

# 基于中华蜜蜂幼虫肠道转录组数据对东方蜜蜂基因组的 基因结构优化及新基因鉴定

熊翠玲<sup>1</sup> 王海朋<sup>1</sup> 郑燕珍<sup>1</sup> 付中民<sup>1</sup> 徐国钧<sup>1</sup> 童新宇<sup>1</sup>  
赵红霞<sup>2</sup> 陈大福<sup>1</sup> 郭睿<sup>1\*</sup>

(1. 福建农林大学 蜂学学院,福州 350002;

2. 广东省生物资源应用研究所,广州 510260)

**摘要** 利用前期获得的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)幼虫肠道转录组数据对东方蜜蜂(*Apis cerana*)基因组的已注释基因进行结构优化、对未注释的新基因进行预测、分析和鉴定;利用 Cufflink 软件对 reads 进行转录本重构,通过与参考转录本序列进行比较,共对 3 366 个东方蜜蜂的基因结构进行了优化;利用 Cuffcompare 软件将重构转录本与参考基因组进行比对,共预测出 527 个东方蜜蜂的新基因,其中 234 个新基因在 Nr 数据库中存在注释信息;随机选取 12 个新基因进行 PCR 鉴定,有 11 个能够扩增出符合预期的目的片段,表明多数预测出的新基因真实存在;GO 分类和 KEGG 代谢通路分析结果显示上述新基因可能在东方蜜蜂的生长发育、物质代谢、遗传信息传递等方面具有重要功能。本研究结果丰富和完善了东方蜜蜂基因组的基因结构与功能注释信息,也为新基因的功能研究打下基础。

**关键词** 东方蜜蜂;基因组;RNA-seq;基因结构优化;新基因鉴定

中图分类号 S891 文章编号 1007-4333(2019)03-0086-08 文献标志码 A

## Gene structure optimization and identification of novel genes in *Apis cerana* genome: Based on the transcriptome data obtained from larval gut

XIONG Cuiling<sup>1</sup>, WANG Haipeng<sup>1</sup>, ZHENG Yanzhen<sup>1</sup>, FU Zhongmin<sup>1</sup>, XU Guojun<sup>1</sup>,  
TONG Xinyu<sup>1</sup>, ZHAO Hongxia<sup>2</sup>, CHEN Dafu<sup>1</sup>, GUO Rui<sup>1\*</sup>

(1. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China)

**Abstract** Based of the previously obtained transcriptome data of *Apis cerana* larval gut, the optimization of annotated gene structures, prediction, analysis as well as identification of unannotated genes were conducted in this study. By using Cufflink software, the transcripts were reconstructed based on reads, and 3 366 genes' structures were optimized via comparison with reference transcripts. By reconstructed transcripts comparisons with reference genome, 527 novel genes of *A. cerana* were predicted, among which 234 were annotated to Nr and KEGG databases. A total of 12 novel genes were randomly selected for PCR identification, and their expected fragments were amplified suggesting the real

收稿日期: 2018-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702190);现代农业产业技术体系建设专项项目(CARS-44-KXJ7);福建省教育厅中青年骨干教师教育科研项目(JAT170158);福建农林大学科技创新专项(CXZX2017343);福建省大学生创新创业训练计划项目(201610389053)

第一作者: 熊翠玲, 实验师, 主要从事蜜蜂保护学研究, E-mail: pandaxiongcl@sina.com

王海朋, 硕士研究生, E-mail: 15020186900@163.com

通讯作者: 郭睿, 副研究员, 主要从事蜜蜂分子生物学及组学研究, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

existence of majority of predicted novel genes. The GO categorization and KEGG pathway analysis showed these novel genes were likely to play key roles in growth and development, substance metabolism and genetic information transmission. This study provided improved for gene structural and functional annotation information of *A. cerana* genome, and provided preliminary foundation for further functional investigation of the novel genes.

**Keywords** *Apis cerana*; genome; RNA-seq; gene structure optimization; novel gene identification

蜜蜂属于膜翅目蜜蜂科,是一种真社会性模式昆虫,不仅为农业生产带来了巨大的经济效益,而且在维持生态平衡和生物多样性方面起到重要作用<sup>[1-2]</sup>。蜜蜂也因其独有的生物学特性为生长发育、社会行为、神经生物学、表观遗传学等领域的研究提供了一个良好的生物学模型<sup>[3-6]</sup>。近年来,随着蜜蜂栖息地减少、外来蜂种的引进、病原菌与寄生虫危害,以及环境中化学药物残留问题不断加剧,蜂群数量不断下降<sup>[7-9]</sup>。中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)作为东方蜜蜂(*A. cerana*)的地理亚种,也是我国的特有蜂种和养蜂生产的常用蜂种<sup>[10]</sup>,经过长期的进化已高度适应我国的生态环境。与西方蜜蜂(*A. mellifera*)相比,中华蜜蜂不仅具有耐寒、飞行距离远和善于利用零星蜜源等优点<sup>[11-13]</sup>,而且根据中华蜜蜂基因组和 RNA-seq 数据分析,其对蜂螨和一些病原菌的抗性显著<sup>[14]</sup>。

2006年,西方蜜蜂基因组完成测序并公布<sup>[15]</sup>,成为继果蝇、蚊子和家蚕之后,第四种全基因组被测定的昆虫。东方蜜蜂基因组直到2015年才完成测序<sup>[16]</sup>,因此此前东方蜜蜂的研究进展缓慢,其基因组质量存在不足,其中 gap 长度占组装总长 9.8%,重复序列长度占 6.5%。近年来, RNA-seq 技术以其高准确性、高通量、高灵敏度、低成本等优势,得到广泛应用。前人利用 RNA-seq 技术对蜜蜂的组织进行深度测序,大量的转录组数据被存储于 NCBI SRA 等公共数据库中,成为优化已注释基因、鉴定新基因的宝贵资源。中华蜜蜂基因组及其 RNA-seq 数据信息的公布<sup>[14]</sup>,极大地丰富和完善了东方蜜蜂基因组信息。相对于西方蜜蜂,东方蜜蜂的转录组数据仍较为有限,阻碍了东方蜜蜂基因组质量的进一步提升。昆虫肠道作为重要的消化器官及个体免疫系统组成部分<sup>[17]</sup>,然而目前还没有基于东方蜜蜂及其幼虫肠道组织的转录组数据对其基因组进行基因结构优化以及新基因鉴定的相关研究报道。本研究基于中华蜜蜂幼虫肠道组织的 RNA-seq 数据对东方蜜蜂进行新基因挖掘及已注释基因的结构优化。

本课题组前期已利用 RNA-seq 技术对正常及

球囊菌胁迫的中华蜜蜂幼虫肠道进行测序,虽然当时韩国的研究者已经公布了东方蜜蜂的基因组的基因序列信息<sup>[16]</sup>,但并未同时公布基因位置及功能注释信息,导致当时无法按有参考基因组的物种对中华蜜蜂进行深入的组学研究。为对中华蜜蜂幼虫的肠道发育、中华蜜蜂幼虫肠道对球囊菌的胁迫应答进行转录组学研究,本课题组首先组装并注释了中华蜜蜂幼虫肠道的参考转录组<sup>[18]</sup>,预测出 13 448 个中华蜜蜂的 SSR 位点,并通过 PCR 扩增鉴定出 15 个 SSR 位点<sup>[19]</sup>,进而通过差异表达基因分析和趋势分析解析了中华蜜蜂幼虫肠道发育过程中的转录组变化(未发表数据)以及中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的免疫应答<sup>[20]</sup>。

东方蜜蜂的基因组位置及功能注释信息 2015 年公布<sup>[16]</sup>,使按有参物种对前期获得的中华蜜蜂幼虫肠道转录组数据进行分析成为可能。本研究在前期研究基础上,拟将已获得的高质量转录组数据比对东方蜜蜂参考基因组,对已注释的基因进行结构优化,同时对未注释的基因进行预测和 RT-PCR 鉴定,以丰富和完善东方蜜蜂的基因组信息,为东方蜜蜂未注释的基因功能研究打下基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试生物材料

中华蜜蜂幼虫取自福建农林大学蜂学学院试验蜂群。

### 1.2 转录组数据来源

本课题组对中华蜜蜂幼虫肠道进行测序,并获得高质量转录组数据<sup>[18]</sup>,原始数据已上传 NCBI SRA 数据库(SRA 456721)。基于中华蜜蜂幼虫肠道的 RNA-seq 测序数据对东方蜜蜂基因组中已注释的基因结构优化及新基因的预测、分析和鉴定。

### 1.3 基因结构优化

参照陈大福等<sup>[21]</sup>的方法,利用 SOAP aligner/soap2 软件将未 mapping 上核糖体的 reads mapping 到东方蜜蜂参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=apis+cerana>),

利用 Cufflink 软件对 clean reads 进行转录本拼接,将重构结果与参考转录本序列进行比较,部分重构转录本的 5' 或 3' 端序列会有延长,从而对东方蜜蜂基因组已注释的基因结构进行优化。

#### 1.4 新基因的预测及分析

利用 Cuffcompare 软件将重构转录本与参考基因组进行比对,其在参考基因组上的位置关系分为 12 类,其中 classcode 为“u”(基因间区的转录本)即认定为新基因。新基因筛选条件为:转录本长度  $\geq 200$  bp 且外显子数量  $\geq 2$  个。通过 Blast 比对对预测出的新基因所对应的转录本进行 Nr、KEGG 和 GO 数据库注释。

#### 1.5 新基因的 RT-PCR 验证

随机取 5 只在实验室条件下培养的 6 日龄中华蜜蜂幼虫,拉取肠道组织,液氮速冻后充分研磨。利

用 RNA 抽提试剂盒(康宁公司,苏州)抽提上述中华蜜蜂幼虫肠道组织混合样品的总 RNA,作为 cDNA 合成的模板;利用 HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(诺唯赞公司,南京)进行 cDNA 第 1 链的合成。以反转录得到的 cDNA 作为模板,随机选取 12 个新基因进行 PCR 鉴定。PCR 反应在 T100 热循环仪(Bio-Rad 公司,美国)上进行。利用 DNA MAN 软件设计特异性引物,委托上海生工生物工程有限公司进行引物合成,引物序列见表 1。PCR 反应体系(20  $\mu$ L):cDNA 模板(80 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,Mixture 10  $\mu$ L,上下游引物(4  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,加无菌水至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 50 s,55  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 34 个循环;72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min;PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增片段长度/bp Length
XLOC_002031-F	CCTTCATCTTCGTTCTAACCTC	306
XLOC_002031-R	GAGTTCTGCCCTTTGCTGT	
XLOC_000037-F	CAACGAATGCTCATCCAGTC	256
XLOC_000037-R	TTCTCCACGATTTCTCCT	
XLOC_011127-F	CGTTCCAACCTCTCCGTCTCT	338
XLOC_011127-R	GGTGTTTGATTAGCGAGCA	
XLOC_002164-F	GTCGTTGCAAACTCAGTC	304
XLOC_002164-R	CGAGGTGAATCAATGGGA	
XLOC_000225-F	AGTAGTGGTTTCGTTTCGGC	282
XLOC_000225-R	CCTTGTGACCTTGAATCTGTAG	
XLOC_006252-F	CAGTTCCTGGGTTGAGAATAAG	273
XLOC_006252-R	CTCTTTCGCACCAATACGA	
XLOC_001627-F	GAGAGACCTTATCGACAATG	235
XLOC_001627-R	TGCCGCTTTAGTTACGGT	
XLOC_004733-F	GAAGCAGGAGTTATTGGAGG	236
XLOC_004733-R	GAGAGAGGTGATTGAGTCGG	
XLOC_004940-F	CGAAGAATACAAGCCGCA	269
XLOC_004940-R	GGGATACGAACACCAGGAA	
XLOC_006951-F	TGCCCATCAACGACTGTCT	324
XLOC_006951-R	GCCAACCCAAATCGCTTT	
XLOC_001958-F	ACGAGGAAAGAAGCCAGGT	268
XLOC_001958-R	GGGAGAAGCGTTTGTAGTGG	

## 2 结果与分析

### 2.1 东方蜜蜂基因组已注释基因的结构优化

利用中华蜜蜂幼虫肠道 RNA-seq 数据对东方蜜蜂参考基因组中已注释的基因结构进行优化。与参考基因组比对发现,已注释基因边界之外的区域有连续的匹配读段支持。本研究将匹配基因的 UTR 向上游或下游延伸,从而修正基因边界。共对 3 366 个东方蜜蜂的基因结构进行了优化,延伸长度主要介于 0~200 bp 之间。其中 1 635 个基因为正链结构优化,1 731 个基因是负链结构优化。5'端延长的基因有 1 745 个,延长长度大于 1 000 bp 的有 138 个基因,最大延长长度为 6 221 bp;3'端延长的基因有 1 746 个,其中延长长度大于 1 000 bp 的基因有 546 个,最大延长长度为 9 383 bp;两端同时延长的基因有 125 个。部分优化结果见表 2。

### 2.2 东方蜜蜂基因组未注释的新基因的预测及鉴定

共预测出 527 个东方蜜蜂新基因,将新基因在 Nr 和 KEGG (E-value<0.000 01) 数据库中比对,234 个新基因存在注释信息。本研究随机挑选了 12 个新基因进行 RT-PCR 验证,琼脂糖凝胶电泳结果显示共有 11 对引物成功扩增出符合预期大小的片段(图 1),初步判断本研究预测出的多数新基因真实存在。

### 2.3 东方蜜蜂新基因的 GO 分类

东方蜜蜂新基因的 GO 分类结果显示,这些新基因涉及生物进程、细胞组分和分子功能三类,分布于 22 个 GO 条目(图 2),其中基因富集数最多的前 10 位 GO 条目分别是细胞进程(24 个基因)、结合(24 个基因)、单组织进程(22 个基因)、代谢进程(21 个基因)、催化活性(18 个基因)、细胞(11 个基因)、细胞组件(11 个基因)、细胞膜(9 个基因)、细胞膜组件(9 个基因)、细胞器(7 个基因)和定位(7 个基因)。

### 2.4 东方蜜蜂新基因的 KEGG 代谢通路富集分析

对东方蜜蜂新基因进行 KEGG 代谢通路富集分析,结果显示这些新基因富集在 7 个代谢通路(图 3),分别为 Hippo 信号通路(3 个基因)、mRNA 监控信号通路(1 个基因)、内吞作用(1 个基因)、剪接体(1 个基因)、甘油磷脂代谢(1 个基因)、醚酯代谢(1 个基因)及 RNA 转运(1 个基因)。

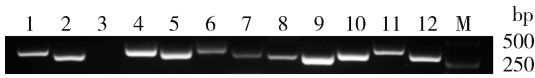
## 3 讨论与结论

人类和果蝇等少数模式物种的基因组测序起步较早,相关组学数据也较为丰富,因而基因组序列和注释信息较为全面而详尽,但其他物种包括蜜蜂在内的多数已测序物种的基因组信息尚不完善<sup>[22]</sup>,需要进一步丰富和补充。东方蜜蜂的基因组序列信息公布较晚,其组装基因位置及功能注释信息直到 2015 年才完全公布,导致东方蜜蜂的组学研究<sup>[23-24]</sup>滞后,转录组和蛋白组相关数据的缺乏,影响了东方蜜蜂基因组信息的完善。刁青云等<sup>[14]</sup>2018 年公布了中华蜜蜂的全基因组测序及 RNA-seq 数据信息,该研究不仅对中华蜜蜂学习记忆、劳动分工、清理巢房等行为从基因组学的角度进行了分析,而且发现中华蜜蜂比西方蜜蜂具有更多免疫系统相关的基因。蜜蜂肠道组织易被病原菌侵染,其组学数据的丰富对其发育过程及宿主-病原菌互作机制的研究具有重要意义。

本研究利用前期获得的中华蜜蜂幼虫肠道转录组数据参照东方蜜蜂基因组(GCF\_001442555.1\_ACSNU-2.0\_genomic)对已注释基因的结构进行优化,共优化了 3 366 个基因结构,其中正链结构优化基因和负链结构优化基因数分别为 1 635 和 1 731 个,5'端延长的基因有 1 745 个,3'端延长的基因有 1 746 个,两端同时延长的基因有 125 个。上述结果可为东方蜜蜂基因组中的已注释基因提供有益的信息补充和完善。此外,本研究所使用参考基因组总数为 10 608 个,比对到已知基因数 10 268 个,预测新基因数 527 个,其中有 234 个新基因可注释到 Nr 和 KEGG 数据库。随机选取 12 个新基因进行 RT-PCR 验证,11 个成功扩增出目的片段,有效扩增率达到 91.67%,表明本研究所预测出的新基因中有相当比例真实存在。GO 分析发现这些新基因分布在 22 个 GO 条目上,包括代谢进程(21 个基因)和细胞进程(24 个基因)等生物学进程,催化活性(18 个基因)和转运器活性(3 个基因)等分子功能,细胞膜(9 个基因)和大分子复合物(4 个基因)等细胞组分,表明这些新基因广泛参与中华蜜蜂的生长和代谢等各项生命活动。进一步分析发现有 7 个新基因富集在 7 个代谢通路上,涉及脂质代谢、翻译、转录、信号传导和分解代谢,其中有 3 个基因富集在 Hippo 通路及 1 个基因富集在细胞内吞代谢通路。Hippo 信号通路广泛作用于器官的发育、组

表2 东方蜜蜂的基因结构优化  
Table 2 Structure optimization of *Apis cerana* genes

基因名 Gene ID	染色体 Chromosome	起始位点 Start site	终止位点 End site	DNA链 DNA strand	5'端非翻译区 5' UTR region	5'端延伸 5' UTR extension	3'端非编码区 3' UTR region	3'端延伸 3' UTR extension
XM_017062114	NW_016019530.1	800 679	805 302	+	800 661~800 679	18	805 302~805 348	46
XM_017065667	NW_016019874.1	116 198	119 150	+	116 017~116 198	181	119 150~120 787	1 637
XM_017051426	NW_016018455.1	2 435 907	2 439 977	+	2 435 801~2 435 907	106	2 439 977~2 440 062	85
XM_017048894	NW_016017900.1	2 022 321	2 037 079	+	2 001 879~2 002 256	377	2 038 413~2 039 273; 2 037 079~2 037 463	1 244
XM_017066817	NW_016017690.1	408 359	419 725	+	393 107~393 138	31	419 725~421 312	1 587
XM_017067065	NW_016017745.1	351 994	371 701	-		0	351 943~351 994	51
XM_017066793	NW_016017679.1	17 648	50 684	+	17 010~17 234	224	50 684~50 964	280
XM_017062101	NW_016019530.1	394 189	402 553	+	394 120~394 189	69	402 553~402 709	156
XM_017061758	NW_016019508.1	760 192	773 077	-		0	757 823~760 192	2 369
XM_017063531	NW_016019663.1	292 559	309 044	-	309 044~309 087	43		0



1, XLOC\_002031; 2, XLOC\_000037; 4, XLOC\_011127; 5, XLOC\_002164; 6, XLOC\_000225; 7, XLOC\_006252; 8, XLOC\_001627; 9, XLOC\_004733; 10, XLOC\_004940; 11, XLOC\_006951; 12, XLOC\_001958; M, DNA 分子量标记 DNA marker.

图 1 东方蜜蜂新基因的 RT-PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of novel genes in *Apis cerana*

织细胞内环境稳态及再生、细胞增长等生命活动中,在中华蜜蜂幼虫肠道发育过程中具有重要调节作用<sup>[25]</sup>。细胞内吞代谢通路与蜜蜂免疫密切相关,在肠道组织早期发育过程中是肠道免疫系统的重要组成部分<sup>[26]</sup>。综上所述,表明这些新基因在中华蜜蜂的物质代谢、遗传信息传递过程、肠道

发育过程和免疫相关过程中都发挥重要作用。KEGG 富集之所以仅有 7 个代谢通路,是因为 KEGG 数据库是一个不断更新和发展的数据库,其完善需要大量试验数据的补充。本研究中未被注释到 KEGG 数据库的新基因日后将会获得更多的注释信息。

基于前期获得的中华蜜蜂幼虫肠道转录组数据对东方蜜蜂基因组进行基因结构优化和新基因的预测、鉴定和分析,共对 3 366 个东方蜜蜂的基因结构进行了优化,并预测出 527 个东方蜜蜂的新基因,其中 234 个新基因在 Nr 和 KEGG 数据库中存在注释信息。下一步可通过 PCR 和 RACE 技术对部分新基因的序列全长进行扩增和克隆,进而在分子水平对其功能进行深入研究。

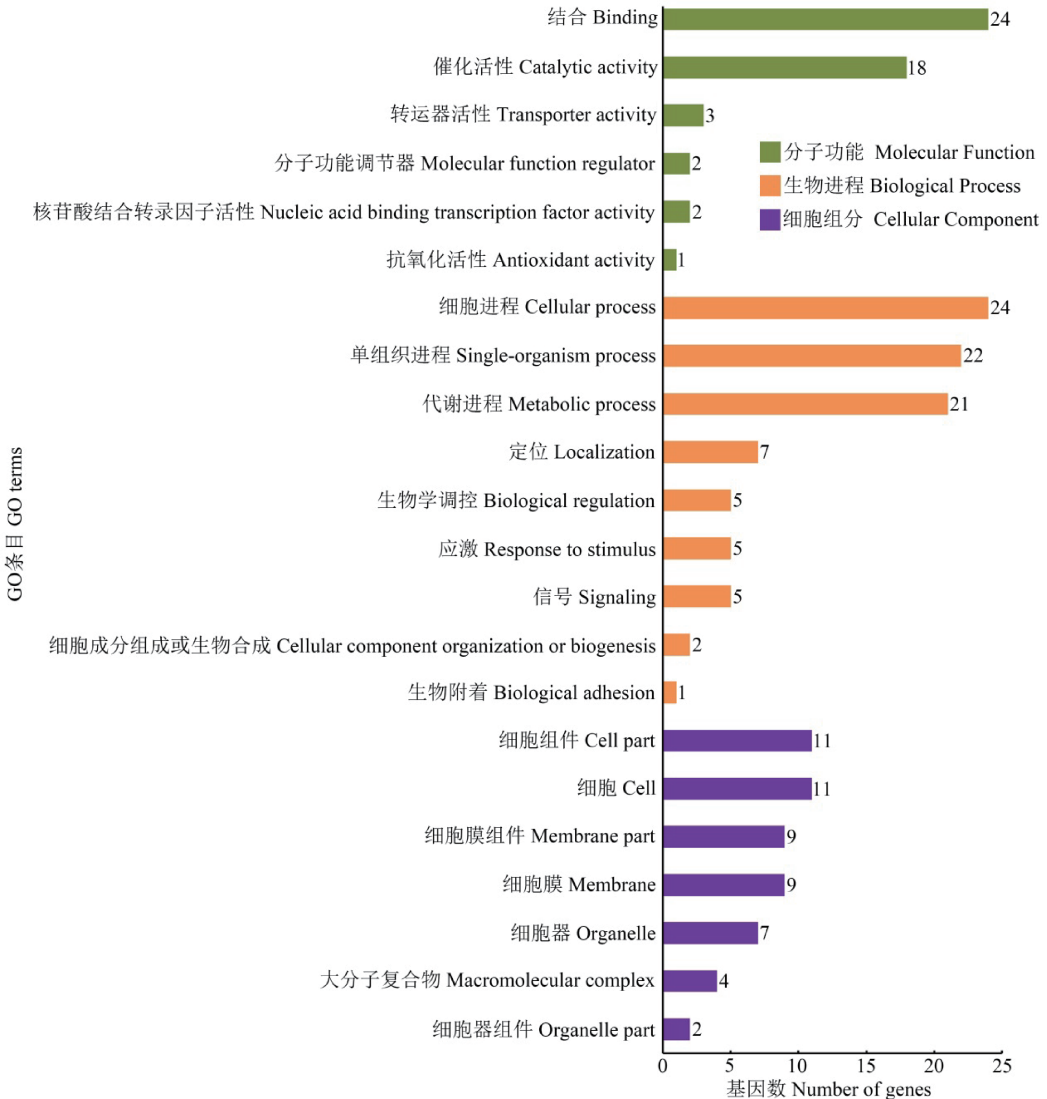


图 2 东方蜜蜂新基因的 GO 分类

Fig. 2 GO categorization of the novel genes in *Apis cerana*

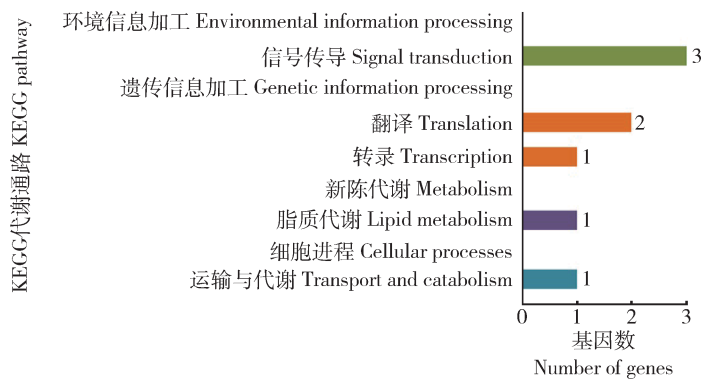


图3 东方蜜蜂新基因的 KEGG 代谢通路富集分析

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis of the novel genes in *Apis cerana*

## 参考文献 References

- [1] Liu L, Qin M Z, Yang L, Song Z Z, Luo L, Bao H Y, Ma Z G, Zhou Z Y, Xu J S. A genome-wide analysis of simple sequence repeats in *Apis cerana* and its development as polymorphism markers[J]. *Gene*, 2017, 599: 53-59
- [2] Kurze C, Routtu J, Moritz R F A. Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level[J]. *Zoology*, 2016, 119(4): 290-297
- [3] Begna D, Han B, Feng M, Fang Y, Li J K. Differential expressions of nuclear proteomes between honeybee (*Apis mellifera* L) queen and worker larvae: A deep insight into caste pathway decisions[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(2): 1317-1329
- [4] Zayed A, Robinson G E. Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: Lessons from the honey bee[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 46(6): 591-615
- [5] Galizia C G, Eisenhardt D, Giurfa M. *Honeybee Neurobiology and Behavior*[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012
- [6] Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng S H, Jacobsen S E, Robinson G E, Maleszka R. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(13): 4968-4973
- [7] Lever J J, van Nes E H, Scheffer M, Bascompte J. The sudden collapse of pollinator communities[J]. *Ecology Letters*, 2014, 17(3): 350-359
- [8] Cresswell J E, Thompson H M. Comment on "A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees"[J]. *Science*, 2012, 337(6101): 1453
- [9] 何旭, 刘新宇. 中华蜜蜂种群数量下降的成因分析[J]. *中国蜂业*, 2011, 62(5): 21-23  
He X, Liu X Y. Factors of *Apis cerana* decline in China[J]. *Apiculture of China*, 2011, 62(5): 21-23 (in Chinese)
- [10] 周冰峰. 蜜蜂饲养管理学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2002  
Zhou B F. *Honey Bee Breeding Management* [M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2002 (in Chinese)
- [11] Xu P, Shi M, Chen X X. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana* [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4239
- [12] Oldroyd B P, Wongsiri S. *Asian Honey Bees: Biology, Conservation, and Human Interactions* [M]. Cambridge: Harvard University Press, 2006
- [13] 龚一飞, 张其康. 蜜蜂分类与进化[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2000: 21-26  
Gong Y F, Zhang Q K. *The Classification and Evolution of Honey Bee* [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 2000: 21-26 (in Chinese)
- [14] Diao Q Y, Sun L X, Zheng H J, Zeng Z J, Wang S Y, Xu S F, Zheng H Q, Chen Y P, Shi Y Y, Wang Y Z, Meng F, Sang Q L, Cao L F, Liu F, Zhu Y Q, Li W F, Li Z G, Dai C J, Yang M J, Chen S L, Chen R S, Zhang S W, Evans J D, Huang Q, Liu J, Hu F L, Su S K, Wu J. Genomic and transcriptomic analysis of the Asian honeybee *Apis cerana* provides novel insights into honeybee biology [J]. *Scientific Reports*, 2018(8): 822
- [15] Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Nature*, 2006, 443(7114): 931
- [16] Park D, Jung J W, Choi B S, Jayakodi M, Lee J, Lim J, Yu Y, Choi Y S, Lee M L, Park Y, Choi I Y, Yang T J, Edwards O R, Nah G, Kwon H W. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 1
- [17] Nappi A J, Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates[J]. *Bioessays*, 2000, 22(5): 469-480
- [18] 徐细建, 郭睿, 骆群, 熊翠玲, 梁勤, 张串联, 郑燕珍, 张翌楠, 黄枳健, 张璐, 李文东, 陈大福. 中华蜜蜂幼虫肠道参考转录组的 *de novo* 组装及 SSR 分子标记鉴定[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(6): 1157-1166  
Xu X J, Guo R, Luo Q, Xiong C L, Liang Q, Zhang C L, Zheng

- Y Z, Zhang Z N, Huang Z J, Zhang L, Li W D, Chen D F. *De novo* transcriptome assembly for *Apis cerana cerana* larval gut and identification of SSR molecular markers [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(6): 1157-1166 (in Chinese)
- [19] 熊翠玲, 张璐, 付中民, 王鸿权, 侯志贤, 童新宇, 李汶东, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿. 基于 RNA-seq 数据大规模开发中华蜜蜂幼虫的 SSR 分子标记[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(1): 68-74
- Xiong C L, Zhang L, Fu Z M, Wang H Q, Hou Z X, Tong X Y, Li W D, Zheng Y Z, Chen D F, Guo R. Large-scale development of SSR primers for *Apis cerana cerana* larvae based on its RNA-seq datasets[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39(1): 68-74 (in Chinese)
- [20] 徐细建. 基于 RNA-seq 的蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的免疫应答研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2017
- Xu X J. A research on immune responses of the larval gut of two honeybee species to the stress of *Ascosphaera apis* based on RNA-seq [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017 (in Chinese)
- [21] 陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 梁勤, 郑燕珍, 徐细建, 张翌楠, 黄帜隼, 张璐, 王鸿权, 解彦玲, 童新宇. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌早期胁迫的转录组学[J]. 中国农业科学, 2017, 50(13): 2614-2623
- Chen D F, Guo R, Xiong C L, Liang Q, Zheng Y Z, Xu X J, Zhang Z N, Huang Z J, Zhang L, Wang H Q, Xie Y L, Tong X Y. Transcriptome of *Apis cerana cerana* larval gut under the stress of *Ascosphaera apis* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(13): 2614-2623 (in Chinese)
- [22] Elsik C G, Worley K C, Bennett A K, Beye M, Camara F, Childers C P, de Graaf D C, Debyser G, Deng J X, Devreese B, Elhaik E, Evans J D, Foster L J, Graur D, Guigo R; HGSC production teams, Hoff K J, Holder M E, Hudson M E, Hunt G J, Jiang H Y, Joshi V, Khetani R S, Kosarev P, Kovar C L, Ma J, Maleszka R, Moritz R F A, Munoz-Torres M C, Murphy T D, Muzny D M, Newsham I F, Reese J T, Robertson H M, Robinson G E, Rueppell O, Solovyev V, Stanke M, Stolle E, Tsuruda J M, Vaerenbergh M V, Waterhouse R M, Weaver D B, Whitfield C W, Wu Y Q, Zdobnov E M, Zhang L, Zhu D H, Gibbs R A; Honey Bee Genome Sequencing Consortium. Finding the missing honey bee genes: Lessons learned from a genome upgrade[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 86
- [23] Zhao H T, Du Y, Gao P F, Wang S J, Pan J F, Jiang Y S. Antennal transcriptome and differential expression analysis of five chemosensory gene families from the Asian honeybee *Apis cerana cerana* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165374
- [24] Jayakodi M, Jung J W, Park D, Ahn Y J, Lee S C, Shin S Y, Shin C, Yang T J, Kwon H W. Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees *Apis cerana*, and *Apis mellifera* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 680
- [25] Hong A W, Meng Z P, Guan K L. The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2016, 13(6): 324-337
- [26] Guillou A, Troha K, Wang H, Franc N C, Buchon N. The *Drosophila* CD36 homologue croquemort is required to maintain immune and gut homeostasis during development and aging [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(10): e1005961

责任编辑: 杨爱东