

# 环状 RNA *ame\_circ\_000115* 调节蜜蜂球囊菌胁迫下意大利蜜蜂幼虫肠道基因表达

叶亚萍<sup>1#</sup>, 王杰<sup>1#</sup>, 张佳欣<sup>1</sup>, 张凯遥<sup>1</sup>, 顾小雨<sup>1</sup>, 姚雨彤<sup>1</sup>, 任中民<sup>1</sup>, 张扬<sup>1</sup>, 陈大福<sup>1,2</sup>, 郭睿<sup>1,2\*</sup>

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

叶亚萍, 王杰, 张佳欣, 张凯遥, 顾小雨, 姚雨彤, 任中民, 张扬, 陈大福, 郭睿. 环状 RNA *ame\_circ\_000115* 调节蜜蜂球囊菌胁迫下意大利蜜蜂幼虫肠道基因表达[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 217-230.

YE Yaping, WANG Jie, ZHANG Jiabin, ZHANG Kaiyao, GU Xiaoyu, YAO Yutong, REN Zhongmin, ZHANG Yang, CHEN Dafu, GUO Rui. Circular RNA *ame\_circ\_000115* regulates expression of genes in larval guts of *Apis mellifera ligustica* stressed by *Ascosphaera apis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 217-230.

**摘要:** 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类新型非编码 RNA, 已被证实可通过竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 调控网络等多种方式参与调节昆虫基因表达和免疫应答。目前, circRNA 在蜜蜂免疫应答中的作用尚不清楚。本研究对意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂) *ame\_circ\_000115* (简称 ac115) 的反向剪切 (back splicing, BS) 位点进行验证。采用 RT-qPCR 检测蜜蜂球囊菌 (*Ascosphaera apis*) 胁迫下意蜂幼虫肠道内 ac115 的表达谱, 利用双荧光素酶报告基因试验验证 ac115 与 *ame-miR-13b* 的结合关系。通过饲喂特异性 siRNA 对蜜蜂球囊菌胁迫的意蜂幼虫肠道内 ac115 进行干扰, 进而检测干扰 ac115 对宿主免疫应答相关的 6 个基因表达量的影响。结果表明, ac115 的 BS 位点真实存在; 相较于未接种组, 蜜蜂球囊菌接种组 4 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量极显著上调 ( $P < 0.0001$ ), 5 和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 显著上调表达 ( $P < 0.05$ ); siRNA-circ\_000115 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的特异性条带亮度逐渐减弱, 而 siRNA-scramble 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的特异性条带亮度均较高且无明显变化; 与 siRNA-scramble 饲喂组相比, siRNA-circ\_000115 饲喂组 4 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量显著下调 ( $P < 0.05$ ), 5 和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量均极显著下调 ( $P < 0.001$ ); *ame-miR-13b* 在意

资助项目: 国家自然科学基金(31702190); 国家现代农业产业技术体系专项资助基金(CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金(2022J01131334); 福建省大学生创新创业训练计划项目(S202210389073, 202210389114, 202210389131)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31702190), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01131334), and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (S202210389073, 202210389114, 202210389131).

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

\*Corresponding author. E-mail: fafu\_ruiguoguo@126.com

Received: 2022-06-11; Accepted: 2022-08-29

蜂幼虫肠道内真实存在和表达; ac115 和 ame-miR-13b 之间存在真实的结合关系; 相比于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组 6 日龄幼虫肠道内抗菌肽基因 *hymenoptaecin* 和 *abaecin* 的表达量均显著上调( $P<0.05$ ), 而蜕皮激素受体(ecdysone receptor, *Ecr*)的表达量极显著下调( $P<0.01$ )。研究结果表明, ac115 在意蜂幼虫肠道内真实表达, ac115 中的 BS 位点真实存在, 饲喂 siRNA 的方式能实现意蜂幼虫肠道内 ac115 的有效干扰, ac115 通过吸附 ame-miR-13b 潜在调控 *Ecr* 表达, 通过非 ceRNA 的方式调控 *hymenoptaecin* 和 *abaecin* 表达进而参与宿主的免疫应答。  
关键词: ame\_circ\_000115; ame-miR-13b; 竞争性内源 RNA; 西方蜜蜂; 意大利蜜蜂; 蜜蜂球囊菌; 免疫应答

## Circular RNA ame\_circ\_000115 regulates expression of genes in larval guts of *Apis mellifera ligustica* stressed by *Ascosphaera apis*

YE Yaping<sup>1#</sup>, WANG Jie<sup>1#</sup>, ZHANG Jiixin<sup>1</sup>, ZHANG Kaiyao<sup>1</sup>, GU Xiaoyu<sup>1</sup>, YAO Yutong<sup>1</sup>, REN Zhongmin<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, CHEN Dafu<sup>1,2</sup>, GUO Rui<sup>1,2\*</sup>

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

2 Apitherapy Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** Circular RNAs (circRNAs) are a new class of non-coding RNAs, which have been confirmed to regulate insect gene expression and immune response through multiple manners such as competing endogenous RNA (ceRNA) regulatory network. Currently, function of circRNA in honey bee immune response remains unclear. In this study, PCR and Sanger sequencing were performed to validate the back splicing (BS) site of ame\_circ\_000115 (in short ac115). RT-qPCR was used to detect the expression profile of ac115 in larval guts of *Apis mellifera ligustica* stressed by *Ascosphaera apis*. Dual-luciferase reporter gene assay was conducted to verify the binding relationship between ac115 and ame-miR-13b. Interference of ac115 in larval guts was carried out by feeding specific siRNA, followed by determination of the effect of ac115 interference on expression of six genes relevant to host immune response. The results confirmed the existence of BS site within ac115. Compared with the un-inoculated group, the expression of ac115 in 4-day-old larval gut of the *A. apis*-inoculated group was up-regulated with extreme significance ( $P<0.0001$ ), while that in 5- and 6-day-old larval guts were significantly up-regulated ( $P<0.05$ ). The brightness of specific band for ac115 in 4-, 5- and 6-day-old larval guts of the siRNA-circ\_000115-fed group gradually became weak, whereas that of the siRNA-scrambl-fed group was pretty high without obvious variation. Compared with that of the siRNA-scramble-fed group, the expression of ac115 in 4-day-old larval gut of the siRNA-circ\_000115-fed group was significantly down-regulated ( $P<0.05$ ), whereas that of the 5- and 6-day-old larval guts were down-regulated with extreme significance ( $P<0.001$ ).

Ame-miR-13b was truly existed and expressed in *A. m. ligustica* larval guts, and there was true binding relationship between *ac115* and *ame-miR-13b*. Compared with that of the siRNA-scramble-fed group, the expression of antimicrobial peptide genes *hymenoptaecin* and *abaecin* in 6-day-old larval gut of the siRNA-circ\_000115-fed group was significantly up-regulated ( $P<0.05$ ), while that of ecdysone receptor (*Ecr*) was down-regulated with extreme significance ( $P<0.01$ ). These results indicate that *ac115* is truly expressed in *A. m. ligustica* larval guts, BS site truly exists within *ac115*, and effective interference of *ac115* in *A. m. ligustica* larval guts can be achieved via feeding siRNA. Moreover, *ac115* potentially regulates *Ecr* expression through adsorption of *ame-miR-13b* and expression of *hymenoptaecin* and *abaecin* using a non-ceRNA manner, further participating in host stress-response.

**Keywords:** *ame\_circ\_000115*; *ame-miR-13b*; competing endogenous RNA (ceRNA); *Apis mellifera*; *Apis mellifera ligustica*; *Ascospaera apis*; immune response

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是新近发现的一类非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 由前体 mRNA (pre-mRNA) 通过反向剪切形成, 具有特殊的共价闭合结构, 因缺少 5'帽子和 3'尾巴而耐受核酸外切酶消化。随着高通量测序技术和生物信息学的迅速发展, 人们已在果蝇 (*Drosophila*)<sup>[1-2]</sup>、家蚕 (*Bombyx mori*)<sup>[3-4]</sup> 和蚊子 (*Culicidae*)<sup>[5]</sup> 等昆虫中鉴定出大量 circRNA。近年来, 国内外学者对蜜蜂 circRNA 进行了一些研究, 发现 circRNA 可能参与调控蜜蜂的免疫应答<sup>[6]</sup>、肠道发育<sup>[7]</sup> 和卵巢激活<sup>[8]</sup> 等生物学过程。笔者团队前期利用链特异性建库的 RNA-seq 技术预测和分析了意大利蜜蜂以及中华蜜蜂工蜂中肠的 circRNA<sup>[9]</sup>。CircRNA 有多种发挥作用的方式, 包括调节来源基因转录, 作为“分子海绵”吸附 miRNA, 翻译蛋白或小肽等。目前, 竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 机制是 circRNA 发挥作用的主要机制之一, 在人类和小鼠等少数模式生物中被研究得较为深入<sup>[10-13]</sup>。昆虫 circRNA 的功能和作用机制研究较为滞后, 相关报道很少。Feng 等<sup>[14]</sup> 利用 RNAi 探究朱砂叶螨 (*Tetranychus cinnabarinus*) 对丁氟螨酯的抗性, 研究结果显示朱砂叶螨 circRNA

*circ1-3p* 通过竞争结合 miR-1-3p, 减少该 miRNA 与其靶基因 *TcGSTm04* 的结合, 证明了 circRNA 是通过 ceRNA 机制促进形成抗性调控通路; Zhang 等<sup>[15]</sup> 发现家蚕 BmNPV 病毒转录的 circRNA-vSP27 可以编码为 vSP27 进而激活家蚕的 NF- $\kappa$ B 信号通路。然而到目前为止, 蜜蜂 circRNA 的功能和作用机制研究仍然缺失。

意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂) 是西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 亚种之一, 具有蜜蜂群势强、蜂蜜产量高、分蜂性弱及区域分布广泛等优良性能, 在养蜂生产中广泛使用, 具有重要的生态、经济和研究价值<sup>[16]</sup>。蜜蜂球囊菌 (*Ascospaera apis*) 专性侵染蜜蜂幼虫导致白垩病, 严重影响蜂群群势和生产力, 给养蜂业造成较大损失。研究表明 circRNA 参与调控果蝇<sup>[17]</sup> 和家蚕<sup>[15]</sup> 等昆虫对病原胁迫的免疫应答。但 circRNA 是否及如何参与调节蜜蜂幼虫对蜜蜂球囊菌胁迫的免疫应答, 目前尚不清楚。

前期研究中, 笔者团队发现在蜜蜂球囊菌胁迫后期意蜂 6 日龄幼虫肠道内 *ame\_circ\_000115* (简称 *ac115*) 差异表达 [ $\log_2$  (FC)=0.99,  $P<0.001$ ] 且表达量较高 (AmCK3\_RPM=28 897.17, AmT3\_RPM=57 266.71) (未发表数据)。在此基础上, 本研究通过 PCR 和 Sanger 测序验证了

ac115 及其靶向 miRNA 的真实表达和存在, 利用双荧光素酶报告基因系统验证 ac115 与靶 miRNA 之间的结合关系, 进而通过饲喂跨反向剪切(back splicing, BS)位点的 siRNA 对蜜蜂球囊菌胁迫的意蜂幼虫 ac115 进行 RNAi, 并检测干扰 ac115 后宿主的免疫基因应答, 以期揭示 ac115 通过 miRNA 调节宿主免疫应答的作用机制, 并为意蜂幼虫-蜜蜂球囊菌的互作机制提供新见解。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试生物材料

意大利蜜蜂工蜂幼虫取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护课题组实验蜂群。蜜蜂球囊菌菌株由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护学实验室分离和保存<sup>[18]</sup>。

### 1.2 ac115 的 BS 位点的 PCR 扩增及 Sanger 测序

根据 ac115 的序列设计跨 BS 位点的背靠背扩增引物(表 1)。使用 RNA 抽提试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]提取 4 日龄幼虫肠道样品( $n=3$ )的总 RNA, 通过 RNase R 消化线性 RNA 后利用随机引物进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系(20  $\mu$ L)包括: PCR mix (擎科生物技术有限公司) 10  $\mu$ L, 背靠背扩增引物各 1  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, 无菌水 7  $\mu$ L。产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后用核酸电泳检测仪进行观察, 然后切胶回收目的片段, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。

### 1.3 蜜蜂球囊菌胁迫过程中宿主 ac115 的 RT-qPCR 检测

选取外观健康且群势较强的 3 群意蜂蜂群, 按照笔者所在团队已建立的技术流程进行幼虫的接种、饲养及肠道样品制备: (1) 用干净

的移虫针将 2 日龄幼虫( $n=96$ )小心移至已预置 50  $\mu$ L 饲料(蜂王浆 63%, 蜂蜜 6%, 酵母粉 1%, 无菌水 30%)的 48 孔细胞培养板, 每孔 1 头幼虫, 置于恒温恒湿箱, 在( $35\pm 0.5$ )  $^{\circ}$ C 和相对湿度(relative humidity, RH) 95%的条件下饲养 1 d; (2) 配制终浓度为  $1\times 10^7$  个/mL 的蜜蜂球囊菌孢子饲料; 接种组每头 3 日龄幼虫饲喂 50  $\mu$ L 含孢子的饲料, 24 h 后饲喂不含孢子的饲料; 未接种组 3 日龄幼虫始终饲喂 50  $\mu$ L 不含孢子的饲料; (3) 在超净台中用干净的眼科镊和眼科剪分别剖取接种组和未接种组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道, 每个日龄均剖取 3 只肠道, 置于 1 个 RNA-free EP 管, 经液氮速冻后至  $-80$   $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存备用。上述实验进行 3 次生物学重复。

使用 RNA 抽提试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]分别提取接种组和未接种组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道的总 RNA, RNase R 消化线性 RNA 后用随机引物进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板进行 ac115 的 qPCR 检测。同时利用 Oligo dT 和随机引物对未消化的总 RNA 进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板进行内参基因 *actin* (Gene ID: 406122)的 qPCR 检测。通过 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统 [Applied Biosystems (ABI)公司]检测 ac115 的相对表达量。反应体系和程序参照郭睿等<sup>[19]</sup>的报道进行设置。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 ac115 的相对表达量。通过 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图。采用 Student's *t* 检验分析实验数据。

### 1.4 ac115 的 RNAi 及效果检测

根据 ac115 序列设计背靠背位点的 siRNA (siRNA-circ\_000115)及与意蜂任何基因不存在靶向结合关系的阴性对照 siRNA (siRNA-scramble)。委托上海吉玛制药技术公司合成上

述 siRNA。按照 1.3 节的方法将 2 日龄幼虫移至预置饲料的 48 孔培养板孔内,在恒温恒湿箱中饲养;利用 50  $\mu\text{L}$  含 siRNA (1  $\mu\text{g}$ )的饲料饲喂 3 日龄幼虫,每隔 24 h 重新饲喂 50  $\mu\text{L}$  含 siRNA (1  $\mu\text{g}$ )的饲料,即每头 4 日龄幼虫摄入的 siRNA 共计 1  $\mu\text{g}$ ,每头 5 日龄幼虫摄入的 siRNA 共计 2  $\mu\text{g}$ ,每头 6 日龄幼虫摄入的 siRNA 共计 3  $\mu\text{g}$ 。

同时采用 PCR 和 RT-qPCR 检测 *ac115* 的 RNAi 效果,参照 1.2 节的方法剖取 siRNA-*circ\_000115* 饲喂组和 siRNA-scramble 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道,提取总 RNA 并消化线性 RNA,反转录及 PCR 扩增,产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后在核酸电泳检测仪下进行观察和拍照。按照 1.3 节的方法进行 siRNA-*circ\_000115* 饲喂组和 siRNA-scramble 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 *ac115* 的 RT-qPCR 检测,每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 *ac115* 的相对表达量,通过 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图,采用 Student's *t* 检验分析实验数据。

### 1.5 *ac115* 的靶 miRNA 预测与分析

本团队前期已利用 small RNA-seq (sRNA-seq)技术对意蜂工蜂 4、5 和 6 日龄幼虫肠道样品进行测序,分别得到 13 186 921、14 255 967 和 10 921 897 条有效读段,经质控得到 10 841 644、12 037 678 和 9 230 496 条高质量测序读段,占比分别为 82.22%、84.44%和 84.51%,各组内生物学重复间的 Pearson 相关系数均在 0.973 4 以上<sup>[20]</sup>。高质量的 sRNA-seq 数据可用于本研究中 *ac115* 的靶 miRNA 预测和分析。

参照郭睿等<sup>[21]</sup>的方法,联用 miRanda (v3.3a)、RNAhybrid (v2.1.2)+svm\_light (v6.01)与 TargetFind 软件预测 *ac115* 靶向的 miRNA,3 种软件均采用默认参数。根据靶向结合关系

构建 *ac115*-miRNA 调控网络,进而通过 Cytoscape 软件<sup>[22]</sup>对调控网络进行可视化。

### 1.6 *ame-miR-13b* 的 stem-loop RT-PCR 及 Sanger 测序

根据 *ame-miR-13b* 序列设计合成特异性 stem-loop 引物和上游引物及通用下游引物(表 1)。利用 RNA 抽提试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]提取 3 头意蜂 4 日龄幼虫肠道的总 RNA,使用 *ame-miR-13b* 的 stem-loop 引物进行反转录得到相应的 cDNA 模板。再利用上下游引物进行 PCR 扩增。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶后回收目标片段。按祝智威等<sup>[23]</sup>的方法进行目的片段的 TA 克隆与 Sanger 测序。

### 1.7 *ac115* 与 *ame-miR-13b* 结合关系的双荧光素酶报告基因系统验证

根据 *ame-miR-13b* 序列设计相应的模拟物 (Mimic-miR-13b),同时设计阴性对照 Mimic (Mimic-negative control, Mimic-NC)委托上海吉玛制药技术公司合成。根据软件预测出 *ac115* 与 *ame-miR-13b* 的潜在结合位点序列,并克隆进 pmirGLO 载体,命名为 pmirGLO-*ac115*-wt。同时设计合成上述结合位点的突变序列,并克隆进 pmirGLO 载体,命名为 pmirGLO-*ac115*-mut。将菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序,测序正确的菌液转接新鲜 LB 液体培养基。使用去内毒素质粒提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取质粒。

将 HEK-293T 细胞铺至 48 孔细胞培养板,然后放入 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱继续培养 24 h,使细胞密度达到 90%–95%。按照 Hieff Trans<sup>TM</sup> Liposomal Transfection Reagent 脂质体核酸转染试剂(上海翊圣生物科技有限公司)的说明书进行细胞转染实验,同时设置 4 个转染组:a 组: Mimic-miR-13b 与 pmirGLO-*ac115*-wt 共转染组;b 组:

Mimic-NC 与 pmirGLO-cir115-wt 共转染组; c 组: Mimic-miR-13b 与 pmirGLO-cir115-mut 共转染组; d 组 Mimic-NC 与 pmirGLO-cir115-mut 共转染组。每组转染 200 ng 质粒和 20 pmol Mimic-miR-13b (或 Mimic-NC)。转染完成后培养 24 h, 然后使用双荧光素酶检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)在 GloMax 化学发光检测仪上分别检测萤火虫荧光素酶及海肾荧光素酶的活力, 计算萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶的比值得到相对表达倍数。该实验进行 3 次重复。

### 1.8 ac115、ame-miR-13b 及靶 mRNA 调控网络构建及分析

联用 miRanda (v3.3a)、RNAhybrid (v2.1.2)+svm\_light (v6.01) 与 TargetFind 软件预测 ame-miR-13b 靶向的意蜂 mRNA (结合自由能  $< -21$  kcal/mol), 3 种软件均采用默认参数。根据 ac115 和 ame-miR-13b、ame-miR-13b 和靶 mRNA 的结合关系构建 ac115-ame-miR-13b-mRNA 调控网络, 再通过 Cytoscape 软件进行调控网络可视化。

### 1.9 宿主免疫应答相关基因的 RT-qPCR 检测

筛选出宿主免疫应答相关的 6 个基因进行 RT-qPCR 检测, 包括膜翅目抗菌肽基因 *hymenoptaecin*、蜂蛾抗菌肽基因 *abaecin*、防御素 1 基因 *defensin-1*、转录因子相关基因 *dorsal*、Toll 通路相关基因 *cactus* 及蜕皮激素受体基因 *Ecr*。根据上述基因序列设计合成相应的 qPCR 检测引物(表 1)。分别提取 1.4 节 siRNA-circ\_000115 饲喂组和 siRNA-scramble 饲喂组 6 日龄幼虫肠道的总 RNA, 使用 Oligo dT 引物和随机引物进行反转录, 将得到的 cDNA 作为模板, 利用上述 6 个基因的特异性上下游引物进行 qPCR 检测。反应体系和条件参照吴鹰等<sup>[24]</sup>的报

道进行设置。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算免疫基因的相对表达量。通过 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图。实验数据进行 Student's *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 ac115 的 BS 位点验证

背靠背引物扩增原理如图 1A 所示。利用背靠背引物对 ac115 进行 PCR 扩增, 产物琼脂糖电泳结果显示能够扩增出符合预期大小(约 100 bp)的目的片段(图 1B)。进一步的 Sanger 测序结果显示, 目的片段序列与二代测序结果完全一致且包含 BS 位点(图 1C)。上述结果证实了 ac115 表达和 BS 位点的真实性。

### 2.2 意蜂幼虫肠道内 ac115 在蜜蜂球囊菌胁迫过程的表达谱

RT-qPCR 结果显示相较于未接种组, 接种组 4 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量极显著上调 3.67 倍( $P < 0.0001$ ), 5 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量显著上调 5.09 倍( $P < 0.05$ ), 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量显著上调 2.16 倍( $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 2.3 ac115 的 RNAi 效果检测

PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示, siRNA-circ\_000115 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的特异性条带亮度逐渐减弱, 而 siRNA-scramble 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的特异性条带亮度均较高且无明显变化(图 3A)。RT-qPCR 结果显示相较于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组 4 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量显著下调( $P < 0.05$ ), 干扰效率为 35.17%; 5 日龄和 6 日龄幼虫肠道内 ac115 的表达量均极显著下调( $P < 0.001$ ), 干扰效率达到 71.50% 和 73.50% (图 3B)。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
siRNA-circ115-sense	UCCCAGAUAGACUAAUGAGTT	Detection of RNAi efficiency
siRNA-circ115-antisense	CUCAUUAGUCUAUCUGGGATT	
Negative-control-sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	Reverse transcription of <i>ame-miR-13b</i>
Negative-control-antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	
<i>ame-miR-13b</i> -stem-loop	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAATCGTCA	
Mimic-miR-13b-sense	UAUCACAGCCAUUUUUGACGAUU	Targeting relationship validation
Mimic-miR-13b-antisense	UCGUCAAAAAUGGCUGUGAUAAU	PCR and RT-qPCR
<i>ame_circ_000115</i> -F	TGTCCAACCACTTGTGGAAGAA	
<i>ame_circ_000115</i> -R	GCTGCTACGTTACTTGTTCATGG	RT-qPCR
<i>ame-miR-13b</i> -F	ACACTCCAGCTGGGTATCACAGCCATTT	
<i>ame-miR-13b</i> -R	CTCAACTGGTGTCTGGGA	
<i>hymenoptaecin</i> -F	ACATAGAAATCGATCAGCTC	
<i>hymenoptaecin</i> -R	AACCAACACGATGAATTTCA	
<i>abaecin</i> -F	AACCAACACGATGAATTTCA	
<i>abaecin</i> -R	TATTCTTTTTTCCGTTTTATG	
<i>defensin-1</i> -F	GTCAGACACTTCTCAGTCTT	
<i>defensin-1</i> -R	TCTCAAATGCTCAAGTGGCTC	
<i>dorsal</i> -F	CTTTTATGTCGCGTGCAAAT	
<i>dorsal</i> -R	CGTTCTGTGTTTCATTCTCTTG	
<i>cactus</i> -F	CCTGGACTGTCTGGATGGTT	
<i>cactus</i> -R	TGGCAAACCCTTTCTCAATC	
<i>ecdysone receptor</i> -F	GTGTCGTGTTGGCAGCCACT	
<i>ecdysone receptor</i> -R	CGACCACGCCAACCCCGGCG	
<i>actin</i> -F	CCTAGCACCATCCACCATGAA	
<i>actin</i> -R	GAAGCAAGAATTGACCCACCAA	

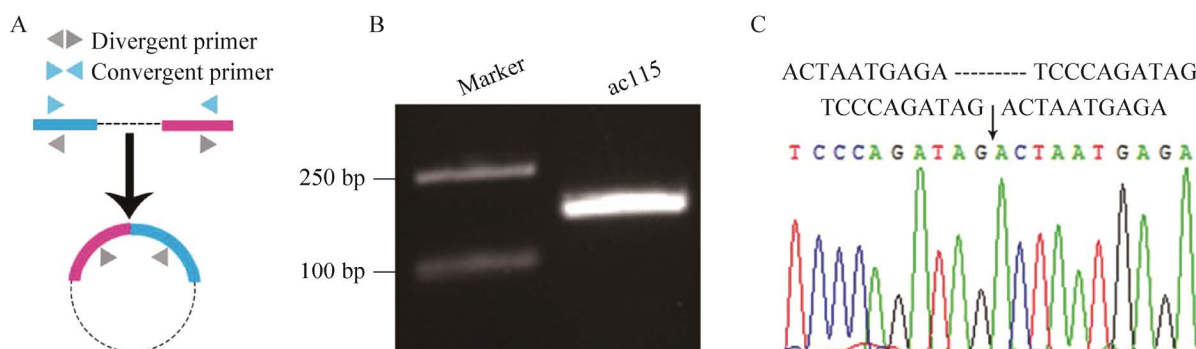
图 1 *ac115* 的 BS 位点验证

Figure 1 Validation of the BS site of *ac115*. A: Diagram of amplification with divergent primers. B: Agarose gel electrophoresis of PCR product. C: Sanger sequencing of target fragment; the black arrow indicates the BS site within *ac115*.

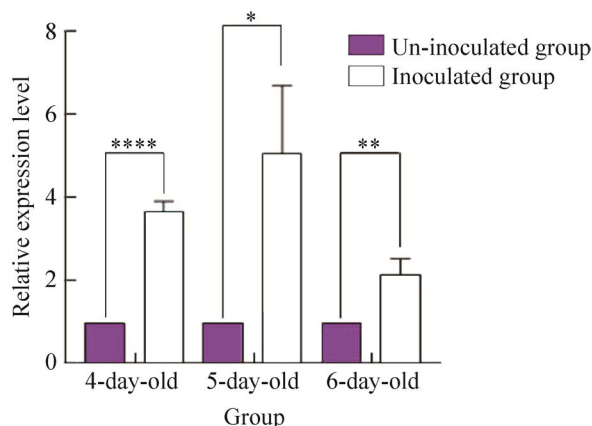


图2 蜜蜂球囊菌胁迫的意蜂4、5和6日龄幼虫肠道内AC115的相对表达量检测

Figure 2 Determination of relative expression of ac115 in 4-, 5-, and 6-day-old larval guts of *Apis mellifera ligustica* infected by *Ascospaera apis*. Data were subjected to Student's *t* test, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  and \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

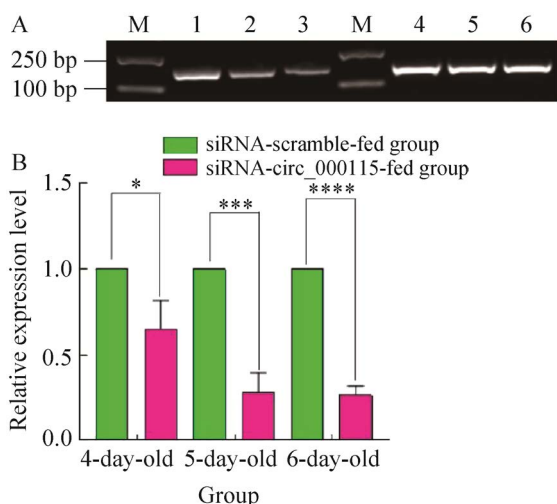


图3 饲喂siRNA后意蜂4、5和6日龄幼虫肠道内ac115的检测

Figure 3 Detection of ac115 in 4-, 5-, and 6-day-old larval guts of *Apis mellifera ligustica* after feeding siRNA. A: Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane M: DNA marker; lane 1-3: 4-, 5- and 6-day-old larval guts in siRNA-circ\_000115-fed group; lane 4-6: 4-, 5- and 6-day-old larval guts in siRNA-scramble-fed group. B: RT-qPCR determination of relative expression of ac115 in larval guts after feeding siRNA, \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  and \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

## 2.4 ac115的靶miRNA分析

ac115共靶向17个miRNA,包括ame-miR-10、ame-miR-1000、ame-miR-11、ame-miR-133、ame-miR-13a、ame-miR-13b、ame-miR-2、ame-miR-2944、ame-miR-3716a、ame-miR-3718a、ame-miR-3718c、ame-miR-3725、ame-miR-3762、ame-miR-6038、ame-miR-6039、ame-miR-9873和ame-miR-9896(图4)。鉴于笔者团队前期研究<sup>[25]</sup>发现,意蜂幼虫肠道内ame-miR-13b负调控靶基因表达,选择ac115靶向的ame-miR-13b进行后续实验。

## 2.5 ame-miR-13b的表达和序列验证

利用Stem-loop RT-PCR对ame-miR-13b进行扩增,琼脂糖电泳结果显示能够扩增出符合预期大小(约60 bp)的目的片段(图5A)。Sanger测序结果显示目的片段序列与sRNA-seq结果完全一致(图5B)。上述结果证实了ame-miR-13b表达和序列的真实性。

## 2.6 ac115与ame-miR-13b结合关系的验证

Sanger测序结果显示ac115-wt与ac115-mut序列分别被克隆进pmirGLO载体,获得重组质粒pmirGLO-cir115-wt和pmirGLO-cir115-mut。双荧光素酶报告基因系统检测结果显示,相比于Mimic-NC与pmirGLO-cir115-wt共转染组,Mimic-miR-13b与pmirGLO-cir115-wt共转染组的细胞荧光活性显著降低( $P < 0.01$ );相比于Mimic-NC与pmirGLO-cir115-mut质粒共转染组,Mimic-miR-13b与pmirGLO-cir115-mut质粒共转染组的细胞荧光活性无显著变化( $P > 0.05$ )(图6)。以上结果表明ac115与ame-miR-13b之间可能存在真实的结合关系。

## 2.7 ac115、ame-miR-13b及靶mRNA的调控网络分析

靶向预测结果显示,ame-miR-13b共靶向



91 条 mRNA。*ac115*、*ame-miR-13b* 及靶 mRNA 之间形成一个较为复杂的调控网络(图 7)。进一步分析发现 *ac115* 可通过靶向 *ame-miR-13b* 进而结合 Toll 信号通路上的基因 *dorsal* 和 *Ecr*。

## 2.8 干扰 *ac115* 对宿主响应蜜蜂球囊菌胁迫的相关基因表达量的影响

RT-qPCR 结果显示, 相较于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组中

的基因 *hymenoptaecin* 显著上调表达 1.60 倍 ( $P < 0.05$ ), 基因 *abaecin* 显著上调表达 1.68 倍 ( $P < 0.05$ ), 基因 *dorsal* 下调表达但组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 基因 *defensin-1* 上调表达但组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), siRNA-circ\_000115 饲喂组中的基因 *cactus* 下调表达但组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 基因 *Ecr* 极显著下调表达 0.48 倍 ( $P < 0.01$ ) (图 8)。

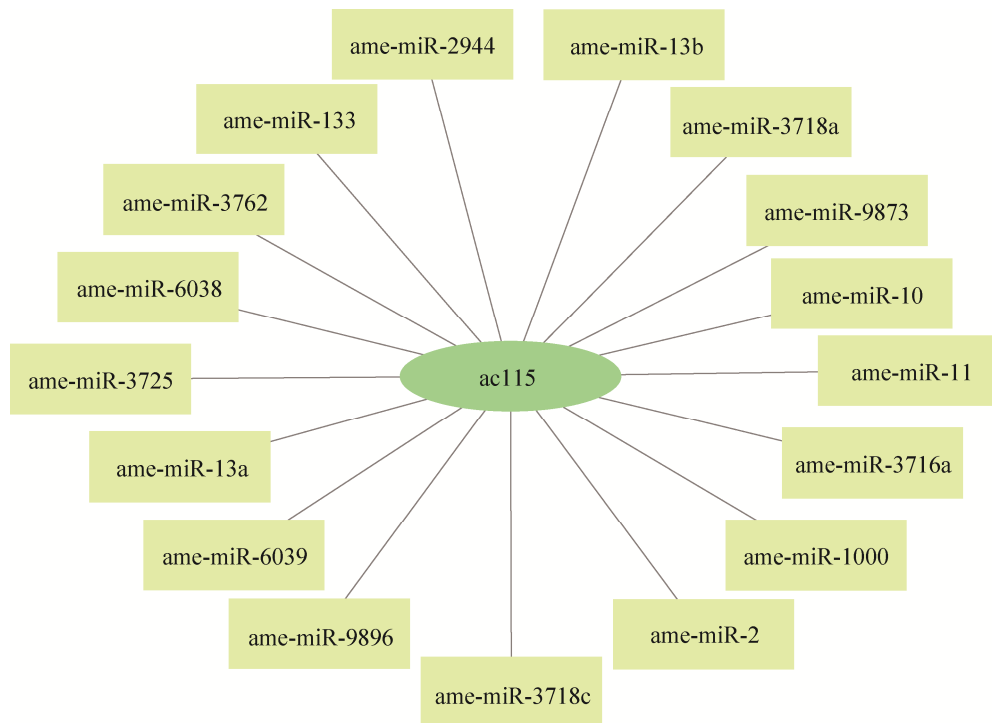


图 4 *ac115* 及其靶 miRNA 之间的调控网络

Figure 4 Regulatory network between *ac115* and its target miRNAs.

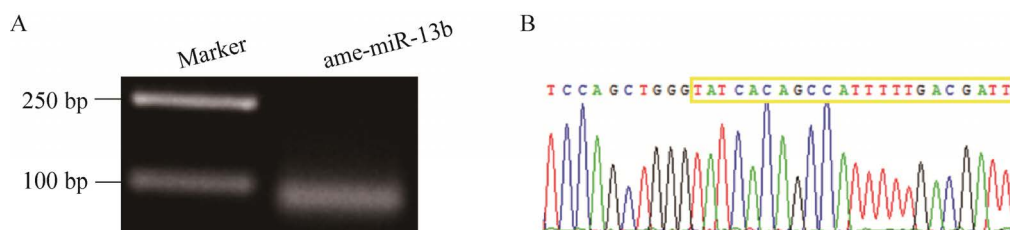


图 5 *ame-miR-13b* 的 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳(A)和 Sanger 测序(B)

Figure 5 Agarose gel electrophoresis (A) and Sanger sequencing (B) of PCR product from *ame-miR-13b*.

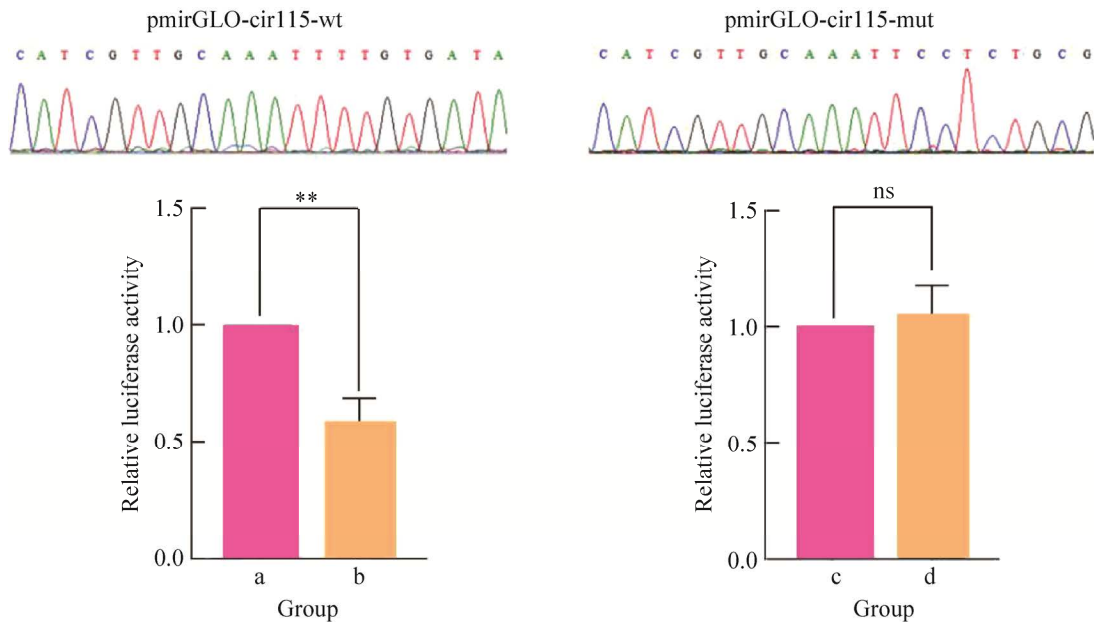


图6 ac115与ame-miR-13b结合关系的验证

Figure 6 Verification of the binding relationship between ac115 and ame-miR-13b. The upper panel is result of Sanger sequencing of binding site between ac115 and ame-miR-13b as well as the sequence of the mutated binding site. The lower panel is result of dual-luciferase reporter gene system, a: Co-transfected cells with Mimic-NC and pmirGLO-cir115-wt; b: Co-transfected cells with Mimic-miR-13b and pmirGLO-cir115-wt; c: Co-transfected cells with Mimic-NC and pmirGLO-cir115-mut; d: Co-transfected cells with Mimic-miR-13b and pmirGLO-cir115-mut; \*\*:  $P < 0.01$ ; ns:  $P > 0.01$ .

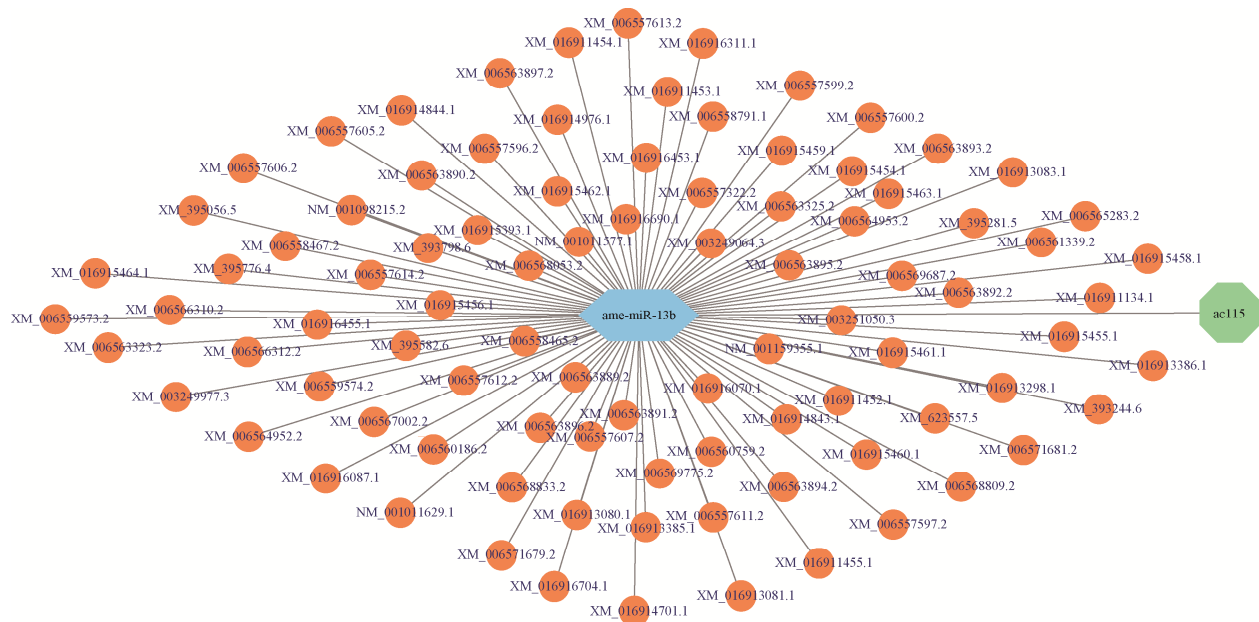


图7 ac115、ame-miR-13b及靶间的调控网络

Figure 7 Regulatory network among ac115, ame-miR-13b and target mRNAs.

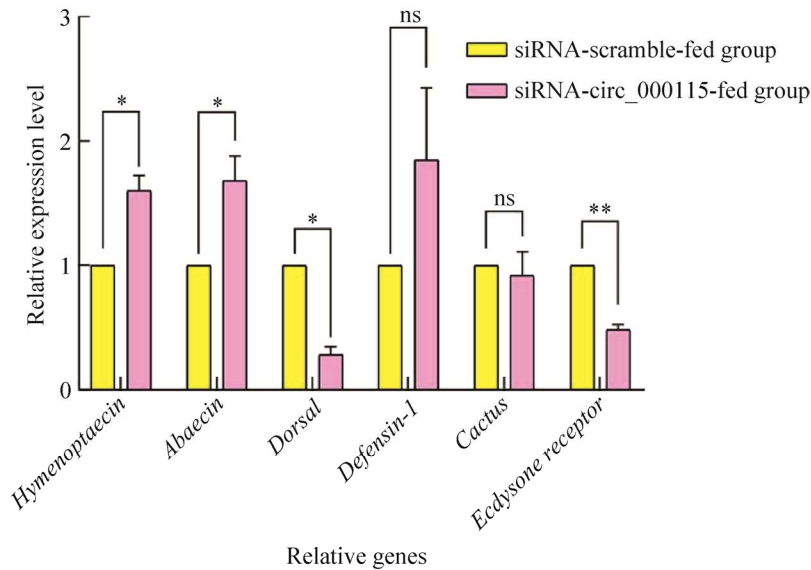


图 8 干扰 *ac115* 后意蜂 6 日龄幼虫响应蜜蜂球囊菌胁迫的相关基因相对表达量检测

Figure 8 Detection of relative expression of 6-day-old larval relative genes of *Apis mellifera ligustica* responding to the *Ascosphaera apis* infection after interference of *ac115*. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; ns:  $P > 0.01$ .

### 3 讨论与结论

目前, 蜜蜂的 circRNA 研究总体有限, 前人利用高通量测序技术和生物信息学预测出西方蜜蜂的大量 circRNA, 但经分子验证的西方蜜蜂 circRNA 仅有 2 条<sup>[26]</sup>。笔者团队前期利用分子生物学方法验证了 11 条意蜂 circRNA 的 BS 位点<sup>[27]</sup>。本研究中, PCR 和 Sanger 测序结果证实了 *ame\_circ\_000115* (简称 *ac115*) 的 BS 位点真实性(图 1), 说明 *ac115* 真实存在, 这为西方蜜蜂 circRNA 信息提供了有价值的补充。相比于未接种组, *ac115* 在蜜蜂球囊菌接种组 4 日龄幼虫肠道内表达量极显著上调, 在 5 和 6 日龄幼虫肠道内均显著上调(图 2), 暗示 *ac115* 参与宿主的胁迫应答。上述结果为持续深入开展 *ac115* 的功能和作用机制研究提供了依据。

CircRNA 的功能研究主要集中于人类等极少数模式生物, 昆虫的相关研究颇为滞后。前人通过饲喂或注射 siRNA 的方式成功实现

对朱砂叶螨和家蚕等昆虫 circRNA 的干扰, 例如 Feng 等<sup>[14]</sup>研究发现饲喂特异性的 siRNA-circ1-3p 后, 相较于 siGFP 饲喂组, siRNA-circ1-3p 饲喂组的朱砂叶螨体内的 *circ1-3p* 基因表达量显著性降低。蜜蜂 circRNA 的功能研究迄今尚无报道。本研究对蜜蜂球囊菌孢子接种后的意蜂幼虫连续饲喂 siRNA, 发现 siRNA-circ\_000115 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 *ac115* 的特异性条带亮度逐渐减弱, 而 siRNA-scramble 饲喂组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 *ac115* 的特异性条带亮度均较高且无明显变化(图 3A), 表明饲喂 siRNA-circ\_000115 干扰了 *ac115* 表达。此外, 还发现相较于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组 4 日龄幼虫肠道内 *ac115* 的表达量显著下调, 5 和 6 日龄幼虫肠道内 *ac115* 的表达量均极显著下调, 干扰效率分别达到 35.17%、71.50% 和 73.50% (图 3B), 且与朱砂叶螨 circRNA 的干扰效率相似<sup>[14]</sup>。值得注意的是, 本研究中 *ac115*

的干扰效率随着日龄增加而上升,表现出一定的累积效应。以上结果共同表明,通过饲喂 siRNA 的方法干扰意蜂幼虫肠道内的 circRNA 可行且高效。这是成功干扰蜜蜂 circRNA 的首例报道,为深入开展西方蜜蜂 circRNA 的功能研究提供了基础。

双荧光素酶报告基因系统是指以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶活性的一种技术,常用于验证核酸之间的互作。笔者团队前期研究发现 ac115 共靶向 17 个 miRNA (未发表数据)。本研究中,双荧光素酶报告基因试验结果证实 ac115 及其靶向的 ame-miR-13b 之间存在真实的结合关系(图 6),说明 ac115 可能作为 ceRNA 吸附 ame-miR-13b 进而发挥作用。

*Ecr* 被认为是调节节肢动物生长和发育的关键因子<sup>[28]</sup>。本研究发现相较于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组 6 日龄幼虫肠道内的 *Ecr* 基因极显著下调表达,与 ac115 的表达趋势一致,说明宿主通过 ac115 吸附 ame-miR-13b 进而调节基因 *Ecr* 表达。在昆虫中, Toll 信号通路参与对革兰氏阳性菌和真菌的免疫应答。*dorsal* 和 *cactus* 是 Toll 信号通路上的 2 个关键免疫基因。研究表明基因 *cactus* 在果蝇幼虫血细胞增殖和血细胞密度调节方面起到重要作用<sup>[29]</sup>。在西方蜜蜂中,基因 *dorsal* 在细胞核中能够促进特定抗菌肽 defensin-1 的合成与分泌<sup>[30]</sup>。本研究发现, ac115 与 *dorsal* 存在靶向关系,但与 *cactus* 之间无靶向关系;相较于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组 6 日龄幼虫肠道内的 *dorsal* 和 *cactus* 下调表达但组间差异均不显著(图 8),说明在宿主 ac115 不通过 ceRNA 机制调节 *dorsal* 表达进而响应蜜蜂球囊菌胁迫, ac115 也不影响 *cactus* 表达。

除了 ceRNA 机制, circRNA 还能通过调

控来源基因转录和编码蛋白或翻译产生多肽的方式发挥生物学功能<sup>[31]</sup>。本研究发现相较于 siRNA-scramble 饲喂组, siRNA-circ\_000115 饲喂组 6 日龄幼虫肠道内的 *hymenoptaecin* 和 *abaecin* 基因的表达量均显著上调, *defensin-1* 上调表达但组间差异不显著(图 8),表明干扰 ac115 显著影响抗菌肽基因 *hymenoptaecin* 和 *abaecin* 的表达。鉴于 ac115 与上述 3 个抗菌肽基因均无靶向关系,推测宿主通过 ac115 经 ceRNA 机制外的其他方式调节 *hymenoptaecin* 和 *abaecin* 表达进而对蜜蜂球囊菌胁迫进行免疫应答,这需要进一步深入研究。

综上所述, ac115 的 BS 位点真实存在,通过饲喂 siRNA 的方式能实现意蜂幼虫肠道内 ac115 的有效干扰, ac115 通过吸附 ame-miR-13b 潜在调控 *Ecr* 表达,通过非 ceRNA 的方式调控 *hymenoptaecin* 和 *abaecin* 表达进而参与宿主免疫应答。

## REFERENCES

- [1] WESTHOLM JO, MIURA P, OLSON S, SHENKER S, JOSEPH B, SANFILIPPO P, CELNIKER SE, GRAVELEY BR, LAI EC. Genome-wide analysis of *Drosophila* circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation[J]. Cell Reports, 2014, 9(5): 1966-1980.
- [2] WEIGELT CM, SEHGAL R, TAIN LS, CHENG J, EBER J, PAHL A, DIETERICH C, GRÖNKE S, PARTRIDGE L. An insulin-sensitive circular RNA that regulates lifespan in *Drosophila*[J]. Molecular Cell, 2020, 79(2): 268-279.e5.
- [3] GAN HY, FENG TS, WU YQ, LIU C, XIA QY, CHENG TC. Identification of circular RNA in the *Bombyx mori* silk gland[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 89: 97-106.
- [4] GAN HY, FENG TS, WU YQ, LIU C, XIA QY, CHENG TC. Circular transcriptome sequencing of the middle silk gland and posterior silk gland in the *Bombyx mori*[J]. Data in Brief, 2017, 15: 709-711.
- [5] LV Y, LI XX, ZHANG HB, ZOU FF, SHEN B. CircRNA expression profiles in deltamethrin-

- susceptible and-resistant *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 261: 110750.
- [6] HUANG MJ, DONG J, GUO HK, XIAO MH, WANG DQ. Identification of circular RNAs and corresponding regulatory networks reveals potential roles in the brains of honey bee workers exposed to dinotefuran[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 180: 104994.
- [7] 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[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 257-276.
- [8] 陈晓, 石巍. 蜜蜂繁殖性状编码 RNA 和非编码 RNA 的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(1): 45-51.
- CHEN X, SHI W. Research progress on coding RNAs and non-coding RNAs in reproductive traits of honey bees[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(1): 45-51 (in Chinese).
- [9] 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[J]. 昆虫学报, 2018, 61(12): 1363-1375.
- 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[J]. Acta Entomologica Sinica, 2018, 61(12): 1363-1375 (in Chinese).
- [10] QI XL, ZHANG DH, WU N, XIAO JH, WANG X, MA W. CeRNA in cancer: possible functions and clinical implications[J]. Journal of Medical Genetics, 2015, 52(10): 710-718.
- [11] BRAGA EA, FRIDMAN MV, MOSCOVTSEV AA, FILIPPOVA EA, DMITRIEV AA, KUSHLINSKII NE. LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(22): E8855.
- [12] CAO MJ, ZHANG LS, WANG JH, ZENG HL, PENG YQ, ZOU JL, SHI JM, ZHANG LW, LI Y, YOSHIDA S, TANG LS, ZHOU YD. Identifying circRNA-associated-ceRNA networks in retinal neovascularization in mice[J]. International Journal of Medical Sciences, 2019, 16(10): 1356-1365.
- [13] MENG XW, ZHANG PJ, CHEN Q, WANG JJ, CHEN M. Identification and characterization of ncRNA-associated ceRNA networks in *Arabidopsis* leaf development[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 607.
- [14] FENG KY, JIANG ZX, LIU PL, LIU J, WEN X, HE L. Circular RNA, *circ1-3p*, is involved in cyflumetofen resistance by acting as a competitive RNA against miR-1-3p in *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(4): 1068-1078.
- [15] ZHANG YS, ZHANG X, DAI K, ZHU M, LIANG Z, PAN J, ZHANG ZY, XUE RY, CAO GL, HU XL, GONG CL. *Bombyx mori* Akirin hijacks a viral peptide vSP27 encoded by BmCPV circRNA and activates the ROS-NF- $\kappa$ B pathway against viral infection[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 194: 223-232.
- [16] JENSEN AB, PALMER KA, BOOMSMA JJ, PEDERSEN BV. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in Northwest Europe[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(1): 93-106.
- [17] POIRIER EZ, GOIC B, TOMÉ-PODERTI L, FRANGEUL L, BOUSSIER J, GAUSSON V, BLANC H, VALLET T, LOYD H, LEVI LI, LANCIANO S, BARON C, MERKLING SH, LAMBRECHTS L, MIROUZE M, CARPENTER S, VIGNUZZI M, SALEH MC. Dicer-2-dependent generation of viral DNA from defective genomes of RNA viruses modulates antiviral immunity in insects[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 23(3): 353-365.e8.
- [18] 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[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(7): 1119-1128.
- DU Y, XIONG CL, SHI XL, ZHENG YZ, FU ZM, XU XJ, CHEN DF, GUO R. Transcriptome analysis of differentially expressed genes in *Ascospaera apis* stressing the 6-day-old larval gut of *Apis mellifera ligustica*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(7): 1119-1128 (in Chinese).
- [19] 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[J]. 中国农业科学, 2018, 51(23): 4575-4590.
- 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[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(23): 4575-4590 (in Chinese).
- [20] 郭睿, 杜宇, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 王海朋, 陈华枝, 耿四海, 周丁丁, 石彩云, 赵红霞, 陈大福. 意大利蜜蜂幼虫肠道发育过程中的差异表达 microRNA 及其调控网络[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(21): 4197-4209.
- GUO R, DU Y, XIONG CL, ZHENG YZ, FU ZM, XU GJ, WANG HP, CHEN HZ, GENG SH, ZHOU DD, SHI CY, ZHAO HX, CHEN DF. Differentially expressed microRNA and their regulation networks during the developmental process of *Apis mellifera ligustica* larval gut[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(21): 4197-4209 (in Chinese).
- [21] 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[J]. *昆虫学报*, 2019, 62(1): 49-60.
- 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[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62(1): 49-60 (in Chinese).
- [22] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT, RAMAGE D, AMIN N, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [23] 祝智威, 付中民, 隆琦, 杜宇, 张文德, 胡颖, 赵萧, 史小玉, 徐细建, 陈大福, 郭睿. 三种微小 RNA 在意大利蜜蜂工蜂蛹期发育过程中的表达谱及潜在功能[J]. *昆虫学报*, 2022, 65(1): 53-62.
- ZHU ZW, FU ZM, LONG Q, DU Y, ZHANG WD, HU Y, ZHAO X, SHI XY, XU XJ, CHEN DF, GUO R. Expression profiles and potential function of three miRNAs during the pupal development process of *Apis mellifera ligustica* worker[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65(1): 53-62 (in Chinese).
- [24] 吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加珺, 张文德, 余岢骏, 吉挺, 蒯哲广, 赵红霞, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-12220 及其靶基因的表达谱[J]. *菌物学报*, 2022, 41(10): 1546-1557.
- WU Y, YE YP, ZHANG JX, QIAN JJ, ZHANG WD, YU KJ, JI T, LIN ZG, ZHAO HX, CHEN DF, GUO R. Expression profiles of nce-miR-12220 and its target genes during the *Nosema ceranae* infection process of *Apis mellifera ligustica* workers[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(10): 1546-1557 (in Chinese).
- [25] 祝智威, 王杰, 隆琦, 许雅静, 冯睿蓉, 刘佳美, 赵浩东, 朱乐冉, 侯海青, 陈大福, 郭睿. 过表达和敲减 ame-miR-13b 对意大利蜜蜂幼虫肠道内基因表达的影响[J]. *昆虫学报*, 2022, 65(4): 460-468.
- ZHU ZW, WANG J, LONG Q, XU YJ, FENG RR, LIU JM, ZHAO HD, ZHU LR, HOU HQ, CHEN DF, GUO R. Impact of overexpression and knockdown of ame-miR-13b on the expression of genes in larval gut of *Apis mellifera ligustica*[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022, 65(4): 460-468 (in Chinese).
- [26] THÖLKEN C, THAMM M, ERBACHER C, LECHNER M. Sequence and structural properties of circular RNAs in the brain of nurse and forager honeybees (*Apis mellifera*)[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 88.
- [27] CHEN HZ, DU Y, ZHU ZW, WANG J, ZHOU DD, FAN YC, JIANG HB, FAN XX, XIONG CL, ZHENG YZ, CHEN DF, GUO R. Deciphering the mechanism underlying circRNA-mediated immune responses of western honeybees to *Nosema ceranae* infection[J]. *bioRxiv*, 2020, DOI:10.1101/2020.10.25.353938.
- [28] HUANG S, YI QL, LIAN XY, XU SQ, YANG CY, SUN JJ, WANG LL, SONG LS. The involvement of ecdysone and ecdysone receptor in regulating the expression of antimicrobial peptides in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 111: 103757.
- [29] QIU P, PAN PC, GOVIND S. A role for the *Drosophila* Toll/cactus pathway in larval hematopoiesis[J]. *Development*, 1998, 125(10): 1909-1920.
- [30] LOURENÇO AP, FLORECKI MM, SIMÕES ZLP, EVANS JD. Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1[J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27(5): 577-589.
- [31] LI X, YANG L, CHEN LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(3): 428-442.

(本文责编 陈宏宇)