

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052009

蜂起群泳——基因表現及溫度的關係

學校名稱：國立宜蘭高級中學

作者： 高二 周彩萱 高二 楊天玉 高二 陳燕純	指導老師： 馮淑卿
---	------------------

關鍵詞：MyD88、SR22、溫度

摘要

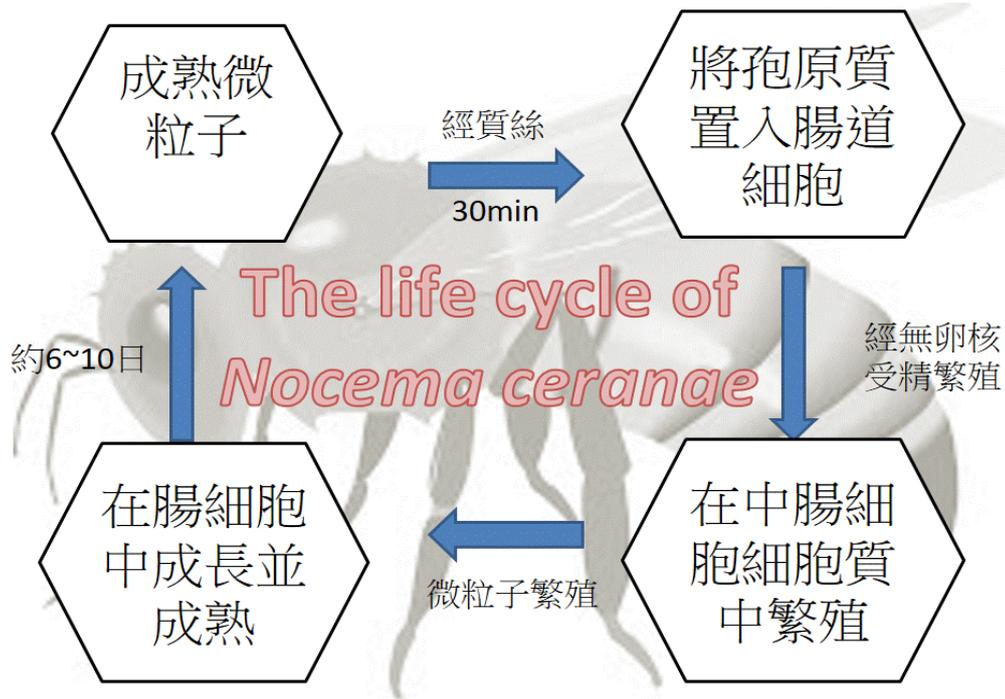
文獻顯示隨著氣溫變化，蜜蜂 (*Apis mellifera*) 感染真菌性病原 (東方蜂微粒子, *Nosema ceranae*) 後，會影響體內的微粒子數量 (Chen et al., 2012)；因此我們以「溫度」為主軸，用人工餵食東方蜂微粒子的方式進行感染，以探討溫度對死亡率及免疫基因 (*MyD88*) 和病原基因 (*SR22*) 之間的對應關係。我們採用三種溫度測試，發現在 35°C 下，即使感染後之微粒子量最高，其死亡率始終很低；且 *SR22* 基因的表現顯著，顯示 *SR22* 的表現與感染後的微粒子數有強烈關係。在測試的溫度下，*MyD88* 的基因在受感染後第六小時就開始表現明顯，表示寄主很早就啟動免疫反應，且 15°C、25°C 的 *MyD88* 及 *SR22* 的表現成反比趨勢。我們由基因表現的證據推測病原感染與寄主免疫途徑表現兩者與環境溫度極有關聯。

壹、研究動機

從咖啡到可可、杏仁到藍莓，這些全世界最營養與具經濟價值的重要作物，全都仰賴蜜蜂授粉以維持生命週期，蜜蜂為農作物生產扮演傳媒的重要角色，是生態系中重要的傳粉者。若沒有蜜蜂對農作物授粉，我們可能面臨全球糧食大量短缺、食物價格上揚、陷入飢荒等恐怖的未來。近幾年來，全球氣候異常，對於嚴苛要求生存環境的蜜蜂來說，極端的氣候可能造成蜜蜂大量死亡。而最主要授粉者的死亡，必然會間接影響人類各種活動，甚至導致人類滅亡。由於我們對這個議題有很大的興趣，於是蒐集一些文獻，文獻中提到蜜蜂的免疫基因表現和昆蟲感染微粒子後的死亡率有關，也指出微粒子數量和溫度氣候有關。因此，與老師深入討論後，並從教授那裏知曉一個與蜜蜂死亡率有很大關聯性的基因——*SR22* (蕭, 2013)，於是我們朝這個方向進行更深入的研究，探討 *SR22* 與蜜蜂感染微粒子後相關的問題。

此外，*MyD88* 是某些昆蟲在感染真菌性病原後所引發的 *Toll* 免疫路徑中的細胞內重要的調節基因，此基因的表現在麵包蟲接受真菌性病原感染後，產生抗菌肽的能力有關 (Yang et al., 2017)。因此，有關 *MyD88* 的研究像雨後春筍般逐漸湧現，所以我們想藉由一些實驗，探討有關蜜蜂的適宜生存溫度、時間和基因表現 (*SR22*、*MyD88*) 與死亡率等四個變項之間的關係。

下圖顯示微粒子進入宿主內的生命週期



貳、研究目的

- 一、不同培養溫度對於蜜蜂中腸微粒子數目的影響
- 二、溫度對蜜蜂的致死率之影響與天數之關係
- 三、*SR22* 表現量與溫度和死亡率的關聯
- 四、在感染微粒子後，在不同溫度的培養下，蜜蜂免疫相關基因 (*MyD88*) 與病原基因 (*SR22*) 基因表現的關聯

參、研究設備及器材

- 一、糖水 (250kg 砂糖 + 250ml 一次水)
- 二、培育箱 (15°C、25°C 及 35°C)
- 三、布丁盒
- 四、去針針筒
- 五、微量吸管
- 六、光學顯微鏡
- 七、研磨棒
- 八、分光光度計 (測 OD 值)

九、離心機

十、西洋蜂 *A. mellifera* (初羽化及成蜂)

十一、 RT-PCR 機

十二、 紫外線攝影機

十三、 電泳槽



培養箱內部



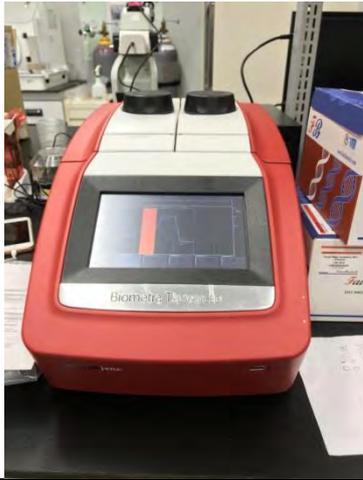
光學顯微鏡



分光光度計



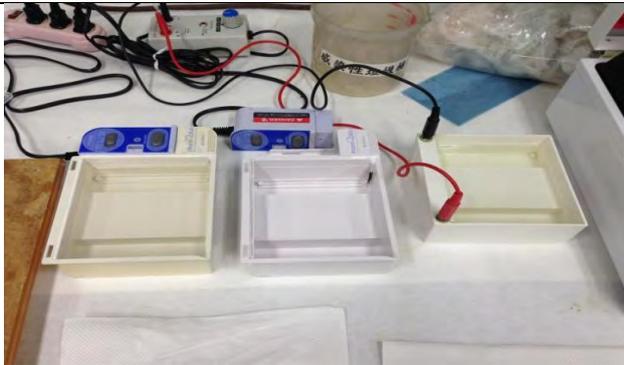
離心機



RT-PCR 機



紫外線攝影機



電泳槽



布丁盒

肆、研究過程或方法

一、檢測不同溫度對初羽化蜜蜂之死亡率影響

- (一) 從蜂箱中取出一片巢片抖掉成蜂後置入 35°C 保溫箱中一日
- (二) 用人工餵食的方式讓感染組的每隻蜜蜂吃下 1×10^5 個微粒子
- (三) 於每個飼養盒中裝入 30 隻初羽化蜜蜂，並以裝有 50% 糖水的針筒（剪去前端）飼養，每一盒分別放入 15°C 冰箱、25°C 室溫、35°C 保溫箱六日
- (四) 每日記錄各組死亡率
- (五) 本實驗進行三重複



二、檢測不同溫度對初羽化蜜蜂中腸微粒子數之影響

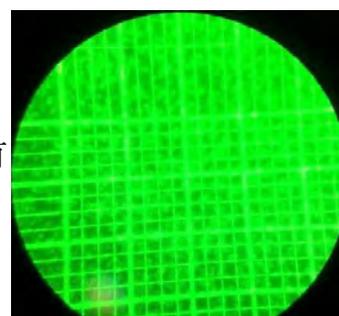
- (一) 步驟同一之（一）、（二）
- (二) 每兩日取 5 隻初羽化蜜蜂之中腸

- (三) 每盒各取 3 隻蜜蜂，以鑷子夾住尾端拉出腸道並取其中腸，放入一個離心管中，加入 200 μl 的 ddH₂O 並且用研磨器搗碎
- (四) 過濾後於新的離心管內加入 500 μl 的 ddH₂O 以 3000xg，4°C 離心 10 分鐘後倒除上清液並再次離心 10 分鐘
- (五) 倒除上清液後加入 500 μl 的 ddH₂O 用震盪器混勻
- (六) 取樣品 100 μl 和 900 μl ddH₂O 混合（10 倍稀釋）
- (七) 吸取 10 μl 稀釋之樣品注入血球計數器和蓋玻片的縫隙中，放大 200 倍觀察微粒子數

孢子數計算方法：兩次測定之平均/80*400*10000*稀釋倍數

(10)*0.5

備註：除以 80 是計算每小格平均微粒子數；乘以 400 是因為共有 400 小格；而乘以 10000 是除以小方格的體積(10⁻⁴cm³)；最後乘以 0.5 是因管內加入 0.5ml 的 ddH₂O



- (八) 本實驗進行三重複

三、確認 *SR22* 表現量與溫度的關聯及蜜蜂免疫相關基因 (*MyD88*) 表現量與溫度的關聯

(一) 萃取 RNA

1. 步驟同一之 (一)、(二)
2. 每盒各取 5 隻蜜蜂，以鑷子夾住尾端拉出腸道並取其中腸，放入一個離心管中，加入 200 μl 的 ddH₂O 和 500 μl 的 TRIzol 並且用研磨器搗碎
3. 取 500 μl 的 Sample
4. 加入 200 μl 的氯仿，震盪混和 15 秒後放置 2~3 分鐘
5. 離心 12000xg(15 分鐘、4°C)，吸取上清液，放入新的離心管
6. 加等體積 Isopropanol (IPA)，搖晃均勻
7. 放入冰箱 30 分鐘 (-20°C)
8. 離心 12000xg (10 分鐘、4°C) 後倒除上清液，輕壓面紙，吸取多餘 IPA
9. 沿管壁加入 700 μl 已預冷-20°C 的酒精 (70%)，離心 12000xg (5 分鐘、4°C)
10. 倒除上清液，輕壓面紙，吸取多餘的酒精
11. 重複 (九)、(十)
12. 以小刻度的微量吸管吸取多餘水分，放入抽風機內風乾 1~2 分鐘
13. 加入 20 μl 的 ddH₂O，並放入乾浴機中 (60°C、10 分鐘) 回溶

(二) 測 OD 值 (校正濃度)

1. 稀釋 Sample 為 1/10 後再加入 20 μ l 的 ddH₂O
2. 用 ddH₂O 將分光光度計偵測部位洗淨並校準
3. 每一 Sample 吸取 2 μ l 放入分光光度機中
4. 測量完畢紀錄數據並將偵測部位用 ddH₂O 洗淨並擦拭
5. 重複 (三)、(四) 直到測量結束
6. 依照每個 Sample 吸光度的不同，加入 ddH₂O 及 Sample 使其濃度相同且總體積為 11 μ l

(三) 將 RNA 轉 cDNA

1. 放入 4 μ l ddH₂O 至已裝 11 μ l Sample 的離心管
2. 放入 1 μ l 的 iScript Reverse Transcriptase 和 4 μ l 的 iScript Reaction Mix
3. 將 Sample 分別置入機器，設定 RT-PCR 機至 cDNA-程式

(四) RT-PCR

1. 拿一離心管放將 ddH₂O 和 primer(R+F)和 Green Master PCR Mix 以 7 : 2 : 10 的比例放入 (一組為 19 μ l 且 primer 分別為 β -actin Hb18 SR22 及 MyD88)
2. 從離心管吸取已混合好的液體 19 μ l 放入已放入 1 μ l Sample 的離心管
3. 將 Sample 分別置入機器，設定 PT-PCR 機至 Nosema 程式

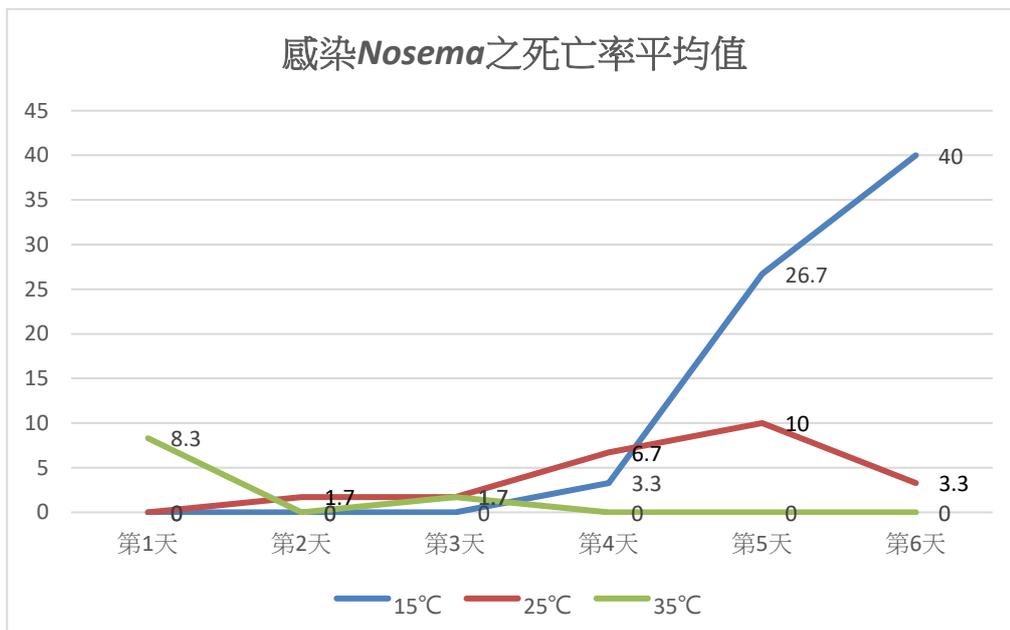
(五) 製膠、電泳

1. 取 1g Agarose 放入錐形瓶並加入 50ml TAE 和 4 μ l 的 EtBr
2. 封上保鮮膜後戳洞並放入微波爐微波
3. 每 10 秒打開微波爐拿出錐形瓶搖晃後放回微波爐繼續微波，動作重複到直到液體沸騰兩次
4. 將液體倒入製膠台，用 tip 將氣泡壓出及挑出後放入齒梳
5. 等待 20 分鐘等其凝固後取出放入電泳槽
6. 第一排放入 8 μ l 的 marker，之後的 Sample 每排放入 4 μ l
7. 待 Sample 全數放入後將電泳槽接上電源，開始進行電泳 (23 分鐘)
8. 時間到後取出膠片放入紫外線攝影箱後拍照

伍、研究成果

一、感染 *N. ceranae* 與否對死亡率與天數的影響

兩次平均						
	感染死亡數			未感染死亡數		
溫度	15°C	25°C	35°C	15°C	25°C	35°C
第 1 天	0	0	2.5	0	0	0.5
第 2 天	0	0.5	0	0	0.5	0
第 3 天	0	0.5	0.5	0	2	0.5
第 4 天	1	2	0	1.5	1	0
第 5 天	8	3	0	7.5	5	0
第 6 天	12	1	0	13	1	0.5



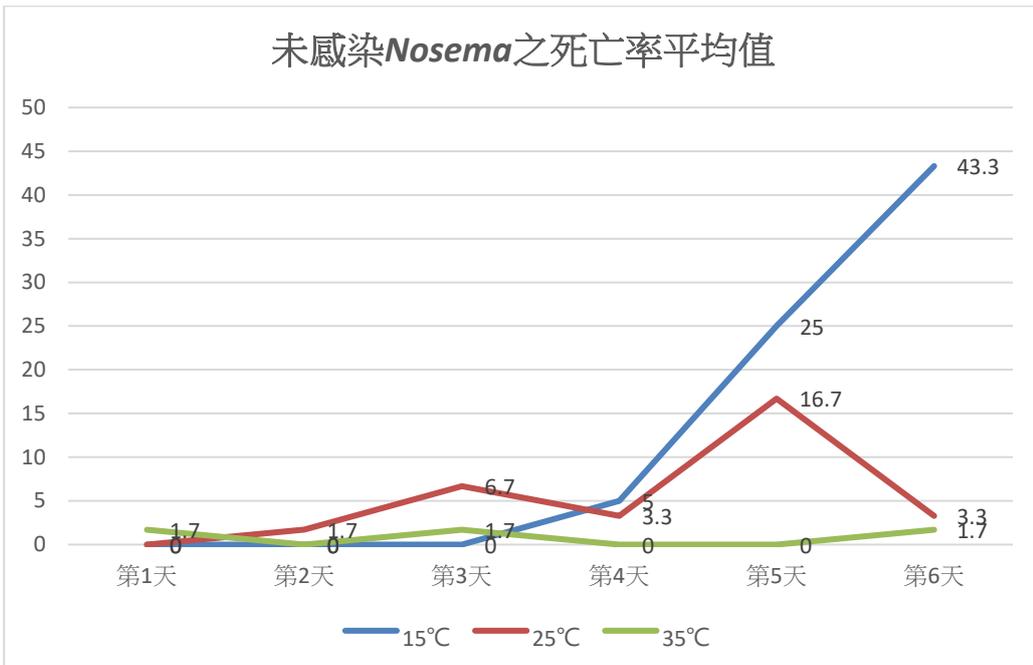
感染 *Nosema ceranae* 之死亡率：

15°C的死亡率都約在第四天及第五天開始攀升，到第六天大量死亡

25°C的死亡率在第三天開始微微上升，但第六天死亡率仍比 15°C 低許多

35°C的死亡率偏低，大致維持穩定狀態

未感染*Nosema*之死亡率平均值



未感染 *Nosema ceranae* 之死亡率：

15°C的死亡率都約在第五天開始攀升，到第六天大量死亡

25°C的第六天死亡率比 15°C低許多

35°C的死亡率比感染 *Nosema ceranae* 的更低，幾乎無上升趨勢

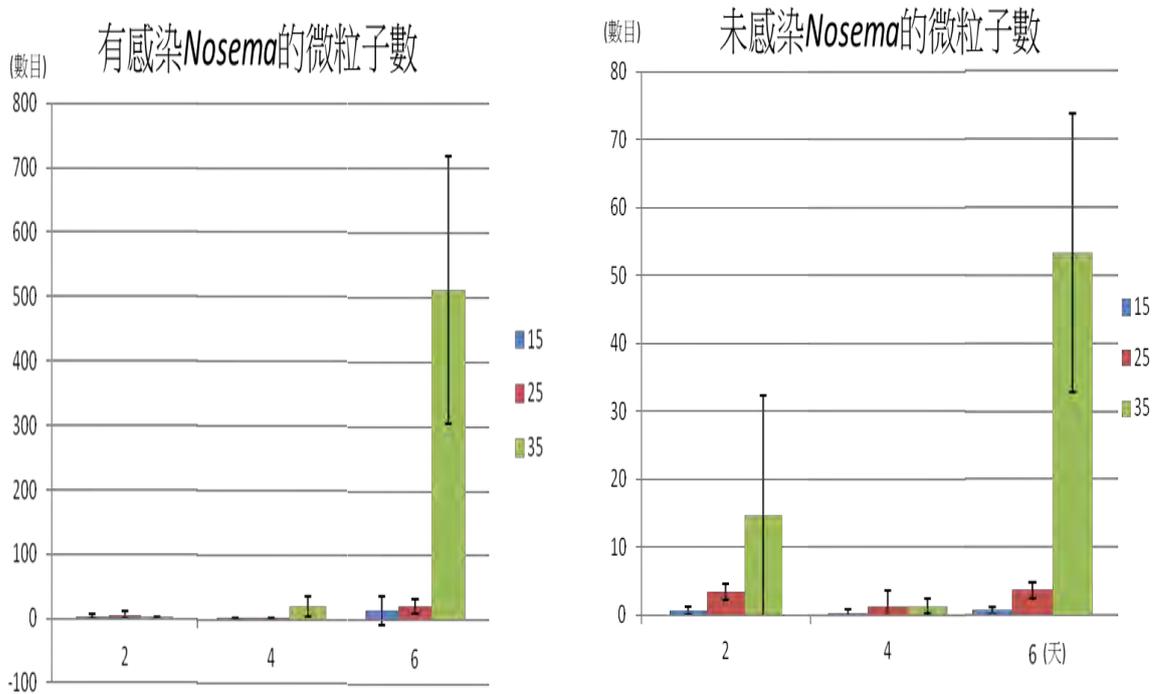
註：數據為兩次(第二次、第三次)實驗之平均之累計

二、感染 *Nosema ceranae* 與否對東方蜂中腸微粒子數目與天數的關係

三次實驗微粒子數平均								
第 2 天			第 4 天			第 6 天		
Nosema	15°C	3.3	Nosema	15°C	5.3	Nosema	15°C	2
	25°C	1.3		25°C	2.3		25°C	20
	35°C	14.6		35°C	14		35°C	513.6
未感染	15°C	0.3	未感染	15°C	3.3	未感染	15°C	14.6
	25°C	0.3		25°C	1.3		25°C	1.3
	35°C	0.6		35°C	3.6		35°C	53.3

註：1. 本次微粒子數濃度已稀釋為 1/10 倍

2. 數據為三次實驗之平均之累計，三次重平均值與標準差表示

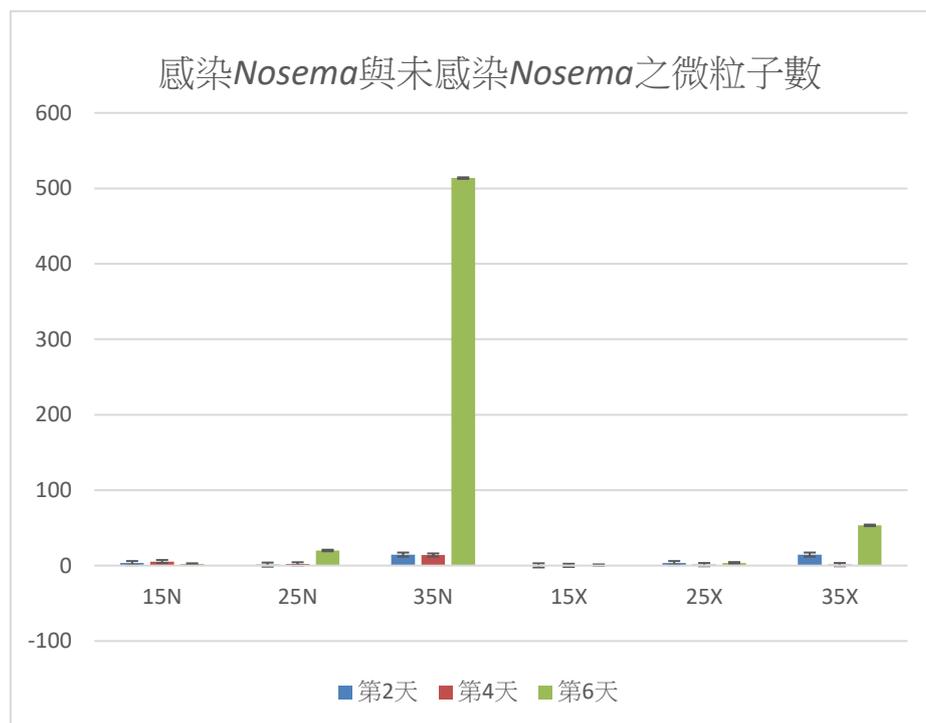


註：上方兩圖的縱坐標為數量，橫坐標為天數

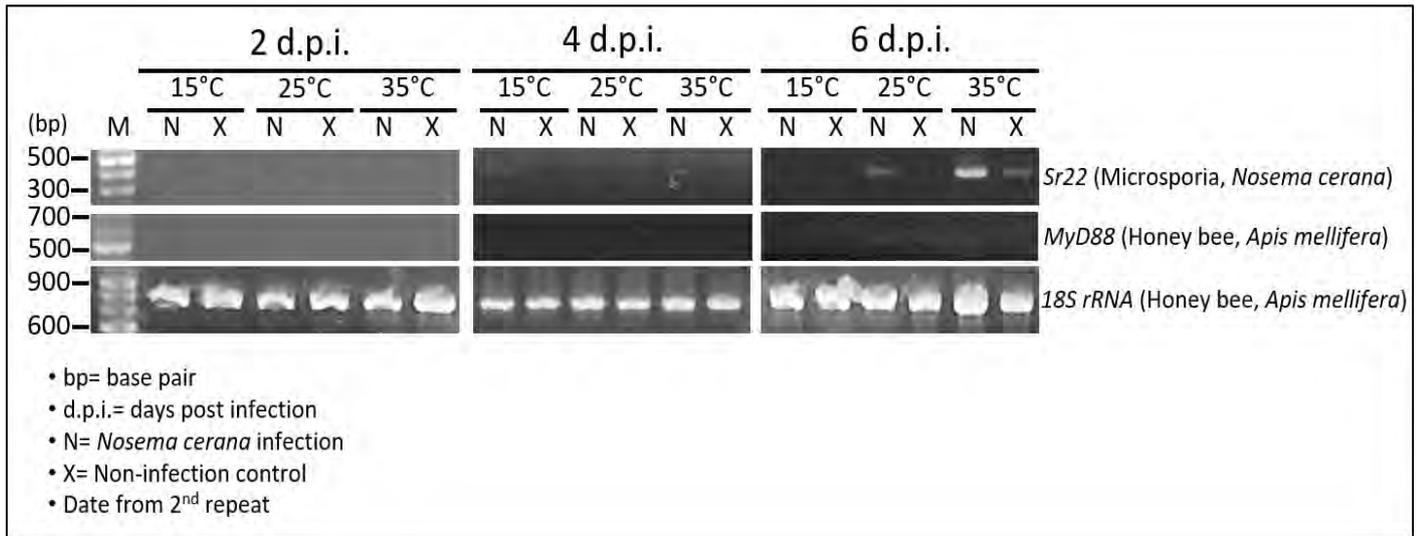
在 15°C 和 25°C 的環境下培養，各天數所偵測的微粒子數差異不大

35°C 在第二天就多於其他兩個溫度，第四天數量增加，第六天明顯暴增許多

特別注意到的是，在 35°C 第六天感染 *N. ceranae* 之微粒子數是未感染 *N. ceranae* 之微粒子數的約十倍，而且感染 *N. ceranae* 的所有實驗數據到第六天都有觀測到微粒子，因此可以確定有感染成功



三、不同溫度與天數下，免疫基因表現的電泳結果

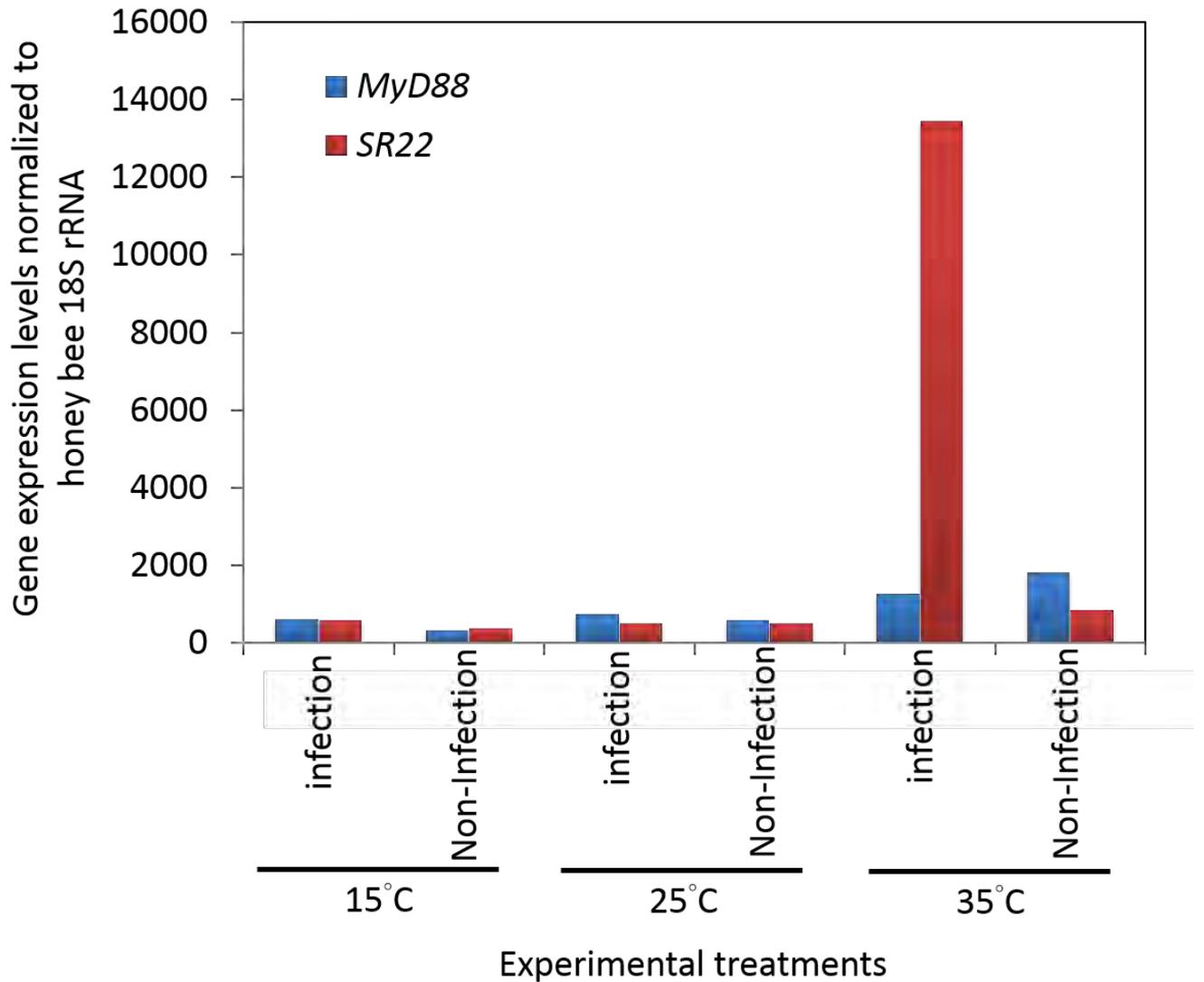


由第六天的25度與35度的基因表現結果顯示，25度的感染實驗可發現 當蜜蜂免疫基因（*MyD88*）表現量較強時，微粒子基因（*Sr22*）表現較弱。

而 35度的感染實驗顯示，微粒子基因（*Sr22*）表現上升，而此時蜜蜂免疫基因（*MyD88*）表現量減弱，這可能是因為病原戰勝寄主免疫系統而對免疫系統上游基因有抑制影響。

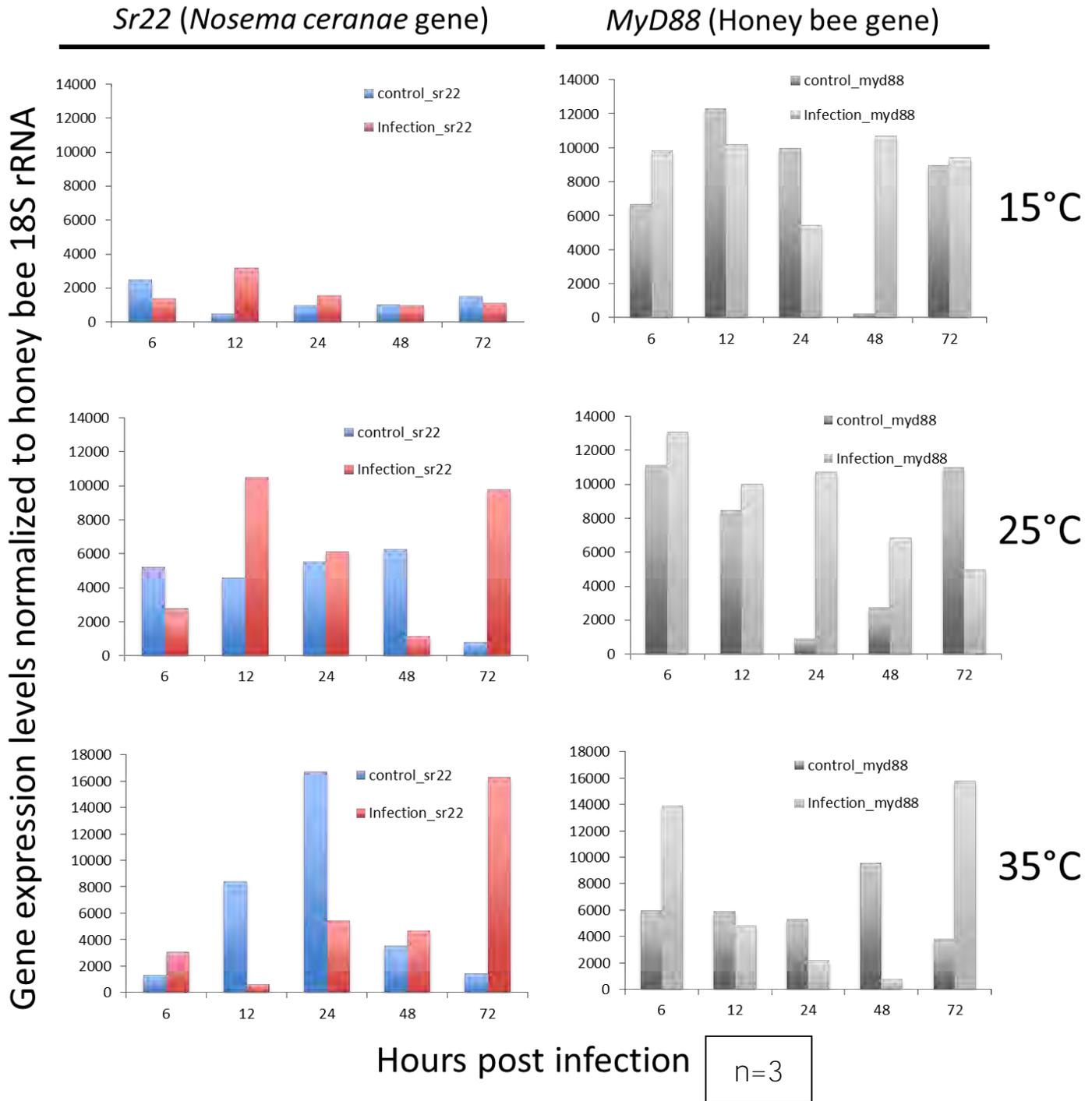
同時我們也發現在35度時，微粒子數量上升至最多。

四、第六天電泳圖定量結果:



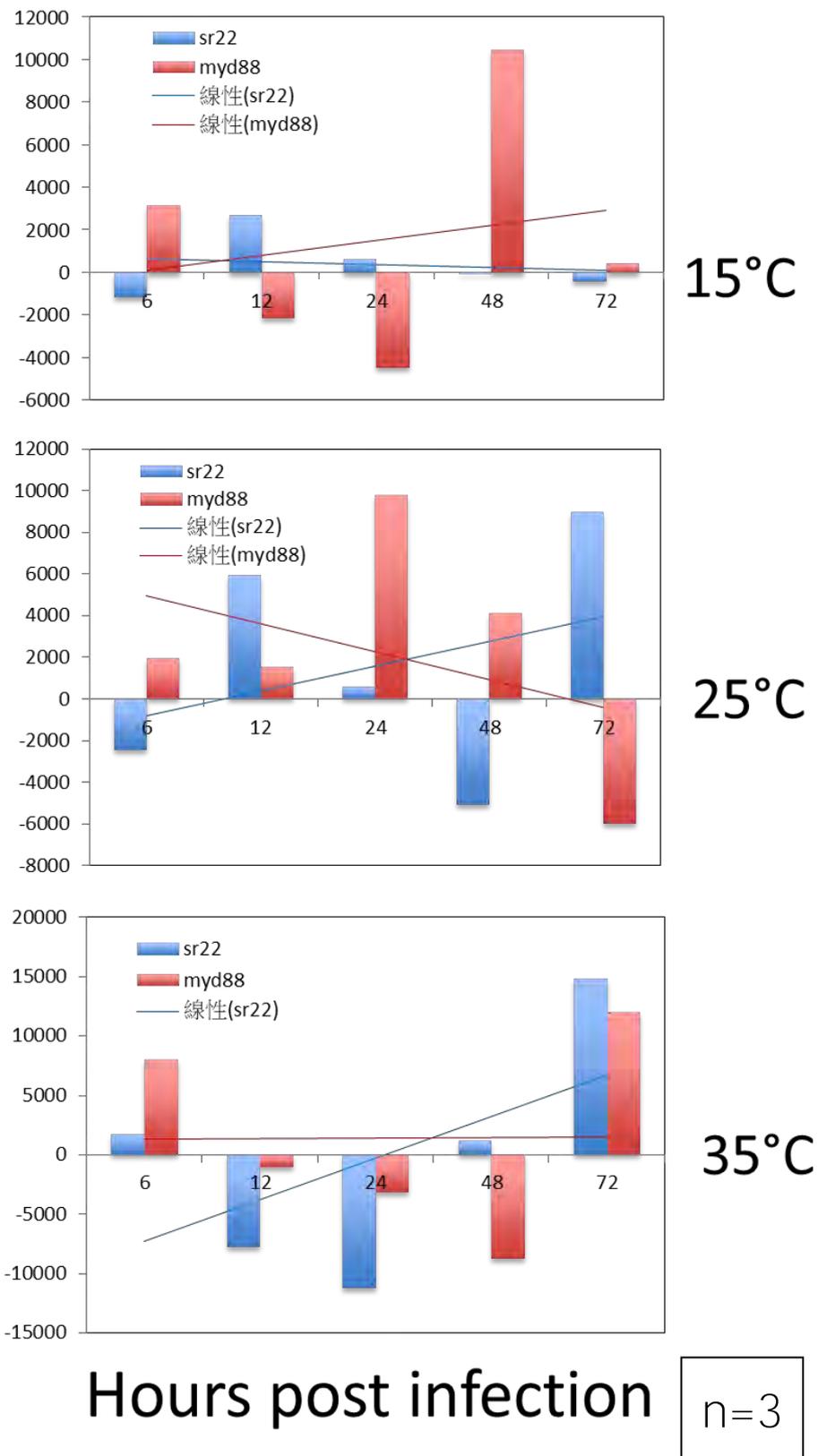
由第六天的電泳結果顯示，在 15°C 和 25°C 的狀態下，蜜蜂免疫基因 *MyD88* 和東方蜂微粒子特有基因 *SR22* 的表現量都偏低;在 35°C 時，兩者的基因表現都非常顯著，尤其是 *SR22*。而 *MyD88* 在 35°C 時未感染的部分比有感染的表現明顯，推測此時寄主免疫力已開始衰弱。

五、不同溫度與時間（小時），免疫基因表現的電泳分析結果



由基因表現分析的結果顯示，無論是在哪種溫度下，蜜蜂免疫基因 (*MyD88*) 在受感染後第六小時就開始表現明顯，雖然基因表現有些變動，但基本上是穩定的。而微粒子特有基因 *Sr22* 在 15°C 表現微弱，在 25°C 或 35°C 時才表現逐漸明顯。

Difference of gene expression levels between control and infection trials



從基因表現分析的結果顯示可以發現，15°C、25°C 的蜜蜂免疫基因 (*MyD88*) 及微粒子基因 (*SR22*) 表現呈反比趨勢，推測可能是因為寄生共演化機制，微粒子基因 (*SR22*) 抑制了蜜蜂免疫基因 (*MyD88*)。而在 35°C 時蜜蜂免疫基因 (*MyD88*) 是穩定的，此溫度與蜂巢內的溫度相同。

陸、討論

- 一、由實驗得知，不同批的蜜蜂，在同樣的溫度處理下，也有可能產生極具差異的死亡數，這其中可能牽涉到很多環境因子值得再探討。
- 二、在感染微粒子後第六天時，*SR22* 基因表現在 35°C 表現量較高，此時微粒子數偏多，死亡率仍然偏低，推論微粒子可能在六天前即可能啟動絕對寄生病原的保護機制（寄生共演化），反而會讓寄主暫時延緩死亡。由後續的實驗發現，在感染後六個小時，25°C 或 35°C 時 *SR22* 表現逐漸明顯，同樣的情況下，蜜蜂免疫基因（*MyD88*）也於受感染後第六小時開始表現明顯，且二者表現互有消長，此現象更驗證寄生共演化的存在。另外，或許可以延長觀測的時間，找出 *SR22* 基因表現與降低蜜蜂死亡率之間的可能原因。
- 三、*MyD88* 在其他文獻中已被證實會誘發 *Abaecin*、*Hymenoptaecin*、*Defensin1*、*Defensin2* 等下游基因，而這些基因的表現和昆蟲產生抗菌肽的能力有關，在本研究中，25°C 環境下，*MyD88* 於第六天基因表現明顯且死亡率沒有上升許多，推測可能跟此溫度下游基因表現有關。
- 四、由兩篇文獻可知（Ryan S. et al., 2013; Yang et al., 2016），*MyD88* 在蜜蜂或麵包蟲受微粒子或其他真菌病原感染後六小時即可測得表現，直到 72 小時仍能偵測出來，可見其為早期基因。而第六天的時間狀態已屬後期，故由第六天的電泳圖定量表現結果顯示，*MyD88* 在 35°C 時未感染的部分比有感染的表現明顯，推測此時寄主免疫力已開始衰弱。
- 五、感染後六個小時開始，蜜蜂免疫基因（*MyD88*）在 35°C 時的表現是穩定的，此溫度恰與蜂巢內的溫度相同，此時蜜蜂的活動力也最強，由此可知，35°C 是比較適合蜜蜂生存的溫度。
- 六、由第六天的電泳圖定量表現結果顯示，在 35°C 時 *SR22* 的表現非常明顯，基因的表現並不等於微粒子數量或複製量的多寡，因為在潛伏感染狀態下的 meront(裂殖體)，也會被同時偵測到很多 DNA，但都沒看到成熟的微粒子，而真正會產生嚴重病徵的過程，應該是變成成熟微粒子破細胞而出的時候。

柒、結論

- 一、由死亡率結果顯示，35°C 的死亡率都是低而穩定，所以 35°C 是培養蜜蜂的最適溫度而 15°C 的死亡率在第四到五天會大幅提升，與蜜蜂的全球地理分布模式是相符合的。

- 二、由溫度與微粒子數量關係的結果顯示，相較其他二種溫度，35°C 的微粒子數偏多，並且在第六天大幅成長。
- 三、我們所觀察到的電泳結果都是在第六天最明顯，表示需要時間讓基因表現顯著。
- 四、*SR22* 的電泳表現結果與感染微粒子後成熟孢子的數目符合相關性，推論 *SR22* 在蜜蜂被感染微粒子後的免疫過程扮演重要角色。
- 五、在 25°C 情況下，*MyD88* 第六天開始表現顯著，且死亡率介於 15°C 和 35°C 之間，表示 *MyD88* 表現是可以延緩死亡發生的。
- 六、感染後基因的表現於較短的觀測時間下顯示，15°C、25°C 的 *MyD88* 及 *SR22* 表現成反比趨勢，而在 35°C 時 *MyD88* 是穩定的，與蜂巢內的溫度相同，由此可推測病原感染與寄主免疫途徑表現兩者與環境溫度極有關聯。

捌、未來展望

- 一、延長觀測的時間天數，以找出 *SR22* 基因表現與降低蜜蜂死亡率之間的可能原因。
- 二、探討 25°C 環境下，延長觀測的時間天數，*MyD88* 基因表現的後續發展及與蜜蜂死亡率之間的關係。
- 三、加入 *GNBP3* 基因表現的探討以了解其與 *SR22* 的基因表現之關聯。
- 四、探討 *Abaecin*、*Hymenoptaecin*、*Defensin1*、*Defensin2* 等 *MyD88* 下游的基因表現與溫度之關聯性。
- 五、可以再設計一組溫差實驗看其中溫差對蜜蜂死亡率及感染率的關係。

玖、參考資料

- 一、Ryan S. Schwarz, (2013), *Developmental and Comparative Immunology* 40 300-31
- 二、Y. T. Yang et al. , (2017) ,*Tenebrio molitor* Gram-negative-binding protein 3(*TmGNBP3*) is essential for inducing downstream antifungal *Tenecin 1* gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007, *Insect Science* 00, 1-9, DOI 10.1111/1744-7917.12482
- 三、Yue-Wen Chen a, (2012), *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature,Wei-Ping Chung a, *Journal of Invertebrate Pathology* 111 264-267
- 四、Yu-His Hsiao , (2013)國立台灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系碩士論文__微粒子特有基因 *SR22* 應用於蜜蜂微粒子病之診斷。
- 五、2016, 第十六屆旺宏科學獎 創意說明書 SA16-063

【評語】 052009

本計畫利用人工餵食東方蜂微粒子的方式進行感染蜜蜂，探討蜜蜂免疫基因 MyD88 的表現，及病原基因 SR22 的表現，發現二者呈反比現象。以三種溫度測試於 35°C 下感染東方風微粒子之真菌性病原最高，但死亡率低，而 SR22 基因表現顯著於感染後第六小時有表現，表示很早就啟動免疫反應。本研究有助於了解基因表現與病原感染及產生免疫反應與溫度有相關性。然實驗圖表應更清楚說明，同學似乎對於實驗原理和實驗方法未能深入了解。基因的表現高低，並不見得跟 phenotype 有關，影響 phenotype 的原因，應該有許多蛋白質的參與。此外，溫度的高低會影響不同基因的表現。同學們藉由溫度及病原對蜜蜂的影響作為研究題材相當新穎，但如文中所述，此實驗可能還牽涉許多因子是沒有被考慮到的，設計實驗上還有許多進步的空間。

壹、摘要

文獻顯示隨著氣溫變化，蜜蜂 (*Apis mellifera*) 感染真菌性病原 (東方蜂微粒子, *Nosema ceranae*) 後，會影響體內的微粒子數量 (Chen et al., 2012)；因此我們以「溫度」為主軸，用人工餵食東方蜂微粒子的方式進行感染，以探討溫度對死亡率及免疫基因 (*MyD88*) 和病原基因 (*SR22*) 之間的對應關係。我們採用三種溫度測試，發現在 35°C 下，即使感染後之微粒子量最高，其死亡率始終很低；且 *SR22* 基因的表現顯著，顯示 *SR22* 的表現與感染後的微粒子數有強烈關係：在測試的溫度下，*MyD88* 的基因在受感染後第六小時就開始表現明顯，表示寄主很早就啟動免疫反應，且 15°C、25°C 的 *MyD88* 及 *SR22* 的表現成反比趨勢。我們由基因表現的證據推測病原感染與寄主免疫途徑表現兩者與環境溫度極有關聯。

貳、研究動機

從咖啡到可可、杏仁到藍莓，這些全世界最營養與具經濟價值的重要作物，全都仰賴蜜蜂授粉以維持生命週期，蜜蜂為農作物生產扮演傳媒的重要角色，是生態系中重要的傳粉者。若沒有蜜蜂對農作物授粉，我們可能面臨全球糧食大量短缺、食物價格上揚、陷入飢荒等恐怖的未來。近幾年來，全球氣候異常，對於嚴苛要求生存環境的蜜蜂來說，極端的氣候可能造成蜜蜂大量死亡。而最主要授粉者的死亡，必然會間接影響人類各種活動，甚至導致人類滅亡。由於我們對這個議題有很大的興趣，於是蒐集一些文獻，文獻中提到蜜蜂的免疫基因表現和昆蟲感染微粒子後的死亡率有關，也指出微粒子數量和溫度氣候有關。因此，與老師深入討論後，並從教授那裏知曉一個與蜜蜂死亡率有很大關聯性的基因——*SR22* (蕭, 2013)，於是我們朝這個方向進行更深入的研究，探討 *SR22* 與蜜蜂感染微粒子後相關的問題。

此外，*MyD88* 是某些昆蟲在感染真菌性病原後所引發的 *Toll* 免疫路徑中的細胞內重要的調節基因，此基因的表現在麵包蟲接受真菌性病原感染後，產生抗菌肽的能力有關 (Yang et al., 2017)。因此，有關 *MyD88* 的研究像雨後春筍般逐漸湧現，所以我們想藉由一些實驗，探討有關蜜蜂的適宜生存溫度、時間和基因表現 (*SR22*、*MyD88*) 與死亡率等四個變項之間的關係。

右圖顯示微粒子進入宿主內的生命週期



參、研究目的

- 不同培養溫度對於蜜蜂中腸微粒子數目的影響
- 溫度對蜜蜂的致死率之影響與天數之關係
- *SR22* 表現量與溫度和死亡率的關聯
- 蜜蜂免疫相關基因 (*MyD88*) 表現量與溫度的關聯，且進一步探討與 *SR22* 基因表現的關聯性以及和微粒子感染之間的關係

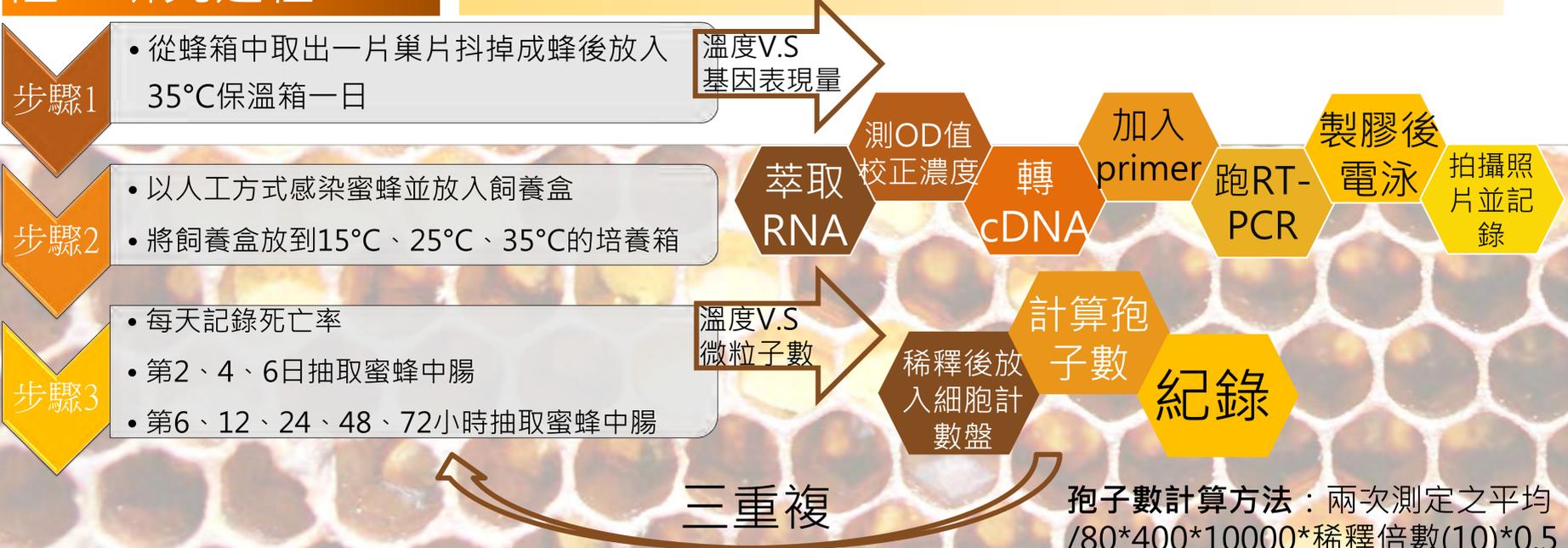
肆、研究器材

- 糖水 (250kg 砂糖 + 250ml 一次水)
- 布丁盒
- 微量吸管
- 研磨棒
- 離心機
- RT-PCR 機
- 電泳槽
- 培育箱 (15°C、25°C 及 35°C)
- 去針針筒
- 光學顯微鏡
- 分光光度計 (測 OD 值)
- 西洋蜂 *A. mellifera* (初羽化及成蜂)
- 紫外線攝影機

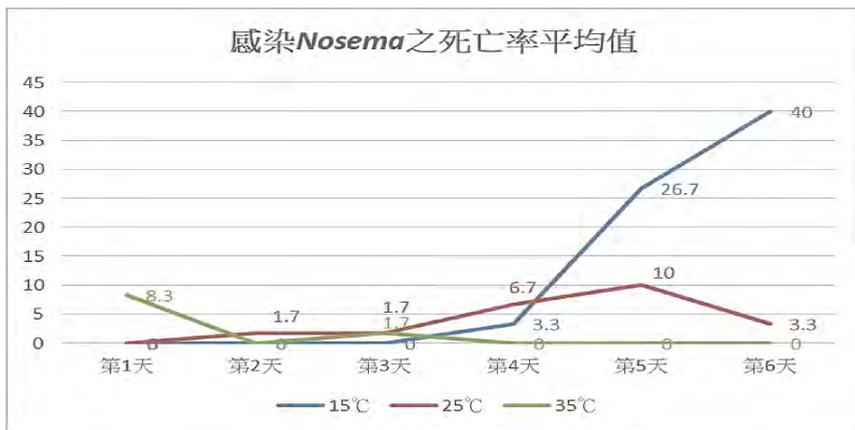
伍、研究方法

天數	第一天			第二天			第三天			第四天			第五天			第六天		
溫度	15	25	35	15	25	35	15	25	35	15	25	35	15	25	35	15	25	35
死亡數	感染與未感染死亡數																	
觀測時間	第6小時			第12小時			第一天			第二天			第三天					
溫度	15	25	35	15	25	35	15	25	35	15	25	35	15	25	35	15	25	35
<i>SR22</i>	gene expression																	
<i>MyD88</i>																		
感染 <i>Nosema</i>	中腸微粒子數目																	

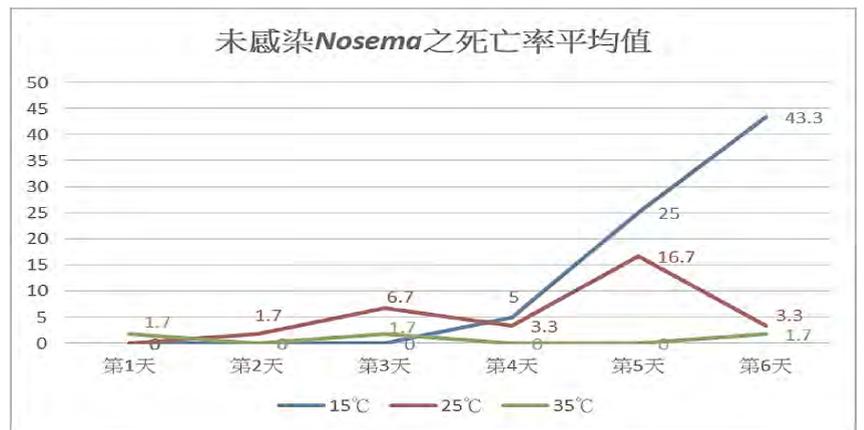
陸、研究過程



一、感染 *Nosema ceranae* 與否對死亡率與天數的影響

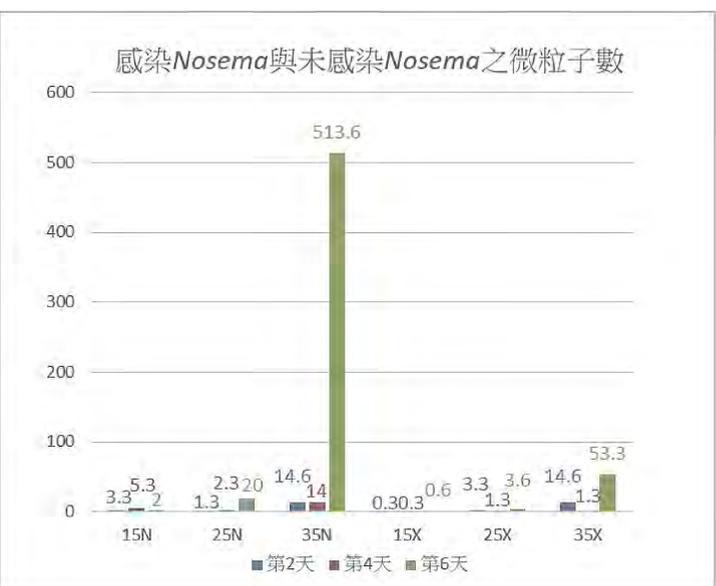
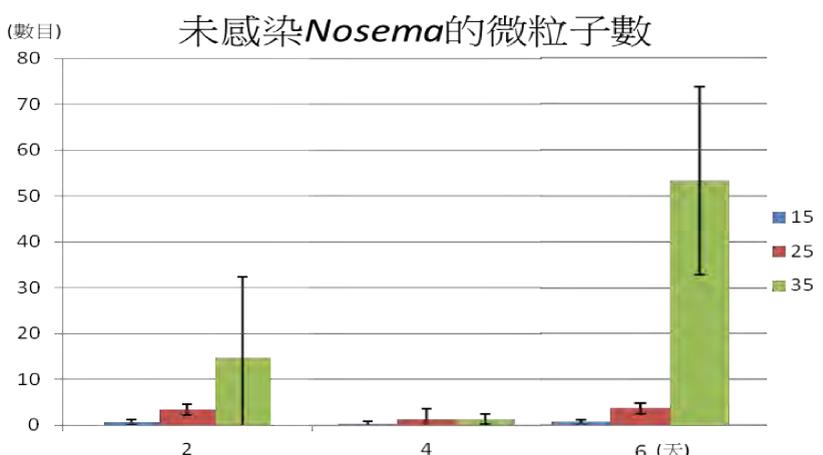
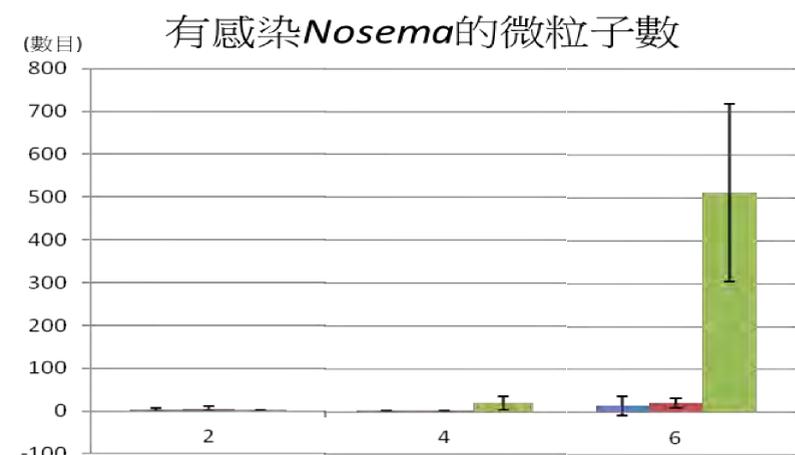


感染 *Nosema ceranae* 之死亡率：
 15°C 的死亡率都約在第四天及第五天開始攀升，到第六天大量死亡
 25°C 的死亡率在第三天開始微微上升，但第六天死亡率仍比15°C低許多
 35°C 的死亡率偏低，大致維持穩定狀態



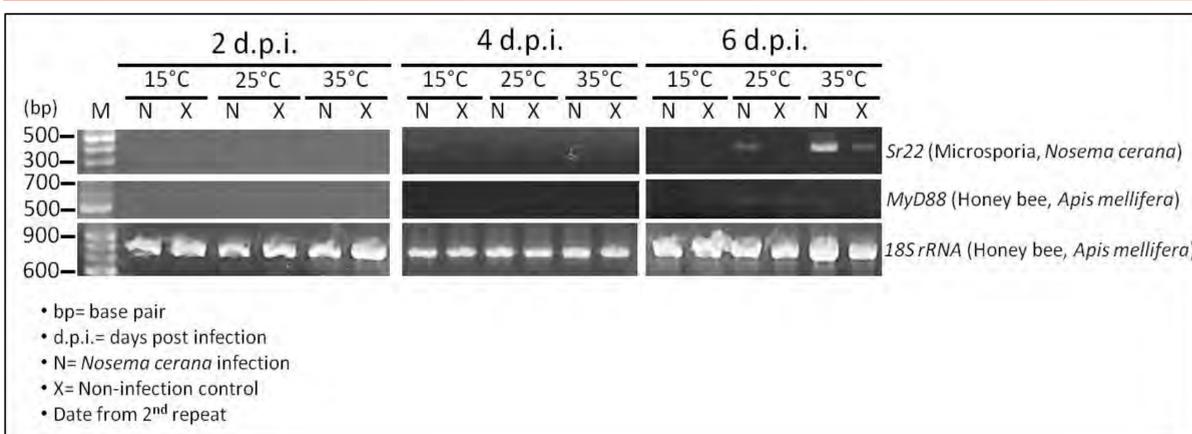
未感染 *Nosema ceranae* 之死亡率：
 15°C 的死亡率大約在第五天開始攀升，到第六天大量死亡
 25°C 的第六天死亡率比15°C低許多
 35°C 的死亡率比感染 *Nosema ceranae* 的更低，幾乎無上升趨勢

二、感染 *Nosema ceranae* 與否對東方蜂中腸微粒子數目與天數的關係

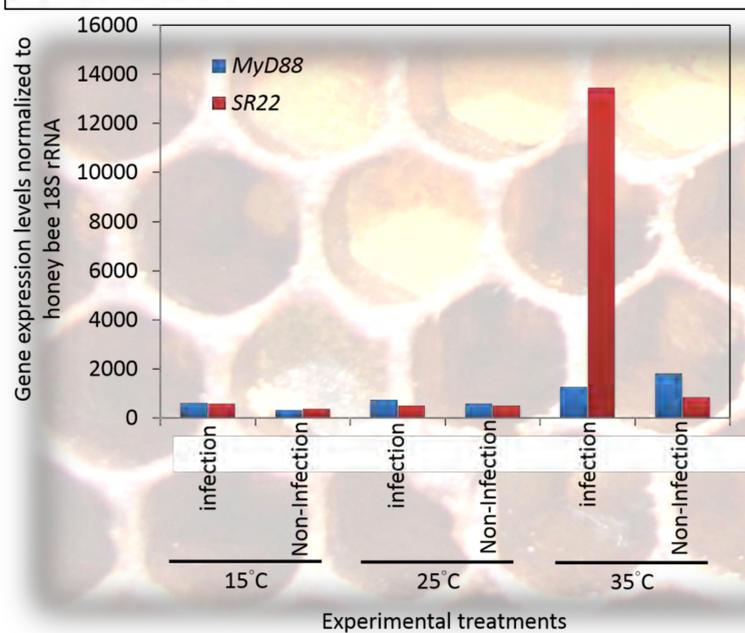


在15°C和25°C的環境下培養，各天數所偵測的微粒子數差異不大。35°C在第二天就多於其他兩個溫度，第四天數量增加，第六天明顯暴增許多
 特別注意到的是，在35°C第六天感染 *N. ceranae* 之微粒子數是未感染 *N. ceranae* 之微粒子數的約十倍，而且感染 *N. ceranae* 的所有實驗數據到第六天都有觀測到微粒子，因此可以確定有感染成功

三、不同溫度與天數下，免疫基因表現的電泳結果

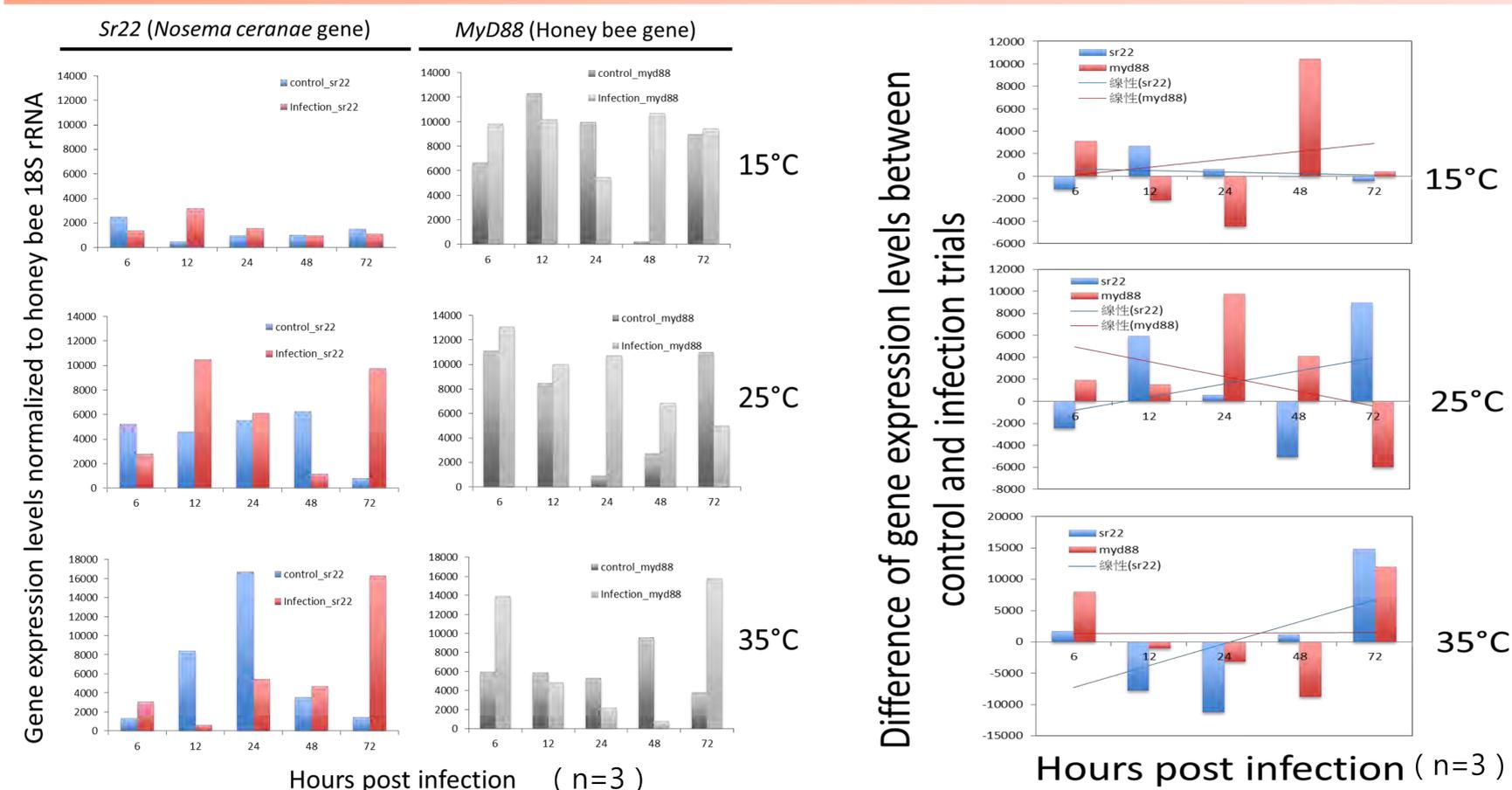


由第六天的25度與35度的基因表現結果顯示，25°C的感染實驗可發現，當蜜蜂免疫基因 (*MyD88*) 表現量較強時，微粒子基因 (*Sr22*) 表現較弱。而35°C的感染實驗顯示，微粒子基因 (*Sr22*) 表現上升，而此時蜜蜂免疫基因 (*MyD88*) 表現量減弱，這可能是因為病原戰勝寄主免疫系統而對免疫系統上游基因有抑制影響。同時我們也發現在35°C時，微粒子數量上升至最多。



此為第六天的電泳定量結果
 由第六天的電泳定量結果顯示，在15°C和25°C的狀態下，蜜蜂免疫基因 *MyD88* 和東方蜂微粒子特有基因 *SR22* 的表現量都偏低；在35°C時，兩者的基因表現都非常顯著，尤其是 *SR22*。而 *MyD88* 在35°C時未感染的部分比有感染的表現明顯，推測此時寄主免疫力已開始衰弱。

四、不同溫度與時間 (小時) , 免疫基因表現的電泳分析結果



由基因表現分析的結果顯示，無論是在哪種溫度下，*MyD88*在受感染後第六小時就開始表現明顯，雖然基因表現有些變動，但基本上是穩定的。而*SR22*在15°C表現微弱，在25°C或35°C時才表現逐漸明顯。

從基因表現分析的結果顯示可以發現，15°C、25°C的*MyD88*及*SR22*表現呈反比趨勢，推測可能是因為寄生共演化機制，*SR22*抑制了*MyD88*。而在35°C時*MyD88*是穩定的，此溫度與蜂巢內的溫度相同。

捌、討論

- 一、由實驗得知，不同批的蜜蜂，在同樣的溫度處理下，也有可能產生極具差異的死亡數，這其中可能牽涉到很多環境因子值得再探討。
- 二、在感染微粒子後第六天時，*SR22*基因表現在35°C表現量較高，此時微粒子數偏多，死亡率仍然偏低，推論微粒子可能在六天前即可能啟動絕對寄生病原的保護機制（寄生共演化），反而會讓寄主暫時延緩死亡。由後續的實驗發現，在感染後六個小時，25°C或35°C時*SR22*表現逐漸明顯，同樣的情況下，蜜蜂免疫基因（*MyD88*）也於受感染後第六小時開始表現明顯，且二者表現互有消長，此現象更驗證寄生共演化的存在。另外，或許可以延長觀測的時間，找出*SR22*基因表現與降低蜜蜂死亡率之間的可能原因。
- 三、*MyD88*在其他文獻中已被證實會誘發*Abaecin*、*Hymenoptaecin*、*Defensin1*、*Defensin2*等下游基因，而這些基因的表現和昆蟲產生抗菌肽的能力有關，在本研究中，25°C環境下，*MyD88*於第六天基因表現明顯且死亡率沒有上升許多，推測可能跟此溫度下游基因表現有關。
- 四、由兩篇文獻可知（Ryan S. et al., 2013; Yang et al., 2016），*MyD88*在蜜蜂或麵包蟲受微粒子或其他真菌病原感染後六小時即可測得表現，直到72小時仍能偵測出來，可見其為早期基因。而第六天的時間狀態已屬後期，故由第六天的電泳圖定量表現結果顯示，*MyD88*在35°C時未感染的部分比有感染的表現明顯，推測此時寄主免疫力已開始衰弱。
- 五、感染後六個小時開始，蜜蜂免疫基因（*MyD88*）在35°C時的表現是穩定的，此溫度恰與蜂巢內的溫度相同，此時蜜蜂的活動力也最強，由此可知，35°C是比較適合蜜蜂生存的溫度。
- 六、由第六天的電泳圖定量表現結果顯示，在35°C時*SR22*的表現非常明顯，基因的表現並不等於微粒子數量或複製量的多寡，因為在潛伏感染狀態下的meront（裂殖體），也會被同時偵測到很多DNA，但都沒看到成熟的微粒子，而真正會產生嚴重病徵的過程，應該是變成成熟微粒子破細胞而出的時候。

玖、結論

- 一、由死亡率結果顯示，35°C的死亡率都是低而穩定，所以35°C是培養蜜蜂的最適溫度而15°C的死亡率在第四到五天會大幅提升，與蜜蜂的全球地理分布模式是相符合的。
- 二、由溫度與微粒子數量關係的結果顯示，相較其他二種溫度，35°C的微粒子數偏多，並且在第六天大幅成長。
- 三、我們所觀察到的電泳結果都是在第六天最明顯，表示需要時間讓基因表現顯著。
- 四、*SR22*的電泳表現結果與感染微粒子後成熟孢子的數目符合相關性，推論*SR22*在蜜蜂被感染微粒子後的免疫過程扮演重要角色。
- 五、在25°C情況下，*MyD88*第六天開始表現顯著，且死亡率介於15°C和35°C之間，表示*MyD88*表現是可以延緩死亡發生的。
- 六、感染後基因的表現於較短的觀測時間下顯示，15°C、25°C的*MyD88*及*SR22*表現成反比趨勢，而在35°C時*MyD88*是穩定的，與蜂巢內的溫度相同，由此可推測病原感染與寄主免疫途徑表現兩者與環境溫度極有關聯。

拾、未來展望

- 一、延長觀測的時間天數，以找出*SR22*基因表現與降低蜜蜂死亡率之間的可能原因。
- 二、探討25°C環境下，延長觀測的時間天數，*MyD88*基因表現的後續發展及與蜜蜂死亡率之間的關係。
- 三、加入*GNBP3*基因表現的探討以了解其與*SR22*的基因表現之關聯。
- 四、探討*Abaecin*、*Hymenoptaecin*、*Defensin1*、*Defensin2*等*MyD88*下游的基因表現與溫度之關聯性。
- 五、可以再設計一組溫差實驗看其中溫差對蜜蜂死亡率及感染率的關係。

拾壹、參考資料

- 一、Ryan S. Schwarz, (2013), Developmental and Comparative Immunology 40 300-31
- 二、Y. T. Yang et al., (2017), Tenebrio molitor Gram-negative-binding protein 3(TmGNBP3) is essential for inducing downstream antifungal Tenecin 1 gene expression against infection with Beauveria bassiana JEF-007, Insect Science 00, 1-9, DOI 10.1111/1744-7917.12482
- 三、Yue-Wen Chen a, (2012), Nosema ceranae infection intensity highly correlates with temperature, Wei-Ping Chung a, Journal of Invertebrate Pathology 111 264-267
- 四、Yu-His Hsiao, (2013)國立台灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系碩士論文__微粒子特有基因SR22應用於蜜蜂微粒子病之診斷
- 五、2016, 第十六屆旺宏科學獎 創意說明書 SA16-063