



中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 microRNA 应答分析

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^{*}

福建农林大学蜂学学院, 福建 福州 350002

摘要:【目的】蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌)是一种能够侵染中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)幼虫的致死性真菌病原。微小 RNA (microRNA, miRNA)可通过在转录后水平靶向抑制或降解 mRNA 而参与宿主与病原互作过程。本研究旨在对球囊菌胁迫的中蜂 6 日龄幼虫肠道的差异表达 miRNA (DEmiRNA)及其靶基因进行深入分析, 进而揭示 DEmiRNA 在中蜂响应球囊菌胁迫应答过程中的作用。【方法】利用 Illumina MiSeq 平台对正常及球囊菌胁迫的中蜂 6 日龄幼虫肠道(AcCK 和 AcT)进行测序, 通过相关生物信息学软件预测 DEmiRNA 及其靶基因。通过 Blast 将靶基因注释到 GO 和 KEGG 数据库。利用 Cytoscape 软件构建 DEmiRNA 与其靶 mRNA 的调控网络。通过 Stem-loop RT-PCR 和 qPCR 验证测序数据的可靠性。【结果】本研究共预测出 537 个 miRNA, 其长度分布介于 16–35 nt 之间, 且不同长度的 miRNA 首位碱基偏向性差异明显。通过 Stem-loop RT-PCR 证实了 10 个 novel miRNA 的表达。AcCK vs AcT 比较组共有 54 个 DEmiRNA, 包含 31 个上调和 23 个下调 miRNA, 可分别靶向结合 6170 和 8199 个靶基因。GO 分类结果显示上调和下调 miRNA 的靶基因分别涉及 47 和 47 个条目, 富集基因数最多的皆为结合细胞进程和催化活性。KEGG 代谢通路(pathway)富集分析结果表明上调和下调 miRNA 的靶基因分别富集在 134 和 126 条 pathway, 富集基因数最多的均为内吞作用和内质网中的蛋白质加工。调控网络分析结果表明, DEmiRNA 及其靶 mRNA 形成十分复杂的调控关系; 31 个 DEmiRNA 可靶向结合 51 个与泛素介导的蛋白水解相关的 mRNA, 18 个 DEmiRNA 可靶向结合 14 个与 Jak-STAT 信号通路相关的 mRNA; miR-1277-x、miR-26-x、miR-27-y、miR-30-x、miR-6052-x 等 16 个 miRNA 共同参与了上述两条免疫通路的调控。最后, 随机挑选 3 个 DEmiRNA 进行 qPCR 验证, 结果证明了测序数据的可靠性。【结论】本研究提供了中蜂幼虫肠道在球囊菌胁迫后期的 miRNA 的表达

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(CXZX2017342, CXZX2017343); 福建省大学生创新创业训练计划(201610389053, 201810389082, 201810389029)

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。Tel/Fax: +86-591-87640197; E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-12; 修回日期: 2018-11-15; 网络出版日期: 2018-11-29

谱和差异表达信息,揭示了球囊菌与宿主之间在 miRNA 组学水平存在复杂的互动。miR-6052-x 和 miR-1277-x 作为调控网络的核心可能通过影响细胞凋亡参与宿主的免疫防御,miR-26-x 和 miR-30-x 可能通过调控 Jak-STAT 信号通路参与宿主的胁迫应答。本研究筛选出的关键 DE miRNA 有望作为治疗白垩病的分子靶标。

关键词: 中华蜜蜂, 幼虫, 球囊菌, microRNA, 靶基因, 调控网络

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)是东方蜜蜂(*Apis cerana*)的指名亚种,也是我国特有的蜜蜂种质资源,具有不可替代的生态和经济价值。相比于西方蜜蜂(*Apis mellifera*),中蜂具有抗螨害、耐寒、善于利用零星蜜粉源等优点^[1]。蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌)特异性感染蜜蜂幼虫而导致白垩病,其孢子随食物被蜜蜂幼虫摄入后进入中肠,因此时中肠与后肠隔绝,孢子处于低水平萌发状态;至幼虫到预蛹的过渡期,中肠与后肠连通,孢子进入后肠接触氧气后剧烈萌发;菌丝开始大量生长,相继穿透肠壁和体壁,最终蔓延包裹幼虫全身,形成白垩病虫尸^[2]。该病能引起成年蜜蜂数量和蜂群生产力的严重下降,给养蜂生产造成巨大损失^[3]。此外,球囊菌对成年熊蜂(*Bumblebee*)^[4]和中蜂幼虫^[5]也具有侵染性。笔者所在课题组近期从中蜂雄蜂白垩状幼虫尸体中分离出球囊菌,在形态学和分子生物学水平对其进行了鉴定,并通过交叉感染证明球囊菌对中蜂雄蜂和工蜂幼虫也具有侵染性^[5]。白垩病在自然界中常见于意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)蜂群,仅偶尔发生于中蜂蜂群。

真核生物的基因组编码大量具有功能的非编码 RNA (non-coding RNAs, ncRNAs),其中 microRNA (miRNA)是一类长度约为 18–25 nt 的小 RNA,通过与靶基因 3' UTR 的特异性结合,导致靶基因的降解或者抑制,在转录后水平对基因表达产生负调控^[6],从而广泛参与调控生物体的生长

发育、新陈代谢、应激反应及免疫防御等各类生命活动^[6–7]。近年来,高通量测序技术已被广泛应用于动物^[8]、植物^[9]和微生物^[10]的 miRNA 相关研究。Winter 等^[11]发现冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)体内的 4 种 miRNA 通过显著差异表达降低宿主对疟原虫(*Plasmodium*)感染的敏感性。Wu 等^[12]发现家蚕(*Bombyx mori*)幼虫被家蚕质型多角体病毒(BmCPV)感染后,过表达 bmo-miR-278-3p 可显著抑制宿主胰岛素相关肽结合蛋白基因 *IBP2* 的表达,并促进病毒的复制过程。相比于蚊子和家蚕等模式生物,蜜蜂的 miRNA 研究较为滞后,并且主要集中在西方蜜蜂的级型分化^[13]、劳动分工^[14]、神经发育^[15]以及免疫防御^[16]等方面。Ashby 等^[13]研究发现 miR-bantam、miR-184 和 miR-315 参与了西方蜜蜂的细胞分化、组织结构重塑以及级型分化等过程。Evans 等^[16]研究发现东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)来源的 miRNA 可靶向结合 918 个西方蜜蜂体内的 mRNA,并主要涉及调控宿主的新陈代谢、细胞凋亡和免疫防御等过程。但对于 miRNA 在中蜂幼虫与球囊菌互动中的作用,至今仍无相关研究报道。

蜜蜂肠道既是食物消化、营养吸收、能量代谢及其与病原互作的主要场所,同时也是球囊菌寄生和增殖的部位。蜜蜂的幼虫期为 1–6 日龄,前期研究发现,被球囊菌侵染的 6 日龄大幼虫虽不表现出明显的白垩病症状^[17],但因临近疾病暴发,此时宿主的转录组变化能更好地体现宿主与

病原之间的复杂互作。因此,本研究利用 small RNA-seq (sRNA-seq)技术对正常及球囊菌胁迫的中蜂 6 日龄幼虫肠道进行测序,通过生物信息学和分子生物学方法对中蜂幼虫肠道的差异表达 miRNA (DEmiRNA)进行预测、分析及鉴定,进而预测 DEmiRNA 的靶基因并构建二者间的调控网络。研究结果可为深入认识球囊菌与中蜂幼虫的互作机制提供新的思路和线索,同时为球囊菌抗性相关 miRNA 的功能研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 供试蜜蜂幼虫及球囊菌

中蜂幼虫取自福建农林大学蜂学学院教学蜂场。球囊菌菌株由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护实验室保存并活化。

1.2 测序样品准备

中蜂幼虫的人工饲养和球囊菌接种参照陈大福等的方法^[18]进行。简述如下:用移虫针将 2 日龄幼虫移入预置 50 μ L 饲料(35 $^{\circ}$ C 预温)的无菌的 24 孔细胞培养板,35.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C、90%相对湿度(RH)条件下饲养。每隔 24 h 更换饲料。处理组 3 日龄幼虫饲喂含球囊菌孢子的饲料(终浓度为 1×10^7 个孢子/mL),对照组 3 日龄幼虫饲喂不含球囊菌孢子的正常饲料,此后所有幼虫均饲喂正常饲料。

在超净工作台中分别剖取 6 日龄幼虫整个肠道组织,处理组(AcT: AcT-1、AcT-2、AcT-3)和对照组(AcCK: AcCK-1、AcCK-2、AcCK-3)均设置 3 个生物学重复。剖取的幼虫肠道每 9 只放于 1 个 RNA-Free 的 EP 管中,经液氮速冻后迅速转移至-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存备用。

为验证处理组确为球囊菌侵染,设计并合成

球囊菌的特异性 Ste11-like 引物,分别提取上述 AcCK 和 AcT 样品的总 RNA,反转录得到 cDNA 作为模板进行 PCR 鉴定,PCR 反应程序如下:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。同时以球囊菌纯培养作为阳性对照,无菌水为阴性对照。

1.3 sRNA-seq、测序数据质控与评估及 DEmiRNA 的预测

委托广州基迪奥生物科技有限公司对上述 6 个肠道样品进行单端测序,测序平台为 Illumina MiSeq。本研究测得的数据已上传美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库, BioProject 号: PRJNA395108。

参照笔者所在课题组前期已建立的方法^[19]对测序数据进行质控和评估。为排除球囊菌测序数据的干扰,首先通过 Bowtie 软件将质控后的非注释标签序列(unannotated tags)映射(mapping)球囊菌参考基因组(assembly AAP 1.0),过滤 mapped tags,并将 unmapped tags 比对到东方蜜蜂参考基因组(assembly ACSNU-2.0),得到相关 tags 在参考基因组上的位置信息。利用 miRDeep2 软件^[20]将 mapped tags 与 miRBase 数据库中的 miRNA 前体序列进行比对,得到前体序列并鉴定 miRNA 的表达,然后通过 TPM (tags per million)算法公式($TPM=T\times 10^6/N$, T 代表单个 miRNA 的 tags, N 代表总 miRNA 的 tags)对所有 miRNA 的表达量进行归一化处理。筛选 DEmiRNA (AcCK vs AcT)的标准为 $|\log_2\text{Fold change}|\geq 1$ 且 $P\leq 0.05$ 。分别统计上调和下调 miRNA 的 $\log_2\text{Fold change}$ 值,利用 OmicShare 在线工具集合(www.omicshare.com)中的 heatmap 工具进行表达量聚类分析,采用默认参数。

1.4 DEmiRNA 的靶基因预测、分析及调控网络构建

联用 RNAhybrid (v2.1.2)+svm_light (v6.01)、Miranda (v3.3a)、TargetScan (Version: 7.0)软件^[21]对 DEmiRNA 进行靶基因预测。通过 BLAST 将预测出的靶基因序列与 GO 和 KEGG 数据库进行比对, 获得靶基因的功能注释信息。根据 DEmiRNA 与靶基因的结合关系构建二者的调控网络, 通过 Cytoscape 软件对调控网络进行可视化。

1.5 Novel miRNA 的 Stem-loop RT-PCR 和 DEmiRNA 的 qPCR 验证

利用 RNA 抽提试剂盒(TaKaRa, 日本)提取中蜂幼虫肠道的总 RNA。参照 Chen 等^[22]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, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。本研究所用引物序列详见表 1。利用 Stem-loop 引物经反转录得到 cDNA, 作为模板进行 PCR

表 1. 本研究使用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primer ID	Sequence (5'→3')
Ste11-like F	GGGAAGATTGCCAGGCC
Ste11-like R	CAAACCTGTAGTCCGGATG
Loop-novel-m0001-3p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGAAGAACG
Loop-novel-m0004-5p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGTTTCAGC
Loop-novel-m0005-5p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACACCACG
Loop-novel-m0008-3p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAAGTGCA
Loop-novel-m0014-3p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAAGAGAG
Loop-novel-m0017-5p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTCGGCAA
Loop-novel-m0020-5p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTCCTCCC
Loop-novel-m0025-5p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAATTAAT
Loop-novel-m0039-5p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACCACTG
Loop-novel-m0054-3p	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGAAATTA
Loop-miR-6497-x	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCGACACG
Loop-miR-4968-y	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGCTGCTG
Loop-miR-3793-x	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGCCAGG
novel-m0001-3p-F	TCGTTCTGGTAAAC
novel-m0004-5p-F	GTGATGGCACA
novel-m0005-5p-F	CGCGTGCAAGTT
novel-m0008-3p-F	CCTGCTATCGGTACT
novel-m0014-3p-F	ACTGTCGATGGATAG
novel-m0017-5p-F	AACGCGACCGATTA
novel-m0020-5p-F	GTGGGAGGATTG
novel-m0025-5p-F	TAAATAGATTTA
novel-m0039-5p-F	TGTGCATCATCGAT
novel-m0054-3p-F	TTTATTCAAAGTAT
miR-6497-x-F	GAGGAGCGGGG
miR-4968-y-F	CAGCAGCAGCAG
miR-3793-x-F	AGCGTGTTTTTC
R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGAAATTA
AcU6-F	GTTAGGCTTTGACGATTTTCG
AcU6-R	GGCATTCTCCACCAGGTA

扩增。PCR 体系为: 上下游引物(1.67 $\mu\text{mol/L}$)和 cDNA 模板各 1 μL , PCR mix 10 μL , 无菌水 7 μL 。PCR 程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用胶回收试剂盒纯化 100 bp 附近的片段, 连接 pMD-19T 载体, 转化 TG1 大肠杆菌后挑斑摇菌, 将菌液 PCR 阳性的菌液送南京金斯瑞生物科技公司进行单端测序。

qPCR 检测采用 SYBR Green 法在 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统(ABI 公司, 美国)中进行, 反应体系为: SYBR Green Dye 10 μL , 上下游引物(1.67 $\mu\text{mol/L}$)以及 cDNA 模板各 1 μL , Rox 0.44 μL , DEPC 水补至 20 μL 。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s。以 U6 作为内参, 所选 miRNA 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式进行计算。对每个生物学重复样品进行 3 次技术重复。最后通过 Graph Prism 5 软件进行相关数据处理及绘图。

2 结果和分析

2.1 中蜂幼虫肠道内球囊菌的侵染情况鉴定

对 AcCK 和 AcT 样品进行 PCR 鉴定, 电泳结果显示 AcT 和阳性对照均可扩增出符合预期的目的片段(约 217 bp), 而 AcCK 和阴性对照均未扩增(图 1), 表明本研究中的处理组样品确为球囊菌侵

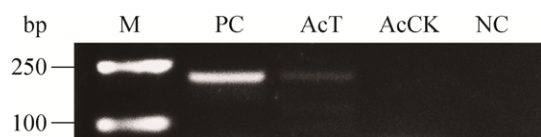


图 1. 中蜂幼虫肠道内球囊菌的 PCR 鉴定

Figure 1. PCR identification of *Apis ascospaera* in the larval guts of *Apis cerana cerana*. Lane M: DNA marker; lane PC: positive control; lane NC: negative control.

染的幼虫肠道, 对照组样品不含球囊菌; 处理组和对照组样品可用于高通量测序。

2.2 数据质控与评估

中蜂幼虫肠道样品 AcCK 和 AcT 测序共得到 33366276 和 29069559 条 raw reads, 经过滤和质控分别得到 28183943 和 26176445 条 clean reads (表 2), 占 raw reads 的比例均在 83.20% 以上。上述结果说明本研究的测序数据质量良好, 可用于进一步分析。将各样品的 clean reads 比对东方蜜蜂的参考基因组, mapped reads 平均数为 1992886 (21.76%)。

2.3 中蜂幼虫肠道 miRNA 的预测与分析

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 537 个 miRNA, 它们的长度分布介于 16–35 nt 之间。其中, 分布在 22 和 23 nt 长度的 miRNA 数量最多(图 2-A)。miRNA 的首位碱基偏向性分析结果显示, 不同长度的 miRNA 的首位碱基偏向性具有明显差异。长度为 18–26 nt 的 miRNA 的首位碱基多为 U, 长度为 27 nt、28 nt 和 29 nt 的 miRNA 的首位碱基多为 C, 长度为 30 nt 的 miRNA 的首位碱基多为 G (图 2-B)。

本研究共预测出 65 个 novel miRNA, 随机挑选 11 个进行 Stem-loop PCR 验证, 电泳结果显示共有 10 个 novel miRNA 能够扩增出符合预期的目的片段(图 3-A), 说明本研究预测出的多数 miRNA

表 2. 本研究中的 sRNA-seq 数据信息统计

Table 2. Summary of sRNA-seq datasets information in this study

Samples	Raw reads	Clean reads/%
AcCK-1	10611126	8828377 (83.20)
AcCK-2	9932874	8401872 (84.59)
AcCK-3	12822276	10953694 (85.43)
AcT-1	9095104	8286341 (91.11)
AcT-2	10062074	8948199 (88.93)
AcT-3	9912381	8941905 (90.21)

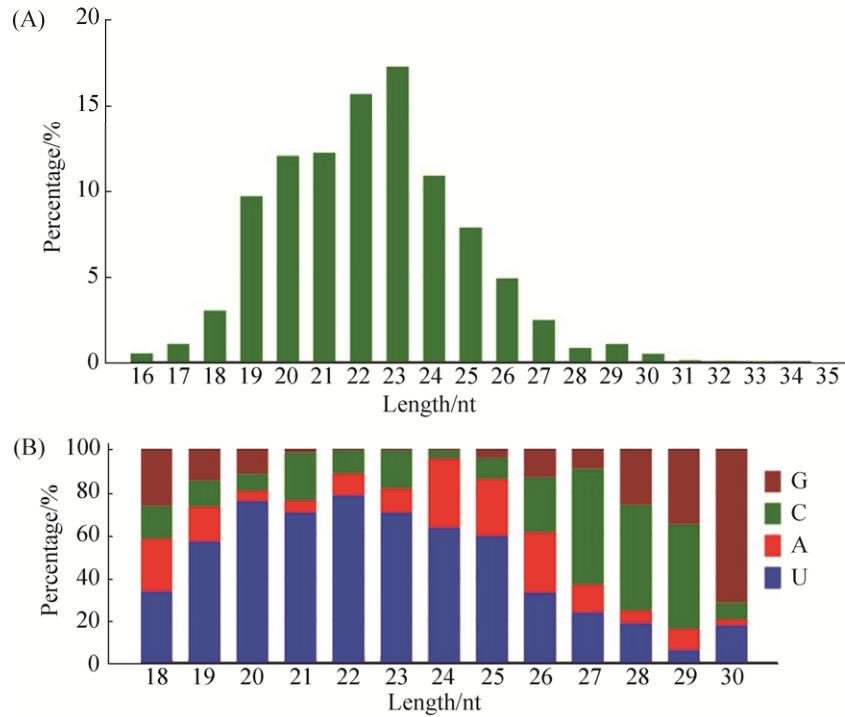


图 2. 中蜂幼虫肠道 miRNA 的特征分析

Figure 2. Characteristics analysis of miRNAs in *Apis cerana cerana* larval gut. A: Length distribution of miRNAs in *Apis cerana cerana* larval gut; B: First nucleotide bias of miRNAs in *Apis cerana cerana* larval gut.

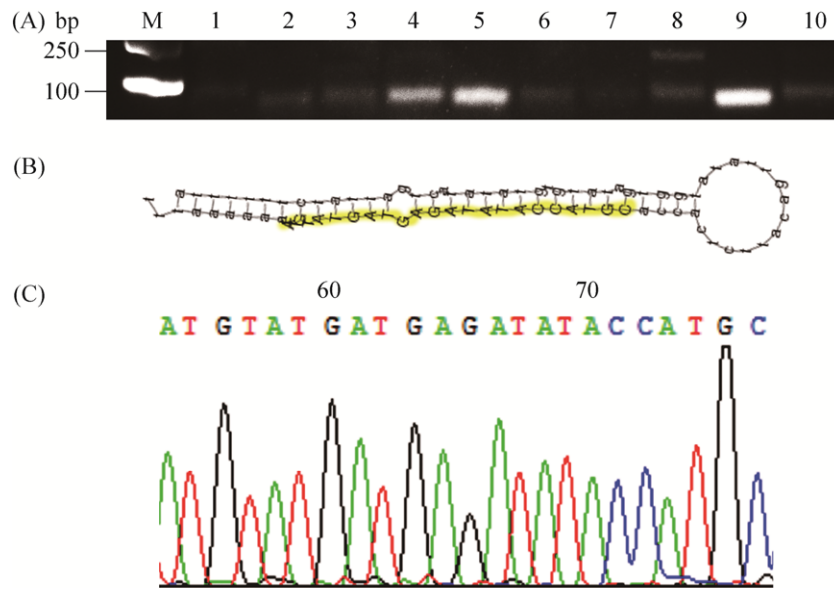


图 3. 中蜂幼虫肠道的 novel miRNA 鉴定

Figure 3. Identification of novel miRNA in the larval gut of *Apis cerana cerana*. A: agarose gel electrophoresis of amplification products from Stem-loop PCR of novel miRNA. lane M: DNA marker; lane 1: novel-m0001-3p; lane 2: novel-m0004-5p; lane 3: novel-m0005-5p; lane 4: novel-m0008-3p; lane 5: novel-m0014-3p; lane 6: novel-m0017-3p; lane 7: novel-m0020-3p; lane 8: novel-m0025-5p; lane 9: novel-m0039-5p; lane 10: novel-m0054-3p. B: secondary structure of novel-m0025-5p precursor, yellow regions indicate the mature sequences. C: Sanger sequencing of novel-m0025-5p.

真实存在。回收 novel-m0025-5p 的 100 bp 附近的片段并进行 TA 克隆, Sanger 测序结果显示与 novel-m0025-5p 序列一致(图 3-B), 再次证实了测序结果。

2.4 中蜂幼虫肠道 DEmiRNA 的预测及分析

AcCK vs AcT 共包含 54 个 DEmiRNA, 其中上调和下调 miRNA 的数量分别为 31 和 23 个。表达量聚类分析结果显示, miR-1344-x、miR-143-y、novel-m0044-5p 上调幅度较大, 差异变化倍数的对数值(\log_2 Fold change)分别达到 15.96、12.91 和 12.78 (图 4-A); miR-4577-y、miR-4968-y、miR-1777-x 下调幅度较大, \log_2 Fold change 分别为-11.18、-9.86 和-8.61 (图 4-B)。

2.5 中蜂幼虫肠道 DEmiRNA 的靶基因的预测及分析

利用 TargetFinder 软件进行中蜂幼虫肠道

DEmiRNA 的靶基因预测, 上调 miRNA 和下调 miRNA 分别预测出 6170 和 8199 个靶基因。GO 分类结果显示, 上述靶基因可注释到生物学进程、细胞组分及分子功能的诸多条目(term)。其中, 上调 miRNA 的 1719 个靶基因富集在 47 个 GO term, 富集靶基因数最多的前 10 位分别是结合、细胞进程、催化活性、代谢进程、单组织进程、细胞、细胞组件、生物学调控、细胞膜; 下调 miRNA 的 2350 个靶基因富集在 47 个 GO term, 其中富集靶基因数最多的前 10 位与上调 miRNA 的靶基因富集的 GO term 一致。此外, 对于上调 miRNA 和下调 miRNA, 富集在应激反应的靶基因数分别为 180 和 219 个, 富集在免疫系统进程的靶基因数分别为 4 和 6 个(图 5)。

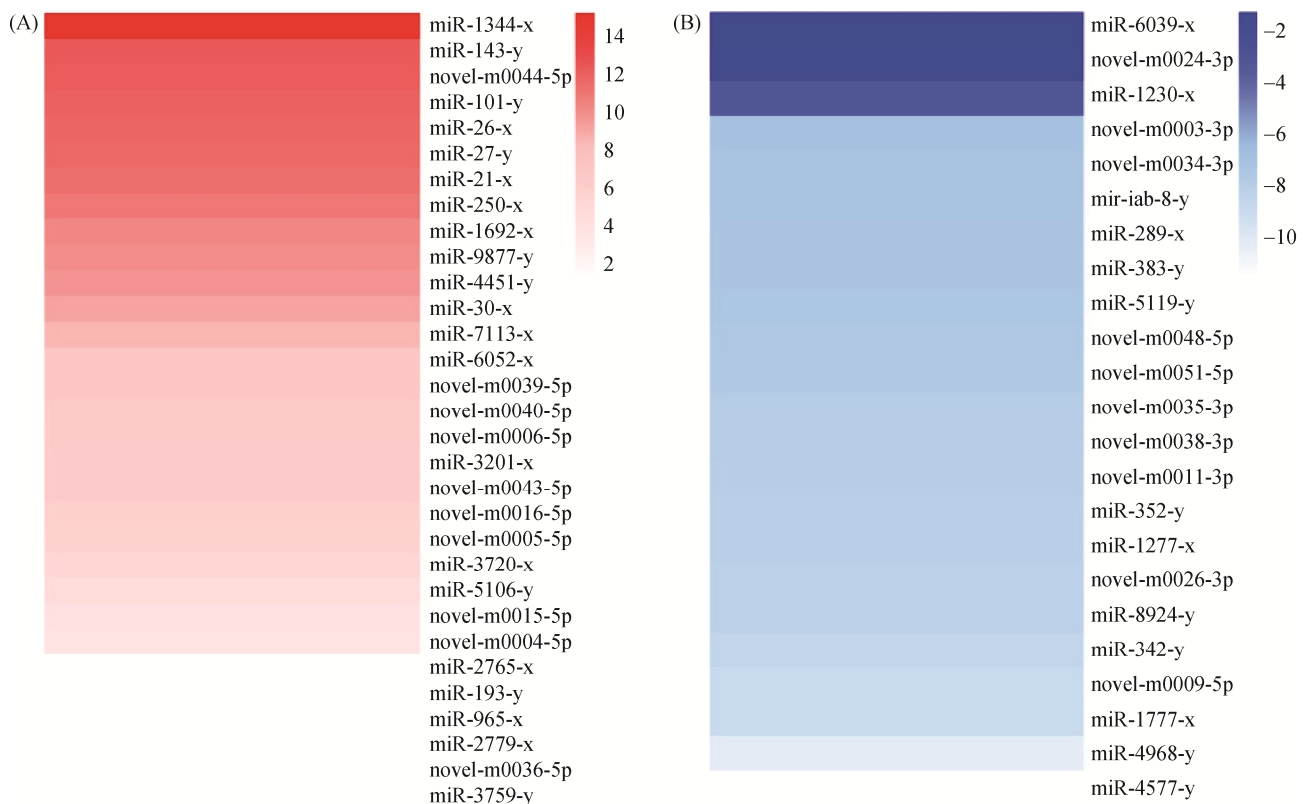


图 4. AcCK vs AcT 中 DEmiRNA 的表达量聚类

Figure 4. Expression clustering of DEmiRNAs in AcCK vs AcT. A: Up-regulated miRNAs; B: Down-regulated miRNAs.

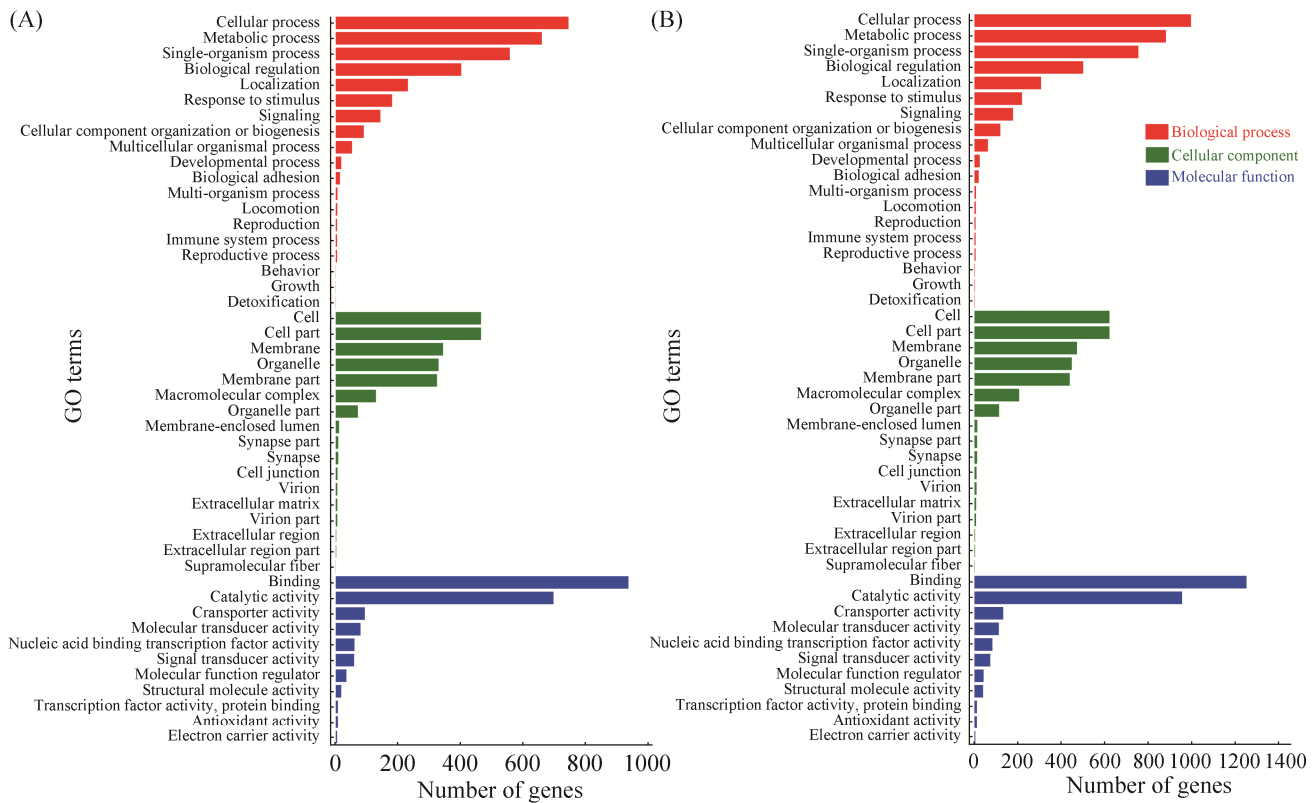


图 5. AcCK vs AcT 中 DE miRNA 的靶基因的 GO 分类

Figure 5. GO categorizations of DE miRNAs target genes in the larval gut of *Apis cerana cerana*. A: target genes of up-regulated miRNAs; B: target genes of down-regulated miRNAs.

KEGG pathway 富集分析结果显示，DE miRNA 的靶基因可注释到 136 个 pathway。其中，上调 miRNA 的靶基因可注释到 134 条 pathway，其中富集数最多的是内吞作用、内质网中的蛋白质加工、Wnt 信号通路、泛素介导的蛋白水解、FoxO 信号通路、碳代谢、RNA 运输、磷脂酰肌醇信号系统、RNA 降解、嘌呤代谢(图 6-A)。下调 miRNA 的靶基因可注释到 126 条 pathway，其中富集数最多的是内吞作用、内质网中的蛋白质加工、RNA 运输、泛素介导的蛋白水解、嘌呤代谢、碳代谢、神经活性的配体-受体相互作用、Hippo 信号通路、mRNA 监视通路、Wnt 信号通路(图 6-B)。

2.6 中蜂幼虫肠道 DE miRNA 的调控网络构建及分析

利用 Cytoscape 软件构建 miRNA-mRNA 调控网络，miRNA 与 mRNA 之间形成十分复杂的调控关系，分析结果显示 31 个上调 miRNA 靶向结合 6170 个 mRNA，其中 miR-6052-x、novel-m0044-5p、novel-m0006-5p、miR-101-y 和 miR-3201-x 结合的 mRNA 最多，分别达到 1474、1116、876、700 和 673 个(图 7-A)；23 个下调 miRNA 靶向结合 8219 个 mRNA，其中 miR-1277-x、novel-m0024-3p、novel-m0048-5p、novel-m0003-3p 和 novel-m0035-3p 结合的 mRNA 最多，分别为 6018、1837、1341、1063 和 717 个(图 7-B)。

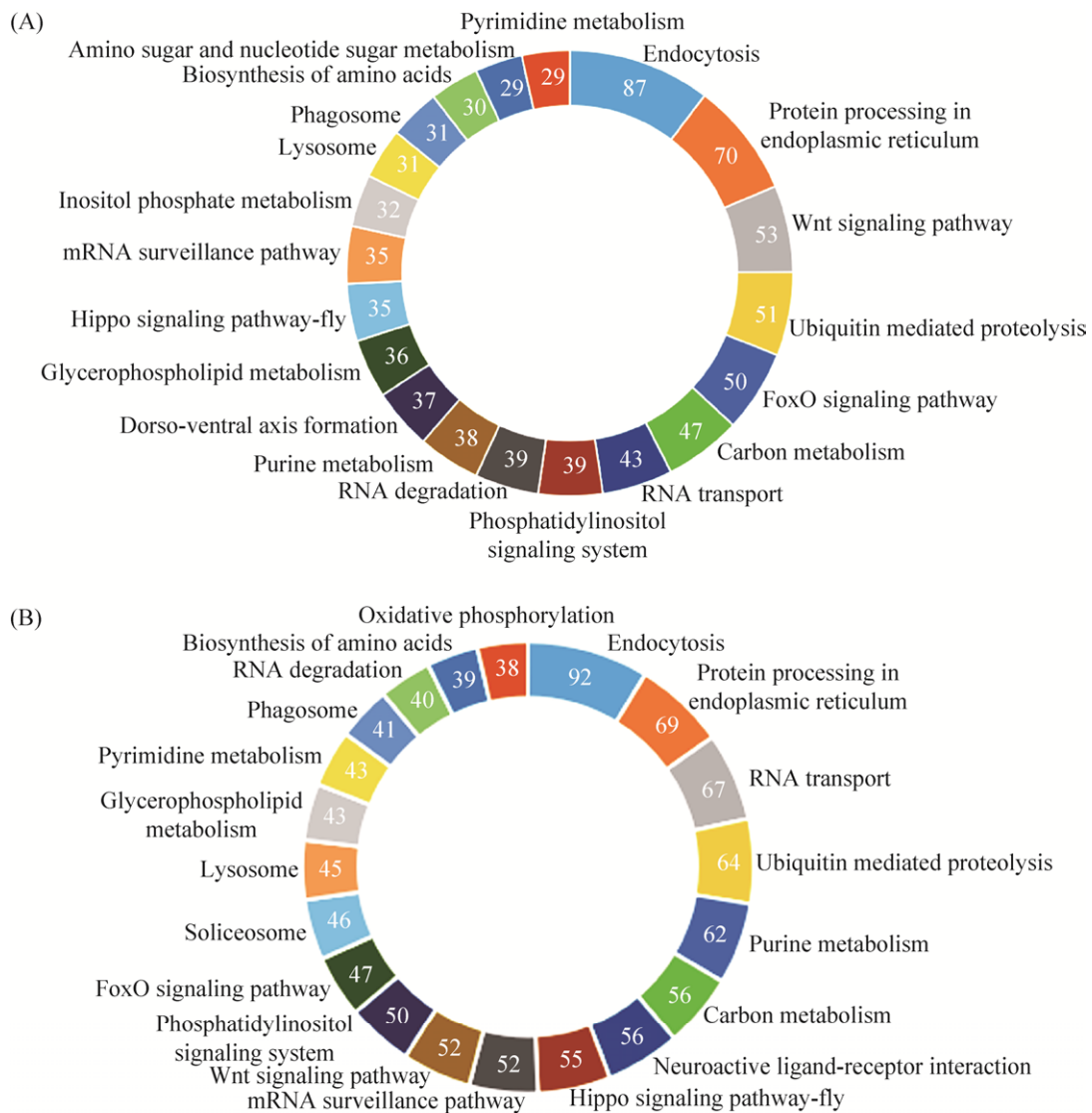


图 6. AcCK vs AcT 中 DE miRNA 的靶基因的 KEGG pathway 富集分析

Figure 6. KEGG pathway enrichment analysis of DE miRNAs-targeted genes in the larval gut of *Apis cerana cerana*. A: Top 20 pathways enriched by targets of up-regulated miRNAs; B: Top 20 pathways enriched by targets of down-regulated miRNAs.

进一步筛选注释到泛素介导的蛋白水解的靶基因并构建调控网络，分析结果显示 31 个 DE miRNA 靶向结合 51 个靶基因，二者形成 1 个较大和 1 个较小的调控网络，其中结合靶基因数量最多的分别是 miR-1277-x (31)、novel-m0044-5p (10)、miR-6052-x (7)、novel-m0024-3p (7) 和 miR-30-x (6)(图 8-A)。筛选出注释到 Jak-STAT 信

号通路的靶基因并构建调控网络，分析结果显示 18 个 DE miRNA 靶向结合 14 个靶基因，其中结合靶基因数最多的分别为 miR-1277-x (6)、miR-6039-x (4)、miR-6052-x (3)、miR-101-y (3) 和 novel-m0044-5p (3)(图 8-B)。

进一步分析发现，miR-101-y、miR-1277-x、miR-21-x、miR-250-x、miR-26-x、miR-27-y、

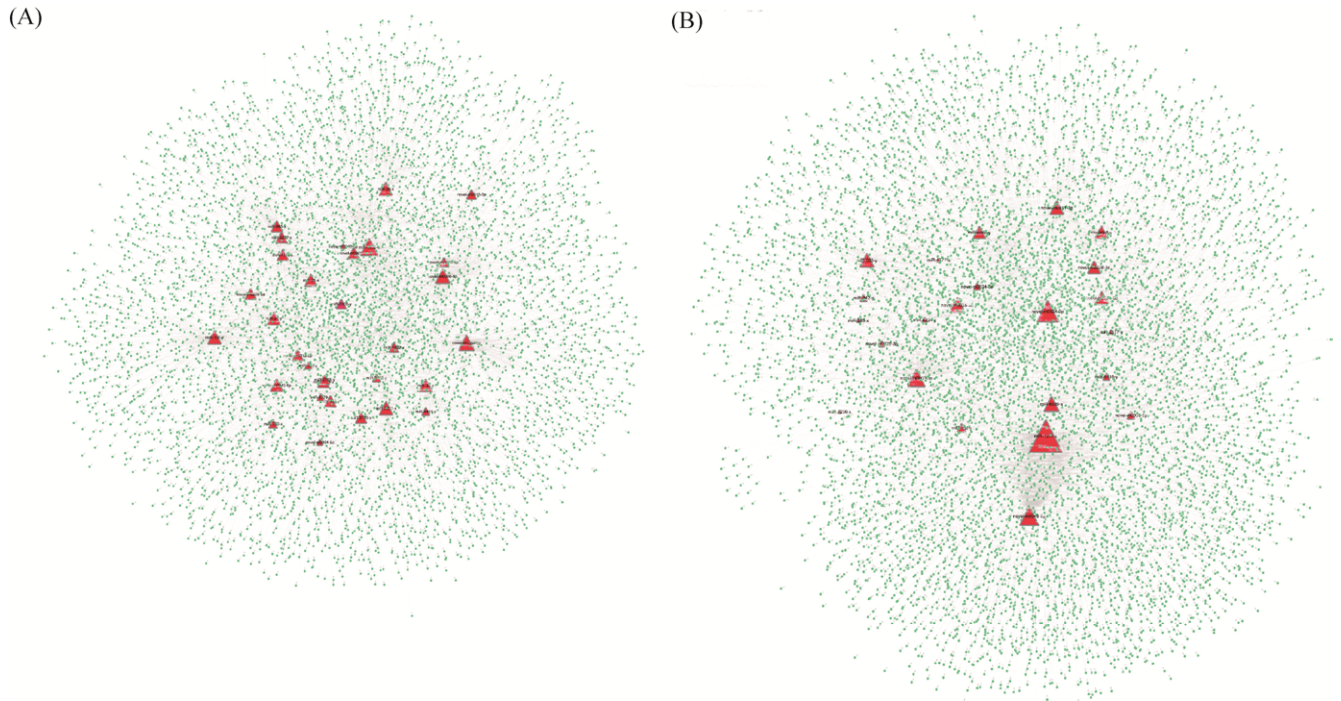


图 7. 中蜂幼虫肠道的 DEmiRNA 的调控网络

Figure 7. Regulation networks of DEmiRNAs in *Apis cerana cerana* larval gut. A: regulation networks of up-regulated miRNAs; B: regulation networks of down-regulated miRNAs. Green circles indicate mRNAs, red triangles indicate miRNAs.

miR-30-x、miR-3201-x、miR-383-y、miR-6039-x、miR-6052-x、novel-m0005-5p、novel-m0006-5p、novel-m0024-3p、novel-m0044-5p 和 novel-m0048-5p 等 16 个 miRNA 共同参与了上述 2 条免疫通路的调控；而 miR-143-y、miR-193-y、miR-4451-y、miR-7113-x、miR-8924-y、miR-965-x、miR-iab-8-y、novel-m0003-3p、novel-m0004-5p、novel-m0011-3p、novel-m0015-5p、novel-m0026-3p、novel-m0035-3p、novel-m0036-5p 和 novel-m0043-5p 等 15 个 miRNA 仅参与泛素介导的蛋白水解的调控，miR-352-y 和 novel-m0039-5p 仅参与对 Jak-STAT 信号通路的调控。

2.7 中蜂幼虫肠道 DEmiRNA 的 Stem-loop RT-PCR 和 qPCR 验证

为验证测序数据的准确性，随机挑选 3 个

DEmiRNA (miR-6497-x、miR-4968-y 和 miR-3793-x) 进行 Stem-loop RT-PCR 验证，电泳结果显示上述 3 个 DEmiRNA 在 AcCK 和 AcT 中均可扩增出符合预期的目的片段(图 9)。进一步对 miR-6497-x、miR-4968-y 和 miR-3793-x 进行 qPCR 验证，结果表明它们的表达水平的变化趋势与测序数据中 DEmiRNA 的表达水平的变化趋势一致。上述结果说明本研究的测序结果真实可靠。

3 讨论

MiRNA 作为基因表达的关键调控因子，在昆虫的细胞生长、发育、凋亡及免疫等过程扮演重要角色^[8]。目前，蜜蜂 miRNA 的相关研究主要集中在西方蜜蜂^[13-16]，对于 miRNA 在蜜蜂与病原的互作中的作用，相关信息极为有限。Huang 等^[23]

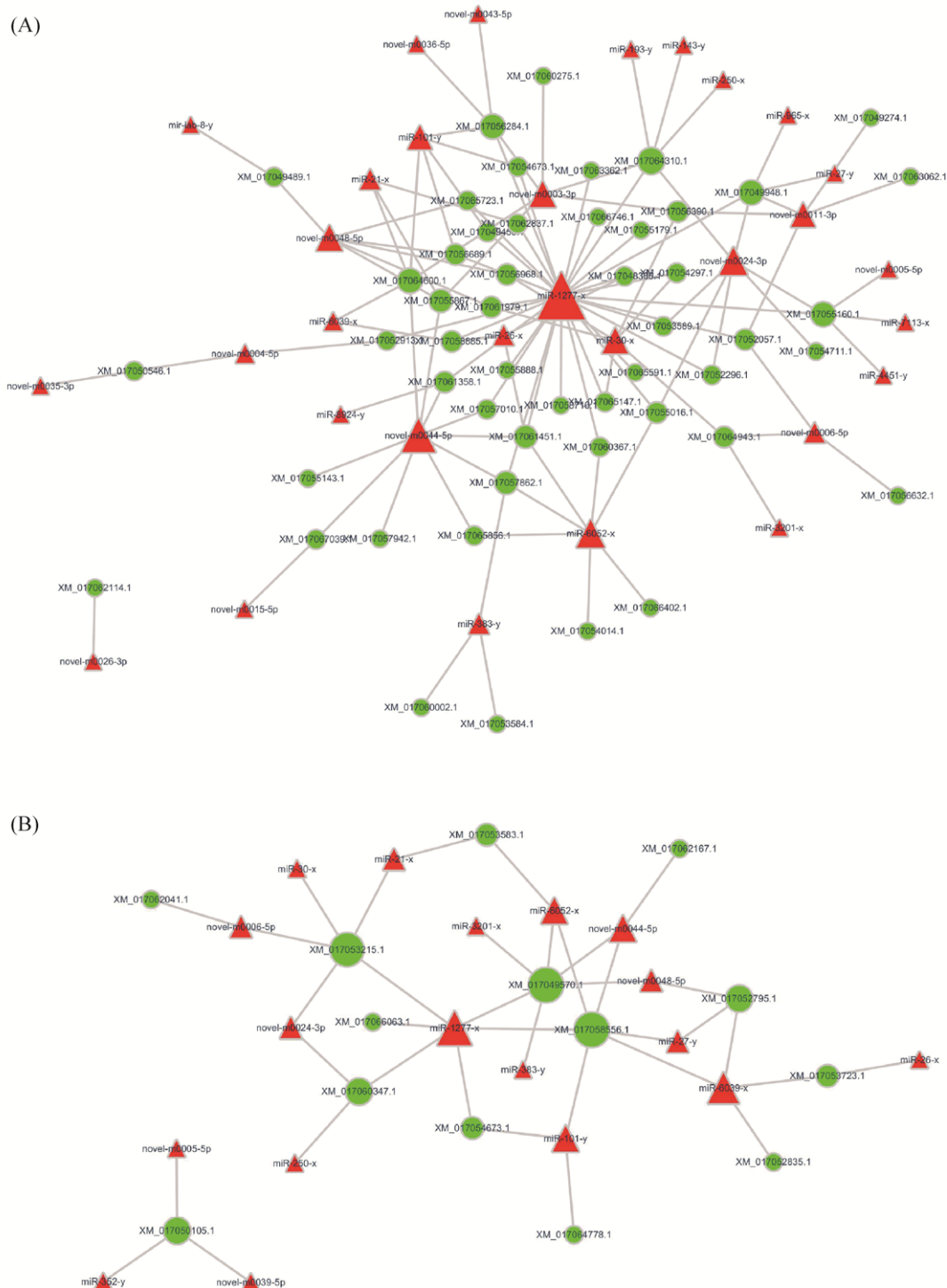


图 8. 中蜂幼虫肠道免疫相关 DE miRNA 的调控网络

Figure 8. Regulation networks of immunity-associated DE miRNAs in the larval gut of *Apis cerana cerana*. A: regulation networks of DE miRNAs regulating ubiquitin mediated proteolysis; B: regulation networks of DE miRNAs regulating Jak-STAT signaling pathway. Circles indicate mRNAs, triangles indicate miRNAs; the size of circles and triangles indicate the number of miRNAs or mRNAs connected.

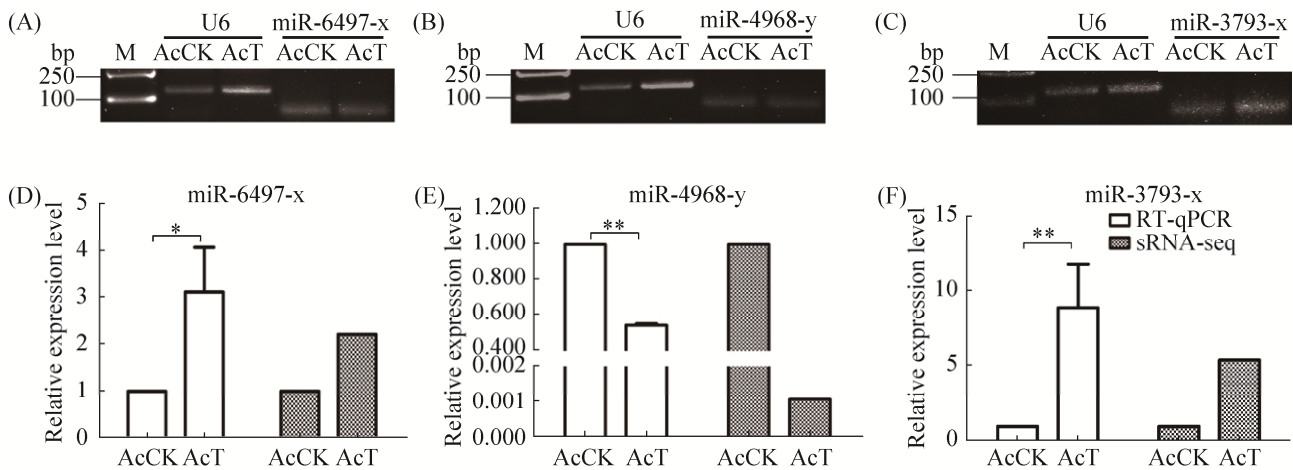


图 9. AcCK vs. AcT 中 DE miRNA 的 Stem-loop RT-PCR 和 qPCR 验证

Figure 9. Stem-loop RT-PCR and qPCR confirmation of DE miRNAs in AcCK vs. AcT. A, B, C: Agarose gel electrophoresis of amplification products from Stem-loop PCR of DE miRNAs. D, E, F: qPCR results of miR-6497-x, miR-4968-y and miR-3793-x. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

对正常及东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)感染后 1–6 d 的西方蜜蜂工蜂中肠组织进行测序,发现宿主的 17 个 miRNA 在整个病原增殖周期内差异表达,进一步发现 DE miRNA 可靶向结合 413 个靶基因,并参与物质代谢和能量代谢的调控。对于东方蜜蜂,miRNA 的相关研究仅限于雌性蜜蜂级型分化^[24]、处女蜂王婚飞行为^[25]等方面,有关病原胁迫应答的研究未见报道。笔者所在课题组前期已通过形态学和分子生物学手段证明了球囊菌对中蜂雄蜂和工蜂幼虫皆具有侵染性^[5],并在 mRNA 组学水平全面解析中蜂幼虫肠道对球囊菌的胁迫应答^[17–18]以及球囊菌的转录组变化^[26]。为在 miRNA 组学水平进一步探究中蜂幼虫对球囊菌的胁迫应答,本研究在前期基础上利用 sRNA-seq 技术对正常及球囊菌胁迫的中蜂 6 日龄幼虫肠道进行测序,预测出的 537 个 miRNA 的长度集中分布在 21–23 nt,首位碱基多偏向于 U,其结构特征与菜蛾盘绒茧蜂(*Cotesia vestalis*)^[27]、人类线粒体^[28]和日本杏^[29]来源的 miRNA 高度相似。

此外,分别有 31 和 23 个 miRNA 在球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道中上调和下调表达,表明球囊菌胁迫可引起宿主 miRNA 的差异表达,暗示上述 DE miRNA 在宿主-病原互作中扮演重要角色。

前期研究中,笔者所在课题组在 mRNA 组学水平对中蜂 6 日龄幼虫肠道响应球囊菌胁迫的差异表达基因(DEGs)进行分析,发现分别有 2、17、20、29 和 52 个上调基因富集在 Jak-STAT 信号通路、溶酶体、泛素介导的蛋白水解、吞噬体和内吞作用,仅有 1 和 8 个下调基因富集在吞噬体和溶酶体,表明中蜂幼虫肠道的细胞及体液免疫通路在球囊菌胁迫后期被显著激活^[17]。本研究中,上调 miRNA 的靶基因主要富集在内吞作用(87)、泛素介导的蛋白水解(51)、溶酶体(31)、吞噬体(31)等细胞免疫通路,而对于下调 miRNA 的靶基因,富集在上述 4 条免疫通路的数量分别为 92、64、45 和 41 个,表明宿主通过下调部分 miRNA 的表达量,降低对相关免疫基因的抑制作用,从而提高对球囊菌的免疫应答水平;同时,球囊菌也能

通过互作上调中蜂幼虫肠道的部分 miRNA 的表达量, 以增加对相关免疫基因的抑制。

Jak-STAT 信号通路作为昆虫先天免疫系统的重要组成部分, 可参与到果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[30]、家蚕 (*Bombyx mori*)^[31]、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)^[32] 及西方蜜蜂^[33] 抵御病原侵染的免疫防御进程。本研究发现, 包括 miR-1277-x、miR-21-x、miR-6052-x、miR-30-x 和 miR-26-x 等在内的 18 个 DE miRNA 可靶向结合 14 个与 Jak-STAT 信号通路相关的靶基因, 推测这些 DE miRNA 参与调控 Jak-STAT 信号通路对球囊菌的应答。在哺乳动物体内, 病毒侵染是干扰素 (IFN) 应答的重要触发因素^[34], Jak-STAT 信号通路被激活后可诱导上百个干扰素刺激基因 (ISGs) 的表达, 从而在抗病毒反应过程中发挥重要作用。Li 等^[35] 将 miR-26 家族的模拟物 (mimic) 转染进猪肺泡巨噬细胞 PAMs 和猴胚胎肾上皮细胞 Marc-145 中, 发现 IFN 和 I 型 ISGs 被诱导激活, 从而对猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) 的复制和侵染过程产生抑制。本研究中, 球囊菌胁迫的中蜂 6 日龄幼虫肠道的 miR-26-x 表达量显著上调 (\log_2 Fold change=12.30), 并且与 miR-1277-x、miR-21-x 和 miR-6052-x 共同靶向结合与 IFN 相关的 3 个靶基因 (XM_017062110.1、XM_017066346.1 和 XM_017066481.1), 推测上述 4 个 DE miRNA 在球囊菌胁迫后期, 通过调控 IFN 相关的靶基因表达水平增强宿主对球囊菌的免疫防御。此外, Zhang 等^[36] 研究发现 PRRSV 感染可通过激活长白猪的 NF- κ B 信号通路并提高宿主 miR-30c 的表达量, 进一步研究证明 miR-30c 可靶向结合 Jak-STAT 信号通路上的 *JAK-1* 基因, 协助病毒逃避 IFN 介导的抗病毒免疫反应, 以增强病毒的侵染性。本研

究发现, miR-30-x 表达量在球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道中显著上调, 暗示球囊菌可能通过影响宿主上调 miR-30-x 的表达量, 抑制宿主的 Jak-STAT 免疫通路诱导产生的 IFN, 以减轻 IFN 对病原的清理作用。未来可通过人工合成 mimic 和抑制物 (inhibitor) 对 miR-26-x 和 miR-30-x 进行过表达和敲减, 深入研究二者在中蜂幼虫的免疫应答中的功能。

泛素化修饰可通过抑制或促进蛋白磷酸化修饰调节生物体的免疫应答效应^[37]。陈阳^[38] 发现泛素介导的蛋白水解与 Jak-STAT 信号通路共同参与了鸭的 *duRIG-I* 基因介导的抗病毒先天性免疫信号的传递途径。Liu 等^[39] 研究发现 miR-181a 可通过抑制泛素介导的蛋白水解途径促进 *p53* 的表达和转录活性, 并推测 miR-181a 可作为治疗肾细胞凋亡、肾炎等疾病的潜在分子靶标。耿立英等^[40] 发现北京油鸡和来航鸡脾脏来源的 miR-21-3p、miR-21-5p、miR-2954、miR-146b-5p 和 miR-6606-5p 等 5 个 DE miRNA 可靶向调控泛素介导的蛋白水解、细胞凋亡以及免疫器官的发育等生物学过程, 并推测 miRNA 的差异表达是导致不同鸡种免疫应答差异的重要影响因素。此外, 泛素-蛋白酶系统在家蚕^[41]、果蝇^[42] 的先天免疫中同样发挥重要调控作用。本研究中, 31 个 DE miRNA 与 51 个与泛素介导的蛋白水解相关的 mRNA 形成较为复杂的调控网络, 其中 miR-1277-x、miR-383-y、miR-6039-x、miR-8924-y、miR-iab-8-y、novel-m0003-5p、novel-m0011-3p、novel-m0024-3p、novel-m0026-3p、novel-m0035-3p 和 novel-m0048-5p 等 11 个 miRNA 表达下调, 推测上述 miRNA 通过下调表达水平, 降低对相关泛素介导的蛋白水解基因的抑制作用, 从而增强宿主对球囊菌的

抵抗作用。此外,病原能够利用宿主细胞的泛素-蛋白水解酶复合体通路逃避免疫系统监控并促进自身的复制过程^[43]。本研究中,球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道的 miR-21-x 表达量显著上调(\log_2 Fold change=11.96),并结合 3 个与泛素介导的蛋白水解相关的靶基因(XM_017055867.1、XM_017062837.1、XM_017064600.1),推测球囊菌通过与宿主互作提高 miR-21-x 的表达水平,增强对相关泛素介导的蛋白水解基因的抑制作用,以协助球囊菌逃避免疫系统的免疫系统监控,并促进自身增殖。

细胞凋亡不仅参与了全变态昆虫的发育过程,而且在昆虫的天然免疫反应中发挥特殊作用^[44]。家蚕在 BmCPV 感染早期,通过上调促凋亡基因的表达量清除冗余、有害细胞,从而抑制 BmCPV 的增殖过程^[45]。此外, BmCPV 也能够通过抑制宿主的细胞凋亡促进病毒粒子的快速增殖^[46],体现了家蚕与 BmCPV 之间互作的复杂性。本研究中,球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道的 miR-6052-x 和 miR-1277-x 分别上调表达(\log_2 Fold change=7.36)和下调表达(\log_2 Fold change=-7.82),可分别结合 1474 和 6018 个靶基因,并且在 DEmiRNA-mRNA 调控网络中居于核心位置,表明二者在中蜂幼虫肠道的胁迫应答中具有关键功能。此外, miR-6052-x 和 miR-1277-x 均可靶向结合与细胞凋亡相关的 8 个靶基因(XM_017051426.1、XM_017051433.1 和 XM_017053949.1 等),推测中蜂幼虫肠道在球囊菌胁迫后期通过下调 miR-1277-x 的表达水平,降低对相关细胞凋亡基因的抑制作用,从而限制球囊菌的增殖;而球囊菌通过与宿主的互作,提高 miR-6052-x 的表达水平,加强对相关细胞凋亡基因的抑制,以促进孢子在宿主体内快速萌发。

MiRNA 在物种间具有高度的保守性、组织特异性和表达时序性^[47],同源 miRNA 在不同宿主抵御病原侵染的过程中可能发挥类似的调控作用。Machitani 等^[48]发现腺病毒(Adenovirus)感染 HeLa 细胞后,细胞来源的 miR-27a/b 可在转录后水平抑制其靶基因 *SNAP25* 和 *TXN2* 的表达,从而有效抑制腺病毒的感染。Buck 等^[49]发现在被鼠巨细胞病毒(Murine cytomegalovirus)感染后,多个小鼠细胞系和原代巨噬细胞的 miR-27 表达量快速下降,并发现过表达 miR-27 能够提高宿主的抗病毒反应。本研究中,在球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道内, miR-27-y 的表达量显著上调(\log_2 Fold change=12.12),其靶向结合的 516 个靶基因涉及内吞作用(7)、MAPK 信号通路(3)、Jak-STAT 信号通路(2)、溶酶体(2)、泛素介导的蛋白水解(1)等细胞和体液免疫通路,推测宿主通过 miR-27 对上述免疫通路进行调节,从而参与对球囊菌的应答。近期,笔者所在课题组在全基因组水平对球囊菌的 miRNA 进行了分析和鉴定,预测出 118 个 miRNA 及 6529 个靶基因,并构建和深入分析了 miRNA-mRNA 调控网络^[19]。下一步将对胁迫中蜂 6 日龄幼虫肠道的球囊菌的 DEmiRNA 及其调控网络进行深入分析,结合本研究的分析结果,我们将进一步利用 TargetFinder 软件预测中蜂幼虫肠道 miRNA 与球囊菌 mRNA、球囊菌 miRNA 与中蜂幼虫肠道 mRNA 间的靶向结合关系,并通过生物信息学和分子生物学方法探究宿主和病原的跨界网络调控作用,以探明二者间的互作机制。

综上所述,本研究对中蜂 6 日龄幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 DEmiRNA 及其调控网络进行深入分析,研究结果为在分子水平阐明中蜂幼虫对球囊菌的胁迫应答机制提供了基础,也为深入理

解中蜂幼虫与球囊菌的互作提供了新的思路线索, 筛选出的候选 miRNA 可用于后续的功能研究。

参考文献

- [1] Lin ZG, Page P, Li L, Qin Y, Zhang YY, Hu FL, Neumann P, Zheng HQ, Dietemann V. Go east for better honey bee health: *Apis cerana* is faster at hygienic behavior than *A. mellifera*. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162647.
- [2] 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, 黄帜隼, 张翌楠, 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.
- [3] Zhao HX, Liang Q, Luo YX, Li JH, Zhang XF, Zeng XN. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36(2): 233–239. (in Chinese)
赵红霞, 梁勤, 罗岳雄, 李江红, 张学锋, 曾鑫年. 蜜蜂白垩病的研究进展. 环境昆虫学报, 2014, 36(2): 233–239.
- [4] Maxfield-Taylor SA, Mujic AB, Rao S. First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult Bumble bees. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124868.
- [5] Chen DF, Guo R, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Fu ZM. Morphological and molecular identification of chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* in *Apis cerana cerana*. *Journal of Apicultural Research*, 2018, 57(4): 516–521.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [7] Fullaondo A, Lee SY. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 267–273.
- [8] Asgari S. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(4): 388–397.
- [9] Liu MM, Yu HY, Zhao GJ, Huang QF, Lu YE, Ouyang B. Profiling of drought-responsive microRNA and mRNA in tomato using high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 481.
- [10] Raj Ojha C, Rodriguez M, Dever SM, Mukhopadhyay R, El-Hage N. Mammalian microRNA: an important modulator of host-pathogen interactions in human viral infections. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23(1): 74.
- [11] Winter F, Edaye S, Hüttenhofer A, Brunel C. *Anopheles gambiae* miRNAs as actors of defence reaction against *Plasmodium* invasion. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(20): 6953–6962.
- [12] Wu P, Qin GX, Qian HY, Chen T, Guo XJ. Roles of miR-278-3p in *IBP2* regulation and *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus replication. *Gene*, 2016, 575(2): 264–269.
- [13] Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18794.
- [14] Liu F, Peng W, Li Z, Li W, Li L, Pan J, Zhang S, Miao Y, Chen S, Su S. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect Molecular Biology*, 2012, 21(3): 297–303.
- [15] 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.
- [16] Evans JD, Huang Q. Interactions among host-parasite microRNAs during *Nosema ceranae* proliferation in *Apis mellifera*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 698.
- [17] Guo R, Zhang L, Xu XJ, Shi XL, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Huang ZJ, Wang HQ, Hou ZX, Chen DF. Analysis of the differentially expressed genes in the 6-day-old larval gut of *Apis cerana cerana* under the stress of *Ascosphaera apis*. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39(3): 539–547. (in Chinese)
郭睿, 张璐, 徐细建, 史秀丽, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 黄帜隼, 王鸿权, 侯志贤, 陈大福. 中华蜜蜂 6 日龄幼虫肠道响应球囊菌胁迫的差异表达基因分析. 环境昆虫学报, 2017, 39(3): 539–547.
- [18] Chen DF, Guo R, Xiong CL, Liang Q, Zheng YZ, Xu XJ, Zhang ZN, Huang ZJ, Zhang L, Wang HQ, Xie YL, 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, 张翌楠, 黄帜隼, 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.
- [19] Guo R, Wang HP, Chen HZ, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Zhao HX, Chen DF. Identification of *Ascosphaera apis*

- microRNAs and investigation of their regulation networks. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(6): 1077–1089. (in Chinese)
- 郭睿, 王海朋, 陈华枝, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 赵红霞, 陈大福. 蜜蜂球囊菌的 microRNA 鉴定及其调控网络分析. *微生物学报*, 2018, 58(6): 1077–1089.
- [20] 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.
- [21] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Carrington JC. MicroRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121(2): 207–221.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 石元元. 东方蜜蜂遗传图谱构建以及雌性蜜蜂发育分子机理. 江西农业大学博士学位论文, 2014.
- [25] Wu XB, Wang ZL, Shi YY, Zhang F, Zeng ZJ. Effects of mating flight on sRNAs Expression in sexual matured virgin queens (*Apis cerana cerana*). *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(17): 3721–3728. (in Chinese)
- 吴小波, 王子龙, 石元元, 张飞, 曾志将. 婚飞对中华蜜蜂性成熟处女蜂王 sRNAs 表达的影响. *中国农业科学*, 2013, 46(17): 3721–3728.
- [26] Guo R, Chen DF, Huang ZJ, Liang Q, Xiong CL, Xu XJ, Zheng YZ, Zhang ZN, Xie YL, 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, 黄枳腱, 梁勤, 熊翠玲, 徐细建, 郑燕珍, 张翌楠, 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.
- [27] 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.
- [28] Sripada L, Tomar D, Prajapati P, Singh R, Singh AK, Singh R. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44873.
- [29] Gao ZH, Shi T, Luo XY, Zhang Z, Zhuang WB, Wang LJ. High-throughput sequencing of small RNAs and analysis of differentially expressed microRNAs associated with pistil development in Japanese apricot. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 371.
- [30] Leclerc V, Reichhart JM. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews*, 2010, 198(1): 59–71.
- [31] Chen C, Eldein S, Zhou XS, Sun Y, Gao J, Sun YX, Liu CL, Wang L. Immune function of a Rab-related protein by modulating the JAK-STAT signaling pathway in the silkworm, *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2018, 97(1): e21434.
- [32] Jupatanakul N, Sim S, Angleró-Rodríguez YI, Souza-Neto J, Das S, Poti KE, Rossi SL, Bergren N, Vasilakis N, Dimopoulos G. Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT pathway-mediated immunity to dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(1): e0005187.
- [33] 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.
- [34] Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(7): 559–568.
- [35] Li LW, Wei ZZ, Zhou YJ, Gao F, Jiang YF, Yu LX, Zheng H, Tong W, Yang S, Zheng HH, Shan TL, Liu F, Xia TQ, Tong GZ. Host miR-26a suppresses replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by upregulating type I interferons. *Virus Research*, 2015, 195: 86–94.
- [36] Zhang Q, Huang C, Yang Q, Gao L, Liu HC, Tang J, Feng WH. MicroRNA-30c modulates type I IFN responses to facilitate porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by targeting JAK1. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(5): 2272–2282.
- [37] 陈涛涌. 新型泛素化修饰介导的免疫调节//第十届全国免疫学学术大会汇编. 北京: 中国免疫学会, 2015.
- [38] 陈阳. 鸭 RIG-I 在免疫调节中的作用及分子调控机制. 扬州大学博士学位论文, 2015.
- [39] Liu XY, Zhang FR, Shang JY, Liu YY, Lv XF, Yuan JN, Zhang TT, Li K, Lin XC, Liu X, Lei QQ, Fu XD, Zhou JG, Liang SJ. Renal inhibition of miR-181a ameliorates 5-fluorouracil-induced mesangial cell apoptosis and

- nephrotoxicity. *Cell Death and Disease*, 2018, 9(6): 610.
- [40] Geng LY, Pan SM, Chen J, Zhu WJ, Gong YF, Liu ZZ, Peng YD, Zhao SY, Zhang CS, Li XL. Identification and bioinformatics analysis of differential expression microRNAs in the spleen between Beijing fatty chickens and Leghorns chickens. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(4): 754–764. (in Chinese)
耿立英, 潘素敏, 陈娟, 朱文进, 巩元芳, 刘铮铸, 彭永东, 赵书雨, 张传生, 李祥龙. 北京油鸡和来航鸡脾脏差异表达 microRNA 的鉴定与分析. *中国农业科学*, 2016, 49(4): 754–764.
- [41] Xu HP, Hao W, He D, Xu YS. Smt3 is required for the immune response of silkworm, *Bombyx mori*. *Biochimie*, 2010, 92(10): 1306–1314.
- [42] Yagi Y, Lim YM, Tsuda L, Nishida Y. *Fat facets* induces polyubiquitination of imd and inhibits the innate immune response in *Drosophila*. *Genes to Cells*, 2013, 18(11): 934–945.
- [43] Li ZF, Pang Y. Ubiquitin-proteasome pathway and virus infection. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(2): 151–156. (in Chinese)
李朝飞, 庞义. 泛素-蛋白水解酶复合体通路与病毒侵染. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 151–156.
- [44] Bao XY, Chen P, Liu TH, Wang L, Liu WB, Pan MH, Lu C. Advances in apoptosis-related genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(4): 487–498. (in Chinese)
包希艳, 陈鹏, 刘太行, 王腊, 刘文波, 潘敏慧, 鲁成. 家蚕凋亡相关基因研究进展. *昆虫学报*, 2017, 60(4): 487–498.
- [45] Wu Y, Wu YJ, Hui T, Wu HL, Wu Y, Wang WB. Reaper homologue *IBM1* in silkworm *Bombyx mori* induces apoptosis upon baculovirus infection. *FEBS Letters*, 2013, 587(6): 600–606.
- [46] Ponnuel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 2003, 77(19): 10725–10729.
- [47] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(7): 522–531.
- [48] Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Nakatani K, Tachibana M, Mizuguchi H. MicroRNA miR-27 inhibits adenovirus infection by suppressing the expression of SNAP25 and TXN2. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e00159–17.
- [49] Buck AH, Perot J, Chisholm MA, Kumar DS, Tuddenham L, Cognat V, Marcinowski L, Dölken L, Pfeffer S. Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA*, 2010, 16(2): 307–315.

MicroRNA responses in the larval gut of *Apis cerana cerana* to *Ascospaera apis* stress

Yu Du[#], Xinyu Tong[#], Dingding Zhou, Dafu Chen, Cuiling Xiong, Yanzen Zheng, Guojun Xu, Haipeng Wang, Huazhi Chen, Yilong Guo, Qi Long, Rui Guo^{*}

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

Abstract: [Objective] *Ascospaera apis* is a lethal fungal pathogen for *Apis cerana cerana* larvae. microRNA can

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 (CXZX2017342, CXZX2017343) and by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (201610389053, 201810389082, 201810389029)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-87640197; E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

Received: 12 September 2018; Revised: 15 November 2018; Published online: 29 November 2018

participate in host-pathogen interaction processes by inhibition or degradation of mRNA via targeting at post-transcriptional level. The aim of this study was to analyze the differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) and their target genes in the 6-day-old larval gut of *A. c. cerana* under *A. apis* stress and reveal DEmiRNAs' roles in the stress response process. **[Methods]** Normal and *A. apis*-challenged 6-day-old larval guts of *A. c. cerana* (AcCK and AcT) were sequenced using Illumina MiSeq platform, followed by prediction and analysis of DEmiRNAs and their target genes using related softwares. Target genes of DEmiRNAs were annotated to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases with Blast. Regulation networks between DEmiRNAs and target mRNAs were constructed using Cytoscape. Stem-loop RT-PCR and qPCR were conducted to verify the reliability of sequencing data. **[Results]** Deep sequencing of larval gut samples generated 537 miRNAs, the length of which was distributed between 16 nt and 35 nt. The first base bias of miRNAs with various length had apparent difference. The expression of 10 novel miRNAs were validated using Stem-loop RT-PCR. There were 54 DEmiRNAs in AcCK vs. AcT comparison group, including 31 up-regulated and 23 down-regulated miRNAs, which can respectively link 6170 and 8199 target genes. GO classification suggested that target genes of up- and down-regulated miRNAs were respectively involved in 47 and 47 terms, and the largest ones were binding, cellular process, and catalytic activity. KEGG pathway enrichment analysis demonstrated that target genes of up- and down-regulated miRNAs were respectively engaged in 134 and 126 pathways, and the mostly enriched ones were endocytosis and protein processing in endoplasmic reticulum. Analysis of regulation networks revealed that very complex regulation relationships existed between DEmiRNAs and corresponding target mRNAs; 31 miRNAs could bind 51 mRNAs associated with ubiquitin mediated proteolysis, and 18 miRNAs can bind 14 Jak-STAT signaling pathway-associated mRNAs; a total of 16 miRNAs, such as miR-1277-x, miR-26-x, miR-27-y, miR-30-x and miR-6052-x, can participate in regulating both of the above-mentioned immune pathways. Finally, three DEmiRNAs were randomly selected for qPCR, the result verified the reliability of our transcriptome sequencing data. **[Conclusion]** We first provided the expression profile and differential expression information of *A. c. cerana* miRNAs during the late stage of *A. apis* stress, revealed the complex interactions between *A. apis* and host at transcriptome level. As the core of regulation networks, miR-6052-x and miR-1277-x were likely to participate in host immune defense by affecting apoptosis, while miR-26-x and miR-30-x may join host responses to *A. apis* stress via regulation of Jak-STAT signaling pathway. Key DEmiRNAs screened in our study are expected to be used as potential molecular targets for chalkbrood control.

Keywords: *Apis cerana cerana*, larvae, *Ascospaera apis*, microRNA, target gene, regulation network

(本文责编: 李磊)



郭睿, 副研究员, 硕士生导师, 福建农林大学 A 类博士引进人才, 校杰出青年科研人员。现供职于福建农林大学蜂学学院, 为蜜蜂-病原互作机制科研创新团队骨干。主要从事蜜蜂病害防治方面的教学与科研, 所在团队长期致力于蜜蜂及其病原的分子生物学、组学、转基因及非编码 RNA 介导的互作机制研究。主持国家自然科学基金项目、福建省自然科学基金项目、福建省教育厅中青年教师科研项目、福建农林大学杰出青年科研人员项目、农业农村部重点实验室开放基金项目等国家级、省部级和校级项目多项, 参与农业农村部现代农业产业技术体系项目。发表学术论文 50 余篇, 其中 SCI 收录 12 篇, 多篇论文作为当期热点被《昆虫学报》和《中国农业科学》的主编重点推荐。