



蜜蜂球囊菌的 microRNA 鉴定及其调控网络分析

郭睿^{1#}, 王海朋^{1#}, 陈华枝¹, 熊翠玲¹, 郑燕珍¹, 付中民¹, 赵红霞², 陈大福^{1*}

¹福建农林大学蜂学学院, 福建 福州 350002

²广东省生物资源应用研究所, 广东 广州 510260

摘要:【目的】本研究利用 small RNA-seq 技术对球囊菌的纯培养进行测序, 对球囊菌的 microRNAs (miRNAs) 进行预测、鉴定和分析, 进而构建 miRNAs-mRNAs 的调控网络。【方法】利用 Illumina HiSeq Xten 平台对球囊菌菌丝与孢子进行测序, 通过相关生物信息学软件对球囊菌的 miRNAs 进行预测和分析, 通过茎环(Stem-loop) PCR 对部分 miRNAs 进行鉴定, 利用 Cytoskype 软件构建 miRNAs-mRNAs 的调控网络。【结果】本研究共获得 48268696 条 clean reads, 预测出 118 个球囊菌的 miRNAs, 它们的长度分布介于 18–25 nt 之间, 不同长度的 miRNA 的首位碱基偏好性差异明显。Stem-loop PCR 验证结果显示共有 10 个 miRNAs 能够扩增出符合预期的目的片段, 说明多数 miRNAs 可能真实存在。共预测出 6529 个球囊菌 miRNAs 的靶基因, 其中 5725 个能够注释到 Nr、Swissprot、KOG、GO 和 KEGG 数据库。进一步分析结果显示有 24 个靶基因注释在 MAPK 信号通路。Cytoskype 软件分析结果显示球囊菌的 miRNAs 与 mRNAs 之间存在复杂的调控网络, 绝大多数的 miRNAs 处于调控网络的内部且同时结合多个 mRNAs。【结论】本研究率先对球囊菌的 miRNAs 及 miRNAs-mRNAs 调控网络进行全面分析, 研究结果丰富了对球囊菌 miRNAs 的认识, 为其基础生物学信息提供了有益补充, 也为阐明球囊菌致病的分子机理打下了一定基础。

关键词: 蜜蜂, 球囊菌, microRNA, 靶基因, 调控网络

蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌) 特异性侵染蜜蜂幼虫而导致白垩病。该病作为典型的蜜蜂真菌性病害, 给世界各国养蜂业造成较大损失^[1]。近 20 年来, 国内外学者在球囊菌的分

类鉴定^[2]、形态学^[3]、病理学^[4]、流行病学^[5]、侵染过程^[6]、免疫防御^[7]及疾病防治^[8]等方面开展了一系列研究, 但其生长发育机制和致病机理仍缺乏分子水平的深入研究^[9], 相关组学研究^[10]也十

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

*通信作者。Tel/Fax: +86-591-83726835; E-mail: dfchen826@fafu.edu.cn

#并列第一作者。

收稿日期: 2017-11-02; 修回日期: 2018-01-18; 网络出版日期: 2018-01-31

分有限。2006年,球囊菌基因组的公布^[11]为其分子生物学及组学研究奠定了基础。本课题组前期组装并注释了球囊菌的参考转录组^[12],利用转录组数据大规模挖掘球囊菌的SSR位点^[13],并对胁迫不同抗性蜜蜂肠道球囊菌的基因表达谱和转录组变化进行了全面解析^[14-15]。

真核生物基因组编码大量的具有功能的非编码RNA(non-coding RNAs, ncRNAs)。根据长度,ncRNAs可分为长度小于200 nt的小RNA,如microRNA(miRNA),以及长度大于200 nt的长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)^[16]。miRNA通过序列互补配对与靶mRNA的特定区域结合,从而下调其表达水平或使其降解^[17]。近年来,随着高通量测序技术与生物信息学方法的快速发展和融合,大量的动植物miRNAs被预测和鉴定出来^[18-19]。2010年, Lee等通过深入分析QDE-2蛋白相关的小RNA,鉴定出粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中的miRNA及5种小RNA的生物合成途径^[20],这是有关真菌miRNA研究的首例报道。此后,在核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)^[21]、绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)^[22]、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)^[23]和新月弯孢菌(*Curvularia lunata*)^[24]等真菌中也陆续预测出miRNAs。Liu等利用Illumina HiSeq技术对*C. lunata*的分生孢子和菌丝进行测序,预测出1012个已注释miRNAs和48个未注释miRNAs,并基于生物信息学分析结果推测这些miRNAs的靶基因在分子孢子的萌发和菌丝生长过程发挥重要作用^[24]。Lin等利用small RNA-seq(sRNA-seq)技术对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)感染后6个时间点的水稻叶片上的菌丝进行测序,预测出177个*R. solani*的miRNAs,并通过miRNA的靶基因分析得到15个候选的致病miRNAs^[25]。然而对于球囊菌,至今仍无miRNA及其孢子萌

发、菌丝生长和致病性等方面作用的相关研究报道。为最大限度地预测和鉴定球囊菌的miRNAs,本研究在前期研究基础上利用sRNA-seq技术对实验室条件下培养的球囊菌菌丝和孢子混合样品进行测序,结合生物信息学和分子生物学方法对球囊菌的miRNA进行预测、分析及鉴定,进而构建球囊菌的miRNAs-mRNAs调控网络。研究结果可为球囊菌的基础生物学信息提供有益的补充,也为在分子水平阐明其致病的分子机理打下一定基础。

1 材料和方法

1.1 供试球囊菌

本研究使用的球囊菌菌株由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护学实验室保存并活化。

1.2 主要试剂及仪器

Small RNA文库构建试剂盒NEB Next Ultra small RNA Sample Library Prep Kit for Illumina RNA为美国NEB公司产品。抽提试剂盒和Superscript II Reverse Transcriptase为日本TaKaRa公司产品。DNA marker为广东东盛生物科技有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司,超低温冰箱购自日本Panasonic电器公司,PCR仪购自美国Bio Rad公司,核酸电泳槽为北京六一生物科技有限公司产品,凝胶成像仪为上海培清科技有限公司产品,超微量核酸浓度测定仪Nanodrop 2000为美国Thermo Fisher公司产品。

1.3 测序样品准备、small RNA文库构建及深度测序

参照陈大福等^[26]的方法对球囊菌进行活化。将实验室保存的球囊菌菌株接种至马铃薯葡萄糖琼

脂(PDA)培养基,置于 37 °C 生化箱恒温培养 10 d,待培养皿中黑色孢子囊和白色菌丝较多时,在超净台中将孢子囊和菌丝刮至无菌 EP 管,随后立即将 EP 管放入液氮速冻,再转移至超低温冰箱保存备用。为最大限度地预测和鉴定球囊菌的 miRNAs,本研究选取球囊菌菌丝和孢子的混合样品作为测序对象。上述测序样品设 3 个生物学重复(Aa-1、Aa-2、Aa-3)。

委托北京百迈克生物科技有限公司对上述 3 个样品进行单端测序。测序平台为 Illumina Hiseq Xten。本研究测得的转录组数据已上传美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库, BioProject 号: PRJNA395108。

1.4 生物信息学分析

1.4.1 测序数据质控与评估:使用 Qubit 2.0 对文库的浓度进行检测,将文库浓度稀释至 1 ng/μL,使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对 insert size 进行检测,使用 qPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。测序得到的原始序列含有接头序列或低质量序列,为了保证信息分析的准确性,按如下标准对原始数据进行质量控制:

(1) 对于每个样本,将碱基质量值小于 20 的和碱基数量超过 50%的 reads 序列去掉;(2) 去除未知碱基 N 含量大于等于 10%的 reads;(3) 去除没有 3'接头序列的 reads;(4) 剪切掉 3'接头序列,去除短于 18 或长于 30 个核苷酸的序列,从而得到高质量序列(clean reads)。

1.4.2 sRNA 分类注释及参考基因组比对:利用 Bowtie 软件^[27],将 clean reads 分别与 Silva、GtRNadb、Rfam 及 Rfam 数据库进行序列比对,过滤核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核内小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA)等 ncRNA 以及重复序列,获得包含 miRNA 的 unannotated

reads。利用 Bowtie 软件将 unannotated reads 与参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=ascosphaera%20apis>)进行序列比对,获取在参考基因组上的位置信息,即为 mapped reads。

1.4.3 miRNA 预测与分析:利用 miRDeep2 软件^[28]将比对到参考基因组上的 reads 与 miRBase 数据库中的已知 miRNA 前体序列进行比对,来鉴定已知 miRNA 的表达。同时,通过 reads 比对到基因组上的位置信息得到可能的前体序列,基于 reads 在前体序列上的分布信息及前体结构能量信息,采用贝叶斯模型经打分最终实现新 miRNA 的鉴定。对各样本中 miRNA 进行表达量的统计,并用 TPM 算法^[29]对表达量进行归一化处理。

1.4.4 miRNA 靶基因预测、分析及调控网络构建:根据已知 miRNA 和新预测的 miRNA (novel miRNA)与对应物种的基因序列信息,利用 TargetFinder 软件^[30]进行靶基因预测。利用 BLAST 软件将预测靶基因序列与 Nr、Swiss-Prot、KOG、GO、KEGG 和 Pfam 数据库比对,获得靶基因的注释信息。利用 Cytoskype 软件^[31]构建 miRNA-mRNA 调控网络。

1.4.5 Novel miRNA 的茎环(Stem-loop)PCR 验证:利用 RNA 抽提试剂盒(TaKaRa,日本)提取球囊菌的总 RNA。参照 Chen 等^[32]的方法,利用 DNAMAN 软件(Lynnon Biosoft 公司,美国)设计 novel miRNA 的 Stem-loop 引物、上游引物和下游引物,设计好的引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。利用 Stem-loop 引物,按照 cDNA 第一链合成试剂盒(TaKaRa,日本)说明书进行 miRNA 的反转录,反转录得到的 cDNA 作为模板进行常规 PCR。PCR 体系(20 μL)包括:cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL,PCR mix 10 μL,无菌水 7 μL。PCR 程序如下:95 °C 5 min;95 °C 50 s,

49 °C 50 s , 72 °C 50 s , 35 个循环 ; 72 °C 10 min。
PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果和分析

2.1 sRNA-seq 数据的质控与评估

实验室条件下活化的球囊菌如图 1 所示。球囊菌菌丝与孢子样品的 sRNA-seq 共产生 70612299 条 raw reads , 过滤低质量、含 N、长度小于 18 nt 和大于 30 nt 的 reads 后, 得到 48268696 条 clean reads , 平均 Q30 达到 98.75% (表 1)。上述结果说明本研究得到的高通量测序数据质量良好, 可用于下一步分析。将各样品的 clean reads 比对球囊菌的参考基因组, 平均比对上的 reads 数约为 2732116 条, 平均比对率约为 52.66% (表 2)。

2.2 球囊菌 miRNA 的预测与分析

利用 miRDeep2 软件, 通过 reads 比对到参考基因组上的位置和二级结构预测, 共预测出 118 个球囊菌的 miRNAs。这些 miRNAs 长度分布介于 18–25 nt 之间, 其中, 分布在 20、22 和 23 nt 长度的 miRNA 数最多(图 2-A)。miRNA 的碱基偏好性分析结果显示, 不同长度的 miRNA 的首位碱基偏好性差异明显, 如长度为 18 nt、19 nt 和 23 nt 的 miRNAs 首位碱基多为 C (45.00%–66.67%), 长度为 20 nt 和 22 nt 的 miRNAs 首位碱基多为 A 和 G (57.89%–63.16%), 长度为 24 nt 的 miRNAs 首位碱基多为 A 和 U (62.50%) (图 2-B)。随机挑选 12 个

miRNAs 进行 stem-loop PCR 验证, 电泳结果显示共有 10 个 miRNAs (conservative_AZGZ01000001.1_1600, conservative_AZGZ01000001.1_170, conservative_AZGZ01000002.1_13849, conservative_AZGZ01000004.1_33180, conservative_AZGZ01000005.1_36837, conservative_AZGZ01000006.1_39913, conservative_AZGZ01000006.1_40023, conservative_AZGZ01000006.1_40522, conservative_AZGZ01000007.1_42036, conservative_AZGZ01000007.1_42616) 能够扩增出符合预期的目的片段(图 3), 说明本研究预测出的球囊菌 miRNA 中有相当比例可能真实存在。本研究使用的引物序列详见表 3。

2.3 球囊菌 miRNA 的靶基因的预测及功能注释

利用 TargetFinder 软件对预测出的 118 个球囊菌 miRNAs 的靶基因进行预测, 共预测出 6529 个靶基因。BLAST 比对结果显示, 共有 5725 个靶基因获得注释信息, 能够注释到 Nr 数据库、Swissprot 数据库、KOG 数据库、GO 数据库和 KEGG 数据库的靶基因数量分别为 5720、4191、3719、3202 和 2716 个。



图 1. 实验室条件下的球囊菌纯培养
Figure 1. *Ascospaera apis* pure culture under laboratory condition.

表 1. sRNA-seq 数据统计

Table 1. Overview of sRNA-seq datasets

Samples	Raw reads	Low quality	Containing 'N' reads	Length<18	Length>30	Clean reads	Q30/%
Aa-1	28107459	0	0	6826867	1254478	20026114	98.71
Aa-2	18958888	0	0	7620276	844015	10494597	98.84
Aa-3	23545952	0	0	3464066	2333901	17747985	98.69

表 2. sRNA-seq 数据比对参考基因组信息统计

Table 2. Mapping of sRNA-seq data to the reference genome of *A. apis*

Samples	Total reads	Mapped reads	Mapping ratio/%
Aa-1	12372063	5451506	44.06
Aa-2	1872934	1071438	57.21
Aa-3	2951258	1673403	56.70

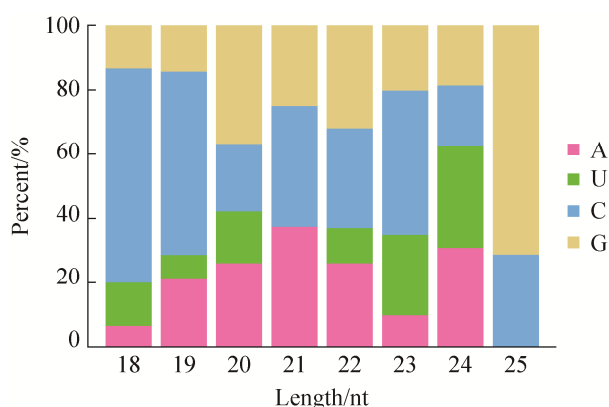
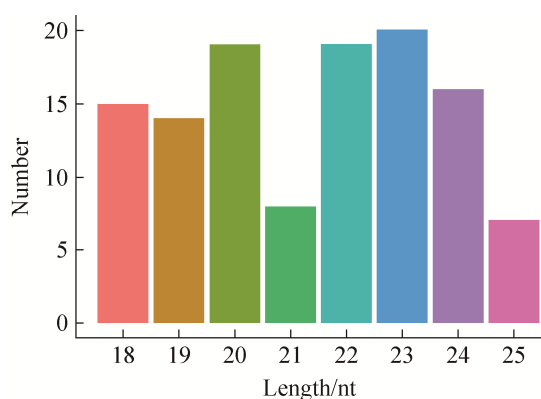


图 2. 球囊菌 miRNAs 的特征分析

Figure 2. Analysis of characteristics of *A. apis* miRNAs. A: Length distribution of *A. apis* miRNA; B: First nucleotide bias of *A. apis* miRNA.

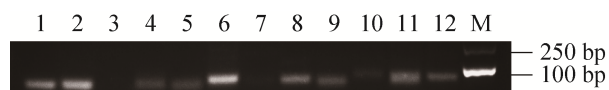


图 3. 球囊菌 novel miRNAs 的 stem-loop PCR 鉴定

Figure 3. Identification of novel miRNAs of *A. apis* via stem-loop PCR. M: DNA marker.

表 3. 本研究使用的引物

Table 3. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence
Loop-1	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGCATTTTCG
Loop-2	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGGCCTCAAT
Loop-4	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGCCACTTCA
Loop-5	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGGGGAAGA
Loop-6	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGAAGCACAC
Loop-8	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGCTCAAAGA
Loop-9	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGCAACTGAG
Loop-10	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGGTGGTTGC
Loop-11	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGCTTTTCTT
Loop-12	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGGAGCCCAC
Aa-1F	ATGGATTGGAGATCC
Aa-2F	CACTTGGTGTCCGCGTC
Aa-4F	GAAGAAGGTCTGTTGTT
Aa-5F	TCTGCATCAGTGAATC
Aa-6F	GAGGATGTCGCTGT
Aa-8F	GCGGCTCTGGGAGGATA
Aa-9F	TTGCCGTCGGAGAGAC
Aa-10F	GTGGTATCGTC
Aa-11F	AGAACGTTGAGGCTG
Aa-12F	CGGGTGGGTG
Aa-R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT

KOG 数据库注释结果显示, 上述靶基因注释到 RNA 加工与修饰和信号转导机制等 26 个直系同源蛋白家族(图 4), 其中, 注释到一般性功能预测的靶基因最多(551 genes), 其次为翻译、核糖体结构及生物合成(252 genes), 氨基酸转运及新陈代

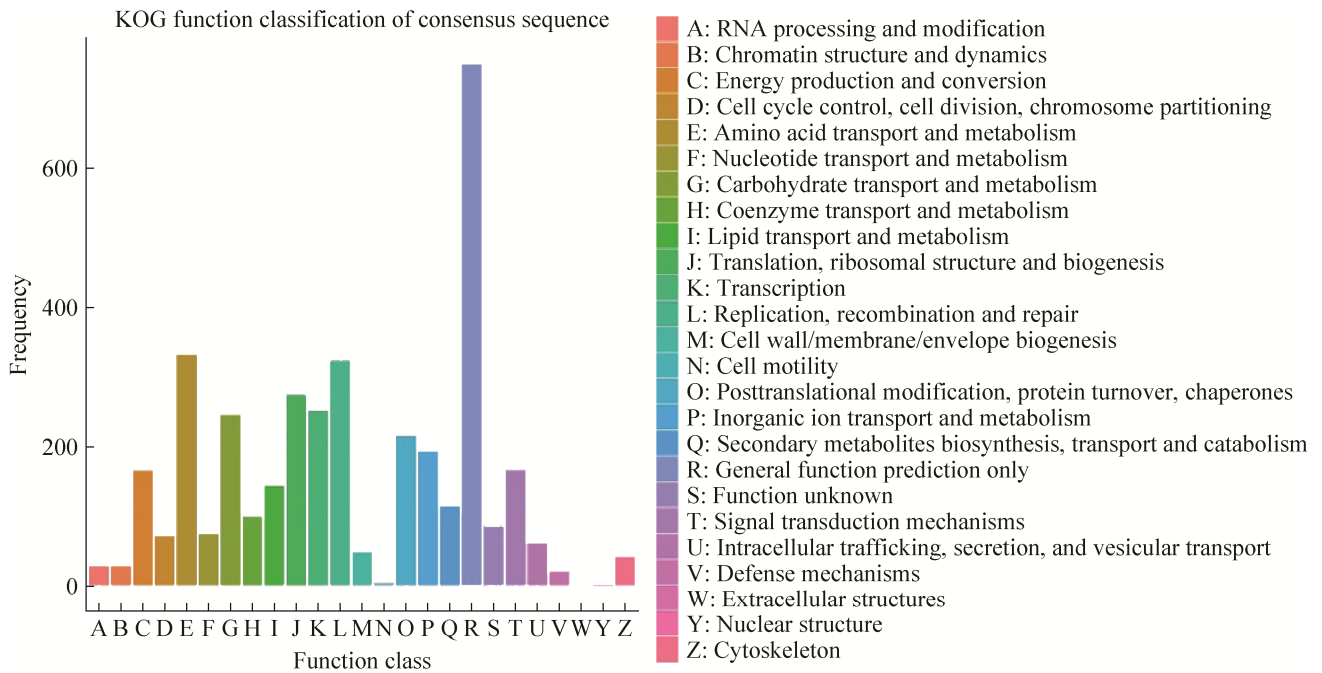


图 4. 球囊菌 miRNAs 的靶基因的 KOG 数据库注释

Figure 4. KOG database annotation of target genes of *A. apis* miRNAs.

谢(180 genes), 翻译(150 genes), 碳水化合物转运及新陈代谢(143 genes), 复制、重组及修复(142 genes), 说明球囊菌的 miRNAs 参与糖类和蛋白质等物质代谢过程、生物信息传递过程的调控。GO 数据库注释结果显示, 上述靶基因涉及 42 个 GO 条目, 注释基因数最多的是代谢进程(2258 genes)、氧化磷酸化(1492 genes)、细胞进程(1846 genes)、结合(1513 genes)、单一组织进程(1408 genes)、细胞组件(1246 genes)、细胞(1243 genes)、细胞器(849 genes)、细胞膜(582 genes)、大分子复合物(537 genes), 说明球囊菌的 miRNAs 在细胞组分、分子功能和生物学进程等方面发挥广泛的调控作用(图 5)。KEGG 数据库注释结果显示, 上述靶基因注释到 99 个 pathways 上, 注释基因数最多的是氨基酸的生物合成(103 genes)、核糖体(89 genes)、剪接体(74 genes)、蛋白质的内质网加工(63 genes)、

RNA 转运(61 genes)、减数分裂(49 genes)、RNA 降解(48 genes)、氧化磷酸化(45 genes)、过氧化物酶体(43 genes)和泛素介导的蛋白水解(42 genes)等(图 6-A), 说明球囊菌的 miRNAs 在调控物质和能量代谢等方面发挥重要功能。进一步分析发现, 有 24 个球囊菌 miRNAs 的靶基因富集在 MAPK 信号通路(图 6-B), 说明球囊菌的 miRNAs 对该通路具有调控作用。

进一步利用靶向关系构建球囊菌的 miRNAs-mRNAs 调控网络, 结果显示仅 conservative_AZGZ01000009.1_44970 结合 1 个靶基因(gene794), 其余 117 个 miRNAs 均能结合 3 个及以上的靶基因。利用 Cytoscape 软件对上述调控网络进行可视化, 结果显示绝大多数 miRNAs 处于调控网络的内部且与多个靶基因靶向结合, 球囊菌的 miRNAs 与 mRNAs 之间存在复杂的调控网络(图 7)。

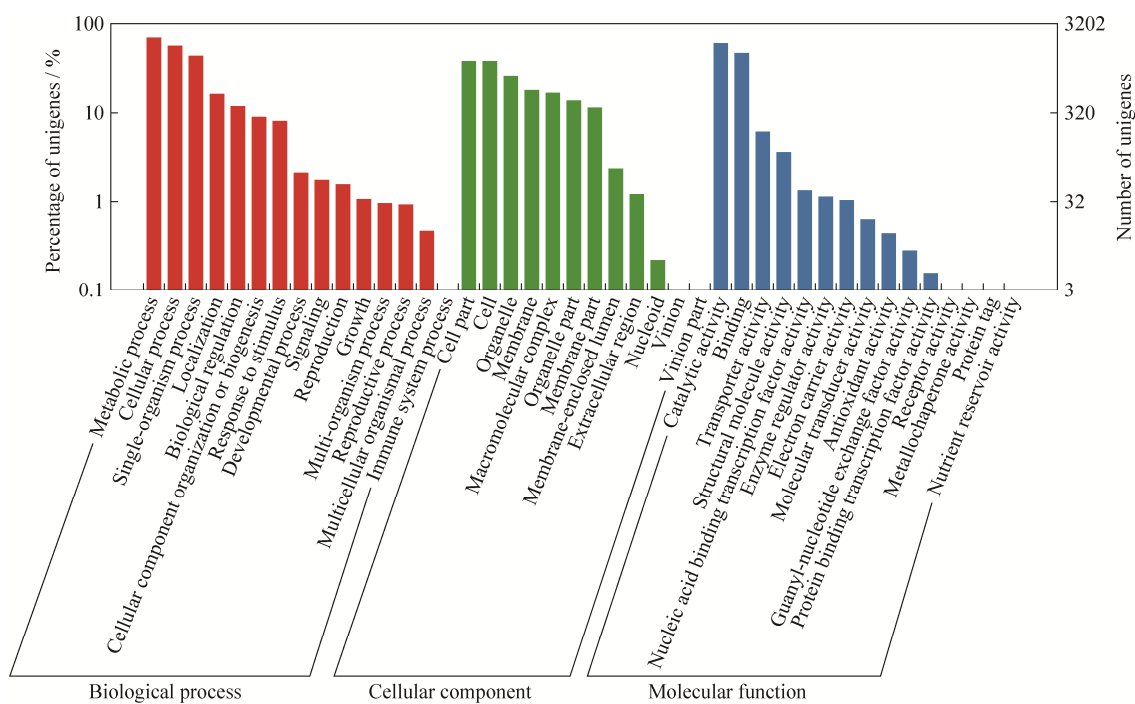


图 5. 球囊菌 miRNAs 的靶基因的 GO 数据库注释

Figure 5. GO database annotation of target genes of *A. apis* miRNAs.

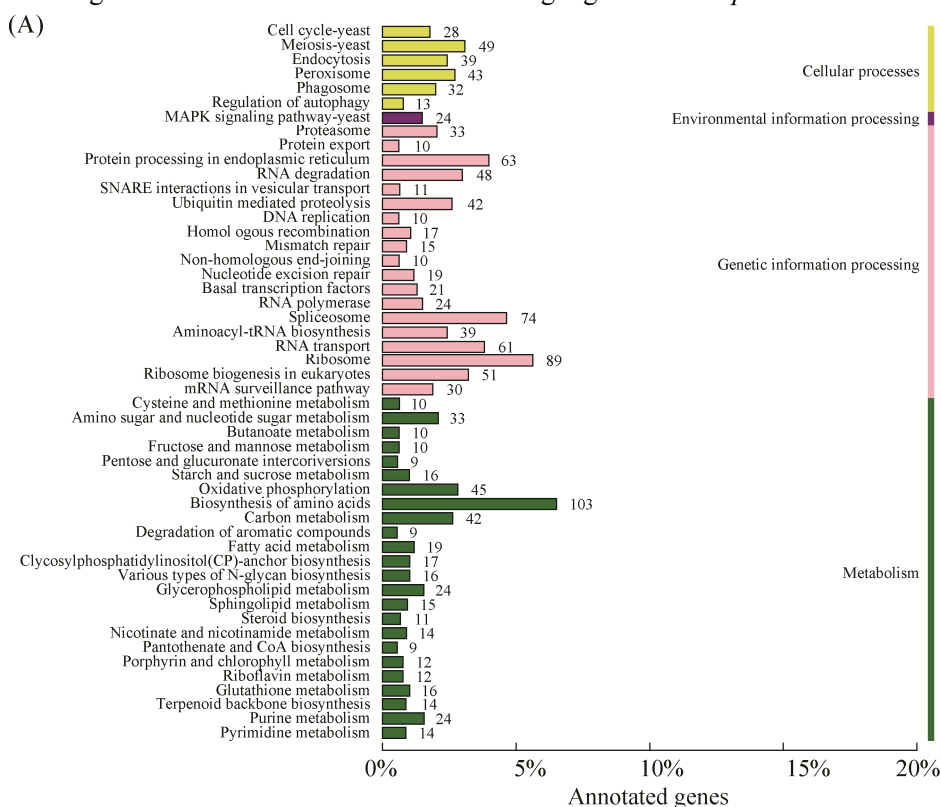


图 6. 球囊菌 miRNAs 的靶基因的 KEGG 数据库注释

Figure 6. KEGG database annotation of target genes of *A. apis* miRNAs. A: Pathway annotation; B: General map of MAPK signaling pathway.

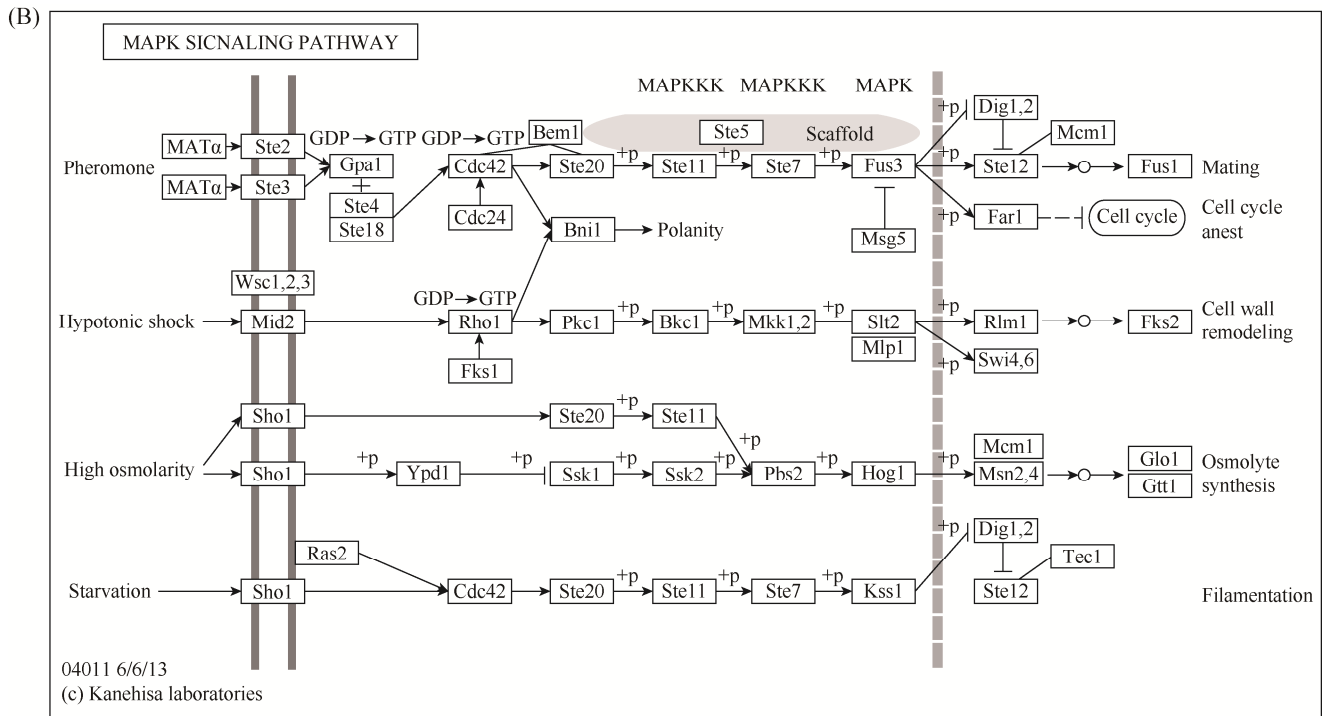


Figure 6. Continued.

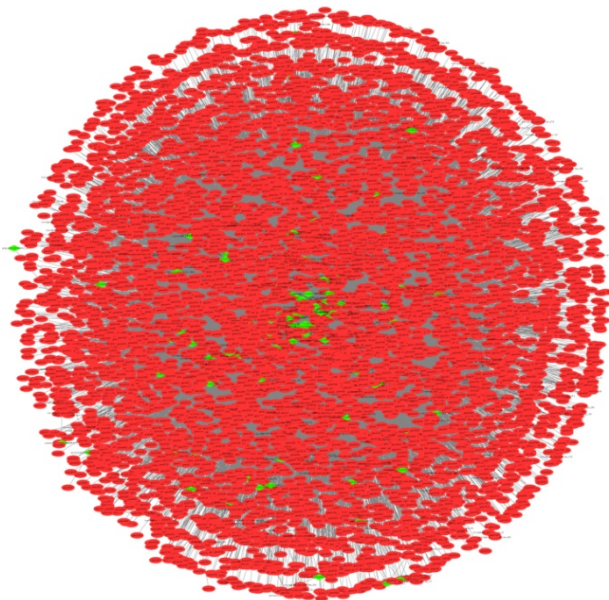


图 7. 球囊菌的 miRNAs-mRNAs 调控网络
Figure 7. miRNAs-mRNAs regulation networks in *A. apis*. Red ovals indicate *A. apis* mRNAs, and green rhombuses indicate *A. apis* miRNAs.

3 讨论

目前，miRNA 已被证明广泛存在于多种真菌^[20, 22-24, 33-36]。Huang 等利用 RNA-seq 技术对东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)感染的西方蜜蜂中肠进行测序，结合 real-time PCR 技术鉴定出 6 个 *N. ceranae* 的 miRNAs^[36]。本研究利用 sRNA-seq 技术对实验室纯培养的球囊菌菌丝和孢子进行测序，基于高质量的测序数据预测出 118 个 miRNAs，RT-PCR 验证结果显示随机选取的 12 个 miRNAs 中有 10 个成功扩增出目的片段，成功扩增率达到 83.33%，初步表明预测出的多数 miRNAs 真实存在。本研究预测出的 miRNAs 丰富了球囊菌的 miRNA 信息，可为深入研究球囊菌 miRNAs 在孢子萌发、菌丝生长、侵染和增殖过程中的功能提供重要的参考信息。

本研究中, 球囊菌 miRNAs 的靶基因注释到多达 2433 个 GO 条目, 涉及细胞组分(2364 genes)、分子功能(5114 genes)和生物学进程(4675 genes)的诸多方面。其中, 有 43 个靶基因注释到包括菌丝生长(21 genes)在内的 12 个生长相关的 GO 条目; 有 27 个靶基因注释到包括分生孢子发育(3 genes)在内的 9 个发育相关的 GO 条目; 有 8 个靶基因注释到包括有性生殖(1 gene)在内的 4 个增殖相关 GO 条目; 有 157 个基因注释到包括胁迫应答(13 genes)在内的 49 个应激反应相关 GO 条目; 有 348 个基因注释到包括翻译起始调控(15 genes)在内的 156 个生物学调控相关 GO 条目。上述结果表明 miRNAs 广泛参与球囊菌的生长、发育、增殖和应激等生命活动的调控。KEGG 数据库注释结果显示, 有 54 个靶基因参与球囊菌的 11 条氨基酸代谢通路, 包括酪氨酸代谢(4 genes)、色氨酸代谢(6 genes)和组氨酸代谢(1 gene)等; 有 105 个靶基因参与球囊菌的 13 条碳水化合物代谢通路, 包括淀粉和蔗糖代谢(16 genes)、肌醇磷酸盐代谢(3 genes)和三羧酸循环(2 genes)等; 有 66 个靶基因参与球囊菌的 7 条脂代谢通路, 包括甘油磷脂代谢(24 genes)、类固醇的生物合成(11 genes)和花生四烯酸代谢(2 genes)等; 有 38 个靶基因参与球囊菌的 2 条核苷酸代谢通路, 包括嘌呤代谢(24 genes)和嘧啶代谢(14 genes)。上述结果表明相应的 miRNAs 在球囊菌的物质代谢方面具有重要的调控功能。此外, 还发现 57 个靶基因参与球囊菌的 3 条能量代谢通路, 分别为氧化磷酸化(45 genes)、硫代谢(7 genes)和氮代谢(5 genes), 表明相应的 miRNAs 参与球囊菌的能量代谢调控。本研究中, 分别有 10、119 和 270 个靶基因富集在 DNA 复制、RNA 转录及蛋白质翻译, 表明相应的 miRNAs 在球囊菌的生物信息的传递过程具有重要的调控作用。

昆虫的消化道上皮围食膜和体壁的角质层一般由几丁质和蛋白质组成, 对于昆虫保护体内器官和抵御病原入侵至关重要^[37]。昆虫病原真菌感染宿主主要依靠酶的降解和机械压力的联合作用^[38]。郑志阳等结合 SDS-PAGE 技术和酶的活性染色方法对健康和白垩病患病蜜蜂幼虫血淋巴进行检测, 发现后者的血淋巴中含有多种蛋白酶和脂酶活性^[39]。本研究发现, 球囊菌 miRNAs 的靶基因中含有多达 24 种蛋白酶编码基因, 包括 ATP 依赖的蛋白酶编码基因(gene5852)、半胱氨酸蛋白酶编码基因(gene2062)和自体吞噬的丝氨酸蛋白酶编码基因(gene1853)等; 含有 18 种脂酶编码基因, 例如磷脂酶 B 编码基因(gene1981)、分泌性脂酶编码基因(gene908)和胞外脂酶编码基因(gene4284)等。几丁质酶是昆虫病原真菌的重要毒力因子^[40]。本研究中, 球囊菌 miRNAs 的靶基因包含 4 个几丁质酶编码基因, 分别为内切几丁质酶 1 编码基因(gene1223)、类型几丁质酶编码基因(gene2593)及几丁质酶 3 编码基因(gene2594, gene5143); 推测球囊菌的 miRNAs 可通过调控蛋白酶和脂酶基因的表达水平影响蛋白酶和脂酶的分泌, 从而促进其在宿主体内的增殖过程。

MAPK 信号通路在真菌致病性及响应环境胁迫方面作用关键^[41]。前期研究发现, 对于胁迫意蜂幼虫的球囊菌, 有 48 个差异表达基因(DEGs)富集在 MAPK 信号通路上且都呈现出上调趋势^[15], 说明该通路在球囊菌胁迫意蜂幼虫的过程中被激活而表现活跃; 但对于胁迫中蜂幼虫的球囊菌, 有 11 个 DEGs 富集在 MAPK 信号通路且都呈现出下调趋势^[14], 说明该通路在球囊菌胁迫中蜂幼虫的过程中受到抑制; 基于前期研究结果, 我们推测 MAPK 信号通路在意蜂幼虫、中蜂幼虫的球囊菌抗性差异方面扮演重要角色, 不同抗性

蜜蜂幼虫可能通过与球囊菌的互作调控其 MAPK 信号通路。本研究发现球囊菌 miRNAs 的靶基因中有 2 个(gene3094, gene3824)富集在 MAPK 信号通路,其中 MAPK 激酶激酶编码基因(gene3094)受到多达 12 个 miRNAs 的靶向调控,包括 conservative_AZGZ01000009.1_44870、conservative_AZGZ01000016.1_10151 和 conservative_AZGZ01000017.1_11003 等;MAPK 激酶激酶 3 编码基因(gene3824)受到 3 个 miRNAs 的靶向调控,分别为 conservative_AZGZ01000046.1_35555、unconservative_AZGZ01000004.1_33206 和 conservative_AZGZ01000007.1_42616;上述结果表明球囊菌的多个 miRNAs 参与 MAPK 信号通路的调控,这些 miRNAs 在球囊菌的侵染和增殖过程、球囊菌与蜜蜂幼虫互作过程中的功能有待于进一步研究。本研究仅对球囊菌的菌丝和孢子进行了测序,研究结果可揭示 miRNAs 与球囊菌的功能或代谢通路的潜在关联性,若要在组学水平深入解析球囊菌 miRNAs 的表达谱和变化规律,则需要对球囊菌胁迫的不同时间点的蜜蜂幼虫肠道进行测序,测序获得的混合数据经过滤后与本研究获得的 miRNA 数据进行比较分析,进而对差异表达 miRNAs 进行靶基因预测及分析,这是下一步的工作重点。

一个 miRNA 可同时靶向调控多个靶基因,一个靶基因也能同时被多个 miRNAs 靶向调控^[18]。本研究中,Cytoscape 软件分析结果显示绝大多数的球囊菌 miRNAs 处于调控网络的内部(图 7)且同时与多个 mRNAs 存在靶向结合关系,球囊菌的 miRNAs-mRNAs 间存在复杂的调控关系,推测 miRNAs 作为球囊菌的关键调控因子,在其生命活动中扮演重要角色。综而述之,本研究利用 sRNA-seq 技术对球囊菌的菌丝和孢子进行深度测

序,对球囊菌的 miRNAs 进行了预测、分析、鉴定以及 miRNAs-mRNAs 的调控网络构建。研究结果丰富了对球囊菌 miRNAs 的认识,为其基础生物学信息提供了有益补充,也为阐明球囊菌致病的分子机理打下了一定基础。

参考文献

- [1] Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103: S20–S29.
- [2] Lumsch HT, Huhndorf SM. Outline of Ascomycota. *Myconet*, 2007, 13: 1–58.
- [3] Chorbiński P. Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*. *Medycyna Weterynaryjna*, 2003, 59(11): 1019–1022.
- [4] Winston ML. The biology of the honeybee. Cambridge: Harvard University Press, 1991.
- [5] Flores JM, Spivak M, Gutiérrez I. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Veterinary Microbiology*, 2005, 108(1/2): 141–144.
- [6] Theantana T, Chantawannakul P. Protease and β -N-acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 2008, 47(1): 68–76.
- [7] Evans JD, Spivak M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103: S62–S72.
- [8] Hornitzky M. Literature review of chalkbrood. A report for the rural industries research and development corporation. Publication No. 01/150, Kingston: ACT, 2001.
- [9] Aronstein KA, Murray KD, de León JH, Qin X, Weinstock GM. High mobility group (HMG-box) genes in the honeybee fungal pathogen *Ascosphaera apis*. *Mycologia*, 2007, 99(4): 553–561.
- [10] Cornman RS, Bennett AK, Murray KD, Evans JD, Elisk CG, Aronstein K. Transcriptome analysis of the honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*: implications for host pathogenesis. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 285–298.
- [11] Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 715–718.
- [12] Zhang ZN, Xiong CL, Xu XJ, Huang ZJ, Zheng YZ, Luo Q, Liu M, Li WD, Tong XY, Zhang Q, Liang Q, Guo R, Chen DF. *De novo* assembly of a reference transcriptome and

- development of SSR markers for *Ascosphaera apis*. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(1): 34–44. (in Chinese)
- 张墨楠, 熊翠玲, 徐细建, 黄积隼, 郑燕珍, 骆群, 刘敏, 李汶东, 童新宇, 张琦, 梁勤, 郭睿, 陈大福. 蜜蜂球囊菌的参考转录组 *de novo* 组装及 SSR 分子标记开发. *昆虫学报*, 2017, 60(1): 34–44.
- [13] Li WD, Xiong CL, Wang HQ, Hou ZX, Tong XY, Zhang L, Fu ZM, Zheng YZ, Chen DF, Guo R. Large scale development of SSR molecular markers of *Ascosphaera apis* based on RNA-seq data. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 46(4): 434–438. (in Chinese)
- 李汶东, 熊翠玲, 王鸿权, 侯志贤, 童新宇, 张璐, 付中民, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿. 基于 RNA-seq 数据大规模挖掘蜜蜂球囊菌的 SSR 分子标记. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2017, 46(4): 434–438.
- [14] Guo R, Chen DF, Huang ZJ, Liang Q, Xiong CL, Xu XJ, Zheng YZ, Zhang ZN, Xie YN, Tong XY, Hou ZX, Jiang LL, Dao C. Transcriptome analysis of *Ascosphaera apis* stressing larval gut of *Apis cerana cerana*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(12): 1865–1878. (in Chinese)
- 郭睿, 陈大福, 黄积隼, 梁勤, 熊翠玲, 徐细建, 郑燕珍, 张墨楠, 解彦玲, 童新宇, 侯志贤, 江亮亮, 刀晨. 球囊菌胁迫中华蜜蜂幼虫肠道过程中病原的转录组学研究. *微生物学报*, 2017, 57(12): 1865–1878.
- [15] Chen DF, Guo R, Xiong CL, Liang Q, Zheng YZ, Xu XJ, Huang ZJ, Zhang ZN, Zhang L, Li WD, Tong XY, Xi WJ. Transcriptomic analysis of *Ascosphaera apis* stressing larval gut of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(4): 401–411. (in Chinese)
- 陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 梁勤, 郑燕珍, 徐细建, 黄积隼, 张墨楠, 张璐, 李汶东, 童新宇, 席伟军. 胁迫意大利蜜蜂幼虫肠道的球囊菌的转录组分析. *昆虫学报*, 2017, 60(4): 401–411.
- [16] St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The landscape of long non-coding RNA classification. *Trends in Genetics*, 2015, 31(5): 239–251.
- [17] Lucas KJ, Zhao B, Liu SP, Raikhel AS. Regulation of physiological processes by microRNAs in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 2015, 11: 1–7.
- [18] Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [19] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(Database issue): D154–D158.
- [20] Lee HC, Li LD, Gu WF, Xue ZH, Crosthwaite SK, Pertsemliadis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 2010, 38(6): 803–814.
- [21] Zhou JH, Fu YP, Xie JT, Li B, Jiang DH, Li GQ, Cheng JS. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Molecular Genetics & Genomics*, 2012, 287(4): 275–282.
- [22] Zhou Q, Wang ZX, Zhang J, Meng HM, Huang B. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biology*, 2012, 116(11): 1156–1162.
- [23] Kang K, Zhong JS, Jiang L, Liu G, Gou CY, Wu Q, Wang Y, Luo J, Gou DM. Identification of microRNA-like RNAs in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by solexa sequencing. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76288.
- [24] Liu T, Hu J, Zuo YH, Jin YZ, Hou JM. Identification of microRNA-like RNAs from *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot by bioinformatics analysis and deep sequencing. *Molecular Genetics & Genomics*, 2016, 291(2): 587–596.
- [25] Lin RM, He LY, He JY, Qin PG, Wang YR, Deng QM, Yang XT, Li SC, Wang SQ, Wang WM, Liu HN, Li P, Zheng AP. Comprehensive analysis of microRNA-Seq and target mRNAs of rice sheath blight pathogen provides new insights into pathogenic regulatory mechanisms. *DNA Research*, 2016, 23(5): 415–425.
- [26] Chen DF, Guo R, Xiong CL, Liang Q, Zheng YZ, Xu XJ, Zhang ZN, Huang ZJ, Zhang L, Wang HQ, Xie YN, Tong XY. Transcriptome of *Apis cerana cerana* larval gut under the stress of *Ascosphaera apis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(13): 2614–2623. (in Chinese)
- 陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 梁勤, 郑燕珍, 徐细建, 张墨楠, 黄积隼, 张璐, 王鸿权, 解彦玲, 童新宇. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌早期胁迫的转录组学. *中国农业科学*, 2017, 50(13): 2614–2623.
- [27] 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, R25.
- [28] 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.
- [29] Fahlgrén N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ,

- Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of *miRNA* genes. *PLoS One*, 2007, 2(2): e219.
- [30] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Carrington JC. microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121(2): 207–221.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Raman V, Simon SA, Romag A, Demirci F, Mathioni SM, Zhai JX, Meyers BC, Donofrio NM. Physiological stressors and invasive plant infections alter the small RNA transcriptome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 326–344.
- [34] Jiang N, Yang YP, Janbon G, Pan J, Zhu XD. Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52734.
- [35] Chen Y, Gao QX, Huang MM, Liu Y, Liu ZY, Liu X, Ma ZH. Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12500.
- [36] Huang Q, Evans JD. Identification of microRNA-like small RNAs from fungal parasite *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 107–109.
- [37] Guo R, Wang SM, Xue RY, Cao GL, Hu XL, Huang ML, Zhang YQ, Lu YH, Zhu LY, Chen F, Liang Z, Kuang SL, Gong CL. The gene expression profile of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals cypovirus-associated variations in host gene transcript levels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(12): 5175–5187.
- [38] Du Y, Xiong CL, Shi XL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu XJ, Chen DF, Guo R. Transcriptome analysis of differentially expressed genes in *Ascosphaera apis* stressing the 6-day-old larval gut of *Apis mellifera ligustica*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(7): 1119–1128. (in Chinese)
杜宇, 熊翠玲, 史秀丽, 郑燕珍, 付中民, 徐细建, 陈大福, 郭睿. 意大利蜜蜂 6 日龄幼虫肠道内球囊菌的差异表达基因分析. *浙江农业学报*, 2017, 29(7): 1119–1128.
- [39] Zheng ZY, Li JH, Liang Q, Chen DF. *Ascosphaera apis* secretes multiple extracellular enzymes to infect honeybee larvae. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2011, 40(3): 280–284. (in Chinese)
郑志阳, 李江红, 梁勤, 陈大福. 蜜蜂球囊菌分泌多种胞外酶侵染蜜蜂幼虫. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2011, 40(3): 280–284.
- [40] Liu PH, Zhou G, Chen DF, Liang Q. Effects of metal ions on the activity of the chitinase from *Ascosphaera apis*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2008, 37(1): 96–98. (in Chinese)
刘鹏虎, 周刚, 陈大福, 梁勤. 金属离子对蜜蜂球囊菌几丁质酶活力的影响. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2008, 37(1): 96–98.
- [41] Rodríguez-Peña JM, García R, Nombela C, Arroyo J. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*, 2010, 27(8): 495–502.

Identification of *Ascosphaera apis* microRNAs and investigation of their regulation networks

Rui Guo^{1#}, Haipeng Wang^{1#}, Huazhi Chen¹, Cuiling Xiong¹, Yanzhen Zheng¹, Zhongmin Fu¹, Hongxia Zhao², Dafu Chen^{1*}

¹ College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

² Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] In this study, pure culture of *A. apis* was sequenced using sRNA-seq technology, followed by prediction, identification and analysis of *A. apis* microRNAs. The microRNAs-mRNAs regulation network was further constructed. **[Methods]** Illumina Hiseq Xten platform was used to sequence mycelium and spores of *A. apis*, and corresponding softwares were used to predict and analyze *A. apis* microRNAs, some of which were identified via Stem-loop PCR. Cytoskype software was used to construct *A. apis* microRNAs-mRNAs regulation network. **[Results]** A total of 48268696 clean reads were obtained, and 118 miRNAs of *A. apis* were predicted, whose length was distributed between 18 nt and 25 nt. The preference of the first base of miRNAs with different length was obviously various. Stem-loop PCR result showed target fragments with expected sizes were amplified from 10 microRNAs, implying most of the predicted microRNAs' true existence. In total, 6529 target genes of *A. apis* microRNAs were predicted, and among them 5725 could be annotated in Nr, Swissprot, KOG, GO and KEGG databases. Further investigation demonstrated 24 target genes were annotated in MAPK signaling pathway. Cytoskype software analysis suggested complicated regulation networks exist between microRNAs and mRNAs in *A. apis*, and majority of miRNAs inside the networks bind to several mRNAs. **[Conclusion]** Our findings enrich the understanding of *A. apis* microRNAs, provide beneficial supplement for basic biology information of *A. apis*, and lay some foundation for illustrating the molecular mechanism regulating the pathogenesis of this widespread fungal pathogen.

Keywords: honeybee, *Ascosphaera apis*, microRNA, target gene, regulation network

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31702190), by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), by the Teaching and Scientific Research Fund of Education Department of Fujian Province (JAT170158), by the Scientific and Technical Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017343) and by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (201610389053)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-83726835; E-mail: dfchen826@fafu.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 2 November 2017; Revised: 18 January 2018; Published online: 31 January 2018

陈大福, 博士, 副教授, 硕士生导师。现任福建农林大学蜂学学院副院长; 农业部现代农业产业技术体系(蜂)岗位科学家; 中国养蜂学会蜜蜂保护专业委员会副主任; 中国蜂产品协会蜂产品生产专业委员会副主任。主要从事蜜蜂病害防治方面的教学与科研, 所在课题组长期致力于蜜蜂病原微生物及其与蜜蜂的互作机制研究, 主持或参与国家自然科学基金项目等国家级和省级项目多项, 发表学术论文 50 余篇, 参加全国高等农林院校“十一五”规划教材 3 部教材及 4 部著作的编写工作。

