# 中华蜜蜂囊状幼虫病毒和东方蜜蜂微孢子虫顺序感染对中华蜜蜂营养和免疫的影响*

王程程** 张 真 李小青 郭 悦 马振刚 周泽扬 党晓群***

（重庆师范大学，重庆市媒介昆虫重点实验室，重庆 401331）

**摘 要 【目的】** 中华蜜蜂囊状幼虫病毒（Chinese sacbrood virus，CSBV）和东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 都是严重威胁蜜蜂健康的重要病原，本研究旨在探究 2 种病原顺序感染对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 存活率、营养代谢和免疫的影响。**【方法】** 设置中华蜜蜂取食正常食物、先喂食 CSBV 后喂食东方蜜蜂微孢子虫和先喂食东方蜜蜂微孢子虫后喂食 CSBV 3 个处理，利用 PCR 检测中华蜜蜂在取食第 2 天和第 4 天后体内病原增殖情况；通过 RT-qPCR 检测中华蜜蜂感染病原后第 2 天和第 4 天后体内 CSBV 数量以及营养代谢基因（*ilp1*、*ilp2*、*hexamerin70b* 和 *hexamerin70c*）和免疫应答基因（*toll*、*relish*、*jra*、*apidaecin*、*abaecin*、*defensin*、*hymenoptaecin* 和 *JAK*）的表达情况。**【结果】** 先喂食 CSBV 后喂食东方蜜蜂微孢子虫组的中华蜜蜂体内孢子量高于先喂食东方蜜蜂微孢子虫后喂食 CSBV 组，而先喂食 CSBV 后喂食东方蜜蜂微孢子虫组的中华蜜蜂体内 CSBV 拷贝数显著高于先喂食东方蜜蜂微孢子虫后喂食 CSBV 组。先喂食 CSBV 后喂食东方蜜蜂微孢子虫组的中华蜜蜂营养代谢基因 *ilp1*、*ilp2*、*hexamerin70c* 和 *hexamerin70b* 的表达水平随感染时间延长逐渐呈现下调，而先喂食东方蜜蜂微孢子虫后喂食 CSBV 组中显著上调。先喂食 CSBV 后喂食东方蜜蜂微孢子虫组中华蜜峰免疫基因 *toll* 和 *relish* 表达量呈现先增加后下降，而 *jra*、*JAK*、*apidaecin*、*abaecin*、*defensin* 和 *hymenoptaecin* 的表达量显著增加，而先喂食东方蜜蜂微孢子虫后喂食 CSBV 组中 8 个免疫基因的表达量均显著增加。**【结论】** 在顺序感染过程中，东方蜜蜂微孢子虫的感染抑制 CSBV 的增殖，而 CSBV 的感染则有助于东方蜜蜂微孢子虫的增殖。先喂食 CSBV 比先喂食东方蜜蜂微孢子虫对中华蜜蜂营养和生长发育的影响更显著，且更易引起宿主的免疫防御，表明 CSBV 与东方蜜蜂微孢子虫顺序感染中蜂后引起的免疫应答及营养代谢更为复杂。

**关键词** 中华蜜蜂；中蜂囊状幼虫病毒；东方蜜蜂微孢子虫；顺序感染；营养；免疫

# Effects of sequential infection of Chinese sacbrood virus and *Nosema ceranae* on nutrition and immunity of *Apis cerana cerana*

WANG Cheng-Cheng** ZHANG Zhen LI Xiao-Qing GUO Yue
MA Zhen-Gang ZHOU Ze-Yang DANG Xiao-Qun***

(Chongqing Normal University, Chongqing Key Laboratory of Vector Insect, Chongqing 401331, China)

**Abstract [Objectives]** To examine the effects of sequential infection by the Chinese sacbrood virus and *Nosema ceranae* on the survival rate, nutritional metabolism and immunity of *Apis cerana cerana*. **[Methods]** The three groups of bees were fed normal food, CSBV first and then *N. ceranae, N. ceranae* first and then CSBV and the proliferation of CSBV and *N. ceranae* in each group was detacted with PCR. The number of CSBV and the expression of nutritional metabolism genes (*ilp1*, *ilp2*, *hexamerin70b*, *hexamerin70c*) and immune genes (*toll*, *relish*, *jra*, *apidaecin*, *abaecin*, *defensin*, *hymenoptaecin*, *JAK*)

*资助项目 Supported projects：重庆市自然科学基金面上项目（cstc2019jcyj-msxmX0564）；重庆市教委科学技术研究项目（KJQN202000521）；国家自然科学基金项目（31770160）

**第一作者 First author，E-mail：996350405@qq.com

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

收稿日期 Received：2022-04-29；接受日期 Accepted：2022-08-18

were detected by RT-qPCR. **[Results]** CSBV and *N. ceranae* infection significantly reduced the survival of *A. cerana cerana*, and the number of spores in the group fed CSBV first was higher than that in the group fed *N. ceranae* first. At the time of CSBV inoculation, the proliferation of CSBV in the group fed CSBV first was significantly higher than that in the group fed *N. ceranae* first. The expression levels of nutritional metabolism genes decreased gradually over time in the group fed CSBV first, but increased significantly in the group fed *N. ceranae* first. In the group fed CSBV first and then *N. ceranae*, the expression of immune genes *toll* and *relish* increased first and then decreased, and the expression of *jra*, *apidaecin*, *abaecin*, *defensin* and *hymenoptaecin* increased significantly, while the expression of these eight immune genes increased significantly in the group fed *N. ceranae* first and then CSBV. **[Conclusion]** Infection with *N. ceranae* inhibited the proliferation of CSBV to a certain extent, whereas infection with CSBV accelerated the proliferation of *N. ceranae*. Infection with CSBV first has a stronger impact on the nutrition, growth and development of honeybees than feeding *N. ceranae* first. Bees that were first infected with CSBV mobilized their immune defense more effectively than those that were infected with *N. ceranae* first. This illustrates the complexity of the interaction between the immune response and the nutritional metabolism caused by the sequential infection of workerbees by CSBV and *N. ceranae*.

**Key words** *Apis cerana cerana*; Chinese sacbrood virus; *Nosema ceranae*; sequential infection; nutrition; immunity

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*（以下简称中蜂）是我国特有蜂种，在我国养蜂业中占据重要地位（John and Mace，2006；Ai *et al.*，2012）。中蜂囊状幼虫病毒（Chinese sacbrood virus，CSBV）是威胁中蜂健康的重要病原之一，对中蜂幼虫具有强感染性，造成中蜂断子，蜂群锐减，同时，工蜂在清理患病幼虫时也会被感染，使得工蜂个体寿命缩短（Chen and Siede，2007；Tantillo *et al.*，2015；Liu *et al.*，2017）。CSBV 虽然在成年工蜂中是隐性感染，但与其他病原共同侵染工蜂时，可能产生的危害会远超过单一病原的危害（吴孟洁等，2014）。东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 作为蜜蜂的另一种重要病原，主要感染成年工蜂，感染后的蜜蜂在生理行为上会出现异常，并且寿命缩短（Lourenco *et al.*，2021）。丁桂玲和石巍（2009）的研究表明东方蜜蜂微孢子虫的危害性有赖于营养和病毒等，一些蜜蜂病毒和微孢子虫感染密切相关，病毒可以通过微孢子虫感染蜜蜂肠道而感染蜜蜂，避免蜜蜂的免疫抵抗。Costa 等（2011）首次报道东方蜜蜂微孢子虫和蜜蜂残翅病病毒（Deformed wing virus，DWV）在蜜蜂不同身体部位的相互作用，结果发现在中肠中孢子数量和 DWV 存在负相关性，表明 DWV 和 *N. ceranae* 可能主要在蜜蜂中肠相互作用。Martin 等（2013）在夏威夷的调查并没有发现 *N. ceranae* 孢子数量和 DWV 存在任何相关性。然而，Zheng 等（2015）在实验室条件下对 DWV 和 *N. ceranae* 共同感染后的不同时期蜜蜂进行取样，结果发现在 DWV 感染的早期阶段，*N. ceranae* 可以以剂量依赖的方式加速受感染蜜蜂体内 DWV 复制，此外该研究还表明营养对病毒的感染也有着一定影响，在饲喂花粉的蜜蜂中 *N. ceranae* 对 DWV 滴度的影响要比只饲喂糖水的蜜蜂要强。Chaimanee 等（2012）发现西方蜜蜂 *Apis mellifera* 接种 *N. ceranae* 后引起抗菌肽 *defensin*、*abaecin*、*apidaecin* 和 *hymenoptaecin* 显著下调。Schwarz 和 Evans（2013）分析 *Crithidia mellificae* 和 *N. ceranae* 的侵染对西方蜜蜂免疫的影响，发现蜜蜂在感染孢子后数小时内就会产生免疫反应，随后会快速增强 Toll 和 Imd 通路信号，且 *apidaecin*、*hymenoptaecin*、*defensin* 和 *abaecin* 的表达均出现上调。在养殖过程中，中蜂成年工蜂对 *N. ceranae* 和 CSBV 的自然感染率极高，双感染较单感染下蜜蜂死亡率高，说明 CSBV 和 *N. ceranae* 之间可能存在相互作用关系（林丽花，2016）。郑寿斌等（2017）研究发现东方蜜蜂微孢子虫的感染引起抗菌肽 *hymenoptaecin*，*defensin 2* 著上调。

营养代谢是所有生物进行正常生长发育活动的基础，生物体营养不仅影响免疫功能，可能还会导致生物体发病和死亡（DeGrandi-Hoffman and Chen，2015）。胰岛素样肽（Insulin-like peptide，ilp）ilp1 和 ilp2 可与胰岛素样受体结合，激活胰岛素受体介导的信号通路，从而调节机体营养的吸收与储存、细胞的增殖及分化等多种生命活动（Wu and Bronw，2006；Liao *et al.*，2020）。hexamerin70b 和 hexamerin70c 都是储存蛋白，属于 Hexamerin 超家

族，主要由蜜蜂幼虫脂肪体合成，为蜜蜂的变态发育、飞行提供物质和能量（Martins and Bitondi，2012）。郑彬悦等（2019）发现 SBV 的侵染显著降低了幼虫营养代谢基因 *ilp1*、*ilp2*、*hex110*、*hex70b* 和 *hex70c* 等的表达量，影响了各发育阶段中华蜜蜂的正常营养代谢，而 SBV 感染的幼虫中，主要免疫通道 IMD、Toll 和 JNK-State 的先天性病毒免疫基因 *rel*、*toll*、*apidaecin*、*hymenoptaecin*、*defensin*、*abaecin* 和 *jra* 的表达都显著上调，在成蜂中 *key* 和 *stat92e* 的上调表达。2021 年，浙江省淳安县 5 个饲养点的中蜂蜂群检测发现 CSBV 和欧洲幼虫腐臭病病原共同存在（王德前等，2021）。

综上，研究中蜂囊状幼虫病毒 CSBV 和东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 这 2 种重要病原之间是否存在协同效应显得尤为必要。因此，本研究通过对中蜂工蜂先后饲喂 CSBV 和 *N. ceranae*，研究 2 种病原顺序感染对中蜂体内主要免疫通路关键基因 *toll*、*relish*、*jra*、*apidaecin*、*abaecin*、*defensin*、*hymenoptaecin* 和 *JAK*（hopscotch）及营养代谢相关基因 *ilp1*、*ilp2*、*hexamerin70b* 和 *hexamerin70c* 的影响，明确中蜂对两种病原的免疫响应能力，检测 *N. ceranae* 是否会抑制 CSBV 增殖，为进一步了解二者的侵染机理和蜜蜂防御机制奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试材料

健康的中华蜜蜂、CSBV 病毒和东方蜜蜂微孢子虫均由重庆师范大学资源昆虫及其病原微生物学研究室提供。

## 1.2 主要试剂及材料

Trizol 试剂、反转录试剂盒 Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser 以及 Premix Taq™（Ex Taq™ Version 2.0）购于 TaKaRa 公司；qPCR 试剂盒 FastStart Essential DNA Green Master 购于 Roche 公司；DEPC 处理水购于生工生物工程（上海）股份有限公司；三氯甲烷、无水乙醇和异丙醇等常用试剂购于重庆化学试剂有限公司。荧光定量 PCR 仪为 BIO-RAD 的 CT036991-CFX96TMReal-Time System；PCR 扩增仪为 BIO-RAD 的 T100-梯度 PCR 仪。

## 1.3 中华蜜蜂工蜂的接种

用 50%的糖水稀释 CSBV 病毒液至 $2.5\times10^6$ 拷贝/μL，再用 50%的糖水将孢子液稀释至 $2.5\times10^4$ 个/μL。

选取刚刚出房的中蜂工蜂转移至 48 孔板中，分成 3 组，每组 150 只。然后放置在恒温恒湿培养箱（温度 30 ℃，湿度 60%）中饥饿 2 h 后，通过单只蜜蜂饲喂的方式接种配制好的病毒液和孢子液，接种情况如下：

1）空白对照组，饲喂 4 μL 的 50%糖水；

2）CSBV+*N. ceranae* 组，先饲喂 4 μL 的 $2.5\times10^6$ 拷贝/μL CSBV 病毒液，24 h 后再饲喂 4 μL 的 $2.5\times10^4$ 个/μL 孢子液；

3）*N. ceranae*+CSBV 组，先饲喂 4 μL 的 $2.5\times10^4$ 个/μL 孢子液，24 h 后再饲喂 4 μL 的 $2.5\times10^6$ 拷贝/μL CSBV 病毒液。

将接种后的中蜂转移至塑料杯中，每杯 50 只，放置在恒温恒湿培养箱培养，实验组和对照组各 3 组重复。实验期间定期更换糖水和花粉，清理杯中死亡蜜蜂，并记录中蜂死亡数，在接种后的 2 d 和 4 d 每组各取 5 只中蜂于 1.5 mL 无酶离心管中，用液氮速冻后放置在 - 80 ℃中保存。

## 1.4 中蜂总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将 1.3 节中 - 80 ℃保存的中蜂材料取出后，用液氮进行研磨，加入 1 mL Trizol 涡旋震荡混匀，静置 10 min；加入 200 μL 氯仿，振荡摇匀后静置 5 min；4 ℃，12 000 r/min，离心 10 min；取上清液，加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，- 20 ℃静置 1 h；4 ℃，12 000 r/min，离心 10 min；弃上清，加入 1 mL 70%乙醇，轻轻吹打；4 ℃，12 000 r/min，离心 10 min；弃上清，室温干燥 5 min；加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀，用紫外分光光度计测定 RNA 浓度，放置于 - 80 ℃保存。cDNA 的合成参照 Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser 说明书进行，之后放于 - 20 ℃保存。

## 1.5 中蜂感染病原的鉴定

针对 CSBV 和东方蜜蜂微孢子虫特异基因设计引物（表 1），以 1.4 节合成的 cDNA 为模板进行 PCR 反应，检测中蜂是否已经感染 CSBV 和微孢子虫。反应体系（12.5 μL）：cDNA 0.5 μL，正反

向引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，Premix Taq DNA 聚合酶 6 μL，$ddH_2O$ 5 μL。反应条件：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 40 s，50 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 1 min，72 ℃终延伸 10 min。然后用 1%琼脂糖核酸电泳检测，再使用 Image J 软件对条带进行灰度值计算，最后 GraphPad Prism 8.3.0 软件 Unpaired *t* -test 双尾检测进行显著性检测。

### 1.6　患病中蜂病毒载量、营养代谢和免疫相关基因转录水平检测

根据 CSBV 特异基因 *VP1* 构建标准质粒，并用 10 倍梯度进行稀释。之后以质粒为模板，通过 qPCR 进行检测，并建立标准曲线。以 1.4 节合成的 cDNA 为模板进行 qPCR，再用标准曲线计算出中蜂体内 CSBV 病毒拷贝数。

昆虫的营养代谢和先天免疫系统在抵御病原物入侵中发挥重要的作用。本研究中选取了 Toll 通路的上游调控基因 *toll*、Imd 通路的下游基因 *relish*、JNK 通路的下游基因 *jra*、JAK/STA 通路的 *JAK* 和抗菌肽 *apidaecin*、*abaecin*、*defensin*、*hymenoptaecin* 以及营养代谢相关基因 *ilp1*、*ilp2*、*hexamerin70b* 和 *hexamerin70c* 评估蜜蜂对两种病原的免疫响应情况。本研究选取的 4 个营养代谢基因和 8 个免疫应答基因的 qPCR 定量引物见表 1，每个样本重复 3 次。参照 FastStart Essential DNA Green Master 说明书配置 20 μL 反应体系：Green

**表 1　引物序列表**

**Table 1　List of primer sequences**

| 基因<br>Gene | 引物序列（5′-3′）<br>Primer sequences (5′-3′) | 退火温度（℃）<br>Temperature<br>(℃) | 参考文献<br>References |
|---|---|---|---|
| *VP1* | F: TAGAGTTACGTTTTGATTTTGTTT<br>R: GCGCTAGCCGTATTTCTC | 50 | 本研究 This study |
| *N. ceranae-actin* | F: GTTGACAATGGTTCAGGTATCG<br>R: GCCTCATCTCCTACATAAGCAT | 52 | 本研究 This study |
| *Ac-actin* | F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG<br>R: AGAATTGACCCACCAATCCA | 59 | 本研究 This study |
| *ilp1* | F: CGATAGTCCTGGTCGGTTTG<br>R: CAAGCTGAGCATAGCTGCAC | 59 | De Azevedo and Hartfelder，2008 |
| *ilp2* | F: TTCCAGAAATGGAGATGGATG<br>R: TAGGAGCGCAACTCCTCTGT | 59 | De Azevedo and Hartfelder，2008 |
| *hexamerin70b* | F: AACAGCCACGAATCCGTCTT<br>R:CAGGCTTGTCCAGAGGGAAG | 59 | 郑彬悦等，2019 |
| *hexamerin70c* | F: TAAGGCAGGCAGACTTGAGC<br>R: AAACGCTGTGGTGAACATGC | 59 | 郑彬悦等，2019 |
| *relish* | F: TTCCTGAAGCTGGTGCATGT<br>R: CCTGCTTTTGCTGCAAGATGT | 59 | 郑彬悦等，2019 |
| *toll* | F:CAAATCGCGCGTTCTGTTGA<br>R: TCTGCGTTCACTGAGTGCTT | 59 | 郑彬悦等，2019 |
| *jra* | F: AGGACCTATACCACCAGCGT<br>R: CGTACAATTCTTGCGCCTCG | 59 | 郑彬悦等，2019 |
| *apidaecin* | F: TAGTCGCGGTATTTGGGAAT<br>R: TTTCACGTGCTTCATATTCTTCA | 59 | Evans *et al.*，2006 |
| *abaecin* | F: CAGCATTCGCATACGTACCA<br>R: GACCAGGAAACGTTGGAAAC | 59 | Simone *et al.*，2009 |
| *defensin* | F: TGCGCTGCTAACTGTCTCAG<br>R: AATGGCACTTAACCGAAACG | 59 | Simone *et al.*，2009 |
| *hymenoptaecin* | F: CTCTTCTGTGCCGTTGCATA<br>R: GCGTCTCCTGTCATTCCATT | 59 | Simone *et al.*，2009 |
| *JAK* | F: CCAGTTGGGCAAGAATTTTCAT<br>R: TGAAAGATAAGGCTGTCCTTCA | 59 | 本研究 This study |

Master 2×conc 10 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，1.4 节合成的 cDNA 模板 1 μL，ddH2O 7 μL。反应条件：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 10 s，59 ℃退火 10 s，72 ℃延伸 20 s，40 个循环。

### 1.7 数据处理

将 qPCR 获得的 Ct 值，先用 Excel 处理，以 *Ac-actin* 为内参基因，根据 ΔΔCt 法计算出各基因相对表达量，即目的基因的相对表达量=$2^{-\Delta\Delta Ct}$，ΔΔCt=（Ct 目的基因 - Ct 内参基因）实验组 -（Ct 目的基因 - Ct 内参基因）对照组。最后用 GraphPad Prism 8.3.0 软件中的 Unpaired *t*-test 双尾检测对对照组和实验组中各基因表达情况进行差异性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 中蜂囊状幼虫病毒和东方蜜蜂微孢子虫顺序侵染后的鉴定

与正常组中蜂相比，感染 CSBV 和 *N. ceranae* 后的中蜂存活率随取食时间呈下降趋势，对 2 个处理组进行显著性分析，结果显示先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组与先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组之间中蜂的存活率之间没有显著性差异（*P*=0.628 0）（图 1）。为了确定中蜂囊状幼虫病毒和蜜蜂微孢子虫是否成功感染了工蜂中蜂，对不同的试验组进行病原特异性PCR检测并进行灰度值分析。感染 CSBV 和 *N. ceranae* 2 d 后，在中蜂中可检测到CSBV的 *VP1* 基因，也能检测到微孢子虫的 *actin* 基因（图 2：A，C），表明蜜蜂均已感染 2 种病原。先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组的第 2 天和第 4 天相比，*VP1* 扩增条带亮度显著增加（P=0.003 1），而先喂食 *N. ceranae* 组后喂食 CSBV 组的第 2 天和第 4 天 *VP1* 扩增条带亮度略有增加但不具有显著性（*P*=0.419 6），表明中蜂先感染 *N. ceranae* 对后续 CSBV 的感染有抑制作用（图 2：A，B）。在顺序感染的第 2 天和第 4 天，先喂食 *N. ceranae* 组的 *actin* 扩增亮度均弱于先喂食 CSBV 组（图 2：C，D），暗示 CSBV 的先感染可能有助于 *N. ceranae* 的入侵。

为明确CSBV与*N. ceranae*的顺序感染是否影响 CSBV 在中蜂体内侵染增殖，对接种喂食 CSBV 的中蜂体内病毒量进行了检测。首先用 10 倍梯度稀释标准质粒，再用 CSBV *VP1* 的特异性引物通过 qPCR 建立标准曲线为 $y$= - 2.804 4$x$+36.357（$R^2$ = 0.971 1）（图 3：A）。之后对实验组中蜂体内病毒量进行检测，检测结果显示，先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组的中蜂体内病毒量在第 2 天和第 4 天没有显著变化（*P*=0.506 9），与 PCR 检测的灰度值结果一致（图 2：B），且显著低于先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组第 2 天（*P*=0.003 7）和第 4 天（*P*<0.000 1）的中蜂体内病毒量（图 3：B），进一步表明中蜂先感染 *N. ceranae* 会抑制后续 CSBV 病毒在体内的侵染和增殖。

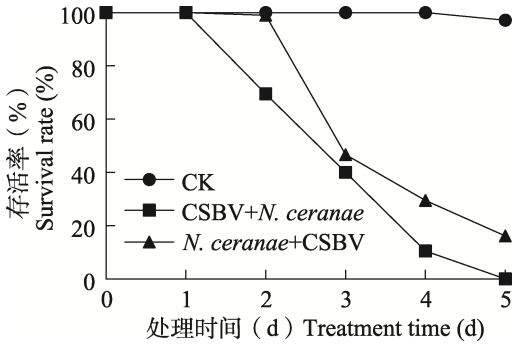


**图 1 CSBV 和 *Nosema ceranae* 顺序侵染后中华蜜蜂工蜂存活率**

**Fig. 1 Survival rate of *Apis cerana cerana* after infection by CSBV and *Nosema ceranae***

CK：饲喂不含 CSBV 和 *N. ceranae* 饲料的中蜂；CSBV+*N. ceranae*：先喂食 CSBV，24 h 后喂食 *N. ceranae* 的中蜂；*N. ceranae* + CSBV：先喂食 *N. ceranae*，24 h 后喂食 CSBV 的中蜂。下图同。

CK: *A. cerana cerana* were fed without CSBV and *N. ceranae*; CSBV+*N. ceranae*: *A. cerana cerana* were fed with CSBV, for 24 h then fed with *N. ceranae*; *N. ceranae* + CSBV: *A. cerana cerana* were fed with *N. ceranae*, for 24 h then fed with CSBV. The same below.

### 2.2 中蜂囊状幼虫病毒和东方蜜蜂微孢子虫顺序侵染对中华蜜蜂免疫防御的影响

对免疫相关基因的荧光定量 PCR 检测结果显示，与对照中蜂相比，先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组中蜂在感染第 2 天，*relish*（*P*<0.000 1），*toll*（*P*=0.005 3），*jra*（*P*=0.002 2），*JAK*（*P*=0.001 1）的表达量均显著增加（图 4：A），暗示中蜂体内 Toll，Imd，JNK 和 JAK/STAT 免疫通路均被激活。同时，抗菌肽基因 *apidaecin*（*P*=0.009 1），*abaecin*（*P*=0.007 0），*defensin*（*P*=0.003 8）和

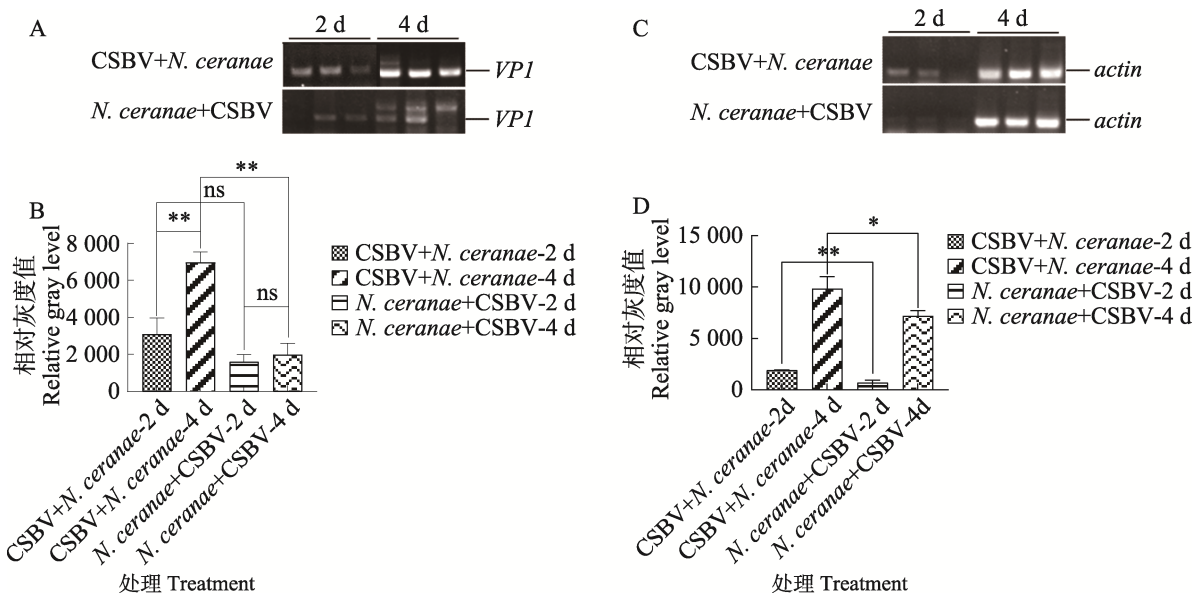


**图 2　CSBV 和 *Nosema ceranae* 的 PCR 检测**

**Fig. 2　CSBV and *Nosema ceranae* were detected by PCR**

A. 顺序感染 CSBV 和 *N. ceranae* 后第 2 天和第 4 天的 *VP1* 检测结果；B. *VP1* 条带相对灰度值；C. 顺序感染 CSBV 和 *N. ceranae* 后第 2 天和第 4 天的 *actin* 检测结果；D. *actin* 条带相对灰度值。图中数据为平均值 ± 标准差（*n*=3）；*，**，***分别表示两个处理组间基因条带相对灰度值在 0.05、0.01 和 0.001 水平上存在显著差异。

A. PCR product of *VP1* on the 2nd and 4th day after sequential infection of CSBV and *N. ceranae*; B. Relative gray level of *VP1* band; C. PCR product of *actin* on the 2nd and 4th day after sequential infection of CSBV and *N. ceranae*; D. Relative gray level of *actin* band. Data in the figure are mean ± SD (*n*=3); *, ** and *** indicates significant differences in the relative gray values of gene bands between the two treatment groups at the levels of 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

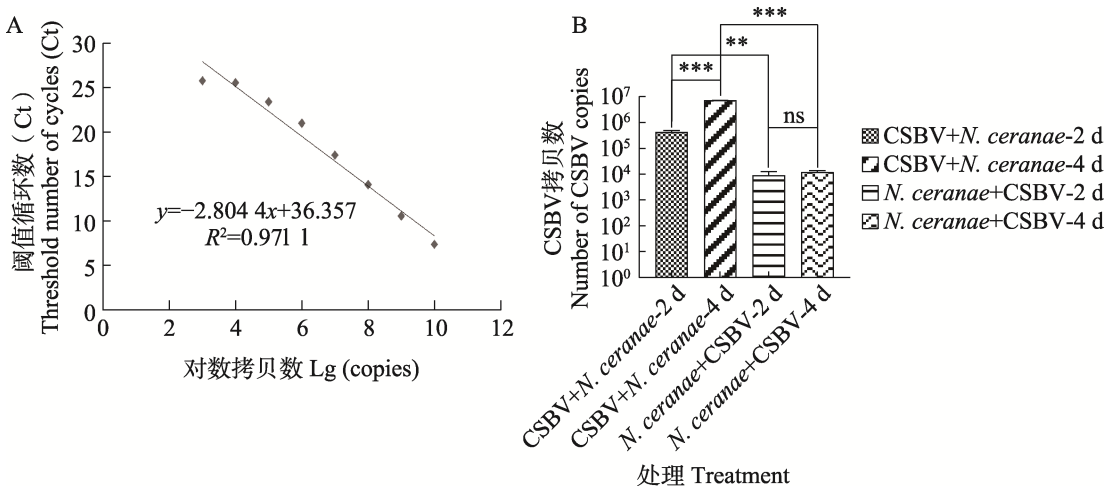


**图 3　CSBV 和 *Nosema ceranae* 感染中蜂后蜜蜂体内 CSBV 病毒量**

**Fig. 3　The copies of CSBV virus in *Apis cerana cerana* infected by CSBV and *Nosema ceranae***

A. *VP1* 基因标准曲线；B. 顺序感染第 2 天和第 4 天中蜂体内 CSBV 拷贝数。图中数据为平均值 ± 标准差（*n*=3）。ns 表示两个处理组间 CSBV 拷贝数无显著性差异；**，***分别表示两个处理组间 CSBV 拷贝数在 0.01 和 0.001 水平上存在显著差异。

A. The standard curves of *VP1* gene; B. CSBV copy number in *A. cerana cerana* on the 2nd and 4th day of sequential infection. Data in the figure are mean ± SD (*n*=3). ns means that there is no significant difference in CSBV copy number between the two treatment groups; **, *** indicates significant differences in CSBV copy number between the two treatment groups at the levels of 0.01 and 0.001, respectively.

*hymenoptaecin*（*P*=0.001 4）表达也显著上调（图 4：A）；在第 4 天，抗菌肽 *apidaecin*（*P*=0.003 4），*abaecin*（*P*<0.000 1），*defensin*（*P*<0.000 1），*hymenoptaecin*（*P*=0.003 2）表达量仍然呈上调趋势（图 4：B），免疫通路调节基因 *relish*（*P*=0.007 1）和 *toll*（*P*<0.000 1）表达量显著下降，而 *jra*（*P*=0.000 8）和 *JAK*（*P*<0.000 1）表达量则持续上调（图 4：B），暗示该阶段 JNK 和 JAK/STAT 免疫发挥主要的免疫防御作用，表明先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组诱导了宿主强烈的免疫反应而后免疫防御逐渐减弱。

先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组中蜂在感染第 2 天，*toll* 没有显著变化（*P*=0.069 0）（图 4：A），而 *relish*（*P*=0.013 3），*jra*（*P*=0.023 3）和 *JAK*（*P*=0.008 8）以及抗菌肽基因 *abaecin*（*P*<0.000 1），*defensin*（*P*<0.000 1），*hymenoptaecin*（*P*=0.000 4）表达量均显著上调（图 4：A），暗示中蜂体内 Imd, JNK 和 JAK/STAT 免疫通路被激活。在第 4 天，*toll*（*P*=0.001 0），*jra*（*P*<0.000 1），*JAK*（*P*=0.000 3），*apidaecin*（*P*<0.000 1），*abaecin*（*P*<0.000 1），*defensin*（*P*=0.000 2）和 *hymenoptaecin*（*P*<0.000 1）的表达量呈上升趋势（图 4：B），表明中蜂在先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 处理条件下的免疫响应逐渐加强。

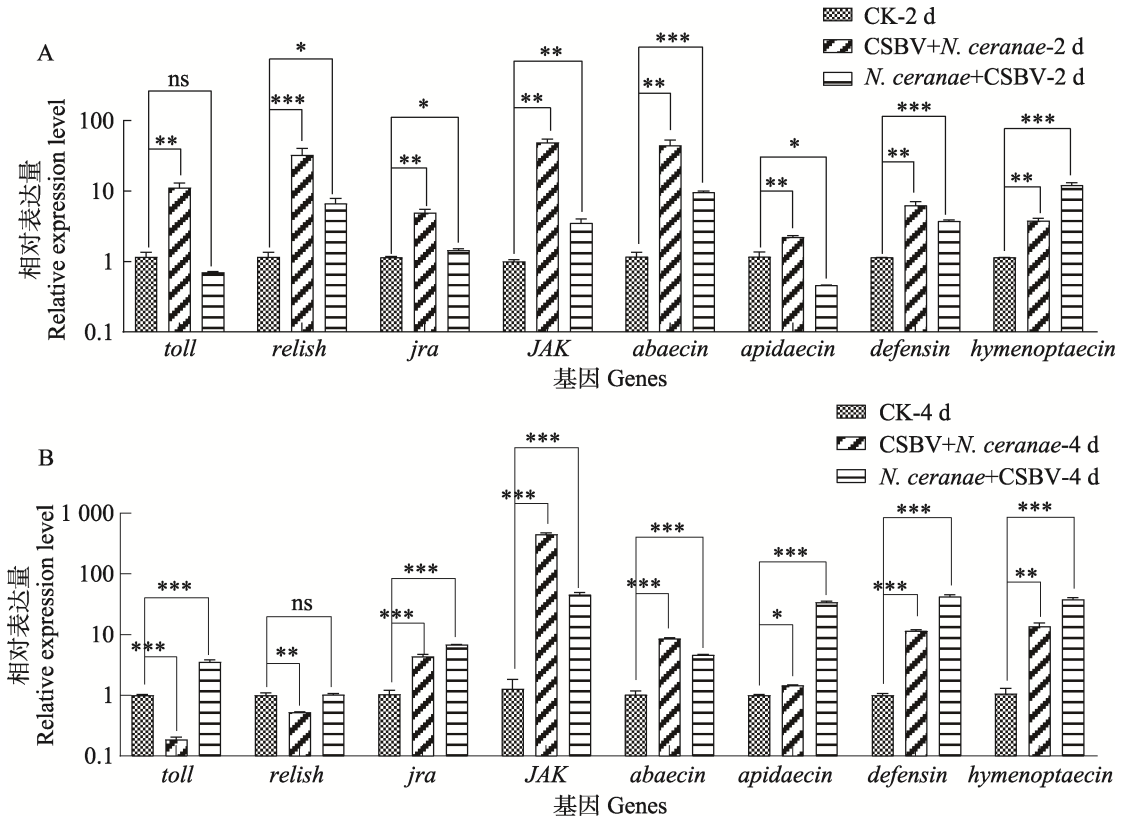


**图 4 CSBV 和 *Nosema ceranae* 感染中蜂后免疫相关基因的相对表达量**

**Fig. 4 Relative expression levels of immune-related genes in honeybees infected by CSBV and *Nosema ceranae***

A. 顺序感染后第 2 天中蜂免疫相关基因的相对表达量；B. 顺序感染后第 4 天中蜂免疫相关基因的相对表达量。图中数据为平均值 ± 标准差（*n*=3）。ns 表示处理组与对照组之间基因表达量无显著性差异；*，**，***分别表示处理组与对照组之间基因表达量在 0.05、0.01 和 0.001 水平上存在显著差异。图 5 同。

A. Relative expression of immune related genes in bees on the 2nd day after sequential infection; B. Relative expression of immune related genes in bee on the 4th day after sequential infection. Data in the figure are mean ± SD (*n*=3). ns means that there is no significant difference in gene expression between the treatment group and the control group; *, ** and *** indicate that there are significant differences in gene expression between the treatment group and the control group at the levels of 0.05, 0.01 and 0.001, respectively. The same as Fig.5.

### 2.3　中蜂囊状幼虫病毒和东方蜜蜂微孢子虫顺序侵染对中华蜜蜂营养代谢的影响

选取 *ilp1*、*ilp2*、*hexamerin70c* 和 *hexamerin70b* 作为评估宿主营养水平的指标。营养代谢相关基因的荧光定量 PCR 数据显示，与对照组中蜂相比，中蜂在先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 的第 2 天，*ilp1* 的表达水平没有显著变化（$P$=0.304 0），*ilp2*（$P$ <0.000 1）和 *hexamerin70b*（$P$=0.014 1）的表达量显著增加，而 *hexamerin70c*（$P$=0.000 2）的表达水平显著下调（图 5：A）；第 4 天，*ilp1*（$P$<0.000 1）、*hexamerin70c*（$P$<0.000 1）和 *hexamerin70b*（$P$<0.000 1）的表达水平均显著下降，表明先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组，中蜂体内营养代谢水平被显著下调，中蜂营养代谢和发育受到阻碍（图 5：B）。中蜂在先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 的第 2 天，*hexamerin70b*（$P$<0.000 1）和 *hexamerin70c*（$P$=0.002 5）的表达量显著下调，而 *ilp2*（$P$=0.010 0）的表达量显著上调（图 5：A）；第 4 天，*hexamerin70b*（$P$=0.000 1）、*ilp1*（$P$=0.005 0）和 *ilp2*（$P$=0.021 9）表达量显著上调，表明先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组的中蜂营养代谢基因表达量轻微上增（图 5：B），暗示中蜂营养代谢增强，对中蜂的生长发育影响较小。本次实验结果表明，先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组比先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组对中蜂营养和生长发育的影响更为强烈。

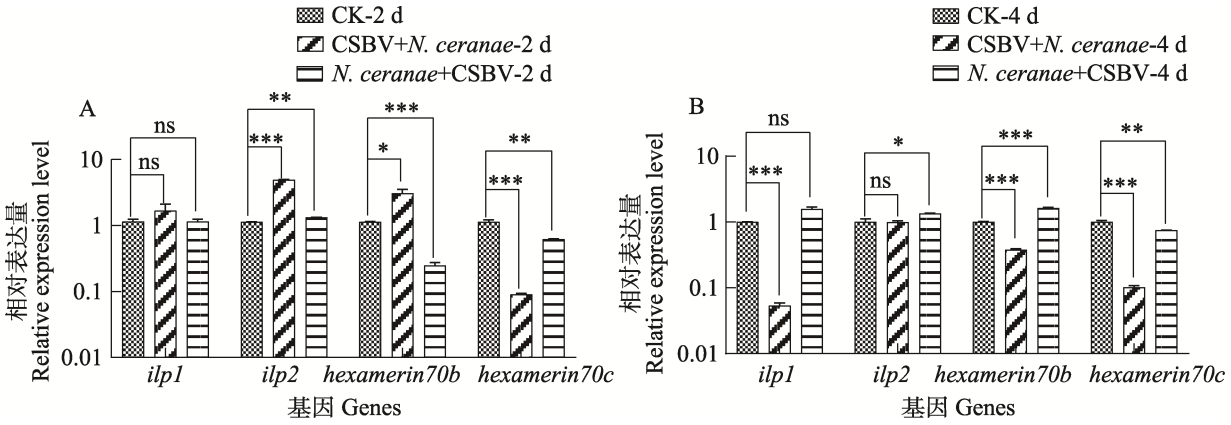


**图 5　CSBV 和 *Nosema ceranae* 感染后中蜂营养代谢基因的相对表达量**

**Fig. 5　Relative expression levels of nutrient metabolism genes in honeybees infected by CSBV and *Nosema ceranae***

A. 顺序感染后第 2 天中蜂营养代谢基因的相对表达量；B. 顺序感染后第 4 天中蜂营养代谢基因的相对表达量。

A. Relative expression of nutrient metabolism genes in bees on the 2nd day after sequential infection;
B. Relative expression of nutrient metabolism genes in bees on the 4th day after sequential infection.

## 3　讨论

中蜂作为我国本土重要的经济昆虫之一，在我国的养蜂业中占据重要地位。在蜜蜂养殖过程中，中蜂和意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 普遍存在区域交错、病害互传的现象（Levy，2011；Ai *et al.*，2012）。据此，本研究设计了 CSBV 和 *N. ceranae* 的顺序感染，调查了感染蜜蜂中蜂的 CSBV 病毒载量、营养代谢基因和免疫相关基因的转录表达水平，以期进一步确定中蜂囊状幼虫病毒和东方蜜蜂微孢子虫这两种重要病原之间是否存在互作。2016 年，林丽花等（2016）同时喂食 CSBV（$10^{10}$-$10^{11}$ 拷贝/头）和东方蜜蜂微孢子虫（$10^3$ 个/头）6 d 后，*N. ceranae* 不影响 CSBV 在工蜂中肠的增殖，而共感染 12 d 后，*N. ceranae* 会抑制 CSBV 的增殖，混合感染的存活率低于单感染组。本研究中，CSBV 和东方蜜蜂微孢子虫是先后相隔 1 d 喂食中蜂，以分析不同的感染顺序对病原感染程度的影响。理论上先感染的病原会优先利用宿主资源并削弱宿主的免疫防御导致后续其它病原的感染，且有报道指出 *N. ceranae* 可以抑制蜜蜂的免疫，从而使蜜蜂更易被病毒入侵（Chaimanee *et al.*，2012）。但本研究

发现，先喂食 *N. ceranae* 再喂食 CSBV 后的第 2 天和第 4 天，CSBV 的增殖并没有发生显著变化，表明 *N. ceranae* 感染后对 CSBV 在蜜蜂体内的感染增殖有抑制作用（图 3）。这与林丽花（2016）对 2 种病原同时感染 12 d 后，*N. ceranae* 会抑制 CSBV 增殖的结果一致。关于 2 个实验中出现感染抑制时间不一致的原因，考虑到东方蜜蜂微孢子虫为慢性感染，且 2 个实验的喂食剂量不同，推测可能是饲喂东方蜜蜂微孢子虫的数量差异，导致本研究中在感染早期就能检测到东方蜜蜂微孢子虫对后续 CSBV 感染的影响。值得注意的是，先喂食 CSBV 则能促进 *N. ceranae* 的侵染增殖（图 2：D）。由此，建议通过优化感染剂量和间隔时间点等方式对 CSBV 如何促进东方蜜蜂微孢子虫的感染展开深入的研究。

中蜂工蜂对 2 种病原 CSBV 和 *N. ceranae* 的免疫防御既是病原与宿主互作的研究热点也是研究重点。有研究结果表明，*N. ceranae* 和 CSBV 在单独感染时，蜜蜂能够通过激发 Toll 和 Imd 信号通路，促使抗菌肽表达，提高免疫应答能力，抵御病原侵染（Chaimanee *et al.*，2012；Liu *et al.*，2017）。在本研究中，所有试验组的中蜂体内 Toll 信号通路、Imd 信号通路、JNK 信号通路和 JAK/STAT 信号通路均被激活，诱导抗菌肽的表达，这与 2 种病原单独感染时的检测结果一致。但是，在顺序感染的第 2 天，先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组的免疫通路基因上调程度均弱于先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 组，结合此时先喂食 CSBV 的病毒量显著高于先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组的病毒量，推测 CSBV 比 *N. ceranae* 更能强烈诱导中蜂工蜂的免疫应答。先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组的病毒量在所有检测点中并没有发现其增殖的趋势，暗示 *N. ceranae* 可能对 CSBV 的侵染增殖有抑制作用。中蜂免疫基因在先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组中的上调表达，推测可能由于东方微孢子虫先入侵增殖激活了中蜂的免疫应答。在顺序感染的第 4 天，先喂食 CSBV 组 *toll* 和 *relish* 基因的表达受到显著抑制，暗示随着两种病原完成入侵，可能通过某种未知途径抑制了蜜蜂免疫。本研究中，先喂食 CSBV 后喂食 *N. ceranae* 的蜜蜂 *ilp1*，*hexamerin70b*，*hexamerin70c* 的表达水平均显著下降，这与郑彬悦等（2019）研究发现接种 SBV 病毒的蜜蜂成蜂体内与营养代谢相关基因 *hexamerin110*，*hexamerin70c* 等表达显著下调相一致，进一步说明 CSBV 的感染对宿主的营养代谢影响更甚。与健康中蜂相比，先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组中蜜蜂营养代谢相关基因主要呈现上调表达，暗示东方蜜蜂微孢子虫的感染没有削弱宿主的营养代谢。有报道提出东方蜜蜂微孢子虫在蜜蜂中肠可能通过利用宿主的能量代谢促进自身的发育繁殖，使宿主产生旺盛的能量代谢需求（陈恒等，2020）。结合免疫应答模式，推测先喂食 *N. ceranae* 后喂食 CSBV 组 CSBV 的增殖受到显著抑制，可能是由于先喂食的 *N. ceranae* 增强了宿主的营养从而对 CSBV 增殖有所抵抗。这些结果表明，CSBV 与 *N. ceranae* 顺序感染工蜂后引起的免疫应答及营养代谢更为复杂，对于 CSBV 与 *N. ceranae* 两种病原感染模式的探讨有利于探明急性感染病毒与慢性感染的东方蜜蜂微孢子虫的侵染和毒力差异的机制，以期寻找影响 CSBV 与 *N. ceranae* 侵染性和毒力的生物学基础，从而为多病原混合感染研究提供参考。

## 参考文献 (References)


Ai H, Yan X, Han R, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1): 160–164.

Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen YP, Evans JD, Pettis JS., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 58(8): 1090–1095.

Chen H, Liu YB, Xu H, Lin ZG, JI T, 2022. Effects of *Nosema Ceranae* in honey bees. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 30(1): 226–234. [陈恒, 刘一冰, 徐浩, 蔺哲广, 吉挺, 2020. 东方蜜蜂微孢子虫对蜜蜂健康的影响. 中国动物传染病报, 30(1): 226–234.]

Chen Y, Siede R, 2007. Honey bee viruses. *Advances in Virus Research*, 70 (1): 33–80.

Costa C, Tanner G, Lodesai M, Maistrello L, Neumann P, 2011. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(3): 224–225.

De Azevedo SV, Hartfelder K, 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development-differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen

and worker larvae. *Journal of Insect Physiology*, 54(6): 1064–1071.

Degrandi-Hoffman G, Chen Y, 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10(5): 170–176.

Ding GL, Shi W, 2009. *Nosema ceranae*. *Apiculture of China*, 60(6): 51. [丁桂玲, 石巍, 2009. 东方蜜蜂微孢子虫. 中国蜂业, 60(6): 51.]

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 645–656.

John E, Mace V, 2006. The economic value of ecological services provided by insects. *BioScience*, 56(4): 311–323.

Levy S, 2011. The pollinator crisis: What's best for bees. *Nature*, 479(7372): 164–165.

Liao S, Post S, Lehmann P, Veenstra JA, Nssel DR, 2020. Regulatory roles of *Drosophila* insulin-like peptide 1 (DILP1) in metabolism differ in pupal and adult stages. *Frontiers in Endocrinology*, 11: 108.

Lin LH, 2016. CSBV single infection and dual infection with *Nosema ceranae* on the adult worker bees (*Apis cerana cerana*). Master dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [林丽花, 2016. CSBV 单感染及与 Nosema ceranae 双重感染对中蜂成年工蜂的影响. 硕士学位论文. 福州：福建农林大学.]

Liu S, Wang LH, Guo J, Tang YJ, Chen YP, Wu J, Li JL, 2017. Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150(9): 63–69.

Lourenco AP, Guidugli-Lazzarini KR, De Freitas NHA, Message D, Teixeira RW, 2021. Immunity and physiological changes in adult honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*: The natural colony environment. *Journal of Insect Physiology*, 131:104237. Doi: 10.1016/j.jinsphys.2021.104237

Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martín-Hernández R, Nikaido S, Higes M, 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically. *Environmental Microbiology Reports*, 5(4): 506–510.

Martins JR, Bitondi M, 2012. Nuclear immunolocalization of hexamerins in the fat body of metamorphosing honey bees. *Insects*, 3(4): 1039–1055.

Schwarz RS, Evans JD, 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology*, 40(3/4): 300–310.

Simone M, Evans JD, Spivak M, 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63(11): 3016–3022.

Tantillo G, Bottaro M, Di Pinto A, Martella V, Terio V, 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Italian Journal of Food Safety*, 4(3): 5364.

Wang DQ, Huang MJ, Guo HK, Fang MG, Li JZ, Dong J, 2021. Investigation on the infection of Chinese sacbrood virus and *Melissococcus pluton* in Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*) of Chun'an county of Zhejiang province. *Journal of Zhejiang University* (*Agric. & Life Sci.*), 47(3): 389–394. [王德前, 黄敏婕, 郭海坤, 方勐鸽, 李君竹, 董捷, 2021. 浙江省淳安县中华蜜蜂囊状幼虫病毒与蜂房球菌感染情况调查. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 47(3): 389–394.]

Wu MJ, Zhou DY, Ma XT, Zhao WZ, Wang SH, He SY, 2014. Study on prevalence of viral disease in *Apis cerana* in Sichuan province. *Journal of Bee*, 34(2): 4. [吴孟洁, 周丹银, 马啸天, 赵文正, 王顺海, 和绍禹, 2014. 四川省东方蜜蜂病毒病感染状况调查. 蜜蜂杂志, 34(2): 4.]

Wu Q, Bronw MR, 2006. Signaling and function of Insulin-like peptides in insects. *Annual Review of Entomology*, 51: 1–24.

Zheng BY, Zhao BA, Jin X, Duan XY, Huang SK, Li JH, 2019. Effect of sacbrood virus infection on nutritional and immune responses of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 62(9): 1054–1064. [郑彬悦, 赵必安, 金鑫, 段辛乐, 黄少康, 李江红, 2019, 囊状幼虫病病毒侵染对中华蜜蜂营养和免疫反应的影响. 昆虫学报, 62(9): 1054–1064. ]

Zheng HQ, Gong HR, Huang SK, Sohr A, Hu FL, 2015. Evidence of the synergistic effect of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*, 177(1/2): 1–6.

Zheng SB, He JF, Li ZG, Gao ZS, Wei TT, Xi WJ, Su SK, 2017. Effects of *Nosema ceranae* on the expression of immune gene and haemolymph sugar levels of *Apis cerana* bees. *Chinese Journal of Applied Entomalogy*, 54(3): 392–399. [郑寿斌, 和静芳, 李志国, 高照生, 蔚添添, 席伟军, 苏松坤, 2017. 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. 应用昆虫学报, 54(3): 392–399.]