

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.03.030

东方蜜蜂微孢子虫侵染中华蜜蜂过程中的高表达基因表达谱及其潜在作用

熊翠玲¹, 陈华枝¹, 耿四海¹, 周倪红¹, 周丁丁¹, 祝智威¹, 陈大福¹,
郑燕珍¹, 徐国钧¹, 张 曦², 郭 睿¹

(1. 福建农林大学 动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002; 2. 枣庄职业学院, 枣庄 277100)

摘 要: 本研究旨在通过高通量测序技术和生物信息学方法探究东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)在侵染中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)过程中的高表达基因(highly expressed gene, HEG)表达谱及潜在作用. 利用 RNA-seq 技术对 *N. ceranae* 感染后 7d 和 10d 的中蜂工蜂中肠进行测序, 通过连续比对东方蜜蜂(*Apis cerana*)和 *N. ceranae* 的基因组, 滤除中蜂的数据, 得到侵染中蜂工蜂的 *N. ceranae*(Nc1 和 Nc2)的有效读段数分别为 180 237 114 和 36 054 033 条. 根据 FPKM 值大于 15 的标准, 从 Nc1 和 Nc2 中分别筛选出 1 482 和 901 个 HEG. Venn 分析结果显示二者的共有 HEG 数为 890 个, 特有 HEG 数分别为 592 和 11 个. GO 分类和 KEGG 通路富集分析结果显示, 上述共有 HEG 分布于 24 个功能条目和富集于 72 条代谢通路. 进一步分析发现分别有 2 个 HEG 富集在与真菌的应激反应和毒力密切相关的 MAPK 信号通路. 此外, *N. ceranae* 的孢壁蛋白等毒力因子编码基因和 ATP/ADP 转移酶基因等能量代谢相关蛋白编码基因在侵染过程维持高量表达. 通过 RT-PCR 验证了随机挑选的 8 个 HEG 的表达. 研究结果提供了 *N. ceranae* 在侵染中蜂工蜂过程中的 HEG 表达谱及潜在作用.

关键词: 中华蜜蜂; 中肠; 东方蜜蜂微孢子虫; 侵染机制; 高表达基因

中图分类号: S895.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)03-0596-09

Expression profile of high-expressing genes and its potential role during *Apis cerana cerana* infected by *Nosema ceranae*

XIONG Cui-Ling¹, CHEN Hua-Zhi¹, GENG Si-Hai¹, ZHOU Ni-Hong¹, ZHOU Ding-Ding¹,
ZHU Zhi-Wei¹, CHEN Da-Fu¹, ZHENG Yan-Zhen¹, XU Guo-Jun¹, ZHANG Xi², GUO Rui¹

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Zaozhuang Vocational College, Zaozhuang 277100, China)

Abstract: To investigate the expression profile of highly expressed genes (HEGs) and its potential role during *Apis cerana cerana* infected by *Nosema ceranae*, RNA-seq was used to sequence the midguts of *A. c. cerana* workers at 7 d and 10 d post-infection by *N. ceranae*, followed by continuously mapping the genomes of *Apis cerana* and *N. ceranae* to filter out the data of *A. c. cerana*. In total, 180 237 114

收稿日期: 2019-04-30
基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建省科技计划项目(2018J05042); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT170158); 福建农林大学杰出青年科研人才计划项目(xjq201814); 福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2017343); 福建省大学生创新创业训练计划项目(201610389053)
作者简介: 熊翠玲(1977-), 女, 福建龙岩人, 硕士, 实验师, 主要从事蜜蜂保护学研究. E-mail: pandaxiongcl@sina.com
通讯作者: 郭睿. E-mail: fafu_ruiguo@126.com

and 36 054 033 clean reads were obtained from *N. ceranae* infecting *A. c. cerana* worker (Nc1 and Nc2), respectively. According to the criterion that the FPKM value >15 , 1 482 and 901 HEGs in Nc1 and Nc2 were filtered out, respectively. Venn analysis showed that the total number of HEGs of the two groups was 890, and the number of specific HEGs was 592 and 11, respectively. Besides, GO classification and KEGG pathway enrichment analysis indicated the shared HEGs were distributed in 24 GO terms and enriched in 72 pathways. Further analysis demonstrated two HEGs were enriched in MAPK signaling pathway, which is closely associated with the stress response and virulence. Besides, some genes coding virulence factors such as spore wall protein, and several genes coding energy metabolism-associated proteins, such as ATP/ADP translocase were highly expressed during *N. ceranae* infection of *A. c. cerana* worker. Finally, eight randomly selected HEGs were confirmed using RT-PCR. Together, these results reveal the expression profile and potential role of HEGs during *N. ceranae* infection of *A. c. cerana* worker.

Keywords: *Apis cerana cerana*; Midgut; *Nosema ceranae*; Infection mechanism; Highly expressed gene

1 引言

微孢子虫是一种真菌病原,广泛感染人类、哺乳类、两栖类和昆虫等^[1-3]. 东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)专性寄生成年蜜蜂的中肠上皮细胞,由 Fries 等人于 1996 年首次在中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)中发现并报道^[4],随后该病原迅速传播蔓延至美国和欧洲地区,目前已扩散到世界各地的西方蜜蜂(*Apis mellifera*)蜂群^[5]. 被 *N. ceranae* 感染的蜜蜂寿命减少 $1/3$ ^[6],产蜜量降低 40%,分泌蜂蜡量减少 25%^[7],并伴随有早熟行为^[8]. 此外,*N. ceranae* 还被认为是诱发蜂群崩溃综合症的主要病原之一^[9]. *N. ceranae* 主要通过粪-口或口-口等途径在蜜蜂个体间传播,当孢子进入蜜蜂中肠,在碱性环境的刺激下,孢子发芽并弹射出高度压缩的极丝,极丝穿入上皮细胞并将有感染性的孢质原浆注入其中;*N. ceranae* 经过增殖形成孢子体,最终导致宿主细胞裂解,释放出的成熟孢子继而感染临近的细胞,或者通过粪便排泄到外界环境中,侵染其他蜜蜂个体^[10].

前人对于 *N. ceranae* 的研究集中在病原鉴定、流行病学、病理学、侵染机理等方面^[10-12]. Cornman 等人于 2009 年完成 *N. ceranae* 的基因组组装并公布其序列及注释信息,为其组学及分子生物学研究提供了基础. 较之蜜蜂,*N. ceranae* 的组学研究进展缓慢,相关信息较为缺乏. Huang^[13] 等通过对 *N. ceranae* 感染 1-6d 的 *A. mellifera* 中肠进行转录组测序和分析,发现在感染过程中宿主的细胞凋亡基因表达受到抑制,*N. ceranae* 在一个繁殖周期中有 1 122 个基因差异表达,并分为 4 种

表达模式. Evans 等发现 1 545 个 *A. mellifera* 基因可能受到 *N. ceranae* 的 5 个 miRNA 的调控,这些 miRNA 聚集成 6 个共表达组,6 个组中的 4 个(918 个基因)与至少 1 个 miRNA 的表达显著相关,*N. ceranae* 的 miRNA 倾向于与病原基因正相关而与宿主基因负相关,表明 *N. ceranae* 的 miRNA 可调控自身基因表达也能跨界调控宿主的部分基因表达^[14]. 目前,前人仅对侵染 *A. mellifera* 的 *N. ceranae* 进行了一些组学研究,而对于侵染东方蜜蜂(*Apis cerana*)的 *N. ceranae* 以及二者互动,还缺乏相关研究报道. 近期,笔者团队结合链特异性建库方法和 RNA-seq 技术对 *N. ceranae* 孢子进行了全转录组测序,通过生物信息学方法分别预测出 83 个长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和 204 个环状 RNA(circular RNA, circRNA),并对它们的数量、种类、结构特征、表达谱和调控网络进行了系统的分析和验证^[15-16].

A. cerana 是 *N. ceranae* 的原始寄主,二者经过漫长的协调进化已相互适应. 有研究表明 *N. ceranae* 对 *A. mellifera* 具有更强的毒力^[5]. 因此,对侵染 *A. cerana* 的 *N. ceranae* 进行组学研究,可为解析 *N. ceranae* 的侵染机制和病原-宿主的适应性进化机制提供有价值的信息和线索. 为了在转录组水平探究在 *N. ceranae* 侵染中蜂过程中的作用,本研究利用基于链特异性建库方法的 RNA-seq 技术对 *N. ceranae* 侵染 7 d 和 10 d 的中蜂工蜂中肠进行测序,筛选出病原的高表达基因(highly expressed gene, HEG),并通过生物信息方法对 *N. ceranae* 的 HEG 进行深入分析,并通过

RT-PCR 技术对部分 HEG 进行验证,以期揭示 HEG 在 *N. ceranae* 侵染中蜂过程的作用,为深入 *N. ceranae* 的侵染机制提供有益的信息和线索.

2 材料与方法

2.1 生物材料

本研究中使用の中蜂取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)教学蜂场;*N. ceranae* 孢子^[15]由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护课题组纯化和保存.

2.2 方 法

2.2.1 蜂群选择 挑选外观健康、群势较强的 10 群中蜂,在每个蜂箱的巢房门口随机抓取 6 只工蜂,小心拉取中肠,加适量无菌水后充分研磨后取少许研磨液进行显微制片和镜检,利用前人报道的 *N. ceranae* 特异性引物(F: CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA, R: CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG)^[17]和 *N. apis* 特异性引物(F: GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA, R: GGGGGGCGTTTAAATGTGAAACAACACTATG)^[17]对镜检不到孢子的样品进行 PCR 检测,将镜检和 PCR 检查都为阴性的中蜂蜂群作为本研究的实验蜂群.

2.2.2 中蜂的饲喂感染及人工饲养 参照郭睿^[17]等方法进行中蜂的饲喂接种及人工饲养,简述如下:将实验蜂群内封盖子较多的巢脾迅速提至实验室,放入 34±0.5℃ 恒温培养箱,将刚出房的工蜂(当天记为 0 d)放进干净的塑料盒(塑料盒四周打孔通风,30 只/盒),每个盒子上方中心插入一支装有 50%(w/v)无菌糖水的饲喂器;(3)34±0.5℃ 培养 24 h,将上述工蜂饥饿处理 2 h,然后给每只工蜂饲喂 5 μL 糖水(含 1×10⁶ 个 *N. ceranae* 孢子),舍弃未食尽糖水的工蜂,将食尽糖水的工蜂用于后续实验;(4)每日检查工蜂的存活情况,及时清理死亡的工蜂,每隔 24 h 更换糖水. 本实验进行三次生物学重复.

2.2.3 测序样品准备及二代测序 因蜜蜂中肠是 *N. ceranae* 寄生和二者互作的主要部位,故本研究选取 *N. ceranae* 侵染的中蜂工蜂中肠作为测序材料. 分别拉取 *N. ceranae* 感染 7 d(即 8 日龄)和 10 d(即 11 日龄)的工蜂中肠,迅速移至 RNA free 的 EP 管中,三只中肠并入一管,液氮速冻后转移保存于-80℃ 超低温冰箱中备用. 将侵染中蜂 8 日龄和 11 日龄工蜂的 *N. ceranae* 分别设为 Nc1

和 Nc2. Nc1 组的 3 个生物学重复为: Nc1-1、Nc1-2 和 Nc1-3; Nc2 组的 3 个生物学重复为: Nc2-1、Nc2-2、Nc2-3. 利用 RNAiso Reagent 试剂盒(TaKaRa 公司,中国)抽提上述样品的总 RNA,再用 RNase-free DNase I 去除上述样品中基因组 DNA 残留,然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择. 参照郭睿等^[18]的方法构建 cDNA 文库. 建好的文库委托广州基迪奥生物技术有限公司进行双端测序,测序平台为 Illumina HiSeq™ 4000. 原始数据已上传 NCBI 的 SRA 数据库, BioProject 号: PRJNA562784.

2.2.4 数据质控及相关生物信息学分析 对于获得的原始数据读段(raw reads),利用 Perl 脚本去除有 adaptors、未知核苷酸比例大于 5% 和低质量的 reads,获得有效读段(clean reads). 按照下述步骤获得纯净的 *N. ceranae* 数据:(1)用短 reads 比对工具 bowtie 将 clean reads 比对到核糖体数据库(最多允许错配 5 个);(2)利用 TopHat2 软件将未比对上的数据比对 *A. cerana* 的参考基因组(assembly ACSNU-2. 0)以去除宿主本身的 clean reads;(3)进而利用 TopHat2 软件将未比对上剩余的 clean reads 继续比对到 *N. ceranae* 的参考基因组(assembly ASM98816v1),比对上的 clean reads 即为病原的数据. 进一步再利用 Cufflinks 软件对比对上的 clean reads 进行组装.

各组基因的表达量用公式 $FPKM = \frac{\text{Total exon fragment}}{[\text{Mapped fragment (millions)} \times \text{exon length (KB)}]}$ 计算. 利用 R 包计算个样品之间的相关性系数. 利用 OmicShare 在线分析工具(<http://www.omicshare.com/tools/index.php/Home/Index/index.html>)对各个样品的 HEG (FPKM >15)进行 Venn 分析,以及对共有 HEG 进行 GO 分类和 KEGG 代谢通路(pathway)富集分析等生物信息学相关分析.

2.2.5 HEG 的 RT-PCR 验证 为证明测序数据的可靠性,从共有 HEG 中随机选择 8 个进行 RT-PCR 验证. 根据所选 HEG 的序列信息,使用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物,委托上海生工生物工程有限公司进行引物合成,相关引物序列信息详见表 1. 利用 AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep 试剂盒(AXYGEN 公司,中国)分别抽提上述受 *N. ceranae* 感染的中蜂工蜂中肠样品的总 RNA,作为模板进行反转录,得到的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增. PCR 反应体系为 20

μL , 包括 PCR Mixture 10 μL , 正、反向引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , 无菌水 7 μL . PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

表 1 RT-PCR 的引物信息	
Tab. 1 Information of primers for RT-PCR	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
A-F	GAACCCTAACTCCCTCAC
A-R	AATTTGTCCTCCAATCAC
B-F	GAATGTCATCTACACGCA
B-R	TAATCATCCTTTAAGCCT
C-F	TTATCTGAAGACGAGGCT
C-R	ATCACCGATATTCCAAAA
D-F	AACAACTAGAAAATAGCGAGAC
D-R	CCAGGTGCCAGTAAGAAT
E-F	AGCGTGAGATTCAAAGGA
E-R	CCAGTAGGAAGGCTGTTC
F-F	AGCCGCTGATACACGACA
F-R	AAGCACCATTCCATTACAGA
G-F	ACAACAATGTATGGGATG
G-R	TAGGTATTTCGATGGTGGC
H-F	GGCAGATTTATACAACAG
H-R	AATACTACCCAAGCAAC

3 结果与分析

3.1 测序数据概览

比对上 *A. cerana* 基因组的 clean reads 数分别为 180 237 114 和 36 054 033 条, Q20 和 Q30 分别在 98.41% 和 95.28% 及以上(表 2). 此外, 各组内各生物学重复之间的 Pearson 相关性均在 0.969 1 及以上(图 1). 以上结果说明本研究中的测序样品重复性较好, 高通量测序数据质量好, 可满足本研究中 *N. ceranae* 的 HEG 分析.

表 2 测序数据的信息统计			
Tab. 2 Summary of sequencing data information			
样本 Samples	比对上 <i>N. ceranae</i> 基因组的有效读段 Clean reads mapped to the <i>N. ceranae</i> genome	99% 碱基 正确率/% Q20/%	99.9% 碱基 正确率/% Q30/%
Nc1-1	38 984 058	98.75	96.30
Nc1-2	35 848 944	98.74	96.23
Nc1-3	105 404 112	98.60	95.85
Nc2-1	7 568 774	98.41	95.28
Nc2-2	13 016 303	98.80	96.42
Nc2-3	15 468 956	98.66	96.02

3.2 HEG 的筛选及 Venn 分析

从 Nc1 和 Nc2 中分别筛选出 1 482 和 901 个 HEG. 共有 HEG 为 890(59.6%) 个, 特有 HEG 分别为 592(39.7%) 和 11(0.7%) 个(图 2). Nc1 和 Nc2 的部分特有 HEG 信息详见表 3 和表 4.

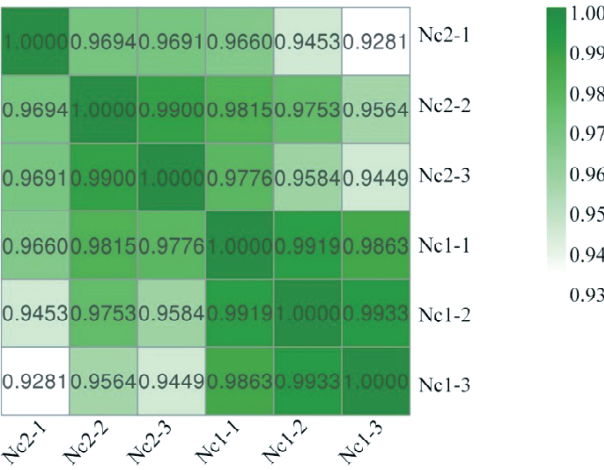


图 1 Nc1 和 Nc2 中不同生物学重复间的相关性
Fig. 1 Pearson correlations between every two biological repeats within Nc1 and Nc2 groups

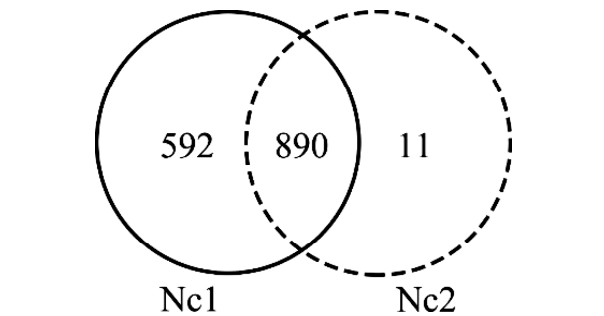


图 2 Nc1 和 Nc2 中 HEG 的 Venn 分析
Fig. 2 Venn analysis of HEGs in Nc1 and Nc2 groups

3.3 共有及特有 HEG 的 GO 分类

GO 分类结果显示分别有 298、302 和 175 个共有 HEG 富集在生物学进程、细胞组分和分子功能, 共涉及 24 个功能条目, 富集前 5 位分别是代谢进程(230 个 HEG)、催化活性(213 个 HEG)、结合(200 个 HEG)、细胞进程(198 个 HEG)、细胞(139 个 HEG)(图 3).

Nc1 的特有 HEG 涉及 21 个功能条目, 富集前 10 位分别是代谢进程(67 个 HEG)、细胞进程(64 个 HEG)、催化活性(63 个 HEG)、结合(61 个 HEG)、单组织进程(32 个 HEG). Nc2 的特有 HEG 涉及 4 个功能条目, 分别为代谢进程(1 个 HEG)、细胞进程(1 个 HEG)、单组织进程(1 个 HEG)和催化活性(1 个 HEG).

表 3 Nc1 的前 11 位特有 HEGs

Tab. 3 Top 11 specific HEGs in Nc1 group

基因 ID Gene ID	FPKM 值 FPKM value	NCBI 数据库功能注释 Functional annotation in Nr database
XM_002 995 272.1	2 962.700	21kda 亚基信号肽酶
XM_002 994 950.1	2 255.120	正乙酰转移酶 5
XM_002 996 771.1	1 160.573	假定蛋白 NCIEL100 730
XM_002 995 006.1	1 054.867	an1-型锌指蛋白 6
XM_002 995 148.1	988.007	40s 核糖体蛋白 s17
XM_00 299 5601.1	893.407	假定蛋白 NCIEL102 011
XM_002 995 929.1	884.643	假定蛋白 NCIEL101 401
XM_002 995 567.1	828.533	部分谷胱甘肽相关蛋白
XM_002 996 258.1	752.340	泛素偶联酶 e2
XM_002 996 742.1	702.877	激酶域蛋白
XM_002 994 854.1	689.390	桶状蛋白

表 4 Nc2 的特有 HEGs

Tab. 4 Specific HEGs in Nc2 group

基因 ID Gene ID	FPKM 值 FPKM value	NCBI 数据库功能注释 Functional annotation in Nr database
XM_002 995 695.1	51.873	假定蛋白 NCER_101 281
XM_002 996 059.1	29.347	假定蛋白 NCER_100 848
XM_002 995 032.1	28.320	海藻酶前体
XM_002 995 101.1	28.257	假定蛋白 NCER_102 076
XM_002 994 904.1	26.177	假定蛋白 NCER_102 375
XM_002 995 353.1	26.013	假定蛋白 NCER_101 720
XM_002 996 389.1	23.060	假定蛋白 NCER_100 482
XM_002 996 695.1	21.453	DNA 结合蛋白 smubp-2
XM_002 995 070.1	21.077	假定蛋白 NCER_102 115
XM_002 996 058.1	17.600	假定蛋白 NCER_100 847
XM_002 996 358.1	16.387	锚定蛋白重复结构域蛋白 32

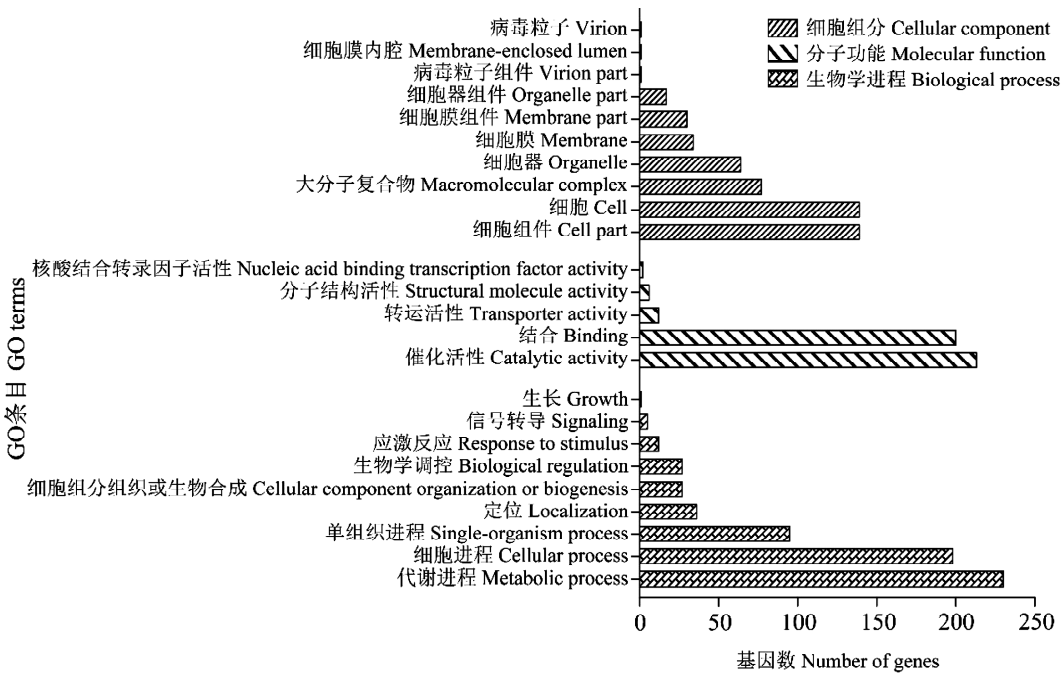


图 3 Nc1 和 Nc2 的共有 HEGs 的 GO 分类
Fig. 3 GO categorization of shared HEGs in Nc1 and Nc2 groups

3.4 共有及特有 HEG 的 KEGG 代谢通路富集分析

KEGG 代谢通路富集分析结果显示,共有 HEG 富集在新陈代谢、遗传信息加工、环境信息加工、细胞组分、有机体系统等 5 大类的 72 条代谢通路,其中富集前 10 位分别是核糖体(53 个 HEG)、内质网蛋白加工(33 个 HEG)、蛋白酶体(27 个 HEG)、真核生物的核糖体生物合成(24 个 HEG)、嘧啶代谢(23 个 HEG)、RNA 转运(21 个 HEG)、

嘌呤代谢(21 个 HEG)(图 4). 进一步分析发现 2 个共有 HEG 富集在 MAPK 信号通路(图 5).

Nc1 的特有 HEG 富集在 51 条代谢通路,富集前 10 位分别是泛素介导的蛋白水解(12 个 HEG)、RNA 转运(11 个 HEG)、细胞周期-酵母(11 个 HEG)、嘌呤代谢(11 个 HEG)、真核生物的核糖体生物合成(11 个 HEG). Nc2 的特有 HEG 仅富集在 1 条代谢通路,即淀粉和蔗糖代谢.

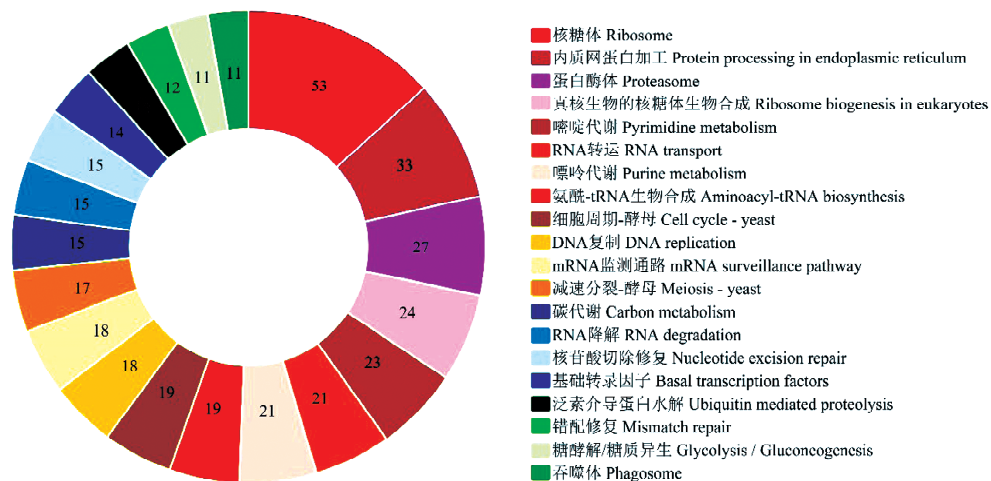


图 4 Nc1 和 Nc2 的共有 HEG 的 KEGG 代谢通路分析
Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of shared HEGs in Nc1 and Nc2 groups

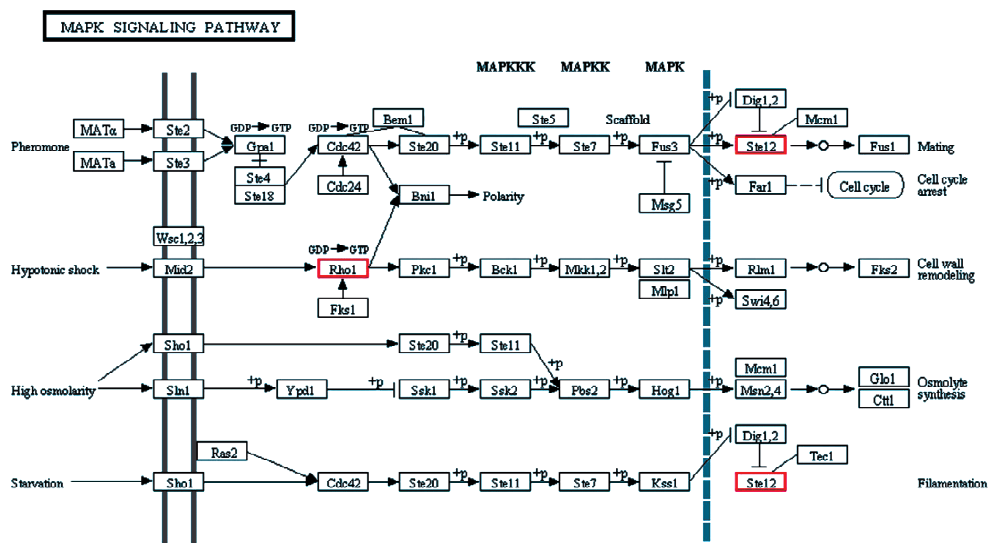


图 5 *N. ceranae* 的 MAPK 信号通路概貌
红框表示 Nc1 和 Nc2 的共有 HEG.
Fig. 5 Overview map of MAPK signaling pathway in *N. ceranae*
Red boxes indicate the shared HEG between Nc1 and Nc2.

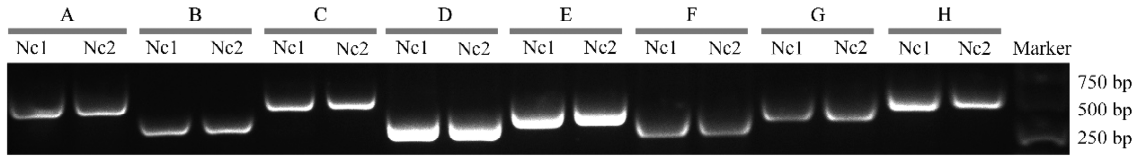


图 6 8 个共有 HEG 的 RT-PCR 验证
A:磷酸甘露糖酶编码基因; B: 假设蛋白 NCER_102326 编码基因; C: RNA 聚合酶 II CTD 磷酸酶编码基因; D: 水通道样蛋白编码基因; E: 26s 蛋白酶体调节亚基 4 编码基因; F: 蛋白酶体亚基-1 型编码基因; G: 蓖麻毒素 b 凝集素编码基因; H: 鸟苷酸结合蛋白 sar1 编码基因
A:phosphomannomutase encoded gene; B: hypothetical protein NCER_102326 encoded gene; C: RNA polymerase ii ctd phosphatase encoded gene; D: aquaporin-like protein encoded gene; E: 26s proteasome regulatory subunit 4 encoded gene; F: proteasome subunit beta type-1 encoded gene; G: ricin b lectin encoded gene; H: gtp-binding protein sar1 encoded gene

3.5 HEG 的 RT-PCR 验证

Nc1 和 Nc2 中均扩增出目的条带(图 6),初步证实了本研究预测的 HEG 真实存在。

电泳结果显示 8 个随机挑选的共有 HEG 在

4 讨论与结论

N. ceranae 广泛感染世界各地的蜂群,除能对蜜蜂造成能量胁迫和免疫抑制等影响外,还能与其他生物或非生物胁迫因子共同危害蜜蜂健康^[6-8]. 此前的组学相关研究主要集中在 *N. ceranae* 与 *A. mellifera* 的互作方面,有关 *N. ceranae* 与 *A. cerana* 互作的组学研究鲜有报道. 为探究 *N. ceranae* 在侵染中蜂过程的 HEG 表达谱及功能,本研究利用 RNA-seq 技术对 *N. ceranae* 侵染 7 d 和 10 d 的中蜂工蜂中肠进行测序,得到高质量的测序数据,并通过连续比对 *A. cerana* 和 *N. ceranae* 的基因组获得病原本身的转录组数据. 从 Nc1 和 Nc2 中分别筛选出 1 482 和 901 个 HEG,其中有 890 个在二者中皆高量表达(FPKM 分别介于 72 073. 050-15. 76 和 75 951. 357-15. 737),分别有 592 个 HEG(FPKM 介于 2 962. 700-15. 003)和 11 个 HEG(FPKM 介于 51. 873-16. 387)特异性高量表达. 推测上述共有 HEG 在 *N. ceranae* 的侵染过程发挥基础性作用,而特有 HEG 在侵染的不同阶段具有特定功能,但具体的功能有待进一步研究. Cornman 等曾利用罗氏 454 平台对 *N. ceranae* 孢子进行测序,通过相关生物信息学软件对基因组进行了组装和注释^[19]. 然而,由于缺失基因功能研究技术体系,包括 *N. ceranae* 在内的微孢子虫的转基因操作技术尚未完全建立,仅在家蚕微孢子虫中有过一例转基因研究报道^[20],因而,包括 *N. ceranae* 在内的微孢子虫的基因功能研究近乎停滞,加上 *N. ceranae* 的组学数据相对有限,导致其基因功能注释信息较不完善. 本研究发现,Nc1 和 Nc2 的 HEG 共包含 362 个假定蛋白编码基因,这些 HEG 在各大主流蛋白功能数据库尚缺乏功能注释信息,其完善需要更多的组学数据的支持以及转基因操作技术体系的建立.

本研究中,Nc1 和 Nc2 的共有 HEG 涉及 24 个功能条目;分别有 139、139、64、34、30 和 17 个 HEG 富集在细胞、细胞组件、细胞器、细胞膜、细胞膜组件和细胞器组件,另有 198 和 27 个 HEG 富集在细胞进程和细胞组分组织或生物合成,表明 *N. ceranae* 在侵染中蜂的过程中伴随着活跃的细胞生命活动,以促进自身在宿主细胞内的增殖. 此外,上述共有 HEG 参与了 72 条代谢通路,包含碳代谢(15)和糖酵解/糖异生(11)等 41 条物质代谢通路,氧化磷酸化(8)和磷酸戊糖途径(5)2 条能量

代谢通路. 上述结果表明 *N. ceranae* 在侵染过程中的物质和能量代谢较为旺盛. Ponton 等^[21] 的发现 *N. ceranae* 侵染 *A. mellifera* 后即利用宿主的物质和能量进行自身遗传物质的复制、转录和翻译. 本研究发现分别有 23、21 和 21 个 *N. ceranae* 的 HEG 富集在嘧啶代谢、RNA 转运和嘌呤代谢;此外,分别有 53、33 和 19 个 HEG 富集在核糖体、内质网蛋白质加工和氨酰基-tRNA 生物合成. 这些结果表明 *N. ceranae* 在中蜂工蜂中肠上皮细胞内的增殖过程中同时进行着较为活跃的 DNA 复制、RNA 转录和蛋白质翻译等活动.

信号通路指能将细胞外的信号经细胞膜传入细胞内的一系列酶促反应通路,真菌通过 MAPK 等信号通路转导系统对外界环境的变化作出相应的应答,进而对生长和毒力等相关基因的表达进行调控,从而影响孢子形成、营养感知和形态建成等生物学过程^[22]. 陈大福等^[23] 发现对于侵染中蜂 6 日龄幼虫的蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌),富集在 MAPK 信号通路的 HEG 远多于体外培养的球囊菌,推测 MAPK 信号通路在球囊菌的侵染过程作用关键. 本研究中,2 个共有 HEG 富集在 MAPK 信号通路,暗示此信号通路在 *N. ceranae* 的侵染过程中发挥重要作用. Jaroenlak 等^[24] 在虾肝肠微孢子虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)中发现一种分布在内生孢子和外孢子层的新孢壁蛋白(EhSWP1),作为病原在侵染早期的重要毒力因子,可能通过结合肝素附着到宿主细胞表面. 极管蛋白与 *N. ceranae* 毒力大小有关,有研究表明干扰 *N. ceranae* 的极性管蛋白 3 基因(*ptp3*)可抑制 *N. ceranae* 增殖^[25]. Paldi 等发现宿主摄入靶向 *N. ceranae* 的 ADP/ATP 转移蛋白基因的 siRNA 能导致特定的基因沉默,进而会影响 *N. ceranae* 感染水平和宿主的生理状况^[26]. 本研究中,孢壁蛋白基因(XM_002996303. 1, Nc1 中 FPKM=24 434. 550, Nc2 中 FPKM=33 275. 467)、极管蛋白基因(XM_002995446. 1, Nc1 中 FPKM=17 490. 823, Nc2 中 FPKM=29 944. 273)、蓖麻毒素 B 链基因(XM_002995387. 1, Nc1 中 FPKM=698. 757, Nc2 中 FPKM=1 547. 050)、ABC 转运体基因(XM_002995069. 1, Nc1 中 FPKM=133. 697, Nc2 中 FPKM=265. 673)、ATP/ADP 转移酶基因(XM_002995682. 1, Nc1 中 FPKM=10 832. 593, Nc2 中 FPKM=7 752. 717)和丝氨酸苏氨酸蛋白激酶基因(XM_002995071. 1, Nc1 中

FPKM=337.033, Nc2 中 FPKM=266.083)等毒力基因均为高量表达,表明 *N. ceranae* 在其侵染中蜂工蜂的过程中通过维持上述毒力基因的高表达水平以提升毒力蛋白的合成代谢,进而促进自身在宿主细胞内的增殖。海藻糖广泛存在于酵母等真菌的孢子和子实体中,在脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压和有毒试剂等不良环境的胁迫下起到保护作用^[27]。海藻糖与海藻糖酶结合会产生大量葡萄糖,导致细胞内渗透压升高促进微孢子虫对宿主的侵染,在微孢子虫孢子的发芽过程中海藻糖酶催化海藻糖水解释放葡萄糖为孢子正常发育提供能量^[28]。本研究发现,海藻糖磷酸合酶 1 基因(XM_002996572.1, Nc1 中 FPKM=239.363, Nc2 中 FPKM=301.7)和海藻糖-6-磷酸合酶基因(XM_002996577.1, Nc1 中 FPKM=73.413, Nc2 中 FPKM=200.397)在 Nc1 和 Nc2 中皆高量表达,推测 *N. ceranae* 通过调控海藻糖磷酸合酶合成速率为自身增殖提供能量。笔者团队在前期研究中发现对于 *N. ceranae* 侵染 7d 和 10d 的中蜂工蜂中肠,随着侵染时间的延长,与宿主物质和能量代谢相关的 HEG 数量持续降低^[29],表明宿主的物质和能量代谢受到 *N. ceranae* 的抑制,体现出 *N. ceranae* 通过与中蜂互动而对后者的部分生命活动进行操纵。前人研究发现通过 RNA 干扰(RNAi)对 *N. ceranae* 的 ATP/ADP 转移酶和裸角质层(Naked cuticle)等毒力因子基因进行沉默的效果良好^[26, 30]。未来可针对 *N. ceranae* 的海藻糖磷酸合酶 1 基因和海藻糖-6-磷酸合酶基因设计特异性的小干扰 RNA(siRNA),通过注射或饲喂感染蜜蜂对该上述病原基因进行沉默,有望用于蜜蜂微孢子虫病的治疗。值得一提的是,本研究发现若干表达水平相对特别高的基因,如部分 SR22 蛋白基因(XM_002996758.1, Nc1 中 FPKM=61 410.717, Nc2 中 FPKM=75 951.357)、假定蛋白 NCER_100570 基因(XM_002996307.1, Nc1 中 FPKM=69 904.740, Nc2 中 FPKM=75 053.357)和延伸因子 1 基因(XM_002995284.1, Nc1 中 FPKM=33 358.027, Nc2 中 FPKM=34 716.303),下一步拟通过 RT-PCR 和 RACE 技术得到上述 HEG 的 cDNA 全长序列,进而在核酸和蛋白水平开展相关的功能研究。

综上所述,*N. ceranae* 可能通过 MAPK 信号通路对中蜂中肠的碱性环境作出应答,促进孢壁蛋白、极管蛋白、蓖麻毒素 B 链、ABC 转运体、ADP/

ATP 转移蛋白和丝氨酸苏氨酸蛋白激酶等毒力因子基因的高量表达,刺激孢子萌发和菌丝弹射,促进 *N. ceranae* 对中蜂中肠上皮细胞的侵染;在中蜂中肠细胞内,激活 ADP/ATP 转移蛋白和海藻糖磷酸合酶基因的表达,对宿主造成能量胁迫,为自身增殖提供能量。本研究通过深入分析侵染中蜂工蜂的 *N. ceranae* 的 HEG 表达谱,揭示了 HEG 在病原侵染过程中的潜在作用,揭示 *N. ceranae* 通过维持孢壁蛋白、极管蛋白、蓖麻毒素 B 链、ABC 转运体、ADP/ATP 转移蛋白和丝氨酸苏氨酸蛋白激酶等毒力因子基因,以及 ATP/ADP 转移酶、海藻糖磷酸合酶 1 和海藻糖-6-磷酸合酶等能量代谢相关蛋白编码基因的高量表达,促进自身在中蜂工蜂中肠的侵染过程。研究结果为明确 *N. ceranae* 对中蜂的侵染机制提供了有益信息和线索。

参考文献:

- [1] Lallo M A, Costa L F V D, Alvares-Saraiva A M, et al. Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest [J]. J Vet Med Sci, 2016, 78: 171.
- [2] Stentiford G D, Becnel J J, Weiss L M, et al. Microsporidia-emergent pathogens in the global food chain [J]. Trends Parasitol, 2016, 32: 336.
- [3] 张龙, 严毓骅. 以生物防治为主的蝗灾可持续治理新对策及其配套技术体系 [J]. 中国农业大学学报, 2008(03): 1.
- [4] Fries I, Feng F, Silva A D, et al. *Nosema ceranae* n. sp. (microspora, nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (hymenoptera, apidae) [J]. Eur J Protistol, 1996, 32: 356.
- [5] Chen Y P, Evans J D, Smith I B, et al. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States [J]. J Invertebr Pathol, 2008, 97: 186.
- [6] Fries I. *Nosema apis*, a parasite in the honey bee colony [J]. Bee World, 1993, 74: 5.
- [7] Dubiel S. Choroby pszczol i ich zwalczanie [J]. Lubuski Informator Rolniczy, 1999, 8: 31.
- [8] Mayack C, Naug D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection [J]. J invertebr pathol, 2009, 100: 185.
- [9] Fernandez J M, Puerta F, Cousinou M, et al. Asymptomatic presence of *nosema* spp. in Spanish commercial apiaries [J]. J Invertebr Pathol, 2012,

111; 106.

[10] Schottelius J, Schmetz C N, Kock N P, *et al.* Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus encephalitozoon [J]. Micro Infect, 2000, 2: 1401.

[11] Mayack C, Natsopoulou M E, McMahon D P. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees [J]. Insect Mol Biol, 2015, 24: 662.

[12] Natsopoulou M E, Doublet V, Paxton R J. European isolates of the microsporidia *Nosema apis*, and *Nosema ceranae*, have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees [J]. Apidologie, 2015, 47: 1.

[13] Huang Q, Chen Y P, Wang R W, *et al.* Host-parasite Interactions and purifying selection in a microsporidian parasite of honey bees [J]. PLoS One, 2016, 11: e0147549.

[14] Evans J D, Huang Q. Interactions among host-parasite microRNAs during *Nosema ceranae* proliferation in *Apis mellifera* [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 698.

[15] Guo R, Chen D F, Xiong C L, *et al.* First identification of long non-coding RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae* [J]. Apidologie, 2018, 49: 660.

[16] Guo R, Chen D F, Chen H Z, *et al.* Genome-wide identification of circular RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae* [J]. Curr Microbiol, 2018, 75: 1655.

[17] Vanengelsdorp D, Evans J D, Saegerman C, *et al.* Colony collapse disorder: a descriptive study [J]. PLoS One, 2009, 4: e6481.

[18] 郭睿, 刀晨, 熊翠玲, 等. 意大利蜜蜂工蜂中肠响应 *Nosema ceranae* 胁迫的高表达基因分析 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40: 1106.

[19] Cornman R S, Chen Y P, Schatz M C, *et al.* Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees [J]. PLoS Pathog, 2009, 5: e1000466.

[20] Guo R, Cao G L, Lu Y H, *et al.* Exogenous gene can be integrated into *Nosema bombycis* genome by mediating with a non-transposon vector [J]. Parasitol Res, 2016, 115: 3093.

[21] Ponton F, Wilson K, Holmes A J, *et al.* Integrating nutrition and immunology: a new frontier [J]. J Insect Physiol, 2013, 59: 130.

[22] 侯彬彬, 刘霞, 张振颖, 等. 参与真菌形态及毒力形成的信号转导通路的研究进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10: 241.

[23] 陈大福, 王鸿权, 李汶东, 等. 胁迫中华蜜蜂幼虫肠道的球囊菌及其体外培养的高表达基因分析 [J]. 福建农林大学学报, 2017, 46: 562.

[24] Jaroenlak P, Boakye D W, Vanichviriyakit R, *et al.* Identification, characterization and heparin binding capacity of a spore-wall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* [J]. Parasit Vect, 2018, 11: 177.

[25] Rodriguez-Garcia C, Evans J D, Li W F, *et al.* Nosemosis control in european honey bees *Apis mellifera* by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3 [J]. J Exp Biol, 2018, 222: jeb184606.

[26] Paldi N, Glick E, Oliva M, *et al.* Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines [J]. Appl Environ Microb, 2010, 76: 5960.

[27] Sillje H H, Paalman J W, ter Schure E G, *et al.* Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Bacteriol, 1999, 181: 396.

[28] Undeen A H, Meer R K V. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination [J]. J Invertebr Pathol, 1999, 73: 294.

[29] 付中民, 周丁丁, 陈华枝, 等. 中华蜜蜂工蜂中肠响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的高表达基因分析 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 191.

[30] Li W F, Evans J D, Huang Q, *et al.* Silencing honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82: 6779.

引用本文格式:

中 文: 熊翠玲, 陈华枝, 耿四海, 等. 东方蜜蜂微孢子虫侵染中华蜜蜂过程中的高表达基因表达谱及其潜在作用 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 596.

英 文: Xiong C L, Chen H Z, Geng S H, *et al.* Expression profile of high-expressing genes and its potential role during *Apis cerana cerana* infected by *Nosema ceranae* [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2020, 57: 596.