

Wolbachia 변이종 *Popcorn*이 초파리의 발육과 생식에 미치는 영향

Effect of *Popcorn*, *Wolbachia* Variant, on Development and Reproduction in *Drosophila melanogaster*

한상미 · 민경태¹ · 한명세² · 이상철

Sang Mi Han, Kyung-Tai Min¹, Myung Sae Han² and Sang Chul Lee

Abstract - *Wolbachia*, vertically transmitted bacterial endosymbionts, is known to induce cytoplasmic incompatibility (CI), parthenogenesis, or feminization in some insect species. The *Wolbachia* found to exist symbiotically as a non-virulent form in *Drosophila melanogaster*, however *popcorn* is a lethal strain of *Wolbachia*, which causes tissue degeneration and early death of its adult host. *Popcorn*-infected flies showed the delayed duration of an egg and larvae, and their pupal period and life span reduced. The oviposition and egg-hatching rate of *popcorn*-infected flies were decreased 15% and 80%, respectively, compared to those of the normal *Wolbachia*-infected flies. The pupation and emergence rates of *popcorn*-infected flies were 67% and 65%, respectively. When *popcorn*-infected flies were crossed with *Wolbachia*-infected flies, and *vice versa*, both crosses resulted in a significant reduction in egg production, egg-hatching, pupation, and emergence rate, and their progeny revealed the *popcorn* syndrome. When *popcorn*-infected male flies were crossed with uninfected females, *popcorn* was not detected in their progeny. *Popcorn* also maternally transmitted in flies, but it did not induce CI and affected on its host life cycle as a virulence.

Key Words - *Wolbachia*, *Popcorn*, *Drosophila melanogaster*

초 목 - *Wolbachia*는 몇몇 곤충류에 공생하는 세포내 공생세균으로서 수직 감염되며, 숙주의 세포질 불화합성, 단위생식, 자성화 등을 유도한다. 현재까지 알려진 *Wolbachia*는 비병원성이지만 돌연변이인 *popcorn*은 숙주인 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 수직 감염되어 성충의 조직괴사와 조기 사망 등의 병원성을 나타낸다. *Popcorn*에 감염된 초파리는 알과 유충 발육기간이 연장되고, 번데기 기간은 단축되는 경향을 보이며, 성충의 수명이 단축되었다. 또한 비병원성 *Wolbachia*에 감염된 경우보다 산란율은 15%, 부화율은 80% 수준으로 감소하였고, 용화율은 67%, 우화율은 65%에 불과하였다. *Popcorn*과 비병원성 *Wolbachia*간의 교배에서 감염된 초파리는 모두 산란수의 감소와 차대의 부화율, 용화율, 우화율 등의 감소를 초래하였으며, *popcorn*에 감염된 초파리의 특성을 나타냈다. *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리와의 교배에서 *popcorn* 감염 초파리가 수컷인 경우 *Wolbachia*가 검출되지는 않았다. 따라서 *popcorn*은 초파리에서 모체 전염되지만, 세포질 불화합성은 유도하지 않으며, 초파리의 초기발육의 지연, 생식의 저하, 성충수명의 단축을 야기하는 등 병원성을 나타냈다.

검색어 - *Wolbachia*, *Popcorn*, 초파리

생명공학연구소 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333)

¹ Neurogenetics Branch, NINDS, NIH, Bethesda, MD 20892 USA

² 경북대학교 곤충병리연구실 (Lab. of Insect Pathology, Kyungpook National University, Taegu 702-701)

생태계의 항상성 유지에 있어서 고등생물과 미생물 간의 공생관계는 일반적 현상이며, 숙주와 공생체간의 이해관계에 따라 상리공생, 편리공생, 그리고 기생의 3 가지 관점에서 볼 수 있다(Tanada and Kaya, 1992). 이들 공생체간의 전염경로가 수직적 (inheritance) 인가 또는 수평적 (infection) 인가에 따라 공생관계의 발전방향에 영향을 미친다. 따라서 공생 미생물의 전파방식과 전염력은 병원성을 좌우하게 된다(Hacker *et al.*, 1997).

초파리에 공생하는 세포내 공생 세균인 *Wolbachia*는 rickettsia의 한 속(屬)으로 숙주의 생식과정을 통하여 수직 감염되며, 세포질불화합성 (cytoplasmic incompatibility) 현상이 나타나는 비병원성으로 알려져 있다(Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999). 또한 등각류(等脚類)의 수컷은 *Wolbachia*에 의해 자성화(feminization)가 유도된다(O'Neill *et al.*, 1992; Bourtzis *et al.*, 1996; Giordano *et al.*, 1997). 세포질 불화합성은 딱정벌레 목, 파리 목, 매미 목, 벌 목, 나비 목 등의 곤충에서 많이 알려져 있고, 나비 목에서는 단위생식(parthenogenesis)을 유도하며, *Wolbachia*에 감염된 수컷과 감염되지 않은 암컷의 교배에서는 증식력이 향상된다(Giordano *et al.*, 1995).

최근에 초파리에서 발견된 *Wolbachia* 변이종인 *popcorn*은 수직 전파되지만, 숙주의 알이나 유충, 번데기에서는 특이한 병징이 나타내지 않으나, 성충의 난소뿐만 아니라 뇌, 근육, 망막에 감염 증식되어 조직 붕괴와 함께 조기 사망시키는 병원성을 보인다(Min and Benzer, 1997). 이러한 *popcorn*의 발견은 정상적인 공생 세균이 병원성으로 전환되는 기작을 연구할 수 있는 모델로서 큰 중요성을 갖고 있다.

본 연구는 *Wolbachia* 변이종인 *popcorn*에 감염된 초파리의 생존율 및 산란율을 조사하는 한편, 정상적인 *Wolbachia*종에 감염된 초파리간의 차이를 비교하고, 각 발육 단계별 기간 및 수명을 조사하였다. 또한 *popcorn* 및 *Wolbachia*에 감염된 초파리간의 교잡차대에서 병원균의 전달성과 병원력 검정을 통한 *popcorn*의 병리학적 상관관계를 규명하였다.

재료 및 방법

1. 실험 곤충

Wolbachia 변이종인 병원성 *popcorn*에 감염된 초파리(*Drosophila melanogaster*)와 비병원성인 *Wolbachia*에 감염된 초파리 및 대조구로 *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리를 실험실내에서 당밀배지로 25°C 항온기에서 암조건으로 누대사육하여 사육하였다.

2. 발육 기간 및 수명

우화 직후의 암 수 각 2마리씩을 당밀배지가 들어

있는 플라스틱 사육병(φ1.0×7 cm)으로 옮기고, 1시간 후 성충을 제거한 다음 2시간 간격으로 실체현미경 하에서 발육단계별 시간을 조사하였다. 한편, 초파리 성충은 우화 직후에 20마리씩을 플라스틱 사육병 내에서 사육하고, 24시간 간격으로 배지를 교체하며 수명을 측정하였다.

3. 교배 및 산란

Popcorn 감염 초파리, *Wolbachia* 감염 초파리, *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리간의 교배는 각기 3령 유충에서 용화 후 암 수를 구분하여 격리배양하고 우화 후 암컷 1마리와 수컷 2마리를 투입하여 교배하였다.

이를 위하여 번데기가 출현하는 시기에 성충을 모두 제거한 다음, 새로 우화된 개체를 암 수별로 구분하여 각기 1마리씩 당밀배지가 들어있는 플라스틱 사육병(φ1.0×7 cm)으로 옮겼다. 사육병 주위 전체를 여지로 쌓아주고, 매일 새로운 여지로 교환하면서 현미경하에서 교배 후에 산란수를 조사하였다.

4. 부화율 및 용화율, 우화율 조사

부화율은 암컷 1마리당 산란수를 조사한 후에 산란 7일째까지 부화되는 알 수를 기준으로 하였다.

용화율 및 우화율은 암 수 1마리씩 우화 직후에 새로운 사육병으로 옮기고, 6시간이 경과한 후 배지에서 제거한 다음, 3령 유충에서 발생하는 번데기의 수 및 번데기에서 발생하는 성충의 수를 매일 조사하였다.

5. 16S rRNA PCR 분석

초파리내에서 *Wolbachia* 존재를 확인하기 위하여 *Wolbachia* 16S rRNA의 유전자를 Polymerase Chain Reaction (PCR) 방법을 사용하여 증폭하였으며, *Wolbachia* 16S rRNA의 유전자에 특이한 primer를 사용하였다(O'Neill *et al.*, 1992). Template DNA는 초파리 성충 10마리를 STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 내에서 마쇄하여 proteinase K를 넣고 37°C에서 30분 동안 반응한 후 95°C에서 5분간 열처리하고, 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 사용하였다. 반응액은 Premix™-Taq (Takara, Korea)을 이용하고, PCR조건은 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C 1분 30초로 30 cycle 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 알 유충 및 번데기의 발육기간

사육온도 25°C에서 *popcorn*과 *Wolbachia*에 감염된 초파리, *Wolbachia*에 감염되지 않은 대조구 초파리의 알 유충 및 번데기 기간을 조사한 결과는 Table 1과

Table 1. Duration (hours) of egg, larva, and pupa of *Drosophila melanogaster* infected with *popcorn* and *Wolbachia*, and uninfected *Wolbachia*

<i>D. melanogaster</i>	Egg	Laval stage			Pupa	Total duration (days)
		1st instar	2nd instar	3rd instar		
<i>Popcorn</i> -infected	29±0.48	30±0.21	33±0.20	54±0.12	89±0.18	9.8
<i>Wolbachia</i> -infected	26±0.16	28±0.21	31±0.17	53±0.60	91±0.74	9.5
<i>Wolbachia</i> -uninfected	25±0.11	28±0.4	30±0.93	52±0.36	92±0.45	9.4

* All values are means±SE of 100 insects.

같다.

*Popcorn*에 감염된 초파리의 알 기간은 *Wolbachia* 감염 초파리 보다 3시간 정도 연장되었으며, 유충기간도 1령, 2령, 3령 유충에서 모두 1~2시간 연장되었다. 그러나 번데기 기간은 오히려 2시간 정도 단축되는 경향을 보였다.

부화 후 성충까지의 발육기간은 *popcorn* 감염 초파리가 9.8일 정도였고, 비병원성 *Wolbachia* 감염 초파리는 9.5일 이었다. *Wolbachia* 감염되지 않은 대조구의 9.4과 비교할 때 *popcorn* 및 *Wolbachia* 감염구에서는 발육기간의 연장이 인정되었다.

2. 산란수 및 부화율

Popcorn 감염 초파리의 총산란수는 158개로 *Wolbachia*에 감염된 초파리의 1,020개의 1/5에 불과하였다 (Table 2). 초파리의 평균수명을 고려한 1일 산란수를 비교했을 때, 평균수명이 10일인 *popcorn* 감염 초파리는 15.8개를 산란한 반면, 30일인 *Wolbachia* 감염 초파리는 34개를 산란하였다. 따라서 *popcorn*에 감염된 초파리는 1일 산란수에 있어서도 *Wolbachia* 감염 초파리의 46% 수준으로 감소하는 경향을 보였다. 그러나 *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리의 산란수가 790개로, 1일 산란수는 19.7개로서, *Wolbachia* 감염의 경우보단 산란율이 낮았다.

알의 부화율은 비감염 초파리 (92%)>*Wolbachia* 감염 (85%)>*popcorn* 감염 (68%) 등의 순서로서 *popcorn* 감염 초파리의 부화율이 현저하게 저하되었다 (Table 2). 그러나, 산란수와 부화율을 감안한 차대 유충의 수는 *Wolbachia* 감염 (867)>비감염 (726)>*popcorn* 감염 (107)의 우열관계가 인정되었다.

3. 용화 및 우화율과 성충 수명

*Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리의 평균 용화율은 87%로서, *Wolbachia*에 감염된 초파리의 85%와 큰 차이가 없으나, *popcorn*에 감염된 초파리는 67%의 유충만이 번데기로 되었다 (Fig. 1).

우화율에 있어서도 *Wolbachia*에 감염된 초파리는 91%, *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리는 92%로서

Table 2. Number of eggs and hatching ratio in *Drosophila melanogaster* infected with *popcorn* and *Wolbachia*, and uninfected *Wolbachia*

<i>D. melanogaster</i>	Number of eggs	Egg hatch (%)
<i>Popcorn</i> -infected	158±51	68±5.6
<i>Wolbachia</i> -infected	1,020±32	85±4.8
<i>Wolbachia</i> -uninfected	790±33	92±3.9

* All values are means±SE of 100 insects.

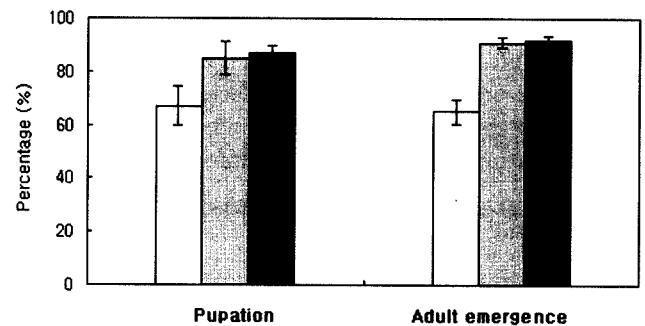


Fig. 1. Pupation ration and adult emergence *Drosophila melanogaster* with infected popcorn (□) and non-pathogenic *Wolbachia* (▨), and uninfected (■).

동등한 우화율을 보였으나, *popcorn* 감염 초파리 번데기는 66%만이 우화되었다 (Fig. 1). 난의 부화율 및 용화율, 우화율의 경우 *Wolbachia* 감염 보다 *popcorn* 감염의 경우에는 25% 가량 감소하는 경향을 나타냈다.

Popcorn 감염 및 *Wolbachia* 감염 초파리와 *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리의 성충 수명을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. *Popcorn* 감염 초파리는 우화 후 24시간 이내에 약 4% 정도가 치사하였으며, 발생 후 8일 정도가 경과했을 때 50% 이상 치사하였으며, 20일 경과한 시점에서는 10% 미만의 초파리가 생존하였다.

Wolbachia 감염 초파리는 발생 후 8일까지는 대부분이 살아있고 32일까지는 50%가 생존하고, 46일 이후까지 10% 정도가 생존하였다.

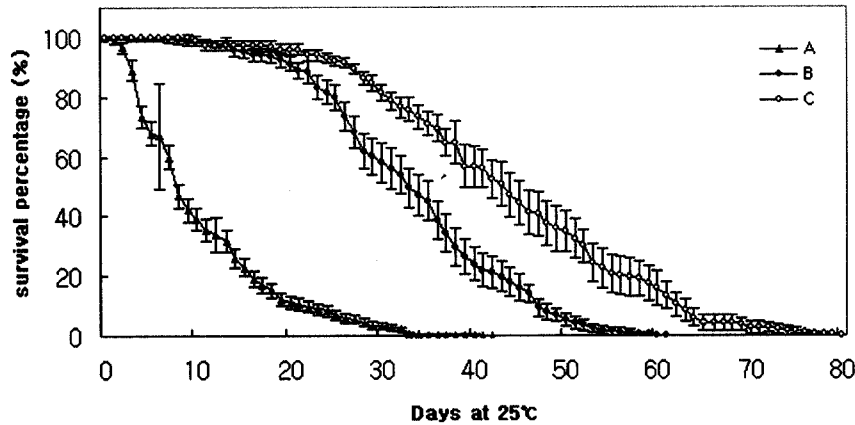


Fig. 2. Life-span of *Drosophila melanogaster* in *Wolbachia* strains of popcorn (A), non pathogenic (B), and uninfected control (C) : survival curves represented mean SE from 20 replicates of 100 population per each.

Table 3. Difference in egg production, egg hatch, pupation and adult emergence in crossed with *Drosophila melanogaster* infected popcorn, and *Wolbachia*, and uninfected *Wolbachia*

Cross (female × male)	No. of egg/female ^a	Egg hatch (%)	Pupation (%) ^a	Adult emergence (%) ^a
Popcorn-infected × <i>Wolbachia</i> -infected	215 ± 39.29	61 ± 3.4	58 ± 3.6	63 ± 8.5
<i>Wolbachia</i> -infected × Popcorn-infected	458 ± 85.42	55 ± 5.6	51 ± 2.8	60 ± 9.2
Popcorn-infected × <i>Wolbachia</i> -uninfected	237 ± 92.33	59 ± 11.9	53 ± 5.7	52 ± 3.9
<i>Wolbachia</i> -uninfected × Popcorn-infected	574 ± 100.74	30.5 ± 2.4	60 ± 1.6	68 ± 1.8
<i>Wolbachia</i> -infected × <i>Wolbachia</i> -uninfected	984 ± 69.1	89 ± 1.6	83 ± 3.4	87 ± 5.9
<i>Wolbachia</i> -uninfected × <i>Wolbachia</i> -infected	1,150 ± 26.43	9 ± 2.4	90 ± 3.8	88 ± 2.5

^a All values are mean ± SE of a total 20 pairs (female and male) of adult and replicate 30 times.

*Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리는 발생 후 50일이 경과한 이후에도 50% 이상의 생존율을 보였다.

따라서 *Wolbachia* 감염은 총산란수의 증대 등 초파리 생식에 유리하게 작용하지만 다소의 성충 수명의 감소를 초래하였고, popcorn은 유충 뿐 아니라 성충의 생존에도 매우 불리하게 작용한다는 사실이 확인되었다.

4. Popcorn 및 Wolbachia 감염주와의 교배검정

Popcorn 및 *Wolbachia* 감염 초파리, *Wolbachia*에 감염되지 않은 3종의 초파리간 초파리 개체군간의 교잡차대에서의 산란수, 용화율 및 우화율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 산란수에 있어서 popcorn 감염 초파리 암컷과 *Wolbachia* 감염 초파리가 수컷일 때는 215개, *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리에서는 237개로 popcorn 감염 초파리간의 교배인 경우와 큰 차이가 없었다. 그러나, *Wolbachia* 감염 초파리나, *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리 암컷인 경우와 비교할 때는 산란수가 40~50% 수준으로 매우 낮았다.

부화율은 popcorn 감염 초파리와 *Wolbachia* 감염 초

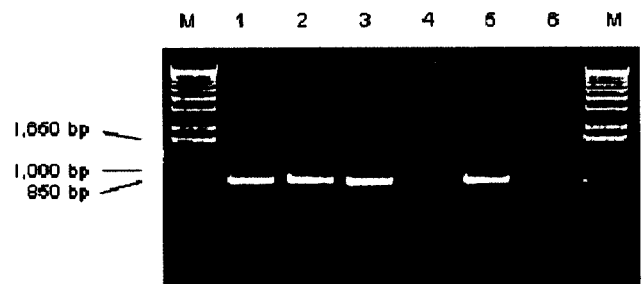


Fig. 3. Detection of *Wolbachia* 16S rRNA in different combination crossing with popcorn, non pathogenic *Wolbachia*, and uninfected *Drosophila melanogaster* by PCR. Lane: M, DNA size marker; 1, popcorn × non-pathogenic; 2, non-pathogenic × popcorn; 3, popcorn × non-infected; 4, non-infected × popcorn; 5, non-pathogenic × non-infected; 6, non-infected × non-pathogenic.

파리 또는 *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리간의 교배조합 중에서 병원성 또는 비병원성을 불문하고 *Wolbachia*에 감염되지 않은 암컷이 낳은 알의 부화율

은 현저하게 낮았다.

용화율은 *popcorn* 감염 초파리 및 *Wolbachia* 감염 초파리의 암 수 교차 교잡 모두 51~58% 정도였고, 우화율은 60~63%의 양상을 보였다. 그러나 *Wolbachia* 비감염 초파리간의 교차 교잡에서는 암컷이 *popcorn* 감염인 경우 53%의 용화율과, 52%의 우화를 보인 반면, 수컷이 *popcorn* 감염인 경우 60%, 68%의 용화 및 우화율을 나타내었다. *Wolbachia* 감염 암컷에 비감염 수컷을 교배하면 산란수가 984개였으나, 이와 반대의 교배조합에서는 산란수가 1,150개로 증가하였다. 부화율이 극히 낮은 것은 세포질 불화합성의 결과로 판단되었다. 용화율 및 우화율은 모두 *Wolbachia* 감염과 비감염구간의 교배에서 가장 높았다.

그러나, *popcorn*과 *Wolbachia* 감염 초파리, *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리간의 교잡후 차대에서의 *Wolbachia* 전달성은 16S rRNA의 유전자의 PCR을 통해 Fig. 3과 같이 확인하였다. *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리가 암컷일 경우에는 *Wolbachia*가 검출되지 않았고, 그 외에서는 모두 검출되었다.

*Wolbachia*에 감염된 것과 *Wolbachia*에 감염되지 않은 초파리와의 교잡차대에서는 비록 *Wolbachia*가 검출되지 않는 경우라도 *popcorn* 감염 초파리와 유사한 생태적 특성을 나타내었으며, *Wolbachia*와 달리 *popcorn* 감염에서는 초파리에서의 세포질 불화합성은 확인되지 않았다 (Barr, 1980; Wade and Chang, 1995; Noda *et al.*, 1997).

일반적인 *Wolbachia*와 특이하게 *popcorn*은 초파리의 전반적인 생활사를 파괴하지는 않으나, 알과 유충, 번데기 기간 등의 발육기간에 이상을 초래하며, 산란수의 현격한 저하나, 부화율의 저조, 용화율, 우화율의 감소를 유도하고, 성충수명의 단축 등 병적인 증상을 야기하였다 (Boyle *et al.*, 1993; Rousset and Solignac, 1995).

위와 같이 초파리의 발육단계별 기간에 따른 *popcorn*의 영향에 대한 결과를 바탕으로 *popcorn*이 병원성을 지니게 된 분자생화학적인 기작에 대해서 계속적인 규명이 이루어질 것이다.

인용문헌

- Barr, A.R. 1980. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. *Nature*. 283: 71~72.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, G. Markakis and C. Savakis. 1996. *Wolbachia* infections and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics*. 144: 1063~1073.
- Boyle, L., S.L. O'Neill, H.M. Robertson and T.L. Karr, 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*. 260: 1796~1799.
- Giordano, R., J.J. Jackson and H.M. Robertson. 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 94: 11439~11444.
- Giordano, R., S.L.O'Neill and H.M. Robertson. 1995. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechllia* and *D. mauritiana*. *Genetics*. 140: 1307~1317.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer and H Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria : structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*. 23: 1089~1097.
- Min, K.T. and S. Benzer. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 94: 10792~10796.
- Noda, H., U.G. Munderloh and T.J. Kurtti. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3926~3932.
- O'Neill, S.L., R. Giordano, A.M.E. Colbert, T.L. Karr and H. M. Robertson. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 89: 2699~2702.
- Rousset, F. and M. Solignac 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 : 6389~6393.
- Stouthamer, R., J.A.J. Breeuwer, R.F. Luck and J.H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*. 361: 66~68.
- Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1992. *Insect pathology*. pp, 12-51. Academic Press, London.
- Wade, J.M. and N.W. Chang. 1995. Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature*. 373: 72~76.
- Werren, J.H. 1997. *Wolbachia* run amok. *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 94: 11154~11155.

(2000년 4월 27일 접수, 2000년 8월 28일 수리)