



蜜蜂球囊菌菌丝和孢子中环状 RNA 的鉴定及比较分析

陈华枝^{1#}, 蒋海宾^{1#}, 祝智威¹, 范元婵¹, 许雅静¹, 孙明会¹, 刘佳美¹, 熊翠玲¹, 郑燕珍^{1,2}, 付中民^{1,2}, 徐国钧^{1,2}, 陈大福^{1,2}, 郭睿^{1,2,3*}

¹ 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

² 福建农林大学蜂疗研究所, 福建 福州 350002

³ 福建农林大学蜂产品加工与应用教育部工程研究中心, 福建 福州 350002

摘要:【目的】本研究旨在明确蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌)菌丝和孢子中环状 RNA (circular RNA, circRNA)的数量、种类和表达谱差异,并探讨共有 circRNA、特有 circRNA 和差异表达 circRNA (differentially expressed circRNA, DEcircRNA)在菌丝与孢子中的潜在作用。【方法】基于前期获得的球囊菌菌丝(AaM)和孢子(AaS)的高质量 RNA-seq 数据,利用 find_circ 软件预测 circRNA。通过 Venn 分析筛选 AaM 和 AaS 的共有 circRNA 和特有 circRNA。根据 $P \leq 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 的标准筛选 AaM vs. AaS 比较组的 DEcircRNA。通过比对 GO 和 KEGG 数据库对 circRNA 的来源基因进行功能和通路注释。利用 TargetFinder 软件预测 circRNA 靶向结合的 miRNA 及 miRNA 靶向结合的 mRNA。采用 Cytoscape 软件对竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)调控网络进行可视化。通过 RT-qPCR 对 DEcircRNA 进行验证。【结果】AaM 和 AaS 中分别含有 13210156 和 19011000 条短序列读段(anchors reads),其中分别有 6124922 和 11392886 条能够比对上球囊菌参考基因组。在 AaM 和 AaS 中分别鉴定到 1868 个和 2225 个 circRNA,二者共有的 circRNA 为 1098 个,AaM 的特有 circRNA 为 770 个,AaS 的特有 circRNA 为 1127 个。AaM 和 AaS 的 circRNA 长度主要介于 1000–2000 nt,基因间区 circRNA 为主要环化类型。AaM vs. AaS 比较组包含 456 个上调 circRNA 和 97 个下调 circRNA。共有 circRNA 的来源基因可注释到 29 个功能条目和 14 类通路;AaM 的特有 circRNA 的来源基因可注释到 31 个功能和 17 类通路;AaS 的特有 circRNA 的来源基因可注释到 34 个功能条目和 16 类通路;DEcircRNA 的来源基因可注释到 29 个功能条目和 40 条通路。调控网络分析结果显示,36 个共有 circRNA

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); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿); 福建农林大学科技创新专项(CXZX2017342, CXZX2017343); 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室(福建农林大学)开放课题; 福建农林大学优秀硕士学位论文资助基金(陈华枝)

#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: 2020-06-19; 修回日期: 2020-09-02; 网络出版日期: 2021-02-03

靶向 4 个 miRNA 进而调控 6 个与内吞作用通路相关的靶 mRNA; 4(255)个 AaM(AaS)的特有 circRNA 靶向 2(2)个 miRNA 进而调控 8(2)个次级代谢产物生物合成通路相关的靶 mRNA; 9 个 DEcircRNA 靶向 2 个 DEmiRNA 进而调控 3 个 MAPK 信号通路相关的 DEmRNA。RT-qPCR 结果显示 10 个 DEcircRNA 的表达趋势与测序数据一致, 证实了测序数据的可靠性。【结论】球囊菌菌丝和孢子的共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 可能通过调控来源基因表达和充当 ceRNA 的方式调节球囊菌的物质和能量代谢、内吞作用、次级代谢产物生物合成和 MAPK 信号通路, 进而影响球囊菌菌丝生长、孢子萌发和致病性。

关键词: 白垩病, 蜜蜂球囊菌, 菌丝, 孢子, 环状 RNA, 微小 RNA, 竞争性内源 RNA

蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌)感染蜜蜂幼虫而导致白垩病, 严重影响蜂群群势和养蜂生产^[1]。该病能引起成年蜜蜂数量、蜂群群势和蜂产品产量的大幅下降^[2]。球囊菌孢子随食物被蜜蜂幼虫经口摄入, 在中肠肠腔中 CO₂ 的刺激下低水平萌发, 并生长出少量菌丝, 至预蛹期中肠与后肠隔膜消失, 孢子随食物残渣进入后肠, 在 O₂ 的刺激下剧烈萌发, 大量生长的菌丝先后穿透幼虫肠壁和体壁, 进而包裹整个幼虫, 形成白垩状虫尸^[2]。2006 年公布的球囊菌基因组版本仅有序列信息, 缺少功能注释信息^[3], 导致球囊菌的组学和分子生物学研究举步维艰。2016 年公布的球囊菌基因组版本同时包含了完整的序列和功能注释信息^[4], 为球囊菌的相关研究奠定了基础。

近年来, 笔者团队对球囊菌开展了一系列组学研究, 例如 *de novo* 组装和注释了球囊菌的参考转录组, 并大规模地开发了球囊菌的 SSR^[5]; 基于高质量转录组数据对球囊菌的已注释基因进行了结构优化, 并对未注释基因进行了鉴定和功能注释^[6]; 通过比较转录组分析筛选出球囊菌菌丝和孢子的共有、特有和差异表达的 mRNA (differentially expressed mRNA, DEmRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA)^[7-8]及长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)(未发表数据)并初步解析了它们的潜在功能。环状 RNA (circular

RNA, circRNA)是一类新近发现的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 广泛存在于真核生物细胞, 已被较多研究证实具有多种重要的生物学功能^[9]。共价闭合的环形结构赋予 circRNA 良好的稳定性, 使其耐受 RNase R 的消化, 因而可作为理想的生物标志物^[10]。随着高通量测序技术和生物信息学算法的持续革新与迅速发展, 人类^[11]、蜜蜂^[12]、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[13]、古细菌^[14]等物种的 circRNA 被陆续鉴定出来。circRNA 具有物种保守性、稳定性、表达丰富性、组织和时序表达特异性等特点^[15]。circRNA 已被证实可通过调控来源基因的转录, 充当 miRNA 的“分子海绵”, 以及与 RNA 结合蛋白质相互作用等方式参与诸多生命活动^[16]。近期的研究表明, 含有核糖体进入位点(intemal ribosome entry site, IRES)和 N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m6A)甲基化位点的 circRNA 能够翻译多肽和蛋白质^[17-18]。含 miRNA 反应元件(miRNA response element, MRE)的 circRNA 可作为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)与其他 RNA (mRNA 和 lncRNA 等)竞争性结合 miRNA, 从而间接调控下游靶 mRNA 的丰度^[12,19-21]。CHEN 等^[12]对意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)4 种不同状态的蜂王卵巢进行转录组测序和 circRNA 预测, 鉴定到 12211 个 circRNA; 作者进

一步对 DEcircRNA 的来源基因进行功能注释, 并构建和分析了 DEcircRNA 的 ceRNA 调控网络, 发现多个 DEcircRNA 可能与卵巢产卵存在潜在关联性。前期研究中, 笔者全基因组鉴定和分析了意蜂中肠的 circRNA^[22], 并对意蜂和中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)工蜂中肠发育过程的 circRNA 差异表达谱、调控网络及潜在作用进行系统解析^[23-24]。目前, 对于球囊菌菌丝和孢子中 circRNA 的数量和种类差异, 以及 circRNA 在菌丝生长、孢子萌发和有性生殖中的作用, 相关研究仍然缺失。

近期, 笔者团队利用基于链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 和 small RNA-seq (sRNA-seq) 技术对球囊菌的纯化菌丝(AaM)和孢子(AaS)样品分别进行测序和分析, 系统解析了二者的共有 mRNA、特有 mRNA 和 DEmRNA 的潜在功能, 共有 miRNA、特有 miRNA 和差异表达 miRNA (differentially expressed miRNA, DEmiRNA) 的调控网络及潜在功能^[7-8], 共有 lncRNA、特有 lncRNA 和差异表达 lncRNA (differentially expressed lncRNA, DELncRNA) 的调控方式和潜在作用(未发表数据)。本研究基于前期获得的高质量的全转录组数据^[7-8], 对球囊菌菌丝和孢子中的 circRNA 进行鉴定, 通过比较分析筛选出菌丝和孢子的共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 并进行来源基因的功能和通路注释, 进而构建和分析 ceRNA 的调控网络, 以期解析球囊菌菌丝和孢子中 circRNA 的数量和种类差异, 挖掘菌丝生长、孢子萌发、有性生殖和致病性相关的关键 circRNA 并探讨其潜在功能。

1 材料和方法

1.1 基于链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 数据来源

前期研究中, 笔者团队已利用基于链特异

性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术对 AaM 和 AaS 分别进行深度测序, 获得了高质量的测序数据, 包含 mRNA 组学数据^[7]、lncRNA 组学数据(未发表数据)和 circRNA 组学数据。其中, 高质量的 circRNA 组学数据可为本研究中 AaM 和 AaS 中的 circRNA 鉴定和分析提供可靠的数据基础。

1.2 sRNA-seq 数据来源

笔者团队前期已利用 sRNA-seq 技术分别对 AaM 和 AaS 进行测序, 获得了高质量的 miRNA 组学数据^[8], 可为本研究中的共有 circRNA、特有 circRNA 及 DEcircRNA 的靶 miRNA 预测及调控网络构建和分析提供可靠的数据支撑。

1.3 circRNA 的鉴定及种类分析

参照 GUO 等^[25]的方法对 AaM 和 AaS 中的 circRNA 进行生物信息学预测, 方法简述如下: 将前期获得的去除了比对上核糖体数据库的有效读段(clean reads), 利用 TopHat2 比对球囊菌的参考基因组(assembly AAP 1.0), 去除比对上的 clean reads; 将剩余的未比对上的 clean reads 的两端分别截取 20 nt, 得到短序列读段(anchors reads); 将 anchors reads 比对球囊菌参考基因组(assembly AAP 1.0), 利用 find_circ 软件^[26]在比对上的短序列读段中预测 circRNA。按照 circRNA 序列在参考基因组的位置, 将预测到的 circRNA 分为以下类型: 已注释的外显子 circRNA (annotated and exonic circRNA)、单一外显子 circRNA (single exonic circRNA)、外显子和内含子 circRNA (exonic and intronic circRNA)、内含子 circRNA (intronic circRNA)、反义链 circRNA (antisense circRNA) 以及基因间区 circRNA (intergenic circRNA)。

1.4 共有 circRNA、特有 circRNA 及 DEcircRNA 的来源基因分析

根据 RPM (每百万比对上的读段中可比对上反向剪切位点的读段数)算法计算 AaM 和 AaS 中 circRNA 的表达量。利用 omicshare 平台 (<http://www.omichshare.com>)的 Venn 工具对 AaM 和 AaS 中的 circRNA 进行 Venn 分析, 筛选出共有 circRNA 和特有 circRNA。利用 edgeR 软件^[27]筛选 AaM vs. AaS 比较组 DEcircRNA, 筛选标准为 $P \leq 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 。

circRNA 可与 RNA 聚合酶 II、U1 小核糖核蛋白及基因启动子相互作用调控来源基因的表达^[28-29]。circRNA 的来源基因通过使用 Bowtie2^[30]将上述 circRNA 两端的 anchors reads 比对球囊菌参考基因组进行确定。再将来源基因映射到 GO 数据库和 KEGG 数据库, 分别统计映射上的功能条目和 KEGG 通路。

1.5 共有 circRNA、特有 circRNA 及 DEcircRNA 的靶向预测及调控网络分析

基于前期获得的 AaM 和 AaS 的 miRNA 组学数据^[8], 利用 TargetFinder 软件^[31]预测共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 靶向结合的 miRNA。按照 $P \leq 0.05$, 自由能 ≤ 35 的标准进一步从上述预测结果中提取共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 的靶 miRNA, 获得共有 circRNA-miRNA、特有 circRNA-miRNA 以及 DEcircRNA-miRNA 的调控关系。

结合前期获得的 AaM 和 AaS 的 mRNA 组学数据^[7]预测共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 靶向 miRNA 的靶 mRNA, 根据上述靶向结合关系获得共有 circRNA-miRNA-mRNA、特有 circRNA-miRNA-mRNA 以及 DEcircRNA-

miRNA-mRNA 的调控关系。通过 Cytoscape 软件^[32]对各调控网络进行可视化, 参数采用默认参数。进一步对共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 的 ceRNA 调控网络中的靶 mRNA 进行 GO 和 KEGG 数据库注释。

1.6 DEcircRNA 的 RT-qPCR 验证

随机选取 10 个 DEcircRNA (novel_circ_000116、novel_circ_000206、novel_circ_002810、novel_circ_000018、novel_circ_000079、novel_circ_002976、novel_circ_002726、novel_circ_001780、novel_circ_000474 和 novel_circ_002752)进行 RT-qPCR 验证。参照 Guo 等^[25]的方法, 设计和合成上述 DEcircRNA 的特异性反向引物 (表 1)。利用 RNA 抽提试剂盒(天漠, 中国)分别提取 AaM 和 AaS 的总 RNA, 分为 2 份, 其中 1 份总 RNA 经 RNase R

表 1. RT-qPCR 的引物信息

Table 1. Information of primers for RT-qPCR

Primer names	Primer sequences (5'→3')
Novel_circ_000116-F	CACTTCGCTGATTGACG
Novel_circ_000116-R	TGATGTGCTGGTGGTTTG
Novel_circ_000206-F	GAGACAGCAATTCGACAGC
Novel_circ_000206-R	GGATTGGTGATAAGTTTGGC
Novel_circ_002810-F	TCCCTCTCTATCATCTCTGC
Novel_circ_002810-R	CATCATCGTCATCTTTCTGG
Novel_circ_000018-F	CGAATACATTGGGAAAGGAG
Novel_circ_000018-R	AATCAAACACTACTGCCGCC
Novel_circ_000079-F	TAAGGGTGTTCCTGTGGGA
Novel_circ_000079-R	TGATGTGCTGGTGGTTTGA
Novel_circ_002976-F	CCTTGTCTCAAACCAGC
Novel_circ_002976-R	ACAGCAACGAATAGCGATG
Novel_circ_002726-F	AGTTTCCTCTATCTGCGTG
Novel_circ_002726-R	GTCAGTGGTCCGACTTCCG
Novel_circ_001780-F	CTTCATCGCCCAACTTCTG
Novel_circ_001780-R	AAACCTCCACGCCTGCCTA
Novel_circ_000474-F	TGCCAAGGGCGTCCACACC
Novel_circ_000474-R	CTCGCGGGGATAGATCC
Novel_circ_002752-F	AAGAAGGTGCGTCGACCGA
Novel_circ_002752-R	CCCCACAACAGCGAAATGG
<i>actin</i> -F	CAGGAAAGGCTATGTTTCGC
<i>actin</i> -R	ATTACCGAGGAGCAAGACG

酶(吉赛, 中国)处理后以随机引物进行反转录, 获得 circRNA 的 cDNA 模板; 另一份总 RNA 直接作为模板, 以 Oligo (dT)₁₈ 作为引物进行反转录, 获得内参基因 *actin* 的 cDNA 模板。按照 SYBR Green Dye (诺唯赞, 中国)说明书配制 qPCR 的反应体系 (20 μ L)。反应在 ABI Q3 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司, 美国)上进行, 每个反应进行 3 次重复。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对上述 DEcircRNA 的相对表达量进行计算。通过 GraphPad Prism 7 软件(GraphPad 公司, 美国)进行相关数据分析及绘图。

2 结果和分析

2.1 球囊菌菌丝和孢子中 circRNA 的预测及分析

AaM 和 AaS 的 anchors reads 数分别为 13210156 和 19011000 条, 比对上参考基因组的 anchors reads 数分别为 6124922 (46.37%) 条, 11392886 (59.93%)。在 AaM 和 AaS 中分别鉴定到 1868 个和 2225 个 circRNA。其中 AaM 中表达量最高的是 novel_circ_000216, 其次是 novel_circ_000217 和 novel_circ_002913 (表 2); AaS 中表达量最高的是 novel_circ_000216, 其次是 novel_circ_000217 和 novel_circ_001553 (表 3)。

表 2. AaM 中前 10 位的高表达 circRNA

Table 2. Top 10 highly expressed circRNAs in AaM

CircRNA ID	RPM values
Novel_circ_000216	956073.87
Novel_circ_000217	10185.83
Novel_circ_002913	433.85
Novel_circ_001553	276.43
Novel_circ_001554	195.81
Novel_circ_000650	180.45
Novel_circ_001468	180.45
Novel_circ_001884	176.61
Novel_circ_000652	168.93
Novel_circ_001382	145.89

表 3. AaS 中前 10 位的高表达 circRNA

Table 3. Top 10 highly expressed circRNAs in AaS

CircRNA ID	RPM values
Novel_circ_000216	926438.18
Novel_circ_000217	9431.94
Novel_circ_001553	661.65
Novel_circ_001554	428.93
Novel_circ_000682	287.48
Novel_circ_000652	282.91
Novel_circ_002913	278.35
Novel_circ_000986	264.66
Novel_circ_000552	260.10
Novel_circ_001363	246.41

Venn 分析结果表明, AaM 和 AaS 共有的 circRNA 为 1098 个, 特有的 circRNA 分别为 770 和 1127 个。在 AaM 和 AaS 中, 分布在 1000–2000 nt 范围的 circRNA 数量最多, 分别达到 598 和 690 个; 其次为分布在 2000–3000 nt 和 0–500 nt 的 circRNA (图 1)。AaM 和 AaS 中最长的 circRNA 分别为 61627 nt 和 90611 nt, 最短的 circRNA 分别为 90 nt 和 87 nt。进一步分析发现, 对于 AaM 和 AaS 中的 circRNA, 最丰富的环化类型均为基因间区 circRNA, 其次是外显子和内含子 circRNA、单一外显子 circRNA (图 2)。

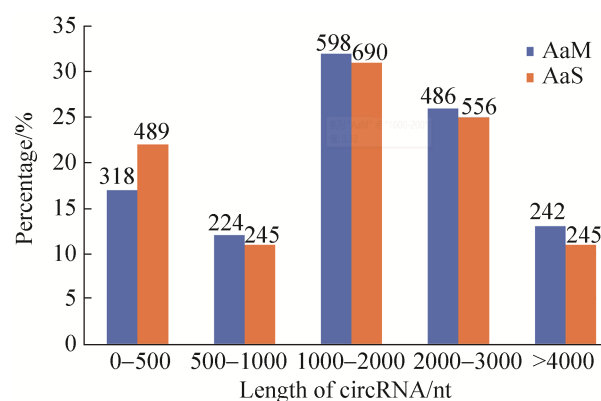


图 1. 球囊菌菌丝和孢子中 circRNA 的长度分布

Figure 1. Length distribution of circRNAs in *A. apis* mycelium and spore.

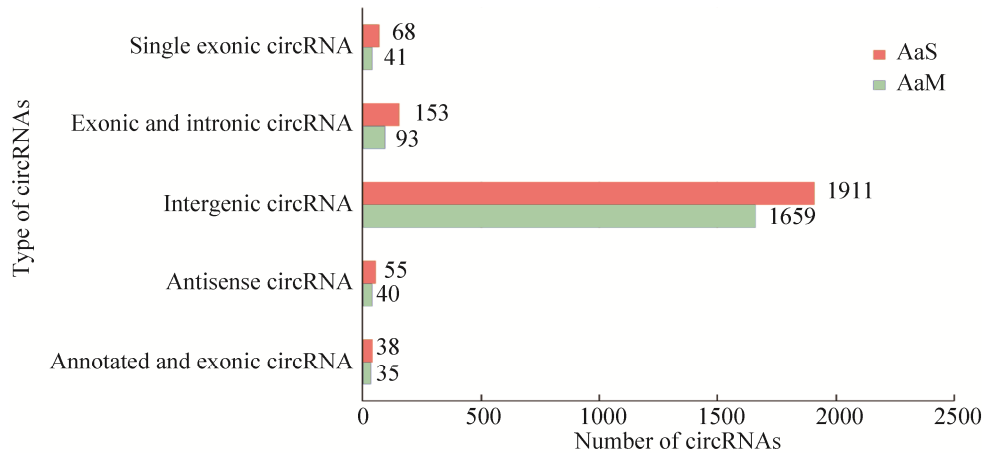


图 2. 球囊菌菌丝和孢子 circRNA 环化类型分布

Figure 2. Cyclization type of circRNAs in *A. apis* mycelium and spore.

2.2 球囊菌菌丝和孢子中共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 的来源基因的数据库注释

共有 circRNA 的来源基因可注释到 GO 数据库的 29 个功能条目, 其中在生物学进程大类中, 注释数量最多的条目分别是代谢进程(32 个)、细胞进程(30 个)及单一组织进程(19 个); 在分子功能大类中, 注释数量最多的为催化活性(17 个)、结合(16 个)及转运器活性(4 个); 在细胞组分大类中, 注释数量最多的为细胞组分(21 个)、细胞(21 个)及细胞器(16 个)(图 3)。

AaM 的特有 circRNA 的来源基因可注释到 31 个功能条目, 包括细胞进程、代谢进程和单一组织进程等 15 个生物学进程相关条目; 结合、催化活性和转运活性等 7 个分子功能相关条目; 细胞、细胞组分和细胞器等 9 个细胞组分相关条目(图 2)。AaS 的特有 circRNA 的来源基因可注释到 34 个功能条目, 包括代谢进程、细胞进程和单一组织进程等 16 个生物学进程相关条目; 结合、催化活性和结构分子活性等 6 个分子功能相关条目; 细胞、细胞组分和细胞器等 12 个细胞组分相关条目(图 3)。

此外, 上述共有 circRNA 的来源基因可注释到 KEGG 数据库中与代谢、遗传信息处理、环境信息处理和细胞进程相关的 14 条通路, 包括为代谢通

路(9 条)、次级代谢产物的生物合成(8 条)、抗生素的生物合成(6 条)、碳代谢(5 条)和不同环境中的微生物代谢(5 条)等(图 4)。AaM 的特有 circRNA 的来源基因可注释到 17 类通路, 包括代谢通路(17 条)、次级代谢产物的生物合成(7 条)、内吞作用(4 条)、氧化磷酸化(4 条)和抗生素的生物合成(4 条)(图 4)。AaS 的特有 circRNA 的来源基因可注释到 16 类通路, 包括代谢通路(27 条)、次级代谢产物的生物合成(15 条)、核糖体(11 条)、抗生素的生物合成(11 条)和不同环境中的微生物代谢(8 条)(图 4)。

2.3 DEcircRNA 的筛选及来源基因分析

AaM vs. AaS 比较组共筛选出 553 个 DEcircRNA, 包括 456 个上调 circRNA 和 97 个下调 circRNA。这些 DEcircRNA 的来源基因可注释到 29 个功能条目, 包括细胞进程、代谢进程和单一组织进程等 12 个生物学进程相关条目; 结合、催化活性和结构分子活性等 6 个分子功能相关条目; 细胞、细胞组分和细胞器等 11 个细胞组分相关条目。此外, 还可以注释到代谢通路(11 个)、次级代谢产物的生物合成(6 个)、核糖体(5 个)、内吞作用(4 个)和不同环境中的微生物代谢(4 个)等 40 条通路。

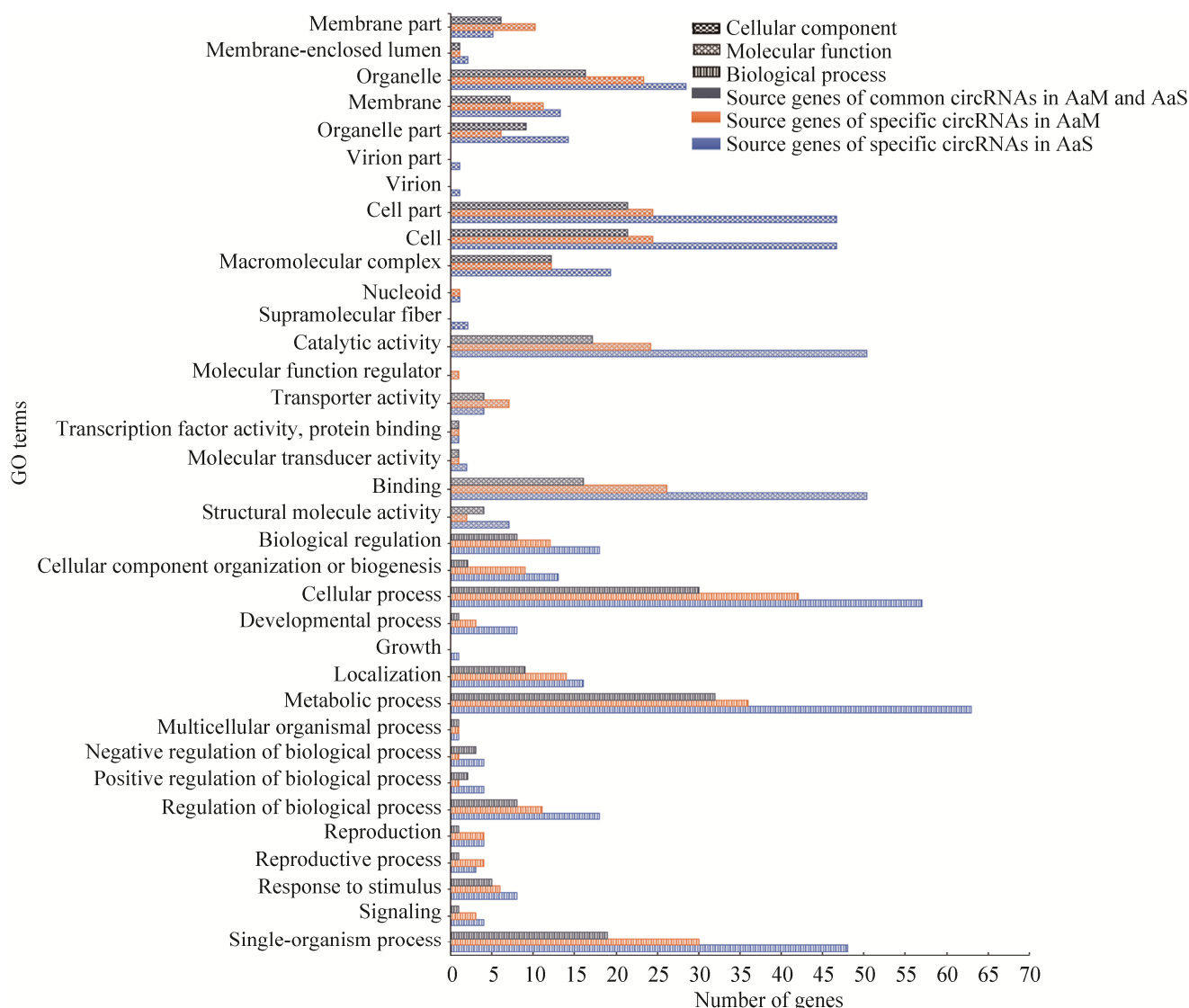


图 3. 球囊菌菌丝和孢子共有和特有 circRNA 的来源基因的 GO 数据库注释

Figure 3. GO database annotation of source genes of common and specific circRNAs in *A. apis* mycelium and spore.

2.4 球囊菌菌丝和孢子的共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA 的 ceRNA 调控网络构建及分析

223 个共有 circRNA 可靶向 22 个 miRNA 进而结合 310 个靶 mRNA; 194 个 AaM 的特有 circRNA 可靶向 9 个 miRNA 进而结合 264 个靶 mRNA; 282 个 AaS 的特有 circRNA 可靶向 17 个 miRNA 进而结合 28 个靶 mRNA; 68 个 DEcircRNA

可靶向 3 个 miRNA 进而结合 1082 个靶 mRNA。

对 ceRNA 调控网络中的靶 mRNA 进行功能注释, 结果显示共有 circRNA 的靶 mRNA 可注释细胞进程、代谢进程和催化活性等 31 个功能条目, 以及代谢通路、抗生素的生物合成和次级代谢产物的生物合成等 72 条通路; AaM 的特有 circRNA 的靶 mRNA 可注释细胞进程、代谢进程和催化活性等 30 个功能条目, 以及代谢通路、抗生素的生物

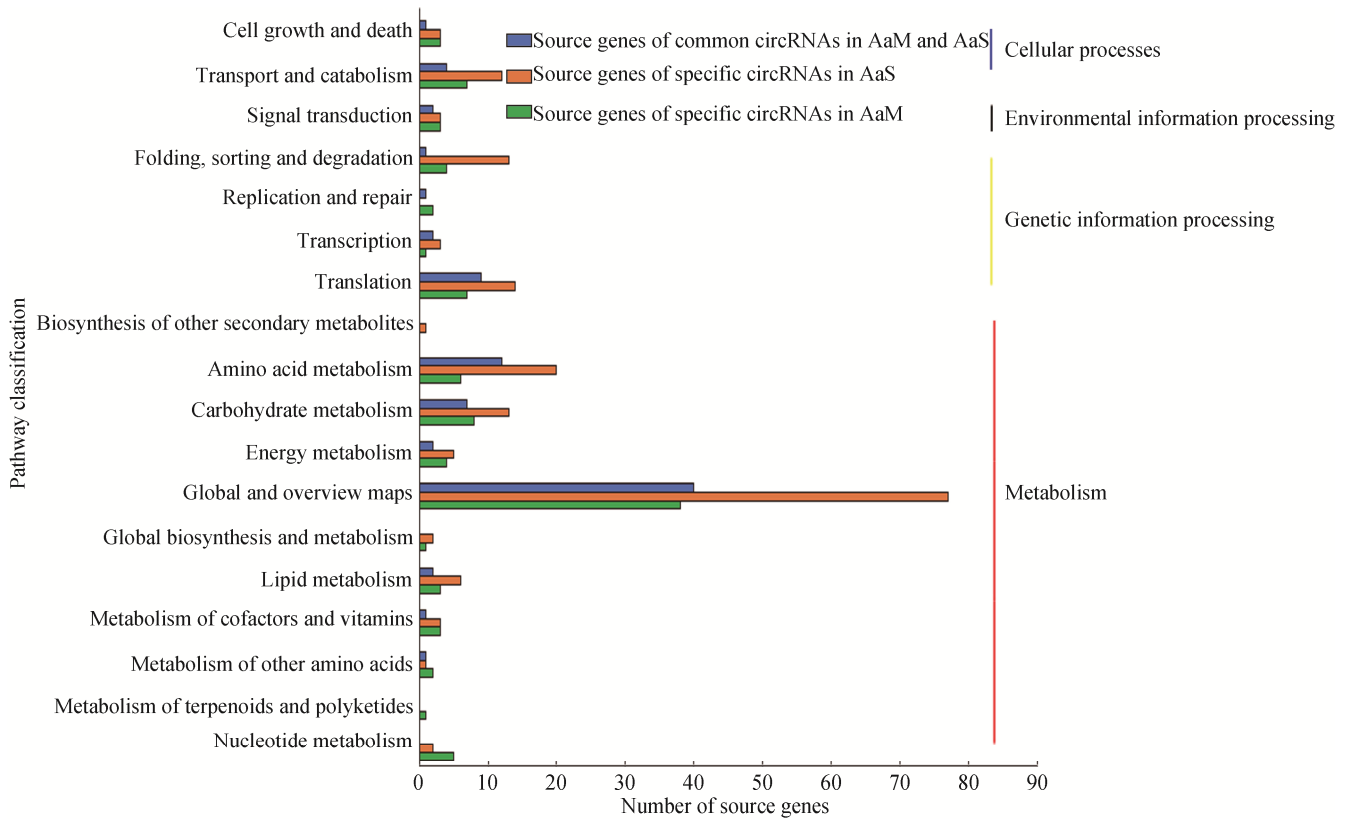


图 4. 球囊菌菌丝和孢子共有和特有 circRNA 的来源基因的 KEGG 数据库注释

Figure 4. KEGG database annotation of source genes of common and specific circRNAs in *A. apis* mycelium and spore.

合成和次级代谢产物的生物合成等 61 条通路; AaS 的特有 circRNA 的靶 mRNA 可注释细胞进程、代谢进程和结合等 21 个功能条目, 以及 RNA 转运、碳代谢和不同环境中的微生物代谢等 24 条通路; DEcircRNA 的靶 mRNA 可注释细胞进程、代谢进程和催化活性等 41 个功能条目, 以及代谢通路、次级代谢产物生物合成和抗生素的生物合成等 106 条通路。

进一步分析发现, 36 个共有 circRNA 可靶向 4 个 miRNA 进而调控 6 个内吞作用相关的靶 mRNA (图 5-A); AaM 的 4 个特有 circRNA 可靶向 2 个 miRNA 进而调控 8 个次级代谢产物生物合成通路

相关的靶 mRNA (图 5-B); AaS 的 255 个特有 circRNA 可靶向 2 个 miRNA 进而调控 2 个次级代谢产物生物合成通路相关的靶 mRNA (图 5-C); 9 个 DEcircRNA 可靶向 2 个 DEmiRNA 进而调控 3 个 MAPK 信号通路相关的 DEmRNA (图 6)。

2.5 DEcircRNA 的 RT-qPCR 验证

随机选取 10 个 DEcircRNA 进行 RT-qPCR 验证, 结果显示 DEcircRNA 的表达水平与测序数据中相应的表达水平变化趋势一致(图 7), 证明了测序数据的可靠性和 DEcircRNA 表达趋势的准确性。

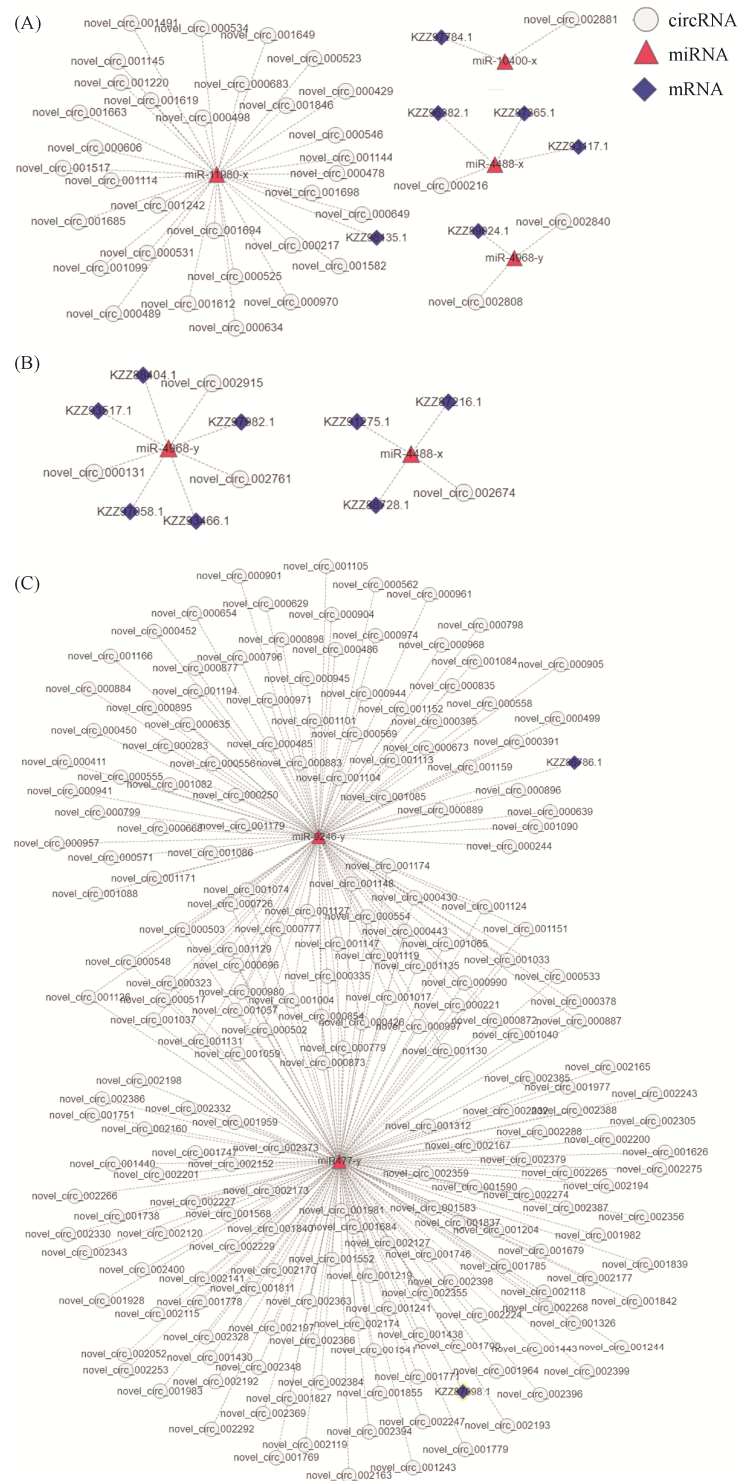


图 5. 球囊菌丝和孢子的共有和特有 circRNA 的 ceRNA 调控网络

Figure 5. CeRNA regulation networks of common and specific circRNAs in *A. apis* mycelium and spore. A: ceRNA network of common circRNAs in *A. apis* mycelium and spore and their target mRNAs relative to endocytosis pathway; B: ceRNA network of specific circRNAs in *A. apis* mycelium and their target mRNAs relative to biosynthesis of secondary metabolites pathway; C: ceRNA network of specific circRNAs *A. apis* spore and their target mRNAs relative to biosynthesis of secondary metabolites pathway.

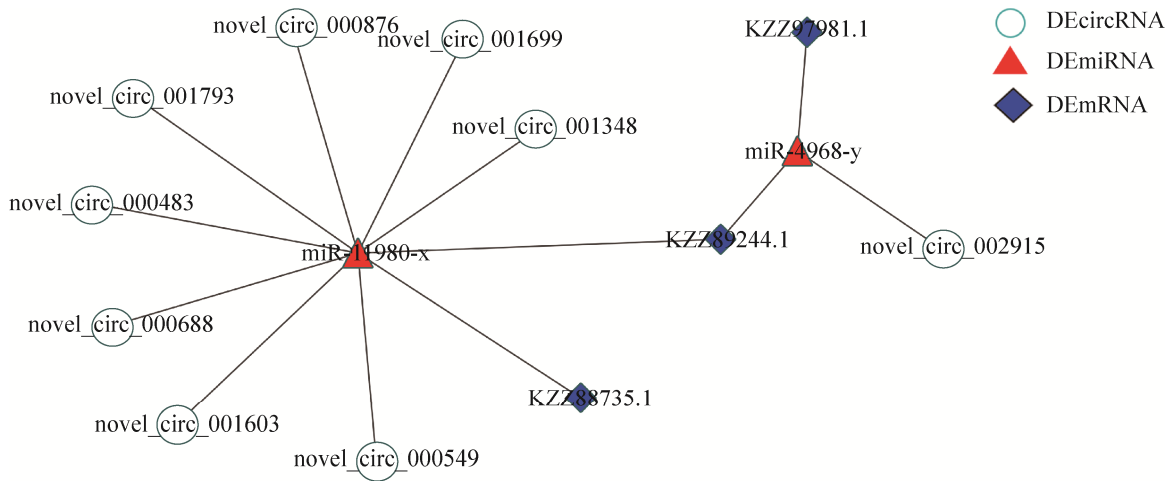


图 6. 球囊菌菌丝和孢子 DEcircRNA 的 ceRNA 调控网络

Figure 6. CeRNA regulation network of DEcircRNA between mycelium and spore of *A. apis*.

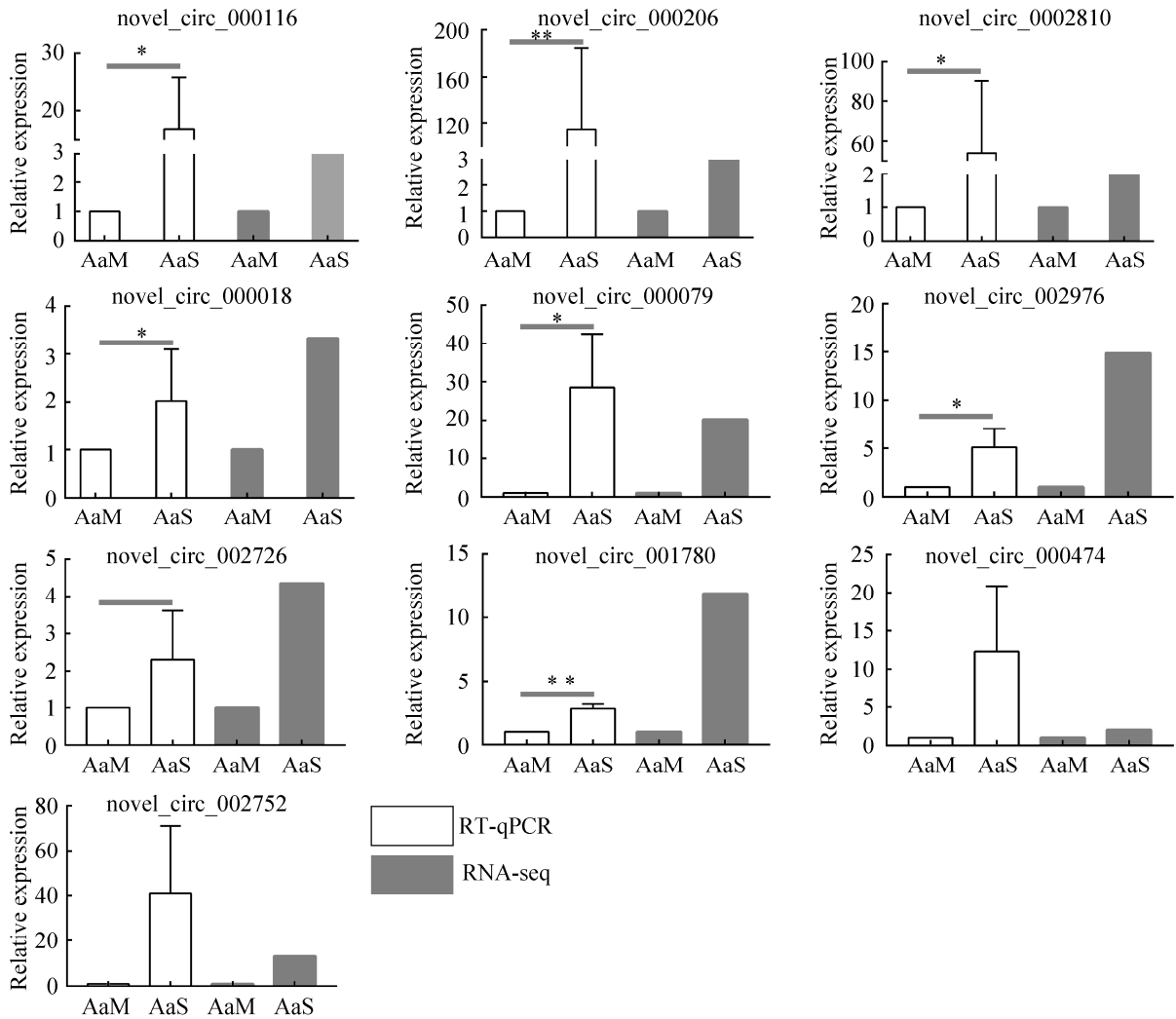


图 7. DEcircRNA 的 RT-qPCR 验证

Figure 7. RT-qPCR validation of DEcircRNAs. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论

前期研究中, 笔者团队采用链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术和 sRNA-seq 技术分别测序了球囊菌菌丝和孢子, 同时获得了 mRNA^[7]、miRNA^[8]、lncRNA (未发表数据) 和 circRNA 组学数据。之所以采用链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术而没有采用去线性 RNA 的 circRNA-seq 技术, 是因为后者虽然可能检测到更多的低表达 circRNA, 但因为预先使用 RNase R 消化去除了绝大多数的线性 RNA, 导致无法同时计算 circRNA 与其他 RNA 的表达量关系^[33]。因此, 本研究基于已获得的球囊菌菌丝和孢子的全转录组数据筛选出 circRNA 组学数据, 分别从 AaM 和 AaS 中鉴定到 1868 个和 2225 个 circRNA, 它们的长度主要分布在 1000–2000 nt, 主要环化类型均为基因间区 circRNA (88.81%和 85.89%)。东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)是养蜂生产中另一种常见的蜜蜂真菌病原, 其 circRNA 的主要环化类型为外显子 circRNA (85.29%) 和基因间区 circRNA (14.71%)^[34], 表明不同蜜蜂真菌病原的 circRNA 环化类型存在差异。笔者团队前期研究发现意蜂主要环化类型为已注释外显子 circRNA (48.56%) 和反义链 circRNA (15.83%)^[22], 而中蜂的主要环化类型均为已注释外显子 circRNA (47.45%) 和反义链 circRNA (18.66%)^[24], 表明来源于不同物种的 circRNA 的环化类型具有物种特异性。circRNA 的表达具有组织特异性^[15,31]。本研究中, 球囊菌菌丝和孢子的共有 circRNA 为 1098 个, 特有 circRNA 的数量分别为 770 和 1127 个。推测上述共有 circRNA 可能在球囊菌生活史的不同阶段发挥必要的生物学功能, 而特有 circRNA 在菌丝和

孢子中分别发挥不同的调控功能。鉴于球囊菌的 circRNA 研究目前还十分滞后, 本研究的鉴定结果较好地丰富了球囊菌的 circRNA 信息, 也能为其他真菌物种的 circRNA 研究提供有益的参考信息。

circRNA 可与 RNA 聚合酶 II、U1 小核糖核蛋白及基因启动子相互作用调控来源基因的表达, 从而发挥特定的生物学功能^[28–29]。本研究中, AaM 和 AaS 的共有 circRNA 的来源基因可注释到生物学进程、细胞组分和分子功能相关的 29 个功能条目, 包括代谢进程、细胞进程、催化活性、生殖和生殖进程等; 此外还可注释到 38 条通路, 包括赖氨酸降解和半胱氨酸和蛋氨酸的代谢等 10 条氨基酸代谢相关通路, 三羧酸循环和磷酸戊糖途径等 5 条碳水化合物代谢相关通路, 脂肪酸伸长和不饱和脂肪酸的生物合成等 2 条脂质代谢相关通路, 以及 1 条能量代谢相关通路(氧化磷酸化)。以上结果说明上述共有 circRNA 可能通过调控相应的来源基因表达广泛调节球囊菌菌丝和孢子的物质和能量代谢。内吞作用是通过质膜的变形运动将胞外物质转运入胞内的过程。真菌菌丝在生长过程中其顶端具有较为活跃的物质合成和分泌过程, 而膜泡通过内吞作用将酶类与质膜等关键分子往返运输于菌丝顶端和其他部位^[35]。在稻瘟病病原(*Magnaporthe oryzae*)中, 内吞作用相关基因 *MoARK1* 和 *MoPANI* 可显著影响细胞壁的完整性、产孢量以及致病性^[36]。本研究发现, 3 个共有 circRNA (novel_circ_002895、novel_circ_002896 和 novel_circ_000146) 调控的 3 个来源基因可注释到内吞作用通路, 说明这些 circRNA 可能通过调控相关来源基因的表达调节菌丝和孢子的内吞作用, 进行影响物质代谢、杂交产孢和致病性。

次级代谢产物一般分为抗生素、激素、生物碱和毒素等类型。在侵染宿主时,真菌能够分泌次级代谢物促进自身增殖并杀死宿主^[37-38]。卵孢白僵菌(*Beauveria tenella*)和球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)合成与分泌的草酸和类草酸晶体等次级代谢物可协同致死宿主^[37]。本研究中,球囊菌菌丝的4个特有 circRNA 调控的来源基因可注释到次级代谢产物生物合成通路。前期研究发现菌丝的4个特有 lncRNA 可能通过顺式作用调控相关基因表达,从而调节次级代谢产物生物合成通路(未发表数据)。以上结果表明菌丝的特有 circRNA 和特有 lncRNA 具有调控次级代谢产物生物合成的潜在功能,可能在侵染和致死宿主的过程中发挥重要作用。此外,真菌的孢子萌发也受次级代谢物的影响^[38-39],例如禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)分生孢子和菌落的产生受自身次级代谢物的诱导^[39]。本研究发现,孢子的255个特有 circRNA 调控的来源基因可注释到次级代谢产物通路。前期研究发现孢子的197个特有 miRNA 调控的288个靶 mRNA 也注释到了次级代谢产物生物合成通路^[8]。上述结果表明孢子的部分特有 circRNA 和特有 miRNA 可能通过共同调控次级代谢产物的合成影响孢子萌发,两种不同类型的 ncRNA 之间或存在一定的关联。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应在真菌的致病性、有性生殖及孢子形成等方面发挥关键调控作用^[40-41],其依赖的 MAPK 激酶可协助病原真菌侵染宿主^[42-43]。在前期研究中,我们发现 AaS vs AaM 比较组中11个 DElncRNA 通过顺式作用调节9个上下游基因,对 MAPK 信号通路具有潜在调控性^[7]。本研究中,2个 DEcircRNA (novel_circ_002736 和 novel_circ_

002895)调控的2个来源基因可注释到 MAPK 信号通路。上述结果表明 DEcircRNA 和 DElncRNA 可能通过不同的方式调控基因表达,进而通过调节 MAPK 信号通路影响球囊菌菌丝和孢子的有性生殖和致病过程。ceRNA 机制认为凡含有相同或类似 MRE 的转录本如 circRNA 和 lncRNA 等均可以通过竞争结合 miRNA 间接调控基因表达^[44-47]。ZHANG 等^[47]证实胶质母细胞中的 circRNAMOT1 能够作为“分子海绵”吸附结合 miR-92,继而上调 WWOX 信号通路相关基因的表达,进而抑制胶质细胞瘤细胞的增殖。本研究中,ceRNA 调控网络分析结果显示223个共有 circRNA、194个菌丝特有 circRNA、282个孢子特有 circRNA 和68个 DEcircRNA 分别靶向结合22、9、17和3个 miRNA,进而调控310、264、28和1082个 mRNA。进一步分析发现,菌丝和孢子共有的36个 circRNA 靶向4个 miRNA,进而调控内吞作用相关的6个靶 mRNA;菌丝的4个特有 circRNA 靶向2个 miRNA,进而调控次级代谢产物生物合成相关的8个靶 mRNA;孢子的255个特有 circRNA 靶向2个 miRNA,进而调控次级代谢产物生物合成通路相关的2个靶 mRNA;此外,9个 DEcircRNA 靶向结合了2个 DEmiRNA,进而调控 MAPK 信号通路相关的3个 DEmRNA。以上结果表明球囊菌的 circRNA 可能通过 ceRNA 机制调控上述靶 mRNA 相关的基因表达,进而通过调节内吞作用、次级代谢产物生物合成和 MAPK 信号通路参与球囊菌的有性生殖和致病过程。但需要强调的是,本研究涉及的球囊菌菌丝和孢子均来自于实验室条件下获得的纯培养,不同于处于侵染过程的球囊菌,因而上述分析结果更多体现的是部分共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA

与球囊菌致病性的潜在关联。目前, 笔者团队已制备球囊菌侵染的意蜂幼虫肠道和中蜂幼虫肠道样品, 下一步将利用链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术对上述肠道样品进行测序, 通过连续比对核糖体数据库、蜜蜂宿主基因组和球囊菌基因组筛选得到病原数据, 再结合球囊菌孢子的测序数据进行比较分析, 处于侵染过程的球囊菌的 DEcircRNA 与病原致病性的关系将更为直接和真实。

根癌农杆菌介导(AtMT)的真菌遗传转化体系为真菌基因的分离克隆和功能研究提供了技术平台, 目前已经广泛应用于昆虫病原真菌^[48-50]的基因功能研究。下一步的工作重点是构建根癌农杆菌介导的球囊菌遗传转化技术体系, 并对内吞作用、次级代谢产物生物合成和 MAPK 信号通路等相关的关键 circRNA 进行初步的功能研究。

4 结论

本研究通过全面分析球囊菌菌丝和孢子的共有 circRNA、特有 circRNA 和 DEcircRNA, 解析了菌丝和孢子中 circRNA 的数量和种类差异, 揭示了部分 circRNA 可能通过调控来源基因和充当 ceRNA 的方式调节内吞作用、次级代谢产物生物合成和 MAPK 信号通路及相关基因表达, 进而影响球囊菌的物质和能量代谢、杂交产孢和致病性。

参考文献

- [1] Calderón RA, Rivera G, Sánchez A, Zamora LG. Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) and some other fungi associated with Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 2004, 43(4): 187–188.
- [2] Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103 Suppl 1: S20–S29.
- [3] 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.
- [4] Shang YF, Xiao GH, Zheng P, Cen K, Zhan S, Wang CS. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 2016, 8(5): 1374–1387.
- [5] 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)
张翌楠, 熊翠玲, 徐细建, 黄枳隼, 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.
- [6] Guo R, Chen HZ, Tong XY, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xie YL, Wang HP, Zhao HX, Chen DF. Structural optimization of annotated genes and identification of novel genes in *Ascosphaera apis*. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(1): 61–68. (in Chinese)
郭睿, 陈华枝, 童新宇, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 解彦玲, 王海朋, 赵红霞, 陈大福. 蜜蜂球囊菌基因结构优化及新基因鉴定. *中国农业大学学报*, 2019, 24(1): 61–68.
- [7] Jiang HB, Du Y, Fan XX, Wang J, Zhu ZW, Fan YC, Xiong CL, Fu ZM, Xu GJ, Chen DF, Guo R. Comparative transcriptome analysis of *Ascosphaera apis* mycelium and spore. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2020, 57(6): 1178–1185. (in Chinese)
蒋海宾, 杜宇, 范小雪, 王杰, 祝智威, 范元婵, 熊翠玲, 付中民, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 蜜蜂球囊菌菌丝和孢子的比较转录组分析. *四川大学学报(自然科学版)*, 2020, 57(6): 1178–1185.
- [8] Chen HZ, Zhu ZW, Jiang HB, Wang J, Fan YC, Fan XX, Wan JQ, Lu JX, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Chen DF, Guo R. Comparative analysis of microRNAs and corresponding target mRNAs in *Ascosphaera apis* mycelium and spore. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(17): 3606–3619. (in Chinese)
陈华枝, 祝智威, 蒋海宾, 王杰, 范元婵, 范小雪, 万洁琦, 卢家轩, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 陈大福, 郭睿. 蜜蜂球囊菌菌丝和孢子中微小 RNA 及其靶 mRNA 的比较分析. *中国农业科学*, 2020, 53(17): 3606–3619.
- [9] Qu SB, Zhong Y, Shang RZ, Zhang X, Song WJ, Kjems J, Li HM. The emerging landscape of circular RNA in life processes. *RNA Biology*, 2017, 14(8): 992–999.

- [10] Perkel JM. Assume nothing: the tale of circular RNA. *Biotechniques*, 2013, 55(2): 55–57.
- [11] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu JZ, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157.
- [12] Chen X, Shi W, Chen C. Differential circular RNAs expression in ovary during oviposition in honey bees. *Genomics*, 2019, 111(4): 598–606.
- [13] Liu JW, Chen LL. Analysis of circular RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Hans Journal of Computational Biology*, 2015, 5(2): 17–28.
- [14] Danan M, Schwartz S, Edelheit S, Sorek R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in *Archaea*. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): 3131–3142.
- [15] He J, Xie QC, Xu HL, Li JT, Li YS. Circular RNAs and cancer. *Cancer Letters*, 2017, 396: 138–144.
- [16] Chen LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(8): 475–490.
- [17] Yang Y, Fan XJ, Mao MW, Song XW, Wu P, Zhang Y, Jin YF, Yang Y, Chen LL, Wang Y, Wong CC, Xiao XS, Wang ZF. Extensive translation of circular RNAs driven by N^6 -methyladenosine. *Cell Research*, 2017, 27(5): 626–641.
- [18] Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, Hanan M, Wyler E, Perez-Hernandez D, Ramberger E, Shenzis S, Samson M, Dittmar G, Landthaler M, Chekulaeva M, Rajewsky N, Kadener S. Translation of circRNAs. *Molecular Cell*, 2017, 66(1): 9–21.
- [19] Qu SB, Yang XS, Li XL, Wang JL, Gao Y, Shang RZ, Sun W, Dou KF, Li HM. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs. *Cancer Letters*, 2015, 365(2): 141–148.
- [20] Yang J, Li Y, Yu ZC, Zhou YF, Tu JF, Lou J, Wang YH. Circular RNA circ100084 functions as sponge of miR-23a-5p to regulate IGF2 expression in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(6): 2395–2404.
- [21] Chen DF, Guo R, Xu XJ, Xiong CL, Liang Q, Zheng YZ, Luo Q, Zhang ZN, Huang ZJ, Kumar D, Xi WJ, Zou X, Liu M. Uncovering the immune responses of *Apis mellifera ligustica* larval gut to *Ascosphaera apis* infection utilizing transcriptome sequencing. *Gene*, 2017, 621: 40–50.
- [22] Xiong CL, Chen HZ, Chen DF, Zheng YZ, Fu ZM, Xu GJ, Du Y, Wang HP, Geng SH, Zhou DD, Liu SY, Guo R. Analysis of circular RNAs and their regulatory networks in the midgut of *Apis mellifera ligustica* workers. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61(12): 1363–1375. (in Chinese) 熊翠玲, 陈华枝, 陈大福, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 杜宇, 王海朋, 耿四海, 周丁丁, 刘思亚, 郭睿. 意大利蜜蜂工蜂中肠的环状 RNA 及其调控网络分析. *昆虫学报*, 2018, 61(12): 1363–1375.
- [23] Guo R, Chen HZ, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu GJ, Du Y, Wang HP, Geng SH, Zhou DD, Liu SY, Chen DF. Analysis of differentially expressed circular RNAs and their regulation networks during the developmental process of *Apis mellifera ligustica* worker's midgut. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(23): 4575–4590. (in Chinese) 郭睿, 陈华枝, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 杜宇, 王海朋, 耿四海, 周丁丁, 刘思亚, 陈大福. 意大利蜜蜂工蜂中肠发育过程中的差异表达环状 RNA 及其调控网络分析. *中国农业科学*, 2018, 51(23): 4575–4590.
- [24] Chen DF, Chen HZ, Du Y, Zhu ZW, Wang J, Geng SH, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Diao QY, Guo R. Systematic identification of circular RNAs and corresponding regulatory networks unveil their potential roles in the midguts of eastern honeybee workers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 257–276.
- [25] Guo R, Chen DF, Chen HZ, Fu ZM, Xiong CL, Hou CS, Zheng YZ, Guo YL, Wang HP, Du Y, Diao QY. Systematic investigation of circular RNAs in *Ascosphaera apis*, a fungal pathogen of honeybee larvae. *Gene*, 2018, 678: 17–22.
- [26] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, Le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, 495(7441): 333–338.
- [27] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140.
- [28] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu SS, Yang L, Chen LL. Circular intronic long noncoding RNAs. *Molecular Cell*, 2013, 51(6): 792–806.
- [29] Li ZY, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang XL, Zhong GL, Yu B, Hu WC, Dai LM, Zhu PF, Chang ZX, Wu QF, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu HJ, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(3): 256–264.

- [30] Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Mining*, 2015, 8(1): 1.
- [31] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Carrington JC. microRNA-directed phasing during *Trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121(2): 207–221.
- [32] 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.
- [33] Hu XL, Zhu M, Zhang X, Liu B, Liang Z, Huang LX, Xu J, Yu L, Li K, Zar MS, Xue RY, Cao GL, Gong CL. Identification and characterization of circular RNAs in the silkworm midgut following *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus infection. *RNA Biology*, 2018, 15(2): 292–301.
- [34] Guo R, Chen DF, Chen HZ, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS, Du Y, Geng SH, Wang HP, Zhou DD, Guo YL. Genome-wide identification of circular RNAs in fungal parasite *Nosema ceranae*. *Current Microbiology*, 2018, 75(12): 1655–1660.
- [35] Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 857–902.
- [36] Wang JM. Characterization of two endocytosis *MoARK1* and *MoPAN1* in development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. Master Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
王佳妹. 细胞内吞作用基因 *MoARK1* 和 *MoPAN1* 在稻瘟病菌生长发育及致病过程中的功能研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2012.
- [37] Huang JM, Zhang PZ, Wang F, Li Y, Feng SJ, Yang M. Advanced studies on metabolites and pharmacological of *Beauveria bassiana*. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2014, 34(9): 167–173. (in Chinese)
黄居敏, 张普照, 王芳, 李旻, 冯少俊, 杨明. 白僵菌的代谢产物及药理活性研究进展. 中国生化药物杂志, 2014, 34(9): 167–173.
- [38] Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 447–459.
- [39] Wolf JC, Mirocha CJ. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum') by F-2 (Zearalenone). *Canadian Journal of Microbiology*, 1973, 19(6): 725–734.
- [40] Zhao XH, Mehrabi R, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(10): 1701–1714.
- [41] Igarria A, Lev S, Rose MS, Lee BN, Hadar R, Degani O, Horwitz BA. Distinct and combined roles of the MAP kinases of *Cochliobolus heterostrophus* in virulence and stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(6): 769–780.
- [42] Chen XX, Xu C, Qian Y, Liu R, Zhang QQ, Zeng GH, Zhang X, Zhao H, Fang WG. MAPK cascade-mediated regulation of pathogenicity, conidiation and tolerance to abiotic stresses in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(3): 1048–1062.
- [43] Jiang C, Zhang X, Liu HQ, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant pathogenic fungi. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(3): e1006875.
- [44] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*, 2011, 146(3): 353–358.
- [45] Deng YY, Zhang WP, She JQ, Zhang LS, Chen T, Zhou J, Yuan ZY. GW27-e1167 circular RNA related to PPAR γ function as ceRNA of microRNA in human acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 2016, 68(16S): C51–C52.
- [46] Pan RY, Liu P, Zhou HT, Sun WX, Song J, Shu J, Cui GJ, Yang ZJ, Jia EZ. Circular RNAs promote TRPM3 expression by inhibiting hsa-miR-130a-3p in coronary artery disease patients. *Oncotarget*, 2017, 8(36): 60280–60290.
- [47] Zhang XW, Zhong B, Zhang WJ, Wu J, Wang Y. Circular RNA *CircMTO1* inhibits proliferation of glioblastoma cells via miR-92/WWOX signaling pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2019, 25: 6454–6461.
- [48] Fang WG, Pei Y, Bidochka MJ. Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(7): 623–626.
- [49] Leclerque A, Wan H, Abschütz A, Chen SW, Mitina GV, Zimmermann G, Schairer HU. Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Current Genetics*, 2004, 45(2): 111–119.
- [50] Zhang YJ, Zhao JJ, Xie M, Peng DL. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* and development of benzimidazole fungicide resistant strains. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 105: 168–173.

Identification and comparison of circular RNAs in *Ascosphaera apis* mycelium and spore

Huazhi Chen^{1#}, Haibin Jiang^{1#}, Zhiwei Zhu¹, Yuanchan Fan¹, Yajing Xu¹, Minghui Sun¹, Jiamei Liu¹, Cuiling Xiong¹, Yanzhen Zheng^{1,2}, Zhongmin Fu^{1,2}, Guojun Xu^{1,2}, Dafu Chen^{1,2}, Rui Guo^{1,2,3*}

¹ College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

² Apitherapy Research Institution, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

³ Engineering Research Center of Processing and Application of Bee Products of Ministry of Education, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this study is to clarify the differences of number, type and expression profile of circRNAs between *Ascosphaera apis* mycelium and spore, and discuss the potential role of common circRNAs, specific circRNAs and differentially expressed circRNAs (DEcircRNAs). [Methods] Based on previously gained high-quality RNA-seq data of *A. apis* mycelium (AaM) and spore (AaS), circRNAs were predicted using find_circ software. Common circRNAs and specific circRNAs were filtered via Venn analysis. DEcircRNAs of AaM vs AaS were screened following the standard of $P \leq 0.05$ and $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$. Function and pathway annotation of source genes of circRNAs was done via alignment against GO and KEGG databases. CircRNA-targeted miRNAs and miRNA-targeted mRNAs were predicted using TargetFinder software. Cytoscape software was used to visualize competing endogenous RNA (ceRNA) regulation network. DEcircRNAs were verified by RT-qPCR. [Results] There were 13210156 and 19011000 anchors reads in AaM and AaS, respectively, among them 6124922 and 11392886 ones can be mapped to the reference genome of *A. apis*. In AaM and AaS groups, 1868 and 2225 circRNA were respectively identified, and the numbers of common circRNAs, specific circRNAs in AaM and specific circRNAs in AaS were 1098, 770 and 1127, respectively. In addition, the length of circRNAs in AaM and AaS was mainly distributed among 1000–2000 nt, and the most abundant circularization type was intergenic circRNA. Further, 456 upregulated circRNAs and 97 downregulated circRNAs were contained in AaM vs AaS comparison group. Source genes of common circRNAs were annotated to 29 functional terms and 14 pathway classifications; source genes of specific circRNAs in AaM were annotated to 31 functional terms and 17 pathway classifications; source genes of specific circRNAs in AaS were annotated to 34 functional terms and 16 pathway classifications; source genes of DEcircRNAs were annotated to 29 functional terms and 40 pathways. ceRNA regulation network analysis showed that 36 common circRNAs can target four miRNAs, further regulating six mRNAs related to endocytosis. Additionally, four (255) specific circRNAs in AaM (AaS) can target two (two) miRNAs, further regulating eight (two) mRNAs related to biosynthesis of secondary metabolites; nine DEcircRNAs can target two DEmiRNAs, further regulating three DEMRNAs associated with MAPK signal pathway. The result of RT-qPCR displayed that the expression trend of 10 DEcircRNAs was consistent with that in the sequencing result, verifying the reliability of our sequencing data. [Conclusion] Common circRNAs, specific circRNAs and DEcircRNAs in *A. apis* mycelium and spore may regulate material and energy metabolisms, endocytosis, biosynthesis of secondary metabolites, and MAPK signaling pathway through controlling the expression of source genes and serving as ceRNAs, further affecting the mycelium growth, spore germination, and pathogenicity of *A. apis*.

Keywords: chalkbrood, *Ascosphaera apis*, mycelium, spore, circular RNA, microRNA, competing endogenous RNA

(本文责编: 李磊)

Supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-44-KXJ7), by the Master Supervisor Team Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (Rui Guo), by the Scientific and Technical Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017342, CXZX2017343), by the Open Project of Fujian Key Laboratory of Pathogenic Fungi and Mycotoxins (Fujian Agriculture and Forestry University) and by the Fund for Excellent Master Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University (Huazhi Chen)

[#]These authors contributed equally to this work.

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

Received: 19 June 2020; Revised: 2 September 2020; Published online: 3 February 2021