

东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程的 nce-miR-23928 及其靶基因表达谱

张文德^{#1}, 胡颖^{#1}, 张凯遥¹, 钱加珺¹, 赵红霞³, 吉挺⁴, 蔺哲广⁴, 陈大福^{*1,2}, 郭睿^{*1,2}

1 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

2 福建农林大学蜂疗研究所, 福建 福州 350002

3 广东省科学院动物研究所, 广东 广州 510260

4 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225000

张文德, 胡颖, 张凯遥, 钱加珺, 赵红霞, 吉挺, 蔺哲广, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程的 nce-miR-23928 及其靶基因表达谱[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 185-193.

ZHANG Wende, HU Ying, ZHANG Kaiyao, QIAN Jiajun, ZHAO Hongxia, JI Ting, LIN Zhanguang, CHEN Dafu, GUO Rui. Expression profiles of nce-miR-23928 and its target genes in the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 185-193.

摘要: 【背景】东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)专性侵染成年蜜蜂中肠上皮细胞而导致的微孢子虫病给养蜂业造成严重损失。【目的】检测东方蜜蜂微孢子虫 nce-miR-23928 及其靶基因在侵染意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)工蜂过程的表达谱, 为深入探究 nce-miR-23928 在东方蜜蜂微孢子虫侵染中的功能及调控机制提供依据。【方法】通过 RNAhybrid、miRanda 和 TargetScan 软件预测 nce-miR-23928 的靶基因。使用 BLAST 工具将上述靶基因比对到基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、Nr 和 Swiss-Prot 数据库以获得相应注释。采用实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)技术检测 nce-miR-23928 及其靶基因在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中的相对表达量。【结果】相较于接种后 1 d (1 day post infection, 1 dpi), nce-miR-23928 的表达量在 2 dpi 基本不变, 而在 4、6、

资助项目: 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专项资助基金(CARS-44-KXJ7); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿); 福建农林大学杰出青年科研人才计划(xjq201814); 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)科研扶持项目

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172792), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), the Master Supervisor Team Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (Guo Rui), the Outstanding Young Scientific Research Talents Project of Fujian Agriculture and Forestry University (xjq201814), and the Scientific Research Project of College of Animal Sciences (College of Bee Science) of Fujian Agriculture and Forestry University.

[#]These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2022-04-24; Accepted: 2022-06-01; Published online: 2022-07-04

8 dpi 均为显著下调($P<0.05$), 总体表现出下降的表达趋势。预测到 nce-miR-23928 的 15 个靶基因, 分别有 9、4、15 和 9 条靶基因可注释到 GO (3 个条目)、KEGG (7 条通路)、Nr 和 Swiss-Prot 数据库。与 1 dpi 相比, 靶基因 *ABCT* 的表达量在 2、4、6、8 dpi 皆显著下调; 靶基因 *SPTK* 的表达量在 4、6、8 dpi 均显著上调。【结论】明确 nce-miR-23928 及其靶基因 *ABCT* 和 *SPTK* 在东方蜜蜂微孢子虫感染意蜂工蜂过程中的动态表达规律, 揭示 nce-miR-23928 通过正调控 *ABCT* 表达和负调控 *SPTK* 表达可能在东方蜜蜂微孢子虫的感染过程中起调节作用。

关键词: 东方蜜蜂微孢子虫; 蜜蜂; 意大利蜜蜂; nce-miR-23928; 表达谱; 靶基因

Expression profiles of nce-miR-23928 and its target genes in the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers

ZHANG Wende^{#1}, HU Ying^{#1}, ZHANG Kaiyao¹, QIAN Jiajun¹, ZHAO Hongxia³, JI Ting⁴, LIN Zheguang⁴, CHEN Dafu^{*1,2}, GUO Rui^{*1,2}

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

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

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

4 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Nosema ceranae* exclusively infects midgut epithelial cells of adult bees, and the resulting microsporidiosis causes severe losses to the beekeeping industry. [Objective] This study aimed to determine the expression profiles of nce-miR-23928 and its target genes during the *N. ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers, and to provide basis for further investigation on the function and regulatory mechanism of nce-miR-23928 during the infection. [Methods] Target genes of nce-miR-23928 were predicted by RNAhybrid, miRanda and TargetScan. BLAST was used to perform annotation of the aforementioned target genes in gene ontology (GO), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), Nr and Swissprot. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to detect relative expression of nce-miR-23928 and its target genes. [Results] As compared with the condition at 1 day post infection (1 dpi), the expression of nce-miR-23928 remained unchanged at 2 dpi, but was all down-regulated at 4, 6, 8 dpi ($P<0.05$), presenting an overall reduced expression trend. Additionally, 15 target genes of nce-miR-23928 were predicted, among which 9, 4, 15 and 9 were annotated in GO (3 items), KEGG (7 pathways), Nr and Swiss-Prot, respectively. As compared with the condition at 1 dpi, the expression of target gene *ABCT* was significantly down-regulated at 2, 4, 6, 8 dpi, while the expression of target gene *SPTK* was significantly up-regulated at 4, 6, 8 dpi, displaying an overall elevation trend. [Conclusion] These results illuminated the dynamic expression rules of nce-miR-23928 and its target genes *ABCT* and *SPTK* in the *N. ceranae* infection of *A. mellifera ligustica* workers, and unraveled that nce-miR-23928 putatively modulated the infection process through positively regulating the

expression of *ABCT* and negatively regulating the expression of *STPK*.

Keywords: *Nosema ceranae*; honey bee; *Apis mellifera ligustica*; nce-miR-23928; expression profiles; target genes

蜜蜂作为最重要的授粉昆虫可为众多野生植物和农作物授粉。东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)专性侵染成年蜜蜂中肠上皮细胞而导致微孢子虫病,对蜜蜂健康和养蜂生产造成严重影响^[1]。东方蜜蜂微孢子虫侵染可导致西方蜜蜂(*Apis mellifera*)工蜂的平均寿命缩短 9 d^[2]。MiRNA 作为基因表达调控的关键因子可参与诸多生理和病理过程^[3]。

关于人(*Homo sapiens*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等动植物的 miRNA 已有大量研究报道^[4-6],但真菌的 miRNA 研究起步较晚。目前,国际原生动物进化和分类委员会已将微孢子虫归类于真菌^[7]。虽然前人对 miRNA 介导的东方蜜蜂微孢子虫-蜜蜂宿主互作进行了一些研究,但主要集中在蜜蜂宿主方面,病原的相关研究很少。Huang 等^[8]曾通过对东方蜜蜂微孢子虫侵染的西方蜜蜂工蜂中肠进行二代测序和分析,鉴定到东方蜜蜂微孢子虫的 6 个 miRNA;随后该团队在重新组装和注释东方蜜蜂微孢子虫基因组的基础上又发现 3 个 miRNA^[9]。近期,我们团队通过 Illumina 测序和生物信息学在东方蜜蜂微孢子虫孢子中鉴定到 10 个 miRNA,并证实 nce-miR-23928 和 nce-miR-26675 真实存在和表达^[10];测定了 nce-miR-12220 及靶基因 γ -tubulin 和 *KRAB-A* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)工蜂过程的表达谱^[11]。

本研究对 nce-miR-23928 的靶基因进行预测和分析,并检测 nce-miR-23928 及其靶基因在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程的表达谱,以期明确 nce-miR-23928 及其靶基因在东

方蜜蜂微孢子虫侵染过程的表达规律,以期为进一步探究 nce-miR-23928 调控侵染的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

东方蜜蜂微孢子虫感染的工蜂来自福州市闽侯县荆溪源安蜂场的意蜂蜂群。未受东方蜜蜂微孢子虫感染的工蜂来自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)教学蜂场的意蜂蜂群^[12]。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)蜜蜂保护实验室制备和保存^[10]。

RNA 抽提试剂盒,普洛麦格公司;反转录试剂盒,湖南艾科瑞生物工程有限公司;SYBR,上海翌圣生物科技有限公司。ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统,ABI 公司。

1.2 东方蜜蜂微孢子虫孢子接种及意蜂工蜂中肠样品制备

按照我们实验室前期建立的技术流程^[12]对意蜂工蜂进行接种:(1) 选取实验蜂群中即将出房的封盖子脾迅速提至实验室置于(34±0.5) °C 培养箱中,将刚出房的工蜂放入干净的塑料盒(四周打孔以通风);(2) 将 1 日龄的工蜂饥饿处理 2 h 后,单只饲喂接种 5 μ L 含有 10⁶ 个东方蜜蜂微孢子虫纯净孢子的蔗糖溶液,饲喂后放入恒温恒湿培养箱中。连续 8 d 使用饲喂器饲喂 50% (质量体积比)蔗糖溶液(不含有病原孢子),饲喂后放入培养箱继续培养且每天饲喂前取样。在超净台中拉取工蜂中肠,每 3 条中肠作为一个生物学重复放入一个无菌的不含核糖核酸(RNA-Free) EP 管中,短暂于液氮中冷冻,样品置于-80 °C 冰箱保存。上述实验共设置 3 个

生物学重复。

1.3 nce-miR-23928 的靶基因分析

我们团队前期利用 RNA-Seq 技术对东方蜜蜂微孢子虫的纯净孢子样品进行测序, 质控结果显示测序数据质量良好^[11]。基于上述高质量转录组数据, 联用 RNAhybrid^[13]、miRanda^[14]和 TargetScan^[15]软件预测 nce-miR-23928 的靶基因, 均采用默认参数。使用 BLAST 工具将上述靶 mRNA 序列比对到 GO 数据库(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/gogsea>)、KEGG 数据库(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/pathwaygsea>)、Nr 数据库(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA>)和 Swiss-Prot 数据库(http://www.uniprot.org/uniprot/?query=*&fil=reviewed%3Ayes)获得靶基因的注释信息。

1.4 nce-miR-23928 的表达谱检测

利用 RNA 抽提试剂盒(普洛麦格公司)提取上述意蜂中肠样品总 RNA, 通过反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)进行反转录, 利用 Stem-loop 引物得到 nce-miR-23928 的 cDNA, 利用 Oligo dT 引物和 Random 6 mer 引物按 1:1 混匀进行反转录获得东方蜜蜂微孢子虫内参基因 5S rRNA 基因的 cDNA。以得到的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)反应检测, 反应体系(20 μ L): SYBR (上海翌圣生物科技有限公司) 10 μ L, 上、下游引物(2.5 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 1 μ L, DEPC 水 7 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 44 个循环, 熔解曲线程序为系统默认设置。每个反应均进行 3 次技术重复, 引物信息见表 1。以接种后 1 d (1 day post inoculation, 1 dpi)为参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16]计算 nce-miR-23928 在 2、4、6、8 dpi 的相对表达量。通过 GraphPad Prism 8 软件对数数据进行分析 and 绘图。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for RT-qPCR

名称 Name	序列 Sequence (5'→3')
nce-miR-23928-Loop	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGG CAATTCAGTTGAGTGACAAA
nce-miR-23928-F	CGCGTATGGTGTAATTGTATC
nce-miR-23928-R	CTCAACTGGTGTCGTGGA
5S rRNA-F	CGAGCGGTTTCCCATCTCAGTA
5S rRNA-R	AAAACACCGGAACCTCGTCAGTC
STPK-F	GTAAGCAACTTGACGAAGC
STPK-R	CACAATGTACCAGGAGGAA
actin-F	CAAAGCCTGTGATGTGGA
actin-R	GCCAAGTTTCTGATTCCC
ABCT-F	AACAGTCGGTCCATCCTCAA
ABCT-R	CATACTATTCGGCAGTCTTCCA

1.5 nce-miR-23928 靶基因的表达谱检测

根据 1.3 节 nce-miR-23928 的靶向预测结果, 结合我们团队对东方蜜蜂微孢子虫侵染机理的相关研究^[17-18]及东方蜜蜂微孢子虫生物学背景, 挑选 ABC 转运体(ABC transporter, ABCT)基因 ABCT 和丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase, STPK)基因 STPK 进行表达谱检测。以 Oligo dT 引物和 Random 6 mer 引物按 1:1 混匀进行反转录获得 cDNA 模板, 以肌动蛋白基因 actin (Gene ID: AB023025.1)为内参, 对上述 2 个靶基因的相对表达量进行 RT-qPCR 检测。反应体系同 1.4 节。以 1 dpi 为参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法检测 2、4、6、8 dpi 的相对表达量。利用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 nce-miR-23928 的靶基因分析结果

靶向预测结果显示, nce-miR-23928 共靶向 15 个基因; 其中有 9 个靶基因可注释到 GO 数据库中的 3 个功能条目, 包括生物学进程、

细胞组分和分子功能; 有 4 个靶基因可注释到 KEGG 数据库中的 7 条通路, 包括 N-聚糖生物合成、内吞作用、MAPK 信号通路-酵母、氨酰基-tRNA 的生物合成、泛素介导的蛋白水解、RNA 转运和代谢途径。另外, 分别有 15 个和 9 个靶基因可注释到 Nr 和 Swiss-Prot 数据库(表 2)。

2.2 东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中 nce-miR-23928 的表达谱

RT-qPCR 结果显示, 相较于 1 dpi, nce-miR-23928 在 2 dpi 的表达量与 1 dpi 基本相同, 但在 4、6、8 dpi 的表达量显著下调($P < 0.05$), 下调倍数分别为 4.08、198.87、456.18 倍; 总体呈现下降的表达趋势(图 1)。

2.3 nce-miR-23928 的靶基因 ABCT 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中的表达谱

基因 ABCT 与 nce-miR-23928 间存在潜在的靶向关系(图 2A)。RT-qPCR 结果显示, 相较于

1 dpi, 靶基因 ABCT 的表达量在 2、4、6、8 dpi 均为显著下调, 下调倍数分别为 4.95、9.54、14.71、24.80 倍, 总体表现出持续下降的表达趋势(图 2B)。

2.4 nce-miR-23928 的靶基因 SPTK 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程的表达谱

SPTK 与 nce-miR-23928 间存在潜在的靶向关系(图 3A)。RT-qPCR 结果显示, 相较于 1 dpi, 靶基因 SPTK 的表达量在 2 dpi 基本相同, 在 4、6、8 dpi 均显著上调, 上调倍数分别为 5.36、2.82、3.95 倍; 总体呈现上升的表达趋势(图 3B)。

3 讨论与结论

前期研究中, 我们团队通过 Stem-loop RT-PCR 和 Sanger 测序证实东方蜜蜂微孢子虫孢子中 nce-miR-23928 真实存在和表达^[10]。本研究发现在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中 nce-miR-23928 与 ABCT 和 SPTK 等 15 个基因存在靶向关系。RT-qPCR 检测结果显示相

表 2 nce-miR-23928 靶基因的 Nr 和 Swiss-Prot 数据库注释

Table 2 Annotation of nce-miR-23928 targeted genes in Nr and Swiss-Prot databases

基因 ID Gene ID	Nr 数据库注释 Nr database annotation	Swiss-Prot 数据库注释 Swiss-Prot database annotation
36319520	ABC transporter	ABC transporter ATP-binding protein
36320748	Protein kinase c	Serine/threonine-protein kinase
36320748	Protein kinase c	-
36321252	Chromosome segregation protein	Probable kinetochore protein
36318399	Hypothetical protein	-
36319866	Hect-domain-containing protein	E3 ubiquitin-protein ligase
36319865	Subtilisin-like endopeptidase	Putative subtilisin-like proteinase
36319415	Eukaryotic translation initiation factor 4e	Eukaryotic translation initiation factor
36321036	CysteinyI-tRNA synthetase	Cysteine-tRNA ligase
36318999	Hypothetical protein	-
36318682	Hypothetical protein	-
36320005	Integral membrane	-
36319142	Isopeptidase t	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
36318706	Dolichol-phosphate mannosyltransferase	Dolichol-phosphate mannosyltransferase
36321176	Peptidase m48	-

-: 无注释

-: No annotation.

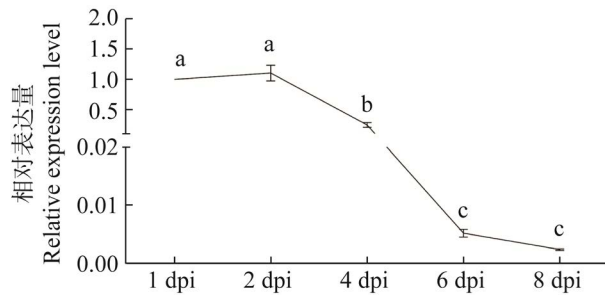


图 1 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中 *nce-miR-23928* 的相对表达量 采用 SPSS statistics 软件对 *nce-miR-23928* 在各日龄的相对表达量进行单因素方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为显著性阈值. 采用 Tukey 检验法和字母显著标记法两两比较分析实验数据. 图中数据为平均值 \pm 标准误差; 曲线上相同小写字母表述差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$). 下同

Figure 1 Relative expression of *nce-miR-23928* during the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers. SPSS statistics software was used to conduct one-way analysis of variance (ANOVA) for the relative expression level of *nce-miR-23928* at each day-old, with $P < 0.05$ as the significance threshold. Experimental data were compared and analyzed by the Tukey test and the letter significance labeling methods. Data are mean \pm SE; the same lowercase letters above the curve indicate non-significant difference ($P > 0.05$), while the different lowercase letters above the curve indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

较于 1 dpi, *nce-miR-23928* 在 4、6、8 dpi 的表达量显著下调. 上述结果表明, *nce-miR-23928* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂的过程中发生差异表达, *nce-miR-23928* 通过调控上述靶基因表达潜在参与调节东方蜜蜂微孢子虫侵染.

ABC 转运蛋白是真核生物最大的膜蛋白家族之一, 可通过水解 ATP 获得能量, 并对细胞质中的各类生物大分子如糖、氨基酸、多肽、

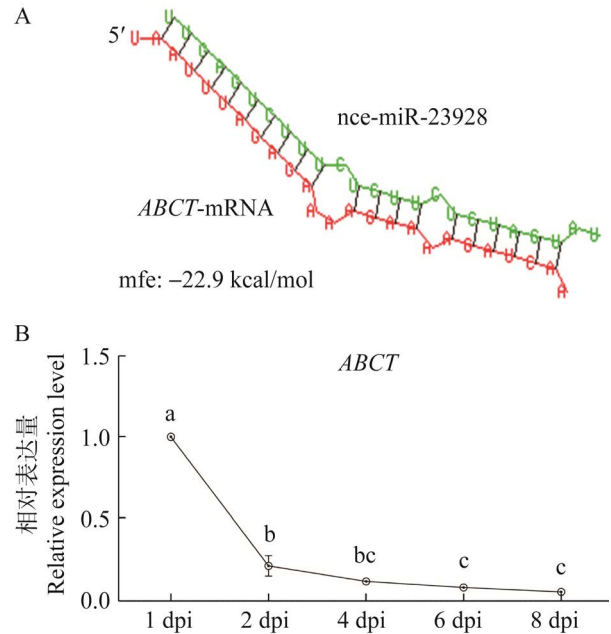


图 2 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中基因 *ABCT* 的相对表达量 A: *nce-miR-23928* 与 *ABCT* 的靶向结合关系示意图. B: *ABCT* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程的表达谱

Figure 2 Relative expression levels of *ABCT* gene in *Apis mellifera ligustica* workers infected by *Nosema ceranae*. A: Schematic diagram of target binding relationship between *nce-miR-23928* and *ABCT*. B: Expression profile of *ABCT* gene during the infection process of *Nosema ceranae*.

蛋白质、代谢物等进行跨膜转运^[19]. ABC 转运体家族包含 8 个亚家族, 其中 5 个亚家族的编码基因存在于东方蜜蜂微孢子虫基因组中^[20]. 东方蜜蜂微孢子虫基因组高度简化, 因缺乏完整的线粒体结构, 其增殖所需能量依赖宿主细胞提供. 研究表明 ABC 转运体在兔脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon cuniculi*) 和家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 窃取宿主细胞内物质和能量中起到重要作用^[21-22]. 本研究中, *ABCT* 与 *nce-miR-23928* 存在靶向关系, 而且相较于 1 dpi, *ABCT* 的表达量在 2、4、6、8 dpi 总体表现出持续下降的表达趋势(图 2B), 与侵染过程中

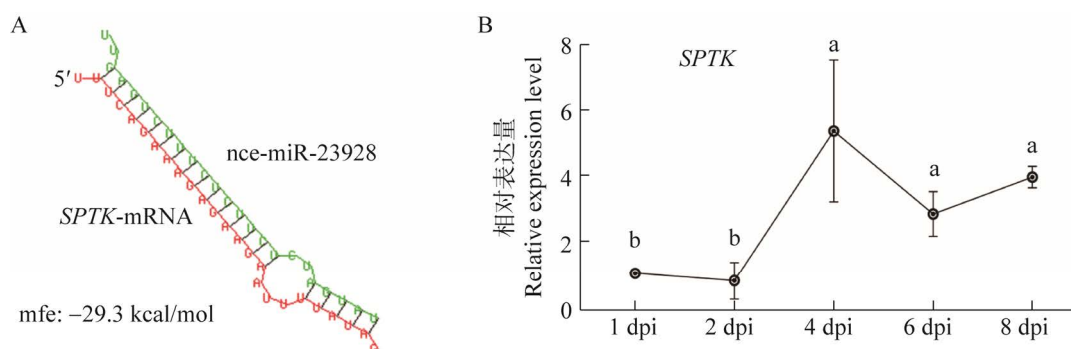


图3 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中 *STPK* 基因的相对表达量 A: nce-miR-23928 与 *STPK* 基因的靶向结合关系示意图. B: *STPK* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程的表达谱

Figure 3 Relative expression levels of *STPK* gene in *Apis mellifera ligustica* workers infected by *Nosema ceranae*. A: Schematic diagram of target binding relationship between nce-miR-23928 and *STPK*. B: Expression profile of *STPK* during the infection process of *Nosema ceranae*.

nce-miR-23928 的表达趋势基本一致, 说明 nce-miR-23928 与 *ABCT* 间存在正调控关系, nce-miR-23928 通过正调控 *ABCT* 表达调节东方蜜蜂微孢子虫侵染。

STPK 是细菌等微生物入侵宿主过程中重要的毒力因子之一^[23]。鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)和假结核杆菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)等通过 III 型分泌系统分泌 *STPK* 进入宿主靶细胞, 破坏肌动蛋白的细胞骨架, 并增强对宿主巨噬细胞吞噬作用的抵抗能力^[24-25]。*STPK* 含有 1 个 RhoGTPase 结合域, 可与细胞骨架完整性相关的 GTPases RhoA 和 Rac-1 特异性结合并使其失活, 从而导致细胞骨架破坏和细胞形状扭曲^[26]。Hervet 等^[27] 研究发现军团杆菌 (*Legionella pneumophila*) 能够通过分泌 *STPK* 家族相关酶干扰宿主免疫相关的核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B) 信号通路^[28-29]。NF- κ B 信号通路是蜜蜂体液免疫的关键途径之一^[30]。本研究发现, 相较于 1 dpi, *STPK* 的表达量在 4、6、8 dpi 显著上调, 这与 nce-miR-23928 的表达趋势相反, 说明 *STPK* 与 nce-miR-23928 间为负调控关系, nce-miR-23928 通过负调控

STPK 表达潜在参与对东方蜜蜂微孢子虫侵染的调节。

本研究明确了 nce-miR-23928 及其靶基因 *ABCT* 和 *STPK* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜂过程中的动态表达规律, 揭示了 nce-miR-23928 通过正调控 *ABCT* 表达和负调控 *STPK* 表达潜在调节东方蜜蜂微孢子虫的侵染过程。

REFERENCES

- [1] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
LIANG Q, CHEN DF. Honeybee Protection[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2009 (in Chinese).
- [2] GOBLIRSCH M, HUANG ZY, SPIVAK M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58165.
- [3] BURNHAM AJ. Scientific advances in controlling *Nosema ceranae* (microsporidia) infections in honey bees (*Apis mellifera*)[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2019, 6: 79.
- [4] LU TX, ROTHENBERG ME. MicroRNA[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [5] XU L, HU YG, CAO Y, LI JR, MA LG, LI Y, QI YJ. An expression atlas of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*[J]. Science China Life Sciences, 2018, 61(2): 178-189.

- [6] CARTHEW RW, AGBU P, GIRI R. MicroRNA function in *Drosophila melanogaster*[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017, 65: 29-37.
- [7] ADL SM, SIMPSON AGB, LANE CE, LUKEŠ J, BASS D, BOWSER SS, BROWN MW, BURKI F, DUNTHORN M, HAMPL V, HEISS A, HOPPENRATH M, LARA E, le GALL L, LYNN DH, MCMANUS H, MITCHELL EA, MOZLEY-STANRIDGE SE, PARFREY LW, PAWLOWSKI J, et al. The revised classification of eukaryotes[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2012, 59(5): 429-514.
- [8] HUANG Q, EVANS JD. Identification of microRNA-like small RNAs from fungal parasite *Nosema ceranae*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 133: 107-109.
- [9] SHAO SS, YAN WY, HUANG Q. Identification of novel miRNAs from the microsporidian parasite *Nosema ceranae*[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 93: 104930.
- [10] 张文德, 赵浩东, 孙明会, 余尚骏, 郭意龙, 朱乐冉, 胡颖, 赵晓明, 叶亚萍, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫孢子中微小RNA的鉴定与分析[J]. *昆虫学报*, 2022(6): 709-718.
- ZHANG WD, ZHAO HD, SUN MH, YU KJ, GUO YL, ZHU LR, HU Y, ZHAO XM, YE YP, CHEN DF, GUO R. Identification and analysis of microRNAs in *Nosema ceranae* spores[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2022(6): 709-718 (in Chinese).
- [11] 吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加璐, 张文德, 余尚骏, 吉挺, 蔺哲广, 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).
- [12] CHEN DF, CHEN HZ, DU Y, ZHOU DD, GENG SH, WANG HP, WAN JQ, XIONG CL, ZHENG YZ, GUO R. 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(8): 245.
- [13] REHMSMEIER M, STEFFEN P, HOCHSMANN M, GIEGERICH R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes[J]. *RNA*, 2004, 10(10): 1507-1517.
- [14] BETEL D, WILSON M, GABOW A, MARKS DS, SANDER C. The microRNA.org resource: targets and expression[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(suppl_1): D149-D153.
- [15] ALLEN E, XIE ZX, GUSTAFSON AM, CARRINGTON JC. MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants[J]. *Cell*, 2005, 121(2): 207-221.
- [16] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 耿四海, 石彩云, 范小雪, 王杰, 祝智威, 蒋海宾, 范元婵, 陈华枝, 杜宇, 王心蕊, 郑燕珍, 付中民, 陈大福, 郭睿. 微小RNA介导东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂的分子机制[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(15): 3187-3204.
- GENG SH, SHI CY, FAN XX, WANG J, ZHU ZW, JIANG HB, FAN YC, CHEN HZ, DU Y, WANG XR, ZHENG YZ, FU ZM, CHEN DF, GUO R. The mechanism underlying microRNAs-mediated *Nosema ceranae* infection to *Apis mellifera ligustica* worker[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(15): 3187-3204 (in Chinese).
- [18] 范小雪, 杜宇, 张文德, 王杰, 蒋海宾, 范元婵, 冯睿蓉, 万洁琦, 周紫戎, 熊翠玲, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿. 参与调控意大利蜜蜂工蜂中肠基因表达的东方蜜蜂微孢子虫 miRNA 的组学解析及其调控网络[J]. *昆虫学报*, 2021, 64(2): 187-204.
- FAN XX, DU Y, ZHANG WD, WANG J, JIANG HB, FAN YC, FENG RR, WAN JQ, ZHOU ZY, XIONG CL, ZHENG YZ, CHEN DF, GUO R. Omics analysis of *Nosema ceranae* miRNAs involved in gene expression regulation in the midgut of *Apis mellifera ligustica* workers and their regulatory networks[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2021, 64(2): 187-204 (in Chinese).
- [19] THEODOULOU FL, KERR ID. ABC transporter research: going strong 40 years on[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2015, 43(5): 1033-1040.
- [20] HUANG Q, WU ZH, LI WF, GUO R, XU JS, DANG XQ, MA ZG, CHEN YP, EVANS JD. Genome and evolutionary analysis of *Nosema ceranae*: a microsporidian parasite of honey bees[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 645353.
- [21] TSAOUSIS AD, KUNJI ERS, GOLDBERG AV, LUCOCQ JM, HIRT RP, EMBLEY TM. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*[J]. *Nature*, 2008, 453(7194):

- 553-556.
- [22] PAN QL, WANG L, DANG XQ, MA ZG, ZHANG XY, CHEN SL, ZHOU ZY, XU JS. Bacterium-expressed dsRNA downregulates microsporidia *Nosema bombycis* gene expression[J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 2017, 64(2): 278-281.
- [23] CANOVA MJ, MOLLE V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(14): 9473-9479.
- [24] JURIS SJ, RUDOLPH AE, HUDDLER D, ORTH K, DIXON JE. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9431-9436.
- [25] GROSDENT N, MARIDONNEAU-PARINI I, SORY MP, CORNELIS GR. Role of yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(8): 4165-4176.
- [26] PREHNA G, IVANOV MI, BLISKA JB, STEBBINS CE. *Yersinia* virulence depends on mimicry of host rho-family nucleotide dissociation inhibitors[J]. Cell, 2006, 126(5): 869-880.
- [27] HERVET E, CHARPENTIER X, VIANNEY A, LAZZARONI JC, GILBERT C, ATLAN D, DOUBLET P. Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(5): 1936-1950.
- [28] SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP, POW EH, BEENA VT, YEUNG KW. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(9): 3296-3302.
- [29] SARDIELLO M, PALMIERI M, di RONZA A, MEDINA DL, VALENZA M, GENNARINO VA, di MALTA C, DONAUDY F, EMBRIONE V, POLISHCHUK RS, BANFI S, PARENTI G, CATTANEO E, BALLABIO A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function[J]. Science, 2009, 325(5939): 473-477.
- [30] 付中民, 陈华枝, 刘思亚, 祝智威, 范小雪, 范元婵, 万洁琦, 张璐, 熊翠玲, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 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(17): 3069-3082.
- FU ZM, CHEN HZ, LIU SY, ZHU ZW, FAN XX, FAN YC, WAN JQ, ZHANG L, XIONG CL, XU GJ, CHEN DF, GUO R. Immune responses of *Apis mellifera ligustica* to *Nosema ceranae* stress[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(17): 3069-3082 (in Chinese).