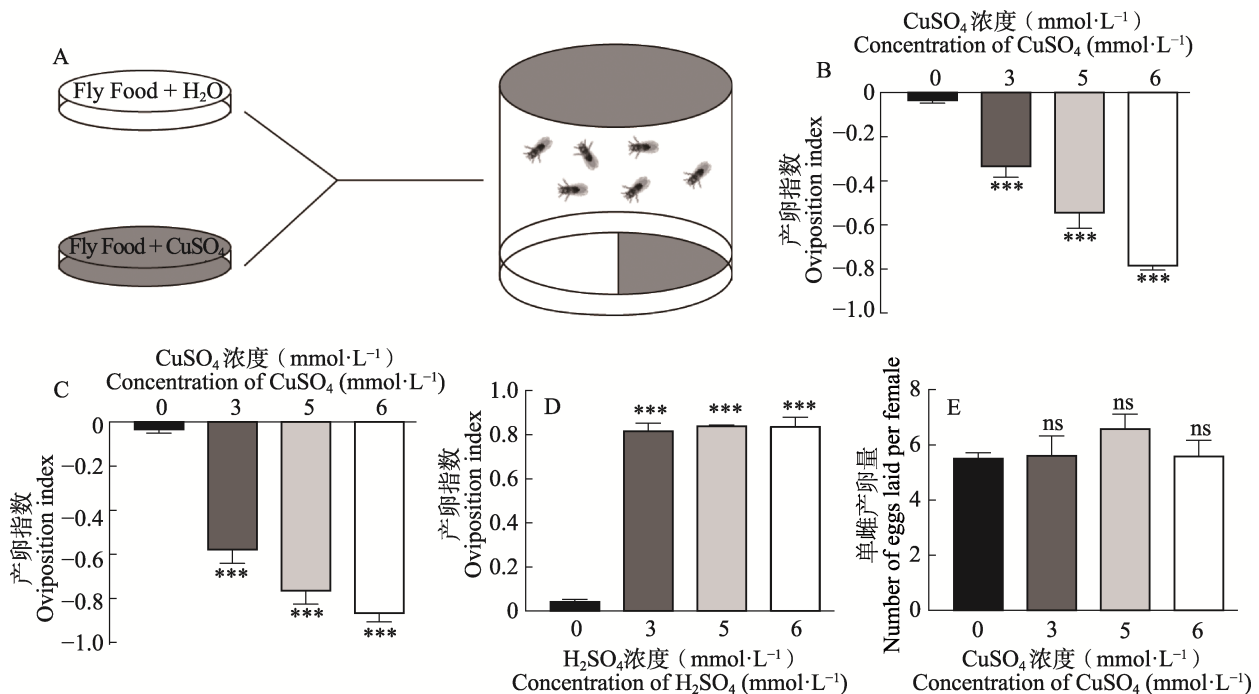


图1 铜离子对果蝇的产卵避性反应

Fig. 1 Oviposition avoidance of *Drosophila* to copper ion

A. 产卵选择行为试验装置; B. 野生型果蝇 Oregon R (OR) 分别在含 3、5 和 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的培养基上的

产卵偏嗜性; C. 野生型果蝇 Canton S (CS) 分别在含 3、5 和 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的培养基上的产卵偏嗜性;

D. 野生型果蝇 Oregon R (OR) 分别在含 3、5 和 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 的培养基上的产卵偏嗜性;

E. CuSO_4 对雌果蝇产卵能力的影响。产卵指数 (OI) = (实验组卵数 - 对照组卵数) / (实验组卵数 + 对照组卵数)。

图中数据为平均值 $\pm$ 标准误, ns 表示 $P > 0.05$; *** 表示 $P < 0.001$ (单样本 t 检验)。下同。

A. A test device of oviposition selection behavior; B. Oviposition preference of the wild type *Drosophila* Oregon R (OR) on the media containing 3, 5 and 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 ; C. Oviposition preference of the wild type *Drosophila* Canton S (CS) on the media containing 3, 5 and 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 ; D. Oviposition preference of the wild type *Drosophila* Oregon R (OR) on the media containing 3, 5 and 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 ; E. Effect of CuSO_4 on oviposition ability of female adults of *Drosophila*. Oviposition index (OI) = (Number of eggs in the experimental group - number of eggs in the control group) / (Number of eggs in the experimental group + number of eggs in the control group). Data in the figure are mean $\pm$ SE. ns indicates $P > 0.05$;

*** indicates $P < 0.001$ (One-sample t -test). The same below.

5 和 6 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 表现出明显的产卵避性 ($P<0.001$), 且随铜离子浓度增加而增大, 产卵指数 (Oviposition index, OI) 分别为 -0.33, -0.54 和 -0.78 (图 1: B)。同样地, 另一种野生型 CS 果蝇品系对铜离子也表现出产卵避性反应, 且避性反应高于 OR 果蝇, OI 分别为 -0.58, -0.77 和 -0.87 ($P<0.001$) (图 1: C)。以上结果说明, 铜离子对果蝇的产卵避性具有保守性。为排除 SO₄²⁻ 对果蝇产卵选择性的影响, 用等浓度硫酸作为对应刺激物, 结果显示, 果蝇对 3、5 和 6 mmol·L⁻¹ H₂SO₄ 有明显的产卵偏好性, OI 分别为 0.82, 0.84 和 0.84 ($P<0.001$) (图 1: D), 说明果蝇对 CuSO₄ 的产卵避性是由铜离子引起的。在强制性产卵实验中, 各浓度 CuSO₄ 处理组与对照组相比, 单雌产卵量无显著差异 ($P>0.05$) (图 1: E), 表明此浓度铜离子食物对果蝇产卵能力的影响可以忽略。

2.2 铜离子对果蝇产卵避性的机制

2.2.1 感觉系统介导铜离子对果蝇的产卵避性

果蝇通过多种感觉系统感知周围环境, 选择适宜后代的生存地点。本实验尝试寻找介导铜离子对果蝇产卵避性的感觉系统。结果显示, 黑暗处理组果蝇对 CuSO₄ 也产生了显著的避性反应, OI 分别为 -0.39, -0.59 和 -0.81, 且与对照组无明显差异 ($P>0.05$) (图 2: A), 表明视觉系统不介导铜离子对果蝇的产卵避性反应。果蝇的嗅觉感受器主要位于触角, 经外科手术切除嗅觉器官, 可致果蝇丧失嗅觉感知。结果显示, 切除触角的果蝇对不同浓度的 CuSO₄ 均表现出明显的避性反应, 3、5 和 6 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 的 OI 分别为 -0.69, -0.58 和 -0.92 (图 2: B), 表明嗅觉系统并没有在铜离子对果蝇的产卵避性中起决定性的作用。为进一步验证果蝇嗅觉不介导

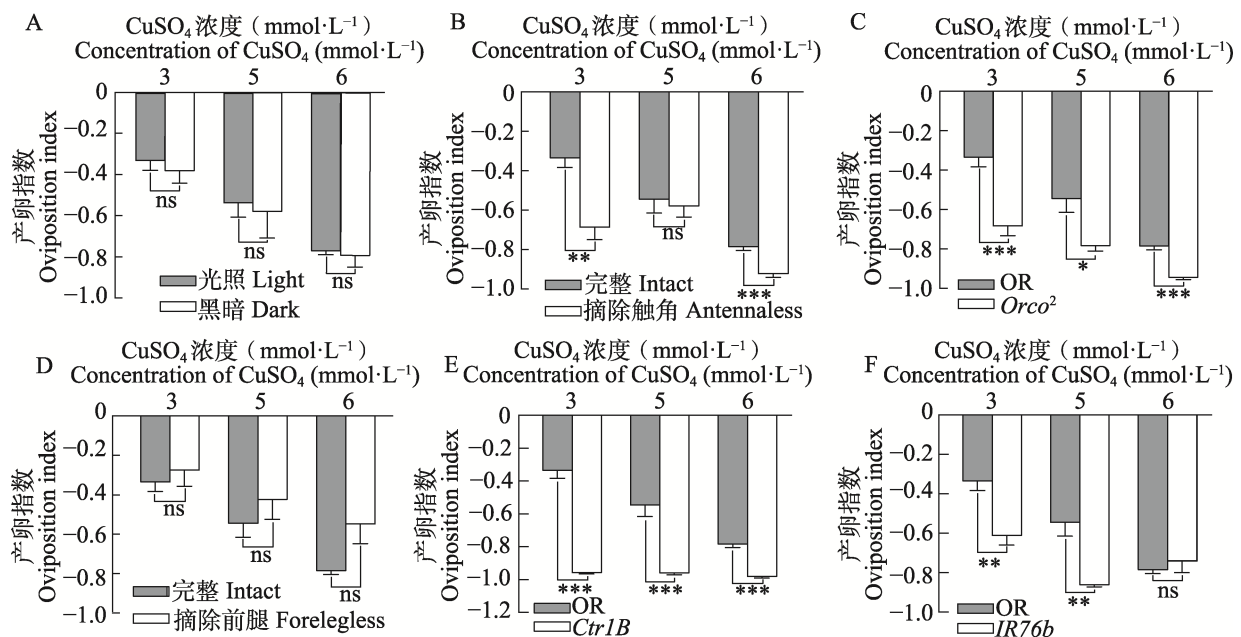


图 2 介导铜离子对果蝇产卵避性的感觉系统

Fig. 2 Sensory systems mediating on the oviposition avoidance of *Drosophila* to copper ion

- A. 黑暗条件不影响果蝇对铜离子产卵避性; B. 嗅觉不介导果蝇对铜离子产卵避性;
C. *Orco*² 突变体对铜离子有产卵避性; D. 味觉不介导果蝇对铜离子产卵避性;
E. *Ctr1B* 突变体对铜离子有产卵避性; F. *IR76b* 突变体对铜离子有产卵避性。

A. Darkness had no effect on the oviposition avoidance to copper ion in *Drosophila*; B. Olfaction didn't mediate the oviposition avoidance to copper ion in *Drosophila*; C. *Orco*² mutant had oviposition avoidance to copper ion; D. Gustation didn't mediate the oviposition avoidance to copper ion in *Drosophila*; E. *Ctr1B* mutant had oviposition avoidance to copper ion; F. *IR76b* mutant had oviposition avoidance to copper ion.

对铜离子的产卵避性,使用对大多数气味丧失感觉的嗅觉系统突变体 *Orco*² 为研究对象。数据显示, *Orco*² 突变体对铜离子的产卵避性与 OR 果蝇相比并没有降低 (图 2: C), 与上述触角摘除结果一致,说明嗅觉系统不介导铜离子对果蝇的产卵避性。果蝇足部末端存在味觉神经元,能够感受多种味觉刺激。数据表明,第一对前足末端摘除的果蝇对 3、5 和 6 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 的 OI 分别为 -0.27, -0.42 和 -0.55 (图 2: D), 与对照组无显著性差异 ($P>0.05$), 但产卵避性有减弱趋势。推测摘除果蝇第一对前足只损伤部分味觉神经元,其余部位的味觉仍然可以介导对铜离子的产卵避性。综述所得,推测味觉介导了铜离子对果蝇的产卵避性。

2.2.2 *Ctr1B* 不介导铜离子对果蝇的产卵避性 铜主要通过铜转运体 *Ctr1* 摄取到细胞内, *Ctr1B* 突变体降低对铜的摄入,应该对铜离子的避性反应减弱。但结果表明, *Ctr1B* 突变体的产卵避性相比 OR 果蝇并未减弱 (图 2: E), 所以

Ctr1B 不介导果蝇的产卵避性。

2.2.3 酸感受通路不介导铜离子对果蝇的产卵避性 CuSO₄ 是强酸弱碱盐,其水解溶液呈弱酸性。酸感受突变体 *IR76b* 对 CuSO₄ 产生了显著的避性反应 (图 2: F), OI 分别为 -0.61, -0.86 和 -0.74。与 OR 果蝇相比, *IR76b* 对铜离子的产卵避性反应并未减弱,说明果蝇不是通过硫酸铜的酸碱性的感受铜离子。

2.3 铜离子对果蝇后代的发育历期和存活率的影响

为提高后代存活率和促进后代生长发育,雌果蝇选择适合的环境产卵,因此检测铜离子对果蝇产卵适合度的影响。结果显示,随着 CuSO₄ 浓度增大,成蛹和成虫羽化时间逐渐延长,其中在 1.2 mmol·L⁻¹ 和 2.4 mmol·L⁻¹ CuSO₄ 时,成蛹时间分别比对照组延长了 1.9 d 和 2.5 d (图 3: A),成虫羽化时间比对照组均延长了 1.8 d (图 3: B),说明铜离子食物对果蝇的生长发育产生了毒害

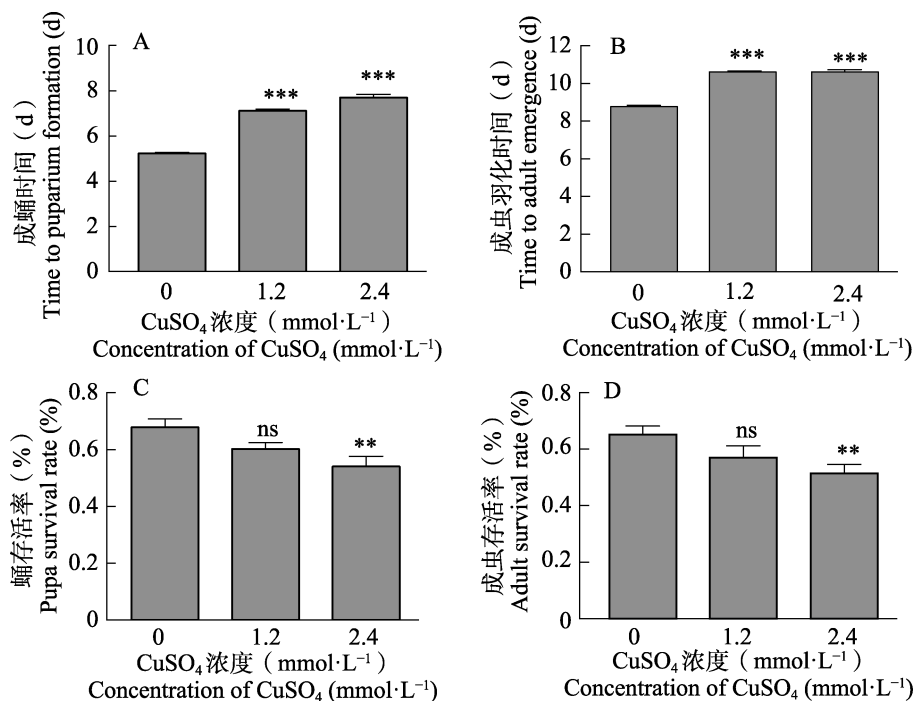


图 3 铜离子对果蝇后代发育历期和存活率的影响

Fig. 3 Effects of copper ion on the developmental timing and survival rate of *Drosophila* offspring

A, B. 铜离子延长后代成蛹和成虫羽化时间; C, D. 铜离子降低后代的存活率。

成蛹和成虫羽化时间均自初产卵开始计时。

A, B. Copper ion extended the time of pupa formation and adult emergence; C, D. Copper ion reduced the survival rate of offspring. Time to puparium formation and adult emergence was calculated from the beginning of spawning.

作用。为进一步探究铜离子对果蝇生长发育的毒性,本实验又检测了蛹和成虫的存活率。数据表明,蛹和成虫的存活率随铜离子浓度的升高逐渐下降。当浓度为 $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蛹和成虫的存活率下降至 60.3% 和 57.0%,与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$);而当浓度为 $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蛹和成虫的存活率下降至 54.1% 和 51.9% (图 3: C, D),与对照组有显著差异 ($P < 0.01$),表明铜离子会降低后代适合度。

2.4 铜离子对果蝇寿命和运动能力的影响

将 20 只雌、雄果蝇分别置于含有不同浓度 CuSO_4 -蔗糖溶液的小管中,以检测铜离子对亲代果蝇寿命和运动能力的影响。结果显示,果蝇存

活率随着 CuSO_4 浓度的增加而呈现下降的趋势 (图 4: A, B)。第 4 天 $36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ 处理的雌果蝇存活率仅为 40%,而对照组为 100%;雄果蝇存活率仅为 3%,而对照组存活率为 98%。以上结果说明铜离子能缩短果蝇的寿命。为进一步探究铜离子对果蝇的毒性,又通过攀爬和奔跑实验检测果蝇的运动能力。数据表明,实验组的果蝇攀爬速度为 0.86 cm/s ,对照组速度为 1.48 cm/s ($P < 0.001$) (图 4: C),说明铜离子降低了果蝇的攀爬能力。果蝇在铜胁迫后奔跑速度为 0.68 cm/s ,对照组速度为 1.41 cm/s ($P < 0.001$) (图 4: D),说明铜离子降低了果蝇的奔跑能力。以上结果表明,铜离子也可导致亲代果蝇适合度的下降。

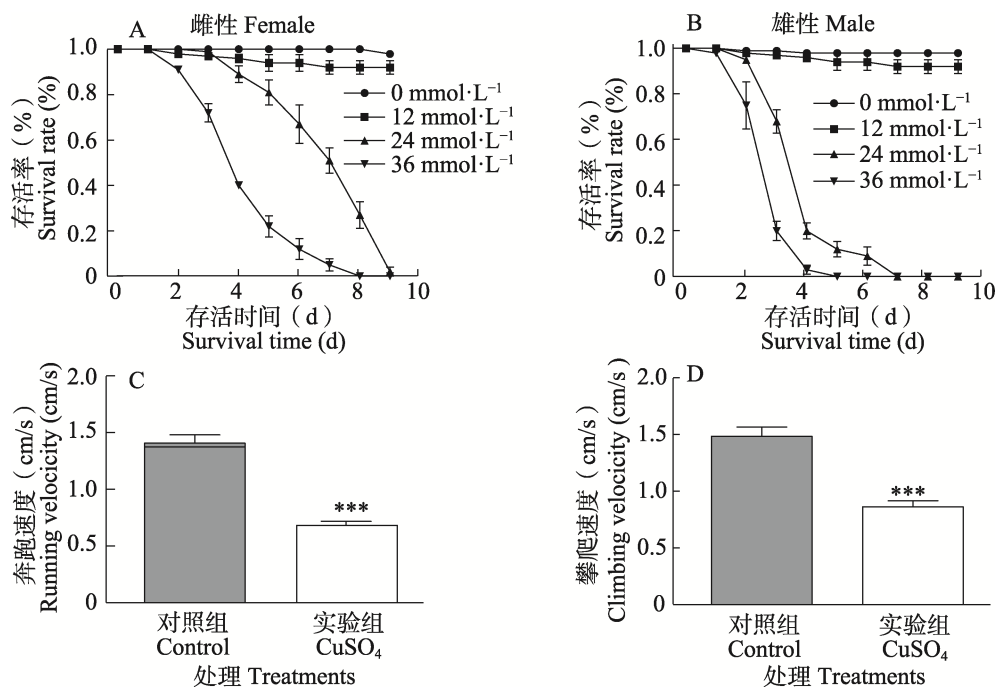


图 4 铜离子对果蝇寿命和运动能力的影响

Fig. 4 Effects of copper ion on the lifespan and locomotion of *Drosophila*

A, B. 铜离子缩短果蝇的寿命; C, D. 铜离子降低果蝇的运动能力。

A, B. Copper ion shortened the lifespans of *Drosophila*; C, D. Copper ion decreased the locomotion of *Drosophila*.

2.5 铜离子对氧化应激指标的影响

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 是体内一类氧的单电子还原产物,可激活氧化应激反应而导致果蝇死亡。为研究铜离子激发肠道中 ROS 产生,使用二氢乙锭 (DHE) 作为探针,

DHE 被氧化时会插入 DNA,发出红色荧光,进而检测活体果蝇肠道内 ROS 水平。结果显示,对照组肠道出现了低强度的荧光信号 (图 5: A),说明机体存在一定量的内源性 ROS。然而, CuSO_4 处理组肠道内荧光信号明显地增强,说明铜离子激发肠道内 ROS 产生。统计结果显示,

CuSO₄ 处理组的 ROS 荧光强度显著地高于对照组 (图 5: B), 进一步说明铜离子刺激肠道上皮细胞, 引起氧化应激反应。

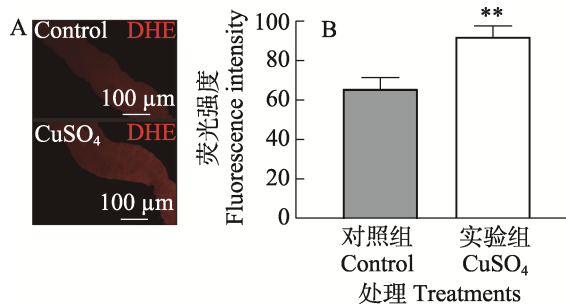


图 5 铜离子对果蝇肠道中 ROS 水平的影响
Fig. 5 The effects of copper ion on the levels of ROS in *Drosophila* guts

- A. 喂食 CuSO₄ 2 d 后果蝇肠道 DHE 染色, 比例尺 100 μm; B. 果蝇肠道 DHE 信号的定量分析。
A. The flies fed with CuSO₄ for 2 d were stained with Dihydroethidium(DHE), Scale bar: 100 μm;
B. Quantification of fluorescence intensity of DHE in the gut of *Drosophila*.

3 讨论

近年来, 人们越来越认识到铜对人体健康的重要性, 它已从一种在少数罕见情况下受影响的微量元素, 发展为在一些重要神经疾病中起至关重要作用的元素 (Navarro and Schneuwly, 2017), 适量摄取这种化学物质对于机体稳态平衡至关重要, 当使用产卵双向选择装置测量果蝇产卵选择性时 (Joseph *et al.*, 2009), 铜离子是理想的刺激物。产卵选择可检测果蝇幼虫和成虫对有毒化合物的喜恶, 本研究发现果蝇需要在复杂的自然环境中作出判断, 并选择合适的产卵地点, 以利于幼虫健康和生存; 相反, 如果产卵环境条件恶劣, 则产生避性反应, 即避开铜离子产卵 (图 1)。这种避性反应帮助果蝇避开铜离子这种有害物质, 促进后代发育, 提高后代蛹和成虫的存活率。果蝇通过不同的神经通路感知周围环境刺激, 如温度 (Ni *et al.*, 2016) 和水分 (Knecht *et al.*, 2017) 等, 从而有效地避开不利环境, 因此, 破译感知和应答的神经回路对于研究果蝇行为是至关重要的。研究发现, Ras/MAKP (Ras 蛋白/促分裂原活化蛋白激酶) 信号转导通路参

与生物体细胞增殖、分化和凋亡等过程, 而铜离子对激活此途径起重要作用 (Turski *et al.*, 2012)。铜离子处理后的果蝇存活率显著下降, 可能归因于过量的铜离子激活 Ras/MAKP 途径诱导细胞发生凋亡, 加速果蝇死亡, 同时伴随着运动能力的减退和生存能力的降低 (图 4), 验证了铜离子对果蝇生长发育的毒性, 解释了亲代避开铜离子产卵的原因。另有研究表明, 棕尾别麻蝇幼虫经高浓度铜离子处理后, 体内抗氧化酶的活力受到明显抑制, 且抑制程度呈浓度梯度效应 (王慧等, 2006)。在高浓度铜离子环境下, 果蝇幼虫发育迟缓且存活率降低 (图 3), 进一步说明铜胁迫对果蝇生长发育有毒理作用, 推测重金属铜抑制抗氧化酶的活力, 清除氧自由基的能力被减弱, 最终抑制幼虫的代谢和生长发育, 延长其发育历期。而当果蝇受到外界刺激时, 可破坏肠道稳态, 激活免疫系统保护机体 (胡启豪等, 2019), 肠道功能屏障是一个很好的预测指标, 活性氧 (ROS) 是一种肠道烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶, 当铜胁迫作用于机体时, ROS 相对表达量增加 (图 5), 可迅速激活机体的免疫系统应答外界刺激, 有效抵御铜毒力的冲击, 同时氧化应激也可能是铜离子诱导果蝇毒性的主要原因之一。

由于幼虫的活动能力受限, 雌果蝇需要利用多种感官系统综合判断环境中的一些因素, 最终决定在最适宜的地点产卵。果蝇可通过视觉判断对后代不利的因素, 如看到胡蜂产卵行为的改变 (Kacsoh *et al.*, 2013)。果蝇还可依靠嗅觉在刺激气味环境中躲避潜在的危险 (Larter *et al.*, 2016)。本实验通过对果蝇器官的筛选, 证明视觉和嗅觉系统不介导果蝇对铜离子的产卵避性。此外, 味觉系统在感受环境中有害信号过程中起着非常关键的作用, 果蝇的附骨和唇瓣均含有味觉感受器, 可以与食物进行初步接触, 避开有害物质 (Ling *et al.*, 2014)。本研究结果表明摘除前足的果蝇部分味觉缺失, 与对照组相比无显著性差异, 但产卵避性有减弱趋势。有研究发现, 果蝇通过激活感知苦味的神经元来避免在铜离子食物上产卵, 味觉回避机制为抵御铜胁迫提供

了第一道防线(Xiao *et al.*, 2022), 本结果与之一致。同样有研究显示, 人类苦味受体 TAS_{2R7} 可作为金属阳离子传感器介导铜离子的味觉属性 (Wang *et al.*, 2019), 然而果蝇以味觉某一种离子通道感知铜离子并作出反应, 其机制还不甚清楚, 有待进一步研究。

综上, 本研究报道了铜离子会引起果蝇产卵避性以及铜胁迫对果蝇生长发育的毒理作用, 具有潜在的应用价值, 也可为环境改良提供一定的科学依据。然而在机制上, 果蝇细胞在铜离子作用下应激基因的表达及其表达量的变化, 仍需要进一步的探究, 或许能进一步解析果蝇分子病理学与其行为之间的关系。

参考文献 (References)

- Brewer GJ, 2010. Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Chem. Res. Toxicol.*, 23(2): 319–326.
- Danks DM, 1988. Copper deficiency in humans. *Annu. Rev. Nutr.*, 8: 235–257.
- Dong X, 2020. Comparative analysis of insect diversity in heavy metal polluted areas. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 41(4): 117–120. [董鑫, 2020. 重金属污染地区昆虫多样性比较分析. 四川林业科技, 41(4): 117–120.]
- Gamakaranage CS, Rodrigo C, Weerasinghe S, Gnanathanan A, Puvanaraj V, Fernando H, 2011. Complications and management of acute copper sulphate poisoning: A case discussion. *J. Occup. Med. Toxicol.*, 6(1): 34.
- Gao L, Li Z, He XY, Gan Y, Jin HY, Yan Q, Bai P, Liu W, 2019. Oviposition avoidance of *Drosophila melanogaster* to high salt and its biological significance. *Acta Entomol. Sin.*, 62(1): 73–81. [高露, 李钊, 赫晓媛, 甘颖, 金虹云, 闫琴, 白芃, 刘威, 2019. 黑腹果蝇对高盐的产卵避性反应及其生物学意义. 昆虫学报, 62(1): 73–81.]
- Gitlin N, 1998. Wilson's disease: The scourge of copper. *J. Hepatol.*, 28(4): 734–739.
- Hu QH, Lu YZ, Yu XQ, 2019. Advances in research on the innate immune system of *Drosophila melanogaster*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(5): 947–956. [胡启豪, 卢玉珍, 余小强, 2019. 黑腹果蝇先天免疫研究进展. 应用昆虫学报, 56(5): 947–956.]
- Joseph RM, Devineni AV, King IF, Heberlein U, 2009. Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(27): 11352–11357.
- Kacsoh BZ, Lynch ZR, Mortimer NT, Schlenke TA, 2013. Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science*, 339(6122): 947–950.
- Knecht ZA, Silbering AF, Cruz J, Yang L, Croset V, Benton R, Garrity PA, 2017. Ionotropic receptor-dependent moist and dry cells control hygro-sensation in *Drosophila*. *Elife*, 6: e26654.
- Larter NK, Sun JS, Carlson JR, 2016. Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins. *Elife*, 5: e20242.
- Li Y, Bai P, Wei L, Kang R, Chen L, Zhang M, Tan EK, Liu W, 2020. Capsaicin functions as *Drosophila* ovipositional repellent and causes intestinal dysplasia. *Sci. Rep.*, 10(1): 9963.
- Li YP, Ge F, 2010. Effect of prey stress from *Propylea japonica* on development and fecundity of *Drosophila melanogaster* in successive three generations. *Entomological Knowledge*, 47(1): 139–145. [李燕平, 戈峰, 2010. 龟纹瓢虫的捕食胁迫作用对连续三代果蝇发育与繁殖的影响. 昆虫知识, 47(1): 139–145.]
- Ling F, Dahanukar A, Weiss LA, Kwon JY, Carlson JR, 2014. The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 34(21): 7148–7164.
- Liu L, Xia Q, 2016. Research progresses about the effect of copper pollution on the growth and reproduction of insects. *Journal of Environmental Entomology*, 38(2): 451–456. [柳琳, 夏婧, 2016. 铜污染对昆虫生长发育及繁殖影响的研究进展. 环境昆虫学报, 38(2): 451–456.]
- Liu W, Jiang F, Bi X, Zhang YQ, 2012. *Drosophila* FMRP participates in the DNA damage response by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.*, 21(21): 4655–4668.
- Liu W, Zhang K, Li EH, Xu HZ, Zhang C, 2017. *Escherichia coli* alters the oviposition preference in *Drosophila*. *Acta Entomol. Sin.*, 60(2): 173–179. [刘威, 张珂, 李恩惠, 徐皓哲, 张策, 2017. 大肠杆菌改变果蝇产卵偏嗜性. 昆虫学报, 60(2): 173–179.]
- Navarro JA, Schneuwly S, 2017. Copper and Zinc Homeostasis: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Front Genet*, 8: 223.
- Ni L, Klein M, Svec KV, Budelli G, Chang EC, Ferrer AJ, Benton R, Samuel AD, Garrity PA, 2016. The ionotropic receptors IR21a and IR25a mediate cool sensing in *Drosophila*. *Elife*, 5: e13254.
- Paris C, Geinguenaud F, Gouyette C, Liquier J, Lacoste J, 2007. Mechanism of copper mediated triple helix formation at neutral pH in *Drosophila* satellite repeats. *Biophys J.*, 92(7): 2498–2506.
- Richmond RC, Gerking JL, 1979. Oviposition site preference in *Drosophila*. *Behav. Genet.*, 9(3): 233–241.
- Song MM, Huang K, 2014. Biological function and application of

- copper. *Feed Review*, 1979(10): 13–17. [宋明明, 黄凯, 2014. 铜的生物学功能及其应用. 饲料博览, 1979(10): 13–17.]
- Tanner MS, Portmann B, Mowa AP, Williams R, Pandit AN, Mills CF, Bremner I, 1979. Increased hepatic copper concentration in Indian childhood cirrhosis. *Lancet*, 313(8128): 1203–1205.
- Turski ML, Brady DC, Kim HJ, Kim BE, Nose Y, Counter CM, Winge DR, Thiele DJ, 2012. A novel role for copper in Ras/mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol. Cell Biol.*, 32(7): 1284–1295.
- Tylko G, Banach Z, Borowska J, Niklińska M, Pyza E, 2005. Elemental changes in the brain, muscle, and gut cells of the housefly, *Musca domestica*, exposed to heavy metals. *Microsc. Res. Tech.*, 66(5): 239–247.
- Vesterberg A, Rizkalla R, Fitzpatrick MJ, 2021. Environmental influences on for-mediated oviposition decisions in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.*, 35(3): 262–273.
- Wang H, Wu GX, Ye GY, Hu C, Cheng JA, 2006. Accumulation of cuprum and cadmium and their effects on the antioxidant enzymes in *Boettcherisca peregrina* exposed to cuprum and cadmium. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 32(1): 77–81. [王慧, 吴国星, 叶恭银, 胡萃, 程家安, 2006. 铜和镉在棕尾别麻蝇体内的累积及其对三种抗氧化酶活性的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 32(1): 77–81.]
- Wang Y, Zajac AL, Lei W, Christensen CM, Margolskee RF, Bouysset C, Golebiowski J, Zhao H, Fiorucci S, Jiang P, 2019. Metal ions activate the human taste receptor TAS_{2R7}. *Chem. Senses*, 44(5): 339–347.
- Wang YH, Li BT, Tang LM, 2014. Effects of copper stress on the growth and reproduction of *Ostrinia furnacalis* Guenée. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(3): 473–481. [王玉宏, 李保同, 汤丽梅, 2014. 铜胁迫对亚洲玉米螟生长发育与生殖的影响. 中国农业科学, 47(3): 473–481.]
- Xia Q, Zhu W, Liao Y, Yu GH, Fang X, Du LF, 2014. Migration of Cu²⁺ in black soldier flies and its effects on the development. *Journal of Zunyi Medical University*, 37(3): 300–303. [夏婧, 朱伟, 廖业, 喻国辉, 方旭, 杜联峰, 2014. Cu²⁺在黑水虻体内迁移及对其发育影响. 遵义医学院学报, 37(3): 300–303.]
- Xiao S, Baik LS, Shang X, Carlson JR, 2022. Meeting a threat of the Anthropocene: Taste avoidance of metal ions by *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 119(25): e2204238119.
- Yang CH, Belawat P, Hafen E, Jan LY, Jan YN, 2008. *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science*, 319(5870): 1679–1683.
- Zamberlan DC, Halmenschelager PT, Silva LFO, da Rocha JBT, 2020. Copper decreases associative learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *Sci. Total Environ.*, 710: 135306.
- Zhao L, Hua L, Bai P, Liu J, Zhang Y, Guo M, Liu W, 2020. Intestinal microbiota aggravates the salt stress response in *Drosophila melanogaster*. *Microbiology China*, 47(6): 1867–1875. [赵璐, 花蕾, 白芃, 刘静, 张勇, 郭敏, 李钊, 刘威, 2020. 肠道微生物群加重黑腹果蝇盐胁迫反应. 微生物学通报, 47(6): 1867–1875.]