

# 蜜蜂球囊菌奎尼酸渗透酶基因的克隆、 分析和表达模式\*

樊念<sup>1\*\*</sup> 王勇杰<sup>1\*\*</sup> 吴陶<sup>1</sup> 陈心蕊<sup>1</sup> 臧贺<sup>1,2,3</sup>  
邱剑丰<sup>1,2,3</sup> 陈大福<sup>1,2,3\*\*\*</sup> 郭睿<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

(1. 福建农林大学蜂学学院, 福州 350002; 2. 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福州 350002;  
3. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

**摘要** 【目的】本研究旨在丰富蜜蜂球囊菌 *Ascospaera apis* 奎尼酸渗透酶 (Quinate permease, AaqtD) 的理化性质和分子特征信息, 为深入开展 AaqtD 基因的功能研究提供科学依据。【方法】通过 PCR 扩增 AaqtD 的编码序列 (Coding sequence, CDS) 并进行 Sanger 测序。使用相关软件预测 AaqtD 的理化性质、信号肽、磷酸化位点、二级结构、三级结构和蛋白互作网络。利用 MEME 软件和 Batch CD-Search 工具分别预测蜜蜂球囊菌和其他 10 种真菌 qutD 所含保守基序和结构域。通过 Mega 11.0 软件构建蜜蜂球囊菌和其他 11 种真菌 qutD 的系统进化树。采用 RT-qPCR 检测蜜蜂球囊菌感染中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂幼虫过程中 AaqtD 的相对表达量。【结果】成功克隆到 AaqtD 的 CDS。AaqtD 在蜜蜂球囊菌孢子中表达。AaqtD 的分子量约为 59.66 kD, 分子式为  $C_{2762}H_{4149}N_{689}O_{733}S_{29}$ , 脂溶系数为 88.77, 等电点为 7.51, 平均亲水系数为 0.286。AaqtD 可同时定位于内质网、线粒体和细胞核; AaqtD 含有 40 个磷酸化位点, 240 个  $\alpha$ -螺旋, 111 条延长链, 29 个  $\beta$ -转角, 155 个无规则卷曲, 但不含典型的信号肽。AaqtD 与模板 A0A168DJE0.1.A 之间的序列同源性为 100%; AaqtD 可能与肿瘤蛋白 p73 等 10 个蛋白互作。蜜蜂球囊菌和其他 10 种真菌的 qutD 皆包含 1 个相同的结构域 (Sugartr) 和 11 个相同的保守基序。蜜蜂球囊菌与针状球囊菌 *Ascospaera acerosa* 的 qutD 在进化树上聚为一支。相较于接种后 1 d (1 day post inoculation, 1 dpi), 幼虫肠道中 AaqtD 的表达量在 2 d 和 3 d 均显著上调 ( $P < 0.05$ )。【结论】AaqtD 是一种潜在的亲水性和胞内蛋白, 蜜蜂球囊菌和其他真菌的 qutD 具有较高的保守性与同源性, 蜜蜂球囊菌与针状球囊菌球囊的 qutD 亲缘关系最高, AaqtD 在蜜蜂球囊菌感染中华蜜蜂工蜂幼虫的过程中被显著激活。

**关键词** 蜜蜂球囊菌; 奎尼酸渗透酶; 分子特性; 系统进化; 表达谱

## Cloning and expression of the quinate permease gene in the fungus *Ascospaera apis*

FAN Nian<sup>1\*\*</sup> WANG Yong-Jie<sup>1\*\*</sup> WU Tao<sup>1</sup> CHEN Xin-Rui<sup>1</sup> ZANG He<sup>1,2,3</sup>  
QIU Jian-Feng<sup>1,2,3</sup> CHEN Da-Fu<sup>1,2,3\*\*\*</sup> GUO Rui<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

(1. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;  
2. National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotxin, Fuzhou 350002, China;  
3. Apitherapy Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** [Aim] To determine the physicochemical properties and molecular characteristics of the quinate permease gene (*qutD*) in the fungus *Ascospaera apis* (*AaqtD*) and thereby provide a foundation for in-depth investigation of the function of

\*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (32372943); 国家现代农业产业技术体系专项资金 (蜜蜂) (CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目 (2022J01133); 福建农林大学硕士生导师团队项目 (郭睿); 福建农林大学科技创新专项基金 (KFb22060XA); 福建省大学生创新创业训练计划项目 (202410389189, S202410389062)

\*\*共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 13595105054@163.com; www1442654340@163.com

\*\*\*共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: dfchen826@fafu.edu.cn; ruigu@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2025-04-03; 接受日期 Accepted: 2025-09-19

this gene. **[Methods]** The coding sequence (CDS) of *AaqtD* underwent PCR amplification and subsequent TA cloning. Predictions regarding its physicochemical properties, signal peptide, phosphorylation sites, secondary and tertiary structures, as well as protein interaction network, were made utilizing appropriate software tools. Conserved motifs and domains of this gene in *As. apis* and ten other fungi were forecasted through MEME software and the BatchCD-Search tool, respectively. Subsequently, a phylogenetic tree was constructed using Mega11.0 software. The relative expression of *AaqtD* in *As. apis* infecting worker larvae of *Ap. cerana cerana* was assessed using RT-qPCR. **[Results]** The *AaqtD* CDS was successfully cloned. *AaqtD* was expressed in *As. apis* spores. The molecular weight of *AaqtD* is around 59.66 kD, with a molecular formula of  $C_{2762}H_{4149}N_{689}O_{733}S_{29}$ . It has a fat coefficient of 88.77, an isoelectric point of 7.51, and an average hydrophilicity coefficient of 0.286. *AaqtD* was simultaneously localized in the endoplasmic reticulum, mitochondria and nuclei. *AaqtD* has 40 phosphorylation sites, 240  $\alpha$ -helices, 111 extended chains, 29  $\beta$ -turns and 155 irregular coils, however, it lacks a typical signal peptide. There is 100% sequence homology between *AaqtD* and the template A0A168DJE0.1.A. *AaqtD* may interact with 10 proteins including the tumor protein p73. The same structural domain (Sugartr) and the same eleven conserved motifs, were identified in *qutD* in *As. apis* and 10 other fungi. *qutD* of *As. apis* and *Ap. acerosa* clustered in one clade on the phylogenetic tree. Expression of *AaqtD* was significantly upregulated ( $P < 0.05$ ) 2- and 3-days post-inoculation (d) compared to that at 1 d. **[Conclusion]** *AaqtD* is a potential hydrophilic and intracellular protein that is highly conserved and homologous with the *qutD* gene of other fungi. *AaqtD* is most closely related to the *qutD* gene of *Ap. acerosa*. *AaqtD* is significantly activated in *As. apis* during the infection of *Ap. cerana cerana* worker larvae.

**Key words** *Ascospaera apis*; quinate permease; molecular characteristics; phyletic evolution; expression profile

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是东方蜜蜂 *Apis cerana* 的指名亚种, 也为我国特有的蜂种和养蜂生产使用的主要蜂种之一。蜜蜂球囊菌 *Ascospaera apis* 被证明是引起白垩病的致命性病原体, 它会感染并影响到蜜蜂的幼虫, 从而显著降低蜂群的力量和产出能力, 这对于养殖业来说是一个巨大的经济负担 (侯丽娜等, 2023)。前期研究中, 本团队证实蜜蜂球囊菌对中华蜜蜂工蜂幼虫和雄蜂幼虫同样具有侵染性, 为深入探究中华蜜蜂幼虫与蜜蜂球囊菌的相互作用提供了理论依据 (Chen *et al.*, 2018; 付中民等, 2023); 此外, 构建了高质量的蜜蜂球囊菌参考转录组和全长转录组, 为持续开展相关分子生物学和组学研究提供了基础 (张墨楠等, 2017; 杜宇等, 2021)。

奎尼酸渗透酶 (Quinate permease, *qutD*) 是一种参与调控真菌奎尼酸代谢过程的关键酶 (Grund *et al.*, 1990)。Whittington 等 (1987) 研究发现构巢曲霉的 *qutD* 基因缺陷突变体在以奎尼酸作为唯一碳源的培养基中无法生长。在粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 和链霉菌 *Streptomyces* spp. 等真菌也鉴定到 *qutD* 的同源基因, 并证实多种真菌都将奎尼酸作为生长发育的必需碳源

(Hawkins *et al.*, 1988; Giles *et al.*, 1991; Grund and Kutzner, 1998)。在构巢曲霉中, 奎尼酸借助 *qutD* 进入菌丝体, 进而在其他几种酶的共同作用下被转化为代谢产物原儿茶酸 (Wheeler *et al.*, 1996)。但由于相关研究缺失, 蜜蜂球囊菌的 *qutD* 基因 (*AaqtD*) 信息匮乏, 功能至今不明。

本研究对 *AaqtD* 的编码序列 (Coding sequence, CDS) 进行分子克隆, 预测 *AaqtD* 蛋白的理化性质和分子特征并进行系统进化分析, 比较蜜蜂球囊菌和其他真菌 *qutD* 所含结构域和保守基序, 进而检测蜜蜂球囊菌侵染中华蜜蜂工蜂幼虫过程中 *AaqtD* 的表达模式, 旨在丰富 *AaqtD* 的基本信息, 并为深入开展 *AaqtD* 的功能研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试生物材料

蜜蜂球囊菌由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护实验室分离和保存 (Guo *et al.*, 2018)。中华蜜蜂工蜂幼虫取自本实验室的饲养蜂群。

## 1.2 蜜蜂幼虫接种与肠道样品制备

按照已报道的方法(陈华枝等, 2020)制备纯化的蜜蜂球囊菌孢子, 置于 4 °C 冰箱保存备用。按照本实验室建立的技术流程(付中民等, 2023)制备幼虫肠道样品, 步骤简述如下: 从群势较强的中华蜜蜂蜂群中移取 2 日龄幼虫至预制 1 000  $\mu$ L 饲料的 6 孔细胞培养板, 放入恒温恒湿箱(博讯, 上海) [(35.0 $\pm$ 0.5) °C], 相对湿度 90% 进行饲养; 培养至 3 日龄的幼虫, 在 24 h 后转移至 48 孔细胞培养板中; 处理组幼虫饲喂添加蜜蜂球囊菌孢子的饲料, 孢子终浓度设定为  $1 \times 10^7$  个/mL, 对照组饲喂不含孢子的等量基础饲料; 待幼虫发育至 4-6 日龄时, 采用无菌眼科剪与眼科镊, 分别对处理组和对照组幼虫进行解剖, 分离肠道组织。每 3 头幼虫的肠道组织合并放入 1 个无 RNA 酶离心管中, 经液氮快速冷冻后, 转移至 -80 °C 超低温冰箱保存备用。每组实验设置 3 次生物学重复。

## 1.3 PCR 扩增与 Sanger 测序

根据 *AaqtD* 的核苷酸序列, 设计并合成特异性扩增引物 (F: 5'-GGACCGTCCAACA-CCATCAT-3'; R: 5'-GACGAGGAAGTTCCAGAGCC-3'), 使用 Trizol 法分别提取上述处理组和对照组 4-6 日龄幼虫样品的总 RNA 后, 分别采用 Oligo dT 引物与随机引物进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 以此 cDNA 作为后续 PCR 扩增的模板。反应体系和程序按照叶亚萍等(2023)的报道进行设置。通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 采用上海培清科技有限公司生产的凝胶成像系统对目标产物进行观察与图像采集。片段回收及 TA 克隆操作参照范元婵等(2022)报道的方法进行。经单菌落挑取与液体培养后, 将菌液送至上海生工生物工程股份有限公司, 完成 Sanger 测序。

## 1.4 生物信息学分析

在 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中查询和下载 *AaqtD* 的氨基酸序列。在蛋白质结构与功能预测研究中, 借助

Expasy 网站 (<https://www.expasy.org/resources>) 提供的 ProtParam、ProtScale 及 SWISS-MODEL 等在线分析工具, 分别开展蛋白质理化性质、亲疏水性以及三级结构的预测。对蛋白质二级结构的预测, 采用 SOPMA 分析软件完成相关分析。此外, 亚细胞定位、信号肽序列及磷酸化位点的预测分析, 分别通过 PSORT II、SignalP 5 Server 和 NetPhos 3.1 Server 三款专业软件实现。

选用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 进行蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络分析, 选择 *Apis cerana cerana* 作为 “Organism” 的条件, 其他参数均为系统默认设置。

使用 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具将 *AaqtD* 的氨基酸序列比对至 GeneBank 数据库以查询和下载序列相似性最高的 10 种真菌的 *qutD* 氨基酸序列, 包括针状球囊菌 *Ascospaera acerosa*、灰色螺旋有果菌 *Helicocarpus griseus*、优青霉 *Penicillium ucsense*、核型青霉 *Penicillium nucicola*、黑青霉 *Penicillium atosanguineum*、长穗青霉 *Penicillium hispanicum*、次红青霉 *Penicillium subrubescens*、柠檬青霉 *Penicillium citrinum*、罗氏青霉 *Penicillium rolfisii*、角状青霉 *Penicillium angulare* 及构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* (表 1)。

通过 MEME 软件 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 识别和比较蜜蜂球囊菌和上述 10 种真菌的 *qutD* 所含保守基序。使用 Batch CD-Search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 预测上述 11 种真菌 *qutD* 所含结构域, 再利用 TBtools 软件进行可视化处理。

本研究选取上述 11 个真菌物种的 *qutD* 氨基酸序列, 利用 Mega 11.0 软件进行多重序列比对分析。基于比对结果, 采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统发育树, 并通过 1 000 次自举检验 (Bootstrap) 评估分支节点的置信度, 同时以构巢曲霉作为外类群以校正进化树拓扑结构。

表 1 蜜蜂球囊菌与其他 11 种真菌所含 *qutD* 概览Table 1 Overview of *qutD* in *Ascosphaera apis* and 11 other fungal species

物种 Species	数量 Number	GeneBank 收录号 GeneBank accession no.
构巢曲霉 <i>Aspergillus nidulans</i>	1	XP_658742.1
针状球囊菌 <i>Ascosphaera acerosa</i>	1	KAI5290184.1
灰色螺旋有果菌 <i>Helicocarpus griseus</i>	1	PGH05133.1
优青霉 <i>Penicillium ucsense</i>	1	KAF7717110.1
核型青霉 <i>Penicillium nucicola</i>	1	XP_056986071.1
黑青霉 <i>Penicillium atosanguineum</i>	1	XP_056744439.1
长穗青霉 <i>Penicillium hispanicum</i>	1	XP_056802452.1
次红青霉 <i>Penicillium subrubescens</i>	1	XP_057003792.1
柠檬青霉 <i>Penicillium citrinum</i>	1	XP_056499144.1
罗氏青霉 <i>Penicillium rolsii</i>	1	KAF3385641.1
角状青霉 <i>Penicillium angulare</i>	1	XP_056779375.1
蜜蜂球囊菌 <i>Ascosphaera apis</i>	1	KZZ97811.1

### 1.5 *AaqtD* 的 RT-qPCR 检测

根据 *AaqtD* (GenBank 登录号: KZZ97811.1) 的核苷酸序列设计 *AaqtD* 的 qPCR 引物 (F: 5'-GTGTCCTTGCGGGTTTAGGA-3'; R: 5'-TCGTACTCCACCAAACG-3'), 同时设计内参 5.8S *rRNA* 基因的 qPCR 引物 (F: 5'-GCAGCGAAATGCGATAAGTAA-3'; R: 5'-CCCTCCTAAGACGGGACGAT-3'), 委托上海生工生物工程股份有限公司合成。使用 Trizol 法分别提取处理组和对照组 4-6 日龄幼虫肠道样品的总 RNA, 通过反转录获得相应的 cDNA 模板, 采用 qPCR 测定 *AaqtD* 的表达谱。每个反应均设置 3 次技术重复和 3 次平行重复。反应体系及

条件参照吴鹰等 (2022) 的报道设置。本研究采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对 *AaqtD* 基因的相对表达水平进行定量分析。实验数据的统计学处理及图表绘制均借助 GraphPad Prism 8 (v.8.0.2) 软件完成。组间差异的显著性检验采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并通过 Tukey 法进行多重比较, 结果以字母标记法展示, 设定  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义的判断标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AaqtD* CDS 的分子克隆

经 PCR 扩增获得了长度约 1 306 bp 的特异性目的条带, 其片段大小与理论预期一致 (图 1)。Sanger 测序结果表明, 所得片段的核苷酸序列与转录组数据预测的 *AaqtD* 基因 CDS 序列完全匹配。上述结果证实, 本研究已成功克隆得到 *AaqtD* 基因的完整 CDS 区, 同时证明该基因在蜜蜂球囊菌孢子中存在表达。

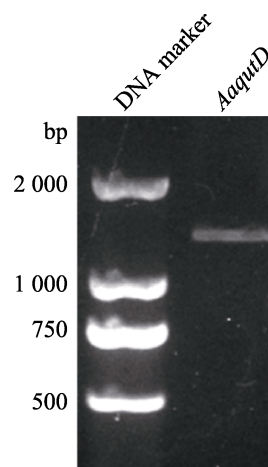


图 1 *AaqtD* 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for the amplified product from *AaqtD*

### 2.2 *AaqtD* 的理化性质和分子特征

*AaqtD* 含 535 个氨基酸, 分子式为  $C_{2762}H_{4149}N_{689}O_{733}S_{29}$ , 分子量约为 59.66 kD, 等电点为 7.51, 平均亲水系数为 0.286 (图 2: A), 可同时定位于内质网 (66.7%)、线粒体 (22.2%) 和原子核 (11.1%)。AaqtD 包含 42

个负电荷氨基酸和 43 个正电荷氨基酸, 含量最高的氨基酸是甘氨酸, 含量最低的氨基酸是吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。另外, AaqtD 含有典型的信号肽 (图 2: B) 和 40 个磷酸化位点 (图 2: C)。

如图 3 (A) 所示, AaqtD 包含 240 个 (44.86%)  $\alpha$ -螺旋, 111 条 (20.75%) 延长链,

29 个 (5.42%)  $\beta$ -转角, 155 条 (28.97%) 无规则卷曲。AaqtD 的模板是 A0A168DJE0.1.A, 二者之间的序列同源性为 100% (图 3: B)。如图 3 (C) 所示, AaqtD 与肿瘤蛋白 p73 (APICC\_03524) 等 10 个蛋白之间具有相互作用, 该 PPI 网络有 11 个节点 19 条连接, PPI 富集  $P$  值为 0.39。

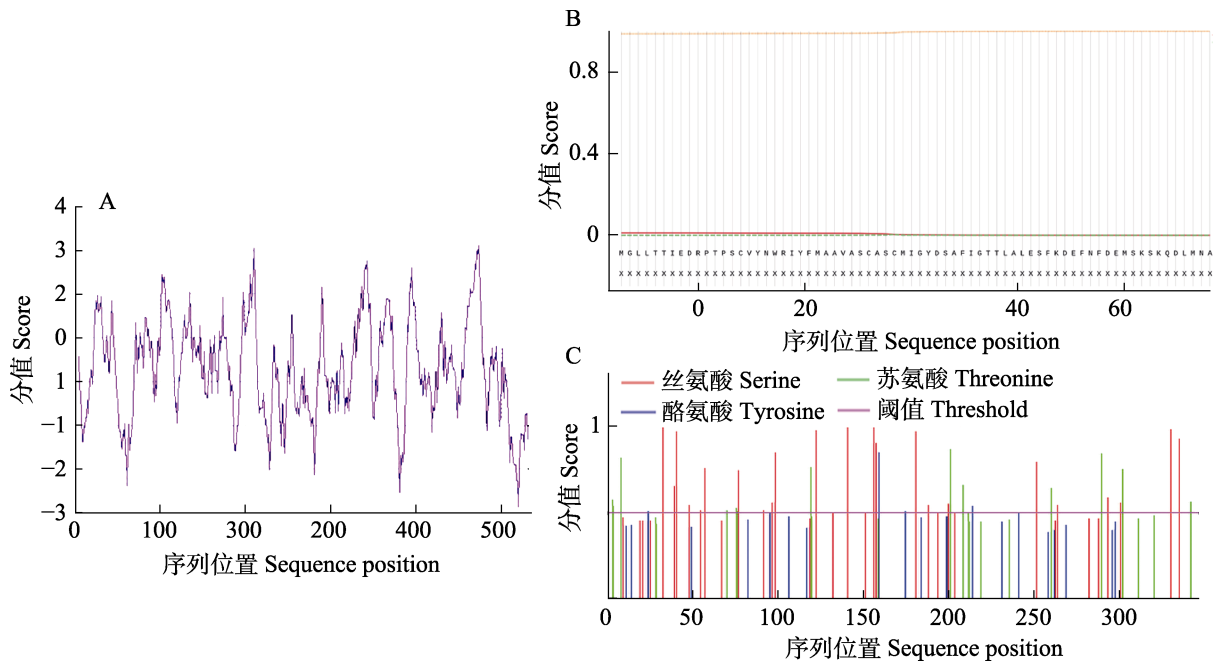


图 2 AaqtD 的亲水性 (A)、信号肽 (B) 和磷酸化位点 (C)  
Fig. 2 Hydrophilicity (A), signal peptide (B), and phosphorylation site (C) of AaqtD

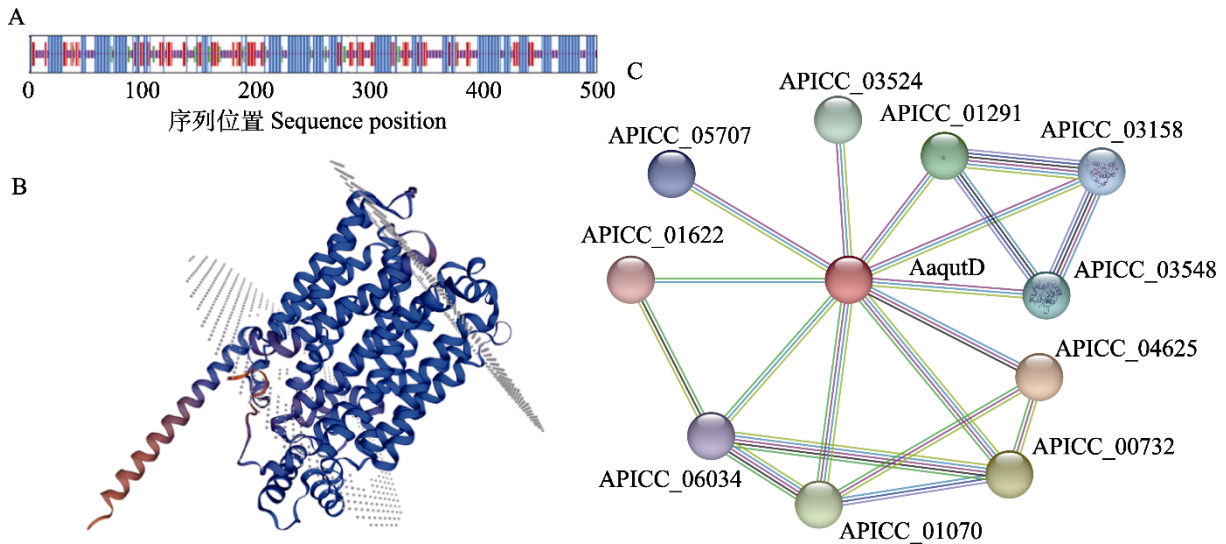


图 3 AaqtD 蛋白的二级结构 (A)、三级结构 (B) 及交互网络 (C)  
Fig. 3 Secondary structure (A), tertiary (B) structure and interaction network (C) of AaqtD protein

### 2.3 AaqtD 的结构域和保守基序分析

在 AaqtD 中鉴定到 1 个 Sugar\_tr 结构域, 该结构域也存在于针状球囊菌、灰色螺旋有果菌、优青霉、核型青霉、黑青霉、长穗青霉、次红青霉、柠檬青霉、罗氏青霉、角状青霉等真菌 (图 4: A)。此外, 在 AaqtD 中鉴定到 11 个相同的保守基序, 这些保守基序同样存在于上述其他 11 种真菌的 qutD; 在优青霉、核型青霉、黑青霉、长穗青霉、次红青霉、罗氏青霉、角状青

霉的 qutD 中还鉴定到上述 11 个保守基序外的 3 个保守基序 (Motif 13, Motif14 和 Motif 15); 在优青霉、核型青霉、长穗青霉、次红青霉、罗氏青霉、角状青霉、柠檬青霉的 qutD 中鉴定到 Motif 11; 在针状球囊菌的 qutD 中还鉴定到 Motif 15; 在灰色螺旋有果菌的 qutD 中还鉴定到 Motif 13 和 Motif 16; 在黑青霉的 qutD 中还鉴定到 Motif 16; 在蜜蜂球囊菌中还鉴定到 Motif 13 (图 4: B)。

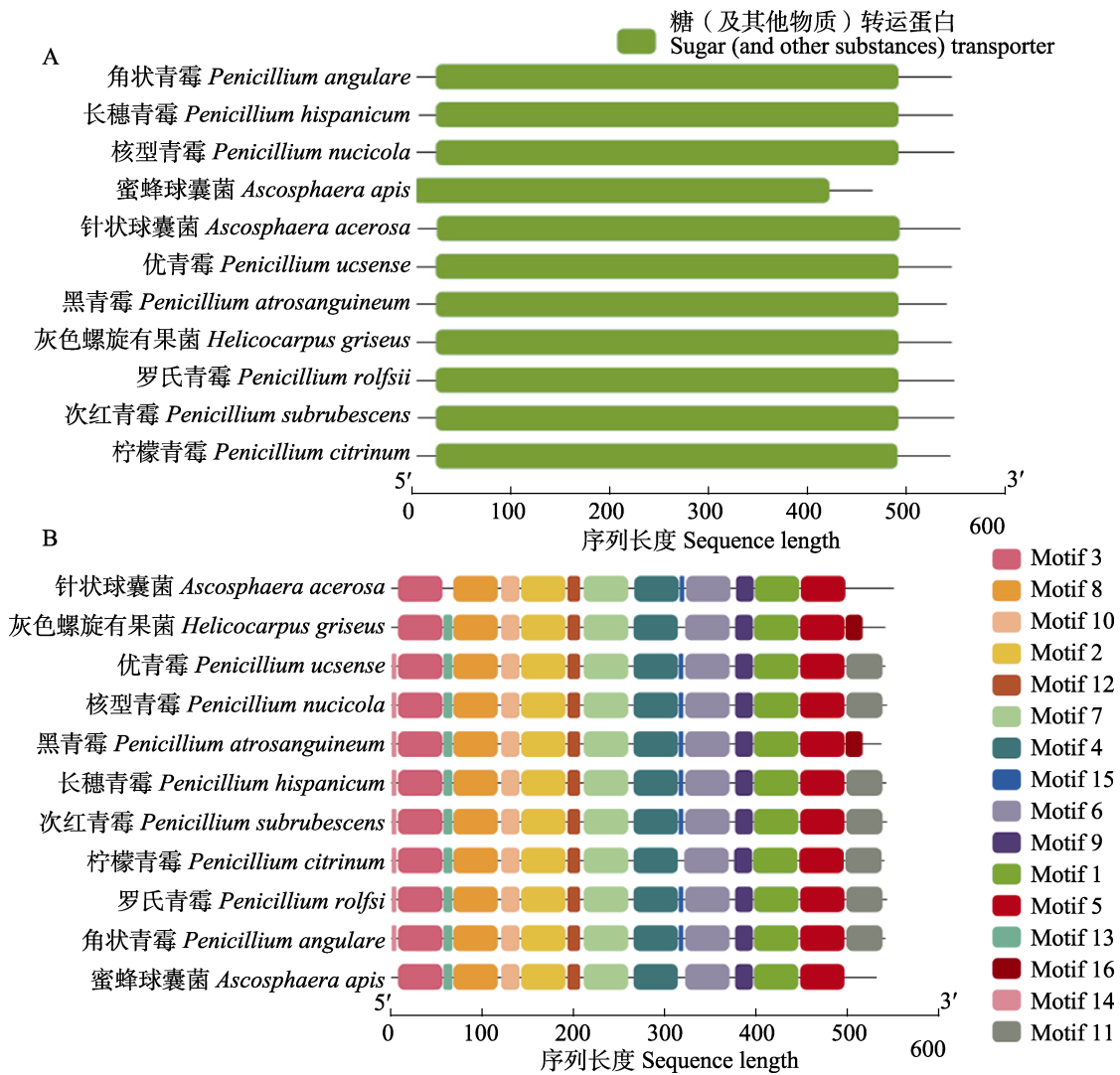


图 4 蜜蜂球囊菌和其他 10 种真菌的 qutD 蛋白所含结构域 (A) 和保守基序 (B)  
Fig. 4 Structural domains (A) and conserved motifs (B) included in qutD proteins in *Ascosphaera apis* and other 10 fungal species

### 2.4 AaqtD 的系统进化分析

蜜蜂球囊菌与针状球囊菌的 qutD 在进化树

上聚为一支, 亲缘关系最近; 构巢曲霉、核型青霉、柠檬青霉、黑青霉和优青霉的 qutD 均单独聚为一支 (图 5)。

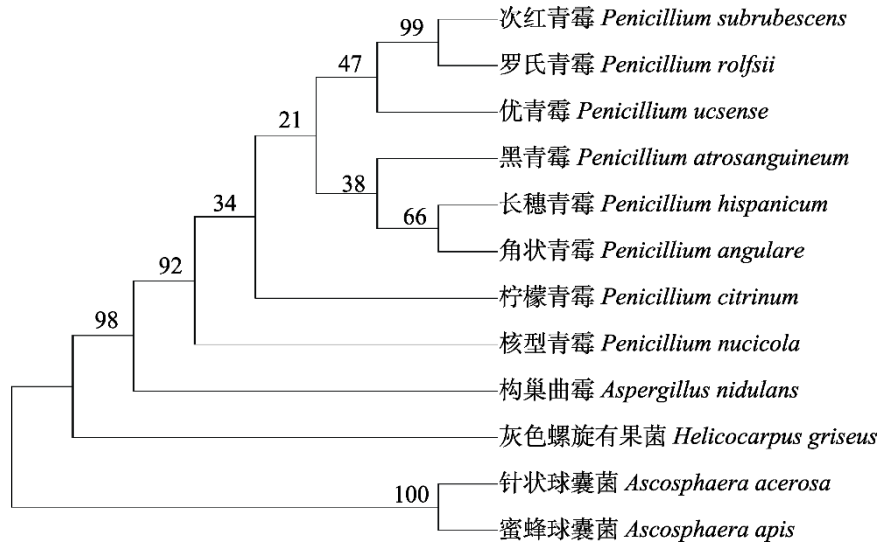


图 5 邻接法构建基于 *qutD* 蛋白氨基酸序列的蜜蜂球囊菌与其他 11 种真菌的系统进化树 (1 000 次重复)

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Ascospaera apis* and other 10 fungal species based on amino acid sequences of *qutD* proteins in *Ascospaera apis* and other 10 fungal species (1 000 replicas)

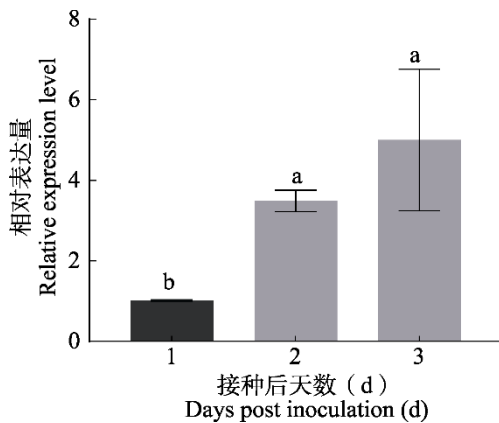


图 6 中华蜜蜂工蜂幼虫肠道中 *AaqtuD* 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *AaqtuD* in the gut of *Apis cerana cerana* worker larvae

图中数据为平均值±标准误。柱上不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ , 单因素方差分析, Tukey 法进行多重比较)。

Data in the figure are mean±SE. Different letters above bars indicate significant difference ( $P < 0.05$ , One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons).

## 2.5 中蜂工蜂幼虫应答蜜蜂球囊菌感染中 *AaqtuD* 的表达谱

RT-qPCR 检测结果显示相较于接种后 1 d (1 day post inoculation, 1 dpi), 中蜂工蜂幼虫肠道中 *AaqtuD* 的表达水平在 2 和 3 d 均显著上升 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

## 3 讨论

奎尼酸是许多微生物的碳源和能量来源 (Niu *et al.*, 2017)。构巢曲霉中的奎尼酸利用基因簇 (Quinic acid utilization, QUT) 包含 *qutA* (激活蛋白)、*qutB* (奎尼酸脱氢酶)、*qutD* (奎尼酸渗透酶)、*qutR* (阻遏蛋白) 等基因 (Grant *et al.*, 1988)。其作为绿原酸、莽草酸和原儿茶酸等物质的前体, 参与了植物的多种生理过程, 包括木质化形成、防御机制及芳香族氨基酸和次生代谢物的合成 (Hoffmann *et al.*, 2004)。在构巢曲霉中, QutA 蛋白在奎尼酸存在时会刺激 *qut* 途径中 8 个基因 (*qutA*、*qutB* 等) 的 mRNA 产生, 从而促进奎尼酸利用基因簇的表达, 使菌株能利用奎尼酸作为碳源 (Beri *et al.*, 1987)。构巢曲霉中的 *qutD* 编码一种被归类为“糖和其他转运蛋白”PFAM 家族 (PF00083) 成员的蛋白 (de Vries *et al.*, 2017)。在 pH 6.5 的条件下, *qutD* 的突变体失去了使用奎尼酸作为碳源进行生长的能力, 表明 QutD 是一种奎尼酸通透酶 (Sgro *et al.*, 2025)。Wheeler 等 (1996) 通过代谢控制分析技术表明, 在 pH 6.5 下, *qutD* 编码的奎尼酸渗透酶的通量控制系数为 0.43, 对代谢通量具有较高的控制程度。此前, *AaqtuD* 的

研究缺失。本研究通过 PCR 在蜜蜂球囊菌孢子样品中扩增出约 1 306 bp 的目的片段, Sanger 测序验证结果显示与前期转录组数据中的 *AaqtD* 基因 CDS 区序列完全匹配(图 1), 说明成功克隆到 *AaqtD* 的 CDS, 为进一步开展 *AaqtD* 相关研究提供了序列基础。另外, *AaqtD* 在蜜蜂球囊菌孢子中表达, 提示该基因参与休眠孢子的奎尼酸代谢过程, 相关功能需进一步验证。通过生物信息学分析发现, *AaqtD* 的平均亲水系数为 0.286, 亲水性氨基酸数量多于疏水性氨基酸, 且其中不含典型的信号肽, 说明 *qutD* 是一种潜在的亲水性和胞内蛋白。本研究还发现 *AaqtD* 可能与肿瘤蛋白 p73 等 10 个蛋白之间存在互作关系。肿瘤蛋白 p73 作为蛋白激酶, 其主要参与细胞内刺激的传导, 近年来有研究证实, 两者在神经元存活、神经元突起生长及功能维持中扮演着关键角色(于韬, 2024)。RAB14 (APICC\_03548) 是 RAB 肿瘤基因家族中的一员, 在人体内主要承担囊泡运输和内体循环的作用, 其异常表达与人类多种恶性肿瘤相关, 包括鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)和口腔鳞状细胞癌等头颈部鳞癌(向政, 2023)。RAB14 被认为是宫颈癌的潜在生物标志物和治疗靶点(Ramírez-Torres *et al.*, 2022)。推测 *AaqtD* 通过与肿瘤蛋白 p73 和 RAB14 等蛋白互作在蜜蜂球囊菌的孢子或侵染过程中发挥功能。

本研究比较发现蜜蜂球囊菌、针状球囊菌、灰色螺旋有果菌、优青霉、核型青霉、黑青霉、长穗青霉、次红青霉、柠檬青霉、罗氏青霉和角状青霉的 *qutD* 中有 11 个相同的保守基序(图 4: A, B), 表明 *qutD* 在上述 11 种真菌中具有高度的保守性, 可能发挥相同或相似的功能。系统进化分析结果显示, 蜜蜂球囊菌与针状球囊菌的 *qutD* 在进化树上聚为一支(图 5), 同源性最高, 符合二者同属子囊菌属的事实。子囊菌属的真菌在感染同一宿主的过程中产生了明确的趋同进化(Shang *et al.*, 2016)。*Sugar\_tr* 蛋白是植物体内调控生物量形成的关键因子, 该蛋白在糖分外排、信号传导、植株生长发育进程、植物-病原菌互作以及逆境胁迫响应等多个生物学过程中

均发挥核心调控作用。(陈晓茹, 2024)。本研究在上述 11 种真菌的 *qutD* 中鉴定到 1 个相同的结构域(*Sugar\_tr*), 表明 *qutD* 在上述真菌的碳水化合物、有机醇和酸转运过程发挥重要功能。

在真菌中, 物质代谢与致病性密切相关(Ene *et al.*, 2014)。有研究表明物质代谢在球囊菌属 *Ascosphaera* 的不同物种的致病性进化中起到关键作用(Maccaro *et al.*, 2022)。本研究发现相较于 1 d, *AaqtD* 表达水平在 2 d 和 3 d 均显著上升(图 6), 说明在蜜蜂球囊菌侵染过程中该基因被激活表达。在受到外界胁迫, 如高温、高渗透压等条件下, *qutD* 基因的表达可能会受影响。例如, 在景宁木兰中, 高温胁迫会导致淀粉与蔗糖代谢途径的关键基因表达发生变化, 以此来提升抵抗胁迫能力(郑晨璐等, 2023)。Luo 等(2024)发现红螯光壳螯虾 *Cherax quadricarinatus* 在盐度胁迫下, 渗透压调节相关基因的表达变化显著。这暗示着 *qutD* 基因可能参与了蜜蜂球囊菌对外界环境变化的应激反应, 通过调节奎尼酸的摄取来维持细胞的正常代谢和生存。*AaqtD* 是否能通过调控奎尼酸的转运来影响蜜蜂球囊菌的物质代谢, 进而调节致病性是一个值得深入探究的科学问题。后续拟通过敲除和过表达 *AaqtD* 基因等实验来明确其具体功能。

综上, 本研究结果丰富了 *AaqtD* 的基本信息, 检测了 *AaqtD* 在蜜蜂球囊菌侵染中华蜜蜂工蜂幼虫过程中的动态表达模式, 为阐明该基因的生物学功能提供了理论基础, 并为后续深入研究 *AaqtD* 在致病过程中的分子机制奠定了坚实基础。

## 参考文献 (References)

- Beri RK, Whittington H, Roberts CF, Hawkins AR, 1987. Isolation and characterization of the positively acting regulatory gene QUTA from *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research*, 15(19): 7991–8001.
- Chen HZ, Fu ZM, Wang J, Zhu ZW, Fan XX, Jiang HB, Fan YC, Zhou DD, Li WD, Xiong CL, Zheng YZ, Xu GJ, Chen DF, Guo R, 2020. Circular RNA responses of 6-day-old larvae of *Apis cerana cerana* to *Ascosphaera apis* stress. *Acta Microbiologica*

- Sinica*, 60(10): 2292–2310. [陈华枝, 付中民, 王杰, 祝智威, 范小雪, 蒋海宾, 范元婵, 周丁丁, 李汶东, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 陈大福, 郭睿, 2020. 中华蜜蜂 6 日龄幼虫响应蜜蜂球囊菌胁迫的环状 RNA 应答. 微生物学报, 60(10): 2292–2310.]
- Chen DF, Guo R, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Fu ZM, 2018. Morphological and molecular identification of Chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* in *Apis cerana cerana*. *Journal of Apicultural Research*, 57(4): 516–521.
- Chen XR, 2024. A preliminary study on the comparison and function of sugar transport proteins between different types of sugarcane. Master dissertation. Nanning: Guangxi University. [陈晓茹, 2024. 甘蔗不同种间的糖转运蛋白比较与功能初探. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学.]
- de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima CA, Anderluh G, Asadollahi M, Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram Ö, Benocci T, Braus-Stromeyer SA, Caldana C, Cánovas D, Cerqueira GC, Chen F, Chen W, Choi C, Clum A, Dos Santos RA, Damásio AR, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flipphi M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Hainaut M, Harispe ML, Henriessat B, Hildén KS, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karányi Z, Kraševc N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Lvasseur A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco AF, MacCabe A, Mäkelä MR, Malavazi I, Melin P, Meyer V, Mielnichuk N, Miskei M, Molnár ÁP, Mulé G, Ngan CY, Orejas M, Orosz E, Ouedraogo JP, Overkamp KM, Park HS, Perrone G, Piumi F, Punt PJ, Ram AF, Ramón A, Rauscher S, Record E, Riaño-Pachón DM, Robert V, Röhrig J, Ruller R, Salamov A, Salih NS, Samson RA, Sándor E, Sanguinetti M, Schütze T, Sepčić K, Shelest E, Sherlock G, Sophianopoulou V, Squina FM, Sun H, Susca A, Todd RB, Tsang A, Unkles SE, van de Wiele N, van Rossen-Uffink D, Oliveira JV, Vesth TC, Visser J, Yu JH, Zhou M, Andersen MR, Archer DB, Baker SE, Benoit I, Brakhage AA, Braus GH, Fischer R, Frisvad JC, Goldman GH, Houbraken J, Oakley B, Pócsi I, Scazzocchio C, Seiboth B, van Kuyk PA, Wortman J, Dyer PS, Grigoriev IV, 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology*, 18(1): 28.
- Du Y, Zhu ZW, Wang J, Wang XN, Jiang HB, Fan YC, Fan XX, Chen HZ, Long Q, Cai ZB, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Chen DF, Guo R, 2021. Construction and annotation of full-length transcriptome of *Ascosphaera apis* by the third generation nano-hole long reading sequencing technology. *Scientia Agricultura Sinica*, 54(4): 864–876. [杜宇, 祝智威, 王杰, 王秀娜, 蒋海宾, 范元婵, 范小雪, 陈华枝, 隆琦, 蔡宗兵, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 陈大福, 郭睿, 2021. 利用第三代纳米孔长读段测序技术构建和注释蜜蜂球囊菌的全长转录组. 中国农业科学, 54(4): 864–876.]
- Ene IV, Brunke S, Brown AJ, Hube B, 2014. Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(12): a019695.
- Fan YC, Wang J, Sun MH, Wu Y, Yu KJ, Wang XR, Ye YP, Qian JJ, Zhang KY, Wang SY, Chen DF, Guo R, 2022. Molecular cloning and bioinformatics analysis of ricin B lectin gene from *Nosema ceranae*. *Journal of China Agricultural University*, 27(3): 138–145. [范元婵, 王杰, 孙明会, 吴鹰, 余岢骏, 王心蕊, 叶亚萍, 钱加珺, 张凯遥, 王思懿, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫蓖麻毒素 B 凝集素基因的分子克隆及生物信息学分析. 中国农业大学学报, 27(3): 138–145.]
- Fu ZM, Gu XY, Hu Y, Zhao HD, Zhu ZW, Zhang HY, Ji T, Niu QS, Chen DF, Guo R, 2023. LncRNA13164 regulates the immune response of *Apis cerana cerana* larvae to *Ascosphaera apis* infection through ace-miR-4968-y. *Acta Microbiologica Sinica*, 63(3): 1047–1059. [付中民, 顾小雨, 胡颖, 赵浩东, 祝智威, 张浩宇, 吉挺, 牛庆生, 陈大福, 郭睿, 2023. LncRNA13164 通过 ace-miR-4968-y 调节中华蜜蜂幼虫对蜜蜂球囊菌感染的免疫应答. 微生物学报, 63(3): 1047–1059.]
- Giles NH, Geever RF, Asch DK, Avalos J, Case ME, 1991. The Wilhelmine E. key 1989 invitational lecture. Organization and regulation of the qa (quinic acid) genes in *Neurospora crassa* and other fungi. *Journal of Heredity*, 82(1): 1–7.
- Grant S, Roberts CF, Lamb H, Stout M, Hawkins AR, 1988. Genetic regulation of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 134(2): 347–358.
- Grund E, Knorr C, Eichenlaub R, 1990. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5): 1459–1464.
- Grund E, Kutzner HJ, 1998. Utilization of quinate and p-hydroxybenzoate by actinomycetes: Key enzymes and taxonomic relevance. *Journal of Basic Microbiology*, 38(4): 241–255.
- Guo R, Chen DF, Xiong CL, Hou CS, Zheng YZ, Fu ZM, Diao Q, Zhang L, Wang H, Hou Z, Li WD, Kumar D, Liang Q, 2018. Identification of long non-coding RNAs in the Chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 156: 1–5.

- Hawkins AR, Lamb HK, Smith M, Keyte JW, Roberts CF, 1988. Molecular organisation of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 214(2): 224–231.
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M, 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme a shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16(6): 1446–1465.
- Hou LN, Zhang K, Zhao WR, Piao CH, Zhang XY, Yi S, Ci D, Dawa Zhuoga, 2023. Pathogen, symptoms and control methods of Chalkbrood disease in honeybees. *Apiculture of China*, 74(4): 35, 37. [侯丽娜, 张魁, 赵文睿, 朴春浩, 张鑫尧, 衣帅, 次多, 达娃卓嘎, 2023. 蜜蜂白垩病病原、症状及防治方法. 中国蜂业, 74(4): 35, 37.]
- Luo L, Yang LS, Huang JH, Jiang SG, Zhou FL, Li YD, Jiang S, Yang QB, 2024. Effects of different salinity stress on the transcriptomic responses of freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard, 1852). *Biology*, 13(7): 530.
- Maccaro JJ, Moreira Salgado JF, Klinger E, Argueta Guzmán MP, Ngor L, Stajich JE, McFrederick QS, 2022. Comparative genomics reveals that metabolism underlies evolution of entomopathogenicity in bee-loving *Ascosphaera* spp. fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 194: 107804.
- Niu J, Alazi E, Reid ID, Arentshorst M, Punt PJ, Visser J, Tsang A, Ram AF, 2017. An evolutionarily conserved transcriptional activator-repressor module controls expression of genes for D-galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. *Genetics*, 205(1): 169–183.
- Ramírez-Torres A, Gil J, Contreras S, Ramírez G, Valencia-González HA, Salazar-Bustamante E, Gómez-Caudillo L, García-Carranca A, Encarnación-Guevara S, 2022. Quantitative proteomic analysis of cervical cancer tissues identifies proteins associated with cancer progression. *Cancer Genomics Proteomics*, 19(2): 241–258.
- Sgro M, Reid ID, Arentshorst M, Ram AFJ, Tsang A, 2025. An examination of the quinic acid utilization genes in *Aspergillus niger* reveals the involvement of two pH-dependent permeases. *G3: Genes Genomes Genetics*, 15(11): jkaf199.
- Shang Y, Xiao G, Zheng P, Cen K, Zhan S, Wang C, 2016. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 8(5): 1374–1387.
- Wheeler KA, Lamb HK, Hawkins AR, 1996. Control of metabolic flux through the quinate pathway in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal*, 315(Pt 1): 195–205.
- Whittington HA, Grant S, Roberts CF, Lamb H, Hawkins AR, 1987. Identification and isolation of a putative permease gene in the quinic acid utilization (QUT) gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 12(2): 135–139.
- Wu Y, Ye YP, Zhang JX, Qian JJ, Zhang WD, Yu KJ, Ji T, Lin ZG, Zhao HX, Chen DF, Guo R, 2022. Expression profiles of nce-miR-12220 and its target genes during infection of *Apis mellifera ligustica* workers by *Nosema ceranae*. *Mycological Journal*, 41(10): 1546–1557. [吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加珺, 张文德, 余尚骏, 吉挺, 蔺哲广, 赵红霞, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-12220 及其靶基因的表达谱. 菌物学报, 41(10): 1546–1557.]
- Xiang Z, 2023. Expression and clinical significance of RAB14 and AKT in nasopharyngeal carcinoma tissues. Master dissertation. Hengyang: University of South China. [向政, 2023. RAB14 和 AKT 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义. 硕士学位论文. 衡阳: 南华大学.]
- Ye YP, Gao XZ, Fan N, Zhang JX, Zhao HD, Qian JJ, Zhang WD, Zhao HX, Xu XJ, Chen DF, Guo R, 2023. Expression verification and molecular characterization analysis of  $\gamma$ -tubulin gene of *Nosema ceranae*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(3): 808–815. [叶亚萍, 高旭泽, 樊念, 张佳欣, 赵浩东, 钱加珺, 张文德, 赵红霞, 徐细建, 陈大福, 郭睿, 2023. 东方蜜蜂微孢子虫  $\gamma$ -tubulin 基因的表达验证与分子特性分析. 应用昆虫学报, 60(3): 808–815.]
- Yu T, 2024. Predictive value of p73 and p38 proteins on the prognosis of severe craniocerebral trauma. *China Health Care*, 42(5): 61–63, 67. [于韬, 2024. p73、p38 蛋白对重症颅脑外伤后的预测价值. 中华养生保健, 42(5): 61–63, 67.]
- Zhang ZN, Xiong CL, Xu XJ, Huang ZJ, Zheng YZ, Luo Q, Liu M, Li WD, Tong XY, Zhang Q, Liang Q, Guo R, Chen DF, 2017. Reference transcriptome de novo assembly and SSR molecular marker development of *Ascosphaera apis*. *Acta Entomologica Sinica*, 60(1): 34–44. [张昱楠, 熊翠玲, 徐细建, 黄积隼, 郑燕珍, 骆群, 刘敏, 李汶东, 童新宇, 张琦, 梁勤, 郭睿, 陈大福, 2017. 蜜蜂球囊菌的参考转录组 de novo 组装及 SSR 分子标记开发. 昆虫学报, 60(1): 34–44.]
- Zheng CL, Wang QY, Lu DY, Shen YM, Ma JJ, Liu L, Wang Y, 2023. Transcriptional analysis of starch and sucrose metabolism pathways in *Magnolia sinostellata* under heat stress. *Journal of Zhejiang A&F University*, 40(1): 55–63. [郑晨璐, 王倩颖, 陆丹迎, 申亚梅, 马晶晶, 刘璐, 王云, 2023. 高温胁迫下景宁木兰淀粉与蔗糖代谢途径转录分析. 浙江农林大学学报, 40(1): 55–63.]