



## 侵染中华蜜蜂 6 日龄幼虫的蜜蜂球囊菌的微小 RNA 差异表达谱及调控网络

熊翠玲<sup>#</sup>, 杜宇<sup>#</sup>, 冯睿蓉, 蒋海宾, 史小玉, 王海朋, 范小雪, 王杰, 祝智威, 范元婵, 陈华枝, 周丁丁, 郑燕珍, 陈大福<sup>\*</sup>, 郭睿<sup>\*</sup>

福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

**摘要:** 【目的】蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌)是专性侵染蜜蜂幼虫的致死性真菌病原。MicroRNA(miRNA)作为一类重要的基因表达调控因子, 能够广泛参与真菌及其宿主的相互作用过程。本研究通过比较分析球囊菌孢子(AaCK)和侵染中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 6 日龄幼虫肠道内的球囊菌(AaT)的 small RNA (sRNA)组学数据对球囊菌的差异表达 miRNA (differentially expressed miRNA, DEmiRNA)、靶 mRNA 及二者间的调控网络进行全面解析, 旨在揭示 miRNA 介导的球囊菌对中蜂幼虫的侵染机制。【方法】对于球囊菌侵染的中蜂 6 日龄幼虫肠道的 small RNA-seq (sRNA-seq)数据, 利用 BLAST 工具连续比对东方蜜蜂(*Apis cerana*)和球囊菌的参考基因组筛选得到 AaT 的 sRNA 组学数据。分别将 AaCK 和 AaT 的 sRNA 组学数据比对 miRBase 数据库, 对球囊菌侵染宿主前后 miRNA 的数量和结构特征进行分析。联用 RNAhybrid+svm\_light、Miranda 和 TargetScan 软件预测 AaCK vs AaT 比较组中 DEmiRNA 的靶 mRNA, 进而利用相关生物信息学软件对上述靶 mRNA 进行 GO 分类和 KEGG 代谢通路富集分析。通过 Cytoscape 软件对 DEmiRNA-mRNA 调控网络进行可视化。利用 Stem-loop RT-PCR、RT-qPCR 和分子克隆验证测序结果的可靠性。【结果】在 AaCK 和 AaT 中分别鉴定到 380 和 387 个 miRNA。结构特征分析结果显示, AaCK 和 AaT 的 miRNA 皆集中分布在 18–25 nt, 且首位碱基主要偏向于 U。AaCK vs AaT 比较组共有 270 个 DEmiRNA, 包含 155 个上调 miRNA 和 115 个下调 miRNA, 分别靶向结合 6091 和 6145 个 mRNA。GO 分类结果显示, 上述靶 mRNA 主要涉及代谢进程、

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); 福建农林大学杰出青年科研人才计划(xjq201814); 福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2017342, CXZX2017343); 福建省大学生创新创业训练计划(201910389011, 201810389029, 201810389082)

<sup>#</sup>并列第一作者。

<sup>\*</sup>通信作者。Tel/Fax: +86-591-83726835; E-mail: 郭睿, ruiguo@fafu.edu.cn, 陈大福, dfchen826@fafu.edu.cn

收稿日期: 2019-09-10; 修回日期: 2019-11-06; 网络出版日期: 2020-01-20

细胞进程、应激反应等 15 个生物学进程; 细胞、细胞组分、细胞器等 12 个细胞组分; 催化活性、结合、转运子活性等 11 个分子功能。KEGG 代谢通路富集分析结果显示, 上述靶 mRNA 富集在 123 条代谢通路, 参与对氨基酸代谢、碳水化合物代谢以及核苷酸代谢等物质代谢, 氧化磷酸化、硫代谢、氮代谢等能量代谢, 以及 MAPK 和 Hippo 等信号通路的调控。球囊菌 DEmiRNA 与靶 mRNA 之间存在复杂的调控关系, 其中 miR-29-x、miR-250-x、miR-4968-y、miR-11200-x、novel-m0023-5p、novel-m0130-5p 和 novel-m0135-5p 等 DEmiRNA 可靶向结合与球囊菌的半胱氨酸蛋白酶、DNA 甲基化转移酶以及几丁质酶相关的 mRNA; 此外, miR-7-x、miR-9-z、miR-319-y 和 miR-5951-y 等同时参与调控 MAPK 信号通路; 进一步分析发现, miR-250-x 同时参与对 DNA 甲基化转移酶、MAPK 信号通路及其他酶类合成与代谢途径的调控, 并可能参与球囊菌与中蜂 6 日龄幼虫之间的跨界调控。通过 Stem-loop RT-PCR 和 RT-qPCR 验证了 4 个 DEmiRNA 的差异表达, 并利用分子克隆和 Sanger 测序证实 miR-7-x 的序列与测序结果一致。【结论】本研究解析了侵染中蜂 6 日龄幼虫的球囊菌的 miRNA 差异表达谱及 DEmiRNA 的调控网络, 揭示了球囊菌 DEmiRNA 可能通过调控病原的物质和能量代谢、增殖、毒力、信号通路及相关 mRNA 参与对中蜂幼虫的侵染过程。miR-7-x、miR-250-x、novel-m0023-5p 等关键 DEmiRNA 有望作为白垩病治疗的新型分子靶点。

**关键词:** 蜜蜂球囊菌, 中华蜜蜂, 幼虫, 微小 RNA, 调控网络, 侵染机制, 跨界调控

蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*, 简称球囊菌)是导致蜜蜂幼虫罹患白垩病的致死性真菌病原。不同于其他昆虫病原菌主要依赖分泌几丁质酶等胞外酶从外界突破宿主表皮和肠腔, 球囊菌与蜜蜂幼虫的长期协同进化过程中形成了高度适应蜜蜂幼虫肠道发育的特定侵染模式<sup>[1]</sup>。病原孢子通过内勤蜂的哺育行为经口饲喂进入幼虫中肠, 在 CO<sub>2</sub> 的刺激下低水平萌发, 并伴有菌丝的少量生长, 6 日龄末期随着中肠和后肠的隔膜消失, 孢子随食物残渣涌入后肠, 在 O<sub>2</sub> 的刺激下迅速萌发, 此时菌丝大量生长, 到了宿主免疫系统防御能力较低的预蛹期, 菌丝先后穿透幼虫肠壁和体壁, 导致幼虫死亡, 最终从幼虫的尾部蔓延包裹整个幼虫, 形成白垩病状虫尸<sup>[2]</sup>。在养蜂生产中, 一般认为该病仅危害西方蜜蜂(*Apis mellifera*)。直至 2015 年, Maxfield-Taylor 等<sup>[3]</sup>发现球囊菌能够侵

染成年熊蜂蜂王。随后, 笔者团队通过组织学和分子生物学手段证实球囊菌对中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)的雄蜂幼虫具有侵染性, 并通过交叉感染试验证实球囊菌对中蜂工蜂幼虫也具有侵染性<sup>[4]</sup>。前期研究中, 为探究球囊菌的侵染机制, 笔者团队开展了一系列的分子生物学和组学研究, 基于高质量的测序数据 *de novo* 组装并注释了球囊菌的参考转录组, 并大规模挖掘了球囊菌的 SSR 分子标记<sup>[5]</sup>; 在 mRNA 组学层面解析了球囊菌在胁迫意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)幼虫和中华蜜蜂幼虫过程中的差异基因表达谱和转录组动态, 初步揭示了病原差异表达基因(DEG)的功能<sup>[6-7]</sup>; 此外, 还在全基因组水平预测、分析和鉴定了球囊菌的微小 RNA (microRNA, miRNA)<sup>[8]</sup>。相关研究为深入解析球囊菌对蜜蜂幼虫的侵染机制打下了良好基础。

MiRNA 作为一类关键的基因表达调节因子,其种子序列在转录后水平能够特异性结合靶 mRNA 的 3' UTR, 导致靶 mRNA 降解或抑制其翻译过程, 从而调控生物体的各类生命活动<sup>[9]</sup>。2010 年, Lee 等<sup>[10]</sup>首次在粗糙脉胞菌(*Neurospora crassa*)中发现丝状真菌的 miRNA-like RNA (miRNA)。鉴于真菌 miRNA 与动植物成熟 miRNA 的特征及对靶 mRNA 的调控方式高度相似<sup>[11]</sup>, 以下统称真菌 miRNA。此后, 随着高通量测序技术的迅速发展与革新, 人们在尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)<sup>[12]</sup>、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)<sup>[13]</sup>、金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)<sup>[14]</sup>、东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)<sup>[15]</sup>等真菌中预测和鉴定出大量 miRNA。李琼等<sup>[16]</sup>研究发现 mro-miR-33 可通过负向调节 *brlA* 促进罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)的孢子形成。大量的研究表明, miRNA 广泛参与真菌及其宿主的相互作用过程<sup>[17]</sup>。Shakeel 等<sup>[18]</sup>研究发现小菜蛾(*Plutella xylostella*)接种 *M. anisopliae* 来源的僵菌素 A 后, miR-263、miR-279 和 miR-306 等差异表达 miRNA (differentially expressed miRNAs, DEmiRNA)参与调节 Toll、IMD、Jak-STAT 及细胞粘附分子等免疫相关信号通路。Evans 等<sup>[19]</sup>研究推测 *N. ceranae* 来源的 miRNA 可分泌到蜜蜂的细胞质内, 从而跨界调控宿主的新陈代谢与免疫过程。笔者团队曾利用二代测序技术和生物信息学方法在球囊菌菌丝和孢子的混合样品中预测和鉴定到 118 个 miRNA, 进而通过靶 mRNA 的功能分析及 miRNA 的调控网络分析揭示了球囊菌 miRNA 与致病性的潜在关联<sup>[8]</sup>。近期, 笔者利用 small RNA-seq (sRNA-seq) 技术对正常及球囊菌胁迫的中蜂 6 日龄幼虫肠道进行了深度测序, 获得了高质量的

sRNA 组学数据, 并通过生物信息学和分子生物学方法深入分析了幼虫肠道 DEmiRNA 及其调控网络, 研究结果表明球囊菌胁迫可导致宿主 miR-30-x、miR-6052-x 和 miR-1277-x 等 54 个 miRNA 差异表达, 上述 DEmiRNA 可能参与调控宿主泛素介导的蛋白水解、细胞凋亡和 Jak-STAT 信号通路等免疫途径<sup>[20]</sup>。然而, 对于病原 miRNA 在球囊菌-蜜蜂幼虫互作过程中的动态和功能, 仍缺乏深入研究和相关报道。

因此, 为进一步探究球囊菌对中蜂幼虫的侵染机制, 本研究基于已获得的高质量 sRNA 组学数据, 通过连续比对东方蜜蜂(*Apis cerana*)和球囊菌的参考基因组筛选得到处理组球囊菌(AaT)的数据, 结合已获得的对照组球囊菌孢子(AaCK)数据全面解析球囊菌侵染前后 miRNA 的数量和结构特征, DEmiRNA 的靶 mRNA 功能注释, 以及 DEmiRNA-mRNA 调控网络, 并利用分子生物学技术对 DEmiRNA 进行验证。研究结果可为阐明球囊菌对中蜂幼虫的侵染机制及二者的互作机制提供新的见解和数据基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试球囊菌及蜜蜂幼虫

球囊菌菌株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藏; 中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。

### 1.2 对照组和处理组球囊菌的 sRNA-seq 数据来源

球囊菌和中蜂幼虫肠道样品的制备参照笔者团队已建立的方法进行<sup>[20-21]</sup>。简述如下: 将球囊菌菌株接种到 PDA 培养基, 并置于  $33.0 \pm 0.5$  °C

条件下培养 10 d 后, 刮取黑色孢子囊, 每 100 mg 置于 1 个 RNA-free 的 EP 管内, 液氮速冻后置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏。其中一份球囊菌孢子样品用于 sRNA-seq, 作为对照组。其余球囊菌利用血球计数板计数, 并配置终浓度为  $1\times 10^7$  个孢子/mL 的幼虫饲料, 饲喂接种 3 日龄中蜂幼虫(50  $\mu\text{L}$ /只), 此后每 24 h 更换正常饲料。实验幼虫置于  $35.0\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 90%相对湿度(RH)条件下饲养至 6 日龄, 在超净工作台解剖肠道, 每 9 只肠道放于 1 个 RNA-Free 的 EP 管中, 液氮速冻后置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏。上述接种感染实验进行 3 次生物学重复, 制备的 3 份球囊菌感染幼虫肠道样品用于 sRNA-seq。上述球囊菌孢子和球囊菌侵染的中蜂 6 日龄幼虫肠道样品委托广州基迪奥生物科技有限公司进行单端测序, 测序平台为 Illumina MiSeq。

对于球囊菌感染中蜂幼虫肠道测序得到的混合数据, 首先将质控后的非注释标签序列映射到东方蜜蜂参考基因组(assembly ACSNU-2.0), 过滤映射上的序列标签(mapped tags) (即宿主数据), 并将 unmapped tags 比对到球囊菌参考基因组(assembly AAP 1.0), 由此得到的 mapped tags 即为病原本身的数据, 从而得到球囊菌相关 tags 在基因组上的位置信息, 获得球囊菌 sRNA 组学数据作为处理组数据(AaT-1、AaT-2、AaT-3)。球囊菌孢子测序得到的数据作为对照组数据(AaCK)。

根据笔者团队前期建立的数据质控方法对原始测序数据进行质控<sup>[22]</sup>。简述如下: 首先过滤掉下机数据中质量值低于 20 的碱基数超过 1 个或含有 N 的低质量 reads, 剔除不带有 3'接头的 reads, 并截取 3'接头前面的序列, 用作后续分析; 进一步过滤掉含有 5'接头的 reads、不含插入片段的 reads

以及插入片段小于 18 nt 的 reads、含有 poly A 的 reads, 最终得到小 RNA 的 clean tags。

### 1.3 球囊菌 miRNA 的生物信息学预测及分析

目前, miRBase 数据库内暂无球囊菌 miRNA 的相关信息, 笔者参照郭睿等<sup>[8]</sup>的方法, 利用 miRDeep2 软件将上述 tags 与 miRBase 数据库中其他物种已知 miRNA 的前体序列进行比对, 并过滤掉比对位置为该 miRNA 左右各延伸 2 bp 的位置以外的 tag, 将最终比对得到的 miRNA 定义为 known miRNA, 其后缀“-x”、“-y”分别代表从 miRNA 前体的 5'臂或 3'臂加工而来, “-z”代表来源位置不确定。进一步过滤掉 known miRNA 的 tag, 并将剩余 tag 序列比对到球囊菌基因组位置, 利用 MIREAP\_v0.2 软件预测 miRNA 的二级结构, 并将存在茎环结构、前体自由能大于  $-18\text{ kcal/mol}$ 、且长度介于 18–26 nt 的成熟 miRNA 定义为 novel miRNA。利用 TPM (tags per million) 算法对获得的所有 miRNA 的表达量进行归一化。

通过 GraphPad Prism 7 软件统计 sRNA 测序数据得到的包含 rRNA、tRNA、miRNA、snRNA、snoRNA 等大量的非编码 RNA (non-coding RNA) 片段数据, 并分析 AaCK 和 AaT 组 miRNA 的长度分布和首位碱基偏向性。

### 1.4 DE miRNA 及其靶 mRNA 的预测和功能注释

AaCK vs AaT 比较组的差异表达 miRNA (DE miRNA) 的筛选标准为  $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$  且  $P \leq 0.05$ 。选取  $-10 \leq \log_2(\text{Fold change}) \leq 10$  范围的 DE miRNA, 利用在线 heatmap 工具 (www.omicshare.com) 进行表达量聚类分析。

分别利用 RNAhybrid (v2.1.2)+svm\_light (v6.01)、Miranda (v3.3a)、TargetScan (Version: 7.0)

三种软件对球囊菌 DEmiRNA 的靶 mRNA 进行生物信息学预测,采用各软件的默认参数;将三者预测结果的交集作为可靠的靶 mRNA 集合。进一步筛选得到结合自由能小于-17 kcal/mol 的靶向结合关系用以后续分析<sup>[23-24]</sup>。利用 BLAST 工具将预测得到的靶 mRNA 序列比对到 GO 和 KEGG 数据库,从而获得靶 mRNA 的功能注释信息。

### 1.5 DEmiRNA-mRNA 调控网络的构建及分析

根据笔者团队的前期研究及上述靶 mRNA 的功能注释结果,筛选可能与球囊菌增殖、毒力和抗逆性等相关的靶 mRNA,根据 DEmiRNA 与靶 mRNA 的靶向结合关系,利用 Cytoscape 软件构建和呈现 DEmiRNA 与靶 mRNA 的调控网络。

### 1.6 DEmiRNA 的 Stem-loop RT-PCR、Sanger 测序及 RT-qPCR 验证

参照前期建立的验证体系<sup>[20]</sup>,随机挑选的 4 个 DEmiRNA (miR-7-x、miR-9-z、miR-319-y 和

miR-5951-y)进行分子验证。根据相应的核酸序列,利用 DNAMAN 软件设计特异性 Stem-loop 引物和上游引物,以及通用下游引物(表 1)。利用 RNA 抽提试剂盒(TaKaRa,日本)分别抽取 AaCK 和 AaT 的总 RNA,利用 Stem-loop 引物反转录得到 cDNA 模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。胶回收 100 bp 附近的片段,连接 pMD-19T 载体,转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌后挑斑摇菌,取菌液 PCR 呈阳性的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司单端测序。

利用 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统进行上述 4 个 DEmiRNA 的 RT-qPCR 检测。采用 SYBR Green 法,反应条件如下:95 °C 5 min;95 °C 10 s, 59 °C 30 s, 40 个循环;熔解曲线程序默认系统设置。以球囊菌 5.8S rRNA 基因作为内参 (GenBank: U68313.1),利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对上述 4 个 DEmiRNA 进行相对定量。利用 GraphPad Prism 7 软件处理 3 次生物学重复的数据并绘图,并利用 *t* 检验计算组间显著性。

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

Primer ID	Primer sequence (5'→3')
miR-7-x-Loop	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACAACAA
miR-9-z-Loop	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCATACAG
miR-319-y-Loop	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGGAGCTC
miR-5951-y-Loop	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCGTCGTC
miR-7-x-F	ACACTCCAGCTGGGTGGAAGACTAGTGATT
miR-9-z-F	ACACTCCAGCTGGGTCTTTGGTTATCTAG
miR-319-y-F	ACACTCCAGCTGGGTGGACTGAAGG
miR-5951-y-F	ACACTCCAGCTGGGTTTCGTCAGGAC
Universal R	CTCAACTGGTGTCGTGGA
5.8S rRNA-F	GCAGCGAAATGCGATAAGTAA
5.8S rRNA-R	CCCTCCTAAGACGGGACGAT

## 2 结果和分析

### 2.1 数据质控与评估

AaCK 的 sRNA-seq 产生 12708832 raw reads, AaT 测序得到的平均 raw reads 数为 10773889; 经质控后 AaCK 和 AaT 的 clean reads 数分别为 12544551 和 10399091, 占 raw reads 的比例均在 96.09% 以上(表 2), 说明测序数据质量良好。将 AaCK 和 AaT 的 clean reads 映射球囊菌基因组, mapping ratio 分别为 71.60% 和 6.43%。

表 2. sRNA-seq 数据信息统计

Table 2. Summary of sRNA-seq datasets

Samples	Raw reads	Clean reads	Mapping ratio/%
AaCK	12708832	12544551 (98.71%)	71.60
AaT-1	10252283	9932883 (96.88%)	8.02
AaT-2	11367190	10922645 (96.09%)	7.58
AaT-3	10702194	10341746 (96.63%)	3.69

### 2.2 球囊菌 miRNA 的预测与结构特征分析

通过深度测序得到较为复杂 sRNA 数据集, 其中包含 rRNA、tRNA、miRNA、snRNA、snoRNA 等大量的非编码 RNA (non-coding RNA) 片段(图 1-A)。通过比对 miRBase 数据库, AaCK 和 AaT 共鉴定到 648 个 miRNA。其中, 在 AaCK 中鉴定到 380 个 miRNA, 包含 233 个 known miRNA 和 147 个 novel miRNA; 在 AaT 中鉴定到 387 个 miRNA, 包含 330 个 known miRNA 和 57 个 novel miRNA。结构特征分析结果显示, AaCK 和 AaT 的 miRNA 皆集中分布在 18–25 nt, miRNA 分布最多的分别为 18 nt 和 22 nt(图 1-B); 此外, AaCK 的 miRNA 首位碱基主要偏向于 U, 其次偏向于 G 和 C; AaT 的 miRNA 首位碱基同样主要偏向于 U, 但其次偏向于 A 和 C(图 1-C)。

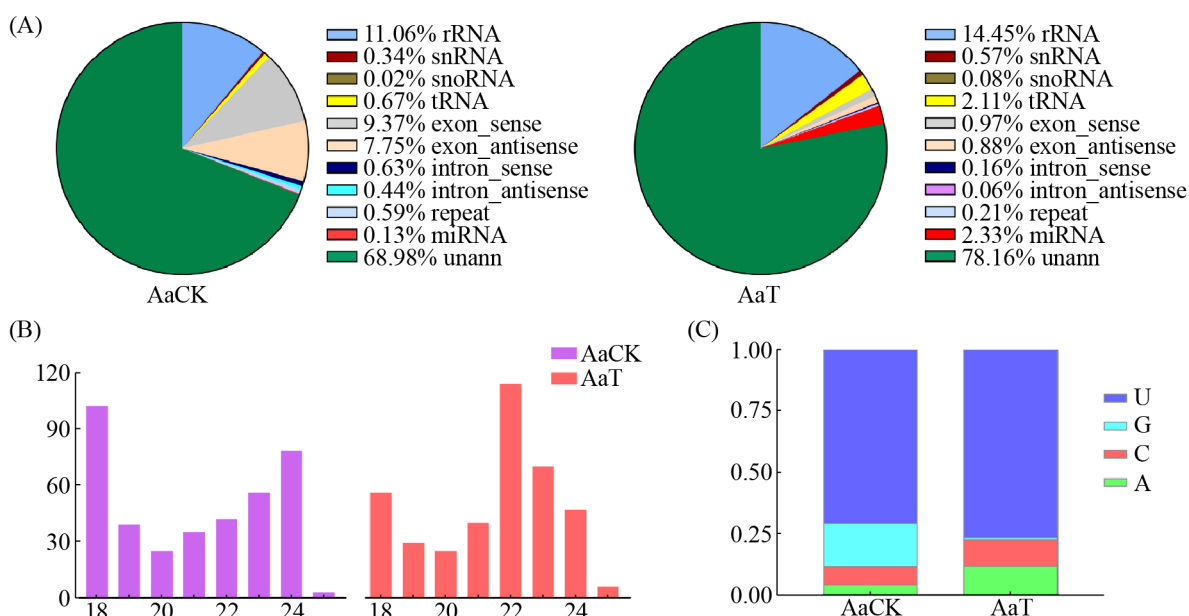


图 1. 球囊菌 miRNA 的预测及特征分析

Figure 1. Prediction and characterization of *A. apis* miRNA. A: Composition of various sRNA populations generated from AaCK and AaT; B: Length distribution of *A. apis* miRNAs; C: First nucleotide bias of *A. apis* miRNAs.

### 2.3 球囊菌 miRNA 的差异表达分析

AaCK vs AaT 比较组经筛选共得到 270 个 DE miRNA, 上调和下调表达的 miRNA 数分别为 155 和 115 个(图 2-A)。其中 miR-31-x、miR-9-z、miR-1-y 以及 miR-375-y 等显著上调,  $\log_2(\text{Fold change})$  分别达到 6.28、4.80、4.72 和 3.96; novel-m0072-3p、novel-m0003-3p、novel-m0046-5p 和 miR-4968-y 等显著下调,  $\log_2(\text{Fold change})$  分别达到 -9.49、-9.60、-9.88 和 -9.92 (图 2-B)。

### 2.4 球囊菌 DE miRNA 的靶 mRNA 预测及分析

靶 mRNA 预测结果显示, 上述 270 个 DE miRNA 共结合 6348 个靶 mRNA, 其中上调 miRNA 和下调 miRNA 分别靶向结合 6091 和 6145 个 mRNA。GO 分类结果显示, 上述靶 mRNA 主要涉及代谢进程(1328)、细胞进程(1309)、单组织进程(1028)、定位(355)、生物调节(310)、细胞成分组织或生物发生(294)、应激反应(169)等 15 个生物学进程; 细胞(1134)、细胞组分(1134)、细胞器(770)、大分子复合物(436)、细胞器组件(356)、细胞膜(352)、细胞膜组件(238)、膜关闭内腔(76)

等 12 个细胞组分; 催化活性(1264)、结合(920)、转运子活性(129)等 11 个分子功能(表 3)。

进一步对上述靶 mRNA 进行 KEGG 代谢通路富集分析, 发现它们富集到 123 条 KEGG 代谢通路, 涉及新陈代谢(2872)、遗传信息加工(854)、细胞进程(385)、环境信息加工(57)以及有机系统(19)等 5 大类, 富集 mRNA 数最多的前 10 位分别是新陈代谢总览(708), 翻译(295), 折叠、分类与降解(237), 碳水化合物代谢(235), 氨基酸代谢(207), 转运和分解代谢(193), 转录(138), 脂质代谢(130), 能量代谢(115), 核苷酸代谢(110) (图 3)。

进一步分析发现富集通路还包括氧化磷酸化(64)、硫代谢(17)、氮代谢(9)等能量代谢相关通路; 糖酵解/糖异生(46)、氨基糖和核苷酸糖代谢(40)、丙酮酸代谢(31)等碳水化合物代谢相关通路; 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(37)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解(30)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(28)等氨基酸代谢通路, 以及 MAPK 信号通路(29)、磷脂酰肌醇信号系统(9)、Hippo 信号通路(3)等信号传导相关通路。

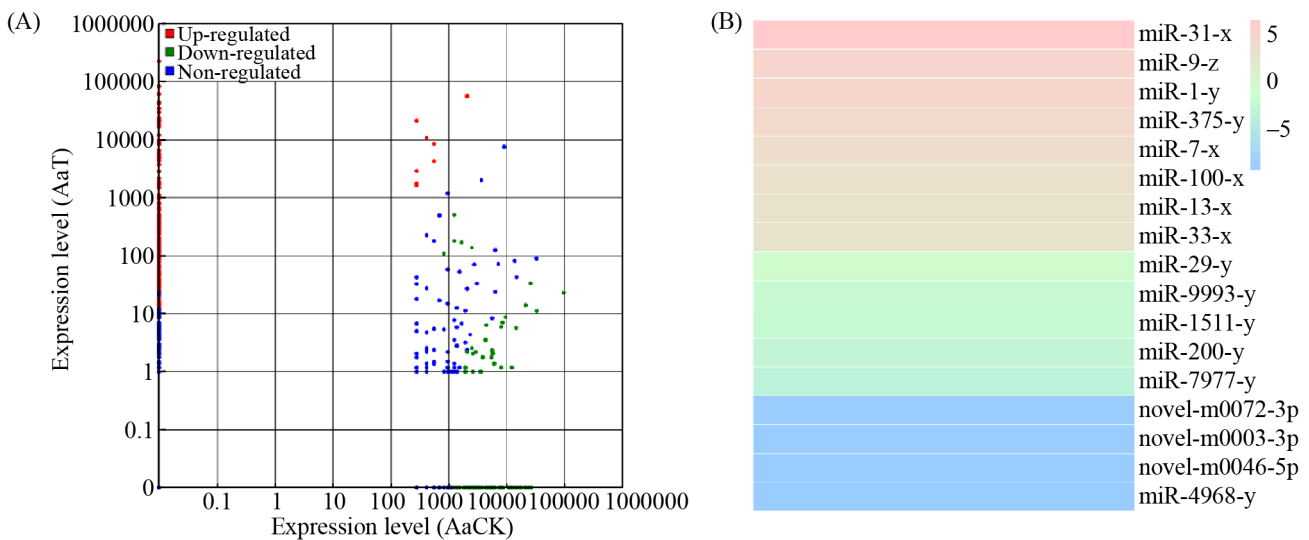


图 2. 球囊菌 miRNA 的差异表达(A)及表达量聚类(B)

Figure 2. Differential expression (A) and expression clustering (B) of *A. apis* miRNAs.

表 3. 球囊菌 DEmiRNA 的靶 mRNA 富集数前 20 位的 GO 条目

Table 3. Top 20 GO terms enriched by target mRNAs of *A. apis* DEmiRNAs

GO category	GO term	NR description	Number of target mRNAs
BP	GO:0009987	Cellular process	1328
BP	GO:0008152	Metabolic process	1309
MF	GO:0003824	Catalytic activity	1264
CC	GO:0005623	Cell	1134
CC	GO:0044464	Cell part	1134
BP	GO:0044699	Single-organism process	1028
MF	GO:0005488	Binding	920
CC	GO:0043226	Organelle	770
CC	GO:0032991	Macromolecular complex	436
CC	GO:0044422	Organelle part	356
BP	GO:0051179	Localization	355
CC	GO:0016020	Membrane	352
BP	GO:0065007	Biological regulation	310
BP	GO:0071840	Cellular component organization or biogenesis	294
CC	GO:0044425	Membrane part	238
BP	GO:0050896	Response to stimulus	169
MF	GO:0005215	Transporter activity	129
CC	GO:0031974	Membrane-enclosed lumen	76
BP	GO:0023052	Signaling	52
MF	GO:0005198	Structural molecule activity	44

BP: Biological process; MF: Molecular function; CC: Cellular component.

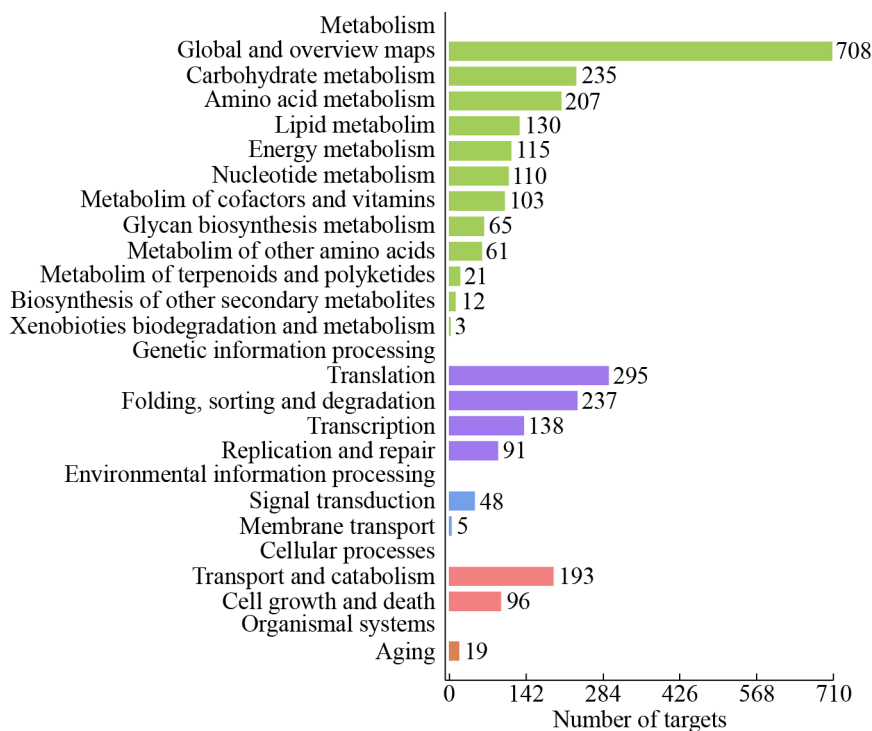


图 3. 球囊菌 DEmiRNA 的靶 mRNA 的 KEGG 代谢通路富集分析

Figure 3. KEGG pathway enrichment analysis of *A. apis* DEmiRNA target mRNAs.



## 2.5 球囊菌 DEmiRNA 的调控网络构建及分析

鉴于球囊菌 DEmiRNA 数量达到 270 个, 构建出的调控网络极为复杂, 因此根据 Nr 数据库注释信息, 筛选与半胱氨酸蛋白酶、DNA 甲基化转移酶、几丁质酶以及 MAPK 信号通路相关的靶 mRNA, 并构建它们与靶向结合的球囊菌 DEmiRNA 之间的调控网络(图 4), 分析发现分别有 11 个上调 miRNA 和 18 个下调 miRNA 结合 2 个与半胱氨酸蛋白酶相关的靶 mRNA; 分别有 6 个上调 miRNA 和 7 个下调 miRNA 结合 1 个与 DNA 甲基化转移酶相关的靶 mRNA; 分别有 3 个上调 miRNA 和 6 个下调 miRNA 结合 1 个与几丁质酶相关的靶 mRNA; 分别有 114 个上调 miRNA 和 88 个下调 miRNA 结合 29 个 MAPK 信号通路相关的靶 mRNA。

进一步分析结果显示, 显著下调的 miR-4968-y 同时参与对 DNA 甲基化转移酶、半胱氨酸蛋白酶和 MAPK 信号通路的调控; 显著下调的 miR-11200-x 和 novel-m0130-5p 均同时参与对 DNA 甲基化转移酶、几丁质酶和 MAPK 信号通路的调控; 显著下调的 novel-m0023-5p 和 novel-m0135-5p 均同时参与对几丁质酶、半胱氨酸蛋白酶和 MAPK 信号通路的调控; 显著上调的 miR-6037-y、miR-250-x、miR-8503-x、miR-3786-x、miR-1344-x、miR-3718-y 等 6 个 miRNA 和显著下调 novel-m0123-3p、novel-m0028-5p、miR-29-x、miR-5658-x 等 4 个显著 miRNA 均同时参与对 DNA 甲基化转移酶和 MAPK 信号通路的调控。显著上调的 miR-2-x、miR-10-y、miR-100-y、miR-190-x、miR-971-y、miR-2788-y、miR-3715-x、miR-6005-x、miR-6497-x、miR-29b3-y 等 10 个 miRNA 和显著下调的 miR-29-y、miR-1546-x、

miR-5951-y、miR-7977-x、miR-8577-x、novel-m0019-3p、novel-m0060-3p、novel-m0062-3p、novel-m0077-3p、novel-m0108-5p、novel-m0112-3p 等 11 个 miRNA 均同时参与对半胱氨酸蛋白酶和 MAPK 信号通路的调控。

## 2.6 球囊菌 DEmiRNA 的 Stem-loop RT-PCR 和 RT-qPCR 验证

利用 Stem-loop RT-PCR 和 RT-qPCR 对随机选择的 2 个上调 miRNA 和 2 个下调 miRNA 在 AaCK 和 AaT 中的真实表达与相对表达变化趋势进行验证, 结果显示上述 4 个 DEmiRNA 在 AaCK vs AaT 比较组内均真实表达, 且与 sRNA-seq 中相应的表达量变化趋势一致(图 5 A-D)。对 miR-7-x 的 Stem-loop RT-PCR 扩增片段进行 TA 克隆和 Sanger 测序, 结果与其测序序列一致(图 5-E), 进一步证明了测序结果的可靠性。

## 3 讨论

球囊菌专性侵染蜜蜂幼虫, 在与宿主的长期协同进化过程中形成特定的侵染模式, 但目前对球囊菌的致病机理的认识还停留在组织学和生物化学水平<sup>[1]</sup>, 缺乏分子生物学和组学水平的深入阐释。前期研究中, 笔者团队利用二代测序技术和生物信息学方法在 mRNA 组学层面初步解析了球囊菌与意蜂及中蜂幼虫的复杂互作机制<sup>[6-7,25-26]</sup>, 发现在侵染中蜂幼虫肠道过程中, 部分与物质和能量代谢相关的球囊菌基因表达受到不同程度的抑制<sup>[4]</sup>; 中蜂幼虫肠道的免疫相关基因被球囊菌大量激活<sup>[25]</sup>; 此外, 在临近白垩病暴发的中蜂 6 日龄幼虫肠道鉴定到 537 个 DEmiRNA, 它们通过靶向调控各类代谢活动和免疫途径对球囊菌胁迫产

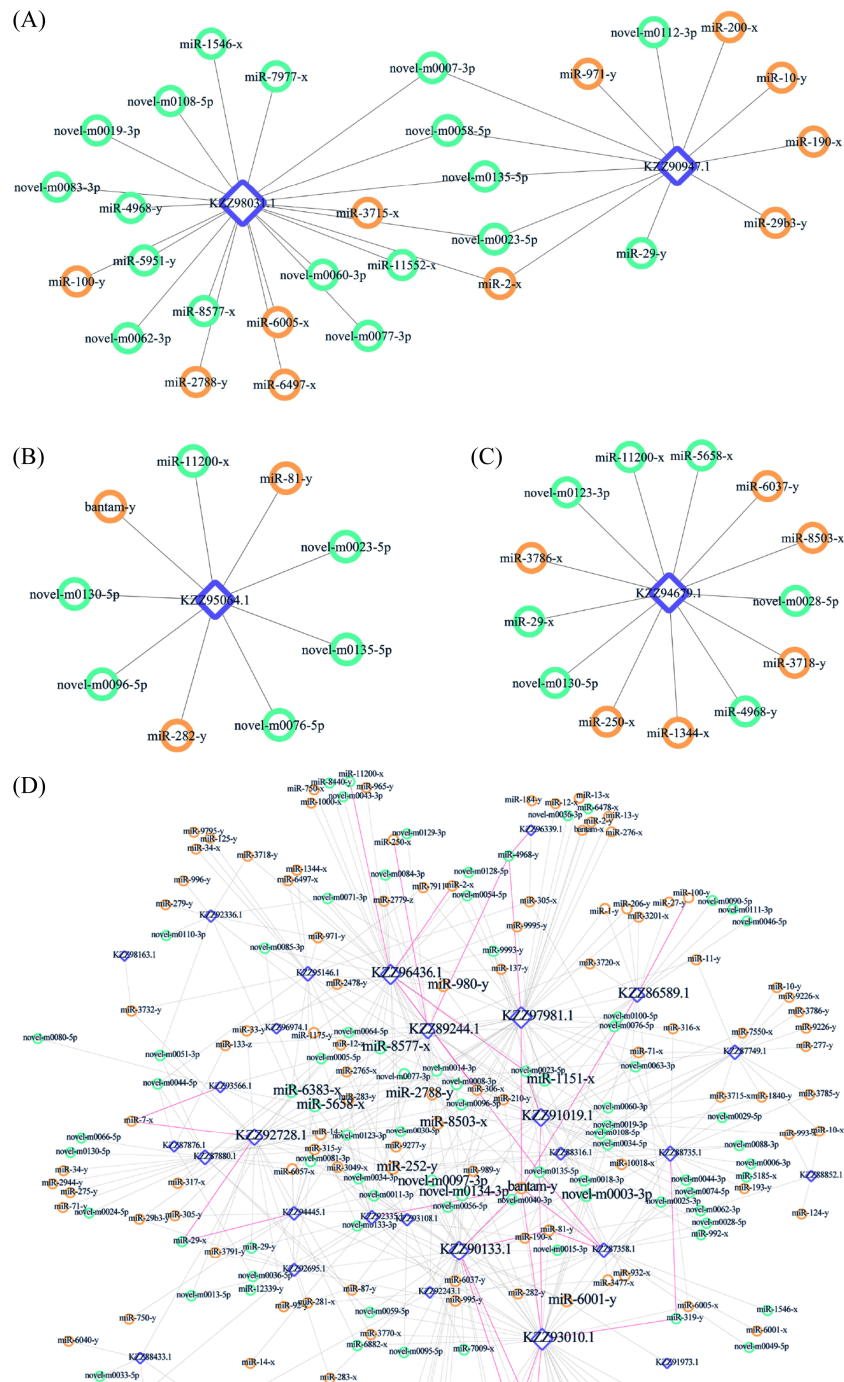


图 4. 球囊菌的 DEMiRNA-mRNA 调控网络

Figure 4. DEMiRNA-mRNA regulation networks in *A. apis*. A: Regulation networks of cysteine proteinase-associated mRNAs and corresponding DEMiRNAs; B: Regulation networks of chitinase-associated mRNAs and corresponding DEMiRNAs; C: Regulation networks of DNA methyltransferases-associated mRNAs and corresponding DEMiRNAs; D: Regulation networks of MAPK signaling pathway-associated mRNAs and corresponding DEMiRNAs. Orange circles indicate up-regulated miRNAs; green circles indicate down-regulated miRNAs. Purple diamond indicate target mRNAs.

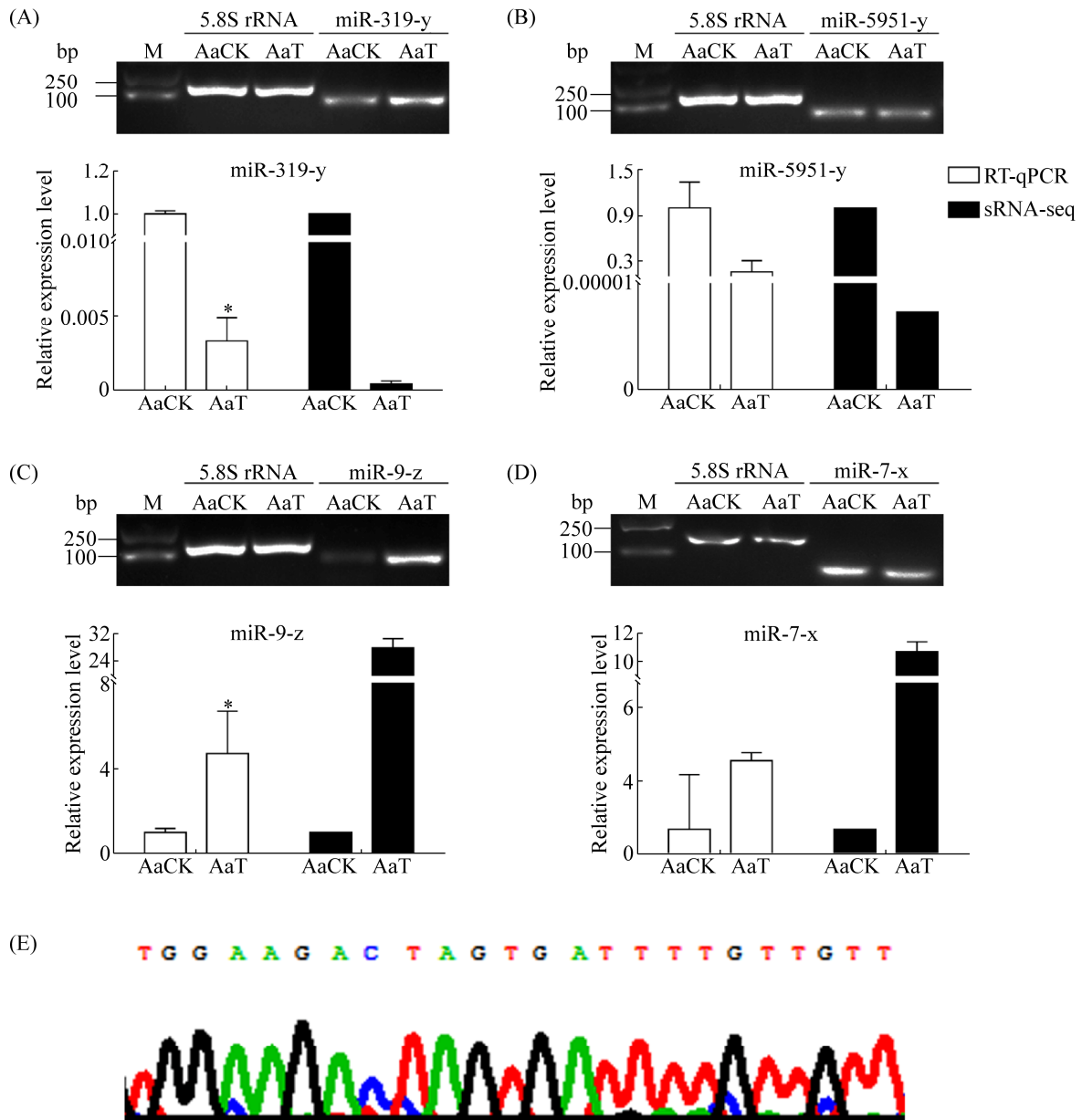


图 5. 球囊菌 DEmiRNAs 的 Stem-loop RT-PCR 及 RT-qPCR 验证

Figure 5. Stem-loop RT-PCR and RT-qPCR confirmation of *A. apis* DEmiRNAs. A, B, C, D: Agarose gel electrophoresis of Stem-loop RT-PCR products and RT-qPCR examination of miR-319-y, miR-5951-y, miR-9-z and miR-7-x; E: Sanger sequencing of Stem-loop RT-PCR product from miR-7-x. Three biological replicates were analyzed, and are represented as Mean $\pm$ SD. \*:  $P < 0.05$  compared with AaCK ( $t$ -test).

生应答<sup>[20]</sup>。本研究在前期研究基础上进一步探究侵染中蜂 6 日龄幼虫肠道的球囊菌的 miRNA 差异表达谱及其潜在调控作用，在 AaCK 和 AaT 中分别鉴定出 380 和 387 个 miRNA，它们的长度主要

介于 18–25 nt，首位碱基偏向性主要偏向于 U。前人研究发现，番茄在接种厚垣孢普可尼亚菌 (*Pochonia chlamydosporia*) 后，其体内用于调控基因沉默的 24 nt 的 sRNA 丰度显著降低<sup>[27]</sup>。本研究

发现 AaCK 中 miRNA 在 18 nt 分布的数量最多, 而 AaT 中 miRNA 在 22 nt 分布的数量最多, 这种差异体现出球囊菌侵染中蜂幼虫前后, 其 miRNA 的结构特征发生改变, 暗示球囊菌可能通过改变 miRNA 结构参与对中蜂幼虫的致病过程。本研究鉴定到的 miRNA 与前期研究<sup>[8]</sup>鉴定到的 miRNA 互为补充, 丰富了球囊菌 miRNA 的信息, 为其功能研究提供了数据基础。进一步的差异分析发现 AaCK vs AaT 比较组的上调和下调 miRNA 数分别为 155 和 115 个, 分别靶向结合 6091 和 6145 个 mRNA, 这些靶 mRNA 参与调控代谢进程、细胞进程、催化活性、应激反应等功能条目, 核苷酸代谢、氨基酸代谢和碳水化合物代谢等物质代谢途径, 氧化磷酸化、硫代谢和氮代谢等能量代谢途径, 以及 MAPK 信号通路、Hippo 信号通路和磷脂酰肌醇信号系统等信号转导通路, 上述结果表明球囊菌在侵染中蜂幼虫时通过改变自身 miRNA 的表达量, 以影响靶 mRNA 的表达水平, 进而适应幼虫肠道内的环境并调节自身的增殖。

DNA 甲基化是真核生物的重要表观遗传标记, 通过影响基因的表达调控遗传组分与环境胁迫的应答反应<sup>[28]</sup>。DNA 甲基化转移酶(DNMTase)是甲基化的关键酶, 与真菌病原的生长、抗逆性及毒力密切相关<sup>[29]</sup>。Jeon 等<sup>[30]</sup>研究发现缺失 DNMTase 编码基因 *DIM-2* 的稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*), 其菌落形态、径向生长和孢子形成过程发生异常, 导致其致病力明显下降。Wang 等<sup>[31]</sup>发现 MrDIM-2 和 MrRID 可影响 *M. robertsii* 的甲基化过程和基因组甲基化特异性, 缺失 MrDIM-2 或 RID/DIM-2 的菌株, 其富集在细胞进程调控和胁迫应答等功能条目上基因及菌株毒

力相关的半胱氨酸蛋白酶和几丁质酶等基因均下调表达, 导致 *M. robertsii* 在经过辐照和热激等不良环境胁迫后的孢子活性降低; 此外, 作者还发现缺失 MrDIM-2 或 RID/DIM-2 的 *M. robertsii* 感染的大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 死亡率和体表分生孢子数也明显降低。Lewsey 等<sup>[32]</sup>研究发现拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 siRNA 在植株体内传播过程中可介导全基因组 DNA 甲基化 (RdDM)。目前, 相关 miRNA 主要通过靶向结合 DNMTase mRNA 的 3'UTR 并抑制其表达, 进而影响整个机体的甲基化模式和生物学功能<sup>[33-34]</sup>。前期研究中, 我们发现侵染中蜂 6 日龄肠道的球囊菌的 DNMTase 编码基因 (ID: Unigene0012984) 显著上调 [ $\log_2(\text{Fold Change})=2.52$ ,  $P=0.02$ ]。本研究中, 分别有 6 个上调 miRNA (miR-250-x、miR-1344-x、miR-3718-y、miR-3786-x、miR-6037-y、miR-8503-x) 和 7 个下调 miRNA (miR-29-x、miR-4968-y、miR-5658-x、miR-11200-x、novel-m0028-5p、novel-m0123-3p、novel-m0130-5p) 共同靶向 1 个与 DNA 甲基化转移酶相关的 mRNA (*DMAPI*, ID: KZZ94679.1)。推测侵染中蜂 6 日龄幼虫的球囊菌通过下调上述 7 个 miRNA 的表达水平, 部分解除对 *DMAPI* 的抑制作用, 从而维持正常的甲基化水平, 保证与其抗逆性和致病性相关基因的表达。中蜂幼虫与球囊菌存在复杂互动, 宿主的免疫系统必然产生相应的免疫防御, 以限制病原的增殖造成部分相关 miRNA 上调表达。目前, 笔者已对球囊菌菌丝和孢子进行全基因组 DNA 甲基化测序, 未来可结合本研究中的 miRNA 组学数据, 进一步探究球囊菌侵染中蜂幼虫过程中病原 miRNA 与 DNA 甲基化之间的调控关系。

在长期协同进化过程中,以蜜蜂为代表的昆虫进化出以吞噬、包囊和黑化作用为代表的细胞免疫和以 Jak-STAT、Imd、JNK 和 Toll 信号通路为代表的体液免疫<sup>[35]</sup>,与复杂而稳定的肠道菌群<sup>[36]</sup>和不饱和脂肪酸<sup>[2]</sup>等生物化学环境协同抵御外源病原菌的入侵。对于真菌病原,其致病性主要依赖于利用宿主营养满足自身繁殖,另一方面抑制和削弱宿主先天性免疫的能力,例如分泌以半胱氨酸蛋白酶和几丁质酶等蛋白酶和其他次生代谢产物抑制宿主免疫反应并降解宿主防御分子<sup>[37]</sup>。前期研究中,笔者团队发现球囊菌的 12 个几丁质酶相关基因在胁迫意蜂 6 日龄幼虫肠道过程中差异表达,说明这些差异表达基因参与了球囊菌的致病过程<sup>[38]</sup>。本研究发现,有 3 个上调 miRNA (bantam-y、miR-81-y、miR-282-y)和 6 个下调 miRNA (miR-11200-x、novel-m0023-5p、novel-m0076-5p、novel-m0096-5p、novel-m0130-5p 和 novel-m0135-5p)靶向结合 1 个几丁质酶相关 mRNA (ID: KZZ95064.1);此外,miR-2-x、miR-10-y、miR-100-y、miR-200-x 和 miR-971-y 等 11 个上调 miRNA 以及 miR-1546-x、miR-4968-y、miR-8577-x、novel-m0023-5p 和 novel-m0135-5p 等 18 个下调 miRNA 靶向结合 2 个半胱氨酸蛋白酶相关 mRNA (ID: KZZ90947.1; KZZ98031.1);进一步分析发现 novel-m0023-5p 和 novel-m0135-5p 均显著下调且同时参与对几丁质酶和半胱氨酸蛋白酶的调控。上述结果表明球囊菌在中蜂幼虫肠道的特定环境下,通过调节 miRNA 的表达水平,动态调控几丁质酶和半胱氨酸蛋白酶基因的表达,影响自身毒力并协助穿透幼虫肠道围食膜和肠壁,可能在球囊菌感染后期

引起白垩病暴发的过程中发挥关键作用,但需要进一步的实验验证。

病原真菌受到外界环境刺激后,可通过复杂而保守的信号级联反应引起下游靶标基因的表达变化<sup>[39]</sup>。其中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应在真菌信号通路中极为关键,参与到真菌交配繁殖、渗透压调节、孢子形成以及毒力水平的调控<sup>[40]</sup>,其依赖的 MAP 激酶可协助病原真菌侵染宿主<sup>[41]</sup>。笔者团队前期在 mRNA 组学层面探究了球囊菌在胁迫中蜂幼虫和意蜂幼虫过程中的基因表达谱,发现对于感染中蜂 6 日龄幼虫的球囊菌,富集在 MAPK 信号通路上的高表达基因数量显著增加<sup>[42]</sup>,另有 64 个富集基因在球囊菌感染意蜂 6 日龄幼虫肠道后显著上调<sup>[38]</sup>,暗示球囊菌 MAPK 信号通路上的大量基因被显著激活。本研究中,共有 29 个 MAPK 信号通路相关的 mRNA (例如 MAP 激酶编码基因, ID: KZZ97981.1;真菌信息素交配因子编码基因, ID: KZZ87749.1,丝氨酸/苏氨酸蛋白酶编码基因, ID: KZZ87358.1 等)与 114 个上调 miRNA (bantam-y、miR-2-x、miR-7-x、miR-9-z、miR-81-y、miR-100-y 和 miR-250-x 等)和 88 个下调 miRNA (miR-29-x、miR-319-y、miR-4968-y、miR-5951-y、miR-11200-x、novel-m0023-5p 和 novel-m0135-5p 等)存在靶向结合关系。RT-qPCR 结果显示其中的 miR-7-x、miR-9-z、miR-319-y 和 miR-5951-y 的相对表达变化水平与测序数据一致。以上结果表明上述 DE miRNA 参与了对感染中蜂幼虫的球囊菌 MAPK 信号通路的调控,病原可通过激活或抑制该通路富集靶 mRNA 的表达,影响球囊菌对宿主肠道环境的适应和增殖。

球囊菌 DEmiRNA 与靶 mRNA 之间存在复杂的调控关系。一个 miRNA 可调控多个靶 mRNA, 反之亦然<sup>[8]</sup>。本研究发现, 结合 262 个靶 mRNA 的 miR-250-x 显著上调 [ $\log_2(\text{Fold Change})=11.52$ ,  $P=0.01$ ], 同时参与 DNA 甲基化转移酶、MAPK 信号通路以及其他酶类合成与代谢途径的调控, 推测球囊菌在侵染中蜂 6 日龄幼虫的过程中, 宿主通过与球囊菌的互作上调后者 miR-250-x 的表达水平, 增强对相关靶 mRNA 的抑制, 从而影响病原的孢子萌发和菌丝生长。前人研究发现 miRNA 在不同物种间具有一定的同源性和保守性<sup>[43]</sup>, 并参与宿主与病原相互之间的跨界调控<sup>[19,44-45]</sup>。前期研究发现, 被球囊菌侵染的中蜂 6 日龄幼虫肠道的 miR-250 显著上调表达, 并参与调控泛素介导的蛋白水解和 Jak-STAT 信号通路等细胞和体液免疫。结合本研究的结果进一步分析发现, 中蜂幼虫肠道和球囊菌的 miR-250 的 5'端种子区序列一致, 具有较高的同源性, 推测宿主来源的 miR-250 对球囊菌的毒力和增殖产生跨界调控, 而病原来源的 miR-250 可能分泌到宿主细胞质内, 对包括免疫防御在内的生物学进程产生影响, 从而促进自身的增殖。下一步将结合病原与宿主的 miRNA 数据, 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 之间的靶向结合关系, 并通过生物信息学和分子生物学方法解析二者的跨界调控作用, 深入探究二者的互作机制。近年来, 非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 日益受到国内外学者的关注, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和环状 RNA (circular RNA, circRNA) 已成为全世界的研究热点。笔者团队前期已利用链特异性建库的二代测

序技术对球囊菌进行测序, 在全基因组水平分析和鉴定了 lncRNA<sup>[46]</sup>和 circRNA<sup>[47]</sup>。竞争性内源 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 假说认为 lncRNA 和 circRNA 等 ncRNA 可充当 miRNA 的分子海绵, 通过 miRNA 应答元件竞争性结合 miRNA, 进而影响其对靶 mRNA 以及各类生命进程的调控<sup>[48]</sup>。球囊菌对蜜蜂幼虫的侵染机制必然伴随着复杂分子事件的发生, 其中 ncRNA 扮演着什么角色, 本研究鉴定出 DEmiRNA 是否与球囊菌的 lncRNA 和 circRNA 存在 cross talk, 是否存在 DEmiRNA 介导的更为复杂的 ceRNA 调控网络, 是非常值得关注的研究方向。

综上所述, 本研究对胁迫中蜂 6 日龄幼虫的球囊菌的 miRNA 差异表达谱及调控网络进行全面分析, 研究结果为深入探究球囊菌对中蜂幼虫的侵染机制以及二者之间的互作机制提供了新的思路和线索, 也为球囊菌关键致病因子的筛选和功能研究提供了基础。

## 参考文献

- [1] Li JH, Zheng ZY, Chen DF, Liang Q. Factors influencing *Ascosphaera apis* infection on honeybee larvae and observation on the infection process. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55(7): 790-797. (in Chinese)  
李江红, 郑志阳, 陈大福, 梁勤. 影响蜜蜂球囊菌侵染蜜蜂幼虫的因素及侵染过程观察. *昆虫学报*, 2012, 55(7): 790-797.
- [2] Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103(S1): S20-S29.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [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 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, 黄枳隼, 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.
- [7] 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, 黄枳隼, 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.
- [8] 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.
- [9] Hussain M, Asgari S. MicroRNAs as mediators of insect host-pathogen interactions and immunity. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 70: 151–158.
- [10] Lee HC, Li LD, Gu WF, Xue ZH, Crosthwaite SK, Pertsemlidis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 2010, 38(6): 803–814.
- [11] Nunes CC, Sailsbery JK, Dean RA. Characterization and application of small RNAs and RNA silencing mechanisms in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 2011, 25(4): 172–180.
- [12] Chen R, Jiang N, Jiang QY, Sun XJ, Wang Y, Zhang H, Hu Z. Exploring microRNA-like small RNAs in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104956.
- [13] Zhou JH, Fu YP, Xie JT, Li B, Jiang DH, Li GQ, Cheng JS. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(4): 275–282.
- [14] Zhou Q, Wang ZX, Zhang J, Meng HM, Huang B. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biology*, 2012, 116(11): 1156–1162.
- [15] Huang Q, Evans JD. Identification of microRNA-like small RNAs from fungal parasite *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 107–109.
- [16] Li Q, Cui CL, Song HS, Wang SB. The effects of mro-miR-33 on the conidial production in *Metarhizium robertsii*. *Mycosystema*, 2017, 36(6): 671–678. (in Chinese)  
李琼, 崔春来, 宋红生, 王四宝. mro-miR-33 在绿僵菌产孢中的作用. 菌物学报, 2017, 36(6): 671–678.
- [17] Croston TL, Lemons AR, Beezhold DH, Beezhold DH, Green BJ. MicroRNA regulation of host immune responses following fungal exposure. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 170.
- [18] Shakeel M, Xu XX, Xu J, Li SZ, Yu JL, Zhou XQ, Xu XJ, Hu QB, Yu XQ, Jin FL. Genome-wide identification of destruxin A-responsive immunity-related microRNAs in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 185.
- [19] Evans JD, Huang Q. Interactions among host-parasite microRNAs during *Nosema ceranae* proliferation in *Apis mellifera*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 698.
- [20] Du Y, Tong XY, Zhou DD, Chen DF, Xiong CL, Zheng YZ,

- Xu GJ, Wang HP, Chen HZ, Guo YL, Long Q, Guo R. MicroRNA responses in the larval gut of *Apis cerana cerana* to *Ascospaera apis* stress. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(9): 1747–1764. (in Chinese)
- 杜宇, 董新宇, 周丁丁, 陈大福, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 王海朋, 陈华枝, 郭意龙, 隆琦, 郭睿. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 microRNA 应答分析. *微生物学报*, 2019, 59(9): 1747–1764.
- [21] Guo R, Du Y, Zhou NH, Liu SY, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu GJ, Wang HP, Geng SH, Zhou DD, Chen DF. Comprehensive analysis of differentially expressed microRNAs and their target genes in the larval gut of *Apis mellifera ligustica* during the late stage of *Ascospaera apis* stress. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62(1): 49–60. (in Chinese)
- 郭睿, 杜宇, 周倪红, 刘思亚, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 王海朋, 耿四海, 周丁丁, 陈大福. 意大利蜜蜂幼虫肠道在球囊菌胁迫后期的差异表达微小 RNA 及其靶基因分析. *昆虫学报*, 2019, 62(1): 49–60.
- [22] Xiong CL, Du Y, Chen DF, Zheng YZ, Fu ZM, Wang HP, Geng SH, Chen HZ, Zhou DD, Wu SZ, Shi CY, Guo R. Bioinformatic prediction and analysis of miRNAs in the *Apis mellifera ligustica* larval gut. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2018, 55(6): 1023–1033. (in Chinese)
- 熊翠玲, 杜宇, 陈大福, 郑燕珍, 付中民, 王海朋, 耿四海, 陈华枝, 周丁丁, 吴素珍, 石彩云, 郭睿. 意大利蜜蜂幼虫肠道的 miRNAs 的生物信息学预测及分析. *应用昆虫学报*, 2018, 55(6): 1023–1033.
- [23] Rajewsky N, Socci ND. Computational identification of microRNA targets. *Developmental Biology*, 2004, 267(2): 529–535.
- [24] Zhu KG, Liu MH, Fu Z, Zhou Z, Kong Y, Liang HW, Lin ZG, Luo J, Zheng HQ, Wan P, Zhang JF, Zen K, Chen J, Hu FL, Zhang CY, Ren J, Chen X. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, 2017, 13(8): e1006946.
- [25] Guo R, Chen DF, Diao QY, Xiong CL, Zheng YZ, Hou CS. Transcriptomic investigation of immune responses of the *Apis cerana cerana* larval gut infected by *Ascospaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 166: 107210.
- [26] 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 *Ascospaera apis* infection utilizing transcriptome sequencing. *Gene*, 2017, 621: 40–50.
- [27] Pentimone I, Lebrón R, Hackenberg M, Rosso LC, Colagiero M, Nigro F, Ciancio A. Identification of tomato miRNAs responsive to root colonization by endophytic *Pochonia chlamydosporia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 907–919.
- [28] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(6): 465–476.
- [29] Kouzminova E, Selker EU. *Dim-2* encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *The EMBO Journal*, 2001, 20(15): 4309–4323.
- [30] Jeon J, Choi J, Lee GW, Park SY, Huh A, Dean RA, Lee YH. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 8567.
- [31] Wang YL, Wang TT, Qiao LT, Zhu JY, Fan JR, Zhang TT, Wang ZX, Li WZ, Chen AH, Huang B. DNA methyltransferases contribute to the fungal development, stress tolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 4215–4226.
- [32] Lewsey MG, Hardcastle TJ, Melnyk CW, Molnar A, Valli A, Ulrich MA, Nery JR, Baulcombe DC, Ecker JR. Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2016, 113(6): E801–E810.
- [33] Xu ZB, Song LX. Research progress in miRNAs and methylation regulation. *Chemistry of Life*, 2016, 36(5): 677–682. (in Chinese)
- 徐振彪, 宋林霞. miRNA 与甲基化调控研究进展. *生命的化学*, 2016, 36(5): 677–682.
- [34] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu ZF, Zanesi N, Callegari E, Liu SJ, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family



- reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2007, 104(40): 15805–15810.
- [35] 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.
- [36] Huang SK, Ye KT, Huang WF, Ying BH, Su X, Lin LH, Li JH, Chen YP, Li JL, Bao XL, Hu JZ. Influence of feeding type and *Nosema ceranae* infection on the gut microbiota of *Apis cerana* workers. *mSystems*, 2018, 3(6): e00177-18.
- [37] Vilcinskis A. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. *Virulence*, 2010, 1(3): 206–214.
- [38] Du Y, Xiong CL, Shi XL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu XJ, Chen DF, Guo R. Transcriptome analysis of differentially expressed genes in *Ascospheara apis* stressing the 6-day-old larval gut of *Apis mellifera ligustica*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(7): 1119–1128. (in Chinese)  
杜宇, 熊翠玲, 史秀丽, 郑燕珍, 付中民, 徐细建, 陈大福, 郭睿. 意大利蜜蜂 6 日龄幼虫肠道内球囊菌的差异表达基因分析. *浙江农业学报*, 2017, 29(7): 1119–1128.
- [39] Xu XG, Zhang ZP, Cheng B. Progression on the research of two-component signal transduction system in fungus and its inhibitors. *Chinese Journal of Mycology*, 2011, 6(6): 370–372, 380. (in Chinese)  
徐西光, 张子平, 程波. 真菌双组分信号转导系统及其抑制剂研究进展. *中国真菌学杂志*, 2011, 6(6): 370–372, 380.
- [40] Jiang C, Zhang X, Liu HQ, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant pathogenic fungi. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(3): e1006875.
- [41] Turrà D, Segorbe D, Di Pietro A. Protein kinases in plant-pathogenic fungi: conserved regulators of infection. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, 52: 267–288.
- [42] Chen DF, Wang HQ, Li WD, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu XJ, Huang ZJ, Guo R. Analysis of highly expressed genes of *Ascospheara apis* infecting the gut of *Apis cerana cerana* larvae and its *in vitro* culture. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 46(5): 562–568. (in Chinese)  
陈大福, 王鸿权, 李汶东, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐细建, 黄积隼, 郭睿. 胁迫中华蜜蜂幼虫肠道的球囊菌及其体外培养的高表达基因分析. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2017, 46(5): 562–568.
- [43] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 858–862.
- [44] McClure LV, Sullivan CS. Kaposi's sarcoma herpes virus taps into a host microRNA regulatory network. *Cell Host & Microbe*, 2008, 3(1): 1–3.
- [45] LaMonte G, Philip N, Reardon J, Lacsina JR, Majoros W, Chapman L, Thornburg CD, Telen MJ, Ohler U, Nicchitta CV, Haystead T, Chi JT. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(2): 187–199.
- [46] Guo R, Chen DF, Xiong CL, Hou CS, Zheng YZ, Fu ZM, Diao QY, Zhang L, Wang HQ, Hou ZX, Li WD, Kumar D, Liang Q. Identification of long non-coding RNAs in the chalkbrood disease pathogen *Ascospheara apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 156: 1–5.
- [47] 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 *Ascospheara apis*, a fungal pathogen of honeybee larvae. *Gene*, 2018, 678: 17–22.
- [48] Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG, DeNicola G, Webster KA, Weiss D, Perez-Mancera PA, Krauthammer M, Halaban R, Provero P, Adams DJ, Tuveson DA, Pandolfi PP. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, 2011, 147(2): 382–395.

# Differential expression pattern and regulation network of microRNAs in *Ascospaera apis* invading *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae

Cuiling Xiong<sup>#</sup>, Yu Du<sup>#</sup>, Ruirong Feng, Haibin Jiang, Xiaoyu Shi, Haipeng Wang, Xiaoxue Fan, Jie Wang, Zhiwei Zhu, Yuanchan Fan, Huazhi Chen, Dingding Zhou, Yanzhen Zheng, Dafu Chen<sup>\*</sup>, Rui Guo<sup>\*</sup>

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

**Abstract:** [Objective] This study aimed to reveal miRNA-mediated mechanism underlying *Ascospaera apis* infection of *Apis cerana cerana* larvae. [Methods] Small RNA (sRNA) dataset of *A. apis* during infection (AaT) was screened out from sRNA-seq data from *Ascospaera apis*-infected *A. c. cerana* 6-day-old larval guts. The filtered sRNA datasets from the purified spores (AaCK) and AaT were aligned against miRBase using Blast, followed by analyses of number and structural characteristics of pathogen miRNAs before and after *Ascospaera apis* infection. Prediction, GO categorization and KEGG pathway enrichment analysis of targets of DE miRNAs were conducted using related software. The regulation network between DE miRNAs and corresponding targets was visualized using Cytoscape. Stem-loop RT-PCR, qPCR and molecular cloning were used to verify the reliability of our sequencing data. [Results] Totally, 380 and 387 miRNAs were identified in AaCK and AaT, respectively. The length of *Ascospaera apis* miRNAs were mainly distributed between 18 nt and 25 nt; and the first base had a U bias. There were 155 up-regulated and 115 down-regulated miRNAs in AaCK vs AaT, targeting 6091 and 6145 mRNAs. Targets of DE miRNAs were involved in 15 biological processes, 12 cell components and 11 molecular functions. Additionally, these targets were engaged in 123 pathways, regulating material metabolisms, energy metabolisms and signaling pathways. Moreover, complex regulation networks existed between DE miRNA and corresponding targets, among them miR-29-x, miR-250-x, miR-4968-y, miR-11200-x, novel-m0023-5p, novel-m0130-5p and novel-m0135-5p can target mRNAs associated with cysteine proteinase, DNA methyltransferases and chitinase; miR-7-x, miR-9-z, miR-319-y and miR-5951-y can simultaneously regulate MAPK signaling pathway; miR-250-x may be involved in cross-kingdom regulation between *A. apis* and *A. c. cerana* larvae. [Conclusion] Our results revealed DE miRNAs may participate in the infection process of *A. apis* via regulating targets associated with material and energy metabolisms, pathogen proliferation, virulence, and several signaling pathways; several key miRNAs including miR-7-x were potential targets for chalkbrood control.

**Keywords:** *Ascospaera apis*, *Apis cerana cerana*, larvae, microRNA, regulation network, infection mechanism, cross-kingdom regulation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31702190), by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), by the Teaching and Scientific Research Fund of Education Department of Fujian Province (JAT170158), by the Outstanding Scientific Research Manpower Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (xjq201814), by the Scientific and Technical Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2017342, CXZX2017343) and by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (201910389011, 201810389029, 201810389082)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding authors. Tel/Fax: +86-591-83726835; E-mail: Rui Guo, ruiguo@fafu.edu.cn, Dafu Chen, dfchen826@fafu.edu.cn

Received: 10 September 2019; Revised: 6 November 2019; Published online: 20 January 2020