



意大利蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌 早期胁迫的转录组学分析*

郭睿** 熊翠玲** 郑燕珍 张璐 童新宇 梁勤 陈大福***

(福建农林大学, 蜂学院蜜蜂保护学实验室, 福州 350002)

摘要 【目的】球囊菌特异性地侵染蜜蜂幼虫而导致白垩病, 该病造成成年蜜蜂数量的大幅下降, 从而严重影响蜂蜜等产品的产量。目前, 尚无利用二代测序技术研究白垩病的报道。本研究利用 RNA-seq 技术对正常及球囊菌胁迫后的意大利蜜蜂 4 日龄幼虫肠道进行深度测序, 为解析宿主响应球囊菌胁迫的应答机制提供了重要的参考信息。【方法】利用 Illumina Hiseq 2500 平台对对照组 (AmCK) 和处理组 (AmT) 幼虫肠道进行双端 (PE125) 测序; 利用 Perl 脚本进行下机数据过滤; 利用 R 软件进行测序饱和度分析、计算各样品之间的相关性系数; 利用 SOAP aligner/soap2 软件将未比对上核糖体的读段 (Reads) 比对到意大利蜜蜂参考基因组; 基于 GO 数据库和 KEGG 数据库进行 GO 分类和 KEGG 代谢通路 (Pathway) 富集分析。【结果】RNA-seq 共得到 181 096 194 条原始读段 (Raw reads), 经过滤得到 179 078 764 条有效读段 (Clean reads)。差异表达基因 (DEGs) 分析结果显示上调与下调基因的数量分别为 4 和 20 个。DEG 的基因本体论 (Gene ontology, GO) 分析结果显示, 这些 DEGs 分布于 10 个 GO 分类, 除归入结合 (Binding) 的基因和催化活性 (Catalytic activity) 的部分基因外, 绝大多数 GO 分类上的基因均表现为下调。DEGs 的 KEGG 代谢通路分析结果显示各有 1 个 DEG 分别富集在核糖体和氧化磷酸化且均下调表达。【结论】本研究揭示了意大利蜜蜂幼虫肠道在球囊菌入侵早期的胁迫应答, 为解析宿主响应球囊菌胁迫的应答机制奠定了基础。

关键词 意大利蜜蜂, 幼虫肠道, 球囊菌, 转录组

Transcriptome analysis of *Apis mellifera ligustica* larval gut during the early stage of stress induced by *Ascosphaera apis*

GUO Rui** XIONG Cui-Ling** ZHENG Yan-Zhen ZHANG Lu
TONG Xin-Yu LIANG Qin CHEN Da-Fu***

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract [Objectives] *Ascosphaera apis* specifically infects honey bee larvae leading to chalkbrood disease, resulting in a serious decline in honey bee numbers and the quantity of honey bee products such as honey. High-throughput sequencing technology has not, so far, been used to study chalkbrood. In order to reveal the molecular mechanism regulating the responses of western honey bee larvae to *A. apis*, we used RNA sequencing to sequence the guts of normal and *A. apis*-challenged 4-day-old larvae of *Apis mellifera ligustica*. [Methods] Guts of an AmCK (un-treated group) and AmT (*A. apis*-treated group) were sequenced on an Illumina Hiseq 2500 (PE125) platform and the raw data were filtered with Perl script. Sequencing

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (30800806); 国家现代农业产业技术体系 (蜜蜂) 建设专项 (CARS-44-KXJ7); 建农林大学科技发展资金 (KF2015123)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn; 992355037@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: dfchen826@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-11-25, 接受日期 Accepted: 2017-05-10

saturation analysis and Pearson correlation coefficients were calculated using Program R software. Mapping of reads to the reference genome of *A. mellifera* was conducted using SOAP aligner/soap2 software and GO classification and KEGG pathway enrichment analysis were carried out based on the GO and KEGG databases. **[Results]** 181 096 194 raw reads, and after filtration, 179 078 764 clean reads, were obtained from RNA-seq. The results of differentially expressed gene (DEG) analysis showed that the number of up- and down-regulated genes were 4 and 20, respectively. Gene ontology (GO) classification suggests these DEGs are grouped into 19 GO terms, and that among them, only several genes assigned to binding and catalytic activity were up-regulated. KEGG pathway enrichment analysis indicated that 1 and 1 DEG were enriched in ribosome and oxidative phosphorylation, respectively. **[Conclusion]** Findings in the present study not only reveal larval responses of *A. m. ligustica* to *A. apis* during the early stage of infection, but also lay a foundation for illustration of the molecular mechanisms underlying host responses to *A. apis*.

Key words *Apis mellifera ligustica*, larval gut, *Ascosphaera apis*, transcriptome

蜜蜂是一种重要的社会学模式昆虫,因其在发育学、神经生物学、行为学和病原-宿主相互作用中的重要性而备受关注(Begna *et al.*, 2012; Foret *et al.*, 2012; Galizia *et al.*, 2012; Zayed, 2012; Kurze *et al.*, 2016)。同时,蜜蜂作为最重要的授粉昆虫在农业生产和生态维持中也发挥着巨大作用(Committee on the Status of Pollinators in North America, 2007)。据报道,蜜蜂为全球 70% 的作物和野生植物授粉(Klein *et al.*, 2007, 2010)。蜜蜂易遭受细菌病、真菌病及病毒病等疾病的危害(Evans and Spivak, 2010)。其中,白垩病(Chalkbrood)是一种最常见和最具代表性的蜜蜂真菌病,该病早在 1913 年就在德国首次被报道(Aronstein and Murray, 2010),我国大陆直到 1990 年才发生白垩病(梁勤和陈大福, 2008)。近年来,随着蜂产品全球贸易的快速发展,白垩病呈逐年上升趋势(Aizen *et al.*, 2009)。白垩病的病原是蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*),它能够特异性侵染蜜蜂幼虫,一般在春季和初夏发病,能造成成年蜜蜂数量的大幅下降,严重影响蜂蜜等产品的产量(Bailey, 1963; Zaghoul *et al.*, 2005)。近 20 年来,国内外学者围绕病原分类鉴定、病理学以及侵染过程等方面对白垩病开展了一系列研究。本课题组前期也在球囊菌的病理和检测方面开展了较为系统的研究,如梁勤等(2001)从碳源、氮源、维生素和矿质元素等方面研究了营养生态条件对球囊菌生长及产孢的影响,发现营养生态条件的变化对球囊菌的影响极大;郑志阳等(2011)对健康及白垩病患蜂蜜蜂幼虫血淋巴进行 SDS-PAGE 电泳以及蛋白

酶和酯酶的活性染色,发现健康幼虫血淋巴中的蛋白含量丰富且主要由 4 种高分子质量的蛋白组成,而患病幼虫血淋巴中的蛋白含量非常少,主要蛋白组分被降解。

西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组信息的公布为其分子生物学研究提供了宝贵契机。Evans 等(2006)在蜜蜂细胞内鉴定出了大多数 NF- κ B 信号通路中的基因,如 *Dorsal* 的 2 个同系物,但都不与 *Dif* 直系同源,表明 *Dif* 是仅存在于果蝇的特化分支而不存在于其它昆虫;Aronstein 等(2010)利用 cDNA-AFLP 和 RT-qPCR 技术对健康及球囊菌感染的蜜蜂幼虫进行测序研究,结果表明 DEGs 参与了能量代谢和蛋白转运,其中的类几丁质编码基因有可能参与了蜜蜂幼虫对球囊菌的抵御。Cornman 等(2013)利用 RNA-seq 技术对幼虫芽孢杆菌(*Paenibacillus larvae*)感染后 12 h 和 72 h 的蜜蜂幼虫进行测序,鉴定出 75 个显著上调基因和 6 个显著下调基因,其中若干编码抗菌肽基因和 2 个编码围食膜基质基因显著上调;Julie 等(2014)通过 RNA-seq 研究了东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)和杀虫剂单独或共同饲喂的意大利蜜蜂中肠转录组,结果表明 *N. ceranae* 和杀虫剂并无协同效应,长期暴露于杀虫剂环境抑制了宿主免疫基因的表达。

本研究利用 RNA-seq 技术对正常及球囊菌胁迫的意大利蜜蜂 4 日龄幼虫肠道进行深度测序,进而对 DEGs 进行 Gene ontology (GO) 和 KEGG 代谢通路 (Pathway) 分析,研究结果揭示了意大利蜜蜂幼虫肠道在球囊菌入侵早期的

胁迫应答,也为深入理解宿主响应球囊菌胁迫的应答机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料

本研究中的意大利蜜蜂幼虫取自福建农林大学蜂学学院教学蜂场,球囊菌菌株由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护实验室分离与保存。

1.2 主要实验试剂及仪器

RNase-Free 水购自中国上海生工生物公司, DNase 和 Oligotex mRNA Kits Midi 试剂盒购自德国 Qiagen 公司,高碘酸钠购自美国 Sigma 公司, RNA Reagent 抽提试剂盒、Ex Taq polymerase 及 Superscript reverse transcriptase 均购自日本 TaKaRa 公司, Dynal M280 磁珠购自 Invitrogen 公司, DNA ligase 购自美国 Thermo 公司, 纯化 cDNA 的 Ampure beads 为美国 Agencourt 产品, cDNA 文库构建试剂盒 TruSeqTMDNA Sample Prep Kit -Set A 为美国 Illumina 公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

倒置显微镜为上海光学仪器五厂产品,超纯水仪购自四川沃特爾水处理设备有限公司,恒温恒湿气候箱购自宁波江南仪器厂, pH 计购自上海仪电科学股份有限公司,高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司,超净工作台为苏州安泰空气技术有限公司产品,凝胶成像系统为中国上海培清科技有限公司产品,PCR 仪为美国 BIO-RAD 公司产品,超低温冰箱为中国中科美菱公司产品。

1.3 球囊菌活化、孢子纯化及计数

超净台紫外灭菌 20 min 后通风 5 min,将镊子在酒精灯上灼烧片刻,冷却后夹取少量球囊菌菌丝在培养基中央 2 cm 圆心区域内划线操作,置于生化箱 37℃ 恒温培养。接种 10 d 以后,待培养皿上黑色孢子囊较多时,刮至干净的 EP 管中,充分研磨,按照 Jensen 等 (2013) 的方法离心纯化,梯度稀释后用血球计数板对孢子进行计数。

1.4 意大利蜜蜂幼虫的人工饲养及肠道样品准备

参照李江红等 (2012) 的方法对意大利蜜蜂幼虫进行人工饲养。用移虫针将 2 日龄幼虫从群势较强的意大利蜜蜂蜂群移入无菌的 24 孔细胞培养板 (孔内加有 35℃ 预温的饲料, 1 只/孔), 35℃, 70% 相对湿度 (RH) 条件下饲养。每隔 24 h 更换饲料。预先配制添有蜜蜂球囊菌孢子的人工饲料,混匀后调整孢子浓度至 1×10^7 孢子/m。处理组 3 日龄幼虫饲喂含球囊菌孢子的饲料,对照组 3 日龄幼虫饲喂不含孢子的正常饲料。本实验进行 3 次生物学重复。

肠道组织不仅是蜜蜂抵御病原入侵的重要免疫器官,也是球囊菌孢子和萌发的主要场所。因此,本研究将幼虫肠道作为测序样品。分别剖取对照组和处理组 4 日龄幼虫肠道组织和处理组 4 日龄幼虫肠道组织 (AmCK 和 AmT)。每剖取 1 只幼虫肠道,迅速将肠道移至 RNA Free 的 EP 管并投入液氮速冻,待一组肠道样品集齐后,转移保存于 -80℃。每个样品含 7 只幼虫肠道。

1.5 cDNA 文库构建及 Illumina 测序

利用 RNAiso Reagent 试剂盒抽提处理组和对照组意大利蜜蜂幼虫肠道组织的总 RNA,然后用 RNase-free DNaseI 去除基因组 DNA 残留。RNA 的质量通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) 进行检测。参照陈大福等 (2017) 的方法构建 cDNA 文库。委托广州基迪奥生物科技有限公司对上述幼虫肠道样品进行测序,测序平台采用 Illumina Hiseq2500,策略为双端测序 (PE125)。

1.6 数据分析

对于下机数据,利用 Perl 脚本去除含有 Adaptor、未知核苷酸比例大于 5% 和低质量 Reads,获得有效读段 (Clean reads)。利用 R 软件 (Version 2.16.2) 进行测序饱和度分析。使用短 Reads 比对工具 Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) 将 Clean reads 比对到核糖体数据库 (最多允许 5 个错配),去除比对上核糖体的 Reads,

将保留下来的数据用于转录组的组装及分析,进而利用 SOAP aligner/soap2 软件 (Hurgobin, 2016) 将未比对上核糖体的 reads 比对到意大利蜜蜂参考基因组 (Amel_4.5, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/48?genome_assembly_id=22683)。

利用 FPKM (Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads) 法计算基因表达量。利用 R 软件 (Version 2.16.2) 计算各样品之间的相关性系数。利用 edgeR 软件 (Robinson *et al.*, 2010) 进行 DEGs 分析。DEGs 的筛选标准为 $FDR \leq 0.05$, $|\log_2 \text{Fold change}| \geq 1$ 。

将 DEGs 向 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 的各条目 (Term) 映射, 并计算每个 Term 的富集基因数, 然后应用超几何检验, 找出与整个基因组背景相比, 在 DEGs 中显著富集的 GO 条目。KEGG 代谢通路显著性富集分析以 Pathway 为单位, 应用超几何检验, 找出与整个基因组背景相比, 在 DEGs 中显著性富集的 Pathway。

2 结果与分析

2.1 Illumina 测序数据质控与评估

Illumina 双端测序数据的质量与数量详见表 1。意大利蜜蜂幼虫肠道样品的转录组测序共测得 181 096 194 条 Reads, 经过滤得到 179 078 764 条 Clean reads, 各样品 Clean reads 数均在 28 774 864 (98.72%) 以上。两端平均 Q20

(99% 碱基正确率) 为 97.56%, 两端平均 Q30 为 (99.9% 碱基正确率) 为 93.85%。随着测序量的增多, 检测到的基因数也随之上升、增长速度趋于平缓, 说明检测到的基因数趋于饱和。AmCK 与 AmT 的组内各生物学重复之间的相关性均高于 0.9739, 说明样本的重复性高。

RNA-seq 数据比对意大利蜜蜂参考基因组情况统计显示, 各样品 Clean reads 比对上参考基因组的比例均在 87.94% 以上。上述结果表明转录组测序数据质量较好, 可用于下一步分析。本研究测得转录组数据已上传美国国家生物技术信息中心 (NCBI) SRA 数据库, SRA 号为 SRA456722。对比对上参考基因组的转录本进行组装与合并, 合并后得到的转录本再次比对参考基因组, 结果显示 AmCK 与 AmT 中检测到的已知基因分别有 11 068 和 11 022, 而新基因均为 189 个 (表 2)。

2.2 DEGs 分析

DEGs 分析结果显示, 球囊菌胁迫的意大利蜜蜂 4 日龄幼虫肠道共有 24 个基因差异表达 (图 1), 包括 4 个上调基因, 分别为 E3 泛素蛋白连接酶编码基因 (gene13277) 类欧米茄芋螺毒素蛋白 1 编码基因 (XLOC_003943) 未知蛋白编码基因 (XLOC_005277), 血管假性血友病因子编码基因 (gene5125), 20 个下调基因分别为抗菌肽前体 22 编码基因 (gene13543) 角质层蛋白前体编码基因 (gene11581) 蛹角质层蛋白编

表 1 RNA-seq 数据统计
Table 1 Overview of RNA-seq data

样品 Samples	原始数据 Raw reads	有效读段 Clean reads	99%碱基正确率 (%) Q20 (%)	99.9%碱基正确率 (%) Q30 (%)
AmCK-1	31 148 146	30 802 898 (98.89%)	3 790 735 516 (98.45%)	3 707 110 328 (96.28%)
AmCK-2	31 152 632	30 802 898 (98.88%)	3 794 986 047 (98.56%)	3 715 485 524 (96.50%)
AmCK-3	30 237 796	29 884 378 (98.83%)	3 673 655 065 (98.34%)	3 584 143 282 (95.95%)
AmT-1	28 774 864	28 407 618 (98.72%)	3 489 845 349 (98.28%)	3 404 427 770 (95.87%)
AmT-2	29 564 924	29 262 394 (98.98%)	3 598 466 384 (98.38%)	3 512 772 090 (96.04%)
AmT-3	30 217 832	29 918 578 (99.01%)	3 686 583 925 (98.58%)	3 610 275 570 (96.54%)

AmCK-1、AmCK-2 和 AmCK-3 为 AmCK 的 3 个生物学重复; AmT-1、AmT-2 和 AmT-3 为 AmT 的 3 个生物学重复。AmCK-1, AmCK-2 and AmCK-3 represent three biological replicates of AmCK; AmT-1, AmT-2 and AmT-3 represent three biological replicates of AmT.

表 2 AmCK 与 AmT 的基因数统计

Table 2 Summary of number of genes in AmCK and AmT

样品	已知基因	新基因	总基因数
Samples	Known genes	New genes	Total genes
AmCK	11 068 (81.43%)	189	11 257
AmT	11 022 (81.09%)	189	11 211

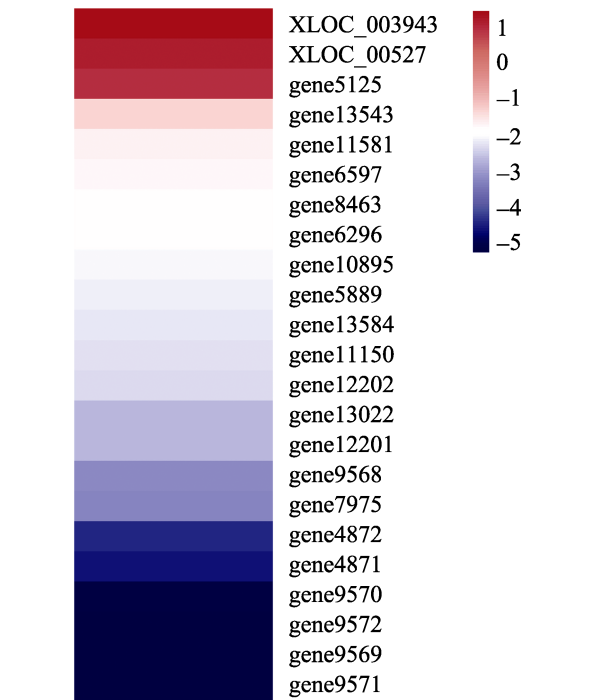


图 1 AmCK vs AmT 中 DEGs 的表达量聚类

Fig. 1 Clustering of expression of DEGs in AmCK vs AmT

码基因 (gene6597) 抗菌肽 Abaecin 编码基因 (gene8463) 类 app1 蛋白编码基因 (gene6296) 类结构化糖蛋白编码基因 (gene10895) 类兜甲蛋白编码基因 (gene5889) 细胞色素 c 氧化酶亚基 III 编码基因 (gene13584) 角质层蛋白 6 编码基因 (gene11150) 角质层蛋白前体 1 编码基因 (gene12202) 类 9B1 钠氢交换器编码基因 (gene13022) 角质层蛋白前体 2 编码基因 (gene12201) 未知含自水解酶结构域蛋白编码基因 (gene9568) 40S 核糖体蛋白编码基因 (gene7975) 假定的富含亮氨酸的重复单位蛋白编码基因 (gene4872) 未知类 PFB0145c 蛋白编码基因 (gene4871) 丝纤蛋白前体 2 编码基因 (gene9570) 丝纤蛋白前体 4 编码基因

(gene9572)、丝纤蛋白前体 1 编码基因 (gene9569)、丝纤蛋白前体 3 编码基因 (gene9571)。如图 1 所示, DEGs 在 AmCK 与 AmT 中的表达量差异明显, 多数基因表达水平表现为下调。上述结果说明下调基因的数量远多余上调基因, 球囊菌入侵对这些基因的表达产生了抑制。

2.3 DEGs 的 GO 分类

GO 分类结果显示, DEGs 分为生物学进程 (Biological process)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function), 共分布于 19 个 GO term, 包括细胞进程 (Cellular process) 免疫系统进程 (Immune system process) 定位 (Localization) 代谢进程 (Metabolic process) 多组织进程 (Multi-organism process) 应激反应 (Response to stimulus) 单组织进程 (Single-organism process) 细胞 (Cell) 细胞组件 (Cell part) 大分子复合物 (Macromolecular complex) 细胞膜 (Membrane) 细胞膜组件 (Membrane part) 细胞器 (Organelle) 细胞器组件 (Organelle part) 结合 (Binding) 催化活性 (Catalytic activity)、电子转运活性 (Electron carrier activity)、结构分子活性 (Structural molecule activity) 以及转运活性 (Transporter activity) (图 2)。其中, 除归入结合的基因和催化活性的部分基因外, 绝大多数 GO term 上的富集基因均表现为下调, 进而说明球囊菌在胁迫早期对意大利蜜蜂幼虫肠道的基因表达产生较强的抑制。

2.4 DEGs 的 KEGG 代谢通路富集分析

KEGG 代谢通路富集分析结果显示, 分别有 1 个 DEG 富集在核糖体 (Ribosome, ko03010) 和氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation, ko00190) 代谢通路上且均下调表达 (图 3)。核糖体是蛋白质合成的场所。有机物包括糖类、脂类和蛋白质等在分解过程中的氧化步骤所释放的能量, 从而驱动 ATP 合成的过程。上述结果说明球囊菌在胁迫早期对意大利蜜蜂幼虫肠道的蛋白合成系统及能量代谢系统产生负面影响。

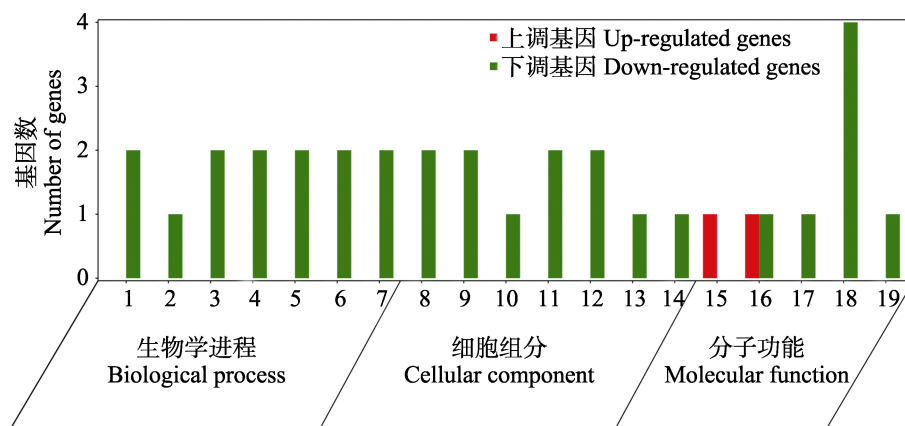


图 2 DEGs 的 GO 分类

Fig. 2 GO classification of DEGs

1 :细胞进程 Cellular process ;2 :免疫系统进程 Immune system process ;3 :定位 Localization ;4 :代谢进程 Metabolic process ;5 :多组织进程 Multi-organism process ;6 :应激反应 Response to stimulus ;7 :单组织进程 Single-organism process ;8 :细胞 Cell ;9 :细胞组件 Cell part ;10 :大分子复合物 Macromolecular complex ;11 :细胞膜 Membrane ;12 :细胞膜组件 Membrane part ;13 :细胞器 Organelle ;14 :细胞器组件 Organelle part ;15 :结合 Binding ;16 :催化活性 Catalytic activity ;17 :电子载体活性 Electron carrier activity ;18 :结构分子活性 Structural molecule activity ;19 :转运器活性 Transporter activity.

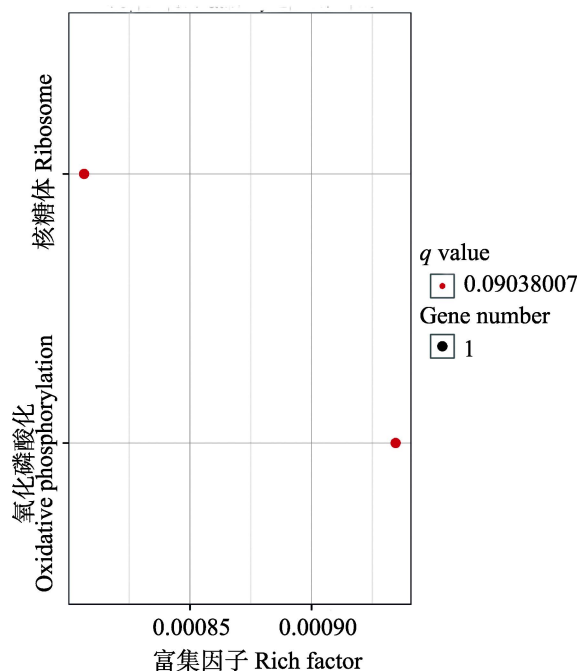


图 3 DEGs 的 KEGG 代谢通路富集分析

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of DEGs

3 讨论与结论

白垩病对西方蜜蜂危害严重,长期困扰养蜂生产。本研究中,我们利用 Illumina Hiseq 2500 平台对正常及球囊菌胁迫的意大利蜜蜂 4 日龄

幼虫肠道进行测序,进而对宿主的胁迫应答进行分析。肠道作为昆虫的重要免疫器官,在病原微生物入侵防御过程发挥重要作用。本研究选择意大利蜜蜂幼虫肠道作为测序对象,其转录组变化能更为精确地反映宿主响应球囊菌早期胁迫的应答。

本研究在转录组数据分析时,发现有部分 Reads 不能 Mapping 到已公开的西方蜜蜂参考基因组序列,这些 Reads 可能是目前尚未克隆得到的新基因序列,有可能在意大利蜜蜂幼虫肠道的发育、代谢和免疫中具有重要功能。在 AmCK 和 AmT 中分别检测到已知基因数约占已公开西方蜜蜂 cDNA 的 81.43%和 81.09%,推测部分未检测到的基因可能在意大利蜜蜂 4 日龄幼虫肠道不表达。此外,本研究还检测到的 189 个新基因将进一步完善已公布的西方蜜蜂参考基因组。

本研究发现与正常幼虫肠道相比,球囊菌胁迫的幼虫肠道的 DEGs 总数只有 24 个,表明宿主在球囊菌胁迫早期的基因应答处于水平较低水平。而下调基因的数量(20 个)远多于上调基因(4 个),则表明球囊菌对意大利蜜蜂幼虫肠道的基因表达产生一定程度的抑制。本研究发现这

些 DEGs 涉及 19 个功能分类, 表明球囊菌的胁迫对意大利蜜蜂幼虫肠道的生长发育、新陈代谢及免疫应答产生较为广泛的抑制作用。本研究中有 2 个 DEGs 富集在核糖体和氧化磷酸化, 表明球囊菌对宿主的蛋白合成系统和能量代谢系统产生抑制。之所以仅有 2 个 DEGs 有代谢通路注释, 主要原因在于 KEGG 数据库是一个不断丰富和完善的数据库, 需要测序信息和实验数据的持续补充。

多数昆虫中肠内侧有一层围食膜, 由几丁质和蛋白质构成, 其作为第一道物理屏障能够阻挡经口摄入的病原微生物的入侵 (Peng *et al.*, 1999; Vuocolo *et al.*, 2001; Wang and Granados, 2001)。角质层蛋白是构成围食膜的主要成分之一。本研究发现有 5 个角质层蛋白编码基因下调表达, 说明球囊菌可能通过某种病原-宿主互作来促进自身的侵染过程。当物理屏障被病原突破后, 昆虫的细胞和体液防御系统, 包括黑化作用、吞噬作用、细胞内吞、酶促降解以及分泌抗菌肽等随即被启动 (Gliński and Jarosz, 2001; Gliński and Buczek, 2003)。本研究中, 宿主的 2 个抗菌肽编码基因表达水平下调, 表明球囊菌对意大利蜜蜂幼虫的免疫产生抑制。养蜂生产中, 意大利蜜蜂幼虫较之中华蜜蜂幼虫更易受球囊菌侵染而罹患白垩病, 二种蜜蜂幼虫的球囊菌抗性差异或许与不同蜂种个体水平的免疫应答差异有关, 意大利蜜蜂及中华蜜蜂幼虫的球囊菌抗性差异机制的阐明有待于分子水平的深入研究。

迄今尚无一种杀真菌剂被批准应用于养蜂生产 (Galizia *et al.*, 2012; 晏励民等, 2013), 目前主要通过改善养蜂管理、保持清洁卫生以及选育抗病品系对白垩病进行预防 (Gilliam *et al.*, 1988), 但效果并不理想, 亟需有效的防治策略。在本研究的基础上对球囊菌胁迫后的各日龄意大利蜜蜂幼虫肠道进行转录组测序, 通过趋势分析 (Lu *et al.*, 2014) 或基因权重共表达分析 (WGCNA) (Udyavar *et al.*, 2013) 方法筛选得到宿主响应胁迫的关键应答基因, 进而利用 RNAi 等技术研究其功能, 是本课题组下一步的

研究方向。

综上所述, 本研究率先利用 RNA-seq 技术对正常及球囊菌胁迫的意大利蜜蜂幼虫肠道进行转录组分析, 研究结果为解析意大利蜜蜂幼虫响应球囊菌胁迫的应答机制、关键应答基因的筛选和功能验证奠定了基础。

参考文献 (References)

- Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM, 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*, 103(9): 1579–1588.
- Aronstein KA, Murray KD, 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(Suppl. 1): S20–S29.
- Aronstein KA, Murray KD, Saldivar E, 2010. Transcriptional responses in honey bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC Genomics*, 11(1): 391.
- Bailey L, 1963. Infectious Diseases of the Honeybee. London: Land Books. 1.
- Begna DHB, Feng M, Li J, 2012. Differential expression of nuclear proteomes between honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae: a deep insight into caste pathway decisions. *J. Proteome Res.*, 11(2): 1317–1329.
- Chen DF, Guo R, Xiong CL, Liang Q, Zheng YZ, Xu XJ, Huang ZJ, Zhang ZN, Zhang L, Li WD, Tong XY, Xi WJ, 2017. Transcriptome analysis of *Ascosphaera apis* stressing larval gut of *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica*, 60(4): 401–411. [陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 梁勤, 郑燕珍, 徐细建, 黄枳健, 张翌楠, 张璐, 李汶东, 董新宇, 席伟军, 2017. 胁迫意大利蜜蜂幼虫肠道的球囊菌的转录组分析. *昆虫学报*, 60(4): 401–411.]
- Committee on the Status of Pollinators in North America, 2007. Status of Pollinators in North America. Washington: National Academies Press. 11–14.
- Cornman RS, Lopez D, Evans JD, 2013. Transcriptional response of honey bee larvae infected with the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 8(6): e65424.
- Elke G, 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87(1): 87–97.
- Evans JD, Aronstein KA, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 645–656.
- Evans JD, Spivak M, 2010. Socialized medicine: individual and

- communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(1): S62–S72.
- Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng SH, Jacobsen SE, Robinson GE, Maleszka R, 2012. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109(13): 4968–4973.
- Galizia CG, Eisenhardt D, Giurfa M, Menzel R, 2012. Honeybee Neurobiology and Behavior: a Tribute to Randolph Menzel. Dordrecht Netherlands. New York: Springer. 2.
- Gliński Z, Jarosz J, 2001. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta*, 36: 12–24.
- Gliniski Z, Buczek K, 2003. Response of the *Apoidea* to fungal infections. *Apiacta*, 38(2): 183–189.
- Gilliam M, Taber S, Lorenz BJ, Prest DB, 1988. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bee, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 52(2): 314–325.
- Hurgobin B, 2016. Short Read Alignment Using SOAP2. *Methods Mol. Biol.*, 1374: 241–252.
- Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M, 2013. Standard methods for fungal brood disease research. *Method*, 52(1): 1–20.
- Julie A, Barbara MA, Bernard V, Catherine T, Frédéric D, Nicolas B, 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE*, 9(3): e91686.
- Kurze C, Routtu J, Moritze, 2016. Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*, 119(4): 290–297.
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B.*, 274(1608): 303–313.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL, 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, 10(3): R25.
- Liang Q, Chen DF, 2008. Honeybee Protection. Beijing: China Agriculture Press. 83–84. [梁勤, 陈大福, 2008. 蜜蜂保护学. 北京: 中国农业出版社. 83–84.]
- Liang Q, Chen DF, Wang JD, 2001. Effects on the mycelia growth and spore-forming of *Ascosphaera apis* under ecological condition of nutrients. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, (9): 31–34. [梁勤, 陈大福, 王建鼎, 2001. 营养生态条件对蜜蜂球囊菌生长及产孢的影响. 中国生态农业学报, (9): 31–34.]
- Li JH, Zheng ZY, Chen DF, Liang Q, 2012. Factors influencing *Ascosphaera apis* infection on honeybee larvae and observation on the infection process. *Acta Entomologica Sinica*, 55(7): 790–797. [李江红, 郑志阳, 陈大福, 梁勤, 2012. 影响蜜蜂球囊菌侵染蜜蜂幼虫的因素及侵染过程观察. 昆虫学报, 55(7): 790–797.]
- Lu XY, Kim H, Zhong SL, Chen HB, Hu ZQ, Zhou BY, 2014. *De novo* transcriptome assembly for rudimentary leaves in *Litchi chinensis* Sonn. and identification of differentially expressed genes in response to reactive oxygen species. *BMC Genomics*, 15(1): 805.
- Peng JX, Zhong J, Granados RR, 1999. A baculovirus enhancer alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.*, 45(2): 159–166.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK, 2010. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139–140.
- Udyavar AR, Hoeksema MD, Clark JE, Zou Y, Tang ZJ, Li ZG, Li M, Chen HD, Statnikov A, Shyr Y, Liebler DC, Field J, Eisenberg R, Estrada L, Massion PP, Quaranta V, 2013. Co-expression network analysis identifies Spleen Tyrosine Kinase (SYK) as a candidate oncogenic driver in a subset of small-cell lung cancer. *BMC System Biology*, 7(Suppl 5): S1.
- Vuocolo T, Eisemann CH, Pearson RD, Willadsen P, Tellam RL, 2001. Identification and molecular characterisation of a peritrophin gene, *peritrophin-48*, from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(9): 919–932.
- Wang P, Granados RR, 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. *Insect Biochem. Physiol.*, 47(2): 110–118.
- Yan LM, Liu YZ, Liu F, Su SK, 2013. Progress in research on resistance to chalkbrood in honeybees. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(6): 1700–1705. [晏励民, 刘元珍, 刘芳, 苏松坤, 2013. 蜜蜂抗白垩病机制的研究进展. 应用昆虫学报, 50(6): 1700–1705.]
- Zaghloul OA, Mourad AK, Kady MBE, Nemat FM, Morsy ME, 2005. Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt. *Communications in Agricultural & Applied Biological Sciences*, 70 (4): 703–714.
- Zayed ARG, 2012. Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: lessons from the honey bee. *Annu. Rev. Genet.*, 46: 591–615.
- Zheng ZY, Li JH, Liang Q, Chen DF, 2011. *Ascosphaera apis* secretes multiple extracellular enzymes to infect honeybee larvae. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, (40): 280–284. [郑志阳, 李江红, 梁勤, 陈大福, 2011. 蜜蜂球囊菌分泌多种胞外酶侵染蜜蜂幼虫. 福建农林大学学报(自然科学版), 40(3): 280–284.]