

东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意大利蜜蜂工蜂的 piRNA 差异表达谱及潜在功能

许雅静¹, 孙明会¹, 刘佳美¹, 郭意龙¹, 胡颖¹, 张佳欣¹,
赵萧¹, 张凯遥¹, 熊翠玲¹, 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, 福州 350002; 2. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

摘要: 为探究东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)胁迫下意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)工蜂的 piRNA 差异表达谱及潜在功能, 本研究利用前期获得的东方蜜蜂微孢子虫接种 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠(AmT1 组和 AmT2 组)及未接种工蜂中肠(AmCK1 组和 AmCK2 组)转录组数据筛选出宿主响应胁迫的差异表达 piRNA(Differentially expressed piRNA, DEpiRNA), 并通过相关软件预测和分析 DEpiRNA 的靶 mRNA, 进而利用 Stem-loop RT-PCR 和 qPCR 对随机选取的 DEpiRNA 进行验证. 结果显示在 AmCK1 vs AmT1 和 AmCK2 vs AmT2 比较组分别筛选出 50 和 207 个 DEpiRNA; 上述两个比较组共有的 DEpiRNA 为 10 个, 特有的 DEpiRNA 分别为 40 和 197 个; 共有的 DEpiRNA piR-ame-1128833 可靶向 3021 条 mRNA; Stem-loop RT-PCR 验证结果显示 4 个 DEpiRNA 均真实表达; qPCR 结果显示 4 个 DEpiRNA 的表达趋势与测序数据中的表达趋势一致. 研究结果揭示了东方蜜蜂微孢子虫胁迫引起意蜂工蜂中肠 piRNA 表达谱的改变; DEpiRNA 可通过靶向相关 mRNA 潜在调控宿主对东方蜜蜂微孢子虫胁迫的响应.

关键词: 意大利蜜蜂; 东方蜜蜂微孢子虫; 胁迫响应; piRNA; 调控网络

中图分类号: S891 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.036004

Differential expression profiles and potential function of piRNAs in *Apis mellifera ligustica* workers under *Nosema ceranae* stress

XU Ya-Jing¹, SUN Ming-Hui¹, LIU Jia-Mei¹, GUO Yi-Long¹, HU Ying¹, ZHANG Jia-Xin¹,
ZHAO Xiao¹, ZHANG Kai-Yao¹, XIONG Cui-Ling¹, CHEN Da-Fu^{1,2}, GUO Rui^{1,2}

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Apitherapy Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To explore the differential expression profile and potential function of piRNAs in *Apis mellifera ligustica* workers under *Nosema ceranae* stress, the differentially expressed piRNA (DEpiRNAs) in the host response to stress were screened out by using previously obtained transcriptome data from *A. m. ligustica* workers' midguts at 7 days post inoculation (dpi) and 10 dpi (AmT1 and AmT2 groups) as well as corresponding un-inoculated workers' midguts (AmCK1 and AmCK2 groups), followed by prediction and investigation of target mRNAs of DEpiRNAs with relevant software, and randomly selected

收稿日期: 2021-12-25
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172792); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建农林大学杰出青年科研人才计划项目(xjq201814); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿)
作者简介: 许雅静(1998-), 女, 福建莆田人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学. E-mail: xxuyajing@163.com
通讯作者: 郭睿. E-mail: fafu_ruiguo@126.com

DEpiRNAs were further validated by Stem-loop RT-PCR and qPCR. The results showed that 50 and 207 DEpiRNAs were screened out from AmCK1 vs AmT1 and AmCK2 vs AmT2 comparison groups, respectively; there are 10 common DEpiRNAs shared by the aforementioned two comparison groups, and the numbers of unique DEpiRNAs were 40 and 197, respectively; the consensus DEpiRNA piR-ame-1128833 can target 3021 mRNAs; Stem-loop RT-PCR result confirmed the true expression of four DEpiRNAs; RT-qPCR result verified that the expression trend of four DEpiRNAs was in accordance with that in the sequencing data. These results reveal that the expression pattern of piRNAs in the midguts of *A. m. ligustica* workers was altered due to *N. ceranae* stress. DEpiRNA potentially regulated host response to *N. ceranae* stress through targeting associated mRNAs.

Keywords: *Apis mellifera ligustica*; *Nosema ceranae*; Response to stress; piRNA; Regulatory network

1 引言

意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)作为西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的亚种之一,在我国和其他国家的养蜂生产中广泛使用,具有重要的生态和经济价值^[1]. 蜜蜂是一种真社会性昆虫,因群居性而易遭受细菌、真菌和病毒等病原微生物的侵袭^[1]. 东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)是一种专性侵染成年蜜蜂中肠上皮细胞的真菌病原,对蜂王、工蜂、雄蜂及蜜蜂幼虫均具有侵染性,导致的蜜蜂微孢子虫病严重危害蜜蜂健康并影响养蜂业的可持续发展^[2]. 东方蜜蜂微孢子虫侵染可对蜜蜂宿主造成诸多不良影响,包括能量胁迫、免疫抑制、细胞凋亡抑制、中肠上皮细胞结构破坏及寿命缩短等^[3].

非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)起初被认为不具有蛋白编码能力和生物学功能,是基因转录过程的“噪音”和“副产物”,但随着技术手段的不断进步和相关研究的持续深入,ncRNA 被证实许多生物学过程中起到关键作用^[4]. 根据长度,ncRNA 可分为长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和小 ncRNA,后者又包括微小 RNA(microRNA, miRNA)、小干扰 RNA(Small interfering RNA, siRNA)和 PIWI 蛋白互作 RNA(PIWI-interacting RNA, piRNA)等. 成熟 piRNA 的长度一般介于 26~30 nt,与 miRNA(20~24 nt)和 siRNA(21~25 nt)的长度相近^[5]. 在真核生物中,piRNA 能参与控制转座子的活性及维持基因组的稳定性^[6]. 此外,有研究表明 piRNA 通过与靶 mRNA 的碱基互补配对发挥基因表达调控作用^[7]. PIWI 蛋白最早在果蝇(*Drosophila melanogaster*)体内被发现,并被证实参与了果蝇种系干细胞的维持和自我更新^[8]. 随着深度测序技术的兴

起与发展,人们在哺乳动物^[9]、昆虫^[10]和鱼类^[11]等物种中均陆续鉴定出 piRNA. 与人和果蝇等少数模式生物相比,昆虫的 piRNA 研究较为滞后,迄今仅在果蝇^[12]、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)^[13]和蜜蜂^[5]等少数昆虫中有过相关报道. Jones 等人^[14]研究表明 piRNA 途径可能在维持果蝇基因组完整性、组织功能、代谢稳态和免疫防御方面起到一定作用. Guo 等通过过表达和敲减 piRNA-3312 发现 piRNA-3312 可靶向结合肠道酯酶 1 基因进而负调控淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 对拟除虫菊酯的抗性^[15].

目前,关于 piRNA 参与蜜蜂宿主与病原互作的研究未见报道;东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意蜂工蜂的 piRNA 应答研究仍然缺失. 本研究拟基于已获得的 small RNA(sRNA)组学数据对东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意蜂工蜂中肠的 DEpiRNA 进行筛选、分析和验证,进而对 DEpiRNA 进行靶向预测及分析,以期解析意蜂工蜂中肠响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的 piRNA 差异表达谱及调控网络,并揭示 DEpiRNA 调控宿主应答的潜在作用.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 供试蜜蜂及微孢子虫 意蜂工蜂取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)教学蜂场的实验蜂群. 东方蜜蜂微孢子虫孢子由福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护实验室纯化和保存^[16].

2.1.2 sRNA 组学数据来源 前期研究中,笔者所在团队已利用 small RNA-seq(sRNA-seq)技术对东方蜜蜂微孢子虫胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠(AmT1 和 AmT2)及未受胁迫的工蜂中肠(AmCK1 和 AmCK2)进行测序,共测得 16 589

574 条原始读段(raw reads), 过滤后得到 132 028 990 条有效读段(clean reads), 各组中 clean reads 占比均达到 77.04% 及以上; AmCK1、AmT1、AmCK2 和 AmT2 组内 3 个不同生物学重复之间的 Pearson 相关性系数分别达到 99.93%、87.92%、99.67% 和 91.14%^[17]. 高质量的 sRNA-seq 组学数据可为本研究中 piRNA 的差异表达及调控网络分析提供可靠的数据基础.

2.2 方法

2.2.1 DEpiRNA 的筛选与分析 根据 edgeR 软件(<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>)对 AmCK1 vs AmT1 和 AmCK2 vs AmT2 比较组中的 DEpiRNA 进行筛选, 筛选标准为 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$ ($|\log_2 \text{FC}| \geq 1$) 且 $P \leq 0.05$, 其余采用软件默认参数. 利用基迪奥在线云平台(www.omicshare.com)的相关工具对上述两个比较组中的 DEpiRNA 进行 Venn 分析, 采用默认参数.

2.2.2 DEpiRNA 的靶 mRNA 预测与分析 参照杜宇等^[18]的方法, 利用 TargetFinder 软件^[19]对 DEpiRNA 进行靶向预测. 通过 BLAST 工具将靶 mRNA 比对到 GO 数据库(<https://www.geneontology.org>)和 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)以获得相应的功能和通路注释. 最后利用 Cytoscape 软件^[20]分别对上述两个比较组中的 DEpiRNA 及其靶 mRNA、共有 DEpiRNA 及其靶 mRNA 的调控网络进行可视化. 均采用默认参数.

2.2.3 DEpiRNA 的 Stem-loop RT-PCR 与 qPCR 验证 利用 FastPure[®] Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 (Vazyme 公司, 中国) 分别提取意蜂 7 日龄和 10 日龄工蜂中肠样品的总 RNA. 利用超微量分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定 RNA 质量. 从上述两个比较组中随机选取 4 个 DEpiRNA (piR-ame-967173、piR-ame-459976、piR-ame-779990、piR-ame-104429) 进行验证. 根据上述 piRNA 的核酸序列设计相应的特异性 Stem-loop 引物和上游引物(F)以及通用下游引物(R), 委托上海生物工程有限公司合成引物(附表 1). 参照 HiScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书利用 Stem-loop 引物反转录合成 cDNA 作为 piRNA 的 PCR 模板; 利用随机引物和 oligo (dT) 引物进行常规反转录, 合成的 cDNA 作为内参基因 snRNA U6 的 PCR 模板.

PCR 体系(20 μL)包括: 10 μL PCR mix(南京诺唯赞, 中国), 1 μL 上游引物(F)、1 μL 通用下游引物(R)、1 μL cDNA 模板以及 7 μL DEPC 处理水. PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环. 产物经 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测. 采用凝胶图像成像分析系统(上海培清, 中国)进行凝胶观察和拍照.

参照笔者所在团队前期已建立的方法^[18]对上述 4 个 DEpiRNA 进行 qPCR 验证. 利用 Stem-loop 引物进行反转录得到相应的 cDNA, 作为模板进行 qPCR 反应. 反应按照 SYBR Green Dye 试剂盒(Vazyme 公司, 中国)操作说明书进行. 反应体系(20 μL)包含: SYBR Green Dye 10 μL , cDNA 模板 1.3 μL , 正、反向引物各 1 μL , DEPC 水 6.7 μL . 反应在 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)上进行, 程序设置为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 共 40 个循环. 每个反应进行 3 次技术重复. 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 DEpiRNA 相对表达量. 最后利用 Graph Prism 7 软件对 qPCR 数据进行 student's t 检验, 并计算组间差异显著性及绘图, 采用默认参数.

3 结果与分析

3.1 东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意蜂工蜂中肠的 piRNA 差异表达谱

差异表达分析结果显示, AmCK1 vs AmT1 比较组包含 50 个 DEpiRNA, 上调 piRNA 和下调 piRNA 的数量分别为 46 和 4 个; 其中上调倍数最高的是 piR-ame-1207641 ($\log_2 \text{FC} = 16.81$, $P = 6.37\text{E}-9$), 其次是 piR-ame-500944 ($\log_2 \text{FC} = 13.13$, $P = 4.45\text{E}-6$) 和 piR-ame-748814 ($\log_2 \text{FC} = 12.49$, $P = 5.14\text{E}-7$); 下调倍数最高的是 piR-ame-1221425 ($\log_2 \text{FC} = -19.97$, $P = 0.0001$), 其次是 piR-ame-1182394 ($\log_2 \text{FC} = -19.65$, $P = 0.0001$) 和 piR-ame-1219424 ($\log_2 \text{FC} = -17.26$, $P = 0.0002$). AmCK2 vs AmT2 比较组包含 207 个 DEpiRNA, 上调 piRNA 和下调 piRNA 的数量分别为 56 和 151 个; 其中上调倍数最高的是 piR-ame-1008436 ($\log_2 \text{FC} = 15.01$, $P = 3.11\text{E}-7$), 其次是 piR-ame-771408 ($\log_2 \text{FC} = 15.01$, $P = 3.11\text{E}-7$) 和 piR-ame-716466 ($\log_2 \text{FC} = 14.95$, $P = 5.36\text{E}-7$); 下调倍数最高的是 piR-ame-706008 ($\log_2 \text{FC} = -14.46$, $P = 7.49\text{E}-6$), 其次是 piR-ame-634882 ($\log_2 \text{FC} = -14.09$, $P = 9.88\text{E}-7$) 和

piR-ame-1253391(log₂FC=−13.96, *P*=3.08E−5). Venn 分析结果显示,上述两个比较组的共有 DEpiRNA 为 10 个(表 1),特有 DEpiRNA 分别为 40 和 197 个.

表 1 东方蜜蜂微孢子虫胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠共有 DEpiRNA 的详细信息

Tab. 1 Detailed information about the shared DEpiRNAs by *A. m. ligustica* workers' midguts at 7 d and 10 d post *N. ceranae* stress

piRNA ID	长度/bp	序列	Am7 组中的 TPM 值	Am10 组中的 TPM 值
piR-ame-1101004	26	CTCGGTAGTATAGTGGTCAGTATCCC	2426.89	865.88
piR-ame-1128833	24	AATTGGATCCGTAACCTTCGGAATA	573.22	573.22
piR-ame-1179286	29	TGCGATCTGTTGAGACTCAGCCCTGCGCC	4475.63	2472.71
piR-ame-1180625	34	TGCGATCTGTTGAGACTCAGCCCTGCGCCAGGTG	4475.63	2472.71
piR-ame-1232308	29	TGAGATTAGCGGAACGCTCTGGAAAGTGC	65 645.86	23 4969.4
piR-ame-44002	27	TGTCAAAGAATAACGCAGGTGTCCTAA	824.79	447.23
piR-ame-506650	28	CTAAGGCCAGCTCAGCGAGGACAGAAAC	1281.67	786.37
piR-ame-568512	29	GGGAGTTTGA CTGGGGCGGTACATCTGTC	1261.13	974.66
piR-ame-613889	28	ATGAATGGATTAACGAGATTCCC ACTGT	217.86	98.75
piR-ame-962854	26	ATGAATGGATTAACGAGATTCCC ACT	202.13	98.75

3.2 东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意蜂工蜂中肠 DEpiRNA 的靶 mRNA 预测及注释

靶向预测结果显示,AmCK1 vs AmT1 比较组中 piR-ame-748814、piR-ame-762269、piR-ame-1128833、piR-ame-175077 可分别靶向 2035、927、3021 和 1273 条 mRNA;AmCK2 vs AmT2 比较组中 piR-ame-1048676、piR-ame-1055898、piR-ame-11093、piR-ame-1128833、piR-ame-165683、piR-ame-190949、piR-ame-202265、piR-ame-471566、piR-ame-503081、piR-ame-630674、piR-ame-706008、piR-ame-742536、piR-ame-797627、piR-ame-932156 可分别靶向 1290、631、1195、3021、3549、4040、1152、2583、512、4935、1297、3191、593、1163 条 mRNA.

GO 数据库注释结果显示,AmCK1 vs AmT1 比较组中 DEpiRNA 的靶 mRNA 可注释到细胞进程(1381)和代谢进程(1214)等 18 个生物学进程相关条目,细胞器(503)和细胞(687)等 16 个细胞组分相关条目,结合(1509)和转运活性(161)等 11 个分子功能相关条目(图 1a);AmCK2 vs AmT2 比较组中 DEpiRNA 的靶 mRNA 可注释到细胞进程(3744)和生物学调控(1087)等 19 个生物学进程相关条目,细胞膜组件(1529)和细胞膜(1581)等 17 个细胞组分相关条目,信号转导活性(417)和结构分子活性(76)等 11 个分子功能相关条目(图 1b). 括号内的数字代表注释在该条目的靶 mRNA

数目.

KEGG 数据库注释结果显示,AmCK1 vs AmT1 比较组中 DEpiRNA 的靶 mRNA 共注释到 117 条代谢通路,包括 Jak-STAT(6)、磷脂酰肌醇信号系统(46)、Wnt 信号通路(42)、mTOR 信号通路(9)、氨基酸代谢(10)、碳水化合物代谢(14)及脂质代谢(10)等(图 2a);AmCK2 vs AmT2 比较组中 DEpiRNA 的靶 mRNA 共注释到 140 条代谢通路,包括 Wnt 信号通路(117)、FoxO 信号通路(82)、MAPK 信号通路(26)、氨基酸代谢(13)、碳水化合物代谢(14)及辅助因子和维生素代谢(12)等(图 2b). 括号内的数字代表注释在该通路的靶 mRNA 数目.

3.3 东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意蜂工蜂中肠 DEpiRNA 及其靶 mRNA 的调控网络

调控网络分析结果显示,AmCK1 vs AmT1 比较组中同一个 DEpiRNA 可靶向多个 mRNA,如 piR-ame-748814 可靶向多达 2035 个 mRNA;此外,部分 mRNA 可被 1~2 个 DEpiRNA 靶向结合,如 NM_001014992.1 可被 piR-ame-1128833 和 piR-ame-175077 共同靶向结合,NM_001040233.1 可被 piR-ame-762269 和 piR-ame-175077 共同靶向结合(图 3a). 类似地,AmCK2 vs AmT2 比较组中也存在同一个 DEpiRNA 靶向多个 mRNA、部分 mRNA 被多个 DEpiRNA 靶向结合的现象(图 3b).

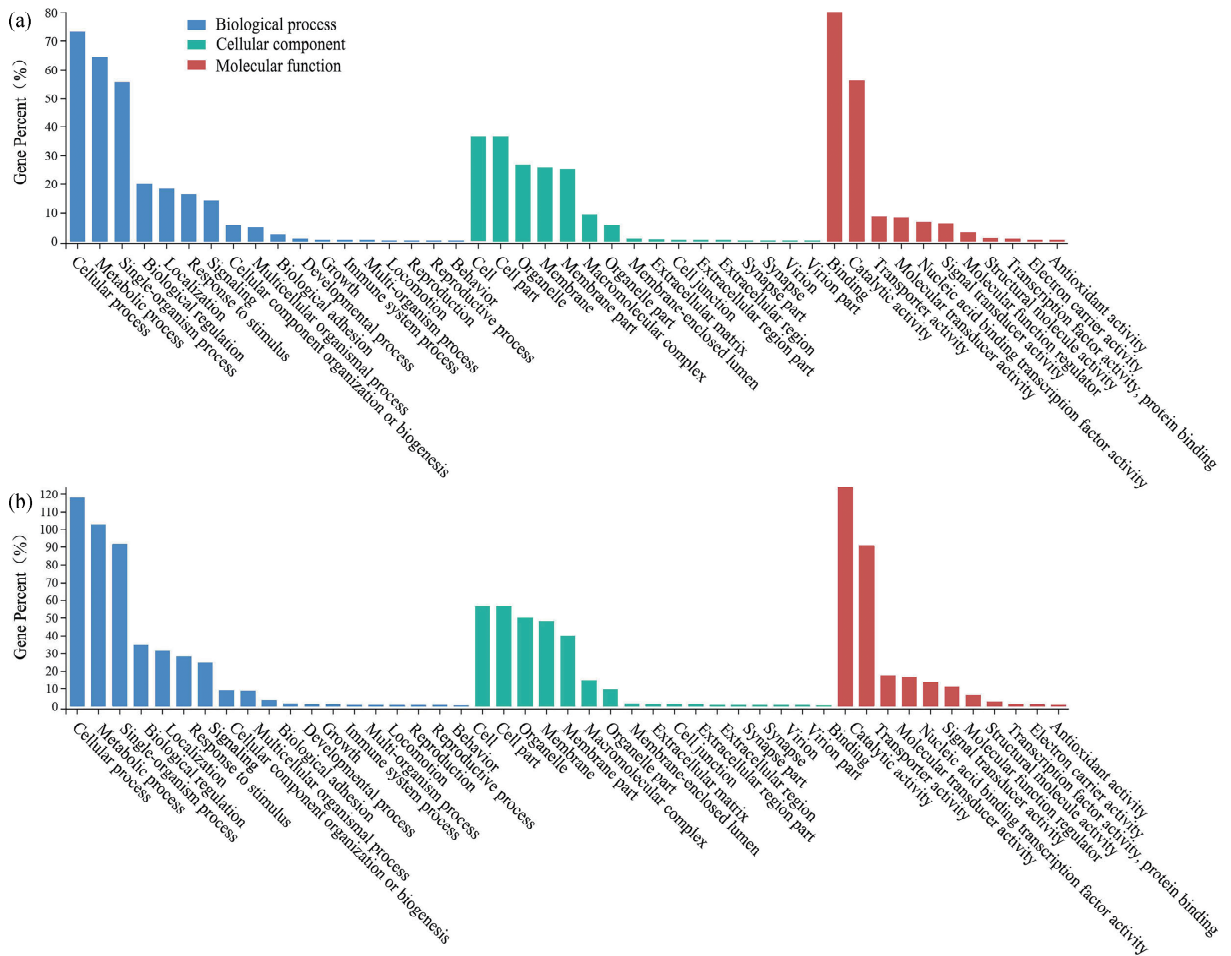


图1 AmCK1 vs AmT1 (a)和 AmCK2 vs AmT2 (b)比较组 DEpiRNA 的靶 mRNA 的 GO 数据库注释

Fig.1 GO database annotation of mRNAs targeted by DEpiRNAs in AmCK1 vs AmT1 (a) and AmCK2 vs AmT2 (b) comparison groups

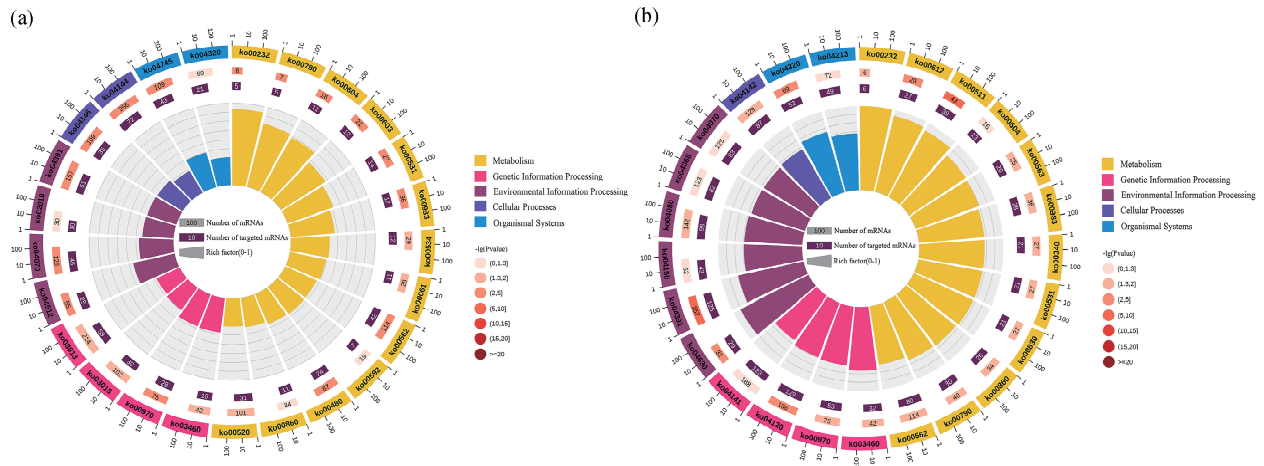


图 2 AmCK1 vs AmT1 (a)和 AmCK2 vs AmT2 (b)比较组 DEpiRNA 的靶 mRNA 的 KEGG 数据库注释
圈图最外侧的数字代表基因数目的坐标尺

Fig. 2 KEGG database annotation of mRNAs targeted by DEpiRNAs in AmCK1 vs AmT1 (a) and AmCK2 vs AmT2 (b) comparison groups

Values outermost the loop graphs represent the coordinatometer of gene number

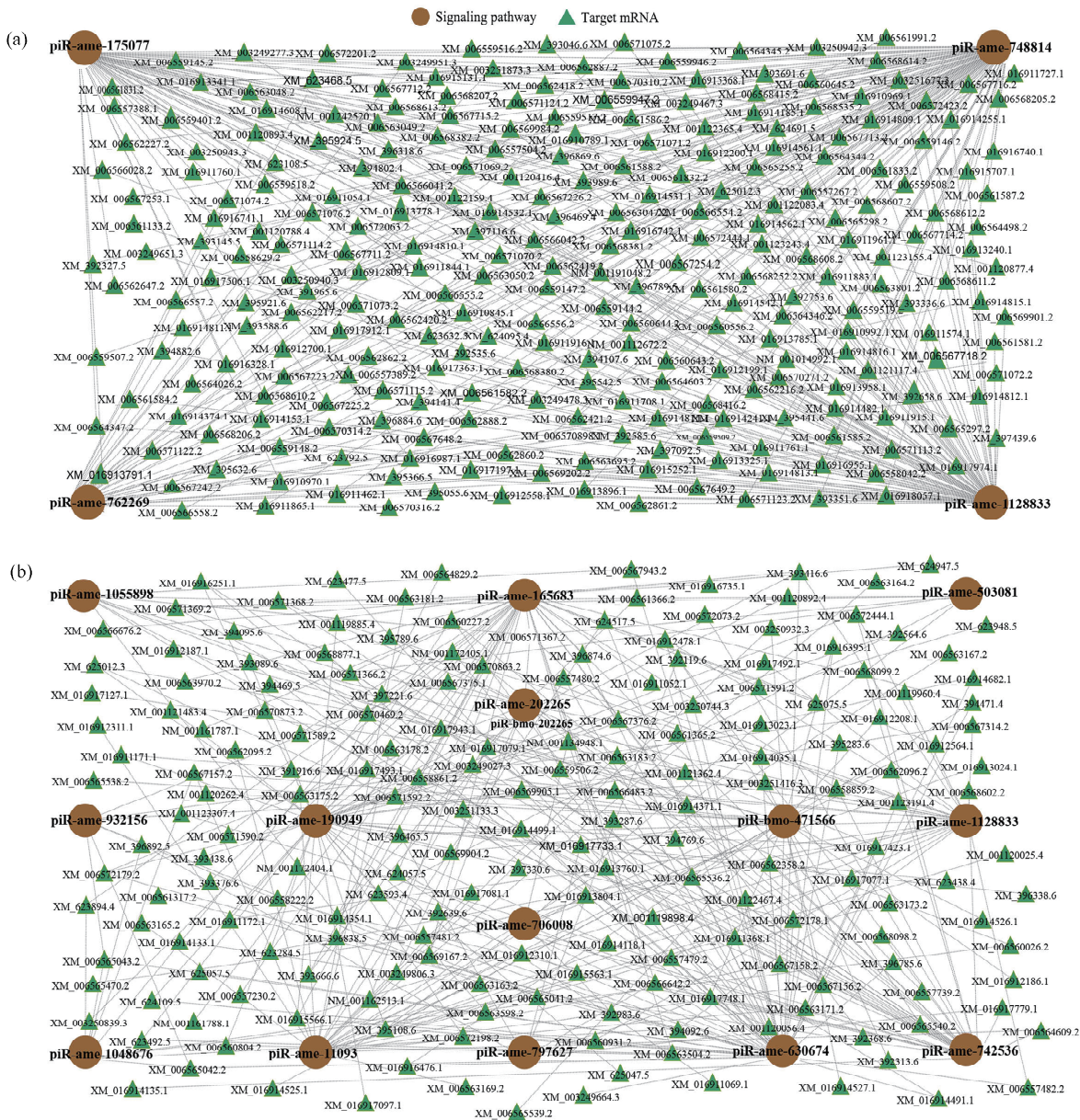


图 3 东方蜜蜂微孢子虫胁迫 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠中 DEpiRNA 及其靶 mRNA 的调控网络
Fig. 3 Regulation network of DEpiRNAs and their target mRNAs in *A. m. ligustica* workers' midguts at 7 d and 10 d post *N. ceranae* stress

进一步分析发现,上述两个比较组共有的 DEpiRNA piR-ame-1128833 靶向的 mRNA 中有 30 个涉及 Hippo、Notch、FoxO、Wnt 和 Hedgehog 等发育相关的信号通路,有 54 个涉及内吞作用、MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路及泛素介导的蛋白水解等免疫途径。

3.4 DEpiRNA 的 Stem-loop RT-PCR 与 RT-qPCR 验证

利用 Stem-loop RT-PCR 对随机选取 4 个 DEpiRNA 进行扩增,产物的电泳结果显示均能扩增出符合预期大小(约 80 bp)的目的片段(图 4)。进一步的 qPCR 结果显示上述 4 个 DEpiRNA 的表达趋

势与测序数据中的趋势一致。以上结果证实了本研究中 piRNA 表达趋势的真实性和测序数据的可靠性。

4 讨论

本研究选择东方蜜蜂微孢子虫胁迫 7 d 和 10 d 两个时间点的意蜂工蜂中肠主要基于三点依据:(1) 东方蜜蜂微孢子虫孢子接种西方蜜蜂工蜂后,病原孢子载量在宿主细胞可持续增长到 20 d^[21];(2) 东方蜜蜂微孢子虫孢子接种意蜂工蜂后,接种组工蜂的累积死亡率在 1~10 dpi 阶段均高于未接种组工蜂,但两组累计死亡率只在 7 dpi 和 10 dpi 两个时间点具有显著性差异^[22];(3) 笔者团队前期

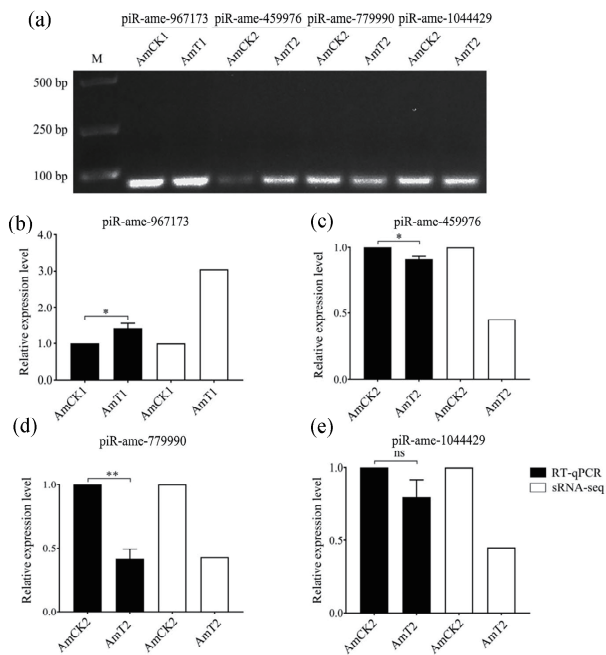


图 4 DEpiRNA 的 Stem-loop RT-PCR(a)和 qPCR 验证 (b~e)
Fig. 4 Stem-loop RT-PCR (a) and qPCR(b~e) validation of DEpiRNAs

已基于东方蜜蜂微孢子虫接种 7 d 和 10 d 的意蜂工蜂中肠及未接种工蜂中肠转录组数据解析了宿主响应胁迫的免疫基因应答^[23],分析和探讨了 miRNA 和 lncRNA 在宿主的胁迫应答中的调控作用^[17,22],本研究是在前期基础上进一步探讨东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意蜂工蜂的 piRNA 差异表达谱及潜在功能,以期全面深入地阐释意蜂工蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的作用机制.相比于未受胁迫的意蜂工蜂中肠,我们在东方蜜蜂微孢子虫胁迫 7 d 和 10 d 的工蜂中肠中分别鉴定到 50 和 207 个 DEpiRNA,说明这些 DEpiRNA 参与了宿主的胁迫应答. AmCK1 vs AmT1 和 AmCK2 vs AmT2 比较组共有的 DEpiRNA 为 10 个,特有的 DEpiRNA 分别为 40 和 197 个,推测上述共有 DEpiRNA 在宿主应答过程的 2 个时间点均发挥作用,而多数 DEpiRNA 在宿主应答的不同时间点发挥特定作用.

piRNA 参与了许多后生动物的生殖系发育和配子发生且与人类的癌症高度相关^[24]. piRNA 也被证实能通过靶向 mRNA 发挥基因表达调控的作用^[25].本研究中, AmCK1 vs AmT1 中仅有 4 个 DEpiRNA 可靶向 7256 条 mRNA, AmCK2 vs AmT2 中有 14 个 DEpiRNA 可靶向 29152 条 mRNA,说明少数 DEpiRNA 参与宿主应答过程中基因表达调控,而多数 DEpiRNA 可能主要发挥保持

基因组稳定性的作用. AmCK1 vs AmT1 中 DEpiRNA 的靶 mRNA 可注释到细胞进程等 45 个功能条目(图 1a);还注释到磷脂酰肌醇信号系统等 117 条代谢通路(图 2a).类似地, AmCK2 vs AmT2 中 DEpiRNA 的靶 mRNA 可注释到细胞进程等 47 个功能条目(图 1b)以及 MAPK 信号通路等 140 条代谢通路(图 2b).以上结果表明 DEpiRNA 通过调节诸多生物学过程潜在影响宿主对东方蜜蜂微孢子虫胁迫的应答. miRNA 作为基因表达的关键调控因子,其“种子区”根据碱基互补配对原则靶向结合 mRNA 的 3'UTR 特定区域,同一个 miRNA 能够靶向多个 mRNA,反之亦然^[26].本研究也发现,同一个 DEpiRNA 可靶向结合多个 mRNA,一些 mRNA 可同时被多个 DEpiRNA 靶向结合,说明 DEpiRNA 能以一种类似于 miRNA 的方式参与宿主应答中的基因表达调控^[27].

信号转导途径在真核生物的环境适应、细胞活动、生长发育、新陈代谢和免疫应答等生物学过程中发挥举足轻重的作用^[28]. Hippo 信号通路通过调节细胞增殖和凋亡参与器官大小控制和组织再生^[29]. Notch 信号通路可调节果蝇中肠上皮细胞分化及细胞凋亡^[30]. FoxO 信号通路参与调控碳水化合物代谢和能量代谢等重要代谢过程^[31].同时, FoxO 和 Wnt 信号通路在调节细胞生长、增殖和凋亡及新陈代谢等方面均起到关键作用^[32-34]. Hedgehog 信号通路与细胞的生长和发育密切相关^[35].上述两个比较组共有的 DEpiRNA 仅 piR-ame-1128833 可靶向 3021 条 mRNA,暗示 piR-ame-1128833 在意蜂工蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的过程中发挥重要作用.本研究发现, piR-ame-1128833 的靶 mRNA 中分别有 11、1、2、11 和 5 个可注释到 Hippo、Notch、FoxO、Wnt 和 Hedgehog 等信号转导途径,表明 piR-ame-1128833 通过调控生长、发育和物质能量代谢通路潜在影响意蜂工蜂对东方蜜蜂微孢子虫胁迫的应答.

为抵御病原体 and 寄生虫的入侵,昆虫进化出了高效的先天免疫系统,包括以内吞和吞噬作用为代表的细胞免疫^[36]和以 Jak-STAT 和 MAPK 等信号通路及抗菌肽释放为代表的体液免疫^[37].媒介昆虫的中肠肠壁是病毒入侵的主要屏障,研究表明依赖于网格蛋白的内吞作用在促进病毒进入烟粉虱(*Bemisia tabaci*)中肠细胞方面起到重要作用^[38]. MAPK 信号通路可以通过级联反应调控中肠基因表达进而引起小菜蛾(*Plutella xylostella*)的抗病

毒反应^[39]. JAK/STAT 信号通路参与调节细胞生长、分化、凋亡及炎症反应,并与埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)抵御真菌侵染密切相关^[40]. 泛素介导的蛋白水解系统作为消除错误折叠或损伤细胞的主要机制,是许多生理过程如信号转导、细胞周期及免疫细胞功能的控制器^[41]. 本研究发现, piR-ame-1128833 的靶 mRNA 中分别有 32、2、1 和 19 个可注释到内吞作用、MAPK 信号通路、Jak-STAT 通路及泛素介导的蛋白水解系统,说明 piR-ame-1128833 可能通过调节上述细胞和体液免疫途径参与宿主对东方蜜蜂微孢子虫胁迫的应答,但仍需要进一步实验验证. 目前,参照 miRNA 的过表达和敲减方法对真核生物组织或细胞中的 piRNA 进行功能研究已见诸报道^[42,43]. 下一步我们将根据 piR-ame-1128833 的序列设计合成相应的模拟物和抑制物,并通过饲喂法对东方蜜蜂微孢子虫感染的意蜂工蜂内的 piR-ame-1128833 进行过表达和敲减,以明确该 piRNA 在宿主的胁迫应答中的功能.

综上,东方蜜蜂微孢子虫胁迫可引起意蜂工蜂中肠 piRNA 表达谱的改变;DEpiRNA 可通过靶向 mRNA 潜在调控宿主响应胁迫中的多个生物学过程;piR-ame-1128833 可通过靶向调控相关 mRNA 潜在调节 Hippo 和 Wnt 等信号通路及内吞作用和 MAPK 信号通路等免疫途径.

参考文献:

- [1] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [2] 耿四海, 周丁丁, 范小雪, 等. 转录组分析揭示东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂的分子机制[J]. 昆虫学报, 2020, 63: 294.
- [3] Martín-Hernández R, Bartolomé C, Chejanovsky N, et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective [J]. Environ Microbiol, 2018, 20: 1302.
- [4] Chadwick B P, Scott K C. Molecular versatility: the many faces and functions of noncoding RNA [J]. Chromosome Res, 2013, 21: 555.
- [5] Williams Z, Morozov P, Mihailovic A, et al. Discovery and characterization of piRNAs in the human fetal ovary [J]. Cell Rep, 2015, 13: 854.
- [6] Llonga N, Ylla G, Bau J, et al. Diversity of piRNA expression patterns during the ontogeny of the *German cockroach* [J]. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2018, 330: 288.
- [7] Weick E M, Miska E A. PiRNAs: from biogenesis to function [J]. Development, 2014, 141: 3458.
- [8] Cox D N, Chao A, Baker J, et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal [J]. Genes Dev, 1998, 12: 3715.
- [9] Li B, He X, Zhao Y, et al. Identification of piRNAs and piRNA clusters in the testes of the *Mongolian horse* [J]. Sci Rep, 2019, 9: 5022.
- [10] Wang Y, Jin B, Liu P, et al. PiRNA profiling of dengue virus type 2-infected asian tiger mosquito and midgut tissues [J]. Viruses, 2018, 10: 213.
- [11] Redl S, de Jesus Domingues A M, Caspani E, et al. Extensive nuclear gyration and pervasive non-genic transcription during primordial germ cell development in zebrafish [J]. Development, 2021, 148: dev193060.
- [12] Huang X, FejesTóth K, Aravin A A. PiRNA biogenesis in *Drosophila melanogaster* [J]. Trends Genet, 2017, 33: 882.
- [13] Liu P, Dong Y, Gu J, et al. Developmental piRNA profiles of the invasive vector mosquito *Aedes albopictus* [J]. Parasit Vectors, 2016, 9: 524.
- [14] Jones B C, Wood J G, Chang C, et al. A somatic piRNA pathway in the *Drosophila* fat body ensures metabolic homeostasis and normal lifespan [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13856.
- [15] Guo J X, Ye W Y, Liu X M, et al. piRNA-3312: A putative role for pyrethroid resistance in *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) [J]. J Med Entomol, 2017, 54: 1013.
- [16] Chen D F, Chen H Z, Du Y, et al. Genome-wide identification of long non-coding RNAs and their regulatory networks involved in *Apis mellifera ligustica* response to *Nosema ceranae* infection [J]. Insects, 2019, 10: 245.
- [17] 陈华枝, 熊翠玲, 祝智威, 等. 基于 small RNA 组学分析揭示意大利蜜蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的免疫应答机制[J]. 微生物学报, 2020, 60: 1458.
- [18] 杜宇, 范小雪, 蒋海宾, 等. 微小 RNA 及其介导的竞争性内源 RNA 调控网络在意大利蜜蜂工蜂中肠发育过程中的潜在作用[J]. 中国农业科学, 2020, 53: 2512.
- [19] Allen E, Xie Z, Gustafson A M, et al. MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants [J]. Cell, 2005, 121: 207.
- [20] Smoot M E, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization [J]. Bioinformatics, 2011, 27: 431.
- [21] Huang W F, Solter L F. Comparative development

- and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* [J]. J Invertebr Pathol, 2013, 113: 35.
- [22] Chen D F, Chen H Z, Du Y, *et al.* Genome-wide identification of long non-coding RNAs and their regulatory networks involved in *Apis mellifera ligustica* response to *Nosema ceranae* infection [J]. Insects, 2019, 10: 245.
- [23] 付中民, 陈华枝, 刘思亚, 等. 意大利蜜蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的免疫应答[J]. 中国农业科学, 2019, 52: 3069.
- [24] Thomson T, Lin H. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009, 25: 355.
- [25] Wei Z, Liu X, Zhang H. Identification and characterization of piRNA-like small RNAs in the gonad of sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) [J]. Mar Biotechnol, 2012, 14: 459.
- [26] 郭睿, 杜宇, 周倪红, 等. 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: 49.
- [27] Dai P, Wang X, Guo L T, *et al.* A translation-activating function of MIWI/piRNA during mouse spermiogenesis [J]. Cell, 2019, 179: 1566.
- [28] Nájera C A, Batista M F, Meneghelli I, *et al.* Mixed signals-how *Trypanosoma cruzi* exploits host-cell communication and signaling to establish infection [J]. J Cell Sci, 2021, 134: jcs255687.
- [29] Zhao B, Tumaneng K, Guan K L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13: 877.
- [30] Reiff T, Antonello Z A, Ballesta-Illán E, *et al.* Notch and EGFR regulate apoptosis in progenitor cells to ensure gut homeostasis in *Drosophila* [J]. EMBO J, 2019, 38: e101346.
- [31] Zečić A, Braeckman B P. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and its role in metabolic remodeling [J]. Cells, 2020, 9: 109.
- [32] Accili D, Arden K C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. Cell, 2004, 117: 421.
- [33] Holzem M, Braak N, Brattström O, *et al.* Wnt gene expression during early embryogenesis in the nymphalid butterfly *Bicyclus anynana* [J]. Front Ecol Evol, 2019, 7: 468.
- [34] Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR-autophagy axis and the control of metabolism [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 655731.
- [35] Saad F, Hipfner D R. Extensive crosstalk of G protein-coupled receptors with the Hedgehog signalling pathway [J]. Development, 2021, 148: 189258.
- [36] Trujillo-Ocampo A, Cázares-Raga F E, Del Angel R M, *et al.* Participation of 14-3-3 ϵ and 14-3-3 ζ proteins in the phagocytosis, component of cellular immune response, in *Aedes mosquito* cell lines [J]. Parasit Vectors, 2017, 10: 362.
- [37] Yang L, Qiu L M, Fang Q, *et al.* Cellular and humoral immune interactions between *Drosophila* and its parasitoids [J]. Insect Sci, 2021, 28: 1208.
- [38] Zhao J, Lei T, Zhang X J, *et al.* A vector whitefly endocytic receptor facilitates the entry of begomovirus into its midgut cells via binding to virion capsid proteins [J]. PLoS Pathog, 2020, 16: e1009053.
- [39] Guo Z, Kang S, Sun D, *et al.* MAPK-dependent hormonal signaling plasticity contributes to overcoming *Bacillus thuringiensis* toxin action in an insect host [J]. Nat Commun, 2020, 11: 3003.
- [40] Dong Y, Morton J C Jr, Ramirez J L, *et al.* The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2012, 42: 126.
- [41] McBride W H, Iwamoto K S, Syljuasen R, *et al.* The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation [J]. Oncogene, 2003, 22: 5755.
- [42] Taborska E, Pasulka J, Malik R, *et al.* Restricted and non-essential redundancy of RNAi and piRNA pathways in mouse oocytes [J]. PLoS Genet, 2019, 15: e1008261.
- [43] Mondal M, Brown J K, Flynt A. Exploiting somatic piRNAs in *Bemisia tabaci* enables novel gene silencing through RNA feeding [J]. Life Sci Alliance, 2020, 3: e202000731.

引用本文格式:

中文: 许雅静, 孙明会, 刘佳美, 等. 东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意大利蜜蜂工蜂的 piRNA 差异表达谱及潜在功能 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 036004.

英文: Xu Y J, Sun M H, Liu J M, *et al.* Differential expression pattern and potential function of piRNAs in *Apis mellifera ligustica* workers under *Nosema ceranae* stress [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 036004.