



意大利蜜蜂工蜂幼虫 *nkd* 基因的生物信息学分析及功能研究

郭意龙^{1,2#}, 余岢骏^{1,2#}, 赵萧¹, 钱加珺¹, 赵浩东¹, 张婕¹, 张扬¹, 赵红霞³, 徐细建⁴, 骆群⁴, 陈大福^{1,2*}, 郭睿^{1,2*}

1 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

2 福建省蜂疗研究所, 福建 福州 350002

3 广东省科学院动物研究所, 广东 广州 510260

4 江西省养蜂研究所, 江西 南昌 330000

郭意龙, 余岢骏, 赵萧, 钱加珺, 赵浩东, 张婕, 张扬, 赵红霞, 徐细建, 骆群, 陈大福, 郭睿. 意大利蜜蜂工蜂幼虫 *nkd* 基因的生物信息学分析及功能研究. 微生物学报, 2022, 62(12): 5005–5017.

Guo Yilong, Yu Kejun, Zhao Xiao, Qian Jiajun, Zhao Haodong, Zhang Jie, Zhang Yang, Zhao Hongxia, Xu Xijian, Luo Qun, Chen Dafu, Guo Rui. Bioinformatic analysis and functional study of *nkd* gene in larvae of *Apis mellifera ligustica* workers. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 5005–5017.

摘要: 【目的】意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)是西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的亚种之一。蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)感染意蜂幼虫导致白垩病。本研究对西方蜜蜂裸表皮蛋白(naked cuticle, Nkd)进行保守基序预测和系统进化分析, 并通过 RNAi 明确 *nkd* 基因对意蜂工蜂幼虫体重及宿主响应蜜蜂球囊菌胁迫的免疫应答的影响, 以期丰富西方蜜蜂基因 *nkd* 的信息, 并揭示意蜂幼虫 *nkd* 的功能。【方法】通过 MEME 软件预测西方蜜蜂和其他 9 个物种 Nkd 蛋白的保守基序。采用 MEGA X 软件对西方蜜蜂及其他 9 个物种的 Nkd 蛋白进行系统进化分析。通过饲喂 dsRNA 对意蜂幼虫肠道内的 *nkd* 进行 RNAi。使用电子天平对幼虫进行称重。利用 RT-qPCR 检测

基金项目: 国家自然科学基金(31702190); 国家现代农业产业技术体系(CARS-44-KXJ7); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿); 江西省蜜蜂生物学与饲养重点实验室开放基金(JXKLHBB-2020-04); 福建省大学生创新创业训练计划(202210389127, 202210389131)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31702190), by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-44-KXJ7), by the Master Supervisor Team Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (Guo Rui), by the Open Fund for Jiangxi Province Key Laboratory of Honeybee Biology and Beekeeping (JXKLHBB-2020-04) and by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (202210389127, 202210389131)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. Tel: +86-591-87640197; E-mail: GUO Rui, ruiguo@fafu.edu.cn, CHEN Dafu, dfchen826@fafu.edu.cn

Received: 1 April 2022; Revised: 31 May 2022; Published online: 18 June 2022

nkd 基因的干扰效率及免疫基因的相对表达量。【结果】西方蜜蜂与东方蜜蜂、柑橘凤蝶、家蚕和金凤蝶的 Nkd 蛋白均含有 3 个保守基序(motif 1、motif 2 和 motif 3), 说明上述 5 个昆虫物种的 Nkd 具有较高的保守性。西方蜜蜂与东方蜜蜂的 Nkd 蛋白聚为一支, 说明二者的亲缘关系近。与 dsRNA-*egfp* 组相比, dsRNA-*nkd* 组 5 日龄和 6 日龄幼虫肠道内 *nkd* 的表达量均极显著下调 ($P < 0.001$), 干扰效率分别为 49.60% 和 56.40%。另外, dsRNA-*nkd* 组幼虫体重较 dsRNA-*egfp* 组显著下降, 说明 *nkd* 显著影响幼虫体重。RT-qPCR 结果显示, 4 日龄幼虫肠道内 *abaecin*、*apidaecin*、*birc5*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 均被激活表达; 5 日龄幼虫肠道内 *abaecin*、*apidaecin*、*birc5* 和 *defensin-1* 均被激活表达, *PGRP-S2* 的表达受到抑制; 6 日龄幼虫肠道内 *abaecin* 被激活表达, 而 *apidaecin*、*birc5*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达均受到抑制, 说明上述 5 个免疫基因在宿主响应胁迫的过程中呈不同的表达趋势, 均参与宿主的免疫应答, *nkd* 与 *abaecin* 和 *apidaecin* 的表达存在负向调控关系。【结论】西方蜜蜂的 Nkd 蛋白含有 3 个保守基序(motif 1、motif 2 和 motif 3), 西方蜜蜂与东方蜜蜂的 Nkd 蛋白亲缘关系最近, 通过饲喂 dsRNA 能有效干扰意蜂工蜂幼虫肠道内 *nkd* 表达, *nkd* 影响意蜂工蜂幼虫体重及宿主对蜜蜂球囊菌胁迫的免疫应答。

关键词: 西方蜜蜂; 意大利蜜蜂; 蜜蜂球囊菌; RNA 干扰; 裸表皮蛋白; 功能; 免疫应答

Bioinformatic analysis and functional study of *nkd* gene in larvae of *Apis mellifera ligustica* workers

GUO Yilong^{1,2#}, YU Kejun^{1,2#}, ZHAO Xiao¹, QIAN Jiajun¹, ZHAO Haodong¹, ZHANG Jie¹, ZHANG Yang¹, ZHAO Hongxia³, XU Xijian⁴, LUO Qun⁴, CHEN Dafu^{1,2*}, GUO Rui^{1,2*}

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

2 Apitherapy Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, Guangdong, China

4 Apicultural Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330000, Jiangxi, China

Abstract: [Objective] *Apis mellifera ligustica* is one of the subspecies of *Apis mellifera*. *Ascosphaera apis* exclusively infects bee larvae and leads to chalkbrood. In this study, we predicted the conserved motifs and analyzed the phylogenetic relationship of naked cuticle (Nkd) protein in *A. mellifera*. Further, we employed RNA interference (RNAi) to study the effect of *nkd* gene on the larval body weight of *A. m. ligustica* and the immune response to *A. apis* stress, aiming to enrich the information of *A. mellifera nkd* gene and reveal the role of *nkd* in *A. m. ligustica* larvae. [Methods] The conserved motifs of Nkd proteins from *A. mellifera* and nine other species were predicted by MEME. MEGA X was used for the phylogenetic analysis of these Nkd proteins. RNAi of the *nkd* in the guts of the worker larvae of *A. m. ligustica* was carried out by feeding dsRNA-*nkd*. The larvae were weighed via an electronic balance. RT-qPCR was employed to determine the relative expression of *nkd* and immune response genes. [Results] The *nkd* proteins from *A. mellifera*, *Apis cerana*, *Papilio xuthus*, *Bombyx mori*, and *Papilio machaon* contained three conserved motifs (motif 1, motif 2, and motif 3), which indicated that the Nkd proteins from the above-mentioned five insect species were highly conserved.

The Nkd proteins in *A. mellifera* and *A. cerana* shared the same clade, showing the closest genetic relationship. Compared with the dsRNA-*egfp* group, the dsRNA-*nkd* group showed down-regulated expression of *nkd* in the guts of 5- and 6-day-old larvae ($P < 0.001$), with the interference efficiencies of 49.60% and 56.40%, respectively. Additionally, the body weights of all the larvae in the dsRNA-*nkd* group were significantly lower than those in the dsRNA-*egfp* group. The expression of *abaecin*, *apidaecin*, *birc5*, *defensin-1*, and *PGRP-S2* was activated in the guts of 4-day-old larvae. In the guts of 5-day-old larvae, the expression of *abaecin*, *apidaecin*, *birc5*, and *defensin-1* was activated, while that of *PGRP-S2* was inhibited. In the guts of 6-day-old larvae, the expression of *abaecin* was activated, while that of *apidaecin*, *birc5*, *defensin-1*, and *PGRP-S2* was suppressed. The results suggested that the expression of above-mentioned five genes varied in response to stress and were involved in the host immune response. Moreover, there was a negative regulatory relationship between the expression of *nkd* and that of *abaecin* and *apidaecin*. **[Conclusion]** *A. mellifera* Nkd protein contains three conserved motifs (motif 1, motif 2, and motif 3). The Nkd proteins from *A. mellifera* and *A. cerana* shared the closest genetic relationship. The interference on *nkd* in the larval guts of *A. m. ligustica* workers could be achieved via feeding dsRNA, and *nkd* affected *A. m. ligustica* workers in terms of larval body weight and immune response to *A. apis* stress.

Keywords: *Apis mellifera*; *Apis mellifera ligustica*; *Ascospaera apis*; RNA interference; naked cuticle protein; function; immune response

意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)是西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的一个优良亚种, 不仅为自然界众多野生植物和农作物授粉, 而且在养蜂生产中广泛使用, 具有重要的生态、经济和研究价值^[1]。蜜蜂白垩病是一种由蜜蜂球囊菌(*Ascospaera apis*)感染幼虫引起的致死性真菌病, 虽然不至于导致蜂群崩溃, 但会严重削弱蜂群群势和生产力, 给养蜂业造成较大损失^[2]。对于该病迄今仍缺乏有效的治疗手段。

较多的研究表明 *nkd* 基因可通过调控相关信号通路调节果蝇和小鼠的发育和免疫过程。Zeng 等^[3]研究发现, *nkd* 不仅是 wingless 信号通路的负调控因子, 也是该信号通路的靶点。Rousset 等^[4]将 *nkd* 的 dsRNA 注射进果蝇胚胎内, 发现与对照组相比, 处理组胚胎更短且小齿带数量明显减少。另外, 作为 Wnt 信号通路的保守调节因子, *nkd* 在细胞质和细胞核中均有分布且发挥重要作用^[3,5]。近期, Wang 等^[6]的研

究发现, 在果蝇幼虫期翅型的形成过程中 *nkd* 具有关键功能, 过表达和敲减 *nkd* 基因均能够导致成虫翅型异常。小鼠 *mNkd2* 是果蝇 *nkd* 的同源基因^[7]。Wharton 等^[8]的研究结果表明, 在小鼠发育过程中 *nkd1* 和 *nkd2* 在多个组织中以部分重叠的梯度样模式表达, 与 Wnt 活性的已知模式具有相关性。Zhao 等^[9]曾对小鼠骨肉瘤进行芯片分析, 结果显示裸表皮蛋白同源物 2 基因 *NKD2* 在局限性肿瘤和转移性肿瘤中的表达量均显著下调($P < 0.05$), 过表达 *NKD2* 不仅能显著抑制体外培养骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 而且能显著抑制小鼠体内骨肉瘤的生长和转移, 敲减 *NKD2* 可增强骨肉瘤的迁移和侵袭能力。

与小鼠和果蝇等模式生物相比, 蜜蜂的 *nkd* 基因研究较为滞后, 迄今仅有 1 例研究报道, Li 等^[10]的研究发现, 西方蜜蜂工蜂感染东方蜜蜂微孢子虫后, 体内 *nkd* 的表达量上调, 饲喂

nkd 的特异性的 dsRNA 后, 有效地沉默了 *nkd* 表达, 4 个免疫基因(*abaecin*、*apidaecin*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2*)被激活表达, 宿主中肠内病原孢子载量下降宿主寿命延长。目前, 意蜂的 *nkd* 信息较为匮乏, 相关功能研究滞后。本研究利用生物信息学方法预测和分析意蜂 *nkd* 基因的保守基序和系统进化分析, 进而通过饲喂 dsRNA 对意蜂工蜂幼虫肠道内 *nkd* 基因进行 RNAi, 探究干扰 *nkd* 对幼虫体重及幼虫响应蜜蜂球囊菌胁迫的免疫基因应答的影响, 以期揭示 *nkd* 在调节幼虫体重和免疫应答中的功能。

1 材料与方法

1.1 供试生物材料

意蜂工蜂幼虫取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)教学蜂场的饲养蜂群。蜜蜂球囊菌由福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护实验室分离和保存^[11-12]。

1.2 Nkd 蛋白的保守基序预测及系统进化分析

鉴于 NCBI 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)收录了西方蜜蜂的蛋白序列, 而没有收录意大利蜜蜂的蛋白信息, 且意蜂是西方蜜蜂的亚种之一, 本研究在 NCBI 数据库下载西方蜜蜂(XP_001120899.3)、东方蜜蜂(*Apis cerana*, XP_016911964.1)、斑翅果蝇(*Drosophila suzukii*, XP_036672123.1)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, NP_001262029.1)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*, XP_021701833.1)、家蚕(*Bombyx mori*, XP_004930158.1)、柑橘凤蝶(*Papilio xuthus*, XP_013177440.1)、金凤蝶(*Papilio machaon*, XP_014368363.2)、锡金小家鼠(*Mus pahari*, XP_021075829.1)和小白鼠(*Mus musculus*, AAK57483.1)的 Nkd 蛋白氨基酸序列。

利用 MEME 软件^[13]预测西方蜜蜂和其他

9 个物种的 Nkd 蛋白的保守基序(motif), 参数为: motif 数目设为 3 个, 保守位点宽度为 6–50 aa, 保守基序的可视化通过 MEME 软件实现。以锡金小家鼠和小白鼠作为外群, 通过 MEGA X 软件采用邻接法(neighbor-joining)构建上述 10 个物种的 Nkd 蛋白系统进化树^[14], 采用软件默认参数。

1.3 dsRNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒(Promega)提取意蜂工蜂 6 日龄幼虫肠道总 RNA, 并通过 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)检测 RNA 的浓度和纯度。利用反转录试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]合成 cDNA 第 1 链, 作为模板进行 PCR 扩增。反应在 T100 PCR 仪(BioRad)上进行。反应体系(50 μ L)包括: 17 μ L ddH₂O, 25 μ L 2 \times Phanta Max Buffer, 1 μ L dNTPs Mix, 2 μ L 上游引物(10 μ mol/L), 2 μ L 下游引物(10 μ mol/L), 1 μ L Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 2 μ L 模板 DNA。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 25–30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10–15 min。取上述 PCR 产物和普通 Mix [翌圣生物科技(上海)股份有限公司]按照 1:1 混匀后, 放入 70 $^{\circ}$ C 金属浴加热 15 min。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 然后使用 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)回收目的片段, 后连接 pESI-T 载体, 获得携带 *nkd* 基因片段的重组质粒 pESI-T-*nkd*。

根据基因 *egfp* 的序列设计特异性扩增引物, 以 pET28a-*egfp* 质粒(武汉森灵生物科技有限公司)为模板进行 PCR, 将目的片段克隆进 pESI-T 质粒, 得到含 *egfp* 基因片段的重组质粒 pESI-T-*egfp*。

分别以 pESI-T-*nkd* 和 pESI-T-*egfp* 质粒(浓

度为 10 ng/ μ L)为模板, 以含 T7 启动子序列 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')的特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增, 然后使用 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)试剂盒回收目的片段, 作为体外转录 dsRNA 的模板。参照 T7 RNAi Transcription Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)的说明书进行 dsRNA 的体外合成。利用 NanoDrop 2000 检测 dsRNA 的浓度和纯度, 并通过 1.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 的完整性, 检测合格的 dsRNA 分装后保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.4 dsRNA 饲喂幼虫及 *nkd* 干扰效率检测

参照王倩等^[15]的配方配制幼虫饲料。从群势较强的意蜂蜂群中提脾至实验室, 用移虫针将巢房内的 2 日龄幼虫($n=48$)移至预置饲料的 48 孔细胞培养板中饲养, 放入恒温恒湿培养箱, 在(35 \pm 0.5) °C, 90%相对湿度(relative humidity, RH)条件下饲养。3 日龄时, 单头幼虫先饲喂

5 μ L dsRNA-*nkd* (或 dsRNA-*egfp*) (终浓度为 200 ng/ μ L)再饲喂 45 μ L 饲料。每 12 h 重复饲喂 1 次, 连续饲喂 6 次至 6 日龄。按照笔者实验室已建立的技术流程^[11-12], 分别剖取 4、5 和 6 日龄幼虫肠道, 每 3 只肠道置于 1 个 RNA-free 离心管, 经液氮速冻后转移到 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

利用 RNA 抽提试剂盒(Promega)提取上述肠道样品的总 RNA。RT-qPCR 反应在 QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(ABI)上进行。反应体系(20 μ L)包括: SYBR Green Dye (翊圣) 10 μ L, DEPC 水(翊圣) 7 μ L, 上下游引物(表 1) (2 μ mol/L)及 cDNA 模板各 1 μ L。反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 15 s, 40 个循环。以肌动蛋白基因 *actin* (GenBank ID: NM_001185145)作为内参^[16]。每个反应进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *nkd* 的相对表达量。采用 GraphPad Prism 8 软件分析数据并绘图, 数据进行 Student's *t* 检验。

表 1 本研究使用的引物信息

Table 1 Information about primers for used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>abaecin</i> -F	CAGCATTTCGCATACGTACCA	RT-qPCR
<i>abaecin</i> -R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC	
<i>apidaecin</i> -F	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	
<i>apidaecin</i> -R	GCAGGTCGAGTAGGCGGATCT	
<i>birc5</i> -F	CTTCTGACAATTCGTGCAATCC	
<i>birc5</i> -R	GGGTTCTTTCTTACCACCCACTAC	
<i>defensin-1</i> -F	TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	
<i>defensin-1</i> -R	TGACCTCCAGCTTACCCAAA	
<i>PGRP-S2</i> -F	TTGCACAAAATCCTCCGCC	
<i>PGRP-S2</i> -R	CACCCCAACCCTTCTCATCT	
<i>nkd</i> -F	TGTACAATGTAAAAGTCGTGCAAGAGC	
<i>nkd</i> -R	AGCTAGTTGCCATACGTACTCCTTTG	
<i>actin</i> -F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	
<i>actin</i> -R	GACCCACCAATCCATACGGGA	
<i>nkd</i> -F	TAATACGACTCACTATAGGGCGCGCTTATGTTCAACCTCAAGT	RNAi
<i>nkd</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCGCGTGTTCAAATGATGC	
<i>egfp</i> -F	TAATACGACTCACTATAGGGGCAGCAGACTTCTTCAA	
<i>egfp</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGGACCAGGAAACGTTGGAAC	

1.5 幼虫体重统计

参照 Borsuk 等^[17]的方法, 在 4、5 和 6 日龄时从 dsRNA-*nkd* 组和 dsRNA-*egfp* 组分别随机选取幼虫, PBS 缓冲液漂洗幼虫 3 次以洗净体表残留饲料, 然后用干净滤纸小心吸尽幼虫体表液体。利用 FA2004 精密电子秤(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)称量上述幼虫体重, 每个日龄称量 5 头幼虫体重。上述实验进行 3 次生物学重复。

1.6 宿主响应蜜蜂球囊菌胁迫的免疫基因相对表达量检测

参照笔者实验室已建立的技术流程^[18]制备蜜蜂球囊菌纯净孢子。按照方法 1.5 将 2 日龄幼虫($n=30$)移至预置人工饲料的 48 孔细胞培养板, 并进行人工饲养。3 日龄时, 在上午 10 时对单头幼虫饲喂接种 5 μL 蜜蜂球囊菌孢子(终浓度为 4×10^5 个/mL), 13 时对单头幼虫先饲喂 5 μL dsRNA-*nkd* (或 dsRNA-*egfp*) (终浓度为 200 ng/ μL) 再饲喂 45 μL 饲料。此后每 12 h 按上述方法饲喂 1 次, 连续饲喂 6 次至 6 日龄。

参照笔者实验室已建立的技术流程^[12-13]分别剖取 4、5 和 6 日龄幼虫肠道, 每 3 只肠道置于 1 个 RNA-free 离心管, 经液氮速冻后转移到 -80°C 超低温冰箱保存备用。以 dsRNA-*egfp* 组为参照, 采用 SYBR Green 法检测饲喂 dsRNA-*nkd* 组意蜂工蜂幼虫肠道内 5 个免疫基因的相对表达量, 包括抗菌肽基因 *abaecin* 和 *apidaecin*, 防御素基因 *defensin-1* 及细胞凋亡基因 *birc5* 和肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRP)基因 *PGRP-S2*^[10,19]。采用 GraphPad Prism 8 软件分析数据并绘图, 数据进行 Student's *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 Nkd 蛋白的保守基序及系统进化分析

MEME 软件预测结果显示, 基序长度介于 29–41 个氨基酸, 基序数目介于 1–3 个(图 1);

西方蜜蜂、东方蜜蜂、柑橘凤蝶、家蚕和金凤蝶的 Nkd 蛋白均含有 3 个保守基序, 埃及伊蚊、斑翅果蝇和黑腹果蝇的 Nkd 蛋白均含有 2 个保守基序(motif 2 和 motif 3), 小家鼠和锡金小家鼠的 Nkd 蛋白均仅含有 1 个保守基序(motif 1) (图 1)。上述结果表明西方蜜蜂和其他昆虫的 Nkd 蛋白保守基序具有一定的保守性, 但不同物种所包含的保守基序数目及种类存在差异。

系统进化分析结果显示, 西方蜜蜂与东方蜜蜂的 Nkd 蛋白聚为一个分支, 而斑翅果蝇、黑腹果蝇、埃及伊蚊、家蚕、柑橘凤蝶和金凤蝶的 Nkd 蛋白聚为另一个分支(图 2)。

2.2 dsRNA 的合成与检测

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 通过 PCR 扩增出长度约 235 bp 的片段(图 3 A), 符合预期大小。测定结果显示 dsRNA-*nkd* 的浓度为 1 838.81 ng/ μL , A_{260}/A_{280} 为 2.11; dsRNA-*egfp* 的浓度为 1 799.13 ng/ μL , A_{260}/A_{280} 为 2.10。电泳结果显示 dsRNA-*nkd* 和 dsRNA-*egfp* 条带单一、清晰且大小符合预期(约 275 bp 和 470 bp)。以上结果说明体外转录得到的 dsRNA 浓度较高、质量良好, 可满足进一步 RNAi 的需要(图 3B)。

2.3 *nkd* 的干扰效率检测

RT-qPCR 结果显示, 相较于 dsRNA-*egfp* 组, dsRNA-*nkd* 组意蜂工蜂 4 日龄幼虫肠道内 *nkd* 的表达量极显著上调($P < 0.01$) (图 4); 5 日龄幼虫肠道内 *nkd* 的表达量极显著下调($P < 0.001$), 干扰效率为 49.60% (图 4); 6 日龄幼虫肠道内 *nkd* 的表达量极显著下调($P < 0.001$), 干扰效率达到 56.40% (图 4)。

2.4 干扰 *nkd* 对意蜂工蜂幼虫体重的影响

与 dsRNA-*egfp* 组相比, dsRNA-*nkd* 组 4 日龄幼虫体重显著下降($P < 0.05$), 5 日龄幼虫体重极显著下降($P < 0.01$), 6 日龄幼虫体重显著下降($P < 0.05$) (图 5), 说明干扰 *nkd* 对意蜂工蜂幼虫体重造成显著影响。

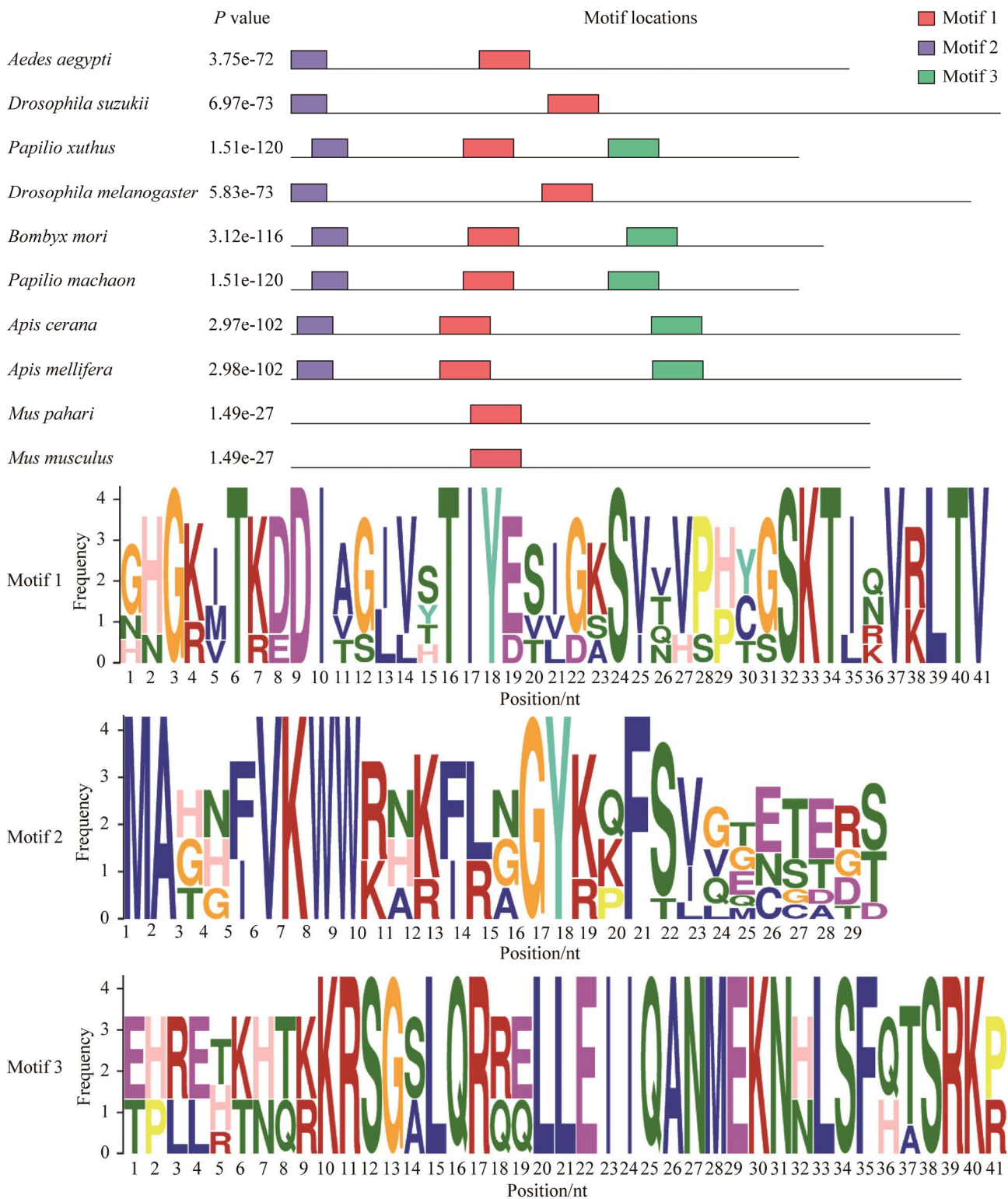


图 1 西方蜜蜂与其他 9 个物种的 Nkd 蛋白的保守基序比较
 Figure 1 Comparison of conserved motifs in Nkd proteins in *A. mellifera* and other nine species.

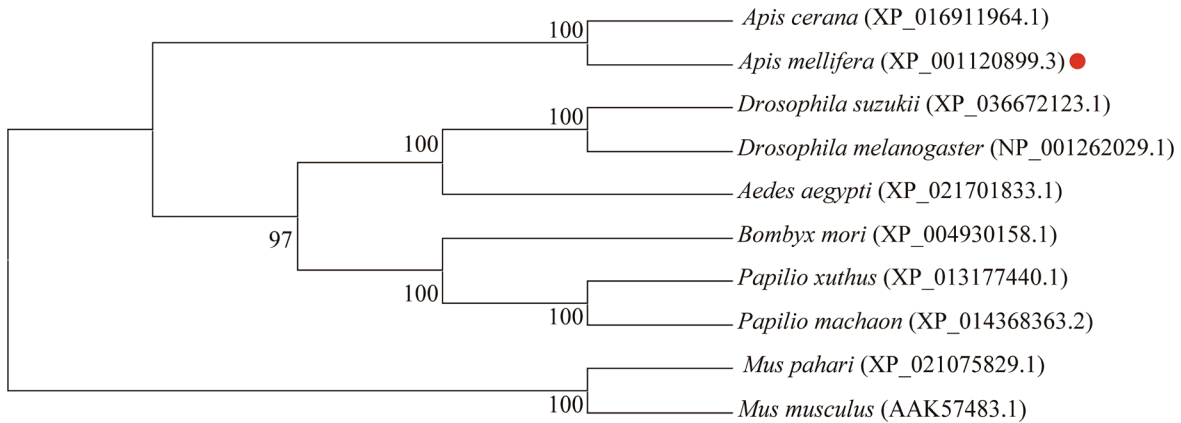


图2 西方蜜蜂与其他9个物种Nkd蛋白的系统进化树(1 000次重复)

Figure 2 Phylogenetic tree of *Nkd* proteins from *A. mellifera* and other nine species (1 000 replicates). The internal node is the support value, which represents the reliability of the branch; the value is between 0%–100%; the higher the value, the higher the reliability. GenBank accession number of *Nkd* protein was marked in brackets.

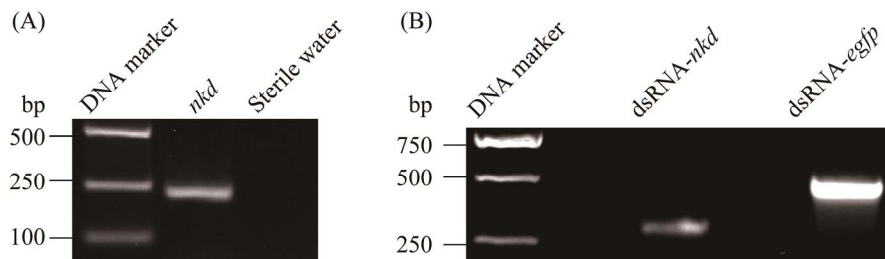


图3 dsRNA-*nkd* 和 dsRNA-*egfp* 的琼脂糖电泳检测

Figure 3 Agarose gel electrophoresis for dsRNA-*nkd* and dsRNA-*egfp*. A: electrophoresis for amplified product from *nkd*; B: electrophoresis for dsRNA.

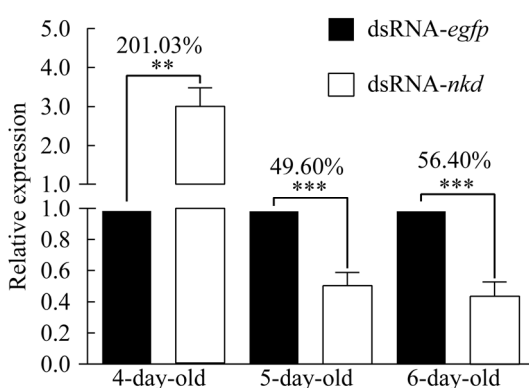


图4 饲喂 dsRNA 后意蜂工蜂幼虫肠道内 *nkd* 的相对表达量检测

Figure 4 Detection of relative expression of *nkd* in *A. m. ligustica* workers' larval guts after feeding dsRNA. The experimental data were expressed as mean±SD; data were subjected to Student's *t* test; ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. The same below.

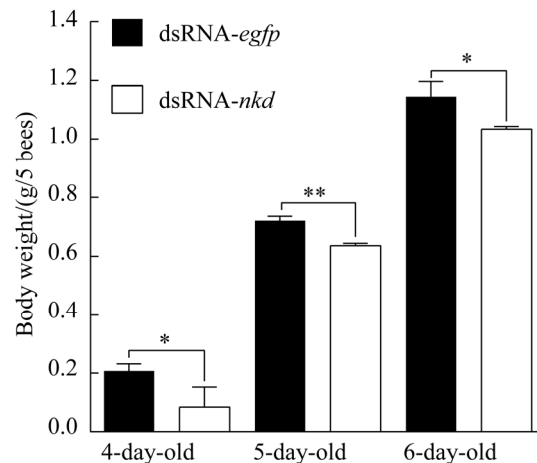


图5 干扰 *nkd* 基因后意蜂工蜂幼虫的体重统计
Figure 5 Statistics of body weight of *A. m. ligustica* workers' larvae after interference of *nkd*.

2.5 干扰 *nkd* 对宿主免疫基因应答的影响

RT-qPCR 结果显示, 相比于 dsRNA-*egfp* 组, dsRNA-*nkd* 组 4 日龄幼虫肠道内基因 *abaecin* 和 *apidaecin* 分别上调表达 6.98 和 1.46 倍 ($P>0.05$), *birc5*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达量分别显著上调 32.85、4.24 和 6.71 倍 ($P<0.05$) (图 6); 5 日龄幼虫肠道内 *abaecin*、*apidaecin* 和 *defensin-1* 的表达量分别极显著上调 2.22、2.68 和 4.05 倍 ($P<0.001$), *birc5* 的表达量上调 2.21 倍 ($P>0.05$), *PGRP-S2* 的表达量极显著下调 2.84 倍 ($P<0.01$) (图 6); 6 日龄幼虫肠道内 *abaecin* 的表达量极显著上调 2.58 倍 ($P<0.01$), *birc5*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达量分别极显著下调 6.25、21.28 和 23.81 倍 ($P<0.001$), *apidaecin* 的表达量极显著下调 1.22 倍 ($P<0.01$) (图 6)。以上结果表明, 干扰 *nkd* 影响意蜂工蜂幼虫对蜜蜂球囊菌胁迫的免疫基因应答, 4 日龄幼虫肠道内 *abaecin*、*apidaecin*、*birc5*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 均被激活表达; 5 日龄幼虫肠道内 *abaecin*、*apidaecin*、*birc5* 和 *defensin-1* 均被激

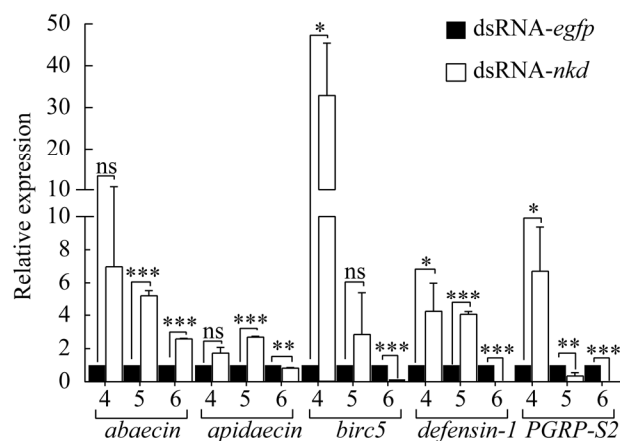


图 6 干扰 *nkd* 基因后意蜂工蜂幼虫肠道内 5 个免疫基因的相对表达量检测

Figure 6 Determination of relative expression of five immune genes in *A. m. ligustica* workers' larval guts after interference of *nkd*. gene 4, 5 and 6 on horizontal axis indicate 4-, 5-, and 6-day-old, respectively.

活表达, *PGRP-S2* 的表达受到抑制; 6 日龄幼虫肠道内 *abaecin* 被激活表达, 而 *apidaecin*、*birc5*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达均受到抑制。

3 讨论与结论

nkd 基因在果蝇和小鼠中已有较为深入的研究, 但对于包括蜜蜂在内的昆虫, *nkd* 相关研究仍十分滞后。蛋白质保守结构域也称为蛋白质的超二级结构, 是蛋白质结构中介于二级和三级结构之间的区域性功能单位, 依据氨基酸的保守基序, 能揭示目标蛋白的功能^[20]。本研究对前期基于 WGCNA 筛选出的 *nkd* 基因的氨基酸序列进行保守基序预测, 发现西方蜜蜂与东方蜜蜂、柑橘凤蝶、家蚕和金凤蝶的 Nkd 蛋白均含有 3 个保守基序(motif 1、motif 2 和 motif 3) (图 1), 说明 Nkd 蛋白在上述 5 个昆虫物种中较为保守, 可能发挥类似的功能。此外, 另外 3 个昆虫物种(埃及伊蚊、斑翅果蝇和黑腹果蝇)的 Nkd 蛋白均含有 2 个保守基序(motif 2 和 motif 3), 但小家鼠和锡金小家鼠的 Nkd 蛋白仅含有 1 个保守基序(motif 1), 说明昆虫的 Nkd 蛋白含有的保守基序数目多于哺乳动物, 推测 Nkd 蛋白在昆虫和哺乳动物中发挥不同的功能。本研究中, 系统进化分析结果显示, 西方蜜蜂和其他 7 个昆虫物种的 Nkd 蛋白聚为一个大支, 而锡金小家鼠和小白鼠单独聚为另一个大支, 进一步说明 Nkd 蛋白在不同昆虫物种中具有较高的保守性, 但昆虫和哺乳动物间 Nkd 的保守性较低。此外, 西方蜜蜂与东方蜜蜂的 Nkd 蛋白聚为一支, 进化距离最近, 说明二者的亲缘关系近, 符合客观实际。

通过饲喂或注射 dsRNA 对蜜蜂基因进行干扰已有多例报道^[19,21]。本研究之所以选择通过饲喂 dsRNA 的方法进行 RNAi, 是因为意蜂幼虫较为脆弱, 显微注射 dsRNA 会导致较高的

幼虫死亡率。与 dsRNA-*egfp* 组相比, dsRNA-*nkd* 组 5 日龄和 6 日龄幼虫肠道内 *nkd* 的表达量极显著下调, 干扰效率分别达到 49.60% 和 56.40%, 表明通过饲喂 dsRNA 可对意蜂工蜂幼虫肠道内 *nkd* 基因实现有效干扰, 这与 Li 等^[10]的研究结果一致。但值得注意的是, 相较于 dsRNA-*egfp* 组, dsRNA-*nkd* 组 4 日龄幼虫肠道内 *nkd* 基因的表达量显著上调, 说明饲喂 dsRNA-*nkd* 在 24 h 内未能有效干扰肠道内 *nkd* 基因, 这与前人在西方蜜蜂^[21-22]、小菜蛾(*Plutella xylostella*)^[14] 和黑腹果蝇^[23]等昆虫上的研究结果相似。以上结果表明, 通过 dsRNA 对昆虫的基因表达进行有效干扰需要一定时间, 在目标器官或组织中累积到一定的量, 不同的组织所需时间不尽相同。

研究表明 *nkd* 基因参与调节果蝇的生长发育^[3-4]。本研究发现相比于 dsRNA-*egfp* 组, dsRNA-*nkd* 组意蜂 4、5 和 6 日龄幼虫体重均显著降低(图 5), 说明干扰 *nkd* 基因可影响幼虫体重。Wnt 信号通路在调节哺乳动物和昆虫的发育和免疫等方面起到关键作用^[7,24]。Wnt 信号通路参与黑腹果蝇胚胎期足、翅、生殖器、触角和眼等的发育调控^[25]。*nkd* 基因作为 Wnt 信号通路的调控因子, 已被证实能通过 Wnt 信号通路影响小鼠和果蝇的生长和发育^[7,24]。因此, 推测 *nkd* 基因通过调控 Wnt 信号通路影响意蜂工蜂幼虫体重。但相关机制仍需要进一步深入研究。

昆虫宿主可通过合成与分泌抗菌肽抵御病原体入侵。蜜蜂主要合成 4 种抗菌肽, 其中基因 *abaecin* 是一种广谱抗菌脯氨酸富集阳离子肽^[26]; 基因 *apidaecin* 是从蜜蜂淋巴液中分离得到的热稳定、非螺旋抗菌肽, 对革兰氏阴性菌有广泛的抗菌性^[27]; 基因 *defensin-1* 的分子量为 5.52 kDa, 由 51 个氨基酸组成的防御素类抗菌肽对革兰

氏阳性菌和部分革兰氏阴性细菌能发挥抗菌作用^[28]。昆虫缺乏获得性免疫, 只能依靠先天免疫来对抗微生物感染维持机体内环境的平衡, 昆虫的先天免疫主要取决于宿主的模式识别受体与病原体相关分子模式间的互动, PGRP 家族是昆虫最重要的模式识别受体, 能识别病原微生物细胞壁的主要成分肽聚糖, 还能参与吞噬过程、激活酚氧化酶原级联以及调节外噬过程^[29-30]。本研究中, 接种蜜蜂球囊菌后, 与 dsRNA-*egfp* 组相比, dsRNA-*nkd* 组 4 日龄幼虫肠道内基因 *abaecin* 和 *apidaecin* 的表达量分别上调 6.98 和 1.46 倍, 基因 *defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达量分别显著上调 4.24 和 6.71 倍; 5 日龄幼虫肠道内 *abaecin*、*apidaecin* 和 *defensin-1* 表达量分别极显著上调 2.22、2.68 和 4.05 倍, *PGRP-S2* 的表达量极显著下调 2.84 倍; 6 日龄幼虫肠道内 *abaecin* 的表达量极显著上调 2.58 倍, *defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达量分别极显著下调 21.28 和 23.81 倍, *apidaecin* 的表达量极显著下调 1.22 倍(图 6)。上述结果表明基因 *abaecin*、*apidaecin*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 参与意蜂幼虫对蜜蜂球囊菌胁迫的免疫应答, 但在宿主响应胁迫的过程中表现出不同的表达趋势; *nkd* 与 *abaecin* 和 *apidaecin* 的表达存在负向调控关系。Li 等^[10]通过对东方蜜蜂微孢子虫感染的西方蜜蜂工蜂饲喂 dsRNA 对 *nkd* 进行干扰, 发现相较于 dsRNA-*GFP* 组, dsRNA-*nkd* 组工蜂腹部 *abaecin* 的表达量极显著上调, *apidaecin*、*defensin-1* 和 *PGRP-S2* 的表达量均显著上调。Rodríguez-García 等^[19]通过饲喂 dsRNA 对东方蜜蜂微孢子虫感染的西方蜜蜂工蜂肠道和脂肪体的基因 *AmTsf* 进行干扰, 发现饲喂 dsRNA 后 6 d, dsRNA-*AmTsf* 组工蜂体内 *abaecin* 上调表达, 而 *apidaecin* 的表达量无明显变化; 饲喂 dsRNA 后 12 d, dsRNA-*AmTsf* 组工蜂体内

abaecin 的表达量显著上调, *apidaecin* 表达量极显著上调。以上结果说明, 上述 4 个免疫基因参与意蜂对 2 种不同真菌病原(蜜蜂球囊菌和东方蜜蜂微孢子虫)胁迫的应答。

细胞凋亡是一个主动的、受特定基因调控的细胞死亡过程, 在消除衰老、损伤和癌变细胞等方面的作用至关重要^[31-32]。作为昆虫天然免疫的重要组成部分, 细胞凋亡可参与昆虫宿主对病原微生物入侵的免疫防御^[19]。铁是宿主和病原体生长和存活的必需营养素, 转铁蛋白作为一种铁结合和铁转运的蛋白, 是铁稳态的关键参与者之一。Rodríguez-García 等^[19]的研究发现, 东方蜜蜂接种微孢子虫后, 相较于 dsRNA-*GFP* 饲喂组, dsRNA-*AmTsf* 饲喂组西方蜜蜂工蜂体内细胞凋亡基因 *birc5* 的表达量极显著下调。本研究发现接种蜜蜂球囊菌后, 与 dsRNA-*egfp* 组相比, *birc5* 在 dsRNA-*nkd* 组 4 日龄幼虫肠道内显著上调表达 32.85 倍, 在 5 日龄幼虫肠道内上调表达 2.21 倍, 在 6 日龄幼虫肠道内极显著下调表达 6.25 倍。这表明意蜂工蜂幼虫可通过 *nkd* 影响 *birc5* 表达以调节宿主细胞凋亡进程, 进而应对蜜蜂球囊菌感染。

综上所述, 西方蜜蜂的 Nkd 蛋白含有 3 个保守基序(motif 1、motif 2 和 motif 3), 西方蜜蜂与东方蜜蜂的 Nkd 蛋白亲缘关系最近, 通过饲喂 dsRNA 能有效干扰意蜂工蜂幼虫肠道内 *nkd* 基因表达, *nkd* 基因影响意蜂工蜂幼虫体重及宿主对蜜蜂球囊菌胁迫的免疫应答。

参考文献

- [1] Morfin N, Anguiano-Baez R, Guzman-Novoa E. Honey bee (*Apis mellifera*) immunity. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2021, 37(3): 521–533.
- [2] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [3] Zeng W, Wharton KA, Mack JA, Wang K, Gadbar M, Suyama K, Klein PS, Scott MP. Naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature*, 2000, 403(6771): 789–795.
- [4] Rousset R, Mack JA, Wharton KA, Axelrod JD Jr, Cadigan KM, Fish MP, Nusse R, Scott MP. Naked cuticle targets disheveled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Development*, 2001, 15(6): 658–671.
- [5] Chan CC, Zhang S, Rousset R, Wharton KA. *Drosophila* naked cuticle (Nkd) engages the nuclear import adaptor importin-alpha3 to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Developmental Biology*, 2008, 318(1): 17–28.
- [6] Wang R, Xie H, Yang L, Wang P, Chen MM, Wu HY, Liao YL, Wang MY, Wang Q, Gong XX, Cheng Q, Cheng L, Xie FY, Bi CL, Fang M. Naked cuticle inhibits wingless signaling in *Drosophila* wing development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 576: 1–6.
- [7] Lei H, Juan AH, Kim MS, Ruddle FH. Mouse naked cuticle 2 (mNkd2) as a direct transcriptional target of Hoxc8 in vivo. *Journal of Experimental Zoology Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 2007, 307(1): 1–6.
- [8] Wharton KA, Zimmermann G, Rousset R, Scott MP. Vertebrate proteins related to *Drosophila* naked cuticle bind dishevelled and antagonize Wnt signaling. *Developmental Biology*, 2001, 234(1): 93–106.
- [9] Zhao S, Kurenbekova L, Gao Y, Roos A, Creighton CJ, Rao P, Hicks J, Man TK, Lau C, Brown AM, Jones SN, Lazar AJ, Ingram D, Lev D, Donehower LA, Yustein JT. NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Oncogene*, 2015, 34(39): 5069–5079.
- [10] Li W, Evans JD, Huang Q, Rodríguez-García C, Liu J, Hamilton M, Grozinger CM, Webster TC, Su S, Chen YP. Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(22): 6779–6787.
- [11] 陈华枝, 蒋海宾, 祝智威, 范元婵, 许雅静, 孙明会, 刘佳美, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 陈大福,

- 郭睿. 蜜蜂球囊菌菌丝和孢子中环状 RNA 的鉴定及比较分析. *微生物学报*, 2021, 61(5): 1299–1314.
- Chen HZ, Jiang HB, Zhu ZW, Fan YC, Xu YJ, Sun MH, Liu JM, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu GJ, Chen DF, Guo R. Identification and comparison of circular RNAs in *Ascosphaera apis* mycelium and spore. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(5): 1299–1314. (in Chinese)
- [12] 孙明会, 刘佳美, 王思懿, 朱乐冉, 王紫馨, 叶亚萍, 钱加珺, 顾小雨, 徐细建, 陈大福, 郭睿, 徐国钧. 结合三代测序与二代测序技术揭示蜜蜂球囊菌孢子转录组的复杂性. *微生物学报*, 2022, 03(22): 1–16.
- Sun MH, Liu JM, Wang SY, Zhu LR, Wang ZX, Ye YP, Qian JJ, Gu XY, Xu XJ, Chen DF, Guo R, Xu GJ. Unraveling the complexity of transcriptome in *Ascosphaera apis* spore: based on third-generation and next-generation sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 03(22): 1–16. (in Chinese)
- [13] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: W202–W208.
- [14] Xu H, Hao Z, Wang L, Li S, Guo Y, Dang X. Suppression of transferrin expression enhances the susceptibility of *Plutella xylostella* to *Isaria cicadae*. *Insects*, 2020, 11(5): 281.
- [15] 王倩, 孙亮先, 肖培新, 刘锋, 康明江, 胥保华. 室内人工培育中华蜜蜂幼虫技术研究. *山东农业科学*, 2009(11): 113–116.
- Wang Q, Sun LX, Xiao PX, Liu F, Kang MJ, Xu BH. Study on technology for indoor artificial feeding of *Apis cerana cerana* larvae. *Shandong Agricultural Sciences*, 2009(11): 113–116. (in Chinese)
- [16] Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS*, 2005, 102(21): 7470–7475.
- [17] Borsuk G, Ptaszyńska AA, Olszewski K, Domaciuk M, Krutmuang P, Paleolog J. A new method for quick and easy hemolymph collection from *Apidae* adults. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170487.
- [18] 陈华枝, 付中民, 王杰, 祝智威, 范小雪, 蒋海宾, 范元婵, 周丁丁, 李汶东, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 中华蜜蜂 6 日龄幼虫响应蜜蜂球囊菌胁迫的环状 RNA 应答. *微生物学报*, 2020, 60(10): 2292–2310.
- Chen HZ, Fu ZM, Wang J, Zhu ZW, Fan XX, Jiang HB, Fan YC, Zhou DD, Li WD, Xiong CL, Zheng YZ, Xu GJ, Chen DF, Guo R. Circular RNA response of *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae to *Ascosphaera apis* stress. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(10): 2292–2310. (in Chinese)
- [19] Rodríguez-García C, Heerman MC, Cook SC, Evans JD, Chen YP. Transferrin-mediated iron sequestration suggests a novel therapeutic strategy for controlling *Nosema* disease in the honey bee, *Apis mellifera*. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(2): e1009270.
- [20] 汤贤春, 钱倩, 罗才林, 王蕾, 钱刚. 千里光脂肪醛脱羧基酶(CER1 蛋白)的保守基序(CSM)与功能结构域分析. *生命科学研究*, 2016, 20(5): 395–400.
- Tang XC, Qian Q, Luo CL, Wang L, Qian G. Analysis of conserved sequence motif (CSM) and functional/structural domains of fatty-aldehyde decarboxylase (CER1 protein) in *Senecio scandens* buch.-ham.ex D.Don. *Life Science Research*, 2016, 20(5): 395–400. (in Chinese)
- [21] Guo XJ, Wang Y, Sinakevitch I, Lei H, Smith BH. Comparison of RNAi knockdown effect of tyramine receptor 1 induced by dsRNA and siRNA in brains of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 111: 47–52.
- [22] Jarosch A, Moritz RF. Systemic RNA-interference in the honeybee *Apis mellifera*: tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(7): 851–857.
- [23] Xiao G, Liu ZH, Zhao M, Wang HL, Zhou B. Transferrin 1 functions in iron trafficking and genetically interacts with ferritin in *Drosophila melanogaster*. *Cell Reports*, 2019, 26(3): 748–758.
- [24] Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, Nusse R. WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in *Drosophila* development and immunity. *Nature*, 2005, 437(7059): 746–749.

- [25] Jenny FH, Basler K. Powerful *Drosophila* screens that paved the wingless pathway. *Fly*, 2014, 8(4): 218–225.
- [26] Luiz DP, Almeida JF, Goulart LR, Nicolau-Junior N, Ueira-Vieira C. Heterologous expression of abaecin peptide from *Apis mellifera* in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 76.
- [27] Zhou XX, Wang YB, Pan YJ, Li WF. Nisin-controlled extracellular production of apidaecin in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(6): 947–953.
- [28] Bucekova M, Sojka M, Valachova I, Martinotti S, Ranzato E, Szep Z, Majtan V, Klaudiny J, Majtan J. Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 7340.
- [29] Wang Q, Ren M, Liu X, Xia H, Chen K. Peptidoglycan recognition proteins in insect immunity. *Molecular Immunology*, 2019, 106: 69–76.
- [30] Kordaczuk J, Sulek M, Wojda I. General overview on the role of peptidoglycan recognition proteins in insect immunity. *Acta Biochimica Polonica*, 2020, 67(3): 319–326.
- [31] Zhu Y, Hu M, Ngowo J, Gao X, Chen X, Yan H, Yu W. Deacetylation of *BmAda3* is required for cell apoptosis caused by *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2021, 108(2): e21838.
- [32] Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian Journal of Biology*, 2021, 81(4): 1133–1143.