

羽化和性成熟时中华蜜蜂蜂王和雄蜂转录组分析

吴小波, 王子龙, 李淑云, 甘海燕, 刘浩, 颜伟玉, 曾志将*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要:【目的】为了系统了解中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蜂王和雄蜂转录组特征, 丰富蜜蜂转录组数据信息。【方法】本研究利用高通量测序的方法分别检测中华蜜蜂蜂王和雄蜂刚出房、性成熟时期以及性成熟期蜂王生殖系统和雄蜂生殖系统之间转录组表达差异。【结果】经过测序获得质量值不低于 20 的碱基比例(Q20)均高于 90%; 所有 reads 组装成 90 839 个 unigenes, 平均长度 1 549 bp; 基于 5 个数据库(NR, Swiss-Prot, GO, COG 和 KEGG)进行比对, 共有 45 112 个 unigenes 被注释。差异基因表达分析发现, 与刚出房时相比, 性成熟的蜂王和雄蜂均在表皮蛋白、细胞色素 P450、气味结合蛋白等家族基因上存在显著差异表达, 而且这些差异表达基因与蜜蜂生长发育和性成熟过程中蜜蜂骨骼发育、生殖系统发育、嗅觉发育等方面有关; 性成熟蜂王与性成熟雄蜂之间以及它们生殖系统之间在气味结合蛋白基因方面存在显著差异。【结论】结果表明, 中华蜜蜂在性成熟过程中, 体内大量基因的表达发生了变化。这些结果揭示了中华蜜蜂性成熟发育的整体基因表达特征, 在得到大量转录组 unigene 序列的同时, 获得了一批与蜜蜂性成熟有关的基因序列, 为深入开展中华蜜蜂生长发育与繁殖研究提供了丰富的数据资源。

关键词: 中华蜜蜂; 蜂王; 雄蜂; 生殖系统; 发育; 转录组

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2014)08-0905-09

Transcriptomic analysis of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) queens and drones newly emerged and sexually matured

WU Xiao-Bo, WANG Zi-Long, LI Shu-Yun, GAN Hai-Yan, LIU Hao, YAN Wei-YU, ZENG Zhi-Jiang* (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to understand the transcriptome characteristics of queens and drones of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, and enrich the transcriptome data. 【Methods】 The transcriptomes of queens and drones newly emerged and sexually matured were constructed and analyzed by RNA-seq. 【Results】 The results showed that the proportion of nucleotides with quality value larger than 20 in reads (Q20) were more than 90% and all the reads were assembled into 90 839 unigenes with a mean length of 1 549 bp. Based on sequence similarity search against five public databases (NR, Swiss-Prot, GO, COG and KEGG), a total number of 45 112 unigenes were annotated. Using these transcriptome data as the reference sequences, we found that the genes encoding cuticular proteins/apidermins, CYP and odorant binding proteins were differentially expressed between the sexually matured bees and the newly emerged bees which are related to the development of body, reproductive system and olfaction system. Meanwhile, the odorant binding protein genes were significantly differentially expressed between the sexually matured queens and drones as well as their reproductive system. 【Conclusion】 The results indicated that the expression levels of a large number of genes changed during maturing of *A. cerana cerana* bees. This study made an insight into the characteristics of the development in adult queen and drone, and a lot of transcript sequences with important function were acquired for future gene expression or regulation research relative to the growth, development and reproduction in *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; queen; drone; reproductive system; development; transcriptome

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国特有的宝贵蜜蜂资源, 也是东方蜜蜂指名亚种。与西方蜜蜂

Apis mellifera 相比, 中华蜜蜂具有嗅觉灵敏, 善于利用零星蜜粉源, 飞行临界温度低, 有利于冬季部分植

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060327); 国家蜂产业技术体系岗位专家项目(CARS-45-KXJ12); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ13280)

作者简介: 吴小波, 男, 1983年生, 江西进贤人, 博士, 讲师, 主要从事养蜂学教学与研究工作, E-mail: wuxiaobo21@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2014-04-03; 接受日期 Accepted: 2014-07-03

物授粉和冬蜜生产,蜂群的抗螨性能强等优势(曾志将,2009)。然而,由于杀虫剂和除草剂在现代农业中的广泛应用,给蜜蜂健康养殖带来了巨大威胁(Frazier *et al.*, 2008;代平礼等,2009;Henry *et al.*, 2012;Whitehorn *et al.*, 2012)。另外,由于西方蜜蜂的进入,导致中华蜜蜂种群数量与分布区域明显缩小(季荣等,2003;杨冠煌,2005),因而,合理利用和保护我国这特有的蜜蜂资源势在必行。

蜜蜂为了提高蜂群的延续性和适应性,已进化出其特殊的竞争交尾机制,即婚飞行为。蜂王和雄蜂只有到达性成熟,才会选择合适的机会进行婚飞,这也说明在性成熟发育过程中,蜂王和雄蜂体内发生了明显的生理变化,而且蜜蜂在不同发育阶段,其体内相关基因表达调控也存在明显区别,并已经在蜜蜂生理生化和分子水平上得到证实(Kocher *et al.*, 2008, 2010;Colonello-Frattini and Hartfelder, 2009;Behura and Whitfield, 2010;Chen *et al.*, 2010;Fang *et al.*, 2012;吴小波等,2012;曾晶等,2012;石元元等,2012;刘芳,2012)。性成熟处女蜂王在进行婚飞过程中,其体内发生了大量的基因表达差异(吴小波等,2013a, 2013b;Wu *et al.*, 2014)。研究还发现,西方蜜蜂会干扰中华蜜蜂处女蜂王交配,并推测中华蜜蜂性成熟处女蜂王分泌的性引诱信息素不但会吸引中华蜜蜂的雄蜂来交尾,而且还会吸引大量西方蜜蜂的雄蜂,从而使中华蜜蜂蜂王交尾成功率大幅度下降(王启发等,2003)。蜂王和雄蜂作为两种性别的个体,其性成熟时期体内的生理状况也不一样,但对其差异及相关调控机理尚未深入研究。

近年来,随着高通量测序技术的不断发展与完善,昆虫的转录组学得到快速发展(张棋麟等,2013),而且蜜蜂转录组研究取得了阶段性研究成果,但关于中华蜜蜂转录组研究报道较少,仅对中华蜜蜂整体转录情况进行了初步探索(Wang *et al.*, 2012),缺少对中华蜜蜂不同发育阶段的转录组表达信息的了解,尤其是性成熟发育阶段。本研究拟通过转录组测序,全面探讨中华蜜蜂蜂王和雄蜂在性成熟时与刚出房时的转录组基本信息,并初步分析了性成熟时期蜂王生殖系统与雄蜂生殖系统的转录组信息,了解中华蜜蜂在性成熟过程中特定基因的表达情况,为深入研究中华蜜蜂性成熟的发育机制、主要相关基因克隆以及功能分析等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

实验蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂,其蜂群各含有1头同批次且交尾成功的新蜂王。蜜蜂自由出巢采集,不进行人工饲喂。

1.2 样品的采集

蜂王:按照标准的人工育王方法培育中华蜜蜂蜂王(曾志将,2009),待中华蜜蜂蜂王出台后,立即采集刚出房的蜂王,迅速用解剖剪从蜂王侧面解剖并剔除蜂王体内的消化道,放入液氮中保存,待提取RNA。

按照同样的方法培育中华蜜蜂蜂王,将新出房的处女王囚入王笼并放入无王区。处女蜂王出房12 d后,采集性成熟处女蜂王,并剔除蜂王体内的消化道,放入液氮中保存,待提取RNA。

雄蜂:用隔王板将已开始产雄蜂卵的蜂王控制在带有雄蜂巢房的巢脾中产卵,24 h之后,移出蜂王,并将该巢脾放在中间继续孵化发育。待雄蜂即将出房时,抖落巢脾中的工蜂,将该巢脾放入恒温恒湿箱(温度35℃,RH 95%,无光照)中,让雄蜂羽化出房,并采集刚出房的雄蜂。同时,对部分刚出房雄蜂进行标记,放入原实验种群进一步发育,出房16 d后,采集这些已标记的雄蜂,用解剖剪从雄蜂侧面解剖并剔除雄蜂体内的消化道,放入液氮中保存,待提取RNA。

蜜蜂生殖系统:通过控制蜂王产雄蜂卵和人工培育蜂王,获取性成熟的蜂王和雄蜂,迅速用解剖剪从蜜蜂侧面解剖并剔除体内的消化道,取出生殖系统,采集蜂王生殖系统和雄蜂生殖系统样品,放入液氮中保存,待提取RNA。

1.3 样品RNA提取

从每组样品中随机挑选4个样品,按照标准的方法分别提取蜂王和雄蜂刚出房时期、性成熟时期以及生殖系统样品的总RNA,并进行RNA质量检测。待样品检验合格后,将每组试验组的两个样品等量混合RNA,各制备2个平行样。

1.4 创建cDNA文库和转录组测序

分别将各试验样品中RNA进行cDNA反转录,并进行纯化等处理,然后用琼脂糖凝胶电泳对片段大小进行选择,最后进行PCR扩增,获得最终的cDNA文库。通过Solexa RNA的paired-end测序方法对各试验样品进行测序,并对测序获得原始数据

经过去除低质量片段,切除 reads 中含 N 部分序列后,获取干净序列。具体参照 Wang 等(2012)研究方法。

1.5 中华蜜蜂性成熟期差异表达基因分析

将试验获取的 Clean reads 与 Wang 等(2012)测序获得的中华蜜蜂转录组数据进行混拼,然后以此为参照,利用 RPKM 法计算每个 unigene 的表达量(Mortazavi *et al.*, 2008)。在此基础上,参照 Audic 和 Claverie(1997)等描述的方法,对蜂王、雄蜂性成熟过程中以及性成熟期生殖系统差异表达基因进行筛选,并对这些差异基因在 GO(Gene Ontology)数据库进行基因功能富集分类,在 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行代谢途径富集分析。

1.6 qRT-PCR 验证

为了验证试验结果的可靠性,分别重新采集上述样品,经过剔除消化道后,按照 1.2 和 1.3 节的方法制备 qRT-PCR 验证试验样品。从比对结果中选择了 5 个共同差异基因,在性成熟蜂王与刚出房蜂王以及性成熟蜂王生殖系统与性成熟雄蜂生殖系统样品中进行试验验证,并进行统计分析。引物设计如表 1。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂转录组 Illumina 测序和序列组装

对中华蜜蜂羽化和性成熟时期的蜂王和雄蜂样品进行 Illumina 测序,将测序获得的原始图像数据经 basecalling 转化为序列数据,并进行过滤去杂

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>HSP70Ab</i>	F: CCAACCATCGAAGAAGTAGAC R: ATGACTGTGCAAAGTTTGAG
<i>HSP90</i>	F: ATTGAAGGAGTTTGATGGCA R: AGAGATTCTCGAATTTGGCT
<i>HSP83</i>	F: CGATTGGTTGATTCACCTT R: GCAGCCATATATCCCATAGTAG
<i>TPX</i>	F: ATTCCATTTCTGCTGTCTCT R: TGAACAAACGCAAAGTCTCA
<i>hsp23</i>	F: CTAGTTTATCATCGGATGGTGT R: CCTTCAATGCCGGTTTAC
<i>GAPDH</i>	F: TTCATGCTGTTACTGCTACAC R: GAAAGCCATACCACTCAAT

(包括含有带接头、重复的和测序质量很低的 reads),得到干净序列。从表 2 中可以看出,经过测序获取到的干净序列数在 43 220 752 ~ 51 791 872 之间,累计长度介于 4 322 075 200 ~ 5 179 187 200 bp 之间。测序质量值大于等于 20(Q20)的碱基比例均高于 94%,GC 含量 36% ~ 41% 之间(表 2)。对测序数据进行组装后分析(表 3),本研究获取的每个样品的 clean reads 能组装成 contigs 数介于 88 361 ~ 107 490,平均长度 396 ~ 432 bp 之间。Contigs 的 N50 介于 924 ~ 1 114 bp。将这些 contigs 和 Wang 等(2012)实验原始数据混拼,通过双末端链接和间隙填充最终组装成 90 839 个 unigenes,平均长度为 1 549 bp,unigenes 的 N50 是 3 156 bp。对最后组装出来的 unigene 进行长度分布统计,共有 41 536 个 unigenes 长度超过了 1 000 bp(图 1)。

表 2 中华蜜蜂转录组数据分析

Table 2 Analysis of the transcriptome data of *Apis cerana cerana*

样品 Samples	原始序列总数 Total raw reads	干净序列总数 Total clean reads	干净核苷总数(nt) Total clean nucleotides	Q20	N 百分比 N percentage	GC 百分比 GC percentage
刚出房雄蜂 Newly emerged drone	58 304 712	48 814 742	4 881 474 200	96.83	0.01	37.75
刚出房蜂王 Newly emerged queen	59 197 522	51 403 028	5 140 302 800	97.38	0.01	37.16
性成熟雄蜂 Sexually matured drone	58 470 882	51 407 440	5 140 744 000	97.58	0.01	38.35
雄蜂生殖系统 Drone reproductive system	59 930 148	51 791 872	5 179 187 200	97.30	0.01	40.16
蜂王生殖系统 Queen reproductive system	61 966 372	45 534 872	4 553 487 200	94.96	0.04	36.16
性成熟蜂王 Sexually matured queen	58 121 396	43 220 752	4 322 075 200	94.98	0.04	37.02
参考组 Reference	51 581 510	51 581 510	4 642 335 900	97.55	0.03	41.92

Q20: 质量值不低于 20 的碱基比例 Proportion of nucleotides with the quality value larger than 20 in reads. 参考组为 Wang 等(2012)研究中华蜜蜂转录组序列结果;下同。The reference is the transcriptome of the Asian honey bee by Wang *et al.* (2012). The same below.

表 3 测序序列组装质量

Table 3 Assembly quality of sequencing sequence

	样品 Samples	总数 Total number	总长度 (nt) Total length	平均长度 (nt) Mean length	N50* (nt)	
Contig	刚出房雄蜂 Newly emerged drone	92 081	39 783 756	432	1 114	
	刚出房蜂王 Newly emerged queen	88 361	37 792 699	428	1 085	
	性成熟雄蜂 Sexually matured drone	105 089	42 245 210	402	999	
	雄蜂生殖系统 Drone reproductive system	96 339	40 236 929	418	1 016	
	蜂王生殖系统 Queen reproductive system	107 490	42 611 757	396	924	
	性成熟蜂王 Sexually matured queen	97 693	40 344 556	413	1 015	
	参考组 Reference	76 087	25 143 199	330	528	
	Unigene	刚出房雄蜂 Newly emerged drone	52 535	75 438 695	1 436	2 778
		刚出房蜂王 Newly emerged queen	48 213	64 088 959	1 329	2 558
性成熟雄蜂 Sexually matured drone		55 689	77 987 467	1 400	2 716	
雄蜂生殖系统 Drone reproductive system		54 413	74 298 541	1 365	2 587	
蜂王生殖系统 Queen reproductive system		56 182	67 709 383	1 205	2 337	
性成熟蜂王 Sexually matured queen		52 180	66 632 174	1 277	2 459	
参考组 Reference		36 972	27 233 479	737	1 124	
合计 Total		90 839	140 715 277	1 549	3 156	

* 把组装出的 contigs 或 scaffolds 从大到小排列, 当其累计长度刚刚超过全部组装序列总长度 50% 时, 最后一个 contig 或 scaffold 的大小即为 N50 的大小。The assembled contigs or scaffolds are arranged from large to small. When the cumulative length is over 50% of the total length of all assembly sequences, the size of the last contig or scaffold is N50.

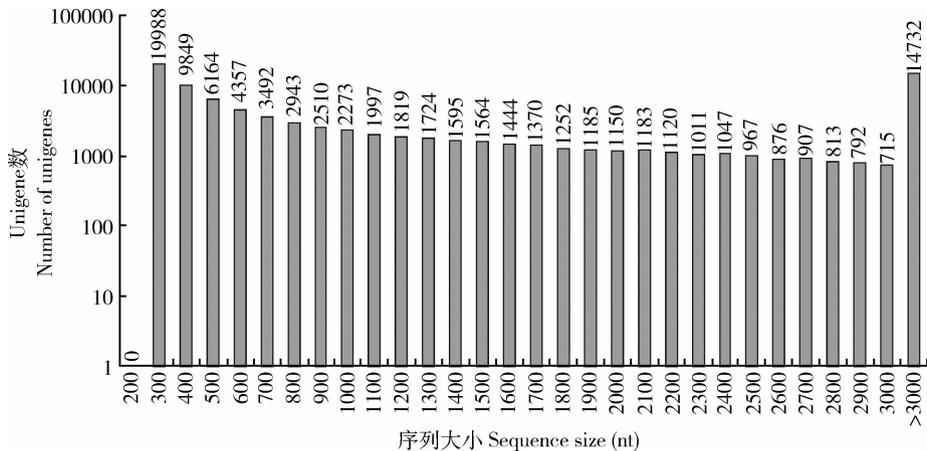


图 1 Contigs 和 unigenes 从头组装的长度分布

Fig. 1 Length distribution of the *de novo* assembly for contigs and unigenes

2.2 Unigene 功能注释

将 unigene 分别注释到 NR, Swiss-Prot, KEGG, COG 和 GO 数据库中,并分别对注释到每个库以及所有注释上的 unigene 数目进行统计。总共获得 45 112 个 unigenes (占 49.66%) 具有比对结果(表 4)。其中通过 NR, Swiss-Prot, GO, COG 和 KEGG 数据库比对到的结果分别是 44 774 (49.26%), 36 294 (39.95%), 20 850 (22.95%), 19 169 (21.10%) 和 33 448 (36.82%)。

表 4 Unigenes 的注释结果
Table 4 Annotation of unigenes

数据库 Database	注释 unigenes 的数目 Number of annotated unigenes	注释 unigenes 的百分比 Percentage of annotated unigenes
NR	44 744	49.26
Swissprot	36 294	39.95
COG	19 169	21.1
GO	20 850	22.95
KEGG	33 448	36.82
Total	45 112	49.66

被 NR 注释到的 unigenes 基因中,相似性高于 95% 基因占 51.5%, 相似性介于 80% ~ 95% 之间的基因数占 28.3% (图 2)。将这些 unigenes 比对到各个物种中,分别有 53.7%, 26.4% 和 8.4% 的基因比对到西方蜜蜂、小蜜蜂中和熊蜂中,另外还有 7.6% 的未知基因(图 3)。将这些 unigenes 在 COG 数据库中进行分类,共分 25 类(图 4),其中最大群体是

R 类(一般功能预测),有 8 201 个基因,其次是 L, J 和 K 类(“复制,重组和修复”、“翻译,核糖体结构和生物起源”、“转录”),分别对应 3 748, 3 340 和 3 277 个基因。进一步将注释到 GO 数据库中的 20 850 个 unigenes 按照生物过程、细胞组成、分子功能三大类别进行分类,其中按照生物过程分成 23 个类别,按照细胞组成成分成 18 个类别,按照分子功能分成 18 个类别。

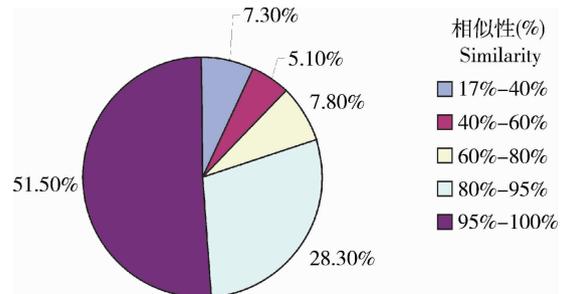


图 2 注释到的 unigenes 基因相似性分布

Fig. 2 Similarity distribution of the annotated unigenes

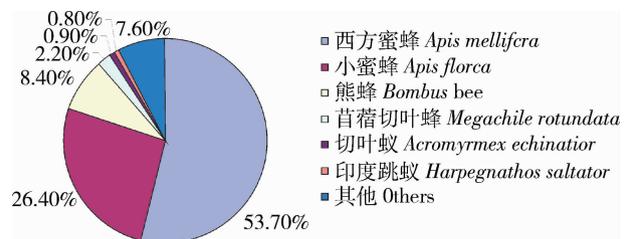


图 3 注释到的 unigenes 基因种类分布

Fig. 3 Species distribution of the annotated unigenes

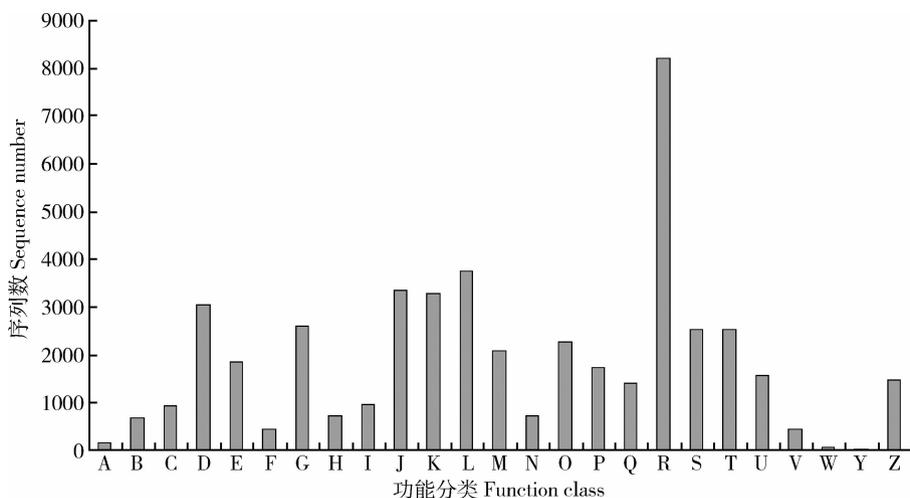


图 4 Unigenes 的 COG 分类

Fig. 4 COG classification of the unigenes

2.3 中华蜜蜂不同时期差异表达基因分析

为了检测中华蜜蜂不同时期基因表达差异,我

们分析了中华蜜蜂蜂王和雄蜂在性成熟期与刚出房时差异表达基因,并对同一时期两种性别的中华蜜

蜂及生殖系统进行差异基因分析,具体差异数量如图 5 所示,从图中可以看出:蜂王和雄蜂在性成熟期上调表达的基因均比刚出房时要多;刚出房的雄蜂

上调表达的基因比蜂王多,但性成熟期的雄蜂上调表达的基因比蜂王少;性成熟期蜂王卵巢上调表达的基因比雄蜂精巢要多。

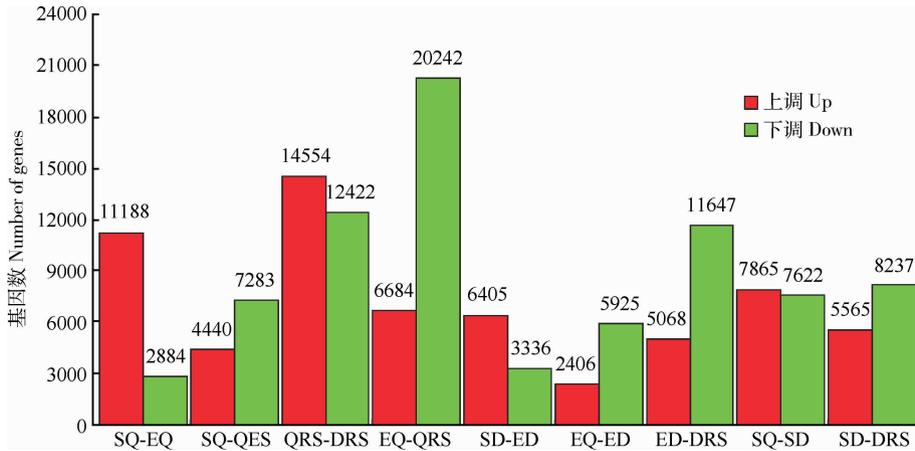


图 5 中华蜜蜂刚出房、性成熟蜂王和雄蜂之间差异表达基因的数目

Fig. 5 Number of differentially expressed genes among newly emerged and sexually matured drones and queens of *Apis cerana cerana*. ED: 刚出房雄蜂 Newly emerged drone; EQ: 刚出房蜂王 Newly emerged queen; SD: 性成熟雄蜂 Sexually matured drone; DRS: 雄蜂生殖系统 Drone reproductive system; QRS: 蜂王生殖系统 Queen reproductive system; SQ: 性成熟蜂王 Sexually matured queen.

比较性成熟蜂王与刚出房蜂王发现,两时期存在 14 072 个差异基因,其中 11 188 个基因在性成熟蜂王中上调,2 884 个基因下调,包括 27 个表皮蛋白、7 个热应激蛋白、6 个气味结合蛋白和至少 15 个细胞色素 P450 等基因。性成熟雄蜂与刚出房雄蜂相比较,有 9 741 个基因存在差异表达,其中 6 405 个基因在性成熟期上调表达,3 336 个基因下调表达,包括 14 个表皮蛋白、9 个气味结合蛋白和至少 9 个热应激蛋白、10 个细胞色素 P450。

刚出房的蜂王与刚出房的雄蜂相比,它们之间有 8 331 个基因存在差异表达,其中在刚出房蜂王中上调表达的基因有 2 406 个,在刚出房雄蜂中上调表达的基因有 5 925 个。然而,到性成熟期之后,两者存在 15 487 个差异基因,在蜂王和雄蜂中上调表达的基因数量分别为 7 865 和 7 622 个。这些差异基因中包括了 9 种气味结合蛋白,其中只有气味结合蛋白基因 15 (*OBP15*)在性成熟蜂王中上调表达,其余 8 种气味结合蛋白相关基因 (*OBP9*, *OBP1*, *OBP6*, *OBP14*, *OBP21*, *ASP6*, *ASP4* 和 *ASP5*)在性成熟雄蜂中上调表达。

研究发现,性成熟期蜂王与雄蜂生殖系统之间存在 26 976 个差异表达基因,其中,在蜂王生殖系统中高表达的基因有 14 554 个,另外 12 422 个基因在雄蜂生殖系统中高表达,其比例与性成熟期蜂王和雄蜂差异基因比例相似。在这些差异基因中,有

7 个气味结合蛋白存在显著差异表达,其中只有 *OBP14* 基因在蜂王生殖系统中上调表达,另外 6 个气味结合相关基因 (*OBP9*, *OBP1*, *OBP16*, *OBP21*, *ASP2* 和 *ASP4*)均在雄蜂生殖系统中上调表达。

2.4 GO 和 KEGG 富集分析

将差异基因作为前景,全部基因作为背景,进行 GO 和 KEGG 的富集分析。性成熟蜂王与刚出房蜂王差异基因按照细胞组成、分子功能和生化过程三大类,共分为 56 个功能群,分别有 28, 10 和 50 个 GO term 在三大类中显著富集 ($P < 0.05$),包括气味结合类。性成熟雄蜂与刚出房雄蜂差异基因按照生物合成、细胞组成和分子功能三大类,共分为 55 个功能群,有 26, 23 和 50 个 GO term 在三大类中显著富集 ($P < 0.05$),包括气味结合类。性成熟蜂王与性成熟雄蜂差异基因按生物合成、细胞组成和分子功能三大类分为 56 个功能群,有 13, 6 和 29 个 GO term 在三大类中显著富集 ($P < 0.05$),包括气味结合类。性成熟期的蜂王生殖系统与雄蜂生殖系统差异基因共分 57 个功能群,有 18, 15 和 46 个 GO term 在三大类中显著富集 ($P < 0.05$)。

将差异基因与 KEGG 数据库进行比对,性成熟蜂王与刚出房蜂王之间的差异基因能归类到 255 个生化途径,其中 40 个显著富集 ($P < 0.05$);性成熟雄蜂与刚出房雄蜂之间的差异基因能归类到 257 个生化途径,其中 67 个显著富集 ($P < 0.05$);性成熟

蜂王与性成熟雄蜂差异基因能归类到 256 个生化途径,其中 51 个显著富集 ($P < 0.05$);性成熟期的蜂王生殖系统与性成熟期的雄蜂生殖系统差异基因能归类到 257 个生化途径,其中 49 个显著富集 ($P < 0.05$)。

2.5 qRT-PCR 验证结果

从差异基因中选择了 4 种热应激蛋白基因和 TPX 基因在性成熟蜂王与刚出房蜂王以及性成熟蜂

王生殖系统与性成熟雄蜂生殖系统样品中进行验证。4 个热应激蛋白基因和 TPX 基因在性成熟蜂王中的表达均显著高于刚出房蜂王(表 5),与转录组结果一致。另外,HSP70Ab 和 HSP23 基因在性成熟雄蜂生殖系统显著上调表达,而 HSP90 和 TPX 基因在性成熟蜂王生殖系统中显著上调表达(表 6),与转录组结果一致。HSP83 基因在性成熟的两种生殖系统表达量差异不显著(表 6)。

表 5 5 个基因在中华蜜蜂蜂王中的表达

Table 5 Quantitative analysis of five genes in *Apis cerana cerana* queens

基因 Gene	刚出房蜂王转录组 RPKM 值 RPKM of transcriptome in newly emerged queen	性成熟蜂王转录组 RPKM 值 RPKM of transcriptome in sexually matured queen	刚出房蜂王基因表达量 Expression level of gene in newly emerged queen	性成熟蜂王基因表达量 Expression level of gene in sexually matured queen	P 值 P-value
HSP70Ab	5.6424	20.6883	1	3.6106	<0.05
HSP90	24.7959	78.4251	1	3.2917	<0.05
HSP83	70.4126	304.5616	1	9.0204	<0.05
TPX	941.1732	2 113.4686	1	4.6898	<0.05
HSP23	123.0106	922.3816	1	4.1281	<0.05

表 6 5 个基因在中华蜜蜂性成熟蜂王和雄蜂生殖系统中的表达

Table 6 Quantitative analysis of five genes in the sexually matured reproductive system of *Apis cerana cerana* queens and drones

基因 Gene	雄蜂生殖系统转录组 RPKM 值 RPKM of transcriptome in drone reproductive system	蜂王生殖系统转录组 RPKM 值 RPKM of transcriptome in queen reproductive system	雄蜂生殖系统基因表达量 Expression level of gene in drone reproductive system	蜂王生殖系统基因表达量 Expression level of gene in queen reproductive system	P 值 P-value
HSP70Ab	16.8763	0.4868	1	0.0338	<0.05
HSP90	164.6236	501.891	1	1.4132	<0.05
HSP83	83.5527	406.2492	1	1.6983	>0.05
TPX	971.6687	3 498.111	1	1.7082	<0.05
HSP23	871.4282	40.1814	1	0.0158	<0.05

3 讨论

本研究通过高通量测序技术对中华蜜蜂蜂王和雄蜂性成熟时期及性成熟期生殖系统的转录组差异进行了分析。测序结果发现:所有试验样本高质量的数据(Q20)均高于 94%,说明测序质量较好。所有转录组测序获得的 reads,组装后,获取 90 839 个 unigenes,平均长度 1 549 bp,而且大部分 unigenes 能比对到亲缘关系较近的物种,仅 7.6% unigenes 未知,这也说明测序组装质量较好。

对差异表达基因进行分析发现,性成熟的蜂王和雄蜂与刚出房时期相比,均存在大量显著表达差异的基因,而且表皮蛋白、热应激蛋白、气味结合蛋白以及细胞色素 P450 基因均存在差异表达,并且气味结合类显著富集,说明这些基因与雄蜂识别信息

素具有必然关系,从而有利于蜜蜂正常交尾。

昆虫表皮蛋白是结构蛋白,它和几丁质一起组成昆虫抵御外界环境的屏障,形成角质层(刘清明等,2010)。本研究发现在雄蜂或蜂王生长发育过程中差异表达的表皮蛋白基因均在刚出房时期上调表达,主要原因在于刚出房的蜜蜂比较柔弱,体格较软,机体有待于进一步发育成熟,从而需要表皮蛋白基因表达活跃,基因表达产生的蛋白经过转运机制运输到昆虫体壁上皮细胞之外而参与外骨骼的构建。

细胞色素 P450s 广泛分布于各种需氧生物中,如昆虫、植物、细菌等。它在昆虫中除了参与体内的生物代谢外,还具有激素的合成与分解(李斌等,2004)。细胞色素 P450 基因大部分在蜜蜂性成熟期高度表达,可能参与了蜜蜂体表信息素的合成,如 9-氧代-癸二烯酸(9-ODA)。另外,细胞色素

CYP342A1, CYP6BD1 和 CYP6AS5 基因在性成熟期的蜂王和雄蜂均上调表达,而细胞色素 CYP4AV1 基因却下调表达,这些基因可能是蜜蜂性成熟期的部分管家基因。细胞色素 P450 还具有抗氧化和加强免疫的作用,降低外来物的侵害,还可能与热应激蛋白一起抵抗外界不良影响的影响。

气味结合蛋白是一类识别或结合外界气味分子并传输给受体的一类蛋白,广泛分布于昆虫触角器官或表皮细胞中。本研究发现,大部分气味结合蛋白基因在性成熟雄蜂上调表达,这可能与蜜蜂交尾机制有关,雄蜂为了在空中有效地追逐蜂王并进行交尾,就需要获取蜂王在婚飞过程中释放的信息素。有些上调基因或下调基因是其不同时期的特异性表达(李红亮,2007)。

性成熟时期是蜂王和雄蜂成功交配的必然条件之一,而且其体表会释放信息素来吸引对方。比较性成熟期的蜂王和雄蜂差异表达基因发现,两者之间存在 15 487 个差异基因,包括 9 种气味结合蛋白基因,其中 8 种在雄蜂中上调表达,说明雄蜂性成熟期嗅觉特别敏感,有利于婚飞时进行竞争交配。同样,比较两者之间的生殖系统发现,有 7 种气味结合蛋白基因存在差异表达,其中 6 种在雄蜂生殖系统上调表达,这也说明气味结合蛋白与雄蜂性腺发育有着密切的关联。

另外,刚出房雄蜂与刚出房蜂王存在 9 331 个差异表达基因,而且其中 5 925 个基因在刚出房雄蜂中上调表达,这可能是由于刚出房雄蜂新陈代谢比刚出房蜂王要快,这有待于进一步研究。

本研究利用高通量测序技术对中华蜜蜂蜂王和雄蜂在刚出房、性成熟时期以及其性成熟时期生殖系统的转录组进行测序和分析,揭示了中华蜜蜂发育的两个关键时期和性成熟时期生殖系统转录组的整体表达特征。初步发现中华蜜蜂在发育过程中,其表皮蛋白基因、热应激蛋白基因、细胞色素 P450 基因以及气味结合蛋白基因表达发生了明显的变化,为深入研究中华蜜蜂生长发育、繁殖以及相关基因功能及调控等提供了丰富的数据资源。

参考文献 (References)

- Audic S, Claverie JM, 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7(10): 986–995.
- Behura SK, Whitfield CW, 2010. Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect Molecular Biology*, 19(4): 431–439.
- Chen X, Yu X, Cai Y, Zheng H, Yu D, Liu G, Zhou Q, Hu S, Hu F, 2010. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 799–805.
- Colonello-Frattini NA, Hartfelder K, 2009. Differential gene expression profiling in mucus glands of honeybee (*Apis mellifera*) drones during sexual maturation. *Apidologie*, 40: 481–495.
- Dai PL, Wang Q, Sun JH, Zhou T, Liu F, Wu YY, Luo QH, Xu SF, 2009. Effects of pesticides on honeybee behaviours. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(6): 855–860. [代平礼, 王强, 孙继虎, 周婷, 刘锋, 吴艳艳, 罗其花, 徐书法, 2009. 农药对蜜蜂行为的影响. 昆虫知识, 46(6): 855–860]
- Fang Y, Song F, Zhang L, Aleku DW, Han B, Feng M, Li J, 2012. Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteomics*, 75: 756–773.
- Frazier M, Mullin C, Frazier J, Ashcraft S, 2008. What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal*, 6: 521–523.
- Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079): 348–350.
- Ji R, Xie BY, Yang GH, Li DM, 2003. From introduced species to invasive species – a case study on the Italian bee *Apis mellifera* L. *Chinese Journal of Ecology*, 22(5): 70–73. [季荣, 谢宝瑜, 杨冠煌, 李典谟, 2003. 从有意引入到外来入侵——以意大利蜂 *Apis mellifera* L. 为例. 生态学杂志, 22(5): 70–73]
- Kocher SD, Richard FJ, Tarpay DR, Grozinger CM, 2008. Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 9: 232.
- Kocher SD, Tarpay DR, Grozinger CM, 2010. The effects of mating and instrumental insemination on queen honey bee flight behaviour and gene expression. *Insect Molecular Biology*, 19(2): 153–162.
- Li B, Xia QY, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2004. Analysis of cytochrome P450 in silkworm genome. *Science in China Series C Life Sciences*, 34(6): 517–521. [李斌, 夏庆友, 鲁成, 周泽扬, 向仲怀, 2004. 家蚕细胞色素 P450 的基因组学分析. 中国科学(生命科学), 34(6): 517–521]
- Li HL, 2007. Construction of the Head ESTs in *Apis cerana cerana*, and Its Main Antennal Proteins: Molecular Cloning, Immunocytochemical Localization and Expression. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [李红亮, 2007. 中华蜜蜂头部 ESTs 文库构建和主要触角特异蛋白基因克隆、定位及其表达鉴定. 杭州: 浙江大学博士学位论文]
- Liu F, 2012. Integrating of Solexa High-abundance mRNAs and sRNAs in *Apis mellifera*: Comparison between Nurses and Foragers to Identify Regulatory Network. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [刘芳, 2012. 意蜂哺育蜂与采集蜂头部 mRNAs 与 miRNAs 表达谱 Solexa 测序比较分析及其调控网络研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]
- Liu QM, Yuan YY, Lin JR, Zhong YS, 2010. Advance of researches on insect cuticular proteins and the regulation mechanism of their gene expression. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(2): 247–255.

- [刘清明, 苑园园, 林健荣, 钟杨生, 2010. 昆虫表皮蛋白及其基因表达调控机理的研究进展. *昆虫知识*, 47(2): 247-255]
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B, 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5: 621-628.
- Shi YY, Tian LQ, Zhang F, Liu JF, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Effect of royal jelly on the DNA methylation of *dynactin p62* in female honeybee larvae. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(23): 4909-4915. [石元元, 田柳青, 张飞, 刘俊峰, 颜伟玉, 曾志将, 2012. 蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 基因甲基化影响. *中国农业科学*, 45(23): 4909-4915]
- Wang QF, Li WS, Zhang QM, Wu SS, 2003. The natural mating interference between *Apis cerana* and *A. mellifera*. *Entomological Knowledge*, 40(2): 164-167. [王启发, 李位三, 张启明, 吴树生, 2003. 中、西蜂间自然交尾干扰问题的观察. *昆虫知识*, 40(2): 164-167]
- Wang ZL, Liu TT, Huang Z, Wu XB, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Transcriptome analysis of the Asian honey bee *Apis cerana cerana*. *PLoS ONE*, 7(10): e47954.
- Whitehorn PR, O' Connor S, Wackers FL, Goulson D, 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079): 351-352.
- Wu XB, Wang ZL, Shi YY, Zhang F, Zeng ZJ, 2013a. Effects of mating flight on sRNAs expression in sexual matured virgin queens (*Apis cerana cerana*). *Scientia Agricultura Sinica*, 46(17): 3721-3728. [吴小波, 王子龙, 石元元, 张飞, 曾志将, 2013. 婚飞对中华蜜蜂性成熟处女蜂王 sRNAs 表达的影响. *中国农业科学*, 46(17): 3721-3728]
- Wu XB, Wang ZL, Zhang F, Shi YY, Zeng ZJ, 2013b. Mating flight behaviour affects gene expression in matured virgin queens of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(5): 486-493. [吴小波, 王子龙, 张飞, 石元元, 曾志将, 2013. 婚飞行为影响中华蜜蜂性成熟处女蜂王的基因表达. *昆虫学报*, 56(5): 486-493]
- Wu XB, Wang ZL, Zhang F, Shi YY, Zeng ZJ, 2014. Mating flight causes genome-wide transcriptional changes in sexually mature honeybee queens. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(1): 37-43.
- Wu XB, Zhang F, Zeng ZJ, 2012. Advances in understanding of reproduction conflict and pheromones of female bees in *Apis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1372-1377. [吴小波, 张飞, 曾志将, 2012. 蜜蜂繁殖冲突与雌性蜜蜂信息素研究进展. *应用昆虫学报*, 49(5): 1372-1377]
- Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401-406. [杨冠煌, 2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. *昆虫学报*, 48(3): 401-406]
- Zeng J, Pan QZ, Wang ZL, Wu XB, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Cloning and developmental expression of *dynactin p62* gene in the Chinese honeybee *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1132-1141. [曾晶, 潘其忠, 王子龙, 吴小波, 颜伟玉, 曾志将, 2012. 中华蜜蜂 *dynactin p62* 基因的克隆及不同发育阶段表达分析. *昆虫学报*, 55(10): 1132-1141]
- Zeng ZJ, 2009. Apiculture. China Agriculture Press, Beijing. [曾志将, 2009. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社]
- Zhang QL, Yuan ML, 2013. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique. *Acta Entomologica Sinica*, 56(12): 1489-1508. [张麒麟, 袁明龙, 2013. 基于新一代测序技术的昆虫转录组学研究进展. *昆虫学报*, 56(12): 1489-1508]

(责任编辑: 赵利辉)