



中华蜜蜂精巢和卵巢差异表达基因分析

成付平^{1,2}, 袁芳³, 席芳贵³, 秦凯鑫^{1,2}, 胡小芬⁴, 王子龙^{1,2,*}

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045; 2. 江西省蜜蜂生物学与饲养重点实验室, 南昌 330045;
3. 江西省养蜂研究所, 南昌 330052; 4. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045)

摘要:【目的】在蜂群中,雄蜂与蜂王都有着发育完全的性腺,但两者达到性成熟的时间却是不同步的。本研究旨在探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 雄蜂与蜂王生殖腺的基因表达差异。【方法】利用 Illumina 测序技术对中华蜜蜂雄蜂精巢与蜂王卵巢转录组差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 进行分析。【结果】从中华蜜蜂精巢与卵巢中共鉴定出 5 312 个差异表达基因,其中 2 668 个基因在精巢中表达上调,2 644 个基因在卵巢中表达上调。并鉴定了 11 个与性别决定和精子卵子发生相关的候选基因。这些差异表达基因可以归类到 1 458 个 GO 功能类别和 132 个 KEGG 通路,其中,有 4 个 GO 条目和 2 个 KEGG 通路显著富集。【结论】这些结果为研究中华蜜蜂繁殖的分子机制提供了有价值的基因表达信息。

关键词: 中华蜜蜂; 转录组; 精巢; 卵巢; 差异表达基因

中图分类号: S894.1 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2022)02-0167-09

Analysis of differentially expressed genes in testes and ovaries of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

CHENG Fu-Ping^{1,2}, YUAN Fang³, XI Fang-Gui³, QIN Kai-Xin^{1,2}, HU Xiao-Fen⁴, WANG Zi-Long^{1,2,*}

(1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of Honeybee Biology and Beekeeping, Nanchang 330045, China; 3. Jiangxi Apiculture Research Institute, Nanchang 330052, China; 4. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract:【Aim】In honeybee colonies, both drones and queens have fully developed gonads, but they do not reach sexual maturity at the same time. The aim of this study is to explore the gene expression difference of gonads between drones and queens of the Asian honey bee, *Apis cerana cerana*.【Methods】Illumina sequencing technology was used to analyze the differentially expressed genes (DEGs) in the transcriptome between testis of drone and ovary of queen of *A. cerana cerana*.【Results】We identified 5 312 DEGs between testis and ovary of *A. cerana cerana*, among which 2 668 and 2 644 genes were up-regulated in testis and ovary, respectively. We also identified 11 candidate genes related to sex determination, spermatogenesis and oogenesis. These DEGs could be classified into 1 458 GO functional classes and 132 KEGG pathways with four GO entries and two KEGG pathways significantly enriched.【Conclusion】These results provide valuable gene expression information for the study of the molecular mechanism of reproduction in *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; transcriptome; testis; ovary; differentially expressed genes

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860686); 江西省杰出青年科学基金项目(2018ACB21028); 江西省自然科学基金项目(20202BABL205007)

作者简介: 成付平, 男, 1995年8月生, 江西九江人, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂分子生物学研究, E-mail: 2770205400@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wzlcqbb@126.com

收稿日期 Received: 2021-06-06; 接受日期 Accepted: 2021-08-19

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 是东方蜜蜂 *Apis cerana* 的指名亚种, 由于它在抵御寒冷、采集零散蜜源、抵抗胡蜂及有节制地产卵等方面有着显著的优势(曾志将, 2020), 使它成为我国饲养的重要蜂种。近些年, 随着研究手段的不断更新与深入, 已由描述性研究转到分子水平上来阐述蜜蜂发育机理。健康的蜂群由蜂王、工蜂、雄蜂组成, 它们的性别决定是一种特殊的单双倍体模式, 雄性是由未受精卵发育而来的单倍体, 雌性是由受精卵发育而来的二倍体(Beye *et al.*, 2003)。在一个蜂群中, 蜂王和雄蜂都拥有发育完全的生殖腺, 但它们的性成熟时间是不同步的。蜂王在羽化一周后达到性成熟, 而雄蜂则需要大约 12 d 才能达到性成熟(曾志将, 2017)。

蜜蜂的性别发育包括两个方面, 分别是性别决定和性别分化。在蜜蜂中, 性别是由 *csd*→*fem*→*dsx* 这个级联反应来决定的(Wilkins, 1995; Hasselmann *et al.*, 2008, 2010)。在这个级联调控过程中, *csd* 是调节 *fem* 进行雌特异性剪接的初始信号(Hasselmann *et al.*, 2008, 2010), 之后 *fem* 又控制着 *dsx* 的雌特异性剪接。在多细胞动物中, *dsx* 是性别决定级联反应中最保守的性别决定基因之一(Wilkins, 1995)。这一级联反应的下游基因充当性别调节因子, 形成性别分化途径, 进而导致雌雄特异性表型。

虽然目前已经鉴定出蜜蜂性别级联的主效基因, 但对蜜蜂生殖活动和性腺发育的研究较少。因此, 有必要了解蜜蜂性腺分化和配子发生的分子机制。本研究对中华蜜蜂的卵巢和精巢进行了转录组测序分析。我们的结果揭示了雄性和雌性性腺的基因表达差异。本研究的结果有助于理解中华蜜蜂性别决定和分化的分子机制, 并为未来的研究提供有价值的基因表达信息。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂及采样

本研究所用的实验蜂群为江西省养蜂研究所饲养的中华蜜蜂蜂群。选择两个群势较强的中华蜜蜂蜂群, 采用标准的人工育王方法(曾志将, 2009) 培育中华蜜蜂蜂王, 待蜂王出房后随机挑选个体发育优良的处女王剪掉翅后放于巢房中培育, 到蜂王出房 12 d 时进行采样, 每 2 头蜂王的卵巢作为一个样品, 每群采集一个样品, 共采集 2 个生物学重复。采用同样的蜂群, 将蜂王控制在一张干净的雄蜂巢脾

中产卵, 12 h 之后放出蜂王, 并将该雄蜂巢脾放入继箱群中继续孵化发育。等雄蜂羽化出房后进行标记, 再放入原实验群中进一步培育, 到雄蜂出房 12 d 时进行采样, 每 10 头雄蜂精巢作为一个样品, 每群采集一个样品, 共采集 2 个生物学重复。取样时, 在显微镜下对雄蜂和蜂王腹部分别进行解剖, 取出雄蜂精巢及蜂王卵巢, 将采集好的精巢和卵巢样品用液氮速冻后装在 1.5 mL EP 管中, 保存于液氮中。

1.2 cDNA 文库的创建与测序

按照标准的方法分别提取 1.1 节每个精巢和卵巢样品的总 RNA, 对 RNA 质量进行检测, 以确保得到合格样本并且能够进行转录组测序。待实验样品总 RNA 检测结果均合格后, 进行文库构建, 主要操作流程为: 用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集样品 mRNA; 加入 Fragmentation Buffer 随机打断 mRNA 片段; 用六碱基随机引物(random hexamers) 合成 cDNA 第 1 链, 然后加入酶 Buffer, dNTPs, RNase H 和 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第 2 链, 反转录结束后, 通过 AMPure XP Beads 纯化 cDNA; 对纯化过后的 cDNA 进行末端修复、加 poly(A) 尾并连接测序接头, 然后用 AMPure XP Beads 进行片段大小选择; 最后通过 PCR 扩增富集得到 cDNA 文库。用 Illumina 高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序。

1.3 测序数据与参考基因组比对

利用 FastQC 软件对数据进行分析筛选, 去除含有接头的读段和低质量的读段(包括去除 N 的比例大于 10% 的读段; 去除质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整条读段的 50% 以上的读段), 最终筛选得到高质量的过滤后数据。Illumina HiSeq 碱基质量值(quality score 或 Q-score) 的计算通常使用 Phred 碱基质量值公式(Ewing *et al.*, 1998): $Q\text{-score} = -10 \times \log_{10} P$, P 为碱基识别出错的概率。

利用 TopHat2(Kim *et al.*, 2013) 软件将获得的过滤后读段与中华蜜蜂最新的基因组序列(ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/invertebrate/Apis_cerana/latest_assembly_versions/GCA_011100585.1_ASM1110058v1) 进行序列比对, 获取过滤后读段在参考基因组和基因上的位置信息, 以及测序样品特有的序列特征信息。

1.4 基因表达水平确定及标准化

使用 Cufflinks 软件的 Cuffquant 和 Cuffnorm 组件, 通过匹配上的读段在基因上的位置信息, 对转录本和基因的表达水平进行定量。采用 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million

fragments mapped) 作为衡量转录本或基因表达水平的指标 (Florea *et al.*, 2013)。

1.5 精巢和卵巢差异表达基因的筛选

采用 DESeq 进行样品组间的差异表达基因分析 (Anders and Huber, 2010)。以相对差异倍数 ≥ 2 且 $FDR < 0.05$ 作为筛选标准。在进行差异表达分析过程中, 采用 Benjamini-Hochberg 校正方法对原有假设检验得到的显著性 P 值 (P -value) 进行校正, 并最终采用 FDR 作为差异表达基因筛选的关键指标 (Westfall, 2008)。将所有的差异表达基因映射到 GO 数据库中进行 GO 富集分析。并在 KEGG 数据库中进行通路富集分析。

2 结果

2.1 精巢和卵巢转录组测序

本试验共得到 75 304 191 条高质量读段, 18.95 Gb 的过滤后数据, 各组样品序列累计长度介于 4 478 945 552 ~ 4 893 890 242 bp 之间, 均达到 4.47 Gb 以上, GC 含量在 39.25% ~ 40.07% 之间, 属于正常范围 (表 1)。Q30 碱基百分比均不小于 94.37%, 表明测序的碱基识别准确度很高。与中华蜜蜂基因组序列进行比对, 每个样品比对到参考基因组唯一位置的读段数介于 32 601 194 ~ 35 445 368 之间, 其对比比率介于 88.38% ~ 91.60% 之间。实验原始数据已上传至 NCBI 序列数据库中, 访问号为 SRR15276363 - SRR15276366。

2.2 生物学重复相关性评估

将皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient) r 作为生物学重复相关性的评估指标 (Schulze *et al.*, 2012)。 r^2 越接近 1, 说明两个重复样品相关性越强。对同一条件的每一对生物学重复样品的基因表达量做相关性热图, 如图 1 所示, 处女王卵巢的 2 个不同生物学重复样品基因表达量之间

和成熟雄蜂精巢的 2 个不同生物学重复样品之间的 r^2 值均大于 0.82, 而卵巢和精巢间 r^2 值均小于 0.35, 说明了测序数据的重复性很好。

对筛选出的差异表达基因做层次聚类分析 (图 2), 发现精巢和卵巢的 2 个生物学重复分别聚到了一起, 而精巢与卵巢间则出现分离, 表明本研究所用样品生物学重复性较好, 且样本分组较合理。

2.3 精巢和卵巢之间差异表达基因

在精巢和卵巢之间共鉴定出 5 312 个差异表达基因, 其中精巢上调表达基因有 2 668 个, 卵巢上调表达基因有 2 644 个。在精巢中上调倍数最大的基因是 *hypothetical protein APICC_07601* (GenBank 登录号: 108003596), 在卵巢中上调倍数最大的基因是 *myb-like protein Q* (GenBank 登录号: 108001861)。在这些差异表达基因中, 通过分析找出了 11 个与性别决定或精子卵子发生相关的基因 (表 2)。其中包括 2 个参与性别决定的基因, 6 个与卵子形成相关的基因, 以及 3 个参与精子形成的基因。参与性别决定的基因分别是 *tra2* (GenBank 登录号: 107997763) 与 *dsx* (GenBank 登录号: 108001352)。其中 *tra2* 在卵巢中表达更高, 而另一个与性别决定相关的基因 *dsx* 在精巢中表达更高。与卵子形成相关的基因有卵黄蛋白原受体基因 (*VgR*) (GenBank 登录号: 107994670), *Squid* (GenBank 登录号: 107993185), *Vasa* (GenBank 登录号: 108004301), *Argonaute-3* (GenBank 登录号: 108004055), *Aubergine* (GenBank 登录号: 108000695) 和 *exuperantia (exu)* (GenBank 登录号: 108003169), 它们均在卵巢中表达上调。与精子形成相关的基因包括 *decapentaplegic (Dpp)* (GenBank 登录号: 108000002), *hedgehog (hh)* (GenBank 登录号: 108003950) 和 *Wnt6* (GenBank 登录号: 107993075), 它们均在精巢中表达上调。

表 1 中华蜜蜂精巢和卵巢转录组测序数据统计

Table 1 Summary of the transcriptome sequencing data of the testis and ovary of *Apis cerana cerana*

样品 Samples	总读数 Total raw reads	有效读数 Clean reads	有效碱基数 Clean bases	$\geq Q30$ (%)	GC (%)	比对数 UniqMapped reads	对比比率 (%) UniqMapped ratio
卵巢-1 Ovary-1	19 417 520	19 122 353	4 812 556 080	94.61	39.47	34 313 925	89.72
卵巢-2 Ovary-2	19 185 666	18 943 765	4 767 459 878	94.58	39.25	33 485 704	88.38
精巢-1 Testis-1	19 601 316	19 442 458	4 893 890 242	94.37	39.25	35 445 368	91.15
精巢-2 Testis-2	17 952 317	17 795 615	4 478 945 552	94.70	40.07	32 601 194	91.60

卵巢-1 和卵巢-2 分别为中华蜜蜂性成熟处女王卵巢的 2 个生物学重复, 精巢-1 和精巢-2 分别为中华蜜蜂性成熟雄蜂精巢的 2 个生物学重复。下同。Ovary-1 and ovary-2 are two ovarian biological replicates of the sexual mature queen of *A. cerana cerana*, and testis-1 and testis-2 are two testis biological replicates of sexual mature drone of *A. cerana cerana*, respectively. The same below.

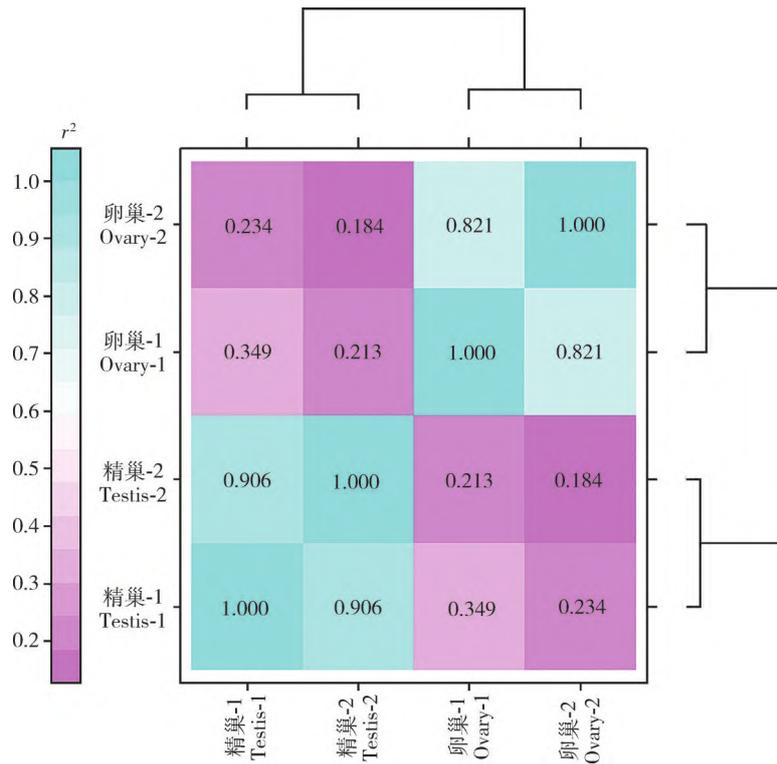


图1 中华蜜蜂精巢和卵巢转录组中基因表达量的相关性

Fig. 1 Correlation of gene expression levels in the transcriptome of the testis and ovary of *Apis cerana cerana*

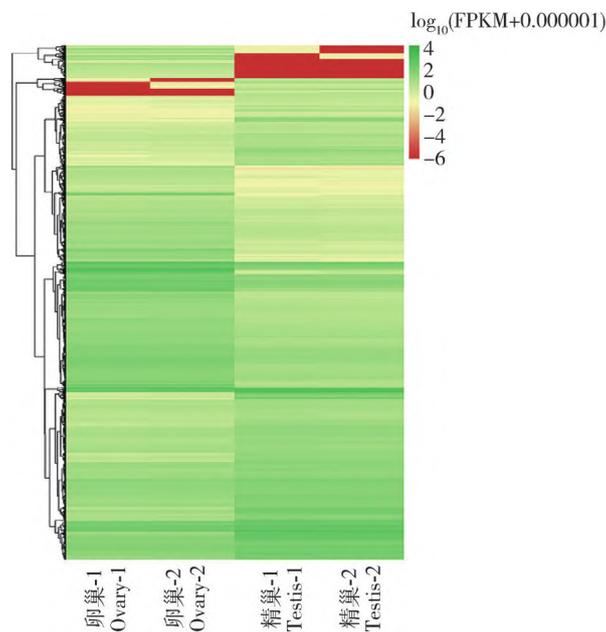


图2 中华蜜蜂精巢和卵巢转录组中差异表达基因聚类图

Fig. 2 Cluster map of differentially expressed genes in the transcriptome of the testis and ovary of *Apis cerana cerana*. 颜色代表了基因在样品中的表达量水平 [$\log_{10}(\text{FPKM} + 0.000001)$]. The color represents the gene expression level [$\log_{10}(\text{FPKM} + 0.000001)$] in the sample.

2.4 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

将 GO 数据库注释的 3 154 个 DEGs 按生物学过程、细胞组分和分子功能三大类进行分类,共分为

1 458 个功能类别。在生物学过程中,跨膜转运 (transmembrane transport) 显著富集;在细胞组分中,膜的整体构成 (integral component of membrane) 显著

富集;在分子功能类别中,序列特异性 DNA 结合转录因子活性(transcription factor activity, sequence-specific DNA binding)与转运活性(transporter activity)显著富集(图 3)。通过差异表达基因的 KEGG 通路

分析,发现这些基因能归类到 132 个生化通路,其中,ECM 受体交互作用(KO04512)和溶酶体(KO04142)信号通路显著富集($q < 0.05$),注释到这两条通路的差异表达基因数目分别为 20 和 37 个。

表 2 中华蜜蜂精巢和卵巢转录组中与性别决定或精子卵子发生相关的基因

Table 2 Genes involved in sex determination, spermatogenesis and oogenesis in the transcriptome of the testis and ovary of *Apis cerana cerana*

基因 Genes	FPKM				FDR	上调/下调 Up/Down	Nr 注释信息 Nr annotation
	卵巢-1 Ovary-1	卵巢-2 Ovary-2	精巢-1 Testis-1	精巢-2 Testis-2			
<i>tra2</i>	223.05	210.31	49.78	47.54	2.04E-22	下调 Down	Transformer-2 protein homolog beta
<i>dsx</i>	0.82	3.79	13.51	13.48	3.37E-06	上调 Up	Protein doublesex
<i>VgR</i>	900.03	740.85	0.62	2.24	2.84E-22	下调 Down	Vitellogenin receptor
<i>Squid</i>	623.68	474.06	152.99	146.14	2.61E-12	下调 Down	RNA-binding protein Squid
<i>Vasa</i>	490.84	394.68	31.31	38.68	3.33E-45	下调 Down	ATP-dependent RNA helicase vasa
<i>Argonaute-3</i>	36.73	35.82	1.81	1.67	2.40E-73	下调 Down	Piwi-like protein Ago3
<i>Aubergine</i>	364.72	300.27	7.041	6.93	2.02E-156	下调 Down	Protein PIWI
<i>exuperantia (exu)</i>	784.47	801.38	20.50	23.84	3.08E-145	下调 Down	Maternal protein exuperantia
<i>Dpp</i>	28.13	25.12	61.35	53.91	1.09E-13	上调 Up	Protein decapentaplegic
<i>Hedgehog (hh)</i>	2.16	3.13	35.46	34.92	9.75E-34	上调 Up	Sonic hedgehog protein A
<i>Wnt6</i>	0.88	1.12	7.95	2.99	1.30E-04	上调 Up	Protein Wnt-6-like

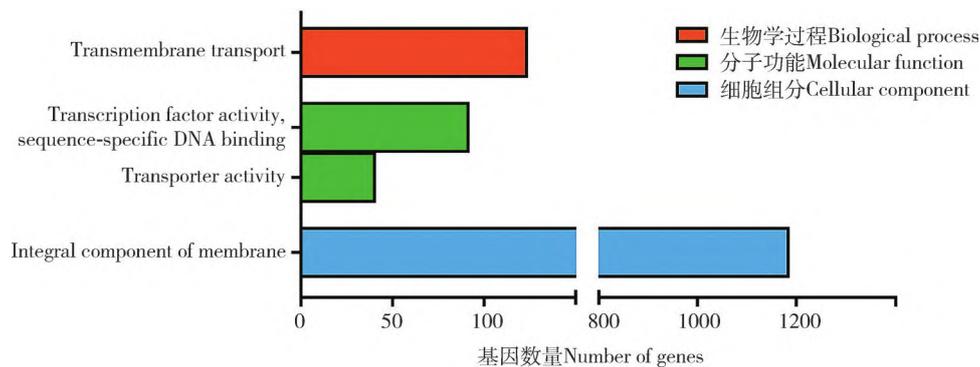


图 3 中华蜜蜂精巢和卵巢转录组中差异表达基因的 GO 富集

Fig. 3 GO enrichment of differentially expressed genes in the transcriptome of the testis and ovary of *Apis cerana cerana*

对在精巢上调表达的基因进行 GO(图 4: A)和 KEGG(图 5: A)分析,发现有 10 个 GO 条目显著富集($q < 0.05$),分别是生物学过程类别中的跨膜转运、氧化还原过程(oxidation-reduction process)、蛋白质水解(proteolysis)、代谢过程(metabolic process)、ATP 水解偶联质子运输(ATP hydrolysis coupled proton transport);分子功能类别中的转运活性、跨膜转运活性(transmembrane transporter activity)、底物特异性跨膜转运活性(substrate-specific transmembrane transporter activity)、血红素结合(heme binding);细胞组分类别中的膜的整体构成。17 个 KEGG 通路显著富集($q < 0.05$),包括溶酶体(lysosome)、丙酮

酸代谢(pyruvate metabolism)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)等。

对在卵巢上调表达的基因进行 GO(图 4: B)和 KEGG(图 5: B)分析,发现有 26 个 GO 条目显著富集($q < 0.05$),包括生物学过程类别中的 DNA 模板的转录调控(regulation of transcription, DNA-templated)、细胞分裂(cell division)、DNA 复制起始(DNA replication initiation)和 DNA 复制(DNA replication)等;分子功能类别中的 DNA 结合(DNA binding)、核苷酸结合(nucleotide binding)和微管结合(microtubule binding)等;细胞组分类别中的细胞内的核糖核蛋白复合体(intracellular

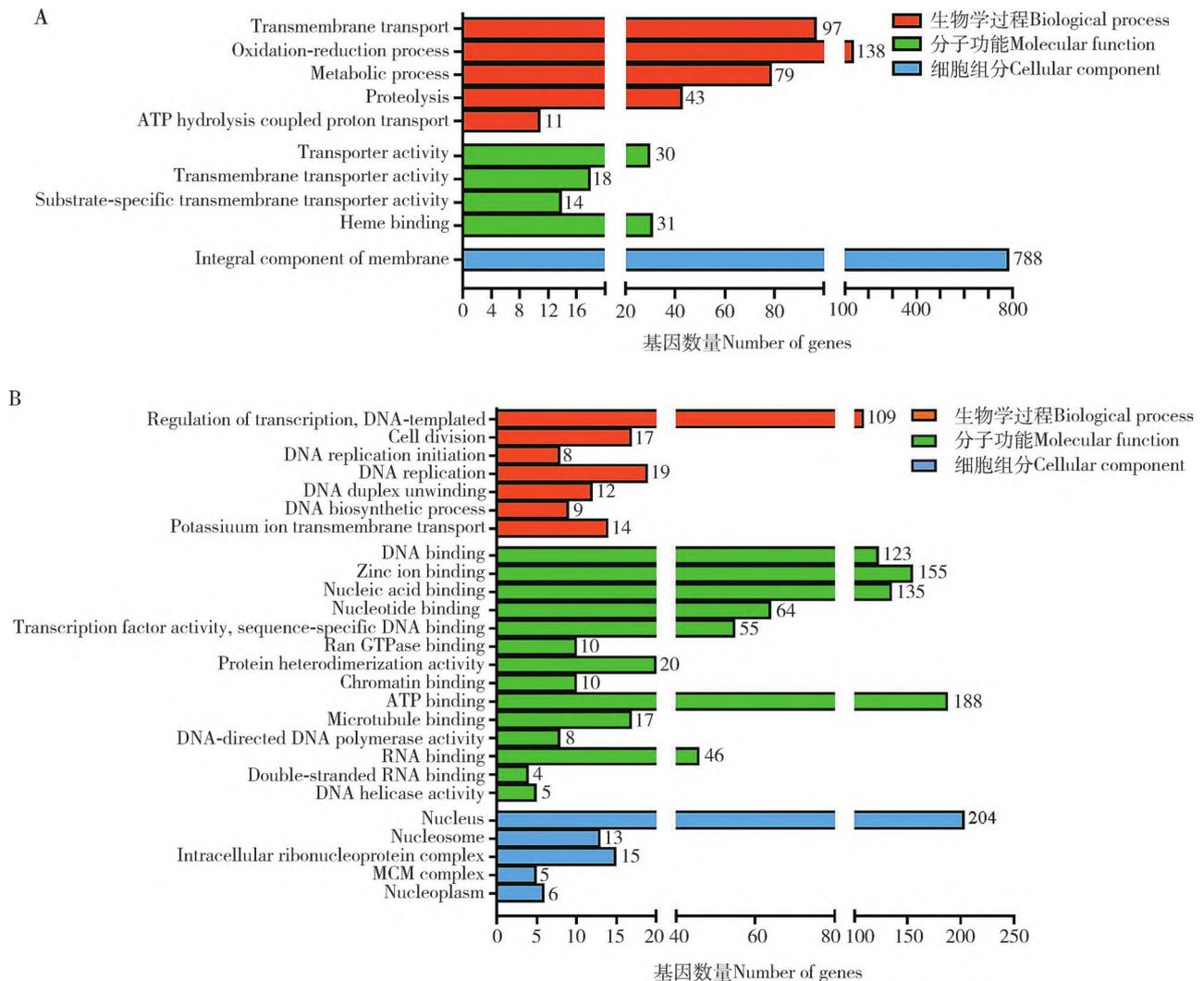


图4 中华蜜蜂精巢(A)和卵巢(B)转录组中上调表达基因的GO显著富集图

Fig. 4 GO enrichment diagram of up-regulated genes in the transcriptome of the testis (A) and ovary (B) of *Apis cerana cerana*

ribonucleoprotein complex)、核原生质(nucleoplasm)和核小体(nucleosome)等。10个KEGG通路显著富集($q < 0.05$),包括DNA复制(DNA replication)、mRNA监测通路(mRNA surveillance pathway)和碱基切除修复(base excision repair)等。

3 讨论

本研究采用高通量测序技术对中华蜜蜂蜂王卵巢和雄蜂精巢转录组差异进行了分析。发现蜜蜂性别决定基因 *tra2* 和 *dsx* 在精巢和卵巢之间有表达差异(表2)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中, *tra2* 不仅是雌性性别分化所必需的,也是雄性正常精子发生所必需的(Amrein *et al.*, 1988)。其他昆虫中 *tra2* 的同源物也已陆续被分离出来,并参与了

性别决定,如地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Pane *et al.*, 2002; Salvemini *et al.*, 2009), 家蝇 *Musca domestica* (Hediger *et al.*, 2004; Burghard *et al.*, 2005), 油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* (Lagos *et al.*, 2007), 铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (Concha and Scott, 2009) 和按实蝇属 *Anastrepha* (Ruiz *et al.*, 2007; Sarno *et al.*, 2010; Schetelig *et al.*, 2012)。在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中, Nissen 等(2012)推测 *Am-tra2* 基因可能具有双重功能, 既在雄性中作为一个调控者调控 *fem* 雄性拼接, 又在雌性中参与增强 *fem* 雌性拼接。我们发现 *tra2* 在卵巢的表达量(表2)显著高于在精巢的表达量(表2), 表明 *tra2* 可能主要在雌蜂中发挥作用。另一个参与性别决定的基因 *dsx* 最初的功能被认为可能是决定性腺的性别身份, 然后扩展到控制其他组织的性别二态性。在黑腹果蝇

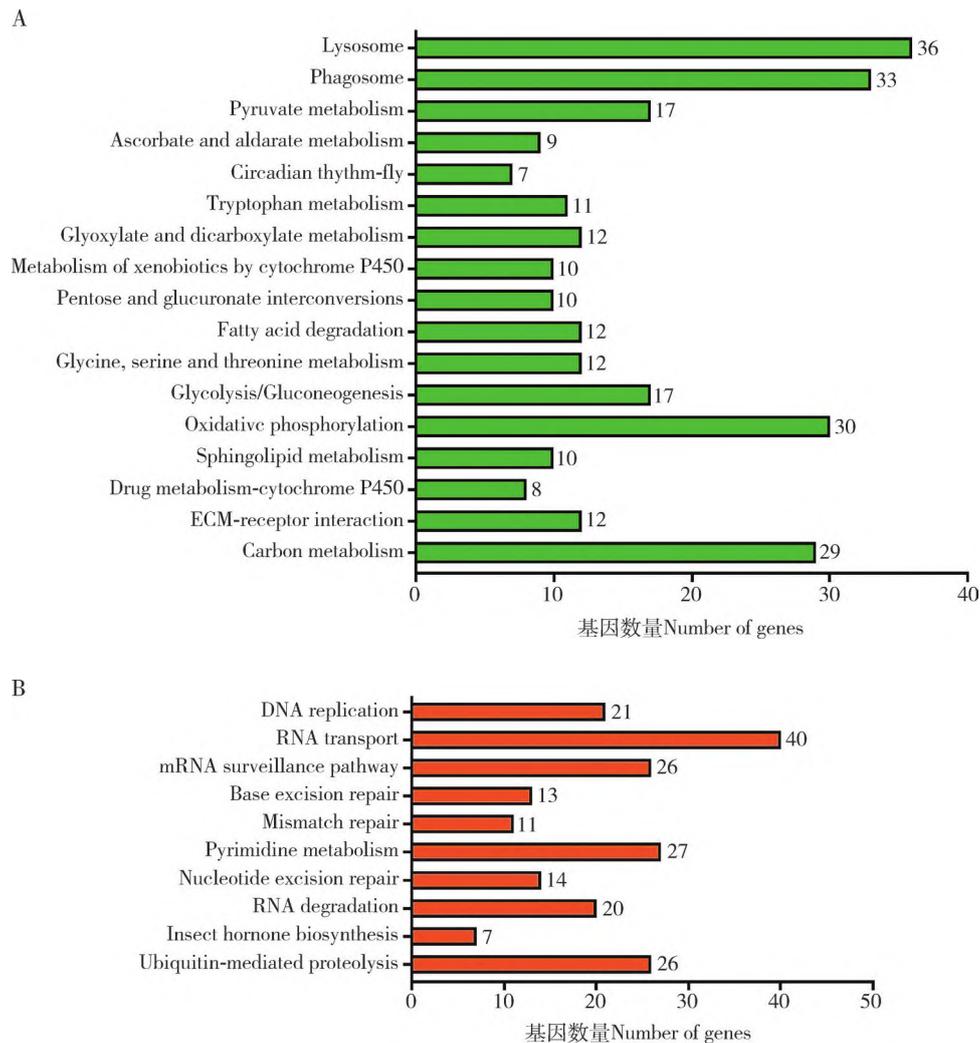


图5 中华蜜蜂精巢(A)和卵巢(B)转录组中上调表达基因的KEGG显著富集图

Fig. 5 KEGG enrichment diagram of up-regulated genes in the transcriptome of the testis (A) and ovary (B) of *Apis cerana cerana*

中,由于 *dsx* 基因的性别特异性选择性剪接,雌性体内会产生雌特异性蛋白 DSX-F,而在雄性体内产生的蛋白是 DSX-M,前者蛋白启动雌性发育,后者调控雄性发育 (Hediger *et al.*, 2010)。我们发现 *dsx* 在精巢中的表达显著上调(表 2),表明它主要在精巢中发挥作用。

分析发现与卵子形成相关的基因 *VgR*, *Vasa*, *Squid* 等均在卵巢中表达上调(表 2)。*VgR* 对昆虫的生殖发育至关重要。它编码一个 180 ~ 215 kD 的卵巢特异性蛋白,*VgR* 参与卵母细胞摄取卵黄原蛋白 (Mizuta *et al.*, 2013)。它通常在雌性生殖发育过程中的卵巢高度表达。Boldbaatar 等(2008)通过对螬 *VgR* 的 RNA 干扰试验得出,相比之下,对照组显示出更大的卵子,并且大多数呈现棕色或褐色,表明摄取了卵黄原蛋白,而实验组卵子更小,颜色也非常淡。我们的结果表明,*VgR* 在卵巢中表达上调(表

2),表明该基因参与了卵子的生成过程。*Vasa* 基因最初在果蝇中被鉴定为生殖细胞发育所需的母体效应基因 (Schüpbach and Wieschaus, 1986)。此外,*vasa* 对 *nanos* RNA 的定位是必需的,也促进了 *nanos* RNA 的翻译 (Gavis *et al.*, 1996)。*Vasa* RNA 在雄性生殖细胞中的表达已在许多生物体内得到证实 (Kobayashi *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005; Marracci *et al.*, 2007; Nakkrasae and Damrongpho, 2007; Zhou *et al.*, 2010)。Wang 等(2012)利用原位杂交检测拟穴青蟹 *Scylla paramamosain* 在卵发生时 *Vasa* 的表达和分布,结果表明,在卵发生过程中,*Sp-vasa* RNA 在 I 期卵浆中、III 期核区中、V 期核周区中均有表达。*Squid* 在 *gurken* 和 *oskar* mRNA 的调控中起着关键作用,是 *gurken* mRNA 向核背侧移动的特异性需要,也在 *gurken* mRNA 的锚定和翻译中发挥作用 (Bastock and St Johnston, 2008)。

分析发现与精子形成相关的基因包括 *hedgehog* 和 *Wnt6* 等均在精巢中表达上调(表 2)。Hedgehog 信号分子是由信号细胞分泌的一种局域性蛋白配体。在脊椎和无脊椎动物的诸多发育过程中,该通路调控着细胞命运、增殖与分化。Wnt 是一种分泌型糖蛋白,它的不同亚型已在多种动物中被找到(Gao *et al.*, 2014)。Luo 等(2015)发现 *Wnt6* 在生殖腺的 cap 细胞中特异性表达。我们的结果表明, *Hedgehog* 和 *Wnt6* 在精巢中的表达量高于卵巢中的(表 2),表明这两个基因可能参与了精子的发生。

将注释到 GO 数据库中的 3 154 个精巢和卵巢差异表达基因进行 GO 分类,与发育繁殖和性别相关的生物学过程包括繁殖(GO:0000003)、生长(GO:0040007)和发育过程(GO:0032502),共涉及 58 个相关基因(图 3)。精巢和卵巢的差异表达基因显著富集于 4 个功能性类别。其中与性别决定相关的差异表达基因 *Dsx* 显著富集于特异性序列 DNA 结合转录因子活性类别(GO:0003700),表明这个基因可能作为一种转录因子来调控其他基因的转录拼接。另外,与精子卵子形成相关的差异表达基因 *VgR*, *Squid* 和 *hedgehog* 显著富集于膜的整体构成(GO:0016021)(图 4:A),表明这几个基因可能参与了精子与卵子膜的形成过程。为进一步确定差异表达基因参与的主要生化代谢途径和信号通路,我们对差异表达基因进行了 KEGG 分析,结果显示 ECM 受体交互作用(KO04512)和溶酶体(KO04142)显著富集(图 5:A)。Bello 等(2015)指出 ECM 通过直接或间接的方式影响胚胎和成年生命的所有步骤。具体机理有待于进一步研究论证。

参考文献 (References)

- Amrein H, Gorman M, Nöthiger R, 1988. The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell*, 55(6): 1025–1035.
- Anders S, Huber W, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.*, 11(10): R106.
- Bastock R, St Johnston D, 2008. *Drosophila* oogenesis. *Curr. Biol.*, 18(23): R1082–R1087.
- Bello V, Moreau N, Sirour C, Hidalgo M, Buisson N, Darribère T, 2015. The dystroglycan: Nestled in an adhesome during embryonic development. *Dev. Biol.*, 401(1): 132–142.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE Jr, Omholt SW, 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114(4): 419–429.
- Boldbaatar D, Battsetseg B, Matsuo T, Hatta T, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Fujisaki K, 2008. Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite. *Biochem. Cell Biol.*, 86(4): 331–344.
- Burghardt G, Hediger M, Siegenthaler C, Moser M, Dübendorfer A, Bopp D, 2005. The *transformer2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev. Genes Evol.*, 215(4): 165–176.
- Concha C, Scott MJ, 2009. Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the transformer gene. *Genetics*, 182(3): 785–798.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P, 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, 8(3): 175–185.
- Florea L, Song L, Salzberg SL, 2013. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues. *PLoS Research*, 2: 188.
- Gao J, Wang X, Zou Z, Jia X, Wang Y, Zhang Z, 2014. Transcriptome analysis of the differences in gene expression between testis and ovary in green mud crab (*Scylla paramamosain*). *BMC Genom.*, 15: 585.
- Gavis ER, Lunsford L, Bergsten SE, Lehmann R, 1996. A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA. *Development*, 122(9): 2791–2800.
- Hasselmann M, Gempe T, Schiøtt M, Nunes-Silva CG, Otte M, Beye M, 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454(7203): 519–522.
- Hasselmann M, Lechner S, Schulte C, Beye M, 2010. Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(30): 13378–13383.
- Hediger M, Burghardt G, Siegenthaler C, Buser N, Hilfiker-Kleiner D, Dübendorfer A, Bopp D, 2004. Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Dev. Genes Evol.*, 214(1): 29–42.
- Hediger M, Henggeler C, Meier N, Perez R, Saccone G, Bopp D, 2010. Molecular characterization of the key switch *F* provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics*, 184(1): 155–170.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL, 2013. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, 14(4): R36.
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y, 2000. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Dev.*, 99(1–2): 139–142.
- Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K, 2007. The transformer gene in *Bactrocera oleae*: The genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol. Biol.*, 16(2): 221–230.
- Luo L, Wang H, Fan C, Liu S, Cai Y, 2015. Wnt ligands regulate Tkv expression to constrain Dpp activity in the *Drosophila* ovarian stem

- cell niche. *J. Cell Biol.*, 209(4): 595–608.
- Marracci S, Casola C, Bucci S, Ragghianti M, Ogielska M, Mancino G, 2007. Differential expression of two vasa/PL10-related genes during gametogenesis in the special model system *Rana*. *Dev. Genes Evol.*, 217(5): 395–402.
- Mizuta H, Luo W, Ito Y, Mushiobira Y, Todo T, Hara A, Reading BJ, Sullivan CV, Hiramatsu N, 2013. Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 166(1): 81–90.
- Nakkrasae LI, Damrongphol P, 2007. A vasa-like gene in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol. Reprod. Dev.*, 74(7): 835–842.
- Nissen I, Müller M, Beye M, 2012. The *Am-tra2* gene is an essential regulator of female splice regulation at two levels of the sex determination hierarchy of the honeybee. *Genetics*, 192(3): 1015–1026.
- Pane A, Salvemini M, Delli Bovi P, Polito C, Saccone G, 2002. The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development*, 129(15): 3715–3725.
- Ruiz MF, Milano A, Salvemini M, Eirín-López JM, Perondini ALP, Selivon D, Polito C, Saccone G, Sánchez L, 2007. The gene transformer of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE*, 2(11): e1239.
- Salvemini M, Robertson M, Aronson B, Atkinson P, Polito LC, Saccone G, 2009. *Ceratitis capitata* transformer-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Ctra*, the master gene for female sex determination. *Int. J. Dev. Biol.*, 53(1): 109–120.
- Sarno F, Ruiz MF, Eirín-López JM, Perondini ALP, Selivon D, Sánchez L, 2010. The gene transformer-2 of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evol. Biol.*, 10: 140.
- Schetelig MF, Milano A, Saccone G, Handler AM, 2012. Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(1): 51–57.
- Schulze SK, Kanwar R, Gölzenleuchter M, Therneau TM, Beutler AS, 2012. SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq. *BMC Genom.*, 13: 524.
- Schüpbach T, Wieschaus E, 1986. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 195(5): 302–317.
- Wang Y, Chen Y, Han K, Zou Z, Zhang Z, 2012. A vasa gene from green mud crab *Scylla paramamosain* and its expression during gonadal development and gametogenesis. *Mol. Biol. Rep.*, 39(4): 4327–4335.
- Westfall PH, 2008. The Benjamini-Hochberg method with infinitely many contrasts in linear models. *Biometrika*, 95(3): 709–719.
- Wilkins AS, 1995. Moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays*, 17(1): 71–77.
- Xu H, Gui J, Hong Y, 2005. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev. Dyn.*, 233(3): 872–882.
- Zeng ZJ, 2009. Apiculture. 2nd Ed. China Agriculture Press, Beijing. 93–95. [曾志将, 2009. 养蜂学(第二版). 北京: 中国农业出版社. 93–95]
- Zeng ZJ, 2017. Apiculture. 3rd Ed. China Agriculture Press, Beijing. 28–29. [曾志将, 2017. 养蜂学(第三版). 北京: 中国农业出版社. 28–29]
- Zeng ZJ, 2020. Advances in honeybee biology in China over the past 70 years. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国70年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264]
- Zhou Q, Shao M, Qin Z, Kyoung HK, Zhang Z, 2010. Cloning, characterization, and expression analysis of the dead-box family genes, *fc-vasa* and *fc-pl10a*, in chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 28(1): 37–45.

(责任编辑: 马丽萍)