外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱营养生理与免疫应答的影响*

邱俊洪[1, 2**] 刘文姗[1] 高 韩[1] 欧 达[1] Bugenimana Eric Derrick[3]
Marguerite Mukangango[3] 邱宝利[1, 2] 张利荷[1***]

（1. 活性物质生物技术教育部工程研究中心，重庆师范大学生命科学学院，重庆 401331；
2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室，广州 510640；3. 卢旺达大学农牧学院，基加利 999051）

摘 要 **【目的】** 探讨外源 *Wolbachia* 注入对于柑橘木虱 *Diaphorina citri* 营养与免疫应答的影响，以明确 *Wolbachia*-营养代谢-免疫应答三者之间的互作关系，为今后研究利用 *Wolbachia* 防控柑橘木虱提供理论基础。**【方法】** 对柑橘木虱高龄若虫通过显微注射使其感染外源 *Wolbachia*，使用全自动氨基酸分析仪对柑橘木虱体内氨基酸含量、种类变化进行检测；利用 Diff-Quick 染色法、酶活检测试剂盒检测血细胞含量、溶菌酶活性。**【结果】** 外源 *Wolbachia* 感染后，处理组柑橘木虱体内游离氨基酸总量显著高于对照组种群（*P*=0.018 4），其中必需氨基酸含量无显著差异，而非必需氨基酸含量显著高于对照组种群（*P*=0.039 1）；氨基酸种类比较结果显示，处理组种群和对照组种群中均检测到了 31 种游离氨基酸，在 9 种必需氨基酸中，苏氨酸（Thr）在处理组种群中的比例显著低于对照组种群（*P*=0.013 2），22 种非必需氨基酸中，处理组种群 α-氨基己二酸（α-AAA）（*P*=0.028 4）、胱硫醚（Cysthi）（*P*=0.012 6）、甘氨酸（Gly）（*P*=0.042 9）和氨（NH_3）（*P*=0.035 2）4 种非必需氨基酸所占比例显著低于对照组种群。*Wolbachia* 感染 24 h 后，处理组血淋巴内的血细胞数量（*P*=0.047 1）、溶菌酶活性（*P*=0.013 2）显著高于对照组，但 48 h 后处理组与对照组体内血细胞数量、溶菌酶活性均有所下降，两者差异不显著。**【结论】** 外源 *Wolbachia* 的注入对柑橘木虱的营养生理产生了显著影响，导致体内游离氨基酸含量增加，苏氨酸、α-氨基己二酸、胱硫醚、甘氨酸及氨的比例降低；相反柑橘木虱通过激活免疫反应来增加血细胞含量和溶菌酶活性以适应外源 *Wolbachia* 感染，维持正常的生命活动。

关键词 沃尔巴克氏体；柑橘木虱；营养代谢；氨基酸；免疫应答

Effects of exogenous *Wolbachia* on the nutritional physiology and immune response of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*

QIU Jun-Hong[1, 2**] LIU Wen-Shan[1] GAO Han[1] OU Da[1] Bugenimana Eric DERRICK[3]
Marguerite MUKANGANGO[3] QIU Bao-Li[1, 2] ZHANG Li-He[1***]

(1. Engineering Research Center of Biotechnology for Active Substances, Ministry of Education, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510640, China; 3. College of Agriculture and Animal Husbandry, University of Rwanda, Kigali 999051, Rwanda)

Abstract **[Aim]** 1. To investigate the effect of exogenous *Wolbachia* injection on the nutritional and immune responses in Asian citrus psyllids (*Diaphorina citri*). 2. To clarify the relationship between *Wolbachia*, nutrient metabolism, and the

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点项目（U22A20481）；重庆市技术创新与应用发展专项重点项目（CSTB2024TIAD-KPX0015）；“十四五”广东省农业科技创新十大主攻技术项目（2023SDZG06）；重庆市研究生科研创新项目（CYS240359）

**第一作者 First author，E-mail：2023110513051@stu.cqnu.edu.cn
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：zhanglihe@cqnu.edu.cn

收稿日期 Received：2024-01-12；接受日期 Accepted：2024-03-03

immune response in *D. citri*. 3. To provide a theoretical basis for a sustainable *Wolbachia*-based control strategy for *D. citri*. **[Methods]** *D. citri* were microinjected with exogenous *Wolbachia*, and the amino acid content and species changes were detected in vivo using an automatic amino acid analyzer. Hemocyte content and lysozyme activity were analyzed using Diff-Quick staining and enzyme activity assays. **[Results]** The total amount of free amino acids in exogenous *Wolbachia* injected *D. citri* (EW) was significantly higher compared to the control population (P=0.018 4). There was no significant difference in the amount of essential amino acids between the EW and control populations. In contrast, the EW population had a significantly higher level of non-essential amino acids than the control population (P=0.039 1). Amino acid species comparison detected 31 free amino acids in both the EW and control populations. Of the 9 essential amino acids, the proportion of threonine (Thr) was significantly lower in the EW population than the control population (P=0.013 2). Of the 22 non-essential amino acids, α-amino adipic acid (α-AAA) (P=0.028 4), cystathionine (Cysthi) (P=0.012 6), glycine (Gly) (P=0.042 9), and ammonia (NH3) (P=0.035 2) levels were significantly lower in the EW population than the control population. The hemocyte quantities (P=0.047 1) and lysozyme activities (P=0.013 2) in the haemolymph of the EW population were significantly higher compared to the control population 24 h after *Wolbachia* infestation. There was a decline in hemocyte quantity and lysozyme activity in vivo in the EW and control populations after 48 h, with no significant difference between the two populations. **[Conclusion]** Injecting exogenous *Wolbachia* significantly affected the trophophysiology of *D. citri*, resulting in an increase in free amino acid content and a decrease in threonine, α-aminoadipic acid, cystathionine, glycine, and ammonia. In contrast, hemocyte content and lysozyme activity were increased through activation of the immune response, indicating *D. citri* is able to adapt to exogenous *Wolbachia* infestation and maintain its regular activities.

Key words *Wolbachia*; *Diaphorina citri*; nutritional metabolism; amino acids; immune response

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一种属于变形菌纲 Proteobacteria α 亚群立克次氏体目 Rickettsiales 的胞内次生共生菌，在自然界中广泛存在于节肢动物体内（Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008）。*Wolbachia* 的感染对宿主的生长发育、营养代谢与生殖等影响显著，例如在生殖方面引导宿主产生 4 种生殖表型，分别为雌化、孤雌生殖、杀雄以及胞质不相容（Duron *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Cordaux *et al.*, 2011; 李春芬, 2021）。除了生殖表型的调控，*Wolbachia* 感染还会影响宿主营养代谢、细胞凋亡以及免疫应答等方面。研究表明，*Wolbachia* 不仅能为宿主提供维生素 B 促进发育，还能通过增加卵巢中凋亡细胞的数量，以半胱天冬酶依赖性方式增强自身繁殖力并促进自身传播（Hosokawa *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2018）。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中，感染 *Wolbachia* *w*MelPop 株系会导致黑色素化水平升高，同时上调防御素、含硫酯蛋白（TEP）和 C 型凝集等免疫效应因子表达水平；在宿主卵发育过程中，也存在大量的细胞凋亡现象（Min and Benzer, 1997; Moreira *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2011; Zhukova and Kiseleva, 2012）。同种而携带不同株系 *Wolbachia* 的昆虫个体，在交配后产生的胞质不亲和（Cytoplasmic incompatibility, CI）机制为利用生物防治手段防控媒介昆虫提供了新的策略和视角（Xi *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2020），深入探讨共生关系机制，将有助于更有效地制定媒介昆虫的生物防治策略。

柑橘木虱 *Diaphorina citri*，属半翅目 Hemiptera 扁木虱科 Liviidae，是柑橘果树的重要农业害虫（Grafton-Cardwell *et al.*, 2013）。柑橘木虱的危害主要分为三种：一是柑橘木虱若虫和成虫能直接通过在寄主植物韧皮部吸取嫩芽汁液导致嫩芽、嫩梢枯干萎缩；二是当柑橘木虱种群数量较大时，若虫会分泌大量蜜露附着于嫩叶表面，最终引起寄主植物的煤污病，影响柑橘果树的光合作用（谢佩华等, 1989）；三是柑橘木虱作为传播柑橘黄龙病 *Candidatus* Liberibacter asiaticus（*C*Las）的重要载体昆虫，其传毒能力很强，而柑橘黄龙病则是柑橘产业毁灭性的危害（Bové, 2006; Grafton-Cardwell, 2013）。感染黄龙病后柑橘果树长势衰退、果

实品质降低，4-5 年内果树逐渐枯死，对整个柑橘产业造成巨大的经济损失。目前能够抵抗柑橘黄龙病菌侵染的果树品种极少，且因柑橘黄龙病菌无法体外培养研究而缺少绿色有效的防治手段（Andrade *et al.*, 2020），因此高效防控柑橘木虱是目前防治柑橘黄龙病的主要措施。

氨基酸是维持生命的基本组成部分，也是蛋白质合成中不可或缺的成分（Cohen, 2003; 杨宇菁, 2022），对许多细胞内的代谢途径包括 ATP 生成、核苷酸合成和氧化还原平衡，起到了关键的支持作用，从而确保细胞和生物体的正常功能（Kelly and Pearce, 2020; 孙少磊和靖湘峰, 2023）。除了参与蛋白质合成，氨基酸代谢对细胞功能有重要影响，特别是对免疫细胞代谢 （Buck *et al.*, 2017）。例如在 T 细胞中，L-精氨酸含量增加会诱导细胞代谢变化，进而影响细胞活性与增殖能力（Geiger *et al.*, 2016）。由于必需氨基酸无法在体内自主合成，摄入量不足可能会导致昆虫无法正常生长和发育（Wilkinson *et al.*, 2001）。同样地，在免疫应答过程中，非必需氨基酸也是细胞生长、增殖所必需的（Kelly and Pearce, 2020）。研究指出，糖酵解的关键酶丙酮酸激酶（PKM2）高度依赖于丝氨酸和甘氨酸。当丝氨酸不足时，巨噬细胞的活化会被抑制，其分解代谢也会受到抑制，导致线粒体呼吸受损、NADH 积累至有毒水平，进而抑制细胞的生长（Chaneton *et al.*, 2012; Minton *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020）。

另一方面，昆虫已经发展出强大的先天免疫系统来抵御自然界中的各种病原生物（Guo *et al.*, 2023）。其中，在免疫应答过程中，溶菌酶主要参与病原微生物检测、血细胞包囊作用等免疫反应（Zavalova *et al.*, 2006; Zdybicka-Barabas and Cytrynska, 2013）。溶菌酶通过催化 N-乙酰胞壁酸（NAM）和 N-乙酰氨基葡萄糖（NAG）之间的 β-糖苷键的水解发挥杀菌活性，可以预防多种细菌、病毒、真菌的侵染（温赛等, 2015; Ragland and Criss, 2017; Kawai *et al.*, 2018）。值得注意的是，谷氨酸、天冬氨酸和色氨酸是溶菌酶发挥杀菌活性的必需氨基酸，改变这些活性位点的必需氨基酸会导致抗菌活性丧失（Phillips, 1966; Ibrahim *et al.*, 2001; 陈艳等, 2009）。在血淋巴中溶菌酶通过激活 T 淋巴细胞来调节机体的免疫反应，去除其中的血细胞后，溶菌酶的活性显著降低（Chu *et al.*, 1992; Sahoo *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2017）。此外，溶菌酶能够增加肠道上皮细胞数量、激活 T 淋巴细胞和血清总蛋白等，发挥激活机体免疫反应、增强免疫屏障的作用（Lee *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2019）。因此，本研究认为，当外源 *Wolbachia* 被人为注入后，氨基酸、血细胞和溶菌酶三者之间存在既定的联系以共同抵抗外源微生物侵染。

本研究借助显微注射技术，通过全自动氨基酸分析仪、酶活检测、Diff-Quick 染色法来检测外源 *Wolbachia* 注入后对柑橘木虱体内营养代谢和免疫反应的变化，包括游离氨基酸含量、种类、血细胞数量以及溶菌酶活性，探究 *Wolbachia* 感染对于柑橘木虱营养代谢与免疫调节的影响，以期为柑橘木虱及黄龙病的生物防治提供新的理论基础与策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试植物 九里香 *Murraya exotica* 采购于广东省广州市荔湾区芳村龙溪大道广州花卉博览园。购回后，定期浇水、施肥，并进行修剪，待嫩梢抽出约 1-2 cm，用于实验。棉花 *Gossypium hirsutum*，品种名为“鲁棉研 32 号”，购于山东省潍坊市棉花研究中心。将棉花种子置于装有营养土的花盆（直径 15 cm）中，然后转移至干净的不锈钢养虫笼（60 cm × 60 cm × 60 cm）中，待棉花苗长至 6-8 叶期，用于实验。

1.1.2 供试虫源 以柑橘木虱为外源 *Wolbachia* 受体昆虫，采自广州市天河区五山路茶山小区绿化带九里香上，成虫采回岭南现代农业科学与技术广东省实验室后，套袋接入提前准备的九里香植株嫩梢上，置于养虫笼（60 cm × 60 cm × 90 cm）内继代饲养扩繁。前期研究表明该柑橘木虱品系体内共生菌 *Wolbachia* 感染率 100%，属于 *Wolbachia* B 大组的 con 亚组。

以烟粉虱 AsiaII7 隐种为外源 *Wolbachia* 供

体昆虫，原始种群 2015 年采自广州华南农业大学教学实习农场。前期研究表明该烟粉虱 AsiaII7 隐种体内共生菌 *Wolbachia* 感染率接近 100%，与柑橘木虱体内 *Wolbachia* 同属于 *Wolbachia* B 大组，且该株系 *Wolbachia* 的 CI 功能达到 63.55%，是作为外源 *Wolbachia* 开展柑橘木虱显微注射的最佳株系（Lü *et al*., 2021）。供试供体昆虫以无病虫的干净棉花为寄主植物，于温度（28±1）℃，湿度 70%-80%，光周期 14 L∶10 D 的培养箱（RXZ-500A，甬州乐电）中继代饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 *Wolbachia* 的人工显微注射　处理组：首先将双面胶带粘到载玻片上制备成粘贴板，在体视镜（Stemi，ZEISS）下将产卵 3 h 的烟粉虱卵挑出置于粘贴板并用卤代烃油 700 包裹，把 5 龄柑橘木虱若虫腹部朝上粘贴在粘贴板上。然后在烟粉虱卵的卵柄处抽取 10 nL 卵质注射入柑橘木虱若虫胸板与腹板间；对照组：通过显微注射向柑橘木虱 5 龄若虫胸板与腹板间注入 10 nL PBS 缓冲溶液。处理组与对照组每个处理设置 3 个生物学重复，每个重复 50 头若虫。注射后，将若虫接到干净的九里香嫩梢上饲养，24 和 48 h 后收集存活的柑橘木虱若虫进行后续实验。

1.2.2 柑橘木虱体内游离氨基酸提取及测定方法　柑橘木虱体内游离氨基酸提取方法参照 Pan 等（2013）和 Zhang 等（2021b）的方法。收集注射外源 *Wolbachia* 处理组和注射 PBS 缓冲液对照组的柑橘木虱若虫样品，每个重复称取 40.00 mg 样品，保存在 1.5 mL 离心管中，将离心管置于液氮中快速冷冻，随后转移至冰上使用研磨仪（OSE-Y30，天根）充分研磨。向离心管中加入 1.5 mL ddH_2O，充分匀浆，在旋涡振荡器（QL-866，Qilinbeier）上振动 2 min，然后以 14 000 r/min 离心 10 min；得到 1 mL 上清液，与等体积的正己烷混合，然后以 14 000 r/min 离心 10 min（去脂肪），弃掉上清液，取 0.5 mL 下层液体，与等体积的磺基水杨酸混合，然后 10 000 r/min 离心 10 min（去蛋白），取 0.5 mL 上清液浓缩干燥得到干粉，加入 0.75 mL 的柠檬酸钠缓冲液复溶，然后用 0.22 μm 的滤膜过滤后，送往华南农业大学测试中心，利用全自动氨基酸分析仪（L-8900，日立）分析测定柑橘木虱体内的游离氨基酸。实验每个处理组包括 3 个独立的重复样品。

检测条件：柱温：程序变温；色谱柱：日立 855-4507 型；反应柱温 ：135 ℃；柠檬酸（锂）PF 缓冲液梯度洗脱；检测波长：570 nm+440 nm ；流速：洗脱泵 0.35 mL/min，衍生泵 0.30 mL/min；分析时间：148 min。标准品氨基酸图谱见图 1。

游离氨基酸由全自动氨基酸分析仪测定。各氨基酸的百分比按以下公式计算：各自氨基酸含量/总氨基酸含量×100%。采用 SPSS 19.0，并使用 *t* 检验在显著水平 $P<0.05$ 下比较差异。

1.2.3 外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内血细胞数量的影响　柑橘木虱 5 龄若虫的外源 *Wolbachia* 显微注射如 1.2.1 节所述。处理 24 和 48 h 后收集注射组柑橘木虱和对照组柑橘木虱若虫，在显微镜下用解剖剪剪断若虫的后足，用毛细吸管吸取 0.1 μL 血淋巴置于载玻片上。实验使用迪夫快速染色液（Bioss，Beijing，S0041）进行血细胞染色，首先将血淋巴溶液涂抹于载玻片上自然干燥后用甲醇固定 20 s，其次使用 Diff-Quik fixative 固定 20 s，再用 Diff-Quik Ⅰ和 Diff-Quik Ⅱ分别染色 10 s，使用 ddH_2O 洗去染料并在荧光倒置显微镜下观察统计血细胞数量。

1.2.4 外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内溶菌酶活性的影响　外源 *Wolbachia* 感染的柑橘木虱参照 1.2.1 节，以 PBS 缓冲液为空白对照，处理 24 和 48 h 后收集柑橘木虱若虫，按若虫体重（g）∶生理盐水（mL）=1∶15 的比例充分研磨，然后 10 000 r/min 4 ℃，离心 10 min，收集上清液待测。使用溶菌酶（LZM）测试盒（Sangon Biotech，Shanghai，D799854-0030）通过酶标仪（Synergy H1, Bio Tek, 美国）在 530 nm 波长下检测柑橘木虱体内的溶菌酶活性。

1.2.5 数据分析　所有数据均为 3 个独立的测量值所求得的平均值，并作为平均值±标准误（SE）。数据采用单因素方差分析之后以 Dunnett's *t* 检验进行组间比较分析。运用统计软

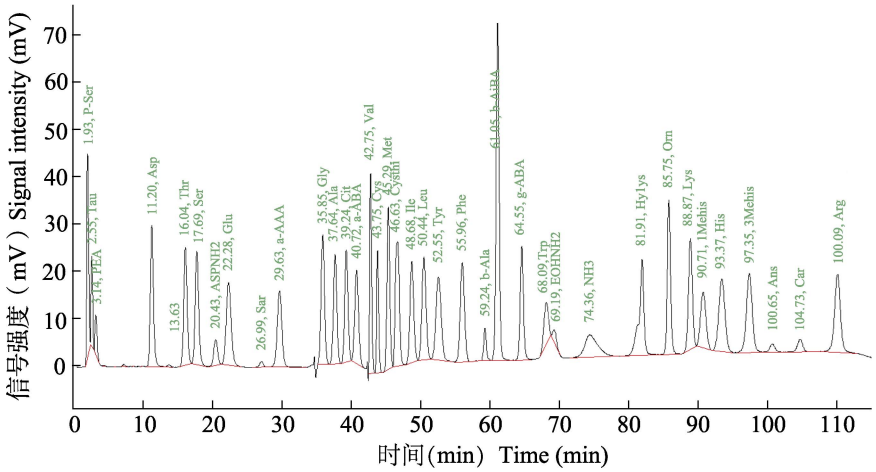

图 1　标准品的氨基酸图谱

Fig. 1　Amino acid map of standard substance

P-ser：磷酸丝氨酸；Tau：牛磺酸；PEA：磷酸乙醇胺；Asp：天冬氨酸；Thr：苏氨酸；Ser：丝氨酸；AspNH2：天冬酰胺；Glu：谷氨酸；Sar：肌氨酸；α-AAA：α-氨基己二酸；Gly：甘氨酸；Ala：丙氨酸；Cit：瓜氨酸；α-ABA：α-氨基丁酸；Val：缬氨酸；Cys：胱氨酸；Met：蛋氨酸；Cysthi：胱硫醚；Ile：异亮氨酸；Leu：亮氨酸；Tyr：酪氨酸；Phe：苯丙氨酸；β-Ala：β-丙氨酸；β-AiBA：β-氨基丁酸；γ-ABA：γ-氨基丁酸；Trp：色氨酸；EOHNH2：乙醇胺；NH3：氨；Hylys：羟赖氨酸；Orn：鸟氨酸；Lys：赖氨酸；1Mehis：1-甲基-组氨酸；His：组氨酸；3Mehis：3-甲基-组氨酸；Ans：鹅肌肽；Car：肌肽；Arg：精氨酸；Hypro：羟脯氨酸；Pro：脯氨酸。

件 SAS v.8.01 对实验数据进行分析，并采用 GraphPad Prism 5 软件作图。

2　结果与分析

2.1　外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内游离氨基酸含量的影响

通过对外源 *Wolbachia* 注入的处理组柑橘木虱和 PBS 对照组柑橘木虱体内氨基酸含量进行分析（图 2：A-C），可知人工外源注入 *Wolbachia* 后柑橘木虱体内游离氨基酸总量显著高于对照组种群（图 2：A，P=0.018 4）；其中，必须氨基酸含量无显著差异（图 2：B，P=0.379 5），但非必须氨基酸含量显著高于对照组种群（图 2：C，P=0.039 1）。

2.2　外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内游离氨基酸组分比例的影响

在外源 *Wolbachia* 注入的柑橘木虱种群和对照组中均检测到游离氨基酸，种类如图 3 所示。处理组种群和对照组种群中均检测到了 31 种游离氨基酸，其中检测到的必需氨基酸有 9 种，非必需氨基酸有 22 种（图 3）。在 9 种必需氨基酸中，处理组种群中苏氨酸（Thr）所占例显著低于对照组种群（P=0.013 2），其它 8 种必需氨基酸所占比例差异不显著（P>0.05）。22 种非必需氨基酸中，处理组种群中 α-氨基己二酸（a-AAA）（P=0.028 4）、胱硫醚（Cysthi）（P=0.012 6）、甘氨酸（Gly）（P=0.042 9）和氨（NH3）（P=0.035 2）这 4 种非必需氨基酸所占比例显著低于对照组种群，剩余 18 种非必需氨基酸均无显著差异（P>0.05）。

2.3　外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内血细胞数量的影响

外源 *Wolbachia* 注射柑橘木虱 24 h 后，柑橘木虱血淋巴内血细胞迪夫染色结果如图 4（A，B）所示，处理组柑橘木虱血淋巴内血细胞数量显著高于 PBS 缓冲液处理的对照组（图 5，P=0.047 1）；48 h 后两组木虱体内血细胞数量虽均有下降，但差异不显著（图 5，P=0.854 1）。上述结果表明，外源 *Wolbachia* 感染能够诱导柑橘木虱体内免疫细胞数量的升高，从而增强自身对外源物质的免疫响应。

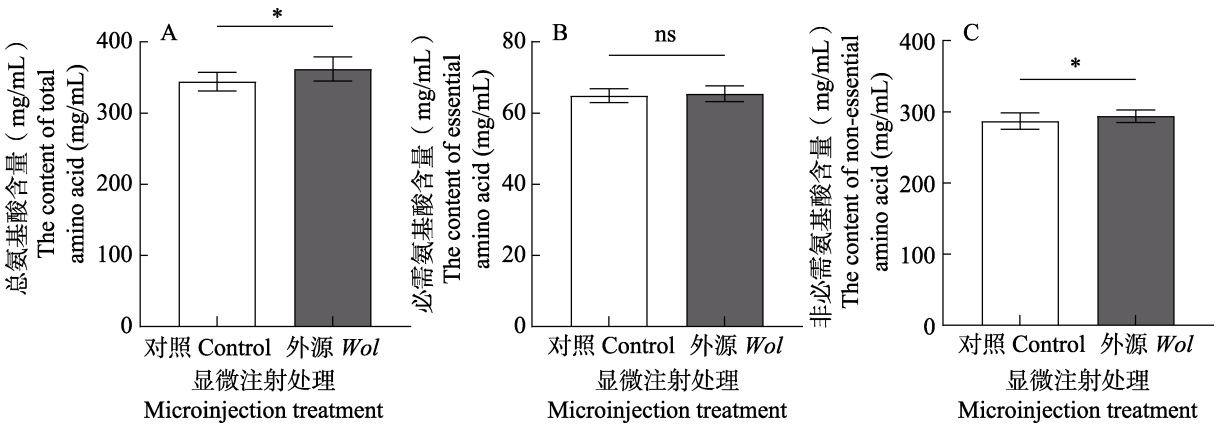

图 2　外源 *Wolbachia* 注入对柑橘木虱体内游离氨基酸含量的影响

Fig. 2　Effect of exogenous *Wolbachia* injection on the contents of free amino acids in *Diaphorina citri*

A. 外源 *Wolbachia* 注射 48 h 后柑橘木虱体内总氨基酸含量变化；B. 外源 *Wolbachia* 注射 48 h 后柑橘木虱体内必需氨基酸含量变化；C. 外源 *Wolbachia* 注射 48 h 后柑橘木虱体内非必需氨基酸含量变化。对照 Control：注射 PBS 缓冲液的对照组；外源 *Wol*：注射外源 *Wolbachia* 的处理组。ns 代表差异不显著（$P>0.05$，t 检验），*代表差异显著（$P<0.05$，t 检验）。下图同。

A. The changes in total amino acid content in *D. citri* after 48 h of exogenous *Wolbachia* injection; B. The changes in essential amino acid content in *D. citri* after 48 h of exogenous *Wolbachia* injection; C. The changes in non-essential amino acid content in *D. citri* after 48 h of exogenous *Wolbachia* injection. Control: PBS buffer-injected control group; Exogenous *Wol*: Exogenous *Wolbachia*-injected treatment group. ns represents no significant difference ($P>0.05$, t-test), * represents significant difference ($P<0.05$, t-test). The same below.

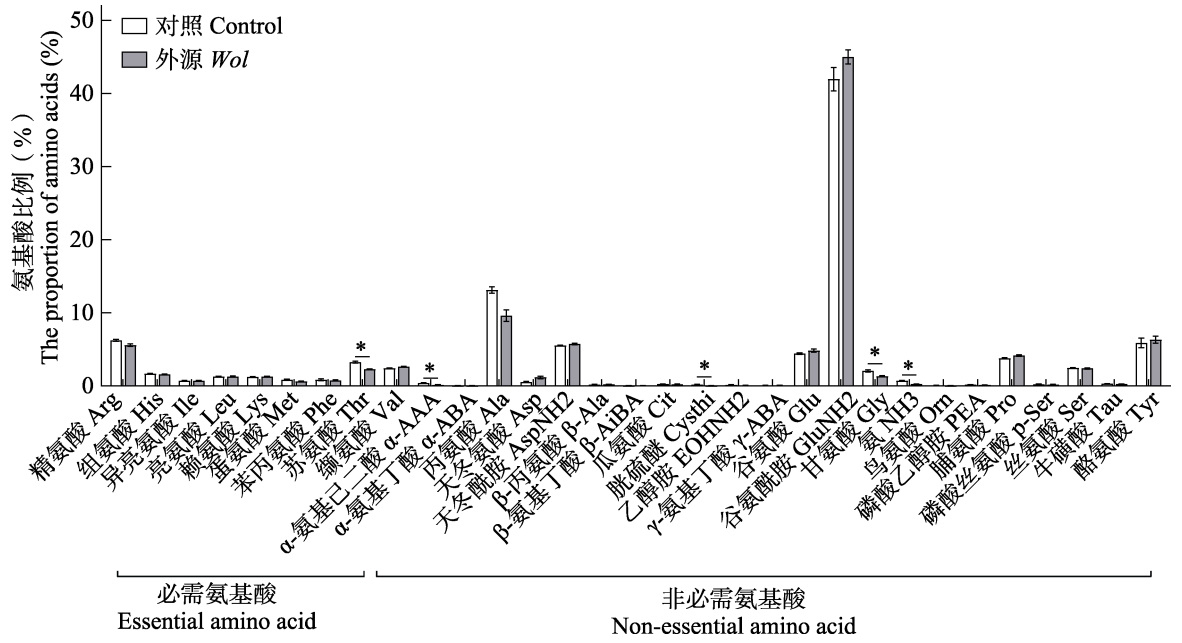

图 3　外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内游离氨基酸组分比例的影响

Fig. 3　Effects of exogenous *Wolbachia* injection on the proportion of different free amino acids in *Diaphorina citri*

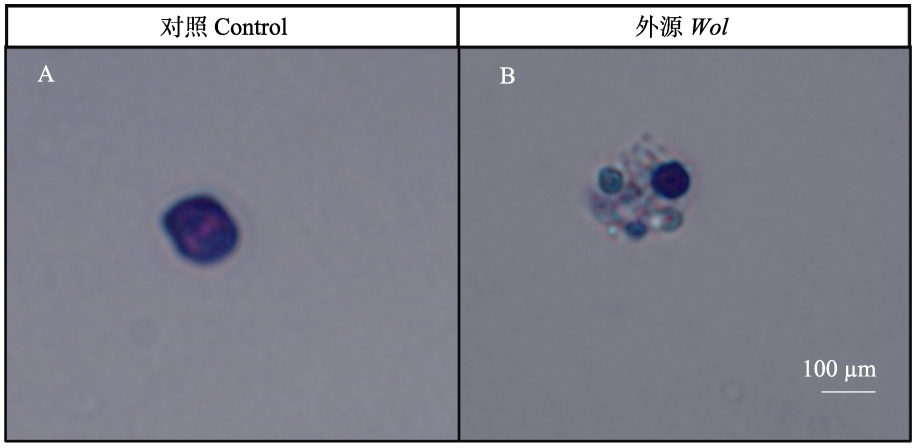

图 4　柑橘木虱血淋巴内血细胞迪夫染色图

Fig. 4　Diff staining schematic diagram of blood cell in haemolymph of *Diaphorina citri*

A. 对照组血细胞染色情况；B. 外源 *Wolbachia* 侵染后血细胞染色情况。图中深蓝色为粒细胞，紫色为类绛色细胞细胞。

A. Staining of blood cells in the control group; B. Staining of blood cells after introduction of exogenous *Wolbachia*. Dark blue is white blood cells and purple is lymphocytes in the figure.

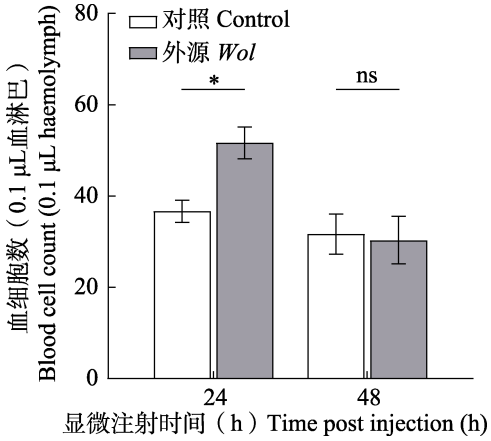

图 5　外源 *Wolbachia* 感染对柑橘木虱血细胞数量的影响

Fig. 5　Effect of exogenous *Wolbachia* infection on the blood cell count of *Diaphorina citri*

2.4　外源 *Wolbachia* 对柑橘木虱体内溶菌酶活性的影响

在注射外源 *Wolbachia* 24 h 后，处理组柑橘木虱体内溶菌酶活性明显高于对照组（图 6，P=0.013 2）；48 h 后处理组与对照组木虱体内溶菌酶活性均有下降，两者差异不显著（图 6，P=0.280 3）。结果表明，外源 *Wolbachia* 感染能够激活柑橘木虱的免疫反应，可以通过提高溶菌酶的活性增强自身免疫力，从而有效抵御外源物质的侵染。

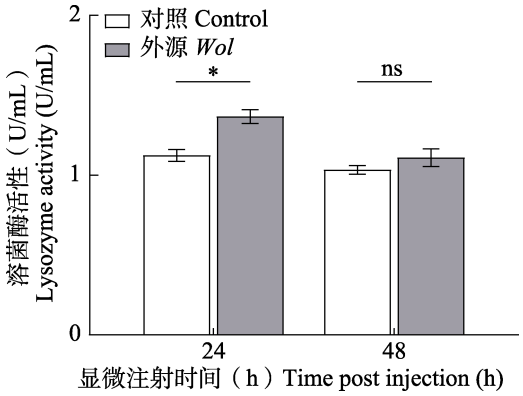

图 6　外源 *Wolbachia* 感染对柑橘木虱溶菌酶活性的影响

Fig. 6　Effect of exogenous *Wolbachia* infection on the lysozyme activity of *Diaphorina citri*

3　讨论

内共生菌 *Wolbachia* 具有胞质不相容性和可以稳定母系遗传的特征，是一种病媒害虫防控方面成熟且防治效果良好的潜在生物防治资源（Zheng *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2021a）。昆虫的发育和繁殖不仅与饮食质量有关，且与它

们自身对营养的利用效率有关（Sadras *et al.*, 2021）。在绿豆象 *Callosobruchus chinensis*、烟粉虱等农业害虫中均已发现 *Wolbachia* 感染影响寄主的营养代谢活动（Xie *et al.*, 2011; 吕宁, 2019），而关于 *Wolbachia* 对于柑橘木虱营养代谢的影响尚未明晰。本研究利用显微注射技术评价了外源 *Wolbachia* 感染对于柑橘木虱营养生理的影响。结果表明，注入外源 *Wolbachia* 的柑橘木虱体内游离氨基酸总量显著高于对照组种群，非必需氨基酸含量显著升高；进行氨基酸组分分析发现，虽然注射外源 *Wolbachia* 的柑橘木虱体内游离氨基酸总量升高，但是必需氨基酸中的苏氨酸（Thr）显著降低，非必需氨基酸中，α-氨基己二酸（α-AAA）、胱硫醚（Cysthi）、甘氨酸（Gly）和氨（NH_3）显著低于对照组。除了生殖表型的调控，*Wolbachia* 感染还会通过调节糖代谢和脂肪酸分解代谢导致宿主能量消耗增加，影响细胞氨基酸合成代谢途径和免疫应答反应（Zhang *et al.*, 2021a; Weyandt *et al.*, 2022）。因此，本研究认为 *Wolbachia* 感染导致柑橘木虱体内游离氨基酸总量升高，而苏氨酸、α-氨基己二酸、胱硫醚和甘氨酸的比例显著降低，这种变化是柑橘木虱在营养代谢方面对外源 *Wolbachia* 的一种应对反应。

早期研究发现，*Wolbachia* 感染能够上调寄主的免疫应答相关基因表达水平，并且异源病原微生物感染会被体内 IMD、Toll 信号通路识别，激活、诱导宿主先天免疫信号响应以保护宿主免受影响（Moreira *et al.*, 2009; Chevalier *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2023）。本研究通过对比外源 *Wolbachia* 注射与自然种群柑橘木虱体内血细胞含量和溶菌酶活性，探究外源 *Wolbachia* 感染对于柑橘木虱免疫反应的影响。Diff-Quick 染色结果显示，24 h 内外源 *Wolbachia* 侵染能够诱导体内免疫细胞数量的升高，而 48 h 后免疫细胞数量逐渐恢复正常水平；溶菌酶酶活结果与免疫细胞变化相似，24 h 时溶菌酶活性显著升高，而 48 h 时同样恢复正常水平。本研究认为外源 *Wolbachia* 注入后，导致柑橘木虱体内溶菌酶活性和血细胞数量增加，激活机体免疫应答进而保护机体免受病原物的危害。

研究表明，营养生理状况与免疫应答能力息息相关，营养缺乏时某些非特异性防御能力也有显著变化，当营养短暂供应不足的时候，为了防止氨基酸被不恰当消耗，机体通过储存氨基酸、诱导自噬反应进行从而维持正常生命活动（Puleston *et al.*, 2014; Pietrocola *et al.*, 2016）。必需氨基酸供应水平较高可以显著增加宿主的适应性，提高昆虫对有毒物质的抵抗能力（Chen *et al.*, 2020; 张云骅, 2022）。*Wolbachia* 感染黑腹果蝇和埃及伊蚊后通过影响氨基酸代谢、核黄素和嘧啶的合成抑制宿主对于外源微生物的免疫应答激活（Jiménez *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021a; Lindsey *et al.*, 2023）。综上，我们认为外源 *Wolbachia* 注入柑橘木虱 24 h，由于病原物定殖先消耗部分营养物质，导致体内蛋白质分解产生大量游离氨基酸，溶菌酶活性增强和血细胞含量增加以抵抗病原物侵染；48 h 时，营养短暂供应不足，导致苏氨酸、α-氨基己二酸、胱硫醚、甘氨酸和氨等重要氨基酸占比下降，某些非特异性防御能力和抗逆能力减弱，自噬反应导致血细胞数量下降，溶菌酶活性降低。

传统化学农药的不当使用带来的负面影响已为人们所熟知，生物防治已成为近些年来农林害虫可持续防控的研究核心与热点。*Wolbachia* 由于能调控寄主的营养代谢、生殖等进而控制寄主昆虫种群密度等，其生殖调控功能提出后被广泛应用于防治农业、林业、卫生害虫的生物防控中（Werren *et al.*, 2008），其中胞质不相容是国内外许多学者研究的热点。当感染 *Wolbachia* 的雄性与未感染或感染不相容 *Wolbachia* 的雌性交配时，会引起后代胚胎致死，以此达到种群控制的效果（Charlat *et al.*, 2004; Vala *et al.*, 2004）。有研究通过解析胞质不相容性因子（CifA 和 CifB）的空间结构，以毒素-抗毒素模型明确 CifA 与 CifB 结合是决定 CI 是否发生的关键（Xiao *et al.*, 2021）。在果蝇模型上，有研究认为 *Wolbachia* 是通过调节寄

主糖代谢和脂肪酸代谢等诱导氧化应激反应和线粒体异常最终导致 CI（Zhang *et al.*, 2021a）。本文通过研究外源 *Wolbachia* 引入后对于柑橘木虱营养生理及免疫应答的影响，可为后续探究柑橘木虱中胞质不亲和现象形成机制提供理论参考。同时，通过引入外源 *Wolbachia* 建立与自然界中可发生胞质不相容的柑橘木虱种群，有望用于控制自然界中柑橘木虱的种群数量，从减少病媒虫源的角度来阻断柑橘黄龙病菌传播，达到防控柑橘黄龙病的目的。

总之，本研究加深了外源 *Wolbachia* 感染对于柑橘木虱体内氨基酸代谢、免疫调节的理解，揭示出外源 *Wolbachia* 感染导致木虱体内氨基酸代谢异常，进而影响溶菌酶活性、血细胞含量变化以保护自身正常的生命活动，展示了昆虫体内 *Wolbachia*-氨基酸代谢-免疫应答三者互作领域的新视角。然而，氨基酸代谢的变化具体通过何种途径（糖酵解、衍生物合成、免疫信号通路）来激活免疫应答反应机制尚未明晰，今后还需要通过结合转录组、代谢组学的方法进一步验证。

4 结论

外源 *Wolbachia* 注入对柑橘木虱的营养生理产生了显著影响，其体内游离氨基酸含量增加，苏氨酸、α-氨基己二酸、胱硫醚、甘氨酸和氨比例降低；相反柑橘木虱通过激活免疫反应来增加血细胞含量、溶菌酶活性以适应外源 *Wolbachia* 感染，维持正常的生命活动。

参考文献 (References)

Andrade M, Li JY, Wang N, 2020. *Candidatus* Liberibacter asiaticus: Virulence traits and control strategies. *Tropical Plant Pathology*, 45(3): 285–297.

Bové JM, 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7–37.

Buck MD, Sowell RT, Kaech SM, Pearce EL, 2017. Metabolic instruction of immunity. *Cell*, 169(4): 570–586.

Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin ACL, Maddocks ODK, Chokkathukalam A, Coyle JE, Jankevics A, Holding FP, Vousden KH, Frezza C, O'Reilly M, Gottlieb E, 2012. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*, 491(7424): 458–462.

Charlat S, Ballard JWO, Merçot H, 2004. What maintains noncytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in their hosts: A case study from a natural *Drosophila yakuba* population. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(2): 322–330.

Chen BS, Zhang N, Xie S, Zhang XC, He JT, Muhammad A, Sun C, Lu XM, Shao YQ, 2020. Gut bacteria of the silkworm *Bombyx mori* facilitate host resistance against the toxic effects of organophosphate insecticides. *Environment International*, 143: 105886.

Chen Y, Jiang MF, Ye YH, Liu YT, Li SW, 2009. Advances in the study of lysozyme. *Journal of Biology*, 26(2): 64–66. [陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 刘勇涛, 李生伟, 2009. 溶菌酶的研究进展. 生物学杂志, 26(2): 64–66.]

Chevalier F, Herbinière-Gaboreau J, Charif D, Mitta G, Gavory F, Wincker P, Grève P, Braquart-Varnier C, Bouchon D, 2012. Feminizing *Wolbachia*: A transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiol*, 12: 1–18.

Chu CP, Kariyama R, Daneo-Moore L, Shockman GD, 1992. Cloning and sequence analysis of the muramidase-2 gene from *Enterococcus hirae*. *Journal of Bacteriology*, 174(5): 1619–1625.

Cohen AC, 2003. Insect Diets: Science and Technology. Chapter 3. New York: CRC Press. 23–24.

Cordaux R, Bouchon D, Grève P, 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics*, 27(8): 332–341.

Duron O, Hurst GDD, Hornett EA, Josling JA, Engelstädter J, 2008. High incidence of the maternally inherited bacterium *Cardinium* in spiders. *Molecular Ecology*, 17(6): 1427–1437.

Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng YH, Fuhrer T, Kogadeeva M, Picotti P, Meissner F, Mann M, Zamboni N, Sallusto F, Lanzavecchia A, 2016. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell*, 167(3): 829–842.

Gong JT, Li YJ, Li TP, Liang YK, Hu LC, Zhang DJ, Zhou CY, Yang C, Zhang X, Zha SS, Duan XZ, Baton LA, Hong XY, Hoffmann AA, Xi ZY, 2020. Stable Introduction of plant-virus-inhibiting *Wolbachia* into planthoppers for rice protection. *Current Biology*, 30(24): 4837–4845.

Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA, 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the

huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58: 413–432.

Guo LZ, Tang JB, Tang M, Luo SQ, Zhou X, 2023. Reactive oxygen species are regulated by immune deficiency and toll pathways in determining the host specificity of honeybee gut bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(33): e2219634120.

Guo Y, Hoffmann AA, Xu XQ, Zhang X, Huang HJ, Ju JF, Gong JT, Hong XY, 2018. *Wolbachia*-induced apoptosis associated with increased fecundity in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology*, 27(6): 796–807.

Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T, 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2): 769–774.

Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T, 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *Febs Letters*, 506(1): 27–32.

Jiménez NE, Gerdtzen ZP, Olivera-Nappa Á, Salgado JC, Conca C, Asgari S, 2019. A systems biology approach for studying *Wolbachia* metabolism reveals points of interaction with its host in the context of arboviral infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(8): e0007678.

Kawai Y, Mickiewicz K, Errington J, 2018. Lysozyme counteracts β-lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell*, 172(5): 1038–1049.

Kelly B, Pearce EL, 2020. Amino assets: How amino acids support immunity. *Cell Metabolism*, 32(2): 154–175.

Lee M, Kovacs-Nolan J, Yang CB, Archbold T, Fan MZ, Mine Y, 2009. Hen egg lysozyme attenuates inflammation and modulates local gene expression in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6): 2233–2240.

Li CF, 2021. The effect of *Wolbachia* on the growth and development and endocrine mechanism in *Hylyphantes graminicola*. Master dissertation. Wuhan: Hubei University. [李春芬, 2021. *Wolbachia* 对草间钻头蛛生长发育及内分泌机制的影响. 硕士学位论文. 武汉: 湖北大学.]

Lindsey AR, Parish AJ, Newton IL, Tennessen JM, Jones MW, Stark N, 2023. *Wolbachia* is a nutritional symbiont in *Drosophila melanogaster*. *Biorxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524972.

Lü N, 2019. Productive manipulation and interaction of endosymbiont *Wolbachia* and *Cardinium* in *Bemisia tabaci*. Doctor dissertation. Guangzhou: South China Agricultural University. [吕宁, 2019. 烟粉虱共生菌 *Wolbachia* 与 *Cardinium* 生殖调控功能及互作研究. 博士学位论文. 广州: 华南农业大学.]

Min KT, Benzer S, 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20): 10792–10796.

Minton DR, Nam M, McLaughlin DJ, Shin J, Bayraktar EC, Alvarez SW, Sviderskiy VO, Papagiannakopoulos T, Sabatini DM, Birsoy K, Possemato R, 2018. Serine catabolism by SHMT2 is required for proper mitochondrial translation initiation and maintenance of formylmethionyl-tRNAs. *Molecular Cell*, 69(4): 610–621.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu GJ, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL, 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 139(7): 1268–1278.

Pan HP, Su Q, Jiao XG, Zhou L, Liu BM, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Xu BY, Zhang YJ, 2013. Relative amount of symbionts in *Bemisia tabaci* (Gennadius) Q changes with host plant and establishing the method of analyzing free amino acid in *B. tabaci*. *Communicative & Integrative Biology*, 6(2): e23397.

Phillips DC, 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, 215(5): 78–90.

Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, Rao S, Enot DP, Baracco EE, Levesque S, Castoldi F, Jacquelot N, Yamazaki T, Senovilla L, Marino G, Aranda F, Durand S, Sica V, Chery A, Lachkar S, Sigl V, Bloy N, Buque A, Falzoni S, Ryffel B, Apetoh L, Di Virgilio F, Madeo F, Maiuri MC, Zitvogel L, Levine B, Penninger JM, Kroemer G, 2016. Caloric restriction mimetics enhance anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell*, 30(1): 147–160.

Puleston DJ, Zhang HL, Powell TJ, Lipina E, Sims S, Panse I, Watson AS, Cerundolo V, Townsend AR, Klenerman P, Simon AK, 2014. Autophagy is a critical regulator of memory $CD8^+$ T cell formation. *eLife*, 3: e03706.

Ragland SA, Criss AK, 2017. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*, 13(9): e1006512.

Sadras V, Vázquez C, Garzo E, Moreno A, Medina S, Taylor J, Fereres A, 2021. The role of plant labile carbohydrates and nitrogen on wheat-aphid relations. *Scientific Reports*, 11: 12529.

Sahoo NR, Kumar P, Bhushan B, Bhattacharya T, Dayal S, Sahoo M, 2012. Lysozyme in livestock: A guide to selection for disease resistance: A review. *Journal of Animal Science Advances*, 2: 347–360.

Sun SL, Jing XF, 2023. Research progress in protein-carbohydrate regulation in insects based on geometric framework model. *Acta Entomologica Sinica*, 66(5): 713–722. [孙少磊, 靖湘峰, 2023. 基于几何营养模型的昆虫蛋白质和碳水化合物调节

的研究进展. 昆虫学报, 66(5): 713–722.]

Thomas P, Kenny N, Eyles D, Moreira LA, O'Neill SL, Asgari S, 2011. Infection with the *w*Mel and *w*MelPop strains of *Wolbachia* leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3): 360–365.

Vala F, Egas M, Breeuwer JAJ, Sabelis MW, 2004. *Wolbachia* affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3): 692–700.

Villa TG, Feijoo-Siota L, Rama JLR, Ageitos JM, 2017. Antivirals against animal viruses. *Biochemical Pharmacology*, 133: 97–116.

Wen S, Liu HR, Xu DD, 2015. Advances in research on lysozyme and strategies for new antimicrobial activity. *China Biotechnology*, 35(8): 116–125. [温赛, 刘怀然, 续丹丹, 2015. 溶菌酶及其分子改造研究进展. 中国生物工程杂志, 35(8): 116–125.]

Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 741–751.

Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42: 587–609.

Weyandt N, Aghdam SA, Brown AMV, 2022. Discovery of early-branching *Wolbachia* reveals functional enrichment on horizontally transferred genes. *Frontiers in Microbiology*, 13: 867392.

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. *Journal of Experimental Biology*, 204(Pt 17): 3027–3038.

Xi ZY, Khoo CCH, Dobson SL, 2005. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*, 310(5746): 326–328.

Xiao YJ, Chen HL, Wang HF, Zhang MW, Chen X, Berk JM, Zhang LL, Wei Y, Li WL, Cui W, Wang FH, Wang QF, Cui C, Li T, Chen C, Ye S, Zhang L, Ji XY, Huang JH, Wang W, Wang ZF, Hochstrasser M, Yang HT, 2021. Structural and mechanistic insights into the complexes formed by *Wolbachia* cytoplasmic incompatibility factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(41): e2107699118.

Xie RR, Chen XL, Hong XY, 2011. Variable fitness and reproductive effects of *Wolbachia* infection in populations of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch in China. *Applied Entomology and Zoology*, 46(1): 95–102.

Xie PH, Su CA, Li ZG, 1989. Biological characteristics of Asian citrus psyllid. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 15(2): 198–202. [谢佩华, 苏朝安, 林自国, 1989. 柑桔木虱生物学研究. 浙江农业大学学报, 15(2): 198–202.]

Yang LF, Garcia Canaveras JC, Chen ZH, Wang L, Liang LF, Jang C, Mayr JA, Zhang ZY, Ghergurovich JM, Zhan L, Joshi S, Hu ZX, McReynolds MR, Su XY, White E, Morscher RJ, Rabinowitz JD, 2020. Serine catabolism feeds NADH when respiration is impaired. *Cell Metabolism*, 31(4): 809–821.

Yang YJ, 2022. Responses of *Sitobion avenae* to water-deficit stress and the underlying mechanisms. Doctor dissertation. Yangling: Northwest A and F University. [杨宇菁, 2022. 麦长管蚜对缺水胁迫的响应及机制. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]

Zavalova LL, Yudina TG, Artamonova II, Baskova IP, 2006. Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides. *Chemotherapy*, 52(3): 158–160.

Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M, 2013. Apolipophorins and insects immune response. *Invertebrate Survival Journal*, 10: 58–68.

Zhang HB, Cao Z, Qiao JX, Zhong ZQ, Pan CC, Liu C, Zhang LM, Wang YF, 2021a. Metabolomics provide new insights into mechanisms of *Wolbachia*-induced paternal defects in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 17(8): e1009859.

Zhang LH, Ren SL, Su ZQ, Xu PP, Ou D, Wang LJ, Sang W, Qiu BL, 2021b. Impact of Huanglongbing pathogen infection on the amino acid composition in both *Citrus* plants and the Asian citrus psyllid. *Frontiers in Physiology*, 12: 777908.

Zhang YH, 2022. Regulation mechanism of *Wolbachia* on the detoxification of *Nilaparvata lugens* (Stål). Doctor dissertation. Wuhan: Huangzhong Agricultural University. [张云骅, 2022. 共生细菌 *Wolbachia* 调控褐飞虱解毒代谢机制. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]

Zheng XY, Zhang DJ, Li YJ, Yang C, Wu Y, Liang X, Liang YK, Pan XL, Hu LC, Sun Q, Wang XH, Wei YY, Zhu J, Qian W, Yan ZQ, Parker AG, Gilles JRL, Bourtzis K, Bouyer J, Tang MX, Zheng B, Yu JS, Liu JL, Zhuang JJ, Hu ZG, Zhang MC, Gong JT, Hong XY, Zhang ZB, Lin LF, Liu QY, Hu ZY, Wu ZD, Baton LA, Hoffmann AA, Xi ZY, 2019. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*, 572(7767): 56–61.

Zhukova MV, Kiseleva E, 2012. The virulent *Wolbachia* strain *w*MelPop increases the frequency of apoptosis in the female germline cells of *Drosophila melanogaster*. *BMC Microbiol*, 12(Suppl 1): S15.

Zou LJ, Xiong X, Liu HN, Zhou J, Liu YH, Yin YL, 2019. Effects of dietary lysozyme levels on growth performance, intestinal morphology, immunity response and microbiota community of growing pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4): 1643–1650.