



中华蜜蜂肠道菌 *Gilliamella* sp. G0441 分离、 鉴定及基因组分析

彭焯华^{1,2}, 高 杨¹, 张立富^{2,3}, 黄少康^{1*}, 李文峰^{2*}

(1. 福建农林大学动物科学学院(蜂学院), 福州 350002; 2. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260; 3. 华南农业大学植物保护学院, 广州 510640)

摘要: 蜜蜂肠道菌群由一组特定的细菌组成, 在宿主营养代谢、免疫调节及解毒等方面发挥重要作用。本研究对一来自中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂肠道的菌株——G0441 进行了分离、鉴定以及基因组分析。G0441 菌株呈圆形, 直径约 1 μm, 表面光滑, 半透明; 严格厌氧生长。基于 16S rRNA 基因序列分析结果可知: G0441 菌株属于γ变形菌纲, Orbaceae 科, 其最近的近缘种均为 *Gilliamella* 属物种。G0441 基因组大小为 2.6 Mb, 总 GC 含量比值为 35%; 基因组编码 2 350 个基因, 其中包括 2 299 个蛋白编码基因, 蛋白编码基因序列长度占比为 85%。对蛋白编码基因进行 COG 功能分类注释, 结果显示: 氨基酸转运和代谢、碳水化合物转运和代谢、翻译-核糖体结构与生物发生、转录、复制-重组-修复、细胞壁/细胞膜/包膜生物发生等功能类别得到显著富集。此外, 从 G0441 基因组中还注释得到 159 个毒力因子、77 个耐药基因、22 个碳水化合物活性酶、255 种转运蛋白、565 个跨膜蛋白基因、201 个信号肽蛋白基因及多个脂蛋白基因。泛基因组分析显示: 在 6 种近缘菌株的同源基因中, 存在 145 个共有基因 (core gene) 和 7 190 个特有基因 (specific gene), 其中, G0441 含有 221 个特有基因。基于 core 单拷贝基因和全基因组 SNP 位点的系统进化树分析均表明: G0441 与 *Gilliamella* sp. ESL0441 菌株亲缘关系最为接近。本研究分离并鉴定了一种中华蜜蜂肠道菌 *Gilliamella* 菌株 (命名为 *Gilliamella* sp. G0441)。本研究获得的菌株基因组信息为进一步探索 *Gilliamella* sp. G0441 相关功能奠定基础。

关键词: 中华蜜蜂; 肠道菌群; *Gilliamella*; 基因组分析

中图分类号: Q968.1;

文献标识码: A

Isolation, identification, and genomic analysis of *Gilliamella* sp. G0441 from the intestinal tract of Asian honey bees, *Apis cerana cerana*

基金项目: 广州市科技计划项目 (202103000009); 广东省科学院科技发展专项 (2022GDASZH-2022010106, 2022GDASZH-2022010102); 南岭国家公园生态系统与生物多样性监测 (一期) (LC-2021124); 广东省乡村振兴战略专项资金种业振兴项目 (2022-440000-4301030211-9465); 广东省创新人才培养专项资金“海外名师”项目; 广东省科学院动物研究所高级科研人员引进计划专项 (GIABR-girc201702)

作者简介: 彭焯华, 女, 硕士研究生, 研究方向为动物疾病诊疗, E-mail: 1649824539@qq.com

*通讯作者 Author for corresponding: 李文峰, 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为蜜蜂健康和保护, E-mail: wfli.bees@giz.gd.cn;

黄少康, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为蜜蜂病理生理学, E-mail: skhuang@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-12-26; 修回日期 Revision received: 2024-02-01; 接受日期 Accepted: 2024-02-02

PENG Ye-Hua^{1,2}, GAO Yang¹, ZHANG Li-Fu^{2,3}, HUANG Shao-Kang^{1*}, LI Wen-Feng^{2*} (1 College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China; 3 College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The gut microbiota of honey bees consists of a specialized group of bacteria that are essential for host nutrition metabolism, immune regulation, and detoxification. In this study, a bacterial strain designated G0441 was isolated from the intestinal tract of worker bees of the Asian honey bee *Apis cerana cerana*. This strain was subsequently identified and subjected to genome analysis. The colonies of G0441 exhibited a circular morphology, measuring approximately 1 mm in diameter, with a smooth and translucent surface. Optimal growth of the G0441 was achieved under strict anaerobic conditions. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence placed G0441 within the order γ -Proteobacteria and the family Orbaceae with the closest relatives being members of the *Gilliamella* genus. The genome of G0441 measures 2.6 Mb in size and has a GC content of 35%. It encodes a total of 2350 genes, including 2299 protein-coding genes, which account for 85% of the genome's total length. Functional annotation of the protein-coding genes using the Cluster of Orthologous Groups (COG) database revealed significant enrichment in several key categories, including amino acid transport and metabolism, carbohydrate transport and metabolism, translation-ribosomal structure and biogenesis, transcription, replication-recombination-repair, and cell wall/membrane/envelope biogenesis. Additionally, genome annotation of G0441 identified 159 virulence factors, 77 antibiotic resistance genes, 22 carbohydrate-active enzymes, 255 transporter proteins, 565 transmembrane protein genes, 201 signal peptide protein genes, and multiple lipoproteins genes. Pan-genome analysis of six closely related strains revealed 145 core genes and 7190 strain-specific genes, with G0441 containing 221 unique genes. Phylogenetic analysis, based on both core single-copy genes and whole-genome SNPs, consistently demonstrated that G0441 is most closely related to the *Gilliamella* sp. ESL0441 strain. This study successfully isolated and identified a strain of *Gilliamella* bacteria, designated as *Gilliamella* sp. G0441, from the intestinal tract of *A. cerana*. The genomic data obtained in this study provide a foundation for further investigation to the functional characteristics of *Gilliamella* sp. G0441.

Key words: Asian honey bee; gut microbiota; *Gilliamella*; genomic analysis

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 简称中蜂, 是广泛分布于我国的东方蜜蜂 *Apis cerana* 亚种。作为山区丘陵地带人工饲养的主要蜂种之一, 其在我国饲养量大约为 400 万群 (徐祖荫和龙立炎, 2019), 是我国重要的传粉昆虫。中华蜜蜂授粉可以通过增加植物多样性和农作物产量来确保当地生态系统的稳定和养蜂人的收入 (Stein *et al.*, 2017)。

蜜蜂成年工蜂的肠道微生物群, 主要包含九类细菌, 分别是: *Snodgrassella alvi*、*Gilliamella apicola*、*Lactobacillus Firm-4*、*Lactobacillus Firm-5*、*Bifidobacterium*、*Frischella*

perrara、巴尔通体菌 *Bartonella apis*、*Parasaccharibacter apium* 和葡糖杆菌 *Gluconobacter* 中特定的一个种类群“Alpha 2. 1”，约占总细菌的 95%~99.99%。每类细菌由一组相关细菌组成，它们通过蜜蜂之间相互的哺育、清洁等社会性行为传播（Martinson *et al.*, 2012）。最普遍存在的两种革兰氏阴性菌是 *Snodgrassella alvi* 和 *Gilliamella apicola*，它们都属于变形菌门 Proteobacteria。*Snodgrassella alvi* 属于奈瑟菌科 Neisseriaceae，是一种专性微需氧细菌。*Gilliamella apicola* 属 Orbacea 科，能代谢蜜蜂体内有毒糖类物质。其次存在较多的是革兰氏阳性菌中的厚壁菌门 Firmicutes 的两个种，*Lactobacillus Firm-4* 和 *Lactobacillus Firm-5*（Babendreier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011）。还有含量通常不十分丰富，但在大多数成年工蜂肠道中也发现了属于放线菌门的 *Bifidobacterium asteroides*（Scardovi *et al.*, 1969; Bottacini *et al.*, 2017）。上述 5 种细菌构成了蜜蜂肠道的优势菌。除此之外在蜜蜂肠道中数量较少的有 *Frischella perrara*、*Bartonella apis*、*Parasaccharibacter apium*（Martinson *et al.*, 2011; Engel *et al.*, 2013; Corby-Harris *et al.*, 2014; Kešnerová *et al.*, 2016）。蜜蜂的肠道菌群可以帮助宿主降解有毒物质、吸收多糖和提高免疫反应，从而有利于宿主的健康和体质（Wang *et al.*, 2018）。

Gilliamella 是蜜蜂肠道中的核心菌属和优势菌属，并占据重要的生态位（Bottacini *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2014; Kwong *et al.*, 2018）。Zhang 等人（2022）通过研究 ANI 和 GTDB 全基因组序列比对，将 *Gilliamella* 属菌种分为 27 个种。其中，利用体外分离培养和 16S rRNA 基因序列比对信息，已经鉴定了 5 种 *Gilliamella* 菌种：*Gilliamella apicola*、*Gilliamella intestini*、*Gilliamella bombicola*、*Gilliamella bombi* 和 *Gilliamella mensalis*（Kwong *et al.*, 2013; Prae *et al.*, 2017）。在蜜蜂肠道内，*Gilliamella* 生长在 *Snodgrassella alvi* 的上方，形成致密的生物膜（Zheng *et al.*, 2019）。*Gilliamella* 谱系定位于后肠不同区域，对应于它们利用宿主空间集中的含氮废物的能力的差异，例如 *G. apis* 和 *G. apicola* 以不同的方式定植于肠道：*G. apis* 强烈定植于幽门，*G. apicola* 定植在回肠和直肠的其余部分。由于尿素在幽门处最集中，因此这种分布与 *G. apis* 和 *G. apicola* 菌株利用尿素作为潜在的氮源相一致（Li *et al.*, 2022）。蜜蜂肠道 *Gilliamella* 菌在中和食物毒素、营养物质的生物合成以及食物成分消化中发挥作用，其中包括蜜蜂本身无法消化的复杂碳水化合物和糖的发酵（Engel *et al.*, 2012）。果胶和多糖是蜂蜜的重要成分，是蜜蜂的重要食物来源，果胶和其他多糖的消化可以导致不可消化的或有毒的糖的释放，但 *Gilliamella* 能够中和和利用这些副产物（Zheng *et al.*, 2016）。同时 *Gilliamella* 在多糖代谢和利用糖底物的能力方面表现出多样性（Zhang *et al.*, 2020）。在宿主和 *Gilliamella* 的长期协同进化过程中，不同菌株对碳水化合物的消耗效率与其生长发育能力相关。此外，这些菌株还可以降解宿主难以消化的单糖，甚至对宿主有害。即使在同一 *Gilliamella* 菌种的不同个体之间，碳水化合物的降解能力也可能不同（Zhang *et al.*, 2022）。研究表明，*Gilliamella* 中的硫肽可能作为细菌与其他微生物和宿主通讯的信号（Zhang *et al.*, 2022）。不同蜂种的 *Gilliamella* 编码的基因也大不相同。对 *Gilliamella* 菌株的比较

基因组分析表明，熊蜂 *Gilliamella* 菌株的半乳糖和果胶消化途径是保守的，而利用阿拉伯糖、甘露糖、木糖和鼠李糖的基因大部分丢失（Zhang *et al.*, 2020）。蜜蜂的 *Gilliamella* 菌株比熊蜂相关菌株含有更多使用各种糖的基因，但它们的 *Gilliamella* 菌株都保存着编码果胶降解酶的基因（Zhang *et al.*, 2020）。

目前对于 *Gilliamella* 属的研究大多数集中在 *Gilliamella* 属菌株的分离、分离菌株的进化地位和基因功能注释分析等，而对 *Gilliamella* 属分离菌株进行基因组水平的比较分析仍然存在很大不足。在本研究中，首次从中蜂工蜂肠道菌中分离、鉴定得到一株 *Gilliamella* 菌株——*Gilliamella* sp. G0441。然后，结合已经发表的 *Gilliamella* 属基因组和 *Frischella* 属基因组，通过比较基因组分析明确了该菌株的分类地位，并通过基因注释和基因组高级注释对该菌株的 GO、COG、KEGG 功能分类注释，并对该菌株的毒力因子、耐药功能、碳水化合物活性酶、病原宿主互作用等进行分析。

1 材料与amp;方法

1.1 培养基制备

含有 5% v/v 去纤维蛋白绵羊血的胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）制备方法为：取 20 g 胰酪大豆胨琼脂培养基干粉（TSA, Difco BD），溶于 500 mL 无菌水，高压蒸汽灭菌 121°C，20 min，待温度降至 55°C 左右时，加入 25 mL 无菌去纤维蛋白绵羊血（鑫泉科技）摇匀后倒平板。

1.2 中蜂工蜂采集

从广东省科学院动物研究所实验蜂场选择健康强群，用软镊子随机采集 10 头工蜂于试管中。放入 4°C 的冰箱中麻醉 10~15 min。

1.3 菌株分离与纯化

使用 75% 的酒精浸泡工蜂表面 1 min，再用无菌水冲洗后，用灭菌滤纸滤干多余水分。在超净工作台中，无菌解剖剪剪去头部，再用无菌镊子夹住工蜂尾部末端，轻拉出整个肠道（包括蜜囊、前肠、中肠、后肠）到灭菌的小管中，汇集 10 头肠道于同一管，加入无菌 1 mL 1×PBS 研磨混匀，并用漩涡振荡器震荡 1 min，形成的悬浊液用 1×PBS 溶液依次稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 三个浓度，各取稀释液 100 μ L 分别涂在 TSA 培养基上（含 5% 去纤维蛋白羊血），每个浓度做 3 个重复。涂布的平板封上封口膜放入厌氧培养箱中，在 35°C，60%RH 条件下培养 3 d。挑取圆形、光滑、半透明的菌落进行纯化，使用平板划线法进行 3 轮纯化后得到纯菌株。

1.4 菌株保藏

配制 20% 的甘油：取 4 mL 100% 的甘油，然后与 16 mL 双蒸水混合均匀，放置于高压灭菌锅 121°C 灭菌 1 h，最后分装于 1.5 mL 离心管中。用接种环小心挑取已纯化的单菌株放入装有 20% 的甘油的 1.5 mL 离心管中，用封口膜封住离心管管口防止污染，最后将菌株放到 -80°C 进行保存。

1.5 菌株鉴定

从平板上挑取已纯化的菌落进行 PCR 扩增。使用细菌通用引物（27F，5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'；1492R，5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）扩增 16S rRNA 基因进行鉴定。PCR 扩增反应体系为：2×Taq HiFi PCR mixenzymes 25 μL，上游引物 1 μL，下游引物 1 μL，DNA 模板 10 μL，去离子水 13 μL。PCR 程序为：95°C 预变性 5 min，94°C 变性 30 s，60°C 退火 30 s，72°C 延伸 30 s。扩增循环数为 35，72°C 保持 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。将目的条带切胶回收后送去双向测序。对测序所得核酸序列在 NCBI 数据库中进行比对、鉴定。

1.6 菌株扩培

对纯化后的 G0441 菌株进行扩培。将保藏的 G0441 菌液用无菌水稀释 10^3 倍，取稀释液用 100 μL 分别涂在 TSA 培养基上（含 5% 去纤维蛋白羊血），然后放置在 35°C，60% RH 的厌氧培养箱中培养 7 d。

1.7 细菌框架图测序

1.7.1 DNA 质检

小心刮取平板上的菌落。转移适量细菌菌落至离心管中。10 000 g 离心 1~3 min 收集细菌菌体，使用适量的 1×PBS 溶液进行清洗，初步去除杂质干扰。加入 180 μL Buffer STE Plus，30 μL Lysozyme 和 5 μL RNase A 至细菌沉淀团中。

涡旋重悬细菌，室温静置 10~20 min。加入 200 mg 磁珠至样品中，高速涡旋混匀 5~10 min 进一步裂解细菌，静置 1 min，转移溶液至新的离心管中。10 000 g 离心 1 min 收集管壁上的液滴，加入 500 μL Buffer BD，震荡混匀，室温放置 2 min。2 mL 离心管放置在磁力架上吸附 5 min，小心吸弃上层清液，并且移开。加入 600 μL Buffer AW1，震荡混匀。放置在磁力架 5 min，弃上清。加入 600 μL 80% ethanol，混匀磁珠。放置在磁力架 5 min，弃上清。并重复上述操作一次。快速离心，磁力架吸附后，使用移液器尽可能多的吸取离心管中液体。将 2 mL 离心管放在 55°C 烘干，使残留酒精完全挥发。加入 50 μL Elution Buffer 到离心管中，充分震荡混匀，65°C 金属浴 10 min。磁力架吸附 5 min，小心吸取上清 DNA 液体到新的 1.5 mL 离心管中。使用 1% 琼脂糖凝胶（电压：200 V，时间：30 min）检测 DNA 完整性，Qubit 定量检测 DNA 样本浓度。

1.7.2 基因组 DNA 文库构建和测序

利用 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 对基因组浓度精确定量，以确定文库构建所加入的 DNA 总量。制备插入片段长度为 500 bp 左右的文库，初始 DNA 总量约为 500 ng。使用 Elution Buffer 将 DNA 稀释到 130 μL，装入 0.5 mL 的 Covaris DNA 破碎管中。使用 Covaris 仪器，按照 S220 操作参数进行片段化。

首先对 DNA 片段进行末端修复（末端补平和 3' 端加 A 尾），再连接接头，然后磁珠分选纯化连接产物，接着进行文库扩增和文库纯化。

通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测文库大小。文库浓度测定：为了得到均匀的长簇效果和高质量的测序数据，使用 Thermo Qubit 4.0 荧光定量仪进行文库浓度测定。

在 Sangon Biotech（中国上海）的 Illumina NovaSeq 平台上对合格文库进行测序。

1.8 基因组拼接和生物信息学分析

1.8.1 数据评估及质控

对测序的原始数据通过 Fastp 进行数据统计以及质量评估，同时进行质量剪切，得到相对准确的有效数据。

1.8.2 基因组拼接

使用 SPAdes (Anton *et al.*, 2012) 拼接二代测序数据。采用 GapFiller (Marten and Walter, 2012) 对拼接得到的 contig 补 GAP。利用 Pilon 进行序列矫正，修正拼接过程中的剪辑错误及小片段的插入缺失，最后完成基因组拼接 (Table S2)。

1.8.3 基因组分分析

使用 NCBI-PGAP (Zhao *et al.*, 2012) /Prokka (Torsten, 2014) 软件预测基因元件 CDS、tRNA、rRNA 等。采用 Repeat Masker 鉴定基因组上的重复序列。利用 CRT (Bland *et al.*, 2007) 进行 CRISPR 预测分析。

1.8.4 基因注释

采用 NCBI Blast+ (Altschul *et al.*, 1997) 将基因蛋白序列与 CDD、KOG、COG、NR、NT、PFAM、Swissprot、TrEMBL 等多个数据库进行比对，得到其功能注释信息。根据基因与 Swissprot、TrEMBL 的注释结果得到 GO 功能注释信息。利用 KAAS (Moriya *et al.*, 2007) 得到基因 KEGG 注释信息。

1.8.5 基因组高级注释

采用 NCBI Blast+ (Altschul *et al.*, 1997) 将基因蛋白序列与 VFDB、CARD、PHI-base 等多个数据库进行比对，得到其功能注释信息。采用 HMMER3 (Eddy, 2009) 将基因蛋白序列与 CAZy 数据库进行比对，得到其功能注释信息。利用 TMHMM (Steffen *et al.*, 2001) 进行跨膜蛋白预测分析，Signal P (Petersen *et al.*, 2011) 进行信号肽预测分析，Lipo P 进行脂蛋白预测分析。利用 Prot Camp 进行蛋白亚细胞定位分析，Island Path-DIOMB (Hsiao *et al.*, 2003) 进行基因组岛预测分析，Phi Spy (Akhter *et al.*, 2012) 进行前噬菌体预测分析。

1.8.6 比较基因组分析

采用 NCBI Blast+ (Altschul *et al.*, 1997) 将拼接得到的基因组与 nt 库进行比对，根据匹配得分得到其同源菌株信息，整理并收集 30 个具有完整注释的参考代表性菌株，用于后续分析。收集所有菌株的 16S rRNA 序列，多重序列比对，并构建系统进化树。利用 Roary 根据同源菌株基因信息进行泛基因组分析和同源基因簇分析，并根据同源基因构建系统进化树。使用 snippy 进行突变检测，并根据突变 SNP 信息构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 G0441 菌株分离、纯化与鉴定

如图 1 所示, 经过三轮纯化后的 G0441 菌株菌落为圆形, 直径 1 mm, 表面光滑、半透明(图 1-A)。琼脂糖凝胶电泳图显示: G0441 菌株的细菌通用引物扩增产物在 1 500 bp 左右有明显清晰的条带(图 1-B)。对扩增产物进行测序分析知, PCR 扩增片段长度为 1 448 bp。此外, 序列比对结果显示 G0441 菌株与 *Gilliamella* sp. ESL0441 菌相似度最高为 99.58%, 因此, 初步将 G0441 鉴定为一种 *Gilliamella* 菌株。

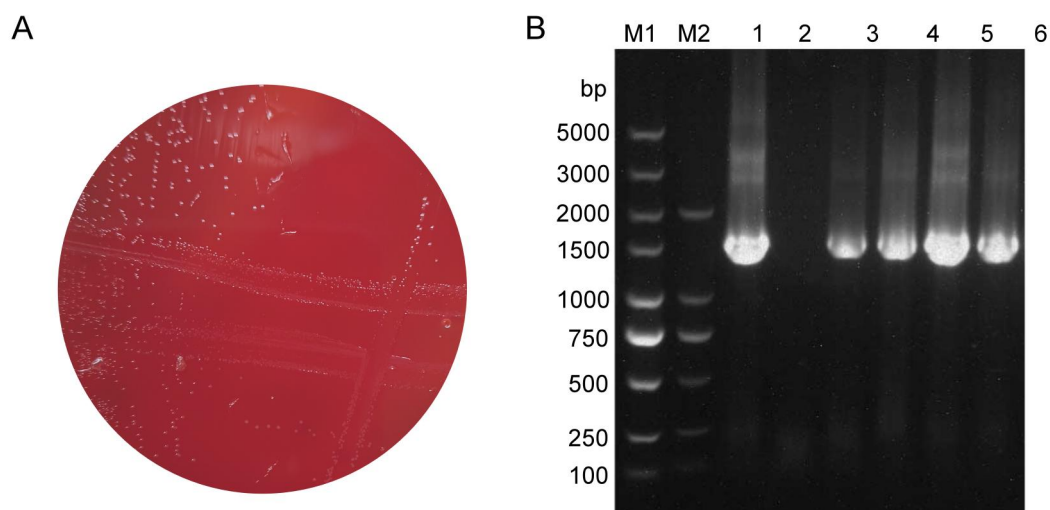


图 1 G0441 菌株分离与鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of G0441 strain

注: A, G0441 菌株平板培养和分离纯化; B, G0441 菌株细菌通用引物扩增产物电泳分析。Note: A, Plate culture, isolation and purification of G0441 strain; B, Electrophoretic analysis of the amplification products of universal primers from G0441 strain.

2.2 基因组组装、基因预测及其功能注释

基因组调查 (genome survey) 结果显示: G0441 基因组纯合度为 100%, 单倍体基因组长度约为 2.56 Mb, 其中, 重复序列占比约为 3.4%, 非重复序列占比约为 96.6%。实际基因组组装结果为: G0441 基因组大小为 2.6 Mb, 其中, 拼接序列平均长度为 52 Kb, 单条序列最大长度为 500 Kb, Contig 数目为 50 个, N50 值为 185 Kb, 序列总 GC 含量比值为 35%。从 G0441 基因组中一共预测得到 2 350 个基因, 其中包括 2 299 个蛋白编码基因、5 个 rRNA 基因、45 个 tRNA 基因、1 个 ncRNA 编码基因。蛋白编码基因序列长度占比为 85%。此外, 还发现 4 条 CRISPR 区域序列。G0441 基因组全长序列已上传至 NCBI GenBank (登录号: PRJNA1195151)。

利用 NR、NT、CDD、KOG、COG、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO 和 KEGG 等多个数据库对上述蛋白编码基因进行功能注释, 在至少 1 个数据库注释成功的基因数目占总基因数的比例为 99.01%。COG 功能分类注释结果显示: 氨基酸转运和代谢、碳水化合物转运和代谢、翻译-核糖体结构与生物发生、转录、复制-重组-修复、细胞壁/细胞膜/包膜生物发生等 COG 功能类别得到显著富集(图 2)。GO 注释结果表明: 细胞过程、代谢过程及对

刺激的反应等生物学过程，膜、含蛋白复合体等细胞组分，结合、催化活性等分子功能，是显著富集的 GO 条目（图 3）。KEGG 注释结果揭示：显著富集的通路多数为代谢相关通路，如碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅酶和维生素代谢通路等，还有膜运输通路也显著富集（图 4）。此外，通过与 VFDB 数据库进行比对，发现了 159 个毒力因子（Table S1）；通过与 CARD 数据库进行比对，得到 77 个耐药基因（Table S2）；通过与 CAZy 数据库进行比对，鉴定出 22 个碳水化合物活性酶，这些酶参与催化碳水化合物降解、修饰、以及生物合成（Table S3）；通过与 TCDB 数据库进行比对，发现了 255 种转运蛋白（Table S4）。另外，还注释得到 565 个跨膜蛋白基因（Table S5），201 个信号肽蛋白基因（Table S6）。对脂蛋白进行注释发现 1 694 个 CYT 型脂蛋白，195 个 SpI 型脂蛋白，101 个 SpII 型脂蛋白和 309 个 TMH 型脂蛋白（Table S7）。

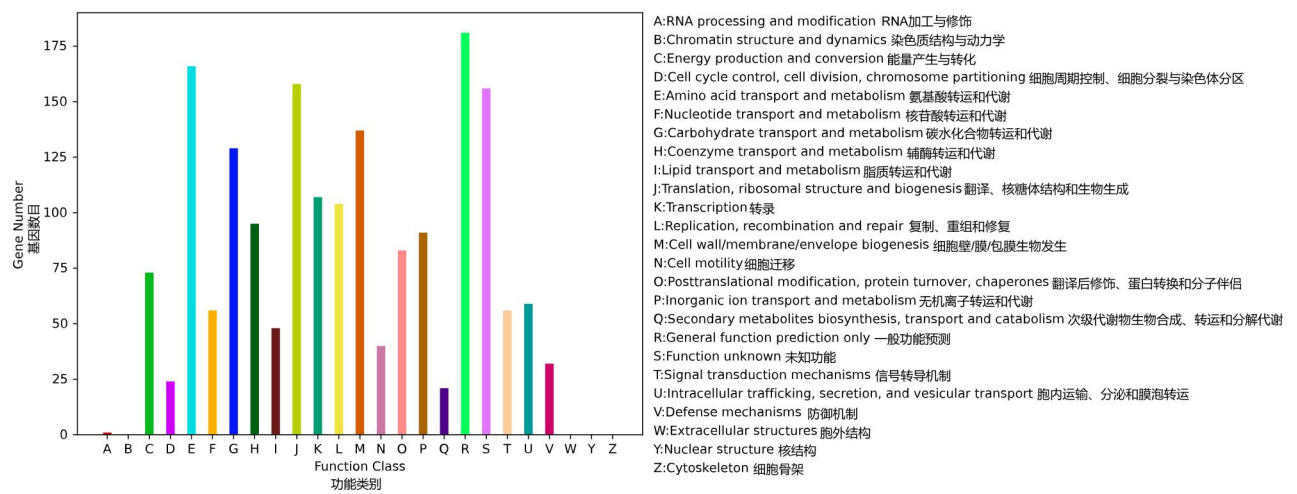


图 2 G0441 基因的 COG 功能分类注释

Fig. 2 COG functional classification annotation of G0441 genes

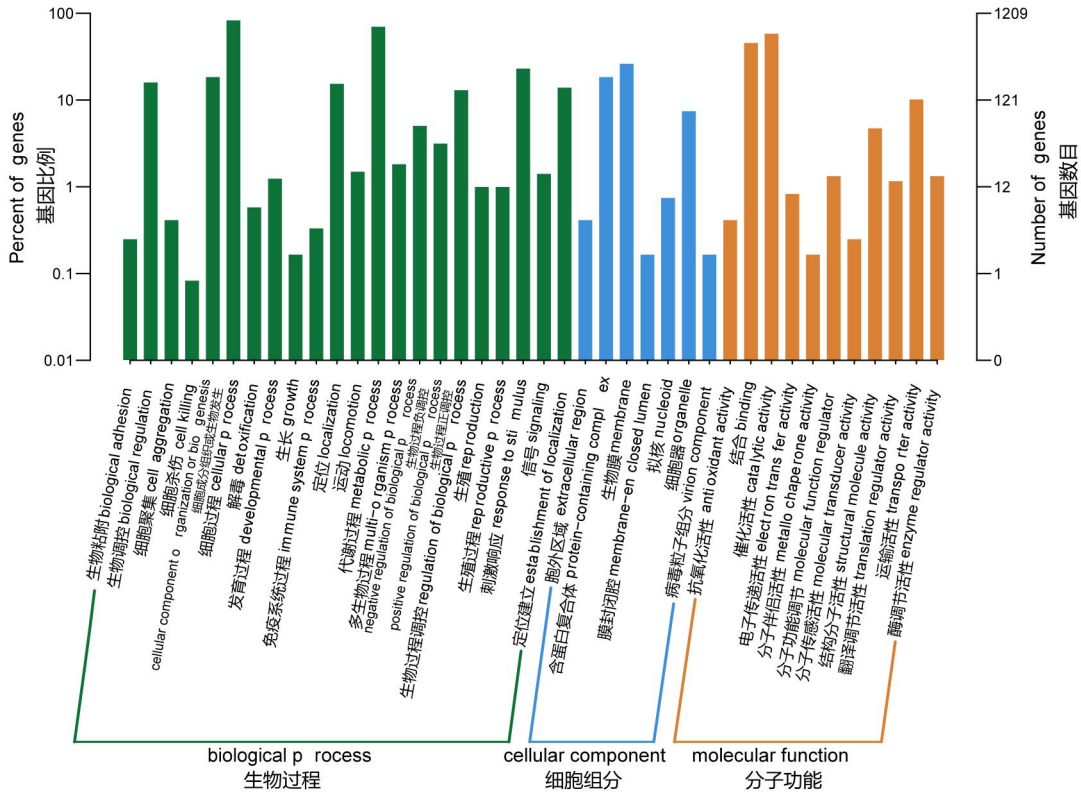


图 3 G0441 基因 GO 功能分类注释

Fig. 3 GO function classification annotation of G0441 genes

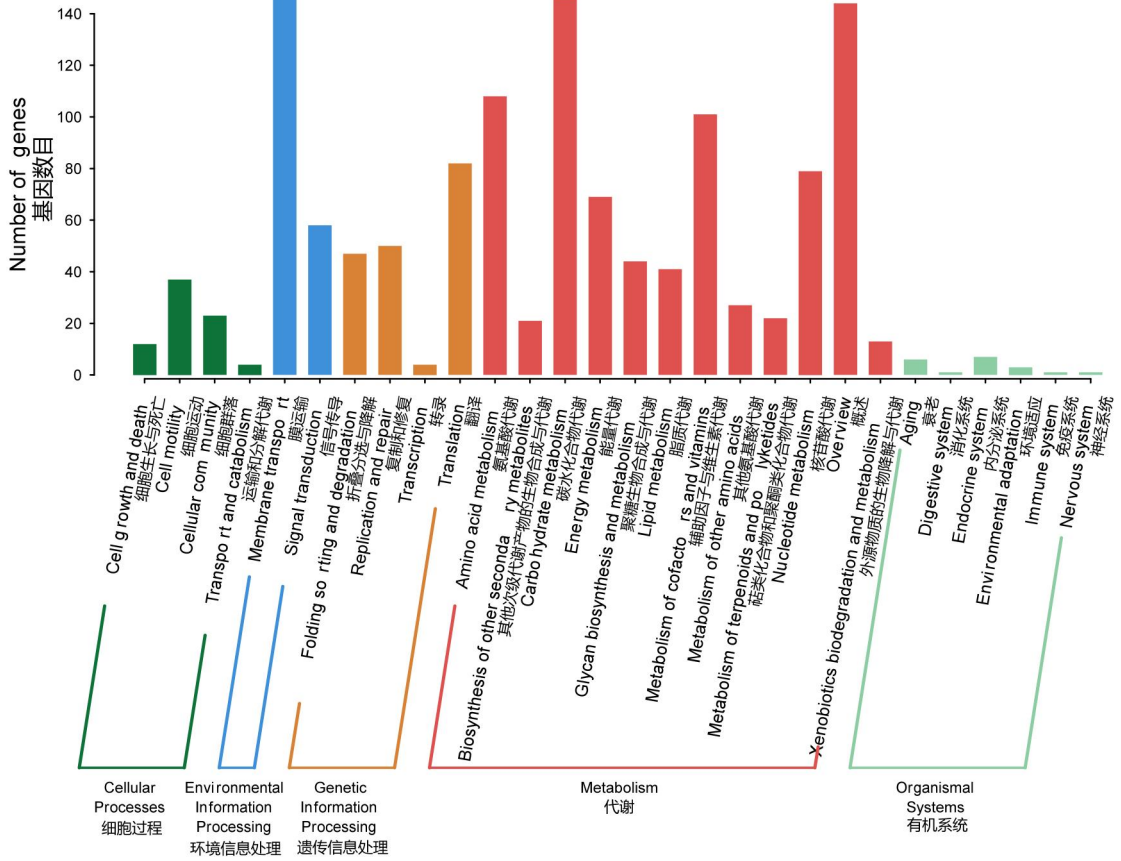


图 4 G0441 基因 KEGG 功能分类注释

Fig. 4 KEGG functional classification annotation of G0441 genes

2.3 泛基因组分析和系统发育树

泛基因组分析结果显示 G0441 有 6 种近缘菌株：*Gilliamella apicola* wkB1 (GCA_000599985.1)、*Frischella perrara* PEB0191 (GCA_000807275.1)、*Gilliamella* sp ESL0443 (GCA_019469165.1)、*Gilliamella* sp ESL0441 (GCA_019469185.1)、*Gilliamella* sp ESL0405 (GCA_019469205.1) 和 *Gilliamella* sp B3022 (GCA_028751545.1) (图 5)。在 6 种近缘菌株的同源基因中,存在 145 个共有基因(core gene)和 7 190 个特有基因(specific gene), 其中, G0441 含有 221 个特有基因 (图 5)。分别基于 core 单拷贝基因和全基因组 SNP 位点的系统进化树分析均表明: G0441 与 *Gilliamella* sp. ESL0441 菌株亲缘关系最为接近 (图 6 和图 7)。

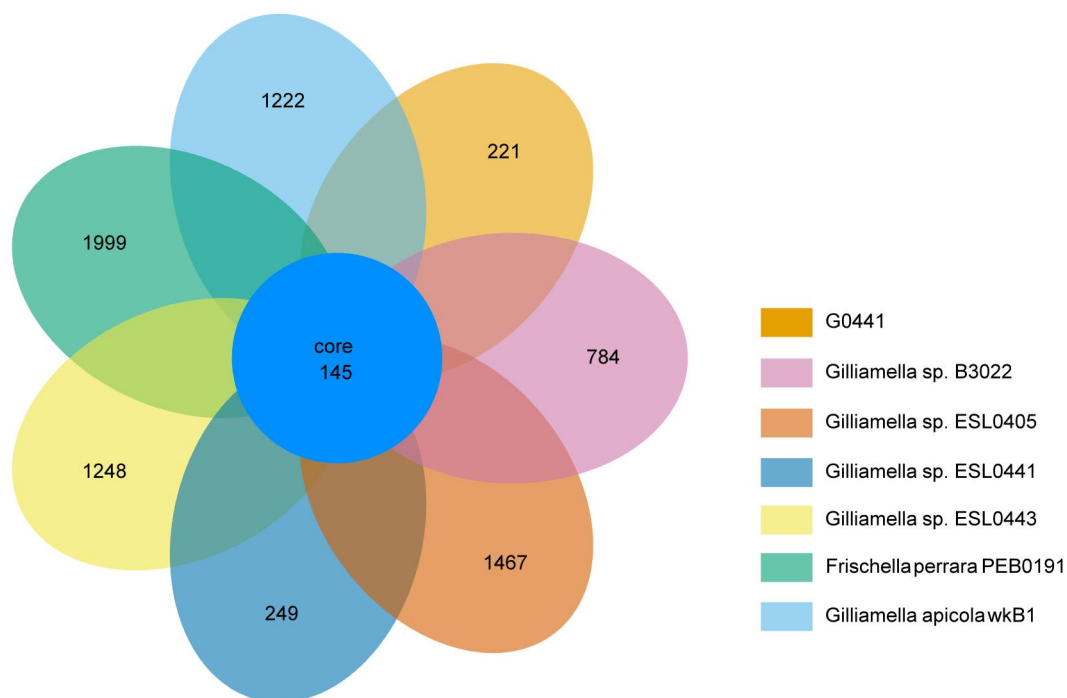


图 5 同源基因花瓣图

Fig. 5 Petal map of homologous genes

注: 花心表示所有菌株都有的 ortholog cluster (即共有基因 core gene), 花瓣表示每个菌株特有的 ortholog cluster (即特有基因 specific gene)。Note: The flower center represented the ortholog cluster shared by all strains (common core gene), and the petal represented the ortholog cluster unique to each strain (specific gene).

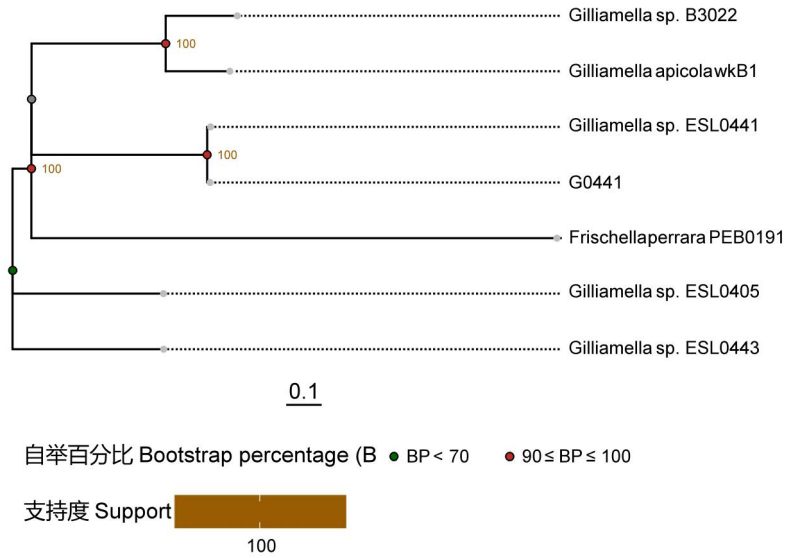


图 6 基于 core 单拷贝基因的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on core single copy genes

注：以 Neighbor-joining 聚类的方式，构建系统进化树。Note: The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-joining clustering method.

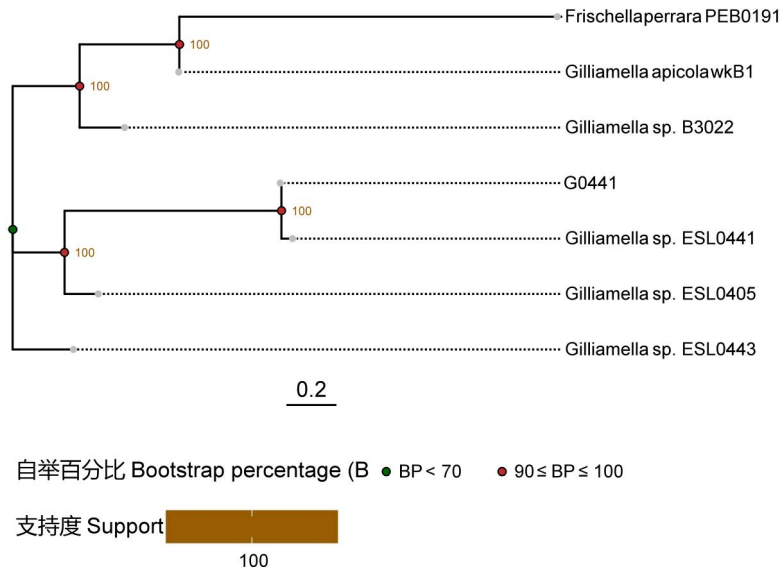


图 7 基于全基因组 SNP 位点的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree based on whole genome SNPs

注：以 Neighbor-joining 聚类的方式构建系统进化树。Note: The phylogenetic tree was constructed using Neighbor-joining clustering.

3 结论与讨论

在蜜蜂肠道内, *Gilliamella* 生长在 *Snodgrassella alvi* 的上方, 这是两种菌株的生长特点, 但是在菌株实际分离和纯化的过程中, 可以从菌株生长条件和菌株特点把这两种菌株区分开来。根据文献 (Kwong and Moran, 2013) 描述, *Snodgrassella alvi* 是微嗜氧物种, 在 5% CO₂ 的条件下获得最适生长, 而在空气中或厌氧条件下无生长或生长非常弱, 而实验室分离的 *Gilliamella* sp. G0441 是在完全厌氧的条件下分离的, 两者的培养条件不一样, 完全厌氧条

件能很大程度上阻止了 *Snodgrassella alvi* 的生长。其次, *Snodgrassella alvi* 在平板上生长 2 d 后形成光滑, 白色, 圆形, 直径约 1 mm 的菌落。而 *Gilliamella* sp. G0441 在平板上生长 2 d 后形成光滑, 半透明, 圆形, 直径约 1 mm 的菌落。因此, 两种菌株的颜色不一样, 肉眼便可区分开来。在实验过程中, 经过 2~3 轮纯化之后, 形成的菌落都是光滑, 半透明, 圆形, 直径约 1 mm 的菌落, 没有发现符合 *Snodgrassella alvi* 特征的菌落。

随着高通量测序技术的发展, DNA 序列分析已成为细菌分类领域不可或缺的一部分。基于 16S rRNA 基因, 已经确定了我们分离到的 G0441 菌株跟 *Gilliamella* sp. ESL0441 (Ellegaard *et al.*, 2020) 的亲缘关系最近, 两菌株的序列相似度 Identities 为 99.86%。对 G0441 菌株进行比较基因组分析, 在菌株水平上 G0441 有 145 个核心基因, 2 983 个附属基因和 7 190 个特有基因。从同源基因 cluster 花瓣图也可以看出, G0441 与 *Gilliamella* sp. ESL0441 和 *Frischella perrara* PEB019 等菌株共有的 orthologs cluster 数目为 145, G0441 特有的 orthologs cluster 数目 221, 以上数据也能够说明 G0441 与 *Gilliamella* sp. ESL0441 不是同一株菌株。

对 G0441 菌株进行基因注释和基因组高级注释, 可以知道 G0441 在功能预测、氨基酸转运与代谢、生物过程、有机系统等功能上的基因占比最高, 说明这几个功能可能是宿主驱动选择的结果。另外在 COG 功能分类注释和 KEGG 功能分类注释中, 可以看到碳水化合物运输和代谢、碳水化合物代谢注释到的基因数目较多, 这些结果一方面与之前的研究结果一致, 即 *Gilliamella* 是降解花蜜和花粉中所含碳水化合物的主要细菌, 来自相同和不同宿主物种的菌株降解碳水化合物的能力不同 (Zheng *et al.*, 2019)。

G0441 菌株含有 T6SS 毒力因子, 对应 1 个效应基因。研究表明许多蜜蜂肠道细菌携带编码高度保守的 T6SS 的基因, 这些基因在与蜜蜂宿主结合时就存在, 并被大多数但不是全部菌株保留。T6SS 损失与宿主和细菌形态有关。研究发现细菌物种采用不同的毒素获取和多样化机制, 并且物种和菌株有时会完全失去 T6SS, 这可能导致这些菌群内竞争动态的变化 (Steele and Moran, 2021)。T6SS 介导的拮抗作用对于蜜蜂肠道中的种内竞争可能很重要, 在蜜蜂肠道中, 相同物种的菌株竞争主导生态位 (Kwong and Engel, 2014), 并且也可能在种间竞争中发挥作用。因此, T6SS 在共同进化菌群之间介导的竞争可能会影响蜜蜂肠道菌群的结构和组成 (Russell *et al.*, 2014; Coyne *et al.*, 2016)。

G0441 菌株耐药的抗生素种类中四环素抗生素和大环内酯类抗生素占比很高。四环素和泰乐菌素 (大环内酯类抗生素) 在几个国家的养蜂业中普遍使用, 抗生素治疗会影响健康蜜蜂宿主的典型肠道微生物群 (Nogradio *et al.*, 2019)。所以并不适合用四环素抗生素和大环内酯类抗生素治疗 G0441 菌株引起的耐药性。

G0441 菌株有糖苷水解酶这种碳水化合物活性酶。研究表明在乳酸菌中发现的许多酶, 例如纤维素酶、半纤维素酶和糖苷水解酶, 可以让蜜蜂更好地利用饮食中的能量 (Lee *et al.*,

2015; Lee *et al.*, 2018)。G0441 菌株也有糖苷水解酶，所以可以推测这株菌株有利于蜜蜂更好的利用饮食中的能量。

转运蛋白在营养物质摄取、代谢产物释放以及信号转导等广泛的细胞活动中起着重要的作用。转运蛋白功能注释显示 G0441 菌株共有 255 个转运蛋白，其中含有 ABC 转运蛋白 84 个。先前的研究表明，ABC 转运蛋白在细菌生物膜的形成中起重要作用 (Vanderlinde *et al.*, 2010; Powell *et al.*, 2016)。可以推测，生物膜的形成可能涉及生态位分化和适应从 G0441 菌株通过基因的变化对齐 ABC 转运体。

G0441 菌株有 556 个跨膜蛋白，占总蛋白的 24.58%，之前的研究已经表明跨膜蛋白在机体的生长、代谢和免疫应答机制中具有很重要的调控功能 (宋寒宾等, 2021)。另外跨膜蛋白与细胞增殖、激活、迁移等多种功能相关，在寄生虫生长发育中起到受体或激素的作用 (吴万军等, 2015)。这可能提示这些跨膜蛋白有助于 G0441 菌株在宿主生长、代谢和免疫应答机制中发挥着重要的调控功能。

G0441 菌株的脂蛋白中，胞浆蛋白的占比最高。先前的研究表明胞浆蛋白缺失会造成 WAS (一种通过 X 染色体传递的性联遗传性疾病)、低 CD8 和 NK 细胞等原发性免疫缺陷病 (黄海等, 1998)，这可能提示 G0441 菌株在治疗原发性免疫缺陷病可以发挥作用。

本研究利用细菌框架图技术建立了 G0441 菌株的数据库，获得了大量的序列信息，对表达的基因进行拼接与分析，与公共数据库的基因与蛋白序列比对，进行相应的基因注释、基因组高级注释和比较基因组分析。该细菌框架图数据为今后更加深入研究 G0441 菌株提供了大量的信息资源，也为以后我们研究蜜蜂肠道微生物 *Gilliamella* 属提供参考。

参考文献 (References)

- Akhter S, Aziz RK, Edwards RA. PhiSpy: A novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity and composition-based strategies [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (16): e126.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, *et al.* Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (17): 3389-3402.
- Anton B, Sergey N, Dmitry A, *et al.* Spades: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*. 2012, 19 (5): 455-477.
- Babendreier D, Joller D, Romeis J, *et al.* Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins [J]. *FEMS Microbiol Ecology*, 2007, 59 (3): 600-610.
- Bland C, Ramsey TL, Sabree F, *et al.* CRISPR recognition tool (CRT): A tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 (1): 209.
- Bottacini F, Milani C, Turrone F, *et al.* *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (9): e44229.
- Corby-Harris V, Snyder LA, Schwan MR, *et al.* Origin and effect of Alpha 2.2 *Acetobacteraceae* in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (24): 7460-7472.
- Coyne MJ, Roelofs KG, Comstock LE. Type VI secretion systems of human gut *Bacteroidales* segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1): 58.
- Dangping L, Hong X, Zhenlan L, *et al.* A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45 (5): 573-577.
- Eddy SR. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference [J]. *International Conference on Genome Informatics*, 2009, 23 (1): 205-211.
- Ellegaard KM, Sunami S, Miyazaki R, *et al.* Vast differences in strain-level diversity in the gut microbiota of two closely related honey bee species [J]. *Current Biology*, 2020, 30 (13): 2520-2531.

- Engel P, Kwong WK, Moran NA. *Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (10): 3646-3651.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (27): 11002-11007.
- Hsiao W, Wan I, Jones SJ, et al. IslandPath: Aiding detection of genomic islands in prokaryotes [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19 (3): 418-420.
- Huang H, Ying DM, Wang YP. Advances in the study of primary immunodeficiency genes with membrane protein and cytoplasmic protein defects [J]. *Foreign Medicine (Immunology)*, 1998, 3: 116-119. [黄海, 应大明, 王耀平. 膜蛋白和胞浆蛋白缺陷的原发性免疫缺陷病基因研究进展 [J]. 国外医学 (免疫学分册), 1998, 3: 116-119]
- Kešnerová L, Moritz R, Engel P. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class *Alphaproteobacteria* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66 (1): 414-421.
- Kwong WK, Engel P, Koch H, et al. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111 (31): 11509-11514.
- Kwong WK, Moran NA. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: Description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Neisseriaceae* of the *Betaproteobacteria*, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of *Orbaceae* fam. nov., *Orbales* ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the *Gammaproteobacteria* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (6): 2008-2018.
- Kwong WK, Steele MI, Moran NA. Genome Sequences of *Apibacter* spp., Gut symbionts of Asian honey bees [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2018, 10 (4): 1174-1179.
- Lee FJ, Miller KI, McKinlay JB, et al. Differential carbohydrate utilization and organic acid production by honey bee symbionts [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94 (8): 113.
- Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, et al. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17 (3): 796-815.
- Li Y, Leonard SP, Powell JE, et al. Species divergence in gut-restricted bacteria of social bees [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119 (18): e2115013119-e2115013119.
- Marten B, Walter P. Toward almost closed genomes with GapFiller [J]. *Genome Biology*, 2012, 13 (6): R56.
- Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, et al. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees [J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20 (3): 619-628.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (8): 2830-2840.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, et al. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: 182-185.
- Nogrado K, Lee S, Chon K, et al. Effect of transient exposure to carbaryl wettable powder on the gut microbial community of honey bees [J]. *Applied Biological Chemistry*, 2019, 62 (1): 1-8.
- Pazda M, Kumirska J, Stepnowski P, et al. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems-a review [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 697: 134023.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8 (10): 785-786.
- Powell JE, Leonard SP, Kwong WK, et al. Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (48): 13887-13892.
- Praet J, Cnockaert M, Meeus I, et al. *Gilliamella intestini* sp. nov., *Gilliamella bombicola* sp. nov., *Gilliamella bombi* sp. nov. and *Gilliamella mensalis* sp. nov.: Four novel *Gilliamella* species isolated from the bumblebee gut [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2017, 40 (4): 199-204.
- Russell AB, Wexler AG, Harding BN, et al. A type VI secretion-related pathway in bacteroidetes mediates interbacterial antagonism [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16 (4): 227-236.
- Scardovi V, Trovatielli LD. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. a contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium* [J]. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg*, 1969, 123 (1): 64-88.
- Song HB, Wang H, Liu M, et al. Transmembrane protein 16A promotes the proliferation of breast cancer cells through activation of epidermal growth factor receptor signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2021, 37 (7): 832-836. [宋寒宾, 王慧, 刘美等. 跨膜蛋白 16A 通过激活表皮生长因子受体信号通路促进乳腺癌细胞增殖的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (7): 832-836]
- Steele MI, Moran NA. Evolution of interbacterial antagonism in bee gut microbiota reflects host and symbiont diversification [J]. *Msystems*, 2021, 6 (3): 11.

- Steffen M, Michael DRC, Rolf A. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17 (7): 646-653.
- Stein K, Coulibaly D, Stenchly K, *et al.* Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 17691.
- Torsten S. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (14): 2068-2069.
- Vanderlinde EM, Harrison JJ, Muszyński A, *et al.* Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71 (3): 327-340.
- Wang X, Zhang X, Zhang Z, *et al.* Honey bee as a model organism to study gut microbiota and diseases [J]. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2018, 28: 35-42.
- Wu WJ, Li CX, Chen JJ, *et al.* Bioinformatics analysis and seamless cloning of *Schistosoma japonicum* genes coding signal peptide and trans membrane domain [J]. *Journal of Hubei Medical University*, 2015, 34 (1): 5-11, 15. [吴万军, 李彩霞, 陈晶晶, 等. 日本血吸虫外分泌蛋白、跨膜蛋白基因筛选与无缝克隆 [J]. 湖北医药学院学报, 2015, 34 (1): 5-11, 15]
- Xu J, Su Z, Ding Q, *et al.* Inhibition of proliferation by knockdown of transmembrane (TMEM) 168 in glioblastoma cells via suppression of Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncology Research*, 2019, 27 (7): 819-826.
- Xu ZM, Long LY. On the status and function of *Apis Cerana* in our country's beekeeping production [J]. *Apiculture of China*, 2019, 70 (2): 63-65. [徐祖荫, 龙立炎. 论中蜂在我国养蜂生产中的地位和作用 [J]. 中国蜂业, 2019, 70 (2): 63-65]
- Yun JH, Roh SW, Whon TW, *et al.* Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (17): 5254-5264.
- Zhang ZJ, Huang MF, Qiu LF, *et al.* Diversity and functional analysis of Chinese bumblebee gut microbiota reveal the metabolic niche and antibiotic resistance variation of *Gilliamella* [J]. *Insect science*, 2020, 28 (2): 302-314.
- Zhang ZY, Guo YL, Yang F, *et al.* Pan-Genome analysis reveals functional divergences in gut-restricted *Gilliamella* and *Snodgrassella* [J]. *Bioengineering*, 2022, 9 (10): 544-544.
- Zhao YB, Wu JY, Yang JH, *et al.* PGAP: Pan-genomes analysis pipeline [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2012, 28 (3): 416-418.
- Zheng H, Nishida A, Kwong WK, *et al.* Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola* [J]. *mBio*, 2016, 7 (6): e01326-16.
- Zheng H, Perreau J, Powell JE, *et al.* Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116 (51): 25909-25916.