

狄斯瓦螨唾液毒性蛋白 VTP 互作蛋白 FABP 的鉴定与功能分析*

丁兆润^{1,2**} 李家豪^{1,3} 陈晓文^{1,4} 李文峰¹ 韩日畴¹ 张 祎^{5***}

(1. 广东省科学院动物研究所, 广州 510260; 2. 华南农业大学, 广州 510642; 3. 华南师范大学, 广州 510631;

4. 青海师范大学, 西宁 810008; 5. 广东药科大学, 广州 527527)

摘 要 【目的】阐明狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 唾液毒性蛋白 (Varroa toxic protein, VTP) 致死中华蜜蜂 (以下简称中蜂) *Apis cerana* 工蜂预蛹的机制, 从而了解狄斯瓦螨与中蜂的互作机制, 为开发蜂螨害防治新技术拓宽思路。【方法】通过酵母双杂交筛选狄斯瓦螨唾液蛋白 VTP 的互作蛋白; 利用 RNAi 技术和 qRT-PCR 验证互作蛋白基因功能并检测相关基因表达情况。【结果】利用酵母双杂交筛选到 11 个候选蛋白基因, 进一步通过“回复”验证, 脂肪酸结合蛋白 (Fatty acid binding protein, FABP) 是唯一阳性蛋白; 为了进一步验证 FABP 在体内与 VTP 结合, 通过注射 dsRNA-*fabp* 干扰中蜂幼虫 *fabp* 的表达, 结果发现, 注射 dsRNA-*fabp* 幼虫组化蛹率 (58%) 与仅注射 VTP 组 (40%) 相比显著提高。qRT-PCR 检测发现, *fabp* 沉默后, 幼虫的蘑菇体大型凯恩细胞特异性蛋白 1 基因 (Mushroom body large-type Kenyon cell-specific protein 1, *mblk-1*) 基因和蜕皮激素受体基因 (Ecdysone receptor, *ecr*) 基因的相对表达量发生变化。【结论】狄斯瓦螨唾液毒性蛋白 VTP 可能通过与中蜂体内 FABP 蛋白结合, 导致 5 龄幼虫化蛹失败, 从而致死中蜂。

关键词 中华蜜蜂; 狄斯瓦螨; VTP; 脂肪酸结合蛋白

Identification and functional analysis of the *Apis cerana* protein FABP, which interacts with the varroa toxic protein VTP from salivary glands of *Varroa destructor*

DING Zhao-Run^{1,2**} LI Jia-Hao^{1,3} CHEN Xiao-Wen^{1,4}
LI Wen-Feng¹ HAN Ri-Chou¹ ZHANG Yi^{5***}

(1. Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China;

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

4. Qinghai Normal University, Xi'ning 810008, China. 5. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 527527, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the mechanism by which varroa toxic protein (VTP), found in *Varroa destructor* saliva, kills *Apis cerana*, and thereby facilitate the development of new methods for controlling *V. destructor*. 【Methods】A two-hybrid yeast was used to screen candidate proteins that bind to VTP after which RNAi technology and qRT-PCR were used to verify the function of the interacting protein gene and detect the expression of related genes. 【Results】Eleven candidate protein genes were identified, however, a "return experiment" revealed that the fatty acid binding protein (FABP) was the only positive protein. In order to further verify the binding of FABP and VTP *in vivo*, the expression of *fabp* in bee larvae was suppressed by an injection of dsRNA-*fabp*. The pupation rate of larvae injected with dsRNA-*fabp* was significantly higher (58%) than that of those injected with VTP alone (40%). QRT-PCR indicated that the relative expression of the

*资助项目 Supported projects: 2022 年省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目 (2022-440000-4301030211-9465)

**第一作者 First author, E-mail: 895518207@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zy3001@163.com

收稿日期 Received: 2023-04-06; 接受日期 Accepted: 2023-05-08

Mushroom body large-type kenyon cell-specific protein 1 (*mbbk-1*) gene and *ecdysone receptor (ecr)* gene in the mushroom body of larvae, changed after *fabp* was silenced. **[Conclusion]** The VTP protein in the saliva of *V. destructor* may cause the death of 5th instar *A. cerana* larvae by binding to the FABP protein.

Key words *Apis cerana*; *Varroa destructor*; VTP; fatty acid binding protein

蜜蜂常罹患疾病,尤其是自 2007 年以来,发生于欧美多国的蜜蜂蜂群崩溃消失现象(Colony collapse disorder, CCD) (Cox-Foster *et al.*, 2007) 导致很多国家蜂群数量急剧下降。狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 及其携带的病毒被认为是蜂群消失最主要的致病因子 (Highfield *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2012; Wilfert *et al.*, 2016), 目前北美地区每年冬天仍有 25%-30% 的蜂群消亡 (Nazzi and Pennacchio, 2018)。我国是世界养蜂大国(曾蜜等, 2022), 虽然还没有 CCD 报道, 但狄斯瓦螨仍是养蜂业的头号防控对象。我国每年养蜂业仅蜂螨造成的直接损失就达几亿人民币, 因防治蜂螨药物造成蜂产品污染(周婷等, 2007)、狄斯瓦螨抗药性及药物残留对环境的影响更是无法估量(胡福良等, 2004)。

狄斯瓦螨对蜜蜂的危害体现于两方面, 一是吸食蜜蜂的血淋巴和脂肪体, 消耗能量, 破坏表皮致水分流失 (Garedew *et al.*, 2004; Annoscia *et al.*, 2012; Ramsey *et al.*, 2019), 对蜜蜂造成直接伤害; 二是携带和传播病毒, 特别是残翅病病毒 (Deformed wing virus, DWV) (Bowen-Walker and Gunn, 2010; Rosenkranz *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2012; Wilfert *et al.*, 2016)。蜜蜂残翅病毒是意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 携带率最高的病毒, 达 90% 以上 (Ai *et al.*, 2012; Ryabov *et al.*, 2014)。没有狄斯瓦螨的情况下, DWV 呈隐性感染, 蜜蜂形态正常 (Benaets *et al.*, 2017)。研究表明, DWV 病毒干扰 NF- κ B 信号传导, 对体液和细胞免疫反应产生不利影响, 衰减蜜蜂细胞结节和黑化作用, 促进狄斯瓦螨取食蜜蜂 (Di Prisco *et al.*, 2016); 高频率的取食激活竞争性免疫反应和抗压反应, 导致蜜蜂抗血细胞凝集, 降低酚氧化酶基因表达 (Koleoglu *et al.*, 2017), 损坏抗病毒免疫屏障 (Tesovnik *et al.*, 2017; Nazzi and Pennacchio, 2018), 反过来促进病毒的复制,

两者协同作用导致蜂群毁灭 (Nazzi and Pennacchio, 2018)。

中华蜜蜂 *Apis cerana* 具有抗螨特性, 前人将其抗螨机制归于 2 点: 工蜂房瓦螨不育和极强的清理行为 (Peng, 1987a, 1987b; Rath, 1999)。最近研究发现, 仅被一只狄斯瓦螨侵染的中华蜜蜂工蜂会死在蜂房中, 然后被清洁蜂清理 (Page *et al.*, 2016); 当 2 只瓦螨感染中华蜜蜂工蜂时, 工蜂则停留在狄斯瓦螨接种的阶段(5 龄大幼虫) 不会继续发育, 慢慢死亡 (Zhang and Han, 2018, 2019)。本实验室利用 Nano-LC-MS/MS 鉴定了狄斯瓦螨的唾液蛋白组, 获得 356 个唾液蛋白 (Zhang and Han, 2019)。其中, 唾液毒性蛋白 VTP 可以致死中华蜜蜂工蜂 (Zhang and Han, 2018)。该蛋白含有 134 个氨基酸, 分子量为 14.7 kD, 等电点为 5.27, 含有 4-6 个 α 螺旋结构, 带有信号肽, 属于分泌型蛋白, 没有跨膜区, 定位于细胞外。这些研究结果证明, 在个体水平上, 中华蜜蜂比意大利蜜蜂对狄斯瓦螨更敏感, 中华蜜蜂可能采取一种“自杀式”机制, 通过牺牲个体的形式, 达到保护群体的目的。但是, 狄斯瓦螨唾液毒性蛋白 VTP 如何杀死中蜂, 中华蜜蜂体内的互作蛋白是什么, 仍有待研究。因此, 本研究将利用酵母双杂交筛选 VTP 互作蛋白并利用 RNAi 技术验证互作蛋白基因功能, 结果将有助于阐明 VTP 致死中华蜜蜂工蜂的分子机制, 为研发螨害防控新技术提供思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中华蜜蜂及狄斯瓦螨(来自广东省广州市从化区蜂场); 大肠杆菌表达菌株 Transetta 及克隆菌株 Trans-T1 (购买于北京全式金生物技术股份有限公司); 酵母双杂交试剂盒 (Matchmaker

Gold Yeast Two-Hybrid System, 货号 630489)、cDNA 文库构建试剂盒(Make Your Own "Mate & Plate" Library System, 货号 630490)、双缺培养基 DDO/X/A 为 SD/-Leu/-Trp (货号 630317) 含 X- α -Gal 和金担子素 A (Aureobasidin A), 四缺酵母培养基(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp, QDO/X/A, 货号 630323) 均购买于大连宝日医生物技术有限公司 (TAKARA)。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母双杂交筛选 VTP 互作蛋白 分别构建以 VTP 蛋白基为诱饵的酵母菌株 Y2HGold (pGBKT7-vtp)(*vtp* 扩增引物: *vtp*-F: CATGG-AGGCCGAATTCGCCATTGAGGCTTTAAAGAC-CGCT; *vtp*-R: GCAGGTCGACGGATCCTTAG-GAGGCG AGCGCCTGCTGGAG) 和中华蜜蜂工蜂 5 龄幼虫 cDNA 文库 Y187 (pGADT7-Acc)。将诱饵菌株和 Y187(pGADT7-Acc) 文库在 30 ℃ 共培养 20-24 h, 观察到类似于三叶草或者是“米老鼠”脸形状的杂合子后, 将共培养液全部涂布于双缺培养板 DDO/X/A 上培养 3-5 d。然后, 将蓝色菌落转到四缺培养板 QDO/X/A 上进行二次菌落筛选。四缺平板上依然显示蓝色的菌落, 即为阳性互作菌落。将阳性菌落在含卡那霉素的培养基上扩大培养, 质粒拯救并测序。根据测序结果设计引物获得全长 CDS 序列, 连接到 pGADT7 载体, 转化到 Y187 酵母感受态细胞后, 再次进行菌液共培养, 即“回复”验证阳性互作蛋白。

1.2.2 脂肪酸结合蛋白基因 (Fatty acid binding protein, FABP) 功能分析 酵母双杂交筛选获得候选蛋白 FABP。为了验证 FABP 在蜜蜂幼虫体内结合外源蛋白 VTP 会导致中华蜜蜂工蜂幼虫化蛹失败, 利用 RNAi 干扰技术沉默 *fabp* 抑制 FABP 的表达, 再注射 VTP 蛋白, 检测 *fabp* 沉默后幼虫的化蛹率。随机选择中华蜜蜂工蜂预蛹, 分为 4 组 (表 1), 其中 (1) 对照组 CK, 48 头; (2) *dsRNA-egfp* 处理组 (注射增强型绿色荧光蛋白基因双链 RNA 片段, 500 ng/头), 72 头; (3) *dsRNA-fabp* 处理组 (注射脂肪酸结合蛋白基因的双链 RNA 片段, 500 ng/头), 72 头; (4)

VTP 处理组 (注射 2 ng/头), 72 头。在每组中设置取样组与观察组, 各占 50%, 分别在处理 24 h 和 48 h 取样与观察统计, 每组每个时间点每个重复 3 头, 3 个重复, 共 9 头幼虫。- 80 ℃ 保存待用。

1.2.3 qRT-PCR 检测基因表达 利用 qRT-PCR 技术检测 *fabp* 沉默效果, 同时检测与发育相关基因的表达变化, 蘑菇体大型凯恩细胞特异性蛋白 1 基因 (Mushroom body large-type kenyon cell-specific protein 1, *mbllk-1*) 以及蜕皮激素受体基因 (Ecdysone receptor, *ecr*) (表 2)。

1.3 数据处理与统计分析

使用 SPSS (21.0) 软件对化蛹率数据进行分析, 采用单因素方差分析方法 (One-way ANOVA), 经 Turkey 多重检验分析各组之间的差异性, $P < 0.05$ 表示差异显著。荧光定量相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 计算数据通过 Graphpad prism 8.3.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 经 Turkey 多重检验分析各组之间基因相对表达量的差异性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表 1 分组与注射的相关参数
Table 1 Groups for RNAi experiment

分组 Group	预蛹数 (头) Prepupae (ind.)	浓度 (ng/ μ L) Concentration (ng/ μ L)	注射量 (μ L) Volume (μ L)
CK	48	ddH ₂ O	1
<i>dsRNA-egfp</i>	72	500	1
<i>dsRNA-fabp</i>	72	500	1
VTP	72	2	1

2 结果与分析

2.1 酵母双杂交筛选 VTP 互作蛋白

诱饵菌株 Y2H (pGBKT7-*vtp*) 与文库菌株 Y187 (pGADT7-*acc*) 共培养 20 h 后, 通过 40 倍的光学显微镜观察到酵母双杂交的杂合子形态, 类似于“米老鼠”脸形状 (图 1)。共筛选到 18 个阳性菌落, 经质粒拯救测序后获得 11 个

表 2 荧光定量内参及相关基因的检测引物

Table 2 Primers for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	片段长度 (bp) Length (bp)
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> -F: TTATATGCCAACACTGTCCTTT <i>β-actin</i> -R: AGAATTGATCCACCAATCCA	126
<i>fabp</i>	<i>fabp</i> -qF: GGAGACGAATGGACCTTCAC <i>fabp</i> -qR: CTTGACGTCGCTCTTGTTTG:	249
<i>mblk-1</i>	<i>mblk-1</i> -qF: TCCTGCCCCGAACAGTATTTTC <i>mblk-1</i> -qR: GCTTTGCTCCTCATCGACTC	288
<i>ecr</i>	<i>ecr</i> -qF: TGTCGTAAAGGTGGTGTGGA <i>ecr</i> -qR: GGACAGTCGGTACTCCGTGT	291

基因。如图 2 所示,“回复”实验显示,含 *fabp* 基因的酵母杂合子在双缺 DDO/X/A 和四缺 QDO/X/A 培养基都表现纯蓝色,FABP 为阳性互作蛋白。



图 1 酵母杂合子

Fig. 1 The typical yeast zygote

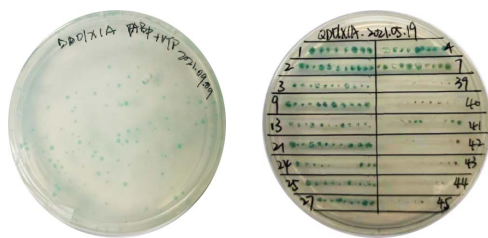


图 2 “回复实验”验证互作蛋白 FABP

Fig. 2 Confirm positive interactions by reverse verification

2.2 FABP 功能分析

如图 3 所示,注射 *dsRNA-fabp* 幼虫组化蛹

率 (58%) 和 VTP 组化蛹率 (40%) 没有显著差异,但与空白对照组 (CK 组 86%) 和 *dsRNA-egfp* 组化蛹率 (78%) 相比,差异显著 ($df=3, 8$; $F=56.98$; $P<0.05$)。尽管 VTP 组化蛹率小于 *dsfabp* 组,但 2 组之间差异不显著。观察幼虫生长变化,发现 *dsRNA-fabp* 组和 VTP 组的蜂蛹在注射后表现出明显体色加深症状,萎缩,而 CK 组和注射 *dsRNA-egfp* 组则发育正常 (图 4)。进一步 qRT-PCR 检测发现,处理 24 h 后,CK 组、*dsRNA-egfp* 组和 VTP 组的 *fabp* 基因相对表达量无显著差异,*dsRNA-fabp* 组与其他 3 组

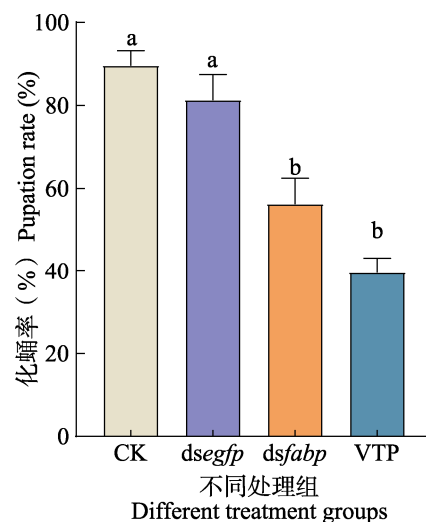


图 3 不同处理下中蜂的化蛹率

Fig. 3 Pupation rate of *Apis cerana* after treatment

数据为平均值±标准差,柱上标有不同的小写字母表示各组之间差异显著 ($P<0.05$, Tukey 检验)。

Data are mean±SD, histograms with different lowercase letters indicate significant differences among different groups ($P<0.05$, Tukey test).

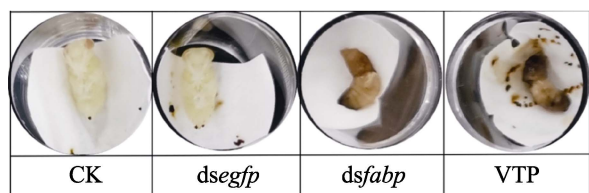
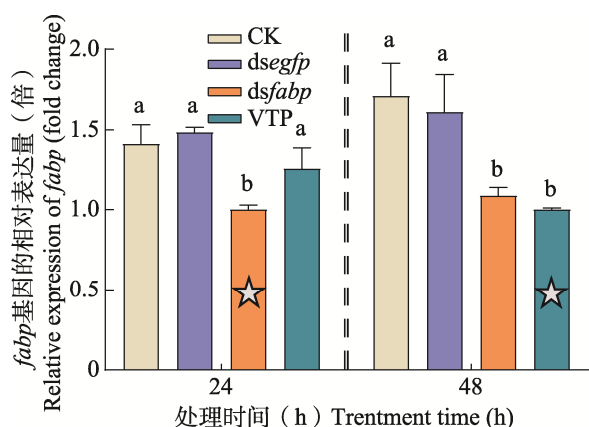


图 4 中蜂蛹在不同处理组的表现

Fig.4 The morphological character of *Apis cerana* pupae after treatment

相比, *fabp* 基因相对表达量显著下降 ($df=3, 8$; $F=16.43$; $P<0.05$)。处理 48 h 后, CK 组与 ds RNA-*egfp* 组中, *fabp* 基因相对表达量差异不显著, 而 ds RNA-*fabp* 组和 VTP 组中, *fabp* 基因的相对表达量与 CK 组和 ds RNA-*egfp* 组相比显著下降 ($df=3, 8$; $F=16.05$; $P<0.05$) (图 5)。

图 5 不同处理下 *fabp* 基因在 24 h 和 48 h 的相对表达量Fig. 5 Relative gene expression of *fabp* post treated for 24 h or 48 h

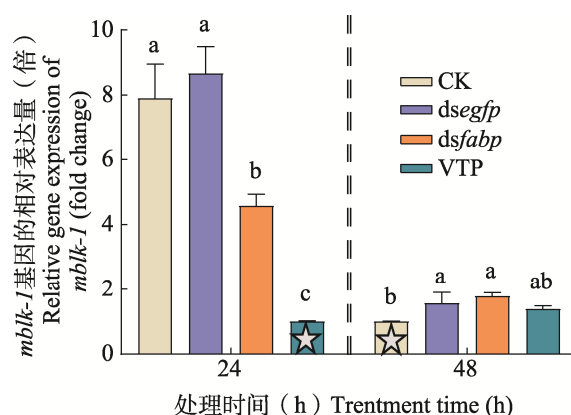
☆表示不同处理下基因相对表达量分析所使用的校正组。图中数据为均值±标准差。不同的小写字母表示经 Tukey 多重比较, 不同处理下中蜂体内 *fabp* 基因的相对表达量差异显著 ($P<0.05$)。下图同。

Date are mean±SD. Histograms with different lowercase letters denote a statistically significant difference between the groups ($P<0.05$, Tukey test). The same below.

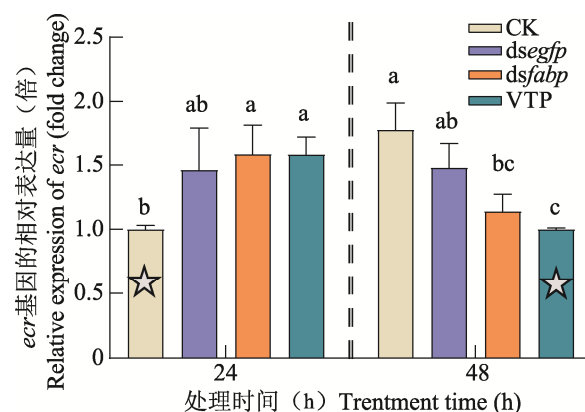
2.3 *mblk-1* 和 *ecr* 基因检测

如图 6 所示, 处理 24 h 时, CK 组的 *mblk-1* 基因相对表达量显著高于 ds RNA-*fabp* 组和 VTP 组, 是 dsRNA-*fabp* 处理组的 1.71 倍, 是 VTP 处理组 7.87 倍, 而 ds RNA-*egfp* 组与 CK 组相比, *mblk-1* 基因相对表达量差异不显著 ($df=3, 8$; $F=78.72$; $P<0.05$)。处理 48 h 时, *mblk-1* 基因在

注射处理组 (ds RNA-*egfp* 组、ds RNA-*fabp* 组和 VTP 组) 显著上调, 分别是 CK 组的 1.70 倍、1.96 倍和 1.52 倍 ($df=3, 8$; $F=10.44$; $P<0.05$)。

图 6 不同处理下 *mblk-1* 基因在 24 h 和 48 h 的相对表达量Fig. 6 Relative gene expression of *mblk-1* post treated for 24 h or 48 h

如图 7 所示, 处理 24 h 时, *ecr* 基因的相对表达在注射处理组 (dsRNA-*egfp* 组、dsRNA-*fabp* 组和 VTP 组) 全部上调, 分别是 CK 组的 1.43 倍、1.57 倍和 1.59 倍 ($df=3, 8$; $F=4.98$; $P<0.05$)。处理 48 h 时, *ecr* 基因在 CK 组的相对表达量最高, 分别是 dsRNA-*egfp* 组、dsRNA-*fabp* 组和 VTP 组的 1.20 倍、1.56 倍和 1.78 倍 ($df=3, 8$; $F=16.01$; $P<0.05$)。

图 7 不同处理下 *ecr* 基因在 24 h 和 48 h 的相对表达量Fig. 7 Relative gene expression of *ecr* post treated for 24 h or 48 h

3 讨论

昆虫唾液是刺吸式昆虫与宿主互作的媒介。

研究表明唾液蛋白在取食、调节宿主免疫反应、间接参与病毒的增殖与传播方面发挥重要作用 (Kotál *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019)。随着二代测序、蛋白组学及分子生物学相关技术的发展, 目前已有 42 种各类寄生虫的唾液蛋白组和转录组获得解析, 如烟粉虱 *Bemisia tabaci*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、蚊子、蜱虫 *Ixodes scapularis*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、白蛉等 (Huang *et al.*, 2017)。唾液蛋白的功能及作用机制也逐步得以阐明。烟粉虱唾液蛋白 Bt56 与烟草 KNOTTED 1 同源转录因子作用激活水杨酸途径, 抑制植物的茉莉酸途径和降低植物对其的抗性, 促进其取食、存活和繁殖 (Xu *et al.*, 2019)。褐飞虱 Mucin-like 蛋白有助于其取食寄主植物汁液, 并通过调控 Ca^{2+} 浓度, MEK2 MAP 激酶活性和茉莉酸途径诱导寄主细胞死亡和免疫应答 (Huang *et al.*, 2017)。褐飞虱唾液腺蛋白 NIOSCP 与 RRSV Pns10 互作帮助水稻齿叶矮缩病毒 (Rice ragged stunt virus, RRSV) 获得能量利于复制, 诱导唾液腺部分细胞凋亡, 使得 RRSV 从唾液腺释放至宿主 (黄海剑, 2017)。此外, 蚊子唾液显著降低宿主 T 细胞数量, 与 Fas 受体发生互作, 并通过激活 p38MARK 通路的方式诱导宿主免疫细胞发生凋亡, 使病毒更容易在宿主免疫能力降低的环境下侵染宿主 (Schneider and Higgs, 2008; Schneider *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012)。壁虱 *Ixodes scapularis* 唾液蛋白甘露糖结合凝集素 (Mannose-binding lectin) 通过抑制宿主的中性粒细胞吞噬作用利于传播莱姆病病原 *Borrelia burgdorferi* (Schuijt *et al.*, 2011)。另外, 狄斯瓦螨唾液中一些成分功能也已报道, 如狄斯瓦螨唾液中的抗凝集素可抑制蜂蛹伤口的愈合, 有利于狄斯瓦螨进行多次取食 (Richards *et al.*, 2011), 唾液腺中高度表达的几丁质酶有利于取食 (Becchimanzi *et al.*, 2020)。

FABP 调节昆虫的能量储存、生长发育以及行为控制。研究发现, 与卵巢和头部相比, 卷叶菜甲虫 *Colaphellus bowringi* 腹部脂肪体中 *fabp* 基因的表达更高, 并且在雌性成虫滞育前的准备阶段开始显著上调, 而脂肪体是昆虫滞育期能量

储存的重要物质 (Tan *et al.*, 2017), 这表明 FABP 可能通过参与脂质代谢, 调节昆虫在滞育期营养物质的储备, 以此来应对滞育期可能面临的不利环境。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *fabp* 基因过表达, 会导致果蝇胚胎孵化率下降, 而敲除 *fabp* 基因后, 不仅会导致果蝇蛹羽化率下降、翅膀与眼睛表型异常等, 还会影响果蝇蘑菇体 α 和 β 脑叶的发育异常 (Jang *et al.*, 2022)。随着昆虫 FABP 功能不断报道, FABP 在昆虫生物过程中的作用越来越受重视。

FABP 家族在昆虫的发育、代谢和免疫等生物过程中发挥着调节的作用。例如, 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 中肠的 *SIFABP1* 在饥饿或取食时呈特异性表达, 中肠 *SIFABP1* 下调或上调介导了机体对脂肪酸等能量的转化和吸收 (Huang *et al.*, 2012)。沙漠蝗虫 *Schistocerca gregaria* 在长时间飞行时, 往往也需要大量 FABP 作为结合载体来促进脂肪酸 β 氧化 (Rajapakse *et al.*, 2019)。本实验对中蜂蛹期不同虫态 (预蛹、白眼蛹、粉眼蛹和黑眼蛹) 的 *fabp* 基因相对表达量进行了差异分析, 发现在预蛹到白眼蛹这个阶段, *fabp* 基因的相对表达量急剧上升, 这表明 FABP 很可能通过调节能量储存与代谢来参与中蜂的变态发育。在蜜蜂变态发育过程中, 即化蛹成蜂阶段, 蜜蜂身体逐渐开始站立、头部朝上并且开始变态, 这一过程需要消耗大量能量 (Traynor *et al.*, 2020)。然而, 蜜蜂在 5 龄幼虫末期 (预蛹期) 已经停止进食, 这些能量来源于幼虫期储存。这在其他昆虫也有类似机制报道, 滞育昆虫在滞育前 *fabp* 基因会快速上调, 参与能量的储存与释放, 以应对滞育期可能会面临的不利环境 (Tan *et al.*, 2017)。在本研究中, 不论是通过 RNAi 技术干扰了中蜂预蛹的 *fabp* 基因还是直接注射重组蛋白 VTP, 都导致了 *fabp* 基因下调以及中蜂化蛹率下降。这些结果与果蝇相似, 果蝇 *fabp* 基因的敲除或者非正常表达, 会导致胚胎孵化率或者幼虫化蛹率下降 (Jang *et al.*, 2022)。因此, FABP 在中蜂化蛹过程中不可缺少, 狄斯瓦螨唾液蛋白 VTP 与中蜂体内的 FABP 结合, 可能已经破坏 FABP 的生物功能

活性,进而影响了能量转换与发育代谢等途径。

昆虫的变态发育,不仅需要能量代谢,还受保幼激素和蜕皮激素(Flatt *et al.*, 2005; Gáliková *et al.*, 2011) 的调节。昆虫的类固醇蜕皮激素是由前胸腺产生,具有高亲脂性,其活性形式 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E) 需要结合蜕皮激素受体 EcR/超气门蛋白 USP 复合体才能启动信号级联,最终在变态发育中发挥作用(Hill *et al.*, 2013)。果蝇 *E93* 基因在变态过程中广泛表达,不仅参与蜕皮激素的诱导,还调节脂肪体的重塑过程自噬与半胱天冬酶的活性(Liu *et al.*, 2014)。*E93* 的特异性敲除不仅会影响果蝇的成功化蛹,还会导致成虫翅膀的表型异常(Wang *et al.*, 2019)。蜜蜂的 *mblk-1* 基因是果蝇 *E93* 基因的同系物(Takeuchi *et al.*, 2001), *mblk-1* 在中蜂和意蜂中相似性高达 93%,是蜜蜂脑部蘑菇体表达的转录因子,而蘑菇体是蜜蜂高级神经中枢,影响蜜蜂的学习、记忆和行为成熟等(殷玲, 2013)。因此,本研究选择中蜂的 *mblk-1* 和 *ecr* 2 个基因进行了差异表达分析。

实验结果表明,在注射 ds RNA*fabp* 基因或重组蛋白 VTP 24 h 时,蜜蜂体内的 *mblk-1* 基因相对表达量显著下降而 *ecr* 基因相对表达量显著上升,在注射 ds*fabp* 或重组蛋白 VTP 48 h 时,蜜蜂体内的 *mblk-1* 相对表达量显著上升而 *ecr* 基因相对表达量显著下降, *mblk-1* 基因与 *ecr* 基因保持着一种相对变化,调节着中华蜜蜂化蛹。*mblk-1* 基因与 *ecr* 基因相对拮抗的关系似乎与其他研究不同,在黑腹果蝇或埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) 中, *ecr* 基因与 *E93* 基因呈现的是相对协同的关系(Pahl *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021)。值得思考的是,蜜蜂 *mblk-1* 基因与 *ecr* 基因相对表达量的动态变化是蜜蜂在化蛹受阻时所做出的反馈, *fabp* 基因下调,可能只影响了 *mblk-1* 或 *ecr* 其中一个基因,而另一个基因的调节是对这种影响的补偿机制。另外, VTP 可能不止结合 FABP 一种蛋白, VTP 潜在的调节机制也可能影响着基因的表达。

研究表明,低水平的 20E 可以诱导 EcR 蛋白的表达,高水平的 20E 反而起到抑制作用,而 EcR 蛋白本身也可以调节靶基因的表达(Davis

and Li, 2013)。在本研究中,注射 ds RNA*fabp* 或注射重组蛋白 VTP 24 h 时, *mblk-1* 基因的表达量急剧下降,很可能导致 *mblk-1* 基因对蜕皮激素基因的诱导表达不足,而 *ecr* 基因上升可能是对这种缺失的反馈调节。注射 ds RNA*fabp* 或注射重组蛋白 VTP 24 h 与 48 h 结果互转也符合相关激素或基因调节昆虫发育的“脉冲”模式(Liu *et al.*, 2015)。然而,在发育过程中,蜜蜂遭遇急剧生理性变化可能致命,特别是 *mblk-1* 基因在 24 h 表达显著下降,可能不仅影响了蜕化类固醇信号通路和蜜蜂的形态发育(孟丽峰, 2018),还影响蜜蜂的大脑发育(Kumagai *et al.*, 2020)。已有研究证明,果蝇体内的 *dfabp* 基因调节其发育和行为, *dfabp* 基因特异性敲除会导致蘑菇体的 α 叶和 β 叶缩小, *dfabp* 的缺失还会导致果蝇无翅或者小翅以及昼夜节律不正常等情况出现(Jang *et al.*, 2022),这与狄斯瓦螨与 DWV 病毒协作导致蜜蜂残翅病的情况很相似,但蜜蜂 FABP 和蜜蜂病毒的关系还需要进一步验证。

参考文献 (References)

- Ai HX, Yan X, Han RC, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *A. cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1): 160–164.
- Annoscia D, Piccolo FD, Nazzi F, 2012. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 58(12): 1548–1555.
- Becchimanzi A, Tatè R, Campbell EM, Gigliotti S, Bowman AS, Pennacchio F, 2020. A salivary chitinase of *Varroa destructor* influences host immunity and mite's survival. *PLoS Pathogens*, 16(12): e1009075.
- Benaets K, van Geystelen A, Cardoen D, De Smet L, De Graaf DC, Schoofs L, Larmuseau MHD, Brettell LE, Martin SJ, Wenseleers T, 2017. Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 284(1848): 20162149.
- Bowen-Walker PL, Gunn A, 2010. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3): 207–217.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briesse T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai JH, Cui L,

- Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 18(5848): 283–287.
- Davis MB, Li TR, 2013. Genomic analysis of the ecdysone steroid signal at metamorphosis onset using *ecdysoneless* and *EcRnull* *Drosophila melanogaster* mutants. *Genes Genomics*, 35(1): 21–46.
- Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, Ferrara R, Varricchio P, Zanni V, Caprio E, Nazzi F, Pennacchio F, 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12): 3203–3208.
- Flatt T, Tu MP, Tatar M, 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *BioEssays*, 27(10): 999–1010.
- Gáliková M, Klepsatel P, Senti G, Flatt T, 2011. Steroid hormone regulation of *C. elegans* and *Drosophila* aging and life history. *Experimental Gerontology*, 46(2/3): 141–147.
- Garedew A, Schmolz E, Lamprecht I, 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4): 419–430.
- He YZ, Ding YK, Wang XL, Zou Z, Raikhel AS, 2021. E93 confers steroid hormone responsiveness of digestive enzymes to promote blood meal digestion in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 134: 103580.
- Highfield AC, Nagar AE, Mackinder LC, Mackinder LCM, Noël LML, Hall MJ, Martin SJ, Schroeder DC, 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied Environment Microbiology*, 75(22): 7212–7220.
- Hill RJ, Billas IML, Bonneton F, Graham LD, Lawrence MC, 2013. Ecdysone receptors: From the ashburner model to structural biology. *Annual Review of Entomology*, 58: 251–271.
- Hu FL, Zhu W, Li YH, 2004. The recent advances in essential oils for the control of *Varroa jacobsoni*. *Apiculture Science and Technology*, 5: 21–25. [胡福良, 朱威, 李英华, 2004. 精油抗蜂螨作用的研究进展. 养蜂科技, 5: 21–25.]
- Huang HJ, Liu CW, XU HJ, Bao YY, Zhang CX, 2017. Mucin-like protein, a saliva component involved in brown planthopper virulence and host adaptation. *Journal of Insect Physiology*, 98: 223–230.
- Huang HJ, 2017. Functional analysis of saliva proteins of the brown planthopper and the roles of salivary gland in the transmission of rice ragged stunt virus. Doctoral dissertation. Zhejiang: Zhejiang University. [黄海剑, 2017. 褐飞虱唾液蛋白功能及唾液腺在水稻齿叶矮缩病毒传播中的作用机制研究. 博士学位论文. 浙江: 浙江大学.]
- Huang ZQ, Zhou DH, Gao GP, Zheng SC, Feng QL, Liu L, 2012. Cloning and characterization of a midgut-specific fatty acid binding protein in *Spodoptera litura*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79(1): 1–17.
- Jang S, Choi B, Lim C, Lee B, Cho KS, 2022. Roles of *Drosophila* fatty acid-binding protein in development and behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 599: 87–92.
- Koleoglu G, Goodwin PH, Reyes-Quintana M, Hamiduzzan MM, Guzman-Novoa E, 2017. Effect of *Varroa destructor*, wounding and *Varroa* homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. *PLoS ONE*, 12(1): e0169669.
- Kotál J, Langhansová H, Lieskovská J, Andersen J, Francischetti IMB, Chavakis T, Kopecký J, Pedra JHF, Kotsyfakis M, Chmelař J, 2015. Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomes*, 128: 58–68.
- Kumagai H, Kunieda T, Nakamura K, Matsumura Y, Namiki M, Kohno H, Kubo T, 2020. Developmental stage-specific distribution and phosphorylation of *Mblk-1*, a transcription factor involved in ecdysteroid-signaling in the honey bee brain. *Scientific Reports*, 10(1): 11577.
- Liu S, Kelvin DJ, Leon AJ, Jin LQ, Farooqui A, 2012. Induction of Fas mediated caspase-8 independent apoptosis in immune cells by *Armigeres subalbatus* saliva. *PLoS ONE*, 7(7): e41145.
- Liu X, Dai FY, Guo E, Li K, Ma L, Tian L, Cao Y, Zhang G, Palli SR, Li S, 2015. 20-hydroxyecdysone (20E) primary-response gene *E93* modulates 20E signaling to promote *Bombyx* larval-pupal metamorphosis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(45): 27370–27383.
- Liu HH, Wang J, Li S, 2014. E93 predominantly transduces 20-hydroxyecdysone signaling to induce autophagy and caspase activity in *Drosophila* fat body. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 30–39.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC, 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086): 1304–1306.
- Meng LF, 2018. Proteome and phosphoproteome comparison of honeybee brain sub-region. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [孟丽峰, 2018. 蜜蜂大脑不同亚区蛋白质组和磷酸化蛋白质组比较. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Nazzi F, Pennacchio F, 2018. Honey bee antiviral immune barriers as affected by multiple stress factors: A novel paradigm to interpret colony health decline and collapse. *Viruses*, 10(4): 159.
- Page P, Lin Z, Buawangpong N, Zheng HQ, Hu FL, Neumann P, Chantawannakul P, Dietemann V, 2016. Social apoptosis in honey bee superorganisms. *Scientific Report*, 6: 27210.
- Pahl MC, Doyle SE, Siegrist SE, 2019. E93 integrates neuroblast intrinsic state with developmental time to terminate MB neurogenesis via autophagy. *Current Biology*, 29(5): 750–762.
- Peng YS, Fang YZ, Xu SY, Ge LS, 1987a. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(1): 54–60.
- Peng YSC, Fang YZ, Xu SY, Ge LS, Nasr ME, 1987b. Response of

- foster Asian honey bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite, *Varroa jacobsoni* oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(3): 259–264.
- Rajapakse S, Qu D, Ahmed AS, Rickers-Haunerland J, Haunerland NH, 2019. Effects of FABP knockdown on flight performance of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, 222(21): jeb203455.
- Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, van Engelsdorp D, 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(5): 1792–1801.
- Rath W, 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2/3): 97–110.
- Richards EH, Jones B, Bowman A, 2011. Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: Effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology*, 138(5): 602–608.
- Rodriguez PA, Escudero-Martinez C, Bos JIB, 2017. An aphid effector targets trafficking protein VPS52 in a host-specific manner to promote virulence. *Plant Physiology*, 173(3): 1892–1903.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 (Suppl. 1): S96–119.
- Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, Mead A, Burroughs N, Evans DJ, 2014. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in vitro*, transmission. *PLoS Pathogen*, 10(6): e1004230.
- Schneider BS, Higgs S, 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 102(5): 400–408.
- Schneider BS, Soong L, Coffey LL, Stevenson HL, McGee CE, Higgs S, 2010. *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile Virus infection. *PLoS ONE*, 5(7): e11704.
- Schuijt TJ, Coumou J, Narasimhan S, Dai JF, Deponte K, Wouters D, Brouwer M, Oei A, Roelofs JJTH, van Dam AP, van der Poll T, Van't Veer C, Hovius JW, Fikrig E, 2011. A tick mannose-binding lectin inhibits the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe*, 10(2): 136–146.
- Takeuchi H, Kage E, Sawata M, Kamikouchi A, Ohashi K, Ohara M, Fujiyuki T, Kunieda T, Sekimizu K, Natori S, Kubo T, 2001. Identification of a novel gene, *mbk-1*, that encodes a putative transcription factor expressed preferentially in the large-type kenyon cells of the honeybee brain. *Insect Molecular Biology*, 10(5): 487–494.
- Tan QQ, Liu W, Zhu F, Lei CL, Hahn DA, Wang XP, 2017. Describing the diapause-preparatory proteome of the beetle *Colaphellus bowringi* and identifying candidates affecting lipid accumulation using isobaric tags for mass spectrometry-based proteome quantification (iTRAQ). *Frontiers in Physiology*, 8: 251.
- Tesovnik T, Cizelj I, Zorc M, Čitar M, Božič J, Glavan G, Narat M, 2017. Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *PLoS ONE*, 12(10): e0187079.
- Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A, 2020. *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7): 592–606.
- Wang WN, Peng J, Li Z, Wang P, Guo MP, Zhang TL, Qin WL, Xia QY, Cheng D, 2019. Transcription factor *E93* regulates wing development by directly promoting Dpp signaling in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(1): 280–286.
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJM, Boots M, 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*, 351(6273): 594–597.
- Xu HX, Qian LX, Wang XW, Shao RX, Hong Y, Liu SS, Wang XW, 2019. A salivary effector enables whitefly to feed on host plants by eliciting salicylic acid-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2): 490–495.
- Yin L, 2013. Identification and verification of genes involved with *Varroa destructor* resistance in the Eastern honeybee (*Apis cerana*). Doctoral dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [殷玲, 2013. 东方蜜蜂抗螨相关基因的筛选及初步验证. 博士学位论文. 扬州: 扬州大学.]
- Zeng M, Zhou WL, Yan WY, Zeng ZJ, 2022. Developmental analysis of apicultural industry in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(6): 1471–1480. [曾蜜, 周伟良, 颜伟玉, 曾志将, 2022. 中国蜜蜂产业生产发展分析. 应用昆虫学报, 59(6): 1471–1480.]
- Zhang Y, Han RC, 2018. A saliva protein of *Varroa* mites contributes to the toxicity toward *Apis cerana* and the DWV elevation in *A. mellifera*. *Scientific Report*, 8(1): 3387.
- Zhang Y, Han RC, 2019. Insight into the salivary secretome of the *Varroa destructor* and salivary toxicity to *Apis cerana*. *Journal of Economic Entomology*, 112(2): 505–514.
- Zhou T, Wang Q, Yao J, Sun JH, Huang SX, Huang ZY, Dai PL, Wang X, Liu F, 2007. Research progress of *Varroa destructor* in China. *Apiculture of China*, 58(2): 5–7. [周婷, 王强, 姚军, 孙继虎, 黄双修, 黄智勇, 代平礼, 王星, 刘锋, 2007. 中国狄斯瓦螨 (*Varroa destructor*, 大蜂螨) 研究进展. 中国蜂业, 58(2): 5–7.]