

熊翠玲,黄积颢,梁 勤,等. 基于 RNA-seq 技术分析意大利蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的高表达基因[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):29-35.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.007

# 基于 RNA-seq 技术分析意大利蜜蜂幼虫肠道 响应球囊菌胁迫的高表达基因

熊翠玲<sup>1</sup>,黄积颢<sup>1</sup>,梁 勤<sup>1</sup>,徐细建<sup>1</sup>,张翌楠<sup>1</sup>,骆 群<sup>2</sup>,刘 敏<sup>1</sup>,陈大福<sup>1</sup>,郭 睿<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学蜂学学院,福建福州 350002; 2. 江西省养蜂研究所,江西南昌 330200)

**摘要:**对意蜂幼虫肠道组织基因进行深度 RNA 测序,并对高表达基因进行 GO 注释和 KEGG 分析,旨在揭示意蜂幼虫免疫抗病机制。分别取 3、4、5、6 日龄意蜂幼虫中肠组织抽提 RNA,合成 cDNA。得到的总读段数都在 26 715 638 条以上,有效数据达到 97% 以上,且测序饱和度良好,说明测序所得数据真实可信。将测序有效数据和意蜂公布 DNA 数据库进行比对,发现意蜂幼虫肠道中有 13 789 个基因有不同程度表达。选取各样本 FPKM 排序最前且表达水平最高的 100 个基因进行 GO 注释,这里主要涉及细胞组分、分子功能和生物学进程功能分析。利用 KEGG 分析显示这 100 个高表达基因分布在能量代谢、翻译、组装和降解以及信号转导等多条通路上。初步分析相应共有基因和特有基因在相关通路上的作用,并对意蜂幼虫肠道受球囊菌胁迫后的相关免疫机制进行一定分析。

**关键词:**RNA-seq;意大利蜜蜂;幼虫肠道;高表达基因

**中图分类号:**S893.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)13-0029-06

蜜蜂白垩病是由蜜蜂球囊菌感染蜜蜂幼虫而导致的致死性真菌病<sup>[1]</sup>。该病主要分布在欧洲、北美和中国等地区,早在 1913 年,Maassen 等就报道了白垩病的发生,我国大陆 1961 年也曾报道发生类似蜜蜂白垩病的病害<sup>[2]</sup>。蜜蜂白垩病主要是使老熟幼虫或封盖幼虫死亡,雄蜂幼虫最易感染,因为雄蜂幼虫多在巢脾的边缘,易受低温的影响。白垩病会导致大批幼虫死亡,造成群势下降,严重病群失去产蜂蜜和蜂王浆的能力,严重影响蜂群的生产力。球囊菌属于球囊菌门球囊菌属,迄今已鉴定出球囊菌属的 22 个种,它们以致病性真菌或腐生菌存在于蜜蜂体内;在蜂群里,患病幼虫的尸体以及被污染的饲料与巢脾是疾病传播的主要来源<sup>[3]</sup>。国内养蜂生产中使用的主要蜂种是意大利蜜蜂和中华蜜蜂,意蜂极易受到球囊菌的感染而暴发白垩病,而中蜂几乎不受影响。2006 年,Evans 等公布了西方蜜蜂的基因组,为在分子水平研究西方蜜蜂奠定了基础<sup>[4]</sup>。对于白垩病的前期研究主要是集中在生化<sup>[5]</sup>、病理<sup>[6]</sup>及检测<sup>[7]</sup>等方面,分子水平的研究相对较少。目前,高通量测序技术应用于白垩病的研究报道极少,蜜蜂幼虫响应球囊菌胁迫的应答研究仍不深入。

以 RNA-seq 为代表的高通量测序技术发展迅猛,现已广泛应用于昆虫包括蜜蜂的相关研究<sup>[8-11]</sup>,然而,尚无利用二

代测序技术研究白垩病过程蜜蜂幼虫应答的相关研究,本研究利用 RNA-seq 技术对球囊菌胁迫和正常意蜂幼虫肠道进行深度测序,对表达水平最高的 100 个基因进行 GO 分类和 KEGG 代谢通路富集分析,并比较分析球囊菌感染幼虫肠道与正常幼虫肠道之间高表达基因的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物材料

本研究中使用的意大利蜜蜂幼虫取自福建农林大学蜂学学院教学蜂场,蜜蜂球囊菌菌株由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护实验室保存并活化。

### 1.2 主要试验试剂及仪器

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

恒温恒湿气候箱购自中国宁波江南仪器厂,超纯水仪购自中国四川沃特尔水处理设备有限公司,高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司,倒置显微镜为中国上海光学仪器五厂产品,超净工作台为中国苏州安泰空气技术有限公司产品,PCR 仪为美国 Bio Rad 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,超低温冰箱为中科美菱低温科技股份有限公司产品。

### 1.3 试验方法

1.3.1 意蜂幼虫饲养 中蜂幼虫的饲料配方参照王倩等的方法<sup>[12]</sup>,其中将 D-果糖和 D-葡萄糖换为新鲜蜂蜜。预试

收稿日期:2016-11-10

基金项目:国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)建设专项(编号:CARS-45-KXJ7);福建省自然科学基金(编号:2013J01070)。

作者简介:熊翠玲(1977—),女,实验师,主要从事蜜蜂保护学研究, E-mail: pandacl@sina.com;共同第一作者:黄积颢(1994—),女,硕士研究生,主要从事蜜蜂保护学研究, E-mail: 18350038128@163.com。

通信作者:陈大福,副教授,主要从事蜜蜂保护学研究, E-mail: dfchen826@163.com;郭 睿,讲师,主要从事蜜蜂保护学研究, E-mail: fafu\_ruiguo@126.com。

验中空白对照组中蜂幼虫 7 日龄成活率达到 90% 以上,说明本实验室建立的中华蜜蜂幼虫人工饲养模型可为本研究提供符合要求的中蜂幼虫。从福建农林大学蜂学学院蜂场选择 20 群健康蜂群(无白垚病症状且蜜蜂球囊菌特异性引物常规 PCR 检测为阴性)。用移虫针挑取 2 日龄幼虫,放入无菌的 24 孔细胞培养板(每孔对应 1 头幼虫,孔内加有 35 ℃ 预温的幼虫饲料),将 24 孔板放入恒温恒湿培养箱,35 ℃、70% RH 条件下培养。每隔 24 h 吸去旧饲料,加入新饲料。3 日龄时,处理组饲喂含有球囊菌孢子的人工饲料(终浓度为  $1 \times 10^7$  孢子/mL),空白对照组饲喂正常人工饲料。适宜条件下饲喂幼虫至 7 日龄,处理组和对对照组均设置 3 个生物学重复。

1.3.2 测序样品准备 肠道组织是球囊菌孢子萌发的主要场所,也是蜜蜂抵御病原入侵的重要免疫器官,故选择幼虫肠道作为测序材料。分别剖取处理组和对对照组 4、5、6 日龄幼虫肠道,为尽量减少肠道 RNA 的降解,将从解剖取样到样品放入液氮速冻的时间控制在 30 s 以内,每剖取 1 组样品,立即液氮速冻并迅速放入 -80 ℃ 超低温冰箱保存,通过 Illumina Hiseq 2500 平台对处理组和对对照组的 12 个幼虫肠道样品进行深度测序,其中处理组样品包括 4 日龄幼虫肠道(AmT1-1、AmT1-2、AmT1-3)、5 日龄幼虫肠道(AmT2-1、AmT2-2、AmT2-3)和 6 日龄幼虫肠道(AmT3-1、AmT3-2、AmT3-3),对照组为 4 日龄幼虫肠道(AmCK-1、AmCK-2、AmCK-3)。

1.3.3 RNA 抽提和 cDNA 合成 液氮冷却研磨,按照 RNA 抽提试剂盒的说明书进行 RNA 抽提,最后将 RNA 溶解于 200  $\mu$ L RNase-free 水中。取 1  $\mu$ L 溶解的 RNA,用 Evolution 600 分光光度计(Thermo Scientific 公司,美国)定量确定浓度。

1.3.4 mRNA 纯化与 cDNA 合成 抽提的总 RNA 首先利用 10 U DNase I 在 37 ℃ 条件下消化 1 h,然后利用 Oligotex mRNA Kits Midi 进行 mRNA 纯化,纯化后的 mRNA 用分光光度计进行定量。以 10  $\mu$ g mRNA 作为模板,GsuI-oligo dT 作为反转录引物,用 1 000 U Superscript II 逆转录酶在 42 ℃ 下孵育 1 h 合成第 1 链 cDNA;随后利用高碘酸钠氧化 mRNA 的 5' 端帽子结构,并连接生物素;通过 Dynal M280 磁珠筛选连接了生物素的 mRNA/cDNA,并通过碱裂解释放第 1 链 cDNA;然后通过 DNA 连接酶在第 1 链 cDNA 的 5' 末端加上接头,利

用 Ex Taq 聚合酶合成第 2 链 cDNA。最后通过 Gsu I 酶切去除 polyA 和 5' 端接头。

1.3.5 cDNA 测序 将 3、4、5、6 日龄意蜂幼虫中肠组织的 cDNA 利用 705 型 Fisher Scientific 超声波破碎仪打断至 300~500 bp,利用 Ampure beads(Illumina 公司,美国)进行纯化。随后纯化的 cDNA 利用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit - Set A(Illumina 公司,美国)构建文库,并利用 TruSeq PE Cluster Kit(Illumina 公司,美国)进行扩增。最后 Illumina Hiseq 2500 测序仪进行测序反应。测序数据已上传 NCBI SRA 数据库,SRA Num:SRA456722。

1.3.6 基因表达丰度统计 通过 Illumina PE125 测序,获得大量原始读段,去除含接头、含 N 比例大于 10% 的和低质量的读段,得到清晰读段,进而利用 Tophat 软件将清晰读段比对至意蜂的参考基因组(Amel\_4.5),表达量的计算使用 FPKM 法<sup>[10]</sup>,其计算公式为:  $FPKM = (10^6 C \times 10^3) / (NL)$ 。

1.4 高表达基因的 GO 分类及 KEGG 代谢通路富集分析 根据基因的 FPKM 值,选取各肠道样品表达量水平最高的前 100 个基因,利用在线分析工具 OmicsShare(<http://www.omicsshare.com/tools/index.php/Home/Index/index.html>)进行 GO 分类及 KEGG 代谢通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 RNA seq 测序数据概述

对 12 个肠道样品进行深度测序,获得的读段数都在 26 405 020 条以上,去除低质量读段后的清晰读段数达到 26 405 020 条以上,Q20 达到 97% 以上,说明 RNA-seq 数据质量较好。首先将清晰读段比对核糖体数据库,最多允许 5 个错配,去除比对上核糖体的读段,剩余读段用于比对意蜂参考基因组(表 1、表 2)。各样品比对上的比例均在 86% 以上,说明测序数据真实可靠。并对各肠道样品进行主成分分析(PCA)(图 1),结果显示处理组和对对照组样品的聚类情况良好,说明测序样品具有较好的重复性。

2.2 各肠道样品前 100 个高表达基因的 GO 分类 一般认为 FPKM 值在 0.10~3.75 之间的是低表达基因,在 >3.75~15 之间为中度表达基因,大于 15 的为高表达基因,根据 FPKM 值对各样品基因进行排序,选取前 100 位的高

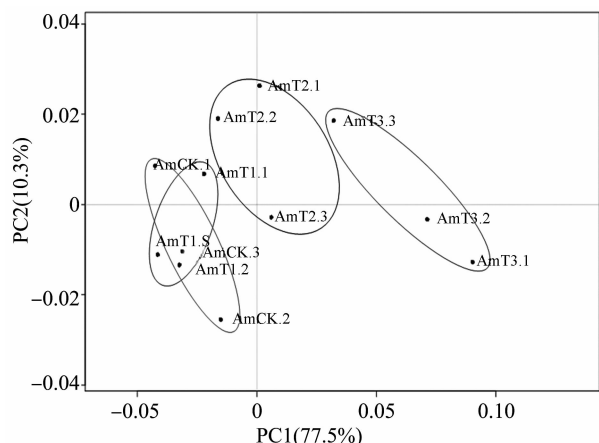
表 1 RNA-seq 数据过滤信息统计

样本名	有效读段 (条)	含接头读段 (条)	低质量读段 (条)	含 polyA (条)	含 N 读段 (条)	Q20
AmCK-1	30 802 898(98.89%)	88 842(0.57%)	83 735(0.54%)	27(0)	20(0)	3 790 735 516(98.45%)
AmCK-2	30 802 898(98.88%)	101 983(0.66%)	72 783(0.47%)	20(0)	81(0)	3 794 986 047(98.56%)
AmCK-3	29 884 378(98.83%)	109 717(0.73%)	65 649(0.43%)	5(0)	1 338(0.01%)	3 673 655 065(98.34%)
AmT1-1	28 407 618(98.72%)	106 791(0.75%)	75 473(0.52%)	26(0)	1 333(0.01%)	3 489 845 349(98.28%)
AmT1-2	29 262 394(98.98%)	90 115(0.61%)	59 827(0.4%)	12(0)	1 311(0.01%)	3 598 466 384(98.38%)
AmT1-3	29 918 578(99.01%)	84 510(0.56%)	65 005(0.43%)	13(0)	99(0)	3 686 583 925(98.58%)
AmT2-1	31 429 194(98.88%)	97 180(0.61%)	81 265(0.51%)	14(0)	0(0)	3 869 752 604(98.50%)
AmT2-2	26 405 020(98.84%)	90 573(0.68%)	63 519(0.48%)	12(0)	1 205(0.01%)	3 245 680 576(98.34%)
AmT2-3	28 238 616(98.93%)	81 579(0.57%)	71 478(0.5%)	7(0)	98(0)	3 478 940 939(98.56%)
AmT3-1	30 860 010(99.03%)	85 022(0.55%)	65 121(0.42%)	66(0)	1 436(0.01%)	3 795 439 275(98.39%)
AmT3-2	28 720 324(97.24%)	100 095(0.68%)	306 303(2.07%)	31(0)	446(0)	3 512 024 376(97.83%)
AmT3-3	29 758 812(97.16%)	114 989(0.75%)	319 668(2.09%)	25(0)	478(0)	3 638 306 244(97.81%)

注:括号内为占比,表 2 同。

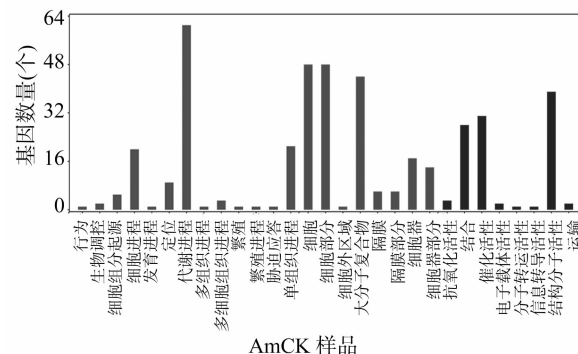
表 2 Clean reads 与参考基因组的比对信息统计

样本	总读段(条)	未比对上读段(条)	唯一比对上读段(条)	多比对读段(条)	比对比率
AmCK-1	30 540 156	3 381 653(11.07%)	26 848 849(87.91%)	309 654(1.01%)	88.93%
AmCK-2	30 544 824	3 221 171(10.55%)	26 983 983(88.34%)	339 670(1.11%)	89.45%
AmCK-3	29 636 402	3 240 646(10.93%)	26 010 060(87.76%)	385 696(1.30%)	89.07%
AmT1-1	27 942 952	3 369 197(12.06%)	24 306 993(86.99%)	266 762(0.95%)	87.94%
AmT1-2	29 045 230	3 180 318(10.95%)	25 597 778(88.13%)	267 134(0.92%)	89.05%
AmT1-3	29 759 616	3 202 462(10.76%)	26 288 338(88.34%)	268 816(0.90%)	89.24%
AmT2-1	30 908 790	3 545 971(11.47%)	27 066 899(87.57%)	295 920(0.96%)	88.53%
AmT2-2	26 025 206	3 098 226(11.90%)	22 694 714(87.20%)	232 266(0.89%)	88.10%
AmT2-3	27 965 688	2 996 833(10.72%)	24 701 137(88.33%)	267 718(0.96%)	89.28%
AmT3-1	29 849 508	4 091 689(13.71%)	25 410 587(85.13%)	347 232(1.16%)	86.29%
AmT3-2	28 575 268	3 801 677(13.30%)	24 469 781(85.63%)	303 810(1.06%)	86.70%
AmT3-3	29 512 734	4 059 196(13.75%)	25 166 090(85.27%)	287 448(0.97%)	86.25%

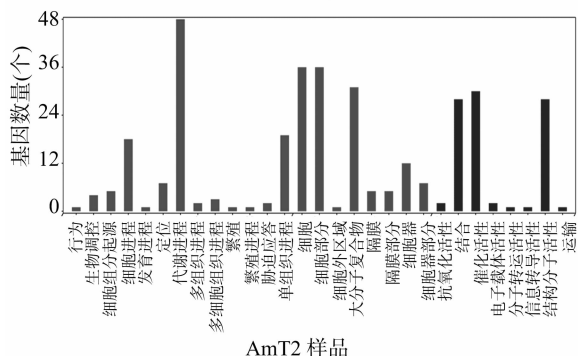


AmCK1、AmCK2、AmCK3代表对照组的3个生物学重复，AmT1.1、AmT1.2、AmT1.3代表处理组4日龄幼虫肠道的3个生物学重复，AmT2.1、AmT2.2、AmT2.3代表处理组5日龄幼虫肠道的3个生物学重复，AmT3.1、AmT3.2、AmT3.3代表处理组6日龄幼虫肠道的3个生物学重复

图1 PCA 分析



AmCK 样品

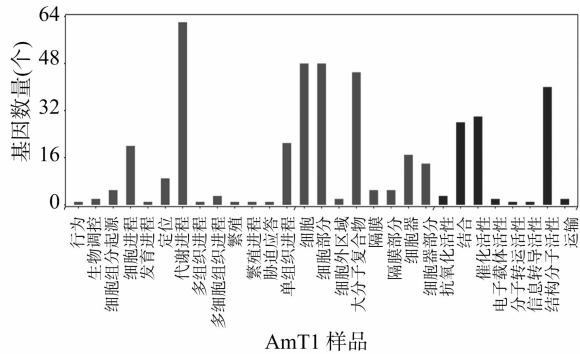


AmT2 样品

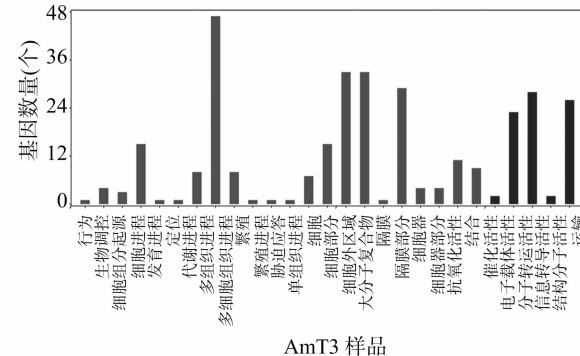
表达基因进行下一步分析。

将意蜂幼虫肠道表达水平最高的 100 个基因进行 GO 注释(图 2),这 100 个高表达基因主要集中在细胞组分、生物学进程和分子功能上发挥作用,AmCK、AmT1 和 AmT2 的高表达基因 GO 分类数均为 29 个,AmT3 的分类数有 27 个,在细胞组分方面,基因主要富集在细胞整体、细胞部分、胞外区、大分子复合物、隔膜、隔膜部分、细胞器和细胞器部分;在生物学进程方面,基因主要富集在细胞进程、行为、生物调节、细胞组分起源、发育进程、代谢进程、定位、多组织进程、多细胞组织进程、繁殖、繁殖进程、刺激反应、单组织进程;在分子功能方面,基因主要富集在抗氧化活性、电子载体活性、结合(Binding)、催化活性、结构分子活性。此外,富集在细胞组分中的基因比率高于在分子功能、生物学进程中的基因比率。

AmT1 与 AmCK 比较,同是 4 日龄,高表达基因富集的 GO 分类数量相同,且分别富集在细胞组分、生物学进程和分子功能上的基因数量基本一致,说明在胁迫的早期阶段,球囊菌尚未唤起意蜂幼虫的应答,AmT1、AmT2、AmT3 之间比较,



AmT1 样品



AmT3 样品

图2 各肠道样品前 100 高表达基因的 GO 分析

高表达基因富集的 GO 分类数量逐渐下降,且分别富集在细胞组分、生物学进程和分子功能上的基因数量也呈逐渐下降的趋势,说明随着时间延长,球囊菌胁迫增强,意蜂幼虫的应答也逐渐增强。

同时,GO 富集分析结果显示,随着胁迫时间的延长,富集在代谢过程和催化活性上的基因数量呈下降趋势,表明随着球囊菌的增殖破坏了幼虫肠道的正常代谢功能。

2.3 各肠道样品前 100 个高表达基因的 KEGG 代谢通路富集分析

对样品 AmCK、AmT1、AmT2、AmT3 表达水平最高的前 100 个基因进行 KEGG 在线分析,结果显示这些基因分别富集在 94、93、93、83 个代谢通路上(图 3)。统计分析发现这些高表达基因主要集中在新陈代谢、有机体系统、遗传信息加工、环境信息加工等 6 个途径上。

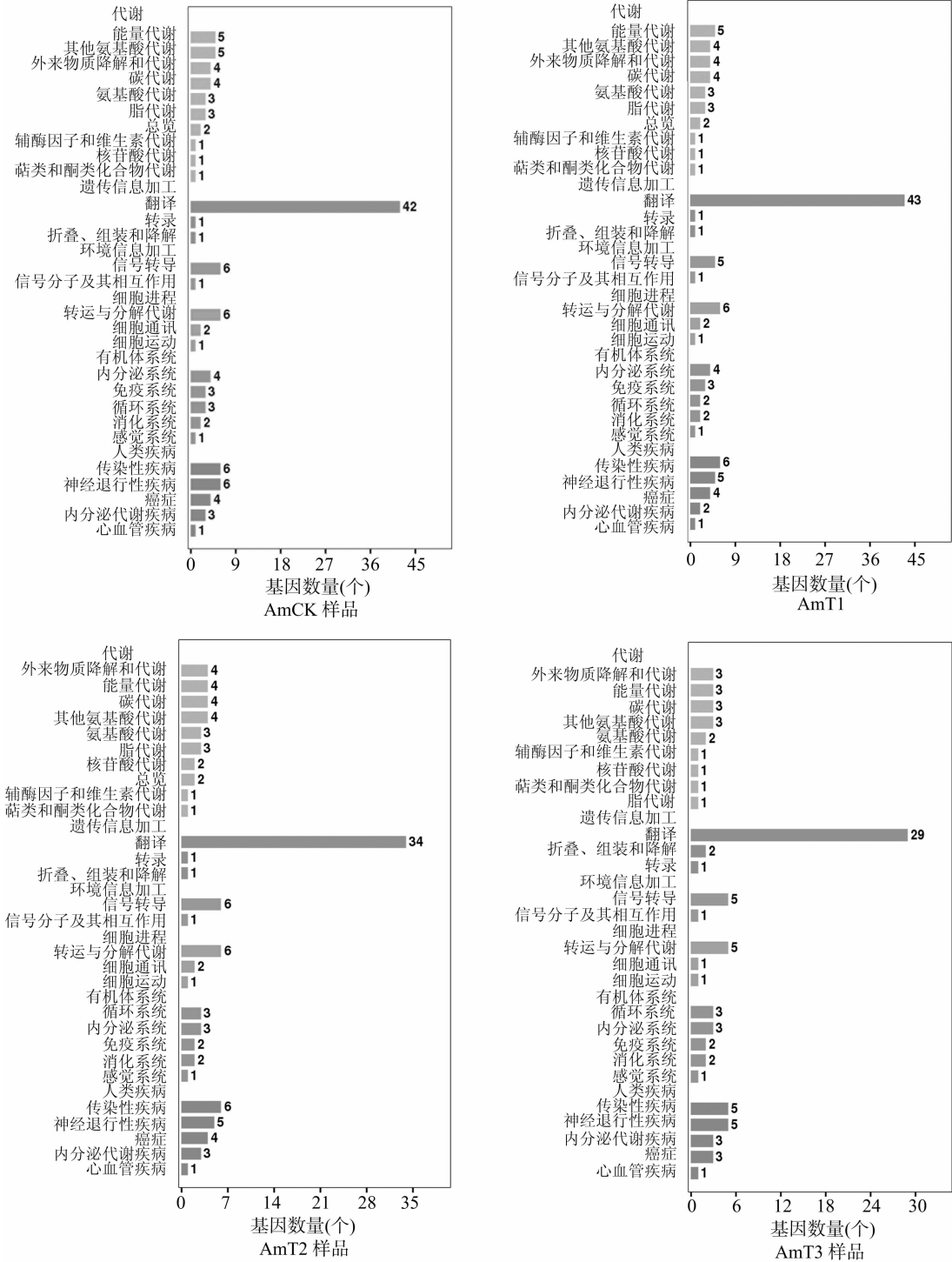


图3 各肠道样品前 100 高表达基因的 KEGG 代谢通路富集分析

2.3.1 新陈代谢 根据 KEGG 直系同源号进行分类,AmCK 新陈代谢相关基因涉及脂代谢、碳水化合物代谢、其他氨基酸

代谢、氨基酸代谢、能量代谢、核苷类和酮类化合物的代谢、外来物质的降解和代谢等 8 个代谢途径。分析结果显示,细胞色

素 C 氧化酶 I、线粒体 ATP 合酶脂质结合蛋白、细胞色素 b、细胞色素 C 氧化酶 II (线粒体) 4 个编码蛋白参与能量代谢, 酮脂酰 CoA 硫解酶、谷胱甘肽 S-转移酶 S1、类视黄醛脱氢酶参与脂类代谢过程,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶前体、山梨糖醇脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶参与碳代谢过程。精氨酸激酶同工酶、酮脂酰 CoA 硫解酶、类视黄醛脱氢酶参与氨基酸代谢过程, 在细胞色素 P450 通路上的谷胱甘肽 S-转移酶 S1 基因、谷胱甘肽 S-转移酶 D1 型 X2 基因共同作用, 细胞色素 P450 是一种含高铁血红素的蛋白, 作为一种末端氧化酶, 细胞色素 P450 主要催化机体内源和外源性物质在体内的氧化反应, 参与大部分药物的氧化代谢<sup>[13-14]</sup>。可以得到多个基因可以参与多个通路。

2.3.2 遗传信息加工 遗传信息加工通路中主要涉及转录、翻译、折叠、组装和降解, 其中参与翻译通路高表达基因占据一个很大的比例, 其中主要有编码 40S 核糖体蛋白基因和 60S 核糖体蛋白, 总共有 37 个基因编码这 2 类蛋白, 翻译通路中的 RNA 转运的延伸因子 1- $\alpha$  同工酶基因, 该基因参与许多重要的细胞过程和疾病, 包括信号传导、翻译控制、凋亡、细胞骨架组成、病毒复制等<sup>[15]</sup>。热休克蛋白在涉及转录、转移、折叠、组装和降解过程, 该基因参与新生蛋白折叠、组装加工成有生物学活性的蛋白质。

2.3.3 环境信息加工 在 KEGG 分析中, 环境信息加工过程具有 2 个方面, 分别是信号转导和信号分子及其相互作用。40S 核糖体蛋白 S6、肌动蛋白相关蛋白等参与相关信号转导表达。

2.3.4 细胞进程 细胞进程中高表达基因主要富集在转运和分解代谢、细胞运动、细胞通讯等 3 个方面。天冬氨酸蛋白酶、GLI2416、NPC2 蛋白质、肌动蛋白、热休克蛋白等参与转运和分解代谢。通路中 GLI2416 基因产物参与吞噬体的形成以及细胞通讯过程中的间隙连接, 相关基因还参与溶酶体的形成和作用。肌动蛋白参与吞噬体通路过程, 是细胞的一种重要骨架蛋白。同时肌动蛋白细胞分泌、吞噬、移动、胞质流动和胞质分离等细胞通讯过程中起重要作用。

2.3.5 有机体系统 有机体系统主要包括免疫系统、循环系统、消化系统等 9 个系统。超氧化物歧化酶、热休克蛋白等蛋白参与有机体系统。热休克蛋白参与 MPKM 通路, 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 是生物体内重要的信号转导系统之一, 参与介导生长、发育、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等多种细胞过程, MAPK 能被多种炎性刺激激活, 并对炎症的发生、发展起重要调控作用<sup>[16-17]</sup>。

2.4 对照组与处理组间比较

意蜂幼虫肠道 AmCK、AmT1、AmT2 之间的差异性不大, 高表达基因富集在新陈代谢、有机体系统、遗传信息加工、环境信息加工和细胞进程上的代谢通路数基本一致。AmT3 相对于 AmCK 具有一些特异性基因, 特异性表达出一些抗菌肽、防御素前体蛋白物质等, 抗菌肽指昆虫体内经诱导而产生的一类具有抗菌活性的碱性多肽物质, 抗菌肽对部分真菌、原虫、病毒及癌细胞等均具有强有力的杀伤作用<sup>[18-19]</sup>, 说明随着球囊菌胁迫时间的增加, 幼虫肠道诱导产生抗菌肽。

2.5 处理组间比较

在球囊菌胁迫前期 (AmT1、AmT2), 高表达基因富集在新

陈代谢、有机体系统、遗传信息加工、环境信息加工和细胞进程上的代谢通路数基本一致, 而在 AmT3 胁迫后期, 高表达基因富集在新陈代谢上的代谢通路数大幅下降, 并且免疫性物质增加, 再次说明球囊菌对意蜂幼虫的生长代谢产生了严重影响, 防御机制开始发挥作用。

KEGG 代谢通路富集分析结果 (表 3 至表 6) 显示, AmCK、AmT1、AmT2 和 AmT3 中基因富集量最多的都为核糖体通路, 但是富集的基因数量呈逐渐下降的趋势, 说明球囊菌破坏了宿主的蛋白合成系统, 推测球囊菌能通过互作减少宿主的营养供给, 从而促进自身增殖。

表 3 AmCK 组基因富集量前 10 位 KEGG 代谢通路统计

通路	基因数量 (个)	通路 ID
核糖体	41	ko03010
氧化磷酸化	4	ko00190
心脏肌肉收缩	3	ko04260
谷胱甘肽代谢	3	ko00480
药物代谢-细胞色素 P450	2	ko00982
外来物质代谢-细胞色素 P450	2	ko00980
戊糖、葡萄糖醛酸转换	2	ko00040
$\beta$ -丙氨酸代谢	2	ko00410
果糖和甘露糖代谢	2	ko00051
脂肪酸降解	2	ko00071

表 4 AmT1 样品基因富集量最多的前 10 个 KEGG 代谢通路

通路	基因数量 (个)	通路 ID
核糖体	42	ko03010
谷胱甘肽代谢	3	ko00480
氧化磷酸化	3	ko00190
药物代谢-细胞色素 P450	2	ko00982
外来物质代谢-细胞色素 P450	2	ko00980
戊糖、葡萄糖醛酸转换	2	ko00040
$\beta$ -丙氨酸代谢	2	ko00410
果糖和甘露糖代谢	2	ko00051
脂肪酸降解	2	ko00071
心脏肌肉收缩	2	ko04260

表 5 AmT2 样品基因富集量最多的前 10 个 KEGG 代谢通路

通路	基因数量 (个)	通路 ID
核糖体	33	ko03010
心脏肌肉收缩	3	ko04260
氧化磷酸化	3	ko00190
药物代谢-细胞色素 P450	2	ko00982
外来物质代谢-细胞色素 P450	2	ko00980
果糖和甘露糖代谢	2	ko00040
$\beta$ -丙氨酸代谢	2	ko00410
果糖和甘露糖代谢	2	ko00051
脂肪酸降解	2	ko00071
精氨酸和脯氨酸代谢	2	ko00330

2.6 各肠道样品前 100 个高表达基因的 Venn 分析

对处理组 and 对照各幼虫肠道样品的 Venn 分析结果显示, 72 个高表达基因为 AmCK、AmT1、AmT、AmT3 所共有, 各样品中的特有高表达基因分别为 1、2、2、13 个, 特有的高表达

表 6 AmT3 样品基因富集量最多的前 10 个 KEGG 代谢通路

通路	基因数量 (个)	通路 ID
核糖体	28	ko03010
心脏肌肉收缩	3	ko04260
氧化磷酸化	3	ko00190
果糖和甘露糖代谢	2	ko04260
$\beta$ -丙氨酸代谢	2	ko00410
精氨酸和脯氨酸代谢	2	ko00330
溶酶体	2	ko04142
内质网蛋白加工	2	ko04141
柠檬油蒽烯降解	1	ko00903
氯代烷和氯代烯烃的降解	1	ko00625

基因大多是编码抗菌肽、防御素前体、铁蛋白、抑制剂等免疫方面的基因,推测这些共有基因在球囊菌侵染的全过程都发挥着重要功能,而少数特有基因则在病程的各个阶段分别发挥作用,对这些共有与特有高表达基因的深入研究将有助于揭示意蜂幼虫的应答机制(图 4)。

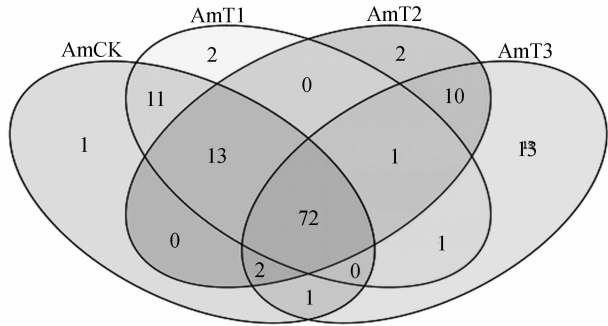


图 4 各肠道样品前 100 个高表达基因的 Venn 分析

3 讨论

本研究选取意蜂幼虫肠道作为测序材料,因为肠道是球囊菌侵染的主要场所,其转录组变化能更准确地反映意蜂幼虫对球囊菌入侵的应答。为了从全局水平了解意蜂幼虫受球囊菌胁迫前后的基因表达谱,本研究利用 RNA-seq 技术对正常幼虫肠道和球囊菌胁迫的幼虫肠道进行深度测序,通过对比意蜂参考基因组,共发现有 13 592 个基因在幼虫肠道中表达,其中已知基因有 11 918 个(87.68%),另有 197 个新基因,这些新基因将为完善意蜂基因组信息提供一定补充。

Venn 分析结果显示,4 个肠道样品中的共有高表达基因有 72 个,比如部分参与核糖体通路的基因,合成加工成供幼虫自身生长发育需要的物质,也有参与核糖体通路的 U-box 结构域蛋白基因,可作为分子伴侣或辅分子伴侣,还可能作为剪接体的部分因子,识别细胞内错误折叠或异常蛋白质,从而使其正确折叠或降解。另外,U-BOX 蛋白质还与癌病变以及自身免疫性疾病等病理过程有关,该类蛋白质通常还在将底物转运给蛋白体的过程中起作用,调节着体内蛋白质的降解<sup>[20]</sup>。各样品中的特有高表达基因分别有 1、2、2、13 个,对比处理组样品和对照组样品中的特有高表达基因,将有可能是意蜂幼虫响应球囊菌胁迫的关键应答基因,基因编码的核苷酸结合蛋白  $\beta$  亚基 1 在 AmT3 上特异性表达,该蛋白特异性结合抗原,可以起到抗体的作用,在抵御侵染上起到一定作

用。对比处理组各样品中的特有高表达基因,或许能为明确球囊菌胁迫过程不同阶段的关键应答基因提供重要线索,这些特有高表达基因值得进一步研究。

由于经费限制,本研究只设 4 日龄正常幼虫肠道作为对照组,会导致一些基因表达信息的缺失,因此,对 4、5、6 日龄正常幼虫肠道分别取样并同时深度测序,便于更全面地获得意蜂幼虫响应球囊菌胁迫的基因表达谱信息。

本研究中,在进行 RNA-seq 数据分析时,发现有部分 reads 不能定位于已有的意蜂参考基因组,它们有可能是尚未克隆的新基因,这些新基因也许在意蜂幼虫肠道发育中发挥重要作用。本研究利用 RNA-seq 技术对正常和球囊菌胁迫意蜂幼虫肠道进行深度测序,通过对各样品表达量水平最高的前 100 个基因进行 GO 分类和 KEGG 代谢通路富集分析,初步解析了意蜂幼虫响应球囊菌胁迫的应答,推测在 6 日龄之后免疫机制迅速增强,应答机制的深入阐释有赖于差异表达基因的进一步研究。

参考文献:

[1]陈淑静,康雪冬,冯 峰. 蜜蜂白垩病研究初报[J]. 中国蜂业, 1994(6):4-7.

[2]赵红霞,梁 勤,罗岳雄,等. 蜜蜂白垩病的研究进展[J]. 环境昆虫学报,2014,36(2):233-239.

[3]赵 磊,杨永红,冯 源. 白垩病研究进展[J]. 中兽医医药杂志,2006,25(2):62-64.

[4]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(7114):931-949.

[5]邵瑞宜,王丽华,赵安法,等. 蜜蜂白垩病病原观察及其综合防治措施[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),1997(3):345-348.

[6]Robinson M D,Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data [J]. Genome Biology,2010,11(3):R25.

[7]Ozsolak F,Milos P M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities[J]. Nature Reviews Genetics,2011,12(2):87-98.

[8]Yu K,Yu Y,Tang X,et al. Transcriptome analyses of insect cells to facilitate baculovirus-insect expression[J]. Protein & Cell,2016,7(5):373-382.

[9]药 青. 果蝇和蜜蜂基于全基因组比对的 RNA 分析[D]. 北京: 中国科学院生物物理研究所,2008.

[10]Trapnell C,Williams B A,Pertea G,et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. Nature Biotechnology,2010,28(5):511-U174.

[11]Mortazavi A,Williams B A,Mccue K,et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nature Methods,2008,5(7):621-628.

[12]王 倩,孙亮先,肖培新,等. 室内人工培育中华蜜蜂幼虫技术研究[J]. 山东农业科学,2009(11):113-116.

[13]王海燕,图力古尔,陈 强,等. 真菌细胞色素 P450 研究进展 [J]. 食用菌学报,2010,17(2):97-102.

[14]Coon M J,Vaz A D,Bestervelt L L. Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes[J]. FASEB Journal,1996,10(4):428-434.

张成兵,刘青利,张先平,等. 10 个 DNA 分子标记在小麦抗条锈病辅助育种上的应用[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):35-39.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.008

# 10 个 DNA 分子标记在小麦抗条锈病 辅助育种上的应用

张成兵<sup>1</sup>, 刘青利<sup>2</sup>, 张先平<sup>1</sup>, 李 云<sup>1</sup>, 邢丽红<sup>1</sup>, 张 羽<sup>3</sup>

(1. 陕西省汉中市农业科学研究所, 陕西汉中 723000; 2. 陕西省渭南市临渭区种子管理站, 陕西渭南 714000;

3. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000)

**摘要:**条锈病是小麦新品种大面积推广应用的主要限制因素。分子标记辅助选择是对小麦遗传资源抗性评价和加速抗性品种培育的有效途径。本研究以 6 份陕西省汉中地区主要推广的小麦品种、4 份汉 5 与贵农 22 杂交后选育的高代品系、32 份汉 6 与贵农 22 杂交后选育的高代品系、2 份育种材料及 1 份抗锈性鉴定诱发品种铭贤 169 为材料, 利用与小麦抗条锈病基因有关的 10 个 DNA 分子标记, 检测了 45 份供试材料中抗条锈病基因的分布情况。结果显示, 供试材料中携带 *Yr9-2* 基因的最多, 占 93.33%, 其次为 *Yr5* 基因, 占 84.44%, 携带 *Yr9-1* 基因的占 80.00%, *Yr15* 基因在 45 份供试材料中都没有检测到; 铭贤 169 中 10 个标记位点都没有检出抗性基因; 同时在 1 个材料中检测到 4 个抗性 DNA 标记的最多, 占 22.22%。有的抗条锈病分子标记是基于特定的材料而构建的, 不一定适合对所有小麦资源进行抗性检测, 与目标基因有多个连锁标记时选择遗传距离最小的标记, 在抗病品种培育过程中分子标记检测应结合田间抗病性鉴定共同筛选抗性材料。

**关键词:**条锈病; 小麦; 抗条锈病基因; 抗性标记; 分布

**中图分类号:** S512.103.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2018)13-0035-05

条锈病是由条形柄锈菌小麦专化型 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 引起的小麦叶部病害, 是世界上小麦的主要真菌病害, 也是我国小麦生产中重要的病害之一, 在我国曾多次大流行<sup>[1]</sup>。防治小麦条锈病主要通过使用化学农药和种植抗性品种 2 种途径, 化学防治通常成本高、污染环境且残留的成分危害人类健康。因此, 发掘新的优良抗条锈病基因及其紧密连锁的分子标记, 培育持久高抗病品种具有经济、有效、环保等重要意义。随着 DNA 分子标记技术的发展, 相继开发了一些与条锈病抗性基因紧密连锁的分子标记, 利用已知抗条锈病基因的分子标记, 可以从 DNA 水平上对育种材料进行快速、准确的检测和评价, 进而明确小麦品种中抗性基因的分布, 为高效开展条锈病抗性基因聚合育种带来了新的契机。

Chen 等筛选到了与抗性基因 *Yr5* 紧密连锁的随机扩增多态性 DNA (random amplification polymorphism DNA, 简称 RAPD) 和简单序列重复 (simple sequence repeat, 简称 SSR) 标记<sup>[2]</sup>。Weng 等筛选到了与 *Yr9* 紧密连锁的 SSR 标记 Xgwm582 (3.7 cM) 和 Xgwm264 (37.9 cM)<sup>[3]</sup>。邵映田等在 *Yr10* 的供体亲本 Moro 中筛选到与 *Yr10* 紧密连锁的扩增片段长度多态性 (amplification fragment length polymorphism, 简称 AFLP) 标记<sup>[4]</sup>。Peng 等研究了与抗条锈病基因 *YrH52*、*Yr15* 连锁的分子标记<sup>[5]</sup>。刘亚萍在小麦 1BS 上筛选到 *Yr24* 的 SSR 标记 Xgwm11 (6.1 cM) 和 Xgwm273 (7.1 cM)<sup>[6]</sup>。严俊等在抗病材料 H52 中筛选到抗性连锁的抗性基因类似物 (resistance gene analogue, 简称 RGA) 分子标记<sup>[7]</sup>。殷贵鸿等从小麦抗条锈病骨干亲本周 8425B 中筛选得到与抗性基因紧密连锁的片段长度为 343 bp 的抗病基因类似序列多态性分子标记技术 (resistance gene analogue polymorphism, 简称 RGAP) 标记 *Xrga-1*<sup>[8]</sup>。李嘉从济麦 22/Avocet S 和济 965261 中分别找到了抗条锈病基因的连锁 SSR 标记 Xwmc658、Xgwm582<sup>[9]</sup>。朱晓娜等筛选到抗条中 32 号小种 (CYR32) 的特异 RAPD 标记

收稿日期: 2017-12-04

基金项目: 国家重点研发计划 (编号: 2016YFD0101802)。

作者简介: 张成兵 (1969—), 男, 陕西汉中中人, 高级农艺师, 研究方向为农作物育种与栽培。E-mail: 190788588@qq.com。

通信作者: 张 羽, 硕士, 教授, 主要从事植物分子标记的开发与应用研究。E-mail: yuzhang20160315@outlook.com。

- [15] Gross S R, Kinzy T G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2005, 12(9): 772-778.
- [16] 姜 勇, 龚小卫. MAPK 信号转导通路对炎症反应的调控 [J]. 生理学报, 2000, 52(4): 267-271.
- [17] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade [Review] [J]. FASEB Journal, 1995, 9(9): 726-735.
- [18] Liu S, Yang H, Wan L, et al. Enhancement of cytotoxicity of

antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2011, 32(1): 79-88.

- [19] 赵东红, 戴祝英. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展 [J]. 中国生物工程杂志, 1999, 19(5): 14-18.
- [20] Löscher M, Fortschegger K, Ritter G, et al. Interaction of U-box E3 ligase SNEV with PSMB4, the beta7 subunit of the 20S proteasome [J]. Biochemical Journal, 2005, 388(Pt 2): 593-603.