



王思懿, 胡颖, 刘小玉, 荆欣, 冯佩林, 朱乐冉, 姚雨桐, 陈大福, 郭睿, 徐国钧. 东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 基因的分子特性及系统进化分析 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (5): 1284 - 1290.

东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 基因的分子特性及系统进化分析

王思懿¹, 胡颖¹, 刘小玉¹, 荆欣¹, 冯佩林¹, 朱乐冉¹,
姚雨桐¹, 陈大福^{1,2}, 郭睿^{1,2*}, 徐国钧^{1*}

(1. 福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院), 福州 350002; 2. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

摘要: 本研究旨在解析东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 的长链脂肪酸辅酶 A 连接酶 (long chain fatty acid COA ligase) 基因 *LCFAL 2* 的分子特性, 鉴定东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 *LCFAL 2* 蛋白的保守基序和结构域并进行系统进化分析, 以期丰富东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 的信息, 为深入开展相关功能研究提供基础。通过 ExPasy 网站上的相关软件预测和分析 *LCFAL 2* 的理化性质、跨膜螺旋域、信号肽、磷酸化位点、二级结构和三级结构。使用 MEME 软件预测东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 *LCFAL 2* 蛋白的保守基序。采用 TBtools 软件预测东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 *LCFAL 2* 的结构域。通过 Mega 11.0 软件构建东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 *LCFAL 2* 的系统进化树。结果表明, 东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 含有 1 836 个核苷酸, 可编码 611 个氨基酸, 分子式为 $C_{3145}H_{4985}N_{813}O_{904}S_{23}$, 分子量约为 69.39 kDa, 脂溶系数为 96.82, 等电点为 8.79, 平均亲水系数为 -0.161; 不含跨膜螺旋域和典型信号肽; 包含 27 个丝氨酸酸化位点, 14 个酪氨酸酸化位点及 23 个苏氨酸磷酸化位点; 包含 240 个 α -螺旋, 124 个延长链, 48 个 β -转角及 199 个无规则卷曲; 可同时定位于细胞核、细胞质和线粒体; 另外, *LCFAL 2* 及其模板 5ms1. A 之间的同源性和为 21.44%。东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 等 9 个物种的 *LCFAL 2* 中均含有 6 个相同的保守基序。东方蜜蜂微孢子虫、管孢属微孢子虫 *Tubulinosema ratisbonensis*、蜜蜂微孢子虫、巨蟹肠孢菌 *Enterospora canceri*、烟粉虱 *Spraguea lophii*、毕氏肠细胞虫 *Enterocytozoon bieneusi*、东方赤孢子虫 *Hamiltosporidium waerminnensis* 和褶皱臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis* 的 *LCFAL 2* 均包含 AFD_class_1 superfamily 结构域。东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* (XP_024331795.1) 与蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* (EQB61677.1) 聚为一支, 进化距离最近。研究结果明确了东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 的分子特性, 并揭示 *LCFAL 2* 可能是亲水性蛋白、胞内蛋白和非跨膜蛋白, 东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 *LCFAL 2* 之间的亲缘关系最近, *LCFAL 2* 在东方蜜蜂微孢子虫和其他微孢子虫中具有较高的保守性。

关键词: 东方蜜蜂微孢子虫; 长链脂肪酸辅酶 A 连接酶 2; 分子特性; 保守性; 系统进化

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 05-1284-07

Investigation of molecular characteristics and phyletic evolution of *Nosema ceranae* *LCFAL 2* gene

WANG Si-Yi¹, HU Ying¹, LIU Xiao-Yu¹, JING Xin¹, FENG Pei-Lin¹, ZHU Le-Ran¹, YAO Yu-Tong¹,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32172792); 国家现代农业产业技术体系专项资金项目 (CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目 (2022J01131334); 宁夏回族自治区重点研发项目 (2022BBF02037); 福建农林大学硕士生导师团队项目 (郭睿); 福建省大学生创新创业训练计划项目 (202210389128, 202210389136)

作者简介: 王思懿, 女, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: siyiwang2021@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 郭睿, 博士, 副教授, 主要研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn; 徐国钧, 硕士, 副教授, 主要研究方向为蜂业经济管理, E-mail: xuguojun@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-07-12; 接受日期 Accepted: 2022-12-28

CHEN Da-Fu^{1,2}, GUO Rui^{1,2*}, XU Guo-Jun^{1*} (1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Apitherapy Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: This study aims to decipher the molecular characteristics of long chain fatty acid COA ligase 2 gene *LCFAL 2* in *Nosema ceranae*, identify conserved motifs and structural domains and conduct phylogenetic analysis of *LCFAL 2* proteins in *N. ceranae* and other species, thus enriching information about *N. ceranae LCFAL 2* gene and providing a foundation for related functional study. Physical and chemical property, transmembrane domain, signal peptide, phosphorylation site, secondary and tertiary structures were predicted and analyzed using relevant software on ExPasy website. MEME software was employed to identify conserved motifs within *LCFAL 2* in *N. ceranae* and other species. Conserved domains within *LCFAL 2* were predicted with TBtools software. Mega 11.0 software was utilized to construct the phylogenetic tree with neighbor-joining method based on *LCFAL 2* proteins in *N. ceranae* and other species. The results demonstrated that *N. ceranae LCFAL 2* contained 1 836 nucleotides, which can encode 611 amino acids, the molecular formula was $C_{3145}H_{4985}N_{813}O_{904}S_{23}$, the molecular weight was about 69.39 kDa, the lipid solubility coefficient was 96.82, the isoelectric point was 8.79, and the average hydrophilic coefficient was -0.161; *LCFAL 2* contained no transmembrane domain and signal peptide; *LCFAL 2* included 27 serine phosphorylation sites, 14 tyrosine phosphorylation sites and 23 threonine phosphorylation sites; *LCFAL 2* included 240 α -helix, 124 extension, 48 β -turn and 199 random coil; the homology between *LCFAL 2* and its target 5mst.1.A was 21.44%; additionally, *LCFAL 2* were simultaneously localized in nucleus, cytoplasm and mitochondria. Six same conserved motifs were included in *LCFAL 2* proteins in nine species such as *N. ceranae* and *N. apis*. Also, AFD_class_I superfamily structural domain were identified in *LCFAL 2* in *N. ceranae*, *Tubulosema ratibonensis*, *N. apis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Spraguea lophii*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Hamiltosporidium tvaerminensis* and *Brachionus plicatilis*. *LCFAL 2* (XP_024331795.1) in *N. ceranae* and *LCFAL 2* (EQB61677.1) were clustered into one clade, and their evolutionary distance was the closest. These findings clarify the molecular characteristics of *N. ceranae LCFAL 2*, and uncover that *LCFAL 2* may be hydrophilic protein, intracellular protein and non-transmembrane protein, the genetic relationship between *N. ceranae LCFAL 2* and *N. apis LCFAL 2* is the closet, and *LCFAL 2* is highly conserved in *N. ceranae* and other microsporidia.

Key words: *Nosema ceranae*; long chain fatty acid COA ligase (*LCFAL 2*); molecular characteristics; conservative; phyletic evolution

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (简称蜜蜂), 是一种优良的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 亚种, 具有优越的采集和造脾能力, 在养蜂生产中广泛使用 (曾志将, 2009)。东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 特异性侵染成年蜜蜂的中肠上皮细胞, 可引起宿主的细胞凋亡和免疫应答抑制, 消化系统紊乱, 记忆受损和寿命缩短, 导致的微孢子虫病给养蜂生产造成较大损失 (Burnham, 2019)。目前, 东方蜜蜂微孢子虫广泛感染世界各地的饲养蜂群 (梁勤和陈大福, 2009)。虽然东方蜜蜂微孢子虫的参考基因组 (Pelin *et al.*, 2015) 和全长转录组均已公布, 但转基因操作技术体系的缺失导

致相关基因功能研究较为滞后。

脂肪酸辅酶 A 连接酶 (fatty acid CoA ligase, *FAL*) 也称脂酰辅酶 A 合成酶 (acyl-CoA Synthetase, *ACS*) 在真核细胞中广泛存在, 催化长链脂肪酸转化为酰基辅酶 A, 在脂质生物合成、能量合成及基因表达调控等方面起到重要作用 (Dong *et al.*, 2012)。Sung (2007) 等研究发现用脂肪酸辅酶 A 连接酶家族的抑制剂 Triacsin C 处理后, 细胞的生长受到抑制, 且细胞凋亡显著增加。Tenagy (2019) 等发现在培养基中加入 Triacsin C 后, 3 种马拉色菌 *Malassezia* spp. 的生长受到抑制且这种抑制与 Triacsin C 呈剂量依赖关系。然而,

东方蜜蜂微孢子虫的 *LCFAL* 研究迄今仍然缺失, 相关信息匮乏。

前期研究中, 笔者团队测定了东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂的过程中 *nce-miR-15338* 及其靶基因 *LCFAL 2* 在的表达谱, 发现二者均呈持续下降的表达趋势 (未发表数据)。本研究对东方蜜蜂微孢子虫孢子中的 *LCFAL 2* 基因进行表达验证, 进而分析 *LCFAL 2* 蛋白的分子特性, 并对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 *LCFAL 2* 进行系统进化分析, 以期丰富东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 的基本信息, 并为深入开展 *LCFAL 2* 的功能研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 *LCFAL 2* 基因的生物信息学分析

根据前期预测出的东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 序列, 利用 NCBI 网站上 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 ORF 工具对 *LCFAL 2* 的氨基酸序列进行预测。通过 Expasy 网站 (<https://www.expasy.org/resources>) 上的 ProtParam、ProtScale 和 SWISS-model 等软件分析 *LCFAL 2* 的理化性质、亲水性和三级结构。采用 SignalP 4.1 Server、NetPhos 3.1 Server、TMHMM 和 SOPMA 等软件预测信号肽、磷酸化位点、跨膜结构域及二级结构。通过 PSORT II 软件 (Sedaghat-Nejad *et al.*, 2021) 进行亚细胞定位预测。

1.2 *LCFAL 2* 蛋白的保守基序和结构域预测

使用 MEME 软件 (Bailey and Elkan, 1994) 预测东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*、蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis*、东方赤孢子虫 *Hamiltosporidium tvaerminnensis*、肠脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon intestinalis*、兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*、巨蟹肠孢菌 *Enterospora canceri*、毕氏肠细胞虫 *Enterocytozoon bieneusi*、烟粉虱 *Spraguea lophii*、管孢属微孢子虫 *Tubulinosema ratisbonensis*、褶皱臂尾轮虫 *Brachionus plicatilis*。 *LCFAL 2* 的保守基序, 参数为: 结构域最小氨基酸残基数为 6 aa, 结构域最大氨基酸残基数为 50 aa, 不同结构域的数量为 5, 其余参数为默认设置。通过 NCBI Conserved Domains Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 对 *LCFAL 2* 蛋白的结构域, 再使用 TBtools 软件进行分析。

1.3 *LCFAL 2* 蛋白的系统进化分析

采用 Blast 工具将东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 氨基酸序列比对到 GeneBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 以搜索序列相似性较高的其他物种的 *LCFAL 2*。通过 Mega 11.0 软件 (Tamura *et al.*, 2021) 对东方蜜蜂微孢子虫和上述其他物种的 *LCFAL 2* 构建系统进化树, 选择默认参数。

2 结果与分析

2.1 *LCFAL 2* 蛋白的分子特性

LCFAL 2 共含有 1 836 个核苷酸, 可编码 611 个氨基酸 (MEKRTNKNKFGEISHTNFLENIECLQNGSKTLEVFSSSTCQKYENKNFLGTIKDNKLIWQTFSEINIKIQLSTFLNSILQENAIFGIFSVNRYEWIVSELAGYMSNCINCPDYSTFGPDAVNLIINETEMTVCCVSGDKAESLLDILLSSKKHFLKDIIFDDDFNRENEFLDL EINVHYSISQIFLETEINLRSNKLDLNSLATICYTSGTSGIPKGVQITHKNFIANISAFFRGQTKNEMYRVSDSEVYLSYLPLAHIMERIVVHVITSVGGSIGFYRGPNPKKIESDYLVIRPTFIIVPRVLNIFKQKIEEVAERGKLSKFIFNIALKIKMWLQCRGSVKCWPLDSLIFNKISNKFGRGRIKACLCSAALSHNVLTFLKATMSMRIFQGYGQTETTGATTLCPDGDNDVNGIPYPSCKIKLSPVDGHDKYSGELLVKGDNVTKGYFKRPELNAELFTEDNWLKTGDIA RFYNGVFKIIGRTKDRFKTGHGEYIEPEKIETLLTGGLIQDIIITLTKGYDKLLALVVCEKEGIEQKEVLDYLIKKGKLVDDKMMNRYEIPSHIILLKGFDTDFDGGKLLSP TAKKIRVKIEKFFYEDIKRALSKK)。 *LCFAL 2* 的分子式为 $C_{3145}H_{4985}N_{813}O_{904}S_{23}$, 分子量约为 69.39 kDa, 脂溶系数为 96.82, 等电点为 8.79。 *LCFAL 2* 中含量最高和最低的氨基酸分别为异亮氨酸和色氨酸 (表 1); 包含 71 个负电荷氨基酸, 其中天冬氨酸和谷氨酸分别有 30 和 41 个; 82 个正电荷氨基酸, 其中精氨酸和赖氨酸分别有 21 个和 61 个 (表 1)。

LCFAL 2 的平均亲水系数为 -0.161, 亲水氨基酸数量比疏水氨基酸多 (图 1-A), 说明其可能为亲水性蛋白。在 *LCFAL 2* 中不存在跨膜螺旋域 (图 1-B), *LCFAL 2* 中不存在典型的信号肽, 说明其可能为胞内蛋白 (图 1-C)。另外, *LCFAL 2* 含有 64 个磷酸化位点, 包括 27 个丝氨酸磷酸化位点, 14 个酪氨酸磷酸化位点及 23 个苏氨酸磷酸化位点 (图 1-D)。

表 1 LCFAL 2 蛋白的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of LCFAL 2 protein

氨基酸 Amino acids	数量 Number	频率 (%) Frequency	氨基酸 Amino acids	数量 Number	频率 (%) Frequency
丙氨酸 Ala	21	3.40	亮氨酸 Leu	61	10.00
精氨酸 Arg	21	3.40	赖氨酸 Lys	61	10.00
天冬酰胺 Asn	39	6.40	蛋氨酸 Met	9	1.50
天冬氨酸 Asp	30	4.90	苯丙氨酸 Phe	36	5.90
半胱氨酸 Cys	14	2.30	脯氨酸 Pro	16	2.60
谷氨酰胺 Gln	14	2.30	丝氨酸 Ser	40	6.50
谷氨酸 Glu	41	6.70	苏氨酸 Thr	36	5.90
甘氨酸 Gly	43	7.00	色氨酸 Trp	5	0.80
组氨酸 His	10	1.60	酪氨酸 Tyr	21	3.40
异亮氨酸 Ile	63	10.30	缬氨酸 Val	30	4.90

LCFAL 2 含有 240 个 (39.28%) α -螺旋, 124 个 (20.29%) 延长链, 48 个 (7.86%) β -转角, 199 个 (32.57%) 无规则卷曲 (图 2-A)。LCFAL 2 三级结构的模板为 5mst. 1. A, LCFAL 2

与 5mst. 1. A 之间的同源性为 21.44% (图 2-B)。此外, 预测 LCFAL 2 同时定位于细胞质、线粒体和细胞核, 占比分别为 52.20%、21.70% 和 17.40%。

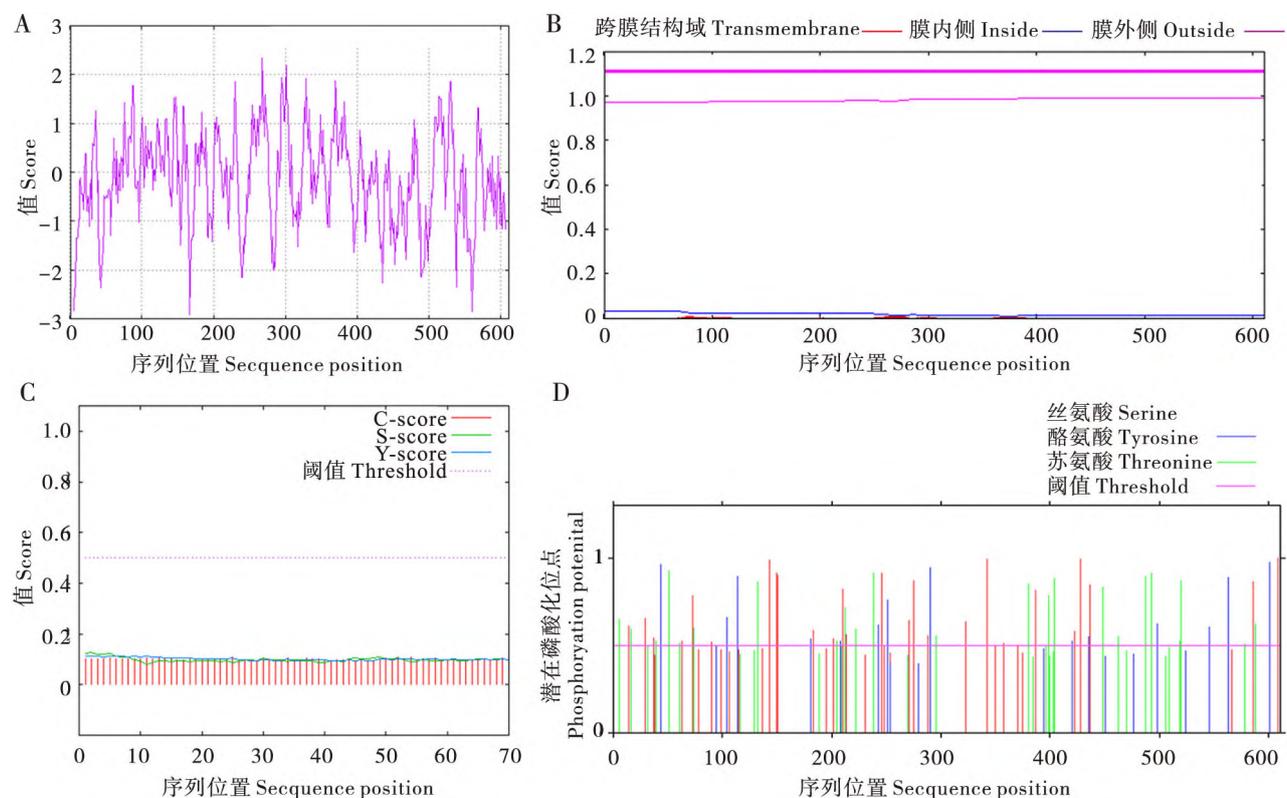


图 1 LCFAL 2 的亲水/疏水性 (A)、跨膜螺旋域 (B)、信号肽 (C) 和磷酸化位点 (D)

Fig. 1 Hydrophilicity (A), transmembrane domain (B), signal peptide (C) and phosphorylation site (D) of LCFAL 2

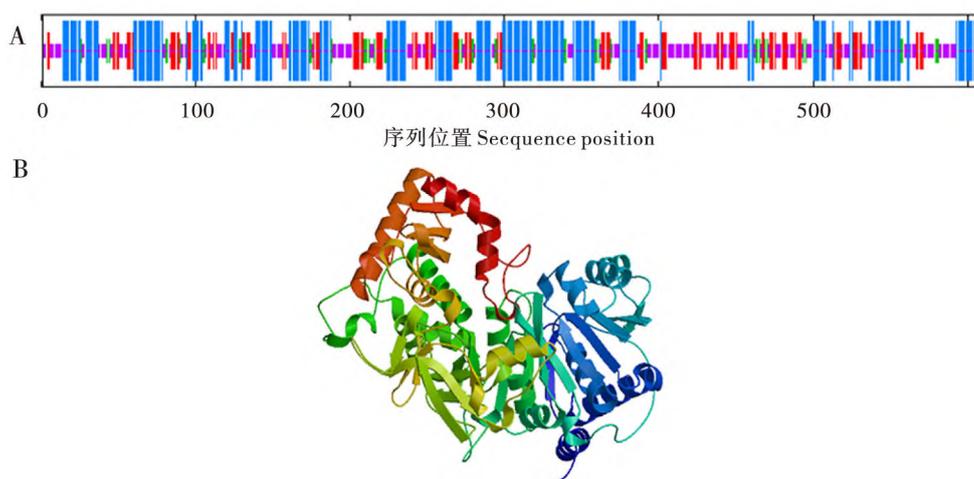


图2 LCFAL 2 的二级结构 (A) 和三级结构 (B)

Fig. 2 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) of LCFAL 2

2.2 LCFAL 2 蛋白的保守基序与结构域分析

在东方蜜蜂微孢子虫的 LCFAL 2 中鉴定到 6 个保守基序: motif 1, motif 2, motif 3, motif 4, motif 5 和 motif 6; 类似地, 在蜜蜂微孢子虫、东方赤孢子虫 (TBU15843.1)、肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、巨蟹肠孢菌、毕氏肠细胞虫、烟粉虱、管孢属微孢子虫和褶皱臂尾轮虫的 LCFAL 2 蛋白中也鉴定到上述 6 个保守基序 (图 3), 说明 LCFAL 2 在东方蜜蜂微孢子虫和其他 9 个物种中高度保守。东方赤孢子虫 (TBU20354.1) 中不含保守基序 6。此外, 东方蜜蜂微孢子虫、管孢属微孢子虫、蜜蜂微孢子虫、巨蟹肠孢菌、烟粉虱、毕氏肠细胞虫、东方赤孢子虫、褶皱臂尾轮虫的 LCFAL 2 含有 AFD_class_I superfamily 结构域; 在兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫的 LCFAL 2 含有 FAA1 结构域。

2.3 LCFAL 2 蛋白的系统进化分析

搜索结果显示, 东方蜜蜂微孢子虫含有 1 个 LCFAL 2, 蜜蜂微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、巨蟹肠孢菌、肠细胞虫、烟粉虱、管孢属微孢子虫和褶皱臂尾轮虫也含有 1 个 LCFAL 2, 而东方赤孢子虫和兔脑炎微孢子虫均含有 2 个 LCFAL 2 (表 2)。系统进化分析结果显示, 东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、巨蟹肠孢菌和毕氏肠细胞虫的 LCFAL 2 聚为一个支, 而东方赤孢子虫、烟粉虱和管孢属微孢子虫的 LCFAL 2 聚为另一个支 (图 4); 东方蜜蜂微孢子虫 LCFAL 2 (XP_024331795.1) 与蜜蜂微孢子虫 LCFAL 2 (EQB61677.1) 聚为一支, 进化

距离最近 (图 4)。以上结果说明东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 LCFAL 2 亲缘关系最近, LCFAL 2 在不同微孢子虫中具有较高的保守性。

表 2 东方蜜蜂微孢子虫与其他 9 个物种的 LCFAL 2 概览

Table 2 Overview of LCFAL 2 proteins from *Nosema ceranae* and other ten species

物种 Species	数量 Number	NCBI 序列号 NCBI reference sequence
东方蜜蜂微孢子虫 <i>Nosema ceranae</i>	1	XP_024331795.1
蜜蜂微孢子虫 <i>Nosema apis</i>	1	EQB61677.1
东方赤孢子虫 <i>Hamiltosporidium tvaerminnensis</i>	2	TBU15843.1; TBU20354.1
肠脑炎微孢子虫 <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	1	XP_003073771.1
兔脑炎微孢子虫 <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2	CAD25808.1; CAD25810.2
巨蟹肠孢菌 <i>Enterospora canceri</i>	1	ORD95088.1
毕氏肠细胞虫 <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	1	EED44456.1
烟粉虱 <i>Spraguea lophii</i>	1	EPR77779.1
管孢属微孢子虫 <i>Tubulinosema ratisbonensis</i>	1	TUBRATIS_19230
褶皱臂尾轮虫 <i>Brachionus plicatilis</i>	1	RNA35284.1

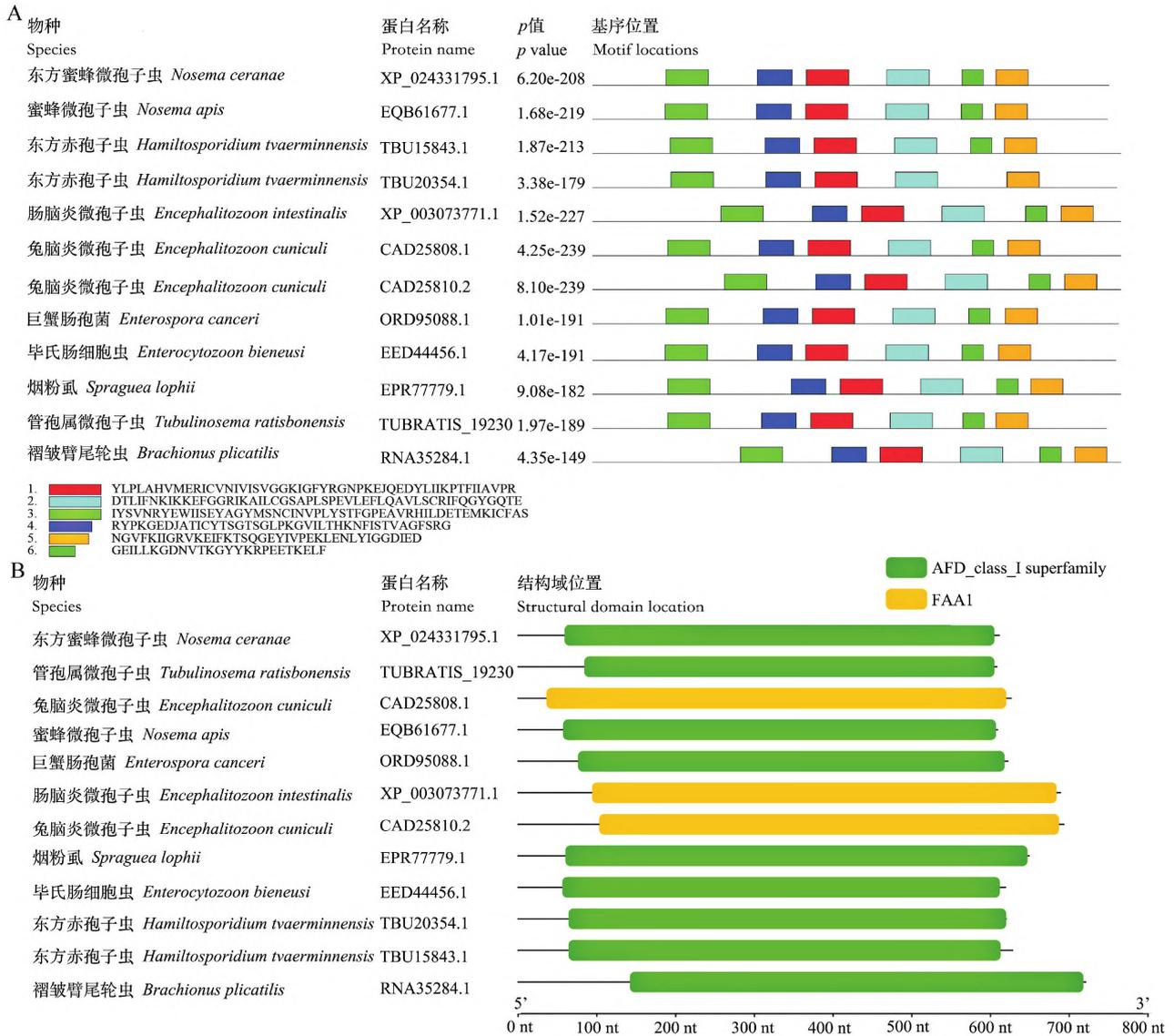


图3 东方蜜蜂微孢子虫和其他9个物种 LCFAL 2 的保守基序和结构域

Fig. 3 Conserved motifs and structural domains in LCFAL 2 in *Nosema ceranae* and other nine species

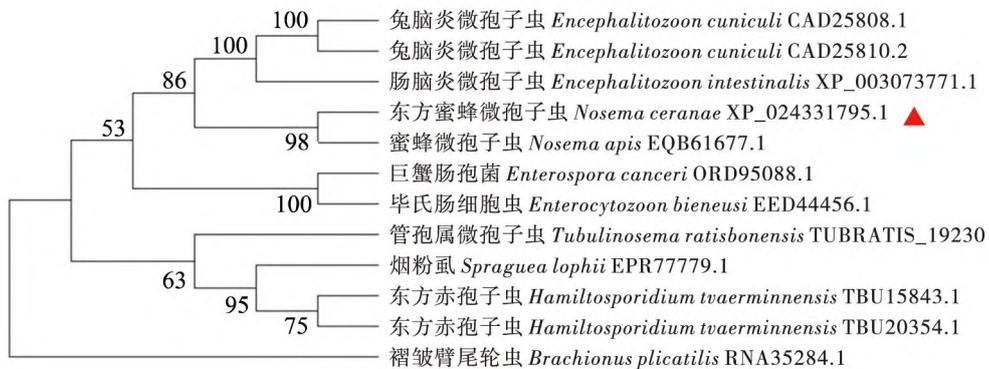


图4 邻接法构建基于 LCFAL 2 的东方蜜蜂微孢子虫与其他9个物种的系统进化树

Fig. 4 Phlogenetic tree of *Nosema ceranae* and other nine species based on LCFAL 2 by neighbor-joining method

3 结论与讨论

目前, 东方蜜蜂微孢子虫的 *LCFAL 2* 研究缺失。本研究中, 生物信息学分析结果显示, 东方蜜蜂微孢子虫的 *LCFAL 2* 含有 1 836 个核苷酸, 编码 611 个氨基酸, 分子式为 $C_{3145}H_{4985}N_{813}O_{904}S_{23}$, 分子量约为 69.39 kDa, 脂溶系数为 96.82, 等电点为 8.79, 说明该氨基酸为碱性氨基酸; 平均亲水系数为 -0.161, 亲水氨基酸数量比疏水氨基酸多 (图 1-A), 说明 *LCFAL 2* 可能为亲水性蛋白; 不含跨膜结构域 (图 1-B), 说明 *LCFAL 2* 可能不是跨膜蛋白; 不存在典型的信号肽, 说明 *LCFAL 2* 可能是胞内蛋白 (图 1-C); 主要定位于细胞质, 进一步说明 *LCFAL 2* 可能在细胞质中发挥功能。以上结果丰富了东方蜜蜂微孢子虫的 *LCFAL 2* 的基本信息, 为进一步开展相关研究提供了理论依据。

本研究发现东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 中含有 6 个保守基序 (motif 1, motif 2, motif 3, motif 4, motif 5 和 motif 6), 上述 6 个保守基序同样存在于蜜蜂微孢子虫、东方赤孢子虫、肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、巨蟹肠孢菌、毕氏肠细胞虫、烟粉虱、管孢属微孢子虫和褶皱臂尾轮虫的 *LCFAL 2* 中 (图 3), 表明 *LCFAL 2* 在上述物种中较为保守。此外, 在东方蜜蜂微孢子虫和蜜蜂微孢子虫等 8 个物种中均鉴定到 AFD_class_I superfamily 结构域, 表明 *LCFAL 2* 在上述 8 个物种中具有较高的保守性。AFD_class_I superfamily 属于非核糖体肽合成酶 A 结构域, 负责催化 ATP 形成 (李根, 2017)。推测东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 具有催化 ATP 形成的功能, 参与能量合成。

东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫是感染蜜蜂的两种主要微孢子虫, 互为姐妹种 (梁勤和陈大福, 2009)。本研究中, 系统进化分析结果显示东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫的 *LCFAL 2* 聚为一支, 进化距离最近, 表明二者的 *LCFAL 2* 亲缘关系最近 (图 4), 符合客观事实。研究表明 *LCFAL 2* 参与真核细胞的增殖、分化和凋亡 (Tomoda *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2011)。推测 *LCFAL 2* 在东方蜜蜂微孢子虫与蜜蜂微孢子虫感染蜜蜂宿主的过程中发挥功能, 值得进一步探究。下一步拟建立东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂或中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂的模型 (Paldi *et al.*, 2010), 并通过饲喂特异性 dsRNA 或

siRNA 对处于侵染过程的东方蜜蜂微孢子虫 *LCFAL 2* 进行 RNAi, 以探究 *LCFAL 2* 的分子功能。

参考文献 (References)

- Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers [J]. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 1994, 2: 28–36.
- Burnham AJ. Scientific advances in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infections in honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 79.
- Dong Y, Du H, Gao C, *et al.* Characterization of two long-chain fatty acid CoA ligases in the Gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 [J]. *Microbiological Research*, 2012, 167 (10): 602–607.
- Liang Q, Chen DF. Honeybee Protection [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 108–110. [梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009: 108–110]
- Li G. Cloning and Bioinformatic Analysis of the Marine Actinomycetes NRPS Gene [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2017. [李根. 海洋放线菌 NRPS 基因克隆及生物信息学分析 [D]. 大连: 大连工业大学, 2017]
- Paldi N, Glick E, Oliva M, *et al.* Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (17): 5960–5964.
- Pelin A, Selman M, Aris-Brosou S, *et al.* Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae* [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17 (11): 4443–4458.
- Sedaghat-Nejad E, Fakharian MA, Pi J, *et al.* P-sort: An open-source software for cerebellar neurophysiology [J]. *Journal of Neurophysiology*, 2021, 126 (4): 1055–1075.
- Sung YK, Park MK, Hong SH, *et al.* Regulation of cell growth by fatty acid-CoA ligase 4 in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2007, 39 (4): 477–482.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38 (7): 3022–3027.
- Tenagy, Tejima K, Chen X, *et al.* Long-chain acyl-CoA synthetase is associated with the growth of *Malassezia* spp. [J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2019, 5 (4): 88.
- Tomoda H, Igarashi K, Cyong JC, *et al.* Evidence for an essential role of long chain acyl-CoA synthetase in animal cell proliferation. Inhibition of long chain acyl-CoA synthetase by triacins caused inhibition of Raji cell proliferation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (7): 4214–4219.
- Xu C, Wang G, Hao Y, *et al.* Correlation analysis between gene expression profile of rat liver tissues and high-fat emulsion-induced nonalcoholic fatty liver [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2011, 56 (8): 2299–2308.
- Zeng ZJ. Apiculture [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 35–36. [曾志将. 养蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 35–36]