

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.01.029

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

付中民¹, 周丁丁¹, 陈华枝¹, 耿四海¹, 陈大福¹, 郑燕珍¹,
熊翠玲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: 为探究高表达基因 (highly expressed gene, HEG) 在中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 工蜂中肠响应东方蜜蜂微孢子虫 (*Nosema ceranae*) 胁迫过程的表达谱及作用, 利用 RNA-seq 技术对正常中蜂工蜂中肠 (Ac7CK 和 Ac10CK) 及 *N. ceranae* 胁迫 7 d 和 10 d 的中肠 (Ac7T 和 Ac10T) 进行深度测序、生物信息学分析和分子生物学验证。共测得 1 809 736 786 条 raw reads, 经质控得到 1 562 162 742 条 clean reads。Ac7CK、Ac7T、Ac10CK 和 Ac10T 的共有 HEG 为 2 074 个, 特有 HEG 分别为 89、283、156 和 78 个。Ac7T 和 Ac10T 的特有 HEG 分别涉及 35 和 28 个功能条目, 以及 39 和 37 条代谢通路。RT-PCR 结果证实了 8 个共有 HEG 的真实表达。上述结果表明, 宿主的物质和能量代谢、细胞和体液免疫均受到不同程度的激活, 二者间存在密切的相互作用。研究结果解析了中蜂工蜂中肠响应 *N. ceranae* 胁迫的 HEG 表达谱及潜在作用。

关键词: 中华蜜蜂; 高表达基因; 东方蜜蜂微孢子虫; 中肠; 胁迫

中图分类号: S895.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)01-0191-08

Analysis of highly expressed genes in *Apis cerana cerana* workers' midguts responding to *Nocema ceranae* stress

FU Zhong-Min¹, ZHOU Ding-Ding¹, CHEN Hua-Zhi¹, GENG Si-Hai¹, CHEN Da-Fu¹,
ZHENG Yan-Zhen¹, XIONG Cui-Ling¹, XU Guo-Jun¹, ZHANG Xi², GUO Rui¹

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

Abstract: To ascertain the expression profile and role of highly expressed genes (HEGs) in the midguts of *Apis cerana cerana* workers responding to *Nocema ceranae* stress, normal *A. c. cerana* workers' midguts (Ac7CK, Ac10CK) and midguts treated by *N. ceranae* stress (Ac7T, Ac10T) for 7 d and 10 d were deeply sequenced followed by bioinformatic analysis and molecular validation. A total of 1 809 736 786 raw reads were yielded, and 1 562 162 742 clean reads were obtained after quality control. In Ac7CK, Ac7T, Ac10CK and Ac10T groups, 2 074 HEGs were shared; the number of specific HEGs was 89, 283, 156 and 78, respectively. The specific HEGs in Ac7T and Ac10T were associated with 35 and 28

收稿日期: 2019-02-28

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育科研课题 (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 (CXZX2017342, CXZX2017343)

作者简介: 付中民 (1972-), 男, 河北唐山人, 硕士, 副教授, 主要研究方向为蜂学。E-mail: 369699776@qq.com

通讯作者: 郭睿。E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

GO terms as well as 39 and 37 pathways, respectively. The confirmation of eight common HEGs was verified using RT-PCR. The results indicated the host's material and energy metabolism, as well as cellular and humoral immune were activated to varying degrees, and there was a close interaction between *A. c. cerana* and *N. ceranae*. These findings revealed the expression profile and potential role of host HEGs in responses to *N. ceranae* stress.

Keywords: *Apis cerana cerana*; Highly expressed gene; *Nocema ceranae*; Midgut; Stress

1 引言

蜜蜂是自然界中最重要的授粉昆虫,能显著提高作物、果蔬的产量和品质^[1],具有无可比拟的经济和生态价值.蜜蜂也是一种高度进化的社会性昆虫,在社会行为学和种群遗传学等研究领域应用广泛^[2].中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*,简称中蜂)是东方蜜蜂(*Apis cerana*)的指名亚种,也是适应我国本土自然环境的特有蜂种,具有善于利用零星蜜源、采集力强及抗病性强等优势^[3].

微孢子虫是专性胞内寄生的真菌,宿主范围包括哺乳动物、鱼类和昆虫等脊椎动物和无脊椎动物^[4].微孢子虫对家蚕和蜜蜂等经济昆虫的影响尤为严重^[5].东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)特异性侵染成年蜜蜂的中肠上皮细胞,可导致蜜蜂免疫力下降,工蜂离巢飞行提前,寿命缩减,以及产蜜量下降,严重危害蜜蜂健康^[6-7].随着东方蜜蜂微孢子虫基因组(大小:7.86 Mb)的公布和东方蜜蜂基因组(大小:228.332 Mb)完善,二者互作的组学研究不断深入^[8-10].较多的研究表明,*N. ceranae*是导致蜂群崩溃综合症的关键因素之一^[11-12].前人对*N. ceranae*与西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的相互作用进行了较多的组学研究,取得了一些重要进展. Aufauvre 等^[13]利用二代测序技术对*N. ceranae*、杀虫剂胁迫及二者共同胁迫 1 d 和 7 d 的西方蜜蜂的中肠样品进行转录组测序,分析发现 7 d 时宿主的中肠免疫调节系统受到了强烈抑制,表皮防御功能以及海藻糖代谢通路受到了显著影响. Badaoui 等^[14]利用 RNA-seq 技术研究了*N. ceranae*感染 5、10 和 15 d 的西方蜜蜂的基因表达谱,发现差异表达基因可归入 3 种表达模式,进一步分析发现*N. ceranae*感染对宿主的氨基酸代谢产生干扰及抗菌肽基因的表达产生抑制,表明*N. ceranae*感染抑制了西方蜜蜂的免疫系统.但有关*N. ceranae*-东方蜜蜂互作的组学研究较为滞后,相关信息匮乏.

笔者所在课题组前期对*N. ceranae*胁迫意大

利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*,简称意蜂)工蜂过程中宿主和病原的高表达基因(highly expressed gene, HEG)进行全面分析,揭示了二者的 HEG 的表达谱及潜在作用^[15].本研究利用 Illumina 测序技术对正常及*N. ceranae*胁迫的中蜂 7 d 和 10 d 工蜂中肠进行测序,通过生物信息学方法对宿主的 HEG 进行深入分析,以期在转录组水平探究中蜂对*N. ceranae*的胁迫应答.研究结果可揭示 HEG 在中蜂胁迫应答中的作用,为探明背后的分子机制提供有益的信息和线索.

2 材料与方法

2.1 实验材料

中蜂工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*孢子由福建农林大学动物科学学院蜂学学院蜜蜂保护学实验室保存并纯化^[16].

2.2 方法

2.2.1 孢子纯化、接种感染及人工饲养 *N. ceranae*孢子的粗提和纯化方法如下:(1)从*N. ceranae*感染严重的意蜂蜂群巢门口抓取外勤蜂若干只,拉取中肠放入研钵加水充分研磨,差速离心后弃上清液,纯水悬浮沉淀,继续多次差速离心以去除杂质,将得到的孢子粗提液,按照 1:10 比例加入无菌水后分装到 1.5 mL 灭菌的 EP 管内,4 °C, 3000 r/min 离心 5 min,吸去上清液后将 5 管浑浊液合为 1 管,4 °C, 1 200 r/min 离心 3 min;(2)分别配制 25%、50%、75%、100%的 percoll 纯化液.各浓度的 percoll 液取 200 μL 按照密度从高到低的浓度依次分装到干净的 EP 管中,最后加入离心后的浑浊液,4 °C, 14 000 r/min 离心 30 min;(3)将无菌的注射器小心吸取孢子,针头插入乳白色的孢子带中,注意不要吸到孢子带上下方的液体.

参照本实验室前期已建立的方法^[17]进行中蜂工蜂的接种感染和人工饲养:(1)配制含孢子的 50%(w/v)糖水,孢子浓度为 2×10^8 /mL;(2)选取群势较强的成熟封盖子脾迅速提至实验室,放入

34±0.5 °C, (60%~70%)RH 培养箱, 将刚出房的工蜂放入灭菌的塑料盒(塑料盒四周打孔以通风, 30 只/盒), 将装有 50% (w/v) 无菌糖水的饲喂器插入每个盒子上方; (3) 将工蜂出房当天记为 0 d, 34±0.5 °C 培养 24 h; 将上述中蜂工蜂单头固定后饥饿处理 2 h, 处理组工蜂单只饲喂含孢子的糖水 5 μL, 对照组工蜂单只饲喂不含孢子的糖水 5 μL; (4) 24 h 后均饲喂不含孢子的糖水, 每日更换糖水, 及时清理未食尽糖水的工蜂及死去的工蜂, 食尽糖水的工蜂用于后续实验, 用 50% (w/v) 的糖水饲喂工蜂, 适宜条件饲喂至 10 d. 处理组和对照组均包含 3 个生物学重复, 每组重复包含 9 只工蜂中肠. 适宜条件饲喂至 7 d 时, 处理组中的 9 只工蜂中肠, 分别放入 3 个 EP 管, 该混合样品记为 Ac7T (Ac7T-1、Ac7T-2、Ac7T-3); 对照组的 9 只工蜂中肠, 分别放入 3 个 EP 管, 该混合样品记为 Ac7CK (Ac7CK-1、Ac7CK-2、Ac7CK-3); 每次取样在 20 s 内迅速放于液氮后, 迅速转移到 -80°C 超低温冰箱保存备用. 10 d 的处理和对照组中肠样品也按照上述方法进行取样和保存, 分别记为 Ac10T (Ac10T-1、Ac10T-2、Ac10T-3) 和 Ac10CK (Ac10CK-1、Ac10CK-2、Ac10CK-3).

2.2.2 RNA 提取、cDNA 建库及 RNA-seq 首先利用 RNAiso Reagent 试剂盒分别抽提上述 12 个中肠组织样品的总 RNA, 然后用 RNase-Free DNase I 去除残留的基因组 DNA. 接着利用 Olig-

otex mRNA Kits Midi 对抽提的总 RNA 进行 RNA 纯化, 通过分光光度计对纯化 RNA 进行定量检测. RNA 的质量通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND-1000 (Nano Drop 公司, 美国) 进行检测. 参照陈大福等^[18]的方法进行 cDNA 文库构建. 委托广州基迪奥生物技术有限公司, 采用 Illumina HiSeq 4000 测序平台进行双端测序.

2.2.3 测序数据质控、HEG 筛选及生物信息学分析 对于测序得到的原始读段 (raw reads), 去除含接头 (adapter)、含未知碱基 (N) 的比例大于 10%、低质量的读段, 用 Tophat 软件将过滤得到的有效读段 (clean reads) 映射核糖体数据库, 进而将未比对上的 clean reads 映射东方蜜蜂基因组 (assembly ACSNU-2.0), 将比对上的 clean reads 用于后续的数据分析.

利用 FPKM (Fragment Per Kilobase of per Million mapped reads) 算法计算基因表达量, 公式为 $FPKM = \text{Total exon fragment} / [\text{Mapped fragment (millions)} \times \text{exon length (KB)}]$, 按照 $FPKM > 15$ 的标准从所有表达基因中筛选出 HEG^[19]. 利用在线工具平台 OmicsShare (<http://www.omicshare.com/tools/index.php/Home/Index/index.html>) 对筛选出的共有及特有 HEG 进行 GO 分类及 KEGG pathway 富集分析等相关生物信息学分析.

表 1 RT-PCR 的引物信息

Tab. 1 Information of primers for RT-PCR

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')	预期片段大小/bp
类易化海藻糖转运体编码基因	A-F	GATGCTTCTACTACTGCTGA	294
	A-R	GTGGAATAACTGTTGACTTT	
类胰蛋白酶-1 编码基因	B-F	CAATGGGGATGGTTGTTTCGG	258
	B-R	CAATGGTTTCGCCAGTTTCA	
类磷脂酶 A1 编码基因	C-F	AATACGATTACTTTTACGCT	492
	C-R	ATGTGATTTATCTACTCTGC	
精氨酸激酶亚基 X1 编码基因	D-F	TTGAGGAAATCGCAGGAAAA	238
	D-R	TCTAAAGGACGAATAAAGGG	
类 α 胰蛋白酶-3 编码基因	E-F	GCAACCTCGGAACCAAAAAGC	240
	E-R	TCCAGCCACCATAGGACCAC	
40S 核糖体蛋白 S15 编码基因	F-F	CGCTGTTTCTTGTTGTCGTT	264
	F-R	TGGTTTTTCATTCCGGTGGTG	
类锌羧肽酶编码基因	G-F	TATTCGTATCGCACCTCAG	354
	G-R	TTTTTCTCCAACAACCACT	
类生命必需蛋白 lethal(2) 编码基因	H-F	GCCGATTGGAGTTATGTTTA	446
	H-R	ATTTTGGTTCTGCTGCTGTT	

2.2.4 HEG 的 RT-PCR 验证 为验证本研究 RNA-seq 的数据的可靠性,从 4 组中肠样品的共有 HEG 中随机选取 8 个 HEG 进行 RT-PCR 验证. 根据上述 8 个基因的序列,利用 Primer Premier 5 设计特异性引物,委托福州擎科生物技术有限公司进行引物合成,相关引物序列信息见表 1. 利用试剂盒 AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep(AXYGEN 公司,中国)抽提上述 4 组中肠样品的总 RNA. 以上述总 RNA 作为模板,利用试剂盒 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme 公司,中国)进行反转录,反应步骤按照说明书进行. PCR 反应在 T100 热循环仪(Bio-Rad 公司,美国)上进行,反应体系包括: Mixture 10 μL, ddH₂O 7 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL. 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存. PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 核酸凝胶成像仪(上海培清, 中国)观察拍照.

3 结果与分析

3.1 高通量测序数据概述

本文中蜂工蜂中肠样品共测得 1 809 736 786 条 raw reads, 经严格质控得到 1 562 162 742 条 clean reads, 将未比对上核糖体数据库的 clean reads 映射到东方蜜蜂基因组, Ac7CK、Ac7T、Ac10CK 及

78.13% 和 44.19%; Q30 均达 93.34% 及以上(表 2). 此外, Ac7CK、Ac7T、Ac10CK 及 Ac10T 的 Pearson 相关系数都在 0.872 8 及以上(图 1). 上述结果说明测序样品的重复性较好, 测序数据的质量可满足进一步分析需要.

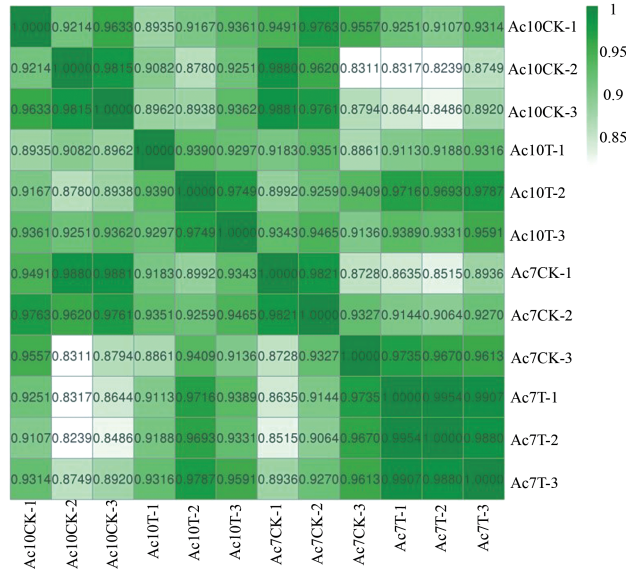


图 1 中蜂工蜂中肠各组样品内不同生物学重复间的 Pearson 相关性

Fig. 1 Pearson correlations among different biological repeats within each *A. c. cerana* worker's midgut sample group

表 2 RNA-seq 数据信息统计

Tab. 2 Summary of RNA-seq datasets

样品	原始读段	有效读段	比对上参考基因组比率/%	99.9% 碱基正确率/%
Ac7CK-1	111 825 446	109 984 026	77.46	94.77
Ac7CK-2	117 584 438	115 737 872	76.77	94.97
Ac7CK-3	143 240 604	140 128 034	73.10	94.07
Ac7T-1	152 978 518	150 634 504	53.90	95.12
Ac7T-2	154 074 074	151 669 178	55.44	95.07
Ac7T-3	217 047 504	213 300 500	55.68	94.68
Ac10CK-1	110 841 204	109 120 786	78.99	95.07
Ac10CK-2	87 175 480	85 637 280	76.33	94.69
Ac10CK-3	99 075 680	97 538 734	79.06	94.98
Ac10T-1	205 810 628	197 162 092	51.18	93.34
Ac10T-2	264 871 994	261 559 618	28.59	95.40
Ac10T-3	145 211 216	142 990 618	52.80	95.01

Ac10T 各组的平均比率为 75.78%、55.01%、

3.2 HEG 的 Venn 分析

根据 FPKM > 15 的标准, 分别从 Ac7CK、Ac7T、Ac10CK 及 Ac10T 中筛选出 3 162、3 311、3 305 和 2 463 个 HEG. Venn 分析结果显示四组样品的共有 HEG 为 2 074 个, 特有 HEG 分别为 89、283、156 和 78 个(图 2).

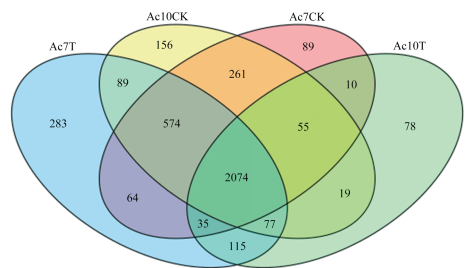


图 2 中蜂工蜂中肠各组样品 HEG 的 Venn 分析
Fig. 2 Venn investigation of HEGs in every *A. c. cerana* worker midgut sample group

3.3 共有及特有 HEG 的 GO 分类

GO 富集分析结果显示, 共有 HEG 主要涉及生物学进程、细胞组分和分子功能三类, 分布于 45 个 GO 条目. 生物进程中, 富集基因数最多的是代

谢进程(409)、细胞进程(380)和单组织进程(314)(图 3A);细胞组分中,富集基因数最多的是细胞(254)、细胞组件(254)和细胞膜(153)(图 3B);分子功能中,富集基因数最多的是结合(385)、催化活性(329)和转运器活性(60)(图 3C).

Ac7CK 特有 HEG 涉及 37 个 GO 条目,基因富集数最多的是细胞进程(204)、代谢进程(196)、结合(191)、催化活性(181)和单组织进程(165);Ac7T 特有 HEG 涉及 35 个 GO 条目,基因富集数最多的是细胞进程(219)、代谢进程(210)、结合(193)、催化活性(189)和单组织进程(183);Ac10CK 特有 HEG 涉及 37 个 GO 条目,基因富集数最多的是细胞进程(230)、代谢进程(223)、结合(217)、催化活性(203)和单组织进程(183);Ac10T 特有 HEG 涉及 28 个 GO 条目,基因富集数最多的是细胞进程(71)、结合(63)、单组织进程(59)、代谢进程(58)和催化活性(51).

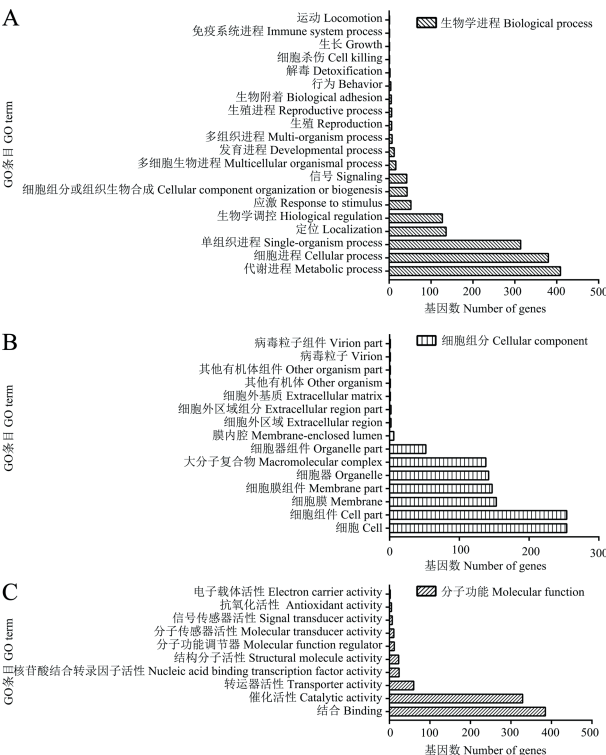


图 3 共有 HEG 的 GO 分类
Fig. 3 GO categorization of the shared HEGs

3.4 共有及特有 HEG 的 KEGG 代谢通路富集分析

KEGG 富集分析结果显示,共有 HEG 富集在 39 条通路,其中基因富集数最多的前 3 位分别是核糖体(90)、氧化磷酸化(63)和蛋白酶体(25)(图 4).

Ac7CK 的特有 HEG 富集在 39 条通路,富集

基因数最多的前 4 位分别是内质网蛋白加工(33)、氧化磷酸化(27)、核糖体(25)和内吞作用(25);Ac7T 的特有 HEG 富集在 39 条通路,富集基因数最多的前 4 位分别是核糖体(32)、氧化磷酸化(29)、内质网蛋白加工(26)和剪接体(23);Ac10CK 的特有 HEG 富集在 39 条通路,富集基因数最多的前 4 位分别是内质网蛋白加工(38)、氧化磷酸化(32)、核糖体(27)、和碳代谢(26);Ac10T 的特有 HEG 富集在 37 条通路,富集基因数最多的前 4 位分别是内质网蛋白加工(8)、PI3K-Akt 信号通路(7)、Wnt 信号通路(6)和 TGF-β 信号通路(5).

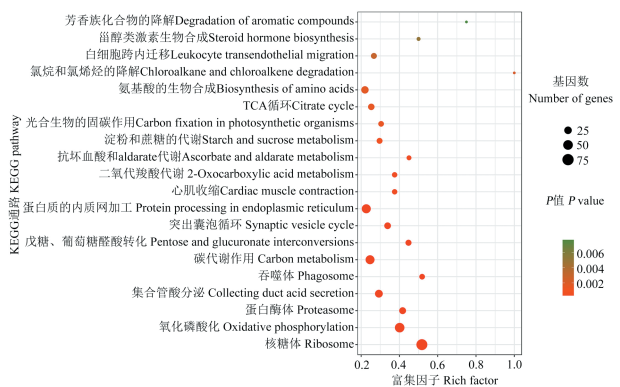


图 4 共有 HEG 的 KEGG 代谢通路富集分析

圆圈大小代表富集在某一通路的基因数多少,越大代表基因数越多;圆圈颜色代表某一通路的富集基因的显著性高低,越红代表显著性越高

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of the shared HEGs

The size of the circle indicates the number of enriched genes in a certain pathway, the bigger the more; the color of the circle indicates the significance of enriched genes in a certain pathway, and the redder the color, the higher the more significant

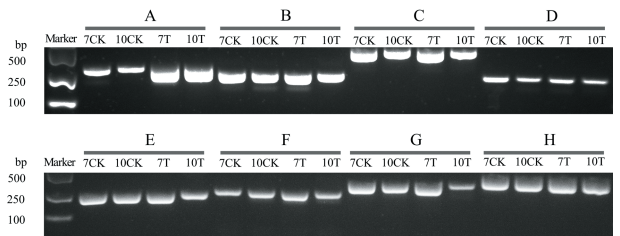


图 5 8 个共有 HEG 的 RT-PCR 验证

A: 类易化海藻糖转运体 *tret1* 编码基因; B: 类胰蛋白酶-1 编码基因; C: 类磷脂酶 A1 编码基因; D: 精氨酸激酶亚基 X1 编码基因; E: 类 α 胰蛋白酶-3 编码基因; F: 40S 核糖体蛋白 S15 编码基因; G: 类羧肽酶编码基因; H: 类生命必需蛋白 *lethal(2)* 编码基因

Fig. 5 RT-PCR verification of eight shared HEGs

A: facilitated trehalose transporter *Tret1*-like encoded gene; B: trypsin-1-like encoded gene; C: phospholipase A1-like encoded gene; D: arginine kinase isoform X1 encoded gene; E: trypsin alpha-3-like encoded gene; F: 40S ribosomal protein S15 encoded gene; G: zinc carboxypeptidase-like encoded gene; H: protein *lethal(2)* essential for life-like encoded gene

3.5 HEG 的 RT-PCR 验证

从 4 个样品共有的 HEG 中随机挑选 8 个进行 RT-PCR 验证,电泳结果显示 8 对引物均能扩增出符合预期的目的条带(图 5),初步证实了本研究预测的 HEG 真实表达。

4 讨论

中蜂是我国养蜂生产的主要蜂种之一,经长期进化已高度适应我国的生态环境.中蜂是 *N. ceranae* 的原始寄主,二者经过长期的协同进化已相互适应,*N. ceranae* 经跨种侵染已扩散至世界各地的西方蜜蜂蜂群.目前,关于 *N. ceranae* 与蜜蜂互作方面的研究主要集中在西方蜜蜂^[20-22].前人也对中蜂与 *N. ceranae* 的互作进行了一些研究,但组学研究较为滞后,相关信息颇为匮乏. Chaimanee 等^[21]曾对 *N. ceranae* 侵染 3、6 和 12 d 的西方蜜蜂(*Apis mellifera*)工蜂进行研究,通过检测 4 种抗菌肽基因(*defensin*、*abaecin*、*apidaecin* 和 *hymenoptaecin*)、*eater* 基因和卵黄原蛋白编码基因(*vitellogenin*)的表达水平,发现 *N. ceranae* 侵染对宿主的体液免疫造成了较强抑制. Sinpoo 等^[22]对西方蜜蜂和东方蜜蜂进行了蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)和 *N. ceranae* 交叉感染试验,发现二种蜜蜂的抗菌肽编码基因和细胞免疫相关基因均显著上调表达,但东方蜜蜂的上皮细胞表现出更强的体液免疫水平且含有更少的孢子数,作者推测东方蜜蜂对 *N. apis* 和 *N. ceranae* 可能具有更强的抵抗力.本研究利用 RNA-seq 技术对正常及 *N. ceranae* 感染的中蜂工蜂中肠进行测序,从正常的 7 和 10 d 工蜂中肠分别筛选出 3 162 及 3 305 个 HEG,从 *N. ceranae* 胁迫的 7 和 10 d 工蜂中肠分别筛选出 3 311 及 2 463 个 HEG. Ac7CK、Ac7T、Ac10CK 和 Ac10T 的共有 HEG 数为 2 074 个,推测这些共有 HEG 对中蜂工蜂中肠的生长和发育中具有重要作用.此外,Ac7T 和 Ac10T 的特有 HEG 数分别为 283 及 78 个,说明随着胁迫时间的延长,宿主应答的特有 HEG 数呈下降趋势,推测这些 HEG 在宿主响应 *N. ceranae* 胁迫的不同阶段发挥特殊作用.本研究中,Ac7CK、Ac7T、Ac10CK 及 Ac10T 各组的平均比率为 75.78%、55.01%、78.13% 和 44.19%,处理组的平均比率明显低于对照组,究其原因,处理组中肠样品包含大量的病原孢子,其测序数据为宿主和病原的混合数据,因病原的 clean reads 无法比对上东方蜜

蜂的参考基因组,势必影响宿主 clean reads 的比对率;而对照组中肠样品的测序数据中绝大部分都为宿主本身的数据,因而 clean reads 的比对率较高.进一步分析发现,处理组和对照组测序得到的 raw reads,以及质控的 clean reads,基本处于同一数量级,因此对后续生物信息学分析的影响很小.

本研究中,Ac7T 和 Ac10T 的特有 HEG 中分别有 219 和 71 个注释到细胞进程,210 和 58 个注释到代谢进程,189 和 51 个注释到催化活性,显示伴随 *N. ceranae* 的入侵,中蜂工蜂中肠的新陈代谢和细胞生命活动处于不同幅度的激活状态,但激活程度随着病原增殖而呈下降趋势.病原微生物入侵昆虫时会遭到宿主细胞免疫和体液免疫的联合抵抗,包括内吞作用、吞噬作用、酶促水解作用、黑化作用以及抗菌肽的合成与释放等^[15].本研究发现,Ac7T 和 Ac10T 的特有 HEG 中分别有 95 和 68 个富集在应激反应,1 和 1 个富集在免疫系统进程,表明中蜂工蜂对 *N. ceranae* 产生了免疫应答且应答水平随胁迫时间的延长有所下降.

本研究中,Ac7T 和 Ac10T 的 210 和 58 个特有 HEG 可注释到 77 和 39 条物质代谢通路,包含碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子与维生素代谢、核苷酸代谢、多糖生物合成与代谢等,进一步说明中蜂工蜂中肠的物质代谢因 *N. ceranae* 胁迫而激活,但激活程度随胁迫时间延长而降低.前期研究中,笔者所在课题组对胁迫中蜂 7 和 10 日龄工蜂中肠的 *N. ceranae* 的共有 HEG 进行了代谢通路分析,发现与物质代谢相关的信号通路多达 43 条,包含碳代谢(15)、糖酵解/糖异生(11)、氧化磷酸化(8)和磷酸戊糖途径(5)等,表明 *N. ceranae* 在侵染过程中的物质和能量代谢较为旺盛(数据未发表).结合本研究中的分析结果,推测 *N. ceranae* 在其增殖过程中一方面增强自身物质和能量代谢以满足核酸和蛋白合成需要,另一方面通过某种操纵策略提高宿主的代谢水平,促使其摄入更多的物质和能量满足中蜂和 *N. ceranae* 的需要,从而利于病原的增殖. Li 等^[23]对新羽化的成年意蜂工蜂接种感染 *N. ceranae*,通过检测宿主体内的脂类含量发现宿主的脂类含量随感染时间的延长而显著降低,作者推测脂质可能是用于维持宿主生长和病原增殖的首选营养物质.本研究发现,Ac7T 和 Ac10T 中分别有 31 和 8 个特有 HEG 富集到 12 和 6 条脂质代谢通路,包括脂肪酸降解、磷脂酰甘油代谢、鞘脂代谢等,表明宿主通过提高脂质的合

成来满足自身和 *N. ceranae* 的需要, 与前人的研究结果一致。前人研究发现在 *N. ceranae* 感染的西方蜜蜂对低浓度的蔗糖溶液可产生伸吻反应, 取食更多的蔗糖溶液, 氧化磷酸化富集基因的数量增加, 表明 *N. ceranae* 对西方蜜蜂造成了能量胁迫^[24-26]。本研究中, Ac7T 和 Ac10T 中分别有 29 和 1 个特有 HEG 富集在氧化磷酸化, 表明 *N. ceranae* 对宿主造成能量胁迫, 与西方蜜蜂的相关研究结果一致。

Toll 样受体是一类富含亮氨酸的重复序列的模式识别受体蛋白质家族, 广泛分布于免疫细胞及某些体细胞的表面, 作为宿主防御反应中的重要组成部分以及先天性免疫和获得性免疫的连接点^[27]。MAPK 属于丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, MAPK 信号通路是一种包括 MAPK、MAPK 激酶激酶、MAPK 激酶的保守三级激酶模式, 共同调节着细胞的生长、分化、增殖及对环境的应激反应、免疫应答、炎症反应等多种细胞生理及病理的过程^[28]。NF- κ B 信号通路通过调节某些抗死亡基因和分子的表达, 介导调节巨噬细胞中的炎症反应及免疫应答^[29]。本研究中, Ac7T 中分别有 3、6 和 1 个特有 HEG 富集在 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路和 NF- κ B 信号通路; Ac10T 中有 1 个特有 HEG 富集在 NF- κ B 信号通路, 但未发现有 HEG 富集在其余两条体液免疫通路。上述结果表明 Toll 样受体等 3 条信号通路在中蜂工蜂响应 *N. ceranae* 胁迫的前期表现活跃, 可能发挥重要的免疫防御作用, 随着胁迫时间的延长, 宿主的 NF- κ B 信号通路在免疫防御中的角色渐趋关键。细胞因子介导的 Jak-STAT 信号通路参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等诸多生物学过程。本研究中, Ac10T 中有 2 个特有 HEG 富集在 Jak-STAT 信号通路, 表明该信号通路被 *N. ceranae* 激活。笔者团队在前期研究中发现对于 *N. ceranae* 胁迫 10 d 的意蜂工蜂中肠, 没有 HEG 富集 Jak-STAT 和 NF- κ B 通路^[15], 表明中蜂和意蜂响应 *N. ceranae* 胁迫的免疫应答存在差异, 值得进一步深入探讨。*N. ceranae* 感染可抑制西方蜜蜂中肠内稳态和细胞凋亡相关基因的表达水平^[15]。本研究发现, Ac7T 中有 2 个特有 HEG 富集在细胞凋亡, Ac10T 中无 HEG 富集在此通路, 推测中蜂工蜂中肠细胞可通过提高相关基因的表达促进细胞凋亡, 以限制 *N. ceranae* 的增殖。

综上所述, 本研究对正常及 *N. ceranae* 胁迫

的中蜂工蜂中肠 HEG 进行了细致深入的生物信息学分析, 提供了宿主的 HEG 表达谱, 揭示了 HEG 在宿主响应 *N. ceranae* 胁迫中的潜在作用。研究结果为在分子水平深入解析中蜂响应 *N. ceranae* 胁迫的应答机制、宿主-病原互作机制提供了有益的信息和线索。

参考文献:

- [1] Goulson D, Hughes W O H. Mitigating the anthropogenic spread of bee parasites to protect wild pollinators [J]. *Biol Conserv*, 2015, 191: 10.
- [2] Aizen M A, Garibaldi L A, Cunningham S A, *et al.* How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production [J]. *An Bot-London*, 2009, 103: 1579.
- [3] 王俊杰. 基于 mtDNA 序列的中华蜜蜂群体遗传结构分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
- [4] 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.
- [5] Ferroglio E, Zanet S, Peraldo N, *et al.* *Nosema ceranae* has been infecting honey bees *Apis mellifera* in Italy since at least 1993 [J]. *J Apicult Res*, 2013, 52: 60.
- [6] Holt H L, Villar G, Cheng W, *et al.* Molecular, physiological and behavioral responses of honey bee (*Apis mellifera*) drones to infection with microsporidian parasites [J]. *J Invertebr Pathol*, 2018, 155: 14.
- [7] Kurze C, Conte Y L, Kryger P, *et al.* Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis [J]. *J Invertebr Pathol*, 2018, 154: 1.
- [8] Pelin A, Selman M, Aris-Brosou S, *et al.* Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen, *Nosema ceranae* [J]. *Environ Microbiol*, 2015, 17: 4443.
- [9] Weinstock G M, Robinson G E, Gibbs R A, *et al.* Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Nature*, 2006, 443: 931.
- [10] Diao Q, Sun L, Zheng H, *et al.* Genomic and transcriptomic analysis of the Asian honeybee *Apis cerana* provides novel insights into honeybee biology [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 822.
- [11] Kribs-Zaleta C M, Mitchell C. Modeling colony collapse disorder in honeybees as a contagion [J].

- Math Biosci Eng, 2017, 11: 1275.
- [12] Chejanovsky N, Ophir R, Schwager M S, *et al.* Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder [J]. *Virology*, 2014, 454: 176.
- [13] Aufaivre J, Misme-Aucouturier B, Bernard V, *et al.* Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e91686.
- [14] Badaoui B, André F, Petit F, *et al.* RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae* [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0173438.
- [15] 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.
- [16] Guo R, Chen D, Xiong C, *et al.* First identification of long non-coding RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae* [J]. *Apidologie*, 2018, 49: 1106.
- [17] 张翌楠, 熊翠玲, 徐细建, 等. 蜜蜂球囊菌的参考转录组 de novo 组装及 SSR 分子标记开发[J]. *昆虫学报*, 2017, 60: 34.
- [18] 陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 等. 胁迫意大利蜜蜂幼虫中肠的球囊菌的转录组分析[J]. *昆虫学报*, 2017, 60: 401.
- [19] 郭睿, 李文东, 陈大福, 等. 意大利蜜蜂幼虫中肠内球囊菌及其纯培养的高表达基因差异分析[J]. *微生物学通报*, 2018, 45: 368.
- [20] Kurze C, Le C Y, Dussaubat C, *et al.* *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0140174.
- [21] Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, *et al.* Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae* [J]. *J Insect Physiol*, 2012, 58: 1090.
- [22] Sinpoo C, Paxton R J, Disayathanoowat T, *et al.* Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response [J]. *J Insect Physiol*, 2017, 105: 1.
- [23] Li W, Chen Y, Cook S C. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees [J]. *Int J Parasitol*, 2018, 48(6): 433.
- [24] Mayack C, Naug D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection [J]. *J Invertebr Pathol*, 2009, 100: 185.
- [25] Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, *et al.* Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae*, and *Nosema apis*, infection of honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Parasitol Res*, 2011, 109: 605.
- [26] Dussaubat C, Brunet J L, Higes M, *et al.* Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera* [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e37017.
- [27] Butcher S K, O'Carroll C E, Wells C A, *et al.* Toll-like receptors drive specific patterns of tolerance and training on restimulation of macrophages [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 933.
- [28] Pietri J E, Cheung K W, Luckhart S. Knockdown of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the midgut of *Anopheles stephensi* mosquitoes using antisense morpholinos [J]. *Insect Mol Biol*, 2015, 23: 558.
- [29] Pires B R B, Silva R C M C, Ferreira G M, *et al.* NF-kappa B: two sides of the same coin [J]. *Genes*, 2018, 9: 24.

引用本文格式:

中文: 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.

英文: Fu Z M, Zhou D D, Chen H Z, *et al.* Analysis of highly expressed genes in *Apis cerana cerana* workers' midguts responding to *Nocema ceranae* stress [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 191.