

# 东方蜜蜂微孢子虫感染对中华蜜蜂免疫基因表达和血淋巴中糖水平的影响\*

郑寿斌\*\* 和静芳 李志国\*\*\* 高照生 蔚添添 席伟军 苏松坤

(福建农林大学蜂学学院, 福州 350000)

**摘要** 【目的】东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 主要感染蜜蜂的消化系统, 它被认为是引起蜂群崩溃综合症 (Colony collapse disorder, CCD) 的主要原因之一。东方蜜蜂微孢子虫对新寄主西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的影响已得到广泛的研究, 但它对原宿主中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 影响的报道则相对较少。本实验以意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 来源的东方蜜蜂微孢子虫感染中华蜜蜂, 分析感病中华蜜蜂的免疫基因表达和血淋巴中糖含量变化, 评价东方蜜蜂微孢子虫对中华蜜蜂健康的影响。【方法】利用荧光定量检测样本的免疫基因 (*vitellogenin*、*abaecin*、*apidaecin*、*hymenoptaecin*、*defensin1*、*defensin2* 和 *eater*) 表达量, 分析东方蜜蜂微孢子虫的感染能否引起中华蜜蜂免疫应答。通过高效液相色谱法对样本的血淋巴进行糖浓度定量分析, 检测其血淋巴中葡萄糖、海藻糖含量。【结果】所研究基因中, *hymenoptaecin* 基因表达量在 14 日龄时感染组和对照组差异显著, *vitellogenin* 基因表达量在 7 日龄时感染组和对照组间差异显著, *defensin2* 基因表达量在 7 日龄和 14 日龄时感染组和对照组均差异显著, 其他基因的表达量在均未达到显著水平; 血淋巴中的葡萄糖与海藻糖的浓度在处理组和对照组间差异不显著。【结论】东方蜜蜂微孢子虫侵染中华蜜蜂后, *hymenoptaecin*、*vitellogenin*、*defensin2* 基因在相应的日龄可对病原物应答, 然而血淋巴中的葡萄糖和海藻糖的浓度不因侵染与否变化。

**关键词** 中华蜜蜂, 东方蜜蜂微孢子虫, 免疫应答, 海藻糖, 葡萄糖

## Effects of *Nosema ceranae* on the expression of immune gene and haemolymph sugar levels of *Apis cerana* bees

ZHENG Shou-Bin\*\* HE Jing-Fang LI Zhi-Guo\*\*\*

GAO Zhao-Sheng WEI Tian-Tian XI Wei-Jun SU Song-Kun

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China)

**Abstract** 【Objectives】*Nosema ceranae* mainly infects the digestive system of honeybees and is also thought to be a factor that may lead to Colony Collapse Disorder (CCD). The effects of *N. ceranae* on *Apis mellifera* have been intensively studied, however, there has been relatively little research on its effects on its original host, *Apis cerana cerana*. Workers of *A. cerana cerana* were infected by *N. ceranae* isolated from *A. cerana cerana*. We evaluated the impacts of *N. ceranae* on the health of *A. cerana cerana* by measuring the expression of immune genes and sugar concentration in the haemolymph. 【Methods】The expression of immune genes, including *vitellogenin*, *abaecin*, *apidaecin*, *hymenoptaecin*, *defensin1*, *defensin2* and *eater*, was measured in infected and uninfected bees to determine whether infection with *N. ceranae* induced an immune response. We used HPLC analysis to quantitatively analyze the haemolymph of infected and uninfected *A. cerana cerana*, and measured concentrations of trehalose and glucose in the haemolymph under the same HPLC conditions. 【Results】Infected and uninfected bees of 14 and 7 days of age significantly differed in their expression of *hymenoptaecin*, *vitellogenin*, and *defensin2*, but the expression of other genes was not significantly different. The concentration of glucose and trehalose in the haemolymph of infected bees was not significantly different from that in uninfected bees. 【Conclusion】Expression of the

\*资助项目 Supported projects: 国家现代农业产业技术体系 (蜜蜂) 项目 (CARS-45); 福建省自然科学基金项目 (2016J05063)

\*\*第一作者 First author, E-mail: 863686642@qq.com

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

收稿日期 Received: 2017-04-24, 接受日期 Accepted: 2017-05-25

immune genes *hymenoptaecin*, *vitellogenin* and *defensin2* is induced in *Apis cerana cerana* of 7 and 14 days of age by infection with *N. ceranae*, but the concentration of glucose and trehalose in the haemolymph is not affected by infection.

**Key words** *Apis cerana*, *Nosema ceranae*, infection, immune response, trehalose, glucose

昆虫有强大的免疫系统去抵御致病因子,物理防御是生物的第一道防线,它能防止传染性病原体进入体腔,细胞和体液免疫则为第二道防线(Gillespie, 1997; Lavineand Strand, 2002; Boman, 2003)。由于蜜蜂不具备淋巴免疫器官,所以当有体外致病因子侵入时,不会产生相应抗体。但蜜蜂血淋巴在致病因子的诱导下,会产生相应的蛋白质以及肽类抵抗物质。虽然这些蛋白质和肽类物质没有病原特异性,但也能起到抑制或灭杀致病因子的作用。这即是说病原体感染时,蜜蜂主要是通过刺激免疫应答能力,改变免疫基因表达量,启动抗菌肽等抗菌物质应对病原体(郑树安, 2016)。在本实验中我们选择了以下几种免疫基因进行研究: *abaecin*、*hymenoptaecin*、*eater*、*apidaecin*、*defensin1*、*defensin2* 和 *vitellogenin*。基因 *abaecin*、*defensin*、*apidaecin*、*hymenoptaecin* 是西方蜜蜂中典型的抗菌肽基因,在中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 中同样存在该四类抗菌肽家族基因的表达(Xu *et al.*, 2012),相较于西方蜜蜂,在中华蜜蜂中抗菌肽家族基因种类较多,抵抗病原体的防御能力更加强大。*Hymenoptaecin* 抗菌肽在 1993 年被发现,研究发现给蜜蜂注射活的大肠杆菌后,在血淋巴中分离可得该抗菌肽,该抗菌肽属阳离子多肽,含 93 个氨基酸,既可以阻止革兰氏阳性菌生长,也可以阻止革兰氏阴性菌生长(Casteels *et al.*, 1993)。*Apidaecin* 抗菌肽于 1989 年被发现,在西方蜜蜂的体液中分离得到,是一类具有热稳定性、没有螺旋结构的抗菌肽,可以阻止植物性相关细菌、人类相关性细菌,属广谱抗菌肽类,但其通过抑制细菌生长的方式发挥抗菌活性(Casteels *et al.*, 1989)。*abaecin* 与常见抗菌肽 *apidaecin* 不同,这类抗菌肽与果蝇中的 *dipterocins* 序列相类似,在氨基酸序列中含有相类似的脯氨酸残基,但功能并不相似。其对于植物相关细菌表现出低效应、广谱、非特异性,在中等离子强度下不能阻止细菌生长

(Casteels *et al.*, 1990)。*defensin* 基因在蜜蜂被病原菌感染后转录表达量相对较低,研究者认为蜜蜂通过迟缓并少量的转录 *defensin* 基因,对病原体的传播进行选择性的应对(Casteels- Jossion *et al.*, 1994)。在西方蜜蜂中发现,东方蜜蜂微孢子虫的感染影响哺育蜂卵黄原蛋白基因 *vitellogenin* 的表达,卵黄原蛋白表达与蜜蜂日龄紧密相关,随着蜜蜂日龄增加,蜜蜂中卵黄原蛋白基因表达减少(Goblirsch *et al.*, 2013),在蜜蜂健康发育过程中,卵黄原蛋白有较多的功能,还与保幼激素协调,共同影响蜜蜂个体发育,如参与免疫应答,抗氧化,储存营养物质,及作为脂肪的载体(Münch *et al.*, 2008)等,尽管在蜜蜂中卵黄原蛋白的研究较多,但在东方蜜蜂健康发育分子层面研究仍较缺少。*eater* 基因在蜜蜂中功能类似脊椎动物中吞噬细胞的功能,首次在果蝇中发现,与果蝇免疫紧密相关,该基因调控果蝇吞噬细胞受体表达,参与巨噬细胞吞噬细菌,当 *eater* 基因表达受损时,吞噬细胞吞噬信号通路表现正常,但是吞噬细胞表现出受损,同时被细菌感染的果蝇的存活率降低(Kocks *et al.*, 2005)。

糖是蜜蜂体内主要的能源物质(Rockstein, 1979),血糖是蜜蜂从食物到能量转变过程中重要的中间环节,可作为临时能源贮藏库(Gmeinbauer *et al.*, 1993),同时还参与吸收及调节血淋巴渗透压等,对维持体内环境平衡起重要作用(Rockstein, 1979)。蜜蜂的血糖主要有 3 种:海藻糖、葡萄糖、果糖。其中以海藻糖最多,葡萄糖次之,果糖最少。海藻糖是昆虫血淋巴中最重要的糖类物质之一,被称为昆虫最重要的“血糖”之一(于彩虹等, 2008),存在于幼虫、蛹和成虫等阶段(Wyatt, 1967)。海藻糖主要在脂肪体内通过海藻糖合成酶或海藻糖磷酸化酶合成,释放出来后通过血淋巴输送到昆虫各个组织器官并发挥功能。为了充分利用海藻糖,海藻糖酶存在于昆虫的各个组织中,1 molL 的海

藻糖能够分解成为 2 mol 的葡萄糖 (Wyatt, 1967)。蔗糖酶是蜜蜂的消化酶,有专一性的糖苷键水解活性(中国农业百科全书,1993)。蜜蜂食物中的蔗糖要经葡糖苷酶分解为果糖和葡萄糖后才能被吸收。蜜蜂血糖浓度受到多种因素的影响,包括内部的因素,如发育阶段的不同 (Bounias,1978) 血淋巴中酶的活性(Bounias, 1984) 等;外部的因素,如食物的种类和浓度 (Bounias, 1978) 活动状态 (Abou-Seif *et al.*, 1993) 农药 (Mohssine *et al.*, 1990) 等。

蜜蜂微孢子虫病在冬季和早春易发生,孢子经蜜蜂口器被摄入中肠而侵染成年蜂,而后在消化液的作用下释放极丝,固定在蜜蜂中肠上皮细胞上,通过极丝槽沟进入中肠上皮细胞,进行无性生殖和孢子生殖(周婷,1999)。繁殖和侵入时间极快,有研究表明了组织切片观察孢子随时间在中肠的分布,9 h 后完全充满中肠,24 h 后肠腔内观察不到孢子,48 h 时侵染的中肠上皮细胞 (Graaf *et al.*, 1994);孢子侵染蜜蜂消化道后,使得蜜蜂寿命缩短,采集力和泌蜡量显著下降,而且王浆腺发育不完全;同时中肠由蜜黄色变为

灰白色,环纹消失,失去弹性,极易破裂,因此蜂群易出现春衰而严重影响生产。本文通过分析东方蜜蜂微孢子虫感染对中华蜜蜂免疫基因表达和血淋巴中糖含量的影响,为评价东方蜜蜂微孢子虫对中华蜜蜂的健康提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 蜜蜂感染与饲养

(1) 将刚要出房的中华蜜蜂工蜂封盖子巢脾(取自福建农业大学蜂学学院养蜂场)置于培养箱里培养(34 ℃, RH 70%, 黑暗),收集新出房蜜蜂。(2) 分组处理,每只蜜蜂饲喂含  $0.5 \times 10^5$  个微孢子虫的蔗糖溶液(糖水比为 1:1) 2  $\mu$ L 作为处理组,对照组蜜蜂饲喂 50%浓度的蔗糖溶液;(3) 将处理组蜜蜂及对照组蜜蜂用饲养盒饲养,45 只/盒,每天及时清理掉死亡的蜜蜂;(4) 7 日龄和 14 日龄蜜蜂,用于提取血淋巴和总 RNA。

### 1.2 引物的合成

引物委托上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 扩增反应引物  
Table 1 Reaction primer for qPCR amplification

引物 Primer	引物序列 Primer sequences	引物来源 Reference
Actin-F	TTGTATGCCAACACTGTCCTTT	Simone <i>et al.</i> , 2009
Actin-R	TGGCGGATGATCTTAATTT	
Hymenoptaecin -F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	Evans, 2006
Hymenoptaecin -R	GCGTCTCCTGTCAATCCATT	
Eater-F	CATTTGCCAACCTGTTTGT	Boncrisian <i>et al.</i> , 2011
Eater-R	ATCCATTGGTGCAATTTGG	
Vitellogenin-F	AGTTCCGACCGACGACGA	Boncrisian <i>et al.</i> , 2011
Vitellogenin-R	TTCCCTCCCACGGAGTCC	
Abaecin-F	CAGCATTCGCATACGTACCA	Evans, 2006
Abaecin-R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC	
Defensin1-F	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG	Al Nagggar <i>et al.</i> , 2015
Defensin1-R	AATGGCACTTAACCGAAACG	
Defensin2-F	GCAACTACCGCCTTTACGTC	Boncrisian <i>et al.</i> , 2011
Defensin2-R	GGGTAACGTGCGACGTTTTA	
Apidacecin-F	GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT	Simone <i>et al.</i> , 2009
Apidacecin-R	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	

### 1.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成

实验方法按照全式金 Transzol 法提取蜜蜂 RNA, 利用全式金反转录试剂盒反转录, 获得 0、7、14 d 实验蜜蜂的 cDNA。方法如下: (1) 取完整样本蜜蜂, 于 1.5 mL 无 RNA 酶离心管, 加入 100  $\mu$ L Transzol 试剂, 在冰上研磨至匀浆; 加入 900  $\mu$ L Transzol, 室温涡旋 1 min, 在室温放置 10 min, 使核酸蛋白质等杂质充分分离, 加入 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min。

(2) 离心 (12 000 g, 4  $^{\circ}$ ) 15 min。样品分层: 红色底层, 苯酚-氯仿相, 与水相交界面, 透明水相。RNA 集中于水相, 将水相转移至新的无 RNA 酶离心管中。加入 500  $\mu$ L 异丙醇, 以沉淀 RNA。(3) 离心 (12 000 g, 4  $^{\circ}$ ) 10 min, 弃上清液。加入 1 mL 75%乙醇 (冰预冷, DECP 水配制) 用以洗涤 RNA 沉淀, 上下缓慢混匀。(4) 离心 (7 400 g, 4  $^{\circ}$ ) 5 min, 弃上清液。在超净台中干燥 3 min, 挥发用以洗涤 RNA 的乙醇, 加入 30  $\mu$ L 无 RNA 酶水溶解 RNA。(5) 用 Nanodrop 800 测定 RNA 的浓度, OD<sub>260/280</sub> 比值在 1.8~2.1 间的样本选作后续实验样本。(6) 进行反转录, 建立 20  $\mu$ L 体系, 为了获得更高的合成效率, 将 RNA 模板、引物与 RNase-free Water 混匀, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后, 冰浴 2 min, 然后再加入其它反应组分。(7) 将所配体系轻轻摇匀, 瞬时离心至管底, 42  $^{\circ}$ C 水浴 15 min 延伸, 70  $^{\circ}$ C 放置 15 min, 将反转录酶灭活。所得到的产物作为 qPCR 反应模板, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。具体体系表 2。

表 2 cDNA 合成体系  
Table 2 Synthesis of cDNA system

成份 Component	体积 Volume
Total RNA/mRNA	检测的 RNA 浓度/500 ng
Random primer (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
2 $\times$ ES reaction mix	10 $\mu$ L
EasyScript <sup>®</sup> RT/RI enzyme mix	1 $\mu$ L
gDNA remover	1 $\mu$ L
RNase-free water	补至 20 $\mu$ L

### 1.4 荧光定量 PCR

按照试剂盒说明书操作, 反应体系见表 3。

表 3 荧光定量反应体系  
Table 3 qPCR reaction system

成分 Components	体积 Volume
cDNA 模板	2 $\mu$ L
Forward primer (10 $\mu$ mol/L)	0.4 $\mu$ L
Remover primer (10 $\mu$ mol/L)	0.4 $\mu$ L
2 $\times$ TransTaq <sup>®</sup> HiFi PCR SuperMix	10 $\mu$ L
Passive reference dye (50 $\times$ )	0.4 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ L

每个基因重复 3 次 (20  $\mu$ L 体系)。

PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.5 中华蜜蜂血淋巴的收集

参考文献 (王岩等, 2009) 方法收集蜜蜂血淋巴: (1) 收集 7 日龄对照组、处理组蜜蜂, 14 日龄对照组、处理组蜜蜂。(2) 将蜜蜂样本于冰上麻醉, 当蜜蜂停止运动时, 在解剖镜下固定于蜡板上。(3) 用昆虫针刺穿中蜂腹部节间膜, 昆虫针紧贴体壁, 避免伤及肠道等组织, 污染血淋巴。(4) 用标有刻度的毛细管收集伤口处血淋巴, 操作时手指可轻轻触碰腹部促进血淋巴流出, 毛细管沿水平方向靠近伤口更易吸收 (收集速度要快, 避免血淋巴氧化或污染)。每只中蜂收集量为 2  $\mu$ L。将收集到的血淋巴保存入 1.5 mL 的离心管, 离心管需保持低温, 避免血淋巴黑化。每个离心管共收集 20 只中蜂的血淋巴。(5) 用乙腈稀释每个离心管的血淋巴至 4 倍 (160  $\mu$ L), 5 000 r/min 离心 5 min, 吸出上清按日龄以及实验组和对照组冷冻保存。

### 1.6 中华蜜蜂血淋巴中海藻糖和葡萄糖含量检测

(1) 标准品母液制备: 精密称取 100 mg 无水葡萄糖标准品, 5 mL 容量瓶定容; 用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 保存, 作为母液备用。精密称取 20 mg 无水海藻糖标准品, 置于 5 mL 容量瓶定容, 用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后保存, 作为母液备用。(2) 样品母液制备: 取已制备好的血淋巴上清样品, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤保存, 作为样品母液备用。(3)

标准溶液配制与标准曲线制定:从葡萄糖标准母液中依次吸取一定量溶液,用乙腈稀释成 2.5、1.0、0.625、0.5、0.25 mg/mL 浓度,混合均匀。从海藻糖标准母液中依次吸取一定量溶液,用乙腈稀释成 2.5、1.25、1.0、0.5、0.25 mg/mL 浓度,依上述梯度的标准溶液,进样量 20  $\mu$ L,进行色谱分析(色谱条件:色谱柱:Sepax HP-Amino, 4.6 $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m 120 $\text{\AA}$ ;柱温:30 ;流动相:乙腈:水=3:1;流速:1 mL/min),分别得到海藻糖和葡萄糖的标准曲线。(4)样品浓度测定:在相同色谱条件下,进样量 20  $\mu$ L,进行色谱分析,得到相应的峰面积,由线性回归方程  $C(\%) = m_1V_2/m_2V_1 \times 100$  计算样品中葡萄糖和海藻糖含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 东方蜜蜂微孢子虫感染对中华蜜蜂免疫基因表达量的影响

本研究选取 *actin* 为参照基因,用荧光定量 PCR 法检测了 *abaecin*、*hymenoptaecin*、*eater*、*apidaecin*、*defensin1*、*defensin2* 和 *vitellogenin* 基因在不同日龄中蜂工蜂中的表达情况。

*hymenoptaecin* 基因在 7 日龄时处理组和对照组间表达量差异不显著,但在 14 日龄时处理组较对照组表达量具有显著差异。*vitellogenin* 基因表达量未随感染时间增加而增加,14 日龄时处理组与对照组的 *vitellogenin* 基因的表达量均极低且未达到显著水平,7 日龄时,处理组与对照组之间基因表达量存在显著差异。*defensin1* 基因在 7 日龄时,处理组表达量高于对照组,但未达到显著水平,14 日龄时两组该基因的表达量均下降,两者间的表达量无显著性差异。*defensin2* 基因表达量随着时间有增加的趋势,在 7 日龄和 14 日龄时,处理组的基因表达量均显著高于对照组。*apidaecin* 基因表达量随着日龄增大而增加,但 7 日龄和 14 日龄时,*apidaecin* 基因表达量在对照组和处理组间均未出现显著性差异。*eater* 基因 14 日龄时,基因的表达量在对照组和处理组中均降到极低的水平,但在 7 日龄和 14 日龄时对照组和处理组的基因表达量均无

显著性差异。*abaecin* 基因在 7 日龄与 14 日龄比较时,该基因表达量较高,但在两个时间点时对照组和处理组间均未达到显著性差异。

### 2.2 东方蜜蜂微孢子虫感染对中华蜜蜂血淋巴中葡萄糖和海藻糖含量的影响

从图 2 可知,7 日龄时中蜂血淋巴中葡萄糖浓度高于 14 日龄时的葡萄糖浓度,而海藻糖的浓度较 14 日龄时低。但东方蜜蜂微孢子虫感染中蜂后,在 7 日龄和 14 日龄时,血淋巴中葡萄糖浓度和海藻糖浓度均与对照组间没有显著性差异。

## 3 讨论

### 3.1 东方蜜蜂微孢子虫感染对中华蜜蜂免疫基因表达量的影响

*vitellogenin* 基因在哺育阶段表达量较高,当蜜蜂在 12 日龄起开始分泌蜂蜡,在蜂群中职能发生改变 (Goblirsch *et al.*, 2013),表达量相应降低,在本实验中中蜂 14 日龄时该基因表达量几乎为零,这符合前人结论;7 日龄时,感染组中蜂 *vitellogenin* 基因表达量显著低于对照组,这一现象也间接表明东方蜜蜂微孢子虫感染导致蜜蜂提早成熟,说明东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫有相似效应,即可以促进蜜蜂提早出巢采集 (Naug and Gibbs, 2009)。尽管 *defensin1* 基因和 *defensin2* 基因都是 *defensin* 抗菌肽家族基因,但两个在被东方蜜蜂微孢子虫感染中蜂中表达状况不同。*defensin1* 基因在同日龄的对照组和处理组中蜂中表达量无显著性差异;*defensin2* 在同日龄的对照组和处理组中蜂中表达量差异性显著。笔者认为 *defensin2* 抗菌肽基因的表达是有助于蜜蜂对东方蜜蜂微孢子虫感染的抵抗。*hymenoptaecin* 基因与 *defensin2* 基因表达情况相似,14 日龄时,该基因在对照组和处理组中蜂中的表达量差异性显著。同为抗菌肽基因,*apidaecin* 和 *abaecin* 基因在中蜂中的表达量较低,东方蜜蜂微孢子虫感染并未引起两个基因的表达量差异。以上实验结果说明东方蜜蜂微

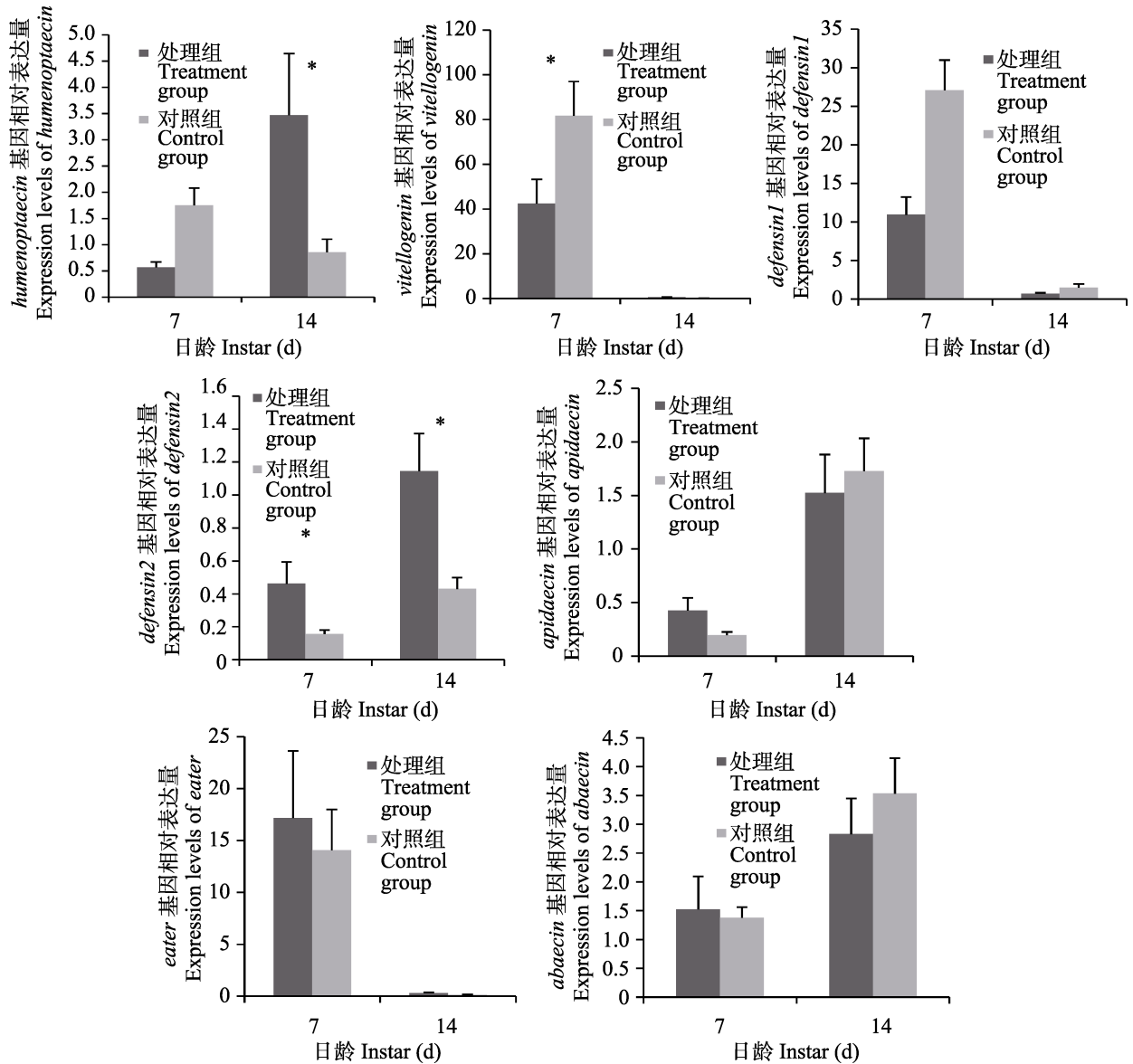


图 1 不同日龄中蜂工蜂基因 *hymenoptaecin*, *vitellogenin*, *defensin1*, *defensin2*, *apidaecin*, *eater* 和 *abaecin* 的表达  
 Fig. 1 Expression levels of *abaecin*, *hymenoptaecin*, *eater*, *apidaecin*, *defensin1*, *defensin2* and *vitellogenin* in *Apis cerana* workers at different day-old

\*\* :  $P < 0.01$ ; \* :  $P < 0.05$ . 下图同。The same below.

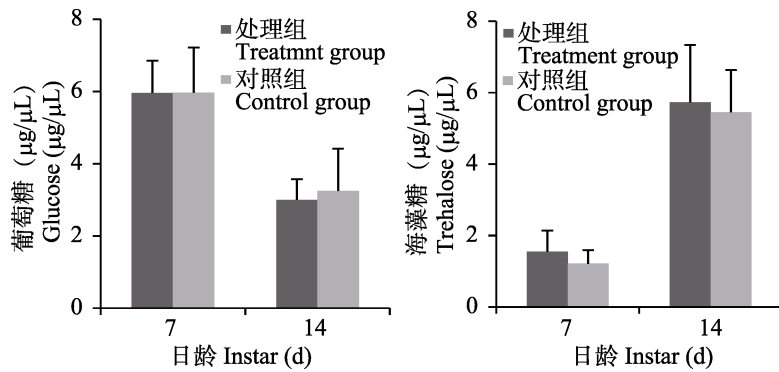


图 2 正常蜜蜂与被感染蜜蜂血淋巴中海藻糖和葡萄糖含量比较  
 Fig. 2 The amounts of haemolymph trehalose and glucose of infected bees and uninfected bees

孢子虫对中蜂的感染能够刺激中蜂的免疫应答，改变中蜂免疫基因表达量。

### 3.2 东方蜜蜂微孢子虫感染对中华蜜蜂血淋巴中葡萄糖和海藻糖含量的影响

通过实验室接种东方蜜蜂微孢子虫，并用 HPLC 检测中蜂血淋巴中的葡萄糖和海藻糖含量，我们发现在正常中蜂和被感染中蜂 7 日龄和 14 日龄血淋巴中这两种糖类在统计学上并没有显著差异。本研究认为，中华蜜蜂可能通过调节自身生理以及行为来降低由于东方蜜蜂微孢子虫感染而引起的营养失衡趋势。例如，通过中华蜜蜂的觅食行为变化和脂肪体对血糖的调控作用动态调节血糖浓度，维持血淋巴渗透压 (Rockstein, 1979)。本实验为加深了解东方蜜蜂微孢子虫对中蜂的生理影响进一步提供了依据。

### 参考文献 (References)

- Abou-Seif MAM, Maier V, Fuchs J, Mezger M, Pfeiffer EF, Bounias M, 1993. Fluctuations of carbohydrates in haemolymph of honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress. *Hormone and Metabolic Research*, 25(1): 4.
- Al Naggar Y, Wiseman S, Sun J, Cutler GC, Aboul-Soud M, Naiem E, Mona M, Seif A, Giesy JP, 2015. Effects of environmentally-relevant mixtures of four common organophosphorus insecticides on the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 82(9): 85–91.
- Boman H, 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254(3): 197–215.
- Bounias M, 1978. Intra-glycemic relations occurring during the development of honey bee workers (*Apis mellifica mellifica* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 61(1): 13–18.
- Bounias M, Morgan MRJ, 1984. Induction of honeybee haemolymphsucrase activity by high levels of dietary sucrose. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 79(1): 75–80.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, 1993. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10): 7044–7054.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P, 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *Embo. Journal*, 8(8): 2387–2391.
- Casteels P, Ampe C, Riviere L, Van Damme J, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P, 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2): 381–386.
- Casteels-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P, Tempst P, 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46): 28569.
- Fang Z, Xu JY, Yuan ZL, Cai HG, 1993. Encyclopedia of Chinese Agriculture. Beijing: Chinese Agriculture Press. 73–78. [房柱, 徐景耀, 袁泽良, 蔡宏高, 1993. 中国农业百科全书. 养蜂卷. 北京: 中国农业出版社. 73–78.]
- Evans JD, 2006. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2): 135–139.
- Graaf DCD, Raes H, Sabbe G, Rycke PHD, Jacobs FJ, 1994. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 74–81.
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T, 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42(1): 611–643.
- Gmeinbauer R, Crailsheim K, Gmeinbauer R, Craisheim C, 1993. Glucose utilization during flight of honeybee (*Apis mellifera*) workers, drone and queens. *Journal of Insect Physiology*, 39(11): 959–967.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M, 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE*, 8(3): e58165.
- Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Ramet M, Ezekowitz RA, 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*, 123(2): 335–346.
- Lavine M, Strand M, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem.Mol. Biol.*, 32(10): 1295–1309.
- Mohssine EH, Bounias M, Cornuet JM, 1990. Lunar phase influence on the glycemia of worker honeybees. *Chronobiologia*, 17(3): 201.
- Münch D, Amdam GV, Wolschin F, 2008. Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Function. Ecology*, 22(3): 407–421.
- Naug D, Gibbs A, 2009. Behavioral changes mediated by hunger in

- honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 40(6): 595–599.
- Rockstein M, 1979. The Quarterly Review of Biology. *Biochem. Insect.*, 54(2): 260.
- Simone M, Evans JD, Spivak M, 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63(11): 3016–3022.
- Wang Y, Ma J, Liu XN, 2009. Techniques and methods for collecting insect haemolymph. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1): 147–151. [王岩, 马纪, 刘小宁, 2009. 昆虫血淋巴的收集技术与方法. *昆虫知识*, 46(1): 147–151.]
- Wyatt GR, 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Advances in Insect Physiology*, 4(4): 287–360.
- Xu P, Shi M, Chen XX, 2012. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 4(1): e4239.
- Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trehalose—the blood sugar in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 832–837. [于彩虹, 卢丹, 林荣华, 王晓军, 姜辉, 赵飞, 2008. 海藻糖-昆虫的血糖. *昆虫知识*, 45(5): 832–837.]
- Zheng SA, 2016. Cell and humoral immunity of bee. *Apiculture of China*, 67(4): 31–33. [郑树安, 2016. 蜜蜂的细胞及体液免疫. *中国蜂业*, 67(4): 31–33.]
- Zhou T, 1999. The prevention and treatment of the disease related to honeybee Microsporidia should be caused take seriously. *Apiculture of China*, 50(4): 15–16. [周婷. 蜜蜂孢子虫病防治工作需引起重视. *中国养蜂*, 50(4): 15–16.]

\*\*\*\*\*



## 盲蛛大眼象 *Talanthia phalangium* Pascoe

身体船型, 眼发达, 两复眼在背部几乎相接。足细长, 腿节和附节红色, 胫节黑色。有报道称该象虫的长足和行动会模拟盲蛛, 因为两者通常生活在一起。也有专家认为, 该象虫的飞行和在树木表面的活动行为更像在模拟大蚊。盲蛛大眼象仅在东南亚国家被记录, 在我国属新纪录物种。该虫于 2015 年 6 月 1 日路园园采集于云南西双版纳, 照片是作者拍摄的标本, 该象虫标本保存于中国科学院动物研究所昆虫标本馆。

(姜春燕, 中国科学院动物研究所)