



基于 small RNA 组学分析揭示意大利蜜蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的免疫应答机制

陈华枝[#], 熊翠玲[#], 祝智威, 王杰, 范小雪, 蒋海宾, 范元婵, 万洁琦, 卢家轩, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 陈大福, 郭睿^{*}

福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

摘要:【目的】通过深度测序和组学分析在 small RNA 组学层面揭示意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)响应东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)的免疫应答机制。【方法】利用 small RNA-seq 技术对正常及 *N. ceranae* 胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠(Am7CK、Am7T、Am10CK 和 Am10T)进行深度测序。利用相关生物信息学软件对测序数据进行质控、已知 microRNA (miRNA) 鉴定、新 miRNA 预测及 miRNA 的结构特征分析。通过 Stem-loop RT-PCR 验证新 miRNA 的表达。按照 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$ 和 $P \leq 0.05$ 的标准筛选出 Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 比较组的差异表达 miRNA (differentially expressed miRNA, DEmiRNA)。利用软件预测 DEmiRNA 靶向结合的 mRNA 并进行 GO 和 KEGG 数据库注释, 根据注释信息对细胞和体液免疫相关通路及富集靶 mRNA 进行统计和分析。根据靶向结合关系构建 DEmiRNA 和免疫通路相关差异表达 mRNA (differentially expressed mRNA, DEmRNA) 的调控网络。采用 RT-qPCR 对数据的可靠性和 DEmiRNA 的差异表达进行验证。【结果】共获得 165895574 条原始读段和 132028990 条有效序列标签, 各组的组内 Pearson 相关性平均在 87.92% 及以上。共鉴定到 928 个已知 miRNA 和 56 个新 miRNA。这些 miRNA 的长度介于 18–28 nt, 多数的长度为 18 nt 和 22 nt 且首位碱基主要偏向 U。验证了 12 个新 miRNA 的真实表达。Am7CK vs. Am7T 比较组包含 48 个上调 miRNA 和 36 个下调 miRNA; Am10CK vs. Am10T 比较组包含 56 个上调 miRNA 和 51 个下调 miRNA。两个比较组的 DEmiRNA 可分别靶向结合 9827 个和 10720 个 mRNA。这些靶 mRNA 可分别注释到 50 和 47 条功能条目, 以及 138 和 135 条 KEGG 通路。DEmiRNA 与免疫通路相关靶 mRNA 的调控网络分

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金(2018J05042); 福建省教育厅中青年教育科研课题项目(JAT170158); 福建农林大学杰出青年科研人才计划(xjq201814); 福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2017342, CXZX2017343); 福建省大学生创新创业训练计划(3165602032, 3155006018)

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

收稿日期: 2019-10-12; 修回日期: 2019-12-24; 网络出版日期: 2020-05-19

析结果显示, Am7CK vs. Am7T 中有 26 个 DEmiRNA 靶向与内吞作用等免疫通路相关的 10 个 DEmRNA; Am10CK vs. Am10T 中有 15 个 DEmiRNA 靶向与 MAPK 信号通路等免疫通路相关的 10 个 DEmRNA。验证了测序数据和 4 个 DEmiRNA 差异表达的可靠性。【结论】研究结果揭示了宿主 DEmiRNA 可能通过调控物质和能量代谢、细胞和体液免疫对 *N. ceranae* 产生应答, 但 DEmiRNA 不参与抗菌肽基因的表达调控; miR-1-z 可能参与宿主的细胞增殖、细胞凋亡和免疫进程; 氧化磷酸化通路可能在宿主免疫应答及宿主-病原互作中发挥特殊作用。

关键词: 意大利蜜蜂, 东方蜜蜂微孢子虫, 微小 RNA, 免疫应答, 宿主-病原互作, 分子机制

意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)作为西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的亚种之一, 因具有采蜜量大、不易逃群和性情温顺等优良特性而广泛用于我国的养蜂生产, 发挥着重要的经济价值和不可替代的生态价值^[1]。东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)是一种单细胞真菌病原, 广泛感染世界各地的蜂群^[2]。*N. ceranae* 特异性侵染成年蜜蜂的中肠上皮细胞^[3], 可导致宿主寿命缩短^[4-5]、能量胁迫^[6-7]和免疫抑制^[8-10]。接种感染 *N. ceranae* 7 d 的西方蜜蜂工蜂的累计死亡率显著上升^[5]; 接种感染 *N. ceranae* 14 d 的西方蜜蜂工蜂死亡率接近 100%^[4]。Mayack 等对未感染和感染 *N. ceranae* 的西方蜜蜂工蜂进行不同浓度蔗糖饲喂并测试其伸吻反应, 发现 *N. ceranae* 感染的工蜂对梯度浓度蔗糖溶液的敏感程度和蔗糖溶液的消耗量均显著高于未感染组的工蜂^[6]。近期, 有研究报道 *N. ceranae* 对西方蜜蜂幼虫也具有侵染性^[11-12]。

西方蜜蜂基因组信息^[13]于 2006 年公布。Evans 等基于该参考基因组, 通过种间同源性比较分析发现西方蜜蜂存在 Toll、Imd、JAK/STAT 和 JNK 等 4 条免疫相关通路及 6 个抗菌肽编码基因, 但相比于果蝇和按蚊, 西方蜜蜂含有的免疫基因(涉及 17 个基因家族)数量下降了三分之二, 表明西方蜜蜂的个体免疫能力有所下降, 而群体防御在抵御病原入侵方面具有较高的重要性, 因此西方

蜜蜂具有被一些协同进化的专性病原感染的倾向性^[14]。此后, 人们利用分子生物学手段对西方蜜蜂响应 *N. ceranae* 的免疫应答进行了较多研究, 发现 *N. ceranae* 能够通过抑制宿主的抗菌肽基因、细胞免疫相关基因的表达显著影响西方蜜蜂的免疫应答^[8,15]; 但也有研究表明 *N. ceranae* 会激活上述免疫基因的表达^[16]。Li 等研究发现 *N. ceranae* 侵染可导致西方蜜蜂 *naked cuticle* 基因上调表达, 沉默 *naked cuticle* 基因会造成抗菌肽基因的上调、蜜蜂寿命延长且宿主肠道内病原孢子数量下降^[17]。近年来, 随着高通量测序技术的发展和普及, 人们在 mRNA 组学层面对西方蜜蜂响应 *N. ceranae* 侵染的胁迫应答也进行了一些研究^[10,18], 但总体仍较为有限。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约 23 nt 的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 其种子序列通过靶向完全或不完全匹配结合靶 mRNA 的 3' UTR 区抑制或降解 mRNA, 从而调控基因的表达^[19-21]。miRNA 已被证明广泛参与动物、植物和微生物的众多生物学过程^[22]。前人通过生物信息学分析对西方蜜蜂的 miRNA 进行了一些研究, 涉及蜜蜂级型分化^[23]、神经发育^[24]和免疫应答^[25]。Ashby 等的研究结果表明, 西方蜜蜂蜂王、雄蜂和工蜂的 miRNA 表达谱在幼虫发育成蛹阶段具有显著差异, 蛹期的 miRNA 可能参与调控

西方蜜蜂的级型分化^[23]。Huang 等利用二代测序和生物信息学探究了 *N. ceranae* 感染 1–6 d 的西方蜜蜂工蜂 miRNA 的胁迫应答,发现宿主差异表达的 miRNA (differentially expressed miRNA, DE miRNA)可能通过参与调控物质代谢、能量代谢和酶类相关基因的表达,应对 *N. ceranae* 的侵染^[26];该团队在此基础上进一步研究发现,miRNA 可能介导 *N. ceranae* 与意蜂之间的跨界调控^[27]。

目前,关于 miRNA 等 ncRNA 在蜜蜂响应和抵御 *N. ceranae* 侵染过程中的作用,相关研究仍然非常滞后。笔者团队前期已结合链特异性建库的 RNA-seq 技术对正常和 *N. ceranae* 胁迫的意蜂工蜂中肠进行测序,系统解析了意蜂工蜂响应 *N. ceranae* 胁迫的高表达基因(highly expressed gene, HEG)表达谱及 HEG 的潜在作用^[28];揭示了宿主响应 *N. ceranae* 胁迫的基因差异表达谱和免疫应答^[29];并解析了宿主响应胁迫的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)差异表达谱及竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)调控网络^[5]。对于蜜蜂响应 *N. ceranae* 胁迫的免疫应答机制,仍缺乏分子生物学水平的深入阐释。本研究利用 small RNA-seq (sRNA-seq)技术对正常和 *N. ceranae* 胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠进行测序,通过深入分析宿主响应胁迫的 DE miRNA 及其调控网络,以及宿主的细胞和体液免疫相关通路及富集 mRNA,在 miRNA 组学层面揭示意蜂工蜂对 *N. ceranae* 的免疫应答机制,为阐明背后的分子机制提供必要的参考信息和数据基础。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫和真菌

供试意蜂工蜂取自福建农林大学动物科学学院

(蜂学学院)教学蜂场, *N. ceranae* 孢子^[30]由动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护实验室分离、纯化和保存。

1.2 意蜂工蜂的接种和人工饲养

参照笔者团队前期已建立的方法^[5]进行意蜂工蜂的接种和人工饲养,简述如下:(1) 挑选外观健康、群势较强的 6 群意蜂,在每个蜂箱巢门口随机抓取 6 只工蜂,拉取中肠进行研磨,取少量研磨液进行显微制片和观察,对镜检不到孢子的样品进行 PCR 检测, *N. ceranae* 特异性引物为 Nc-F: CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA, Nc-R: CCCGTCATTCTCAAACAAAAACCG, *N. apis* 特异性引物 Na-F: GGGGGCATGTCTTTG ACGTACTATGTA, Na-R: GGGGGGCGTTTAAAA TGTGAAACA ACTATG^[31],将 PCR 检测结果为阴性的意蜂蜂群作为本研究实验蜂群;(2) 选取实验蜂群中封盖子较多的巢脾放入(34.0±0.5) °C 恒温培养箱,将刚出房的工蜂放入四周打孔的干净塑料盒(30 头/盒),每个盒子上方插入一支装有 50% (W/V) 无菌糖水的饲喂器;(3) (34.0±0.5) °C 培养 24 h,将上述工蜂饥饿处理 2 h,然后给对照组的每只工蜂饲喂 5 μL 糖水(不含 *N. ceranae* 孢子),处理组的每只工蜂饲喂 5 μL 糖水(含 1×10⁶ 个 *N. ceranae* 孢子^[5]),舍弃未食尽糖水的工蜂,将食尽糖水的工蜂用于后续实验,接种当天记为接种后 0 d;(4) 每日检查工蜂的存活情况,及时清理死亡的工蜂,每隔 24 h 更换糖水。本实验进行 3 次生物学重复。

1.3 测序样品制备及 sRNA-seq 测序

蜜蜂中肠是 *N. ceranae* 寄生及其与宿主相互作用的主要部位,因而本研究选取意蜂工蜂中肠作为测序样品。*N. ceranae* 在西方蜜蜂中肠上皮细胞中完成一轮生活史的周期为 6 d^[32],随后病原孢子数量可持续增长到 20 d^[33]。综合考虑,本研究

选取正常和 *N. ceranae* 感染 7 d 和 10 d 的工蜂的中肠进行测序。分别拉取正常和 *N. ceranae* 感染 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠, 每 3 只置于 1 个 RNA-Free 的 EP 管, 立即放入液氮速冻, 每次取样时间均控制在 20 s 以内。7 d 对照组样品为 Am7CK: Am7CK1、Am7CK2、Am7CK3; 7 d 处理组样品为 Am7T: Am7T1、Am7T2、Am7T3; 10 d 对照组样品为 Am10CK: Am10CK1、Am10CK2、Am10CK3; 10 d 处理组样品为 Am10T: Am10T1、Am10T2、Am10T3。待取完全部样品, 统一转移至 -80°C 超低温冰箱保存备用。利用 Trizol 法分别提取上述样品的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳切胶选择 18–30 nt 的片段。继而连接 3'接头, 连接产物以 15% 变性 PAGE 胶电泳分离, 切胶选择 36–44 nt 目的条带; 回收切胶产物, 连接 5'接头, 然后对连接了两侧接头的小 RNA 样本进行反转录 PCR。反转录产物以 3.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收 140–160 bp 区域条带, 即为文库。委托广州基迪奥生物技术有限公司对构建好的文库进行测序, 测序平台 Illumina HiSeq™ 2000。sRNA-seq 的原始数据已上传 NCBI SRA 数据库, BioProject 号: PRJNA408312。

1.4 测序数据质控

参照郭睿等的方法^[34]对测序数据进行过滤和质控, 简述如下: (1) 剔除原始读段(raw reads)中含 5'接头序列、含 polyA、低质量的 reads 和剪切掉 3'接头序列后的短于 18 或长于 30 个核苷酸的序列, 得到高质量的有效序列标签(clean tags); (2) 利用 Bowtie 软件^[35]将获得的 clean tags 比对 GenBank 及 Rfam (11.0) 数据库, 过滤比对上 rRNA、scRNA、snoRNA 和 tRNA 的 clean tags, 得到未注释的 tags (unannotated tags); (3) 比对 *N.*

ceranae 参考基因组 (assembly ASM98816v1) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/931?genome_assembly_id=230435), 去除比对上的数据(即为 *N. ceranae* 的数据); (4) 将剩余数据继续比对西方蜜蜂参考基因组(assembly Amel_4.5) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/48?genome_assembly_id=22683), 剔除比对上基因组外显子、内含子和重复序列的 clean tags, 剩余比对上的数据(mapped tags)可用于后续分析。

1.5 miRNA 的预测及差异分析

利用 miRDeep2 软件^[36]将上述剩余的 mapped tags 与 miRBase 数据库中收录的 miRNA 前体序列进行比对, 获得已知 miRNA 序列。同时, 将未比对上的 tags 比对基因组, 得到可能的前体序列, 根据 tags 在前体序列上的分布信息和前体结构能量信息, 采用贝叶斯模型经打分实现 novel miRNA 的鉴定。利用 TPM (tags per million) 算法公式 ($\text{TPM} = T \cdot 10^6 / N$, T 表示单个 miRNA 的 tags, N 表示总 miRNA 的 tags) 对 miRNA 的表达量进行归一化。筛选 DE miRNA 的标准: $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$, $P \leq 0.05$ 。上述筛选方法已广泛用于其他物种的 miRNA 组学研究^[37–39]。利用 OmicShare 在线工具集合(www.omicshare.com)计算 Pearson 相关系数并作图, 以及绘制 DE miRNA 的火山图和热图, 相关软件采用默认参数。

1.6 DE miRNA 的靶 mRNA 预测和分析及调控网络构建

根据 miRNA 与西方蜜蜂参考基因组序列信息, 利用 TargetFinder 软件^[40]进行靶 mRNA 预测。将预测到的靶 mRNA 映射到 GO 和 KEGG 数据库, 统计比对上 GO 条目或 KEGG 通路(pathway)的 mRNA 数。此外, 利用 Cytoscape 软件^[41]将

DEmiRNA 及其靶向结合的-免疫通路相关的差异表达 mRNA (differentially expressed mRNA, DEmRNA)^[29]的结合关系进行可视化。

1.7 Novel miRNA 的 Stem-loop RT-PCR 验证

参照 Chen 等^[42]和郭睿等^[34]的方法,随机挑选 13 个 novel miRNA (novel-m0008-3p、novel-m0019-5p、novel-m0003-3p、novel-m0018-5p、novel-m0006-3p、

novel-m0005-3p、novel-m0043-5p、novel-m0022-3p、novel-m0033-3p、novel-m0040-3p、novel-m0026-5p、novel-m0031-3p、novel-m0001-3p)进行表达验证,利用 DNAMAN 8 软件设计 novel miRNA 的 Stem-loop 引物、特异性上游和通用下游引物,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物信息详见表 1。利用 RNA 抽提试剂盒(Promega 公司,

表 1. 本研究所用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
novel-m0008-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCATCCTCC
novel-m0019-5p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATCTCGGA
novel-m0003-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACAACGG
novel-m0018-5p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCTACTG
novel-m0006-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCCTCCA
novel-m0005-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGTAGGATG
novel-m0043-5p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGACGAAT
novel-m0022-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATCCTCTC
novel-m0033-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGGATAACC
novel-m0040-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCTAGCAC
novel-m0026-5p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCATCAG
novel-m0031-3p-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGAGAAAT
miR-8271-y-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCTATCT
miR-1-z-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATACATAC
miR-374-y-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAATTACAA
miR-128-y-loop	CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAAGAGAC
miR-8271-y-F	GCGCGCGTATACTGAAT
miR-1-z-F	GCGCGCGTGAATGTAAAGAA
miR-374-y-F	GCGCGCGCTTATCAGATTGTA
miR-128-y-F	GCGCGCGTCACAGTGAACCG
novel-m0008-3p-F	AGGGGATGGGAG
novel-m0019-5p-F	TGCAGGCGTGCAGA
novel-m0003-3p-F	TTTGAACAATTGTAC
novel-m0018-5p-F	GGCCATTAGCT
novel-m0006-3p-F	CACAACCACTCTGA
novel-m0005-3p-F	ACACTCCAGCTGGGTTGACTATGATT
novel-m0043-5p-F	ACACTCCAGCTGGGTTAATTAATAACAT
novel-m0022-3p-F	ACACTCCAGCTGGGCGTGTTCGAGGACA
novel-m0033-3p-F	ACACTCCAGCTGGGATATACCATTCGTC
novel-m0040-3p-F	ACACTCCAGCTGGGTCGGTTTTAAAGTCT
novel-m0026-5p-F	ACACTCCAGCTGGGTTATCCACGATCATAA
novel-m0031-3p-F	ACACTCCAGCTGGGTCGCGATCGATA
Universal R	CTCAACTGGTGTTCGTGGA
U6-F	GTTAGGCTTTGACGATTTTCG
U6-R	GGCATTCTCCACCAGGTA

美国)提取 Am7CK、Am7T、Am10CK 和 Am10T 样品的总 RNA, 利用 Stem-loop 引物反转录得到相应的 cDNA 预混, 作为 PCR 的模板。PCR 反应体系(20 μ L)包括 cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, dH₂O 7 μ L, PCR mix 10 μ L; PCR 程序设置: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 40 s, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min。PCR 产物经 1.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 利用凝胶成像系统(上海培清, 中国)观察和拍照。

1.8 DE miRNA 的 qPCR 验证

利用 DNAMAN 8 软件设计 DE miRNA 的 Stem-loop 引物、特异性上游引物、通用下游引物, 以及意蜂 *U6* 基因(DE miRNA 的内参)的特异性引物, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息详见表 1。利用 RNA 抽提试剂盒(Promega 公司, 美国)分别提取 Am7CK、Am7T、Am10CK 和 Am10T 样品的总 RNA, 利用 Stem-loop 引物和随机引物反转录得到相应的 cDNA 分别作为 DE miRNA 和 *U6* 基因的 qPCR 模板。qPCR 反应体系(20 μ L): cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, RNA-Free H₂O 7 μ L, SYBR Green Dye (上海翊圣, 中国) 10 μ L; ABI QuanStudio 3 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国)的 qPCR 程序设置: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环。RT-qPCR 每个反应进行 3 次平行重复和生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 DE miRNA 的相对表达量, 利用 GraphPad Prism 7 软件进行 Student's *t*-test 检验和绘图。

2 结果和分析

2.1 测序数据质控与评估

上述 12 组意蜂工蜂中肠样品共测得 165895574 条 raw reads, 经严格过滤和质控共得

到 132028990 条 clean tags, 每组样品的 clean tags 占 raw reads 的比例都达到 77.04%及以上(表 2)。此外, Am7CK、Am10CK、Am7T 和 Am10T 的组内平均 Pearson 相关性分别达到 87.92%、99.93%、91.14%和 99.67% (图 1)。以上结果表明测序数据质量和样品重复性良好。

2.2 意蜂工蜂中肠 miRNA 的鉴定与分析

利用 miRDeep2 软件共预测出 984 个 miRNA, 包含 928 个已知 miRNA 和 56 个新 miRNA; 它们长度介于 18–28 nt, 大部分的 miRNA 的长度为 18 nt (263, 27%)和 22 nt (264, 27%) (图 2-A)。此外, 不同长度的 miRNA 的首位碱基偏向性存在明显差异, 19–25 nt 的 miRNA 首位碱基以 U 为主, 18 nt 和 26 nt 的 miRNA 首位碱基以 A 为主, 28 nt 的 miRNA 首位碱基以 G 为主(图 2-B)。从上述 56 个新 miRNA 中随机挑选了 13 个 novel miRNA 进行 Stem-loop RT-PCR, 琼脂糖凝胶电泳结果显示其中 12 个(92.31%)均能扩增出符合预期的特异性条带(图 3)。

表 2. sRNA-seq 数据统计

Table 2. Summary of sRNA-seq dataset

Samples	Raw reads	Clean tags
Am7CK1	14021728	11355712 (83.38%)
Am7CK2	13479635	10077417 (77.04%)
Am7CK3	13033478	10828352 (85.55%)
Am7T1	13731512	10764025 (80.66%)
Am7T2	13195285	10728197 (83.57%)
Am7T3	14332490	11456414 (82.16%)
Am10CK1	13083648	10127041 (80.51%)
Am10CK2	13544596	10710261 (81.52%)
Am10CK3	13716280	11019319 (82.75%)
Am10T1	14346575	12065860 (87.31%)
Am10T2	14861853	11591319 (80.99%)
Am10T3	14548494	11305073 (80.68%)

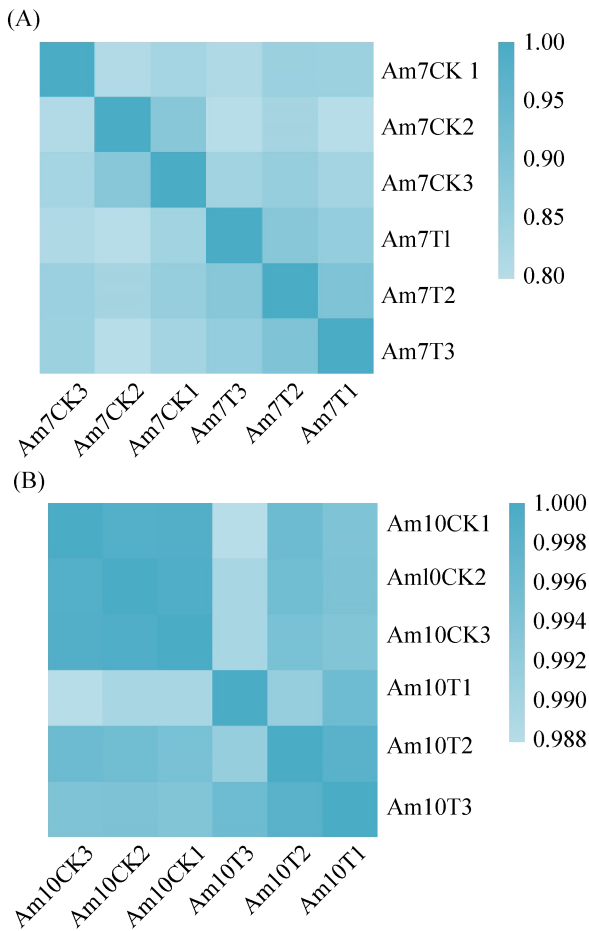


图 1. 各组不同生物学重复间的 Pearson 相关性
Figure 1. Pearson correlation coefficients among various biological replicates within every groups.

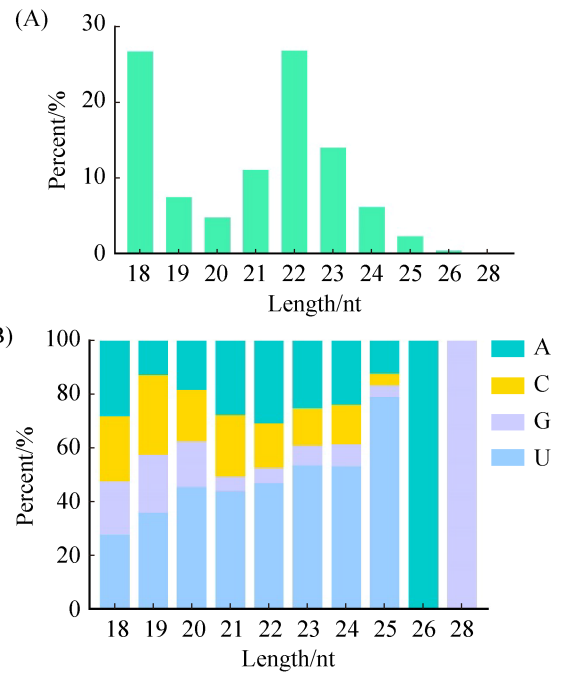


图 2. 意蜂工蜂中肠 miRNA 的结构特征
Figure 2. Structural properties of miRNA in the midgut of *A. m. ligustica* worker. A: Length distribution of miRNA; B: First base bias of miRNA.

2.3 意蜂工蜂中肠 DE miRNA 的预测和分析

结果显示, Am7CK vs. Am7T 比较组中共有 84 个 DE miRNA, 包括 48 个上调 miRNA 和 36 个下调 miRNA (图 4-A); Am10CK vs. Am10T 比较组中

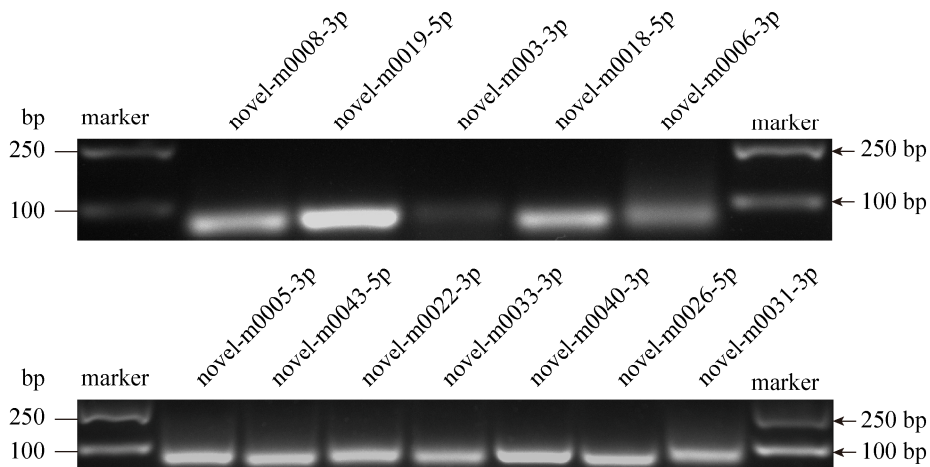


图 3. 意蜂工蜂中肠新 miRNA 的 Stem-loop RT-PCR 鉴定
Figure 3. Stem-loop RT-PCR identification of novel miRNAs in *A. m. ligustica* worker's midgut.

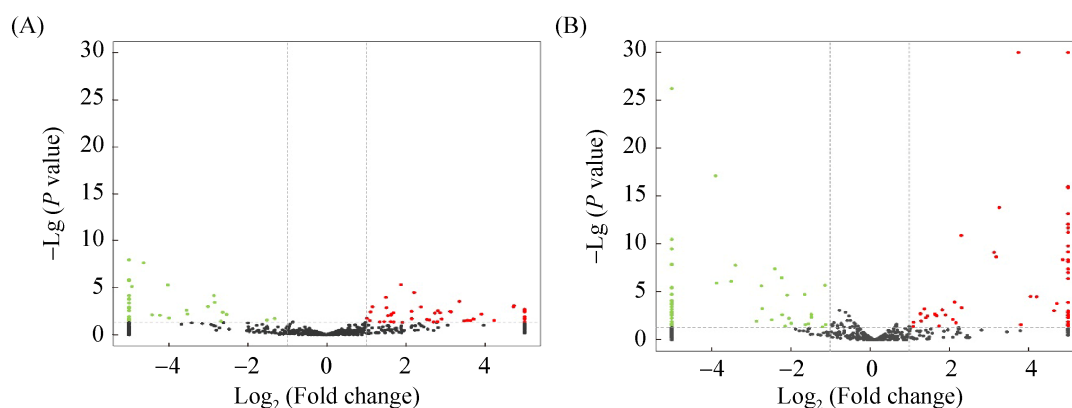


图 4. 各比较组中 DEmiRNA 的火山图

Figure 4. Volcano plots of DEmiRNAs in every comparison groups. A: Volcano plot of DEmiRNAs in Am7CK vs. Am7T; B: Volcano plot of DEmiRNAs in Am10CK vs. Am10T. Green dots indicate downregulated miRNAs and red dots indicate upregulated miRNAs.

共有 107 个 DEmiRNA, 包括 56 个上调 miRNA 和 51 个下调 miRNA (图 4-B)。Am7CK vs. Am7T 中上调幅度最大的为 miR-9075-y [$\log_2(\text{Fold change})=12.29$], 其次是 miR-2188-x [$\log_2(\text{Fold change})=12.21$] 和

ame-miR-6052 [$\log_2(\text{Fold change})=11.73$], 下调幅度最大的为 miR-8191-x [$\log_2(\text{Fold change})=-14.22$], 其次是 miR-298-x [$\log_2(\text{Fold change})=-13.64$] 和 miR-434-y [$\log_2(\text{Fold change})=-13.48$] (表 3)。

表 3. Am7CK vs. Am7T 比较组中前 10 位的上调和下调 miRNA

Table 3. Top 10 up- and down-regulated miRNAs in Am7CK vs. Am7T comparison group

miRNA name	TPM in Am7CK group	TPM in Am7T group	$\log_2(\text{Fold change})$	<i>P</i> value
Up-regulated miRNAs				
miR-9075-y	0.001	5.020	12.293	0.003
miR-2188-x	0.001	4.740	12.211	0.021
ame-miR-6052	0.001	3.390	11.727	0.002
miR-1983-y	0.001	3.040	11.570	0.004
miR-8212-y	0.001	2.833	11.468	0.004
miR-224-x	0.001	2.327	11.184	0.013
miR-92-x	0.001	1.647	10.685	0.023
miR-501-y	0.001	1.273	10.314	0.047
miR-374-y	0.203	5.397	4.730	0.001
miR-767-x	0.203	5.347	4.717	0.001
Down-regulated miRNAs				
miR-8191-x	19.120	0.001	-14.223	0.000
miR-298-x	12.743	0.001	-13.637	0.000
miR-434-y	11.440	0.001	-13.482	0.000
miR-541-x	10.293	0.001	-13.329	0.000
miR-5100-y	9.750	0.001	-13.251	0.000
miR-291-y	7.853	0.001	-12.939	0.000
miR-292-y	6.880	0.001	-12.748	0.001
miR-4700-x	5.990	0.001	-12.548	0.022
miR-293-y	4.937	0.001	-12.269	0.003
miR-381-y	4.377	0.001	-12.096	0.001

Am10CK vs. Am10T 比较组中上调幅度最大的为 miR-8503-x [$\log_2(\text{Fold change})=15.97$], 其次是 miR-2965-y [$\log_2(\text{Fold change})=15.21$] 和 miR-4700-x [$\log_2(\text{Fold change})=14.75$], 下调幅度最大的为 miR-462-x [$\log_2(\text{Fold change})=-16.42$], 其次是 miR-142-y [$\log_2(\text{Fold change})=-14.75$] 和 miR-144-y [$\log_2(\text{Fold change})=-14.51$] (表 4)。

2.4 意蜂工蜂中肠 DEmiRNA 靶 mRNA 的预测和分析

Am7CK vs. Am7T 比较组包含的 84 个 DEmiRNA 共预测出由 4003 个基因转录形成的 9827 个靶 mRNA, 它们富集在 50 条功能条目(图 5-A), 涉及 19 条与细胞组分相关条目, 例如细胞(1189 个

mRNA)和细胞组件(1189 个 mRNA); 11 条与分子功能相关条目, 例如结合(2727 个 mRNA)和催化活性(1794 个 mRNA); 20 条生物学进程相关条目, 例如细胞进程(2617 个 mRNA)和代谢进程(2276 个 mRNA)。

Am10CK vs. Am10T 比较组包含的 107 个 DEmiRNA 共预测出由 4301 个基因转录形成的 10720 个靶 mRNA, 它们富集在 47 条 GO 条目(图 5-B), 涉及细胞(1342 个 mRNA)和细胞组件(1342 个 mRNA)等 17 条细胞组分相关条目; 结合(2996 个 mRNA)和催化活性(1934 个 mRNA)等 11 条与分子功能相关条目; 细胞进程(2865 个 mRNA)和代谢进程(2427 个 mRNA)等 19 条与生物

表 4. Am10CK vs. Am10T 比较组中前 10 位的上调和下调 miRNA

Table 4. Top 10 up- and down-regulated miRNAs in Am10CK vs. Am10T comparison group

miRNA name	TPM in Am10CK group	TPM in Am10T group	$\log_2(\text{Fold change})$	<i>P</i> value
Up-regulated miRNAs				
miR-8503-x	0.001	64.363	15.974	0.000
miR-2965-y	0.001	37.877	15.209	0.000
miR-4700-x	0.001	27.610	14.753	0.000
miR-8797-x	0.001	25.680	14.648	0.000
miR-7572-y	0.001	22.733	14.473	0.000
miR-3232-x	0.001	18.357	14.164	0.000
miR-4577-y	0.001	18.353	14.164	0.000
miR-301-x	0.001	17.167	14.067	0.000
miR-5001-x	0.001	14.707	13.844	0.000
miR-2172-x	0.001	7.387	12.851	0.001
Down-regulated miRNAs				
miR-462-x	87.560	0.001	-16.418	0.000
miR-142-y	27.487	0.001	-14.746	0.000
miR-144-y	23.357	0.001	-14.512	0.000
miR-144-x	17.910	0.001	-14.128	0.000
miR-223-y	17.157	0.001	-14.066	0.000
miR-8159-x	12.397	0.001	-13.598	0.000
miR-7132-y	9.860	0.001	-13.267	0.000
miR-5112-x	8.670	0.001	-13.082	0.000
let-7-z	8.143	0.001	-12.991	0.000
miR-2184-x	7.807	0.001	-12.930	0.000

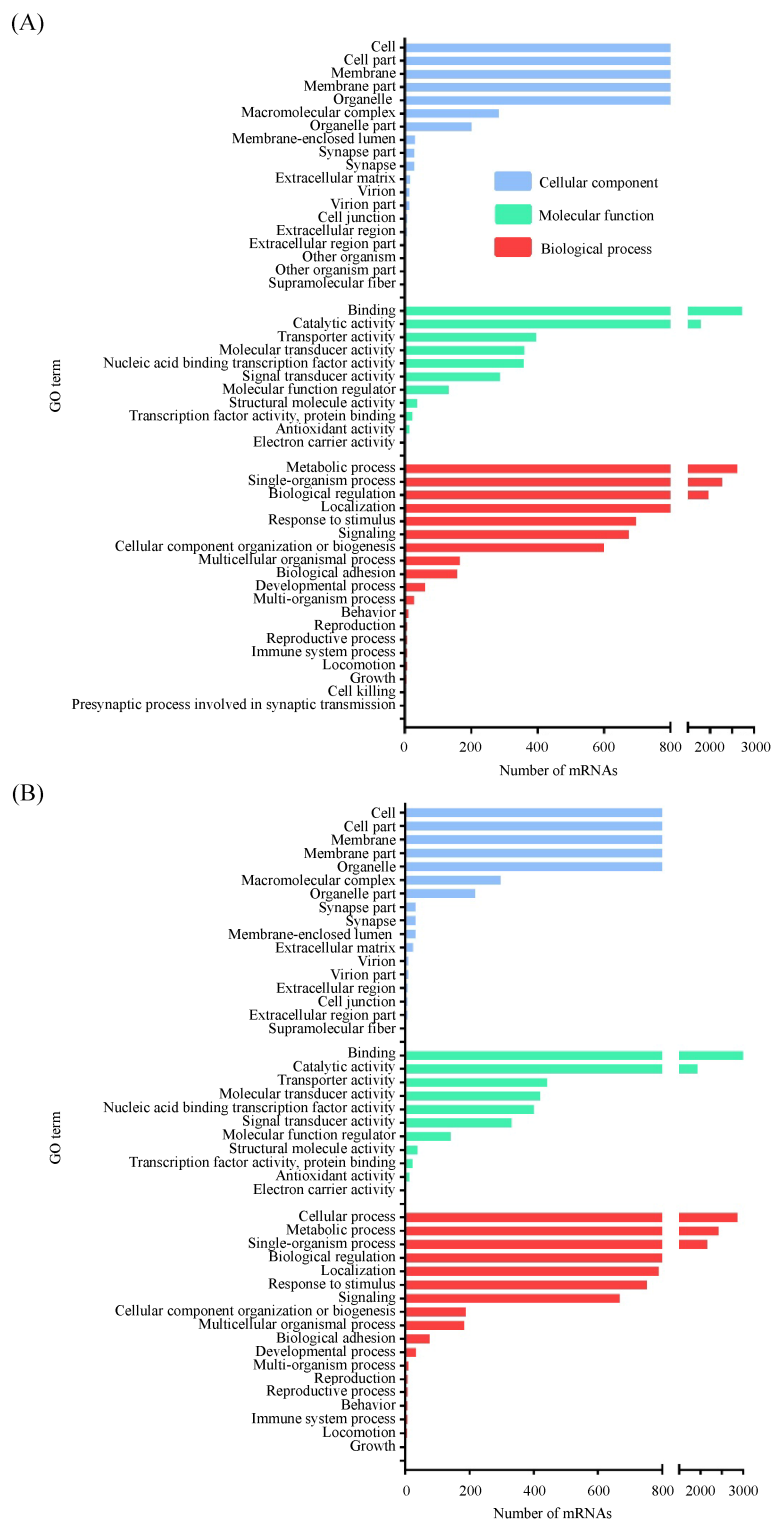


图 5. 各比较组中 DEmiRNA 靶 mRNA 的 GO 分类

Figure 5. GO classifications of DEmiRNA target mRNAs in every comparison groups. A: GO classifications of DEmiRNA target mRNAs in Am7CK vs. Am7T; B: GO classifications of DEmiRNA target mRNAs in Am10CK vs. Am10T.

学进程相关条目。其中, Am7CK vs. Am7T 中分别有 675、7 和 2 个靶 mRNA 注释在应激反应、免疫系统进程和细胞杀伤; Am10CK vs. Am10T 中分别有 753 和 7 个靶 mRNA 注释在应激反应和免疫系统进程。

2.5 意蜂工蜂中肠 DE miRNA 的靶 mRNA 的通路分析

Am7CK vs. Am7T 比较组中 DE miRNA 的靶 mRNA 共富集在 138 条通路, 富集数最多的前 5 位分别是 Wnt 信号通路(173 个 mRNA)、内吞

作用(139 个 mRNA)、Hippo 信号通路(118 个 mRNA)、嘌呤代谢(97 个 mRNA)和泛素介导的蛋白水解(90 个 mRNA) (表 5)。Am10CK vs. Am10T 比较组中 DE miRNA 的靶 mRNA 共富集在 135 条通路(图 6-B), 富集数最多的前 5 位分别是 Wnt 信号通路(200 个 mRNA)、内吞作用(120 个 mRNA)、嘌呤代谢(112 个 mRNA)、Hippo 信号通路(110 个 mRNA)和泛素介导的蛋白水解(100 个 mRNA) (表 6)。

进一步分析发现, Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK

表 5. Am7CK vs. Am7T 中 DE miRNA 靶 mRNA 富集数最多的前 10 位通路

Table 5. Top 10 pathways of DE miRNA target mRNA enriched in Am7CK vs. Am7T

Pathway name	Pathway ID	Number of target mRNA	P value
Wnt signaling pathway	ko04310	173	0.000
Endocytosis	ko04144	139	0.000
Hippo signaling pathway	ko04391	118	0.000
Purine metabolism	ko00230	97	0.612
Ubiquitin mediated proteolysis	ko04120	90	0.009
Neuroactive ligand-receptor interaction	ko04080	89	0.000
Phototransduction	ko04745	83	0.000
mRNA surveillance pathway	ko03015	78	0.000
Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141	75	0.516
FoxO signaling pathway	ko04068	68	0.000

表 6. Am10CK vs. Am10T 中 DE miRNA 靶 mRNA 富集数最多的前 10 位通路

Table 6. Top 10 pathways of DE miRNA target mRNA enriched in Am10CK vs. Am10T

Pathway name	Pathway ID	Number of target mRNA	P value
Wnt signaling pathway	ko04310	200	0.000
Endocytosis	ko04144	120	0.074
Purine metabolism	ko00230	112	0.194
Hippo signaling pathway	ko04391	110	0.000
Ubiquitin mediated proteolysis	ko04120	100	0.001
Phototransduction	ko04745	85	0.000
Neuroactive ligand-receptor interaction	ko04080	83	0.000
Spliceosome	ko03040	83	0.689
Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141	75	0.777
RNA transport	ko03013	75	0.989

表 7. Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 比较组中 DEmiRNA 的靶 mRNA 富集的细胞免疫相关通路
Table 7. Cellular immune-related pathways enriched by DEmiRNA-targeted mRNAs in Am7CK vs. Am7T and Am10CK vs. Am10T comparison groups

Pathway	Pathway ID	Num of target mRNAs in Am7CK vs. Am7T	Num of target mRNAs in Am10CK vs. Am10T
Endocytosis	ko04144	139	120
Ubiquitin mediated proteolysis	ko04120	90	100
Lysosome	ko04142	42	54
Phagosome	ko04145	38	39
Insect hormone biosynthesis	ko00981	8	4

表 8. Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 比较组中 DEmiRNA 的靶 mRNA 富集的体液免疫相关通路
Table 8. Humoral immune-related pathways enriched by DEmiRNA-targeted mRNAs in Am7CK vs. Am7T and Am10CK vs. Am10T comparison groups

Pathways	Pathway ID	Num of target mRNAs in Am7CK vs. Am7T	Num of target mRNAs in Am10CK vs. Am10T
FoxO signaling pathway	ko04068	68	71
MAPK signaling pathway - fly	ko04013	19	20
Jak-STAT signaling pathway	ko04630	16	20
Drug metabolism - cytochrome P450	ko00982	6	4
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	ko00980	6	4

vs. Am10T 中 DEmiRNA 靶 mRNA 均富集在果糖和甘露糖代谢(30 个 mRNA 和 29 个 mRNA)、其他多糖降解(28 个 mRNA 和 25 个 mRNA)、淀粉和蔗糖代谢(29 个 mRNA 和 32 个 mRNA)、半乳糖代谢(20 个 mRNA 和 18 个 mRNA)、三羧酸循环(24 个 mRNA 和 24 个 mRNA)和氧化磷酸化(36 个 mRNA 和 44 个 mRNA)等物质和能量代谢通路; Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 比较组的 DEmiRNA 靶 mRNA 均富集于内吞作用和泛素介导的蛋白水解等 5 条细胞免疫相关通路(表 7); MAPK 信号通路和 FoxO 信号通路等 5 条体液免疫相关通路(表 8)。

结合前期分析得到的 DEmRNA 结果^[29], 构建 DEmiRNA 与 DEmRNA 之间的调控网络, 分析结果显示 Am7CK vs. Am7T 中有 26 个 DEmiRNA 靶向结

合与内吞作用、泛素介导的蛋白水解、吞噬体、FoxO 信号通路和 MAPK 信号通路等免疫相关的 10 个 DEmRNA (XM_006570195.2、XM_006564220.2 和 XM_006570873.2 等)(图 6-A); Am10CK vs. Am10T 中有 15 个 DEmiRNA 靶向结合与溶酶体、泛素介导的蛋白水解、内吞作用、MAPK 信号通路和 FoxO 信号通路等免疫相关 10 个 DEmRNA (XM_006567428.2、XM_006570714.2 和 XM_006561133.2 等)(图 6-B)。

2.6 意蜂工蜂中肠 DEmiRNA 和 mRNA 的 RT-qPCR 验证

随机挑选图 6 中的 4 个 DEmiRNA 进行 RT-qPCR 验证, 结果显示它们的表达趋势与测序数据一致(图 7), 证实了测序数据和上述 miRNA 差异表达趋势的可靠性。

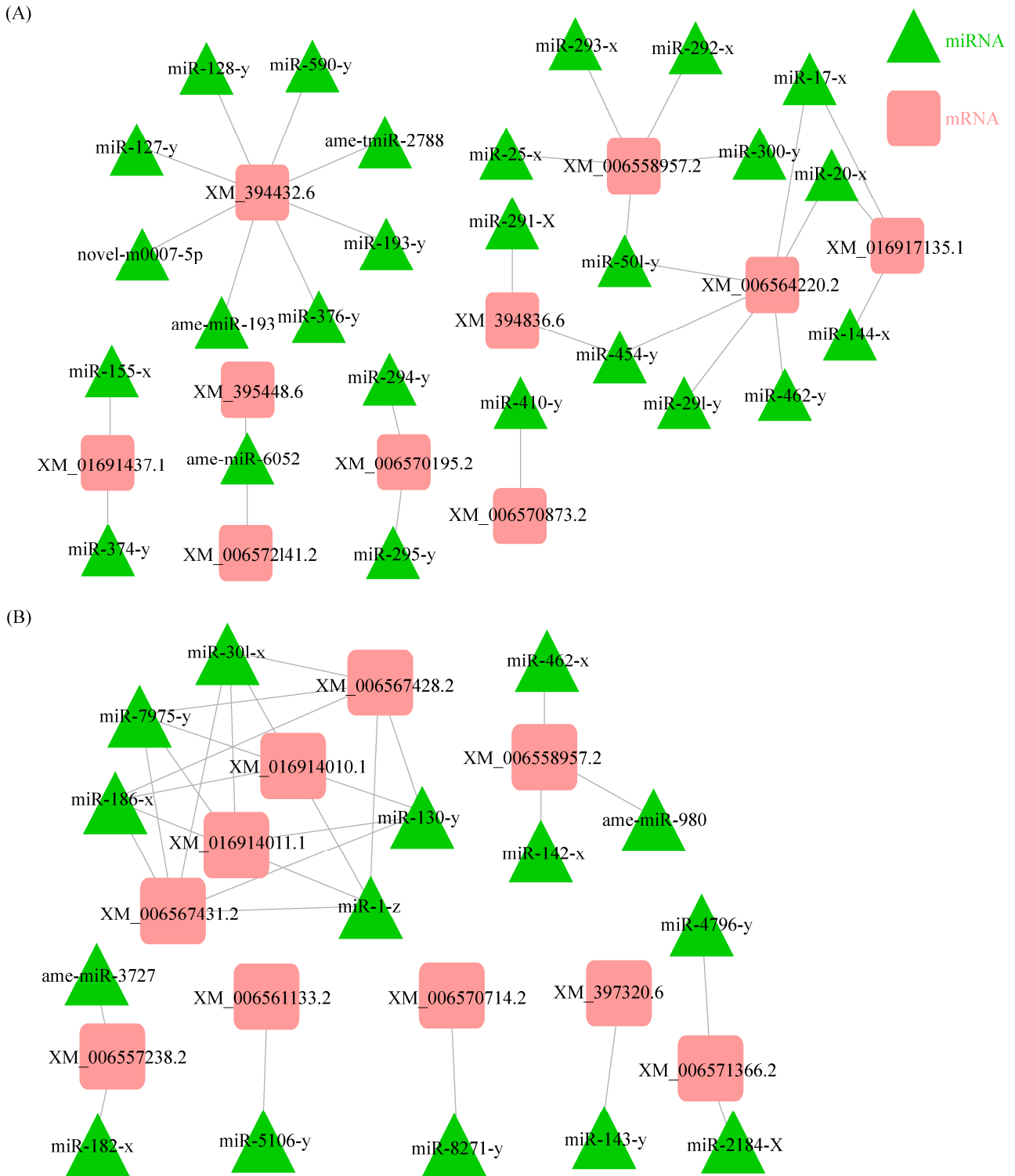


图 6. 意蜂工蜂中肠 DEmiRNA 靶向免疫通路相关 DEmRNA 的调控网络

Figure 6. Regulatory network of midgut DEmiRNAs and their target DEmRNAs associated with immune pathway in *A. m. ligustica* worker. A: Regulatory network of DEmiRNA-DEmRNA in Am7CK vs. Am7T comparison group; B: Regulatory network of DEmiRNA-DEmRNA in Am10CK vs. Am10T comparison group.

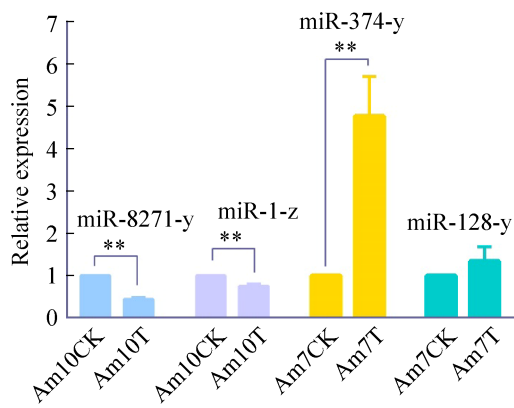


图7. 意蜂工蜂中肠 DEmiRNA 的 RT-qPCR 验证
Figure 7. RT-qPCR verification of DEmiRNA in the midgut of *A. m. ligustica* worker. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论

miRNA 作为基因表达的关键调控因子, 在昆虫细胞发育和免疫等生理过程中扮演重要角色^[43]。目前, 西方蜜蜂对 *N. ceranae* 的胁迫应答的组学研究主要集中在 mRNA 层面^[4,18,44], 但在 ncRNA 层面的研究极为有限^[5,26]。Dussaubat 等研究发现, *N. ceranae* 接种后 14 d 的西方蜜蜂死亡率接近 100%; 作者结合石蜡切片和 RNA-seq 技术对感染肠道进行分析, 结果显示 *N. ceranae* 感染导致宿主肠道结构受到破坏, 调控细胞更新的相关基因表达, 导致受损肠道无法修复^[4]。本研究对正常和 *N. ceranae* 胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠进行测序, 通过生物信息学方法鉴定到 984 个长度介于 18–28 nt 的 miRNA, 其中多数 miRNA 的首位碱基偏向 U, 与中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)^[25] 和菜蛾盘绒茧蜂 (*Cotesia vestalis*)^[45] 的 miRNA 结构特征相似。前期研究中, 笔者团队从意蜂幼虫肠道的 sRNA-seq 数据中预测出 560 个 miRNA, 同样发现这些 miRNA 的长度介于 17–27 nt, 首位碱基多偏向 U^[46]。上述结

果说明不同昆虫物种的 miRNA, 以及意蜂不同虫态的 miRNA, 具有类似的结构特征。此外, 本研究鉴定到 56 个 novel miRNA, 为 miRBase 数据库中西方蜜蜂的 miRNA 信息提供了有益补充。miRNA 表达具有时序表达特异性^[47–48]。本研究 Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 比较组中分别筛选到 84 和 107 个 DEmiRNA, 18 个 DEmiRNA 为二者共有, 二者特有的 DEmiRNA 分别为 66 和 89 个, 表明意蜂工蜂中肠在 *N. ceranae* 胁迫的不同阶段通过差异表达不同的 miRNA 对病原入侵产生应答。

蜜蜂微孢子虫病是一种慢性病, *N. ceranae* 对蜜蜂宿主的侵染是一个较为长期的过程, 可能持续 1 个月甚至更长的时间, 而在侵染的全过程, 宿主和病原都在时刻进行相互作用; 而且, 意蜂工蜂对 *N. ceranae* 的胁迫应答是一个复杂而持续的过程, 伴随着非常复杂的分子事件发生。因此, 深入解析宿主的胁迫应答机制需要从多个角度尽可能获得更多的信息。Huang 等^[26] 曾对正常和 *N. ceranae* 感染 1–6 d 的西方蜜蜂工蜂中肠进行深度测序, 首次筛选到 17 个 DEmiRNA, 可靶向结合 413 个 mRNA; 作者进一步分析发现这些靶 mRNA 注释到了铁结合、信号转导、细胞核、DNA 结合、跨膜转运活性等 5 条功能条目, 以及嘌呤代谢、硫胺素新陈代谢、氨基苯甲酸酯降解、抗生素生物合成、氧化磷酸化、多糖降解、核黄素的新陈代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、嘧啶代谢等 9 条物质和能量代谢通路, 未发现靶 mRNA 涉及细胞和体液免疫相关通路。通过与本研究结果比较分析, 发现 *N. ceranae* 感染后 1–6 d 和感染后 10 d 的宿主中肠中共有的 DEmiRNA 仅有 1 个 (ame-miR-1), 表明大部分 DEmiRNA 具有时序表

达特异性;此外,Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 的 DEmiRNA 靶 mRNA 分别注释到了 50 和 47 个功能条目,以及 138 和 135 条通路,包括 5 条细胞免疫通路和 5 条体液免疫通路,但未发现有靶 mRNA 注释到铁离子结合功能条目、氨基苯甲酸酯降解和抗生素生物合成通路。鉴于 miRNA 具有时序表达特异性^[47-48],上述比较结果表明蜜蜂宿主的不同 miRNA 在 *N. ceranae* 感染的不同阶段产生不同的应答,从而发挥不同的作用;此外,比较结果还进一步丰富了西方蜜蜂响应 *N. ceranae* 的胁迫应答的 miRNA 相关信息。但需要强调的是,Huang 等^[26]的研究中选择的是西方蜜蜂,但没有具体说明为西方蜜蜂的哪一个具体蜂种;而本研究选择的是意蜂,两项研究选择的蜂种或许存在差异,可能对分析结果产生一定影响。

miRNA 通过 miRNA 种子序列靶向结合 mRNA 的 3'-UTR 发挥抑制或降解作用^[19-21]。本研究对两个比较组中 DEmiRNA 靶向结合的 mRNA 进行预测,结果显示 Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 的 DEmiRNA 分别靶向 9827 和 10720 个 mRNA。进一步对 DEmiRNA 及其调控的免疫通路相关 DEmRNA 进行调控网络构建(图 6),分析发现 Am7CK vs. Am7T 中有 16 个 DEmiRNA (ame-miR-193、ame-miR-2788 和 ame-miR-6052 等)靶向结合 10 个 DEmRNA,Am10CK vs. Am10T 有 25 个 DEmiRNA (miR-1-z、ame-miR-3727 和 ame-miR-980 等)靶向结合 10 个 DEmRNA。前人研究发现,miR-1 不仅可抑制癌细胞增殖^[49],还可促进细胞凋亡^[50]。昆虫中,miR-1 已被证明参与调控黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[51]和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)^[52]的免疫进程。此外,Huang 等研究发现 ame-miR-1 在 *N. ceranae* 侵染 6 d 后的

西方蜜蜂工蜂中肠中显著下调^[26]。本研究中,miR-1-z (与 miR-1 高度同源)在 Am10CK vs. Am10T 中显著下调 [$\log_2(\text{Fold change})=-11.573$, $P=0.02$],靶向 4 个富集在溶酶体通路的 DEmRNA (XM_006567428.2、XM_006567431.2、XM_016914010.1 和 XM_016914011.1),表明 *N. ceranae* 在侵染意蜂工蜂的过程可能通过抑制 miR-1-z 的表达上调溶酶体通路基因的表达水平,对宿主细胞的增殖、凋亡和免疫进程进行调控。在另一项研究中,笔者团队发现在 *N. ceranae* 侵染 7 d 的中蜂工蜂中肠中,miR-1-x 的表达也受到了一定抑制^[53]。以上结果说明 miR-1 可能同时参与调控意蜂工蜂和中蜂工蜂对 *N. ceranae* 的胁迫应答中的细胞更新和免疫进程。

N. ceranae 不含线粒体,增殖所需能量全部窃取自宿主细胞^[6-7]。被 *N. ceranae* 寄生的西方蜜蜂因受到能量胁迫而增加蔗糖溶液的摄入量^[6]。本研究发现,上述两个比较组中 DEmiRNA 的靶 mRNA 均有部分注释到果糖和甘露糖代谢(30 个 mRNA 和 29 个 mRNA)、其他多糖降解(28 个 mRNA 和 25 个 mRNA)、半乳糖代谢(20 个 mRNA 和 18 个 mRNA)、淀粉和蔗糖代谢(29 个 mRNA)等糖类代谢相关通路;此外,两个比较组中 DEmiRNA 的靶 mRNA 均有部分注释到氧化磷酸化(36 个 mRNA 和 44 个 mRNA)和三羧酸循环(24 个 mRNA 和 24 个 mRNA)等能量代谢相关通路。Huang 等也发现 *N. ceranae* 感染 1-6 d 的西方蜜蜂工蜂中肠的 DEmiRNA 参与调节宿主氧化磷酸化通路相关基因的表达^[26]。氧化磷酸化是昆虫细胞线粒体合成 ATP 的主要方式^[54]。笔者团队前期对 *N. ceranae* 胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠 DEmRNA 和 DElncRNA 进行了系统分析,发现有 1 个 DEmRNA

(XM_001123191.4)富集在氧化磷酸化通路^[29],有3个DElncRNA (XR_001702895.1、XR_411776.2和XR_001704989.1)涉及该通路的调控^[5]。本研究中,对于Am7CK vs. Am7T和Am10CK vs. Am10T比较组中的DEmiRNA,分别有36和44个靶mRNA注释到氧化磷酸化通路。上述结果表明,氧化磷酸化通路在意蜂与*N. ceranae*相互作用中扮演特殊角色,*N. ceranae*可能通过调控该通路对宿主造成能量胁迫,以满足自身增殖需要,而意蜂工蜂可能通过调节该通路对病原进行胁迫应答;本研究发现的相关DEmiRNA及前期发现的DElncRNA或许能作为新型的分子靶点,用于蜜蜂微孢子虫病的治疗,这是下一步的研究重点。蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*,简称球囊菌)是另一种常见的蜜蜂真菌病原,其引发的蜜蜂白垩病是长期困扰养蜂生产的一大顽疾^[55]。前期研究中,笔者团队通过比较转录组学分析探究中蜂幼虫和意蜂幼虫对球囊菌的抗性差异,发现受到强烈正向选择的意蜂单拷贝基因富集在氧化磷酸化等4条代谢通路,推测球囊菌主要通过影响意蜂幼虫能量代谢和物质代谢降低宿主的抵御作用^[56]。综上,推测氧化磷酸化通路在意蜂不同虫态响应真菌病原胁迫应答的过程中发挥特殊作用,该通路也是不同真菌病原的重要调控靶点。

本研究发现,Am7CK vs. Am7T和Am10CK vs. Am10T中DEmiRNA的靶mRNA均有部分注释到应激反应和细胞杀伤等免疫相关的功能条目,此外Am7CK vs. Am7T中DEmiRNA的靶mRNA还富集在免疫系统进程,表明意蜂工蜂的DEmiRNA参与了免疫防御的调控。昆虫识别病原体是免疫应答的第一步,由二类模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)激活,一类是参与细

胞免疫识别的相关基因,如*Nimrod*、*SRCB*和*TEP*等;另一类是参与体液免疫识别的相关基因,如*PGRP*、 β *GBP*和*GNBP*等^[57]。本研究中,分别有5个DEmiRNA (Am7CK vs. Am7T中的miR-294-y和miR-295-y; Am10CK vs. Am10T中的ame-miR-981、miR-142-y和miR-316-x)和1个DEmiRNA (Am10CK vs. Am10T中的miR-186-x)靶向结合*SRCB*和*PGRP*的转录本,说明上述DEmiRNA参与调控宿主对*N. ceranae*的免疫识别。昆虫的细胞免疫主要方式包括血淋巴介导的吞噬、集结和包裹等方式消除病原;体液免疫的主要方式为识别病原、胞内信号通路激活以及诱导抗菌肽等效应因子基因的诱导表达^[58]。本研究的2个比较组中DEmiRNA的靶mRNA皆有部分注释到内吞作用(139个mRNA和120个mRNA)、溶酶体(42个mRNA和54个mRNA)、吞噬体(42个mRNA和54个mRNA)、泛素介导的蛋白水解(90个mRNA和100个mRNA)和昆虫激素的生物合成(8个mRNA和4个mRNA)等5条细胞免疫通路;另有部分靶mRNA注释到5条体液免疫相关通路,包括FoxO信号通路(68个mRNA和71个mRNA)、MAPK信号通路(19个mRNA和20个mRNA)、Jak-STAT信号通路(16个mRNA和20个mRNA)、药物代谢-细胞色素P450(6个mRNA和4个mRNA)和细胞色素P450对外源生物的代谢作用(6个mRNA和4个mRNA)。然而,未发现靶向6个抗菌肽基因(*abaecin*、*apidaecin*、*apisimin*、*hymenoptaecin*、*defensin-1*和*defensin-2*)的miRNA表达量发生变化。因此,笔者推测DEmiRNA在*N. ceranae*胁迫的免疫应答中主要参与调控病原识别、细胞免疫通路和部分体液免疫通路,但不参与调控抗菌肽基因的表达及抗菌肽的合成。

近年来, miRNA 介导的跨界调控已成为国内外的研究热点^[59-60]。植物来源的 miRNA 可以跨界调控动物体内 mRNA 的表达, 从而影响动物的各种生理过程^[59-60]。2012 年, 张辰宇团队在摄入大米的小鼠血液和器官中检测到来源于大米的 MIR168a, 并证明 MIR168a 能够导致小鼠肝脏功能损伤, 摄入 MIR168a 的抑制物可恢复肝脏功能, 首次证实了 miRNA 具有跨界调控功能^[59]。2018 年, Huang 等基于生物信息学分析报道了 *N. ceranae* 的 miRNA 与西方蜜蜂的 mRNA 之间存在潜在的跨界调控关系^[27], 仍需要进一步的实验验证。目前, 笔者团队正在探究意蜂工蜂中肠 DEmiRNA 对于 *N. ceranae* 的 mRNA 的靶向结合关系, 以期更深入地理解和揭示意蜂对 *N. ceranae* 的胁迫应答机制和二者的互作机制。

综上所述, 本研究利用高通量测序技术和生物信息学方法从意蜂工蜂中肠鉴定到 928 个已知 miRNA 和 56 个新 miRNA, 在 Am7CK vs. Am7T 和 Am10CK vs. Am10T 中分别鉴定到 84 和 107 个 DEmiRNA; 通过靶 mRNA 和调控网络分析揭示意蜂工蜂中肠的 DEmiRNA 可能通过负调控靶 mRNA 对部分糖代谢、能量代谢、病原体识别、细胞免疫和体液免疫通路进行调控, 以应对 *N. ceranae* 的入侵; miR-1-z 可能在宿主响应 *N. ceranae* 胁迫中参与细胞增殖、凋亡和免疫进程; 氧化磷酸化通路可能在意蜂工蜂与 *N. ceranae* 的相互作用中扮演特殊角色。

参 考 文 献

- [1] Bromenshenk JJ, Henderson CB, Seccomb RA, Welch PM, Debnam SE, Firth DR. Bees as biosensors: chemosensory ability, honey bee monitoring systems, and emergent sensor technologies derived from the pollinator syndrome. *Biosensors*, 2015, 5(4): 678–711.
- [2] Shumkova R, Georgieva A, Radoslavov G, Sirakova D, Dzhebir G, Neov B, Bouga M, Hristov P. The first report of the prevalence of *Nosema ceranae* in Bulgaria. *PeerJ*, 2018, 6(5): e4252.
- [3] Higes M, García-Palencia P, Urbietta A, Nanetti A, Martín-Hernández R. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* tissue tropism in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Pathology*, 2020, 57(1): 132–138.
- [4] Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Le Conte Y, Alaux C. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37017.
- [5] Chen DF, Chen HZ, Du Y, Zhou DD, Geng SH, Wang HP, Wan JQ, Xiong CL, Zheng YZ, Guo R. Genome-wide identification of long non-coding RNAs and their regulatory networks involved in *Apis mellifera ligustica* response to *Nosema ceranae* infection. *Insects*, 2019, 10(8): 245.
- [6] Mayack C, Naug D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 100(3): 185–188.
- [7] Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C, Higes M. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*, 2011, 109(3): 605–612.
- [8] Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 2009, 11(9): 2284–2290.
- [9] Paris L, El Alaoui H, Delbac F, Diogon M. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 2018, 26: 149–154.
- [10] Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91686.
- [11] Eiri DM, Suwannapong G, Endler M, Nieh JC. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126330.
- [12] BenVau LR, Nieh JC. Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young

- adults. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 14144.
- [13] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443(7114): 931–949.
- [14] Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 645–656.
- [15] Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen YP, Evans JD, Pettis JS. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(8): 1090–1095.
- [16] Sinpoo C, Paxton RJ, Disayathanoowat T, Krongdang S, Chantawannakul P. Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 105: 1–8.
- [17] Li WF, Evans JD, Huang Q, Rodríguez-García C, Liu J, Hamilton M, Grozinger CM, Webster TC, Su SK, Chen YP. Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(22): 6779–6787.
- [18] Badaoui B, Fougeroux A, Petit F, Anselmo A, Gorni C, Cucurachi M, Cersini A, Granato A, Cardeti G, Formato G, Mutinelli F, Giuffra E, Williams JL, Botti S. RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173438.
- [19] Wang L, Jiang P, He Y, Hu HY, Guo Y, Liu XY, Qiu HH, Ma QL, Ouyang F. A novel mechanism of smads/miR-675/TGF β R1 axis modulating the proliferation and remodeling of mouse cardiac fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 20275–20285.
- [20] Li K, Wu Y, Yang H, Hong PY, Fang XD, Hu YJ. H19/miR-30a/C8orf4 axis modulates the adipogenic differentiation process in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 20925–20934.
- [21] Kim EJ, Kim JS, Lee S, Lee H, Yoon JS, Hong JH, Chun SH, Sun S, Won HS, Hong SA, Kang K, Jo JY, Choi M, Shin DH, Ahn YH, Ko YH. QKI, a miR-200 target gene, suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and tumor growth. *International Journal of Cancer*, 2019, 145(6): 1585–1595.
- [22] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [23] Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18794.
- [24] Hori S, Kaneko K, Saito TH, Takeuchi H, Kubo T. Expression of two microRNAs, ame-mir-276 and -1000, in the adult honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Apidologie*, 2011, 42(1): 89–102.
- [25] Du Y, Tong XY, Zhou DD, Chen DF, Xiong CL, Zheng YZ, Xu GJ, Wang HP, Chen HZ, Guo YL, Long Q, Guo R. MicroRNA responses in the larval gut of *Apis cerana cerana* to *Ascospaera apis* stress. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(9): 1747–1764. (in Chinese)
杜宇, 童新宇, 周丁丁, 陈大福, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 王海朋, 陈华枝, 郭意龙, 隆琦, 郭睿. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 microRNA 应答分析. 微生物学报, 2019, 59(9): 1747–1764.
- [26] Huang Q, Chen YP, Wang RW, Schwarz RS, Evans JD. Honey bee microRNAs respond to infection by the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17494.
- [27] Evans JD, Huang Q. Interactions among host-parasite microRNAs during *Nosema ceranae* proliferation in *Apis mellifera*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 698.
- [28] Guo R, Dao C, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Geng SH, Chen DF. Analysis of the highly expressed genes in the midgut of *Apis mellifera ligustica* worker under the stress of *Nosema ceranae*. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40(5): 1106–1112. (in Chinese)
郭睿, 刀晨, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 耿四海, 陈大福. 意大利蜜蜂工蜂中肠响应 *Nosema ceranae* 胁迫的高表达基因分析. 环境昆虫学报, 2018, 40(5): 1106–1112.
- [29] Fu ZM, Chen HZ, Liu SY, Zhu ZW, Fan XX, Fan YC, Wan JQ, Zhang L, Xiong CL, Xu GJ, Chen DF, Guo R. Immune responses of *Apis mellifera ligustica* to *Nosema ceranae* stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(17): 3069–3082. (in Chinese)
付中民, 陈华枝, 刘思亚, 祝智威, 范小雪, 范元婵, 万洁琦, 张璐, 熊翠玲, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 意大利蜜蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的免疫应答. 中国农业科学, 2019, 52(17): 3069–3082.
- [30] Guo R, Chen DF, Xiong CL, Hou CS, Zheng YZ, Fu ZM, Liang Q, Diao QY, Zhang L, Wang HQ, Hou ZX, Kumar D. First identification of long non-coding RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 2018, 49(5): 660–670.
- [31] VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen YP, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6481.
- [32] Huang Q, Chen YP, Wang RW, Cheng S, Evans JD. Host-parasite interactions and purifying selection in a

- microsporidian parasite of honey bees. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147549.
- [33] Huang WF, Solter LF. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 113(1): 35–41.
- [34] Guo R, Du Y, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu GJ, Wang HP, Chen HZ, Geng SH, Zhou DD, Shi CY, Zhao HX, Chen DF. Differentially expressed microRNA and their regulation networks during the developmental process of *Apis mellifera ligustica* larval gut. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(21): 4197–4209. (in Chinese)
郭睿, 杜宇, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 王海朋, 陈华枝, 耿四海, 周丁丁, 石彩云, 赵红霞, 陈大福. 意大利蜜蜂幼虫肠道发育过程中的差异表达 microRNA 及其调控网络. *中国农业科学*, 2018, 51(21): 4197–4209.
- [35] Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25.
- [36] Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 37–52.
- [37] Cheng HY, Wang Y, Tao X, Fan YF, Dai Y, Yang H, Ma XR. Genomic profiling of exogenous abscisic acid-responsive microRNAs in tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMC Genomics*, 2016, 17: 423.
- [38] Liu H, Yang X, Zhang ZK, Zou WC, Wang HN. miR-146a-5p promotes replication of infectious bronchitis virus by targeting IRAK2 and TNFRSF18. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 120: 32–36.
- [39] Li SY, Yang J, Wang LY, Du F, Zhao JL, Fang R. Expression profile of microRNAs in porcine alveolar macrophages after *Toxoplasma gondii* infection. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 65.
- [40] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Carrington JC. MicroRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121(2): 207–221.
- [41] Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431–432.
- [42] Chen CF, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou ZH, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): e179.
- [43] Asgari S. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(4): 388–397.
- [44] Holt HL, Aronstein KA, Grozinger CM. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 2013, 14: 799.
- [45] Wang ZZ, Ye XQ, Shi M, Li F, Wang ZH, Zhou YN, Gu QJ, Wu XT, Yin CL, Guo DH, Hu RM, Hu NN, Chen T, Zheng BY, Zou JN, Zhan LQ, Wei SJ, Wang YP, Huang JH, Fang XD, Strand MR, Chen XX. Parasitic insect-derived miRNAs modulate host development. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2205.
- [46] Xiong CL, Du Y, Chen DF, Zheng YZ, Fu ZM, Wang HP, Geng SH, Chen HZ, Zhou DD, Wu SZ, Shi CY, Guo R. Bioinformatic prediction and analysis of miRNAs in the *Apis mellifera ligustica* larval gut. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2018, 55(6): 1023–1033. (in Chinese)
熊翠玲, 杜宇, 陈大福, 郑燕珍, 付中民, 王海朋, 耿四海, 陈华枝, 周丁丁, 吴素珍, 石彩云, 郭睿. 意大利蜜蜂幼虫肠道的 miRNAs 的生物信息学预测及分析. *应用昆虫学报*, 2018, 55(6): 1023–1033.
- [47] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(7): 522–531.
- [48] Ha MJ, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(8): 509–524.
- [49] Yan HB, Huang JC, Chen YR, Yao JN, Cen WN, Li JY, Jiang YF, Chen G, Li SH. Role of miR-1 expression in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): a bioinformatics study based on GEO, ArrayExpress microarrays and TCGA database. *Pathology-Research and Practice*, 2018, 214(2): 195–206.
- [50] Tang YH, Zheng JY, Sun Y, Wu ZG, Liu ZM, Huang GZ. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *International Heart Journal*, 2009, 50(3): 377–387.
- [51] Fullaondo A, Lee SY. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 267–273.
- [52] Shrinet J, Jain S, Jain J, Bhatnagar RK, Sunil S. Next generation sequencing reveals regulation of distinct *Aedes* microRNAs during chikungunya virus development. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8(1): e2616.
- [53] Chen DF, Du Y, Chen HZ, Fan YC, Fan XX, Zhu ZW, Wang J, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Diao QY, Guo R. Comparative identification of microRNAs in *Apis cerana cerana* workers' midguts in response to *Nosema ceranae* invasion. *Insects*, 2019, 10(9): 258.

- [54] Li YY, Zhang R, Liu SL, Donath A, Peters RS, Ware J, Misof B, Niehuis O, Pfrender ME, Zhou X. The molecular evolutionary dynamics of oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes in Hymenoptera. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, 17: 269.
- [55] Evison SE. Chalkbrood: epidemiological perspectives from the host-parasite relationship. *Current Opinion in Insect Science*, 2015, 10: 65–70.
- [56] Xiong CL, Du Y, Wang HQ, Zheng YZ, Fu ZM, Wang HP, Zhang L, Chen DF, Guo R. Unraveling the mechanism regulating the *Ascospaera apis*-resistance difference between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* larvae based on comparative transcriptome analysis. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(5): 106–114. (in Chinese)
熊翠玲, 杜宇, 王鸿权, 郑燕珍, 付中民, 王海朋, 张璐, 陈大福, 郭睿. 基于比较转录组学分析揭示中华蜜蜂及意大利蜜蜂幼虫的球囊菌抗性差异机制. *中国农业大学学报*, 2019, 24(5): 106–114.
- [57] Keehnen NLP, Rolff J, Theopold U, Wheat CW. Insect antimicrobial defences: a brief history, recent findings, biases, and a way forward in evolutionary studies. *Advances in Insect Physiology*, 2017, 52: 1–33.
- [58] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 697–743.
- [59] Zhang L, Hou DX, Chen X, Li DH, Zhu LY, Zhang YJ, Li J, Bian Z, Liang XY, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang TF, Zhu DH, Zhang DM, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen JQ, Wang J, Wang M, Zhang QP, Zhang JF, Zen K, Zhang CY. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, 2012, 22(1): 107–126.
- [60] Zhu KG, Liu MH, Fu Z, Zhou Z, Kong Y, Liang HW, Lin ZG, Luo J, Zheng HQ, Wan P, Zhang J, Zen KF, Chen J, Hu FL, Zhang CY, Ren J, Chen X. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, 2017, 13(8): e1006946.

Unraveling the mechanism underlying the immune responses of *Apis mellifera ligustica* to *Nosema ceranae* stress based on small RNA omics analyses

Huazhi Chen[#], Cuiling Xiong[#], Zhiwei Zhu, Jie Wang, Xiaoxue Fan, Haibin Jiang, Yuanchan Fan, Jieqi Wan, Jiaxuan Lu, Yanzhen Zheng, Zhongmin Fu, Guojun Xu, Dafu Chen, Rui Guo^{*}

College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To reveal the mechanism underlying immune responses of *Apis mellifera ligustica* to *Nosema*

Supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J05042), by the Teaching and Scientific Research Fund of Education Department of Fujian Province (JAT170158), by the Outstanding Scientific Research Manpower Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (xjq201814), by the Scientific and Technical Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017342, CXZX2017343) and by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (3165602032, 3155006018)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: ruiquo@fafu.edu.cn

Received: 12 October 2019; Revised: 24 December 2019; Published online: 19 May 2020

ceranae stress at small RNA transcriptome level based on deep sequencing and omics analysis. **[Methods]** *A. m. ligustica* workers' midguts at 7 and 10 days post *N. ceranae* stress (Am7T, Am10T) and corresponding normal midguts (Am7CK, Am10CK) were sequenced using small RNA-seq. Related bioinformatic softwares were used to perform quality control of sequencing data, identification of known miRNAs and novel miRNAs and analysis of structural features of miRNAs. The expression of novel miRNAs was verified by Stem-loop RT-PCR. Differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) in Am7CK vs. Am7T and Am10CK vs. Am10T comparison groups were screened out following the standards of $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$ and $P \leq 0.05$. Target mRNAs of DEmiRNAs were predicted followed by annotation in GO and KEGG databases using softwares, based on annotation information, summary and investigation of cellular and humoral immune-associated pathways and enriched target mRNAs were conducted. Regulatory networks of DEmiRNAs and differentially expressed mRNAs (DEmRNAs) related to immune pathways were constructed according to target binding relationship. RT-qPCR was performed to validate the sequencing data and differential expression of DEmiRNAs. **[Results]** Here, 165895574 raw reads and 132028990 clean tags were yielded, and average Pearson correlation coefficients among different biological replicas in every group were above 87.92%. 928 known miRNAs and 56 novel miRNAs were identified. The length of these miRNAs was among 18–28 nt, with the most abundant length 18 nt and 22 nt; the first base of most miRNAs had a U bias. The true expression of 12 novel miRNAs was verified. 48 up-regulated miRNAs and 36 down-regulated miRNAs were identified in Am7CK vs. Am7T, while 56 up-regulated miRNAs and 51 down-regulated miRNAs were identified in Am10CK vs. Am10T. These DEmiRNAs can respectively target 9827 and 10720 mRNAs, involving in 50 and 47 functional terms and 138 and 135 pathways. Analysis of regulatory networks of DEmiRNAs and target mRNAs related to immune pathways showed 26 DEmiRNAs in Am7CK vs. Am7T could target 10 DEmRNAs such as endocytosis, whereas 15 DEmiRNAs in Am10CK vs. Am10T can target 10 immune-associated pathways including MAPK signaling pathway. The reliability of sequencing data and differential expression trend of four DEmiRNA was validated. **[Conclusion]** Host DEmiRNAs may response to *N. ceranae* through regulating material and energy metabolisms, as well as cellular and humoral immune, but might not regulate the expression of antimicrobial peptide-encoded genes; miR-1-z was likely to participate in cell proliferation, apoptosis and immune processes; oxidative phosphorylation pathway may play a special role in host immune response and host-pathogen interaction.

Keywords: *Apis mellifera ligustica*, *Nosema ceranae*, microRNA, immune response, host-pathogen interaction, molecular mechanism

(本文责编: 李磊)