携带与非携带松材线虫的松墨天牛 miRNA 表达谱比较分析

宁 静^{1,2},张 宾²,田浩楷^{2,3},柳小龙^{2,4},杨炳琰^{2,3},赵莉蔺^{2*}

¹河北大学生命科学学院,河北保定071002;²中国科学院动物研究所,农业虫害鼠害综合治理研究国家 重点实验室,北京100101;³中国科学院大学,北京100049;⁴山西农业大学林学院,山西太谷030801

摘要:【目的】松墨天牛是松树的重要蛀干害虫,也是林业重大外来入侵种松材线虫的媒介昆虫。虽然松墨天牛和松材线 虫互作的化学生态和分子进化机制受到人们的广泛关注,但 miRNA 等表观遗传因子在天牛—线虫互作中的作用未见报 道。【方法】使用 illuminaHiSeq 2000 平台进行 miRNA 高通量测序,得到 4 个携带线虫的天牛 miRNA 库和 4 个未携带线虫 的天牛 miRNA 库。此外,对鉴定出的 miRNA 进行了差异表达分析,并对这些 miRNA 的靶基因进行了 GO 注释和 KEGG 通 路富集分析。【结果】在携带线虫的天牛表皮、脂肪体、中肠和气管样本中分别鉴定出 780、802、617 和 762 个 miRNA;在未 携带松材线虫的天牛的不同组织样本中分别鉴定出 784、723、713 和 837 个 miRNA。在携带松材线虫的松墨天牛中,某些 已知 miRNA 表达量会显著升高,如 miR-14、miR279 和 miR-312 等。差异表达 miRNA 的功能大多指向代谢、免疫等方面。 【结论】miRNA 在松墨天牛和松材线虫互作中起着重要的调控作用。

关键词: 松墨天牛; 松材线虫; 共生互作; miRNA; 高通量测序

Comparative analysis of microRNA profile in *Monochamus alternatus* in the presence or absence of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*

NING Jing^{1,2}, ZHANG Bin², TIAN Haokai^{2,3}, LIU Xiaolong^{2,4}, YANG Bingyan^{2,3}, ZHAO Lilin^{2*}

¹College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; ²State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁴College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: [Aim] *Monochamus alternatus*, has established a symbiotic relationship with, and is the main vector of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. However, little is known about the symbiotic relationship at the molecular level. microRNAs (miRNAs) are considered to be very important in regulating the growth, development and behavior in animals and plants in post-transcriptional gene regulation. [Method] Eight small RNA libraries were constructed and sequenced by the illumina high-throughput sequencing technology. In addition, differential expression of the identified miRNAs was analyzed, and the function of target genes for these miRNA were predicted by GO annotation and KEGG pathway enrichment analysis. [Result] From these data we identified known miRNAs from the library of beetle's epidermis, fat body, midgut and trachea with nematodes (780+802+617+762), and without nematodes (784+723+713+837). The prediction of target genes function for these miRNAs suggested that miRNAs might participate in metabolism regulation and the immune response of the beetle host. [Conclusion] miRNA plays an important regulatory role in the interaction between *M. alternatus* and its nematode sybmiont.

Key words: Monochamus alternatus; Bursaphelenchus xylophilus; symbiosis; miRNA; high-throughput sequencing

收稿日期(Received): 2017-11-02 接受日期(Accepted): 2018-01-16

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1200600); 国家自然科学基金(31572272); 中国科学院创新工程项目(KSCX2-EW-J-2); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-SMC014)

作者简介:宁静,女,硕士研究生。研究方向:化学生态学及分子生态学。E-mail: ningjing_2012@163.com

^{*} 通信作者(Author for correspondence), E-mail: zhaoll@ioz.ac.cn

松墨天牛 Monochamus alternatus Hope, 属鞘翅 目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 墨天牛属 Monochamus, 是松树的主要蛀干害虫, 主要为害衰 弱木、濒死木和新伐木(王玲萍,2004; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek,2008)。在亚洲,松墨天牛与林业 重大外来入侵害虫松材线虫 Bursaphelenchus xylophilus Steiner et Bührer (pine wood nematode, PWN) 建立了共生互作关系(Zhao et al., 2014)。夏季,松 材线虫连续经过卵、繁殖型1~4龄幼虫发育为成虫 并快速繁殖。如遇到低温、干燥或种群密度过高等 不利的环境条件,松材线虫就转型为扩散型3龄幼 虫 L_w;L_w在媒介天牛存在的情况下,进入天牛气管 并转型为扩散型4龄幼虫(dispersal fourth stage larva,L_N)(Tomminen et al.,1991)。L_N随着媒介天牛 从树势衰弱的病死木中转移到新的健康松树上,线 虫在补充营养时离开天牛体内,进入新的寄主松树 中,转型为繁殖型线虫在松树中不断传代,进而导 致松材线虫病的不断扩散与蔓延(Dwinell, 1997; Mamiya, 1983; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008) 因此,从不同角度阐明松墨天牛和松材线虫的互作 机制对于理解松材线虫病的传播扩散机理和发展 新的防控技术至关重要。

从化学生态学的角度来说,松材线虫的传播主要靠松墨天牛产生的脂肪酸类物质、挥发性萜烯类物质、碳氢化合物和 CO₂ 进行调控(郑雅楠等, 2014)。脂肪酸类物质可刺激线虫聚集,挥发性萜烯类物质、部分碳氢化合物以及 CO₂ 对线虫具有吸引作用(Futai,2008; Miyazaki *et al.*,1978; Shuto & Watanabe,1987; Zhao *et al.*,2007)。从分子生物学的角度来讲,天牛与线虫的协同进化使天牛产生了许多不同于其他昆虫的生物学特征。例如,松墨天牛为了适应松材线虫的进入,在 JNK 和 STAT 等免疫通路上产生了许多特异表达的基因(Zhou *et al.*, 2017)。然而,表观遗传因子在松墨天牛—松材线虫互作中的作用鲜有报道。

MicroRNA (miRNA) 是一种有重要功能的非编 码 RNA,成熟 miRNA 约 22 个核苷酸(nt)。它们通 过与靶基因 5'非翻译区(5'UTR)、3'非翻译区(3' UTR) 及编码区(CDS) 结合, 对基因的转录后调控 发挥非常重要的作用(Axtell *et al.*,2011; Bartel & Chen,2004)。在动物体内, miRNA 主要通过"种子 序列"即5′端的2~8个碱基与靶序列互补而实现 对靶基因的调控(Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2005)。在最新的 miRBase 数据库(http:// www.mirbase.org/,release21,October 2017)中,已经 收录了 28645 种 miRNA。对昆虫 miRNA 的研究表 明,其参与调控细胞的增殖、分化、凋亡,以及机体 的生理代谢、免疫防御等几乎所有的生物过程(刘 永平等,2013)。由此可知,对携带和未携带松材线 虫的松墨天牛 miRNA 进行鉴定将有助于研究天 牛---线虫互作的表观遗传分子调控机理。本实验 通过构建8个miRNA文库,并使用illumina 高通量 测序平台进行测序,得到松墨天牛的保守 miRNA 和新 miRNA, 比较研究 8 个小 RNA 库中的 miRNA 表达谱,并预测其潜在的靶基因。由于 miRNA 在物 种进化过程中较为保守,也可为其他鞘翅目昆虫 miRNA 的研究提供参考。

1、材料与方法

1.1 材料

◇ 实验所用松墨天牛成虫于 2015 年 6 月采自浙 江富阳(N30°70′、E119°90′)野外。选取携带松材 线虫的天牛(以 PWN 表示)和不携带松材线虫的 天牛(以 CK 表示)雄虫,在无菌条件下解剖,在放 有无菌水的培养皿中快速冲洗各组织,去掉附着在 组织表面的线虫(对冲洗过组织的无菌水进行镜 检,确定天牛有无携带线虫)。分别完成各个体的 表皮(Epidermis, Ep)、脂肪体(Fat body, Fb)、中肠 (Midgut, Mg)和气管(Trachea, Tr)的取样工作。依 次编号,并放入 EP 管中,冻存于液氮,置于-80 ℃ 保存备用。

1.2 样本 RNA 提取、建库及质量检测

RNA 提取使用 RNeasy Micro Kit 试剂盒(Qiagen,德国)。RNA 提取后,使用 Nano Drop DN-1000 (Nano Drop Technologies,美国)检测样品质量,选 取质量好的样本进行建库。参考转录组数据上传 至 NCBIbioproject PRGNA374773。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 检测文库质量和产量,并用 illuminaHiSeq 2000 系统进行高通量测序,相关检测由深圳华大基 因科技服务有限公司完成。

1.3 数据过滤

去除杂质,去除无插入片段序列、插入片段过

长的序列、低质量序列、polyA 序列和小片段序列, 得到 clean reads。统计小 RNA(sRNA)的序列种类 (用 unique 表示)及序列数量(用 total 表示),并统 计小 RNA 的序列长度分布情况。

1.4 小 RNA 分类注释

对所有小 RNA 与各类 RNA 进行 Genbank(ftp: //ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)比对和注释,由于 某些小 RNA 可能会比对上多个不同 RNA 的注释 结果,按照 rRNAetc>known miRNA>piRNA>repeat> exon>intron 的优先级顺序对 sRNA 进行遍历,去除 重复注释的小 RNA。

1.5 已知 miRNA 比对

通过 blast 将 sRNA 和 miRBase 数据库(http:// www.mirbase.org/)中所有昆虫(去除线虫)miRNA 进行比对,鉴定出已知 miRNA。

1.6 新 miRNA 预测

本实验主要是针对未注释上任何 RNA 且比对 上基因组外显子反义链、内含子、基因间区的小 RNA,通过选用软件 mirdeep (Friedländer *et al.*, 2012)筛选 miRNA 的生物特征而得到。miRNA 初 始转录位点多位于基因间隔区、内含子以及编码序 列的反向重复序列上,其前体具有标志性的发夹结 构,成熟体的形成是由 Dicer 酶的剪切而实现。

1.7 miRNA 差异表达分析

利用 ExpDiff 方法对已知 miRNA 进行差异表 达分析,将携带松材线虫的各组织 miRNA 库(Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、Tr-PWN)和未携带松材线 虫的 miRNA 库(Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK)进 行比对。使用参数 log2-ratio 比较两者共同表达的 miRNA 表达量差异。具体方法:将两个样品(CK 和 PWN)归一化到同一个量级(Zhou *et al.*,2010)。

归一化表达量 = (某一 miRNA 序列数 × 1000000)/总序列数。

对归一化后的数据进行 fold change 和 *P*-value 统计(Audic & Claverie, 1997)。差异表达 miRNA 筛选条件:*P*-value≤0.05 且|fold change|≥1。

1.8 已知 miRNA 的靶基因预测

使用 miRanda (Enright et al., 2003)和 targetscan (Lewis et al., 2003)进行靶基因预测,取交 集或并集作为预测结果。交集都只取相同 miRNA 预测的相同靶基因。

1.9 差异表达的已知 miRNA 的靶基因功能预测

对差异表达的已知 miRNA 靶基因进行 GO 分 析,数据来自 http://www.geneontology.org/。将靶 基因与参考基因进行比较,选择靶基因中显著富集 的几个 GO 功能条目,并筛选出与其显著相关的生 物学功能(Sherlock,2009)。用 KEGG 数据提供代 谢通路信息进行 Pathway 富集分析,当 Qvalue \leq 0.05时,表示差异表达基因在该通路中显著富集 (Kanehisa *et al.*,2008)。

2 结果与分析

2.1 sRNA 测序结果

采用 illuminaHiSeq 2000 系统对 4 个未携带和 4个携带松材线虫的松墨天牛成虫组织样品(Ep、 Fb、Mg、Tr)进行高通量测序。结果(表1)表明,8 个库中未经过滤的原始序列分别为 22100500、 25746674、18042623、23615366、19824853、20166204、 22909595、28461495个。去除低质量 reads 后 Ep-CK 中包含 22073317 个高质量 reads, 过滤去除 3'adapter、5'adapter 和 polyA reads 后得到 21624215 个 clean reads, 为高质量 reads 的 97.97%; 在 Ep-PWN 样本中包含 25620440 个高质量 reads、24777733 个 clean reads, clean reads 为高质量 reads 的 96.71%; 在Fb-CK 样本中包含 18019573 个高质量 reads、 16545231个 clean reads, clean reads 为高质量 reads 的 91.82%;在 Fb-PWN 样本中包含 23544786 个高 质量 reads、23076468 个 clean reads, clean reads 为 高质量 reads 的 98.01%;在 Mg-CK 样本中包含 19800737 个高质量 reads、18946038 个 clean reads, clean reads 为高质量 reads 的 95.68%;在 Mg-PWN 样本中包含 20138493 个高质量 reads、18791765 个 clean reads, clean reads 为高质量 reads 的 93.31%; 在 Tr-CK 样本中包含 22882734 个高质量 reads、 20930087个 clean reads, clean reads 为高质量 reads 的 91.47%:在 Tr-PWN 样本中包含 28378622 个高 质量 reads、27990568 个 clean reads, clean reads 为 高质量 reads 的 98.63%。

样品 Samples	原始测序数据 /个 Raw reads	高质量数据 /个 High quality	无 3'接头序列 /个 3'adapter null	无插入片段 /个 Insert null	有 5′接头污染 /个 5′adapter contaminants	小于 18 nt 的小片段 /个 Smaller than 18 nt	多聚腺苷酸 /个 PolyA	高质量测序数据 /个 Clean reads
Ер-СК	22100500	22073317	89011	1866	13351	344737	137	21624215
Ep-PWN	25746674	25620440	147099	1708	17955	675893	52	24777733
Fb-CK	18042623	18019573	88987	1598	37530	1346128	99	16545231
Fb-PWN	23615366	23544786	79980	1287	10535	376332	184	23076468
Mg-CK	19824853	19800737	74136	8106	14907	757529	21	18946038
Mg-PWN	20166204	20138493	99297	2705	18025	1226693	8	18791765
Tr-CK	22909595	22882734	53241	2025	26830	1870513	38	20930087
Tr-PWN	28461495	28378622	88869	3254	19758	276061	112	27990568

表1 松墨天牛 miRNA 文库测序质量 Table 1 Read quality in the miRNA libraries of *M. alternatus*

Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK分别表示未携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管;Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、Tr-PWN分别表示携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管。

Ep-CK, Fb-CK, Mg-CK, Tr-CK indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the absence of its symbiont, *B. xylophilus*; Ep-PWN, Fb-PWN, Mg-PWN, Tr-PWN indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the presence of its symbiont, *B. xylophilus*.

一般而言,小 RNA 的长度为 18~30 nt,因此可 通过 sRNA 的长度分布图初步判断 sRNA 的类型, 如 miRNA 一般集中在 21 或 22 nt, siRNA 集中在 24 nt, piRNA 集中在 30 nt 等。在本实验中,8 个样 本的小 RNA 长度分布总体相似, 主峰集中于 22 nt (图 1), 说明 miRNA 在样品小 RNA 中所占的比例 较大, 测序质量较好。



图 1 松墨天牛小 RNAs 测序结果长度分布

Fig.1 Length distribution of sequenced small RNAs from *M. alternatus* Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK 分别表示未携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管;Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、 Tr-PWN 分别表示携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管。

Ep-CK, Fb-CK, Mg-CK, Tr-CK indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the absence of its symbiont, *B. xylophilus*; Ep-PWN, Fb-PWN, Mg-PWN, Tr-PWN indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the presence of its symbiont, *B. xylophilus*.

如表 2 所示,通过 SOAP 和 bowtie 将 sRNA 定 位到基因组上,得到各样本小 RNA 文库的总数据 和unique sequences。将可比对的唯一去重复的小 RNA 数据与 Genebank 和 Rfam 数据库中的非编码 RNA(包括 tRNA、rRNA、snoRNA 和 snRNA)进行比 对。最后,剔除其他非编码 RNA 的干扰,分别将 Ep-CK、Ep-PWN、Fb-CK、Fb-PWN、Mg-CK、Mg-PWN、Tr-CK 和 Tr-PWN 中的 2386101、2936382、 1766002、2771045、893938、1090703、1647849、 2441619 种 unique reads 用于接下来 miRNA 分析。 结果表明,在5 类小 RNA 库中, miRNA 的丰度最 高,约 60%(图 2)。

방민 c · ·	序列数量/个	• Total reads	序列种类/种 Unique reads		
作前 Samples	高质量测序数据 Clean reads	比对到的基因组 Genome	高质量测序数据 Clean reads	比对到的基因组 Genome	
Ep-CK	21624215	12302874(56.89%)	2386101	984557(41.26%)	
Ep-PWN	24777733	13674247(55.19%)	2936382	1397225(47.58%)	
Fb-CK	16545231	12493249(75.51%)	1766002	1168380(66.16%)	
Fb-PWN	23076468	15274090(66.19%)	2771045	1558636(56.25%)	
Mg-CK	18946038	11930605(62.97%)	893938	281383(31.48%)	
Mg-PWN	18791765	3631934(19.33%)	1090703	114387(10.49%)	
Tr-CK	20930087	13345491(63.76%)	1647849	612018(37.14%)	
Tr-PWN	27990568	14029728(50.12%)	2441619	886582(36.31%)	

	表 2	比对到松墨天牛基因组的序列数量和种类
Table 2	Unique	reads and total reads mapped to the genome of <i>M. alternatus</i>

Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK分别表示未携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管;Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、Tr-PWN分别表示携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管。

Ep-CK, Fb-CK, Mg-CK, Tr-CK indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the absence of its symbiont, *B. xylophilus*; Ep-PWN, Fb-PWN, Mg-PWN, Tr-PWN indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the presence of its symbiont, *B. xylophilus*.



图 2 携带和未携带松材线虫的松墨天牛中小 RNAs 的分类

Fig.2 Distribution of different small RNA classes in *M. alternatus* in the absence and presence of its symbiont, *B. xylophilus* Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK 分别表示未携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管; Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、 Tr-PWN 分别表示携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管。

Ep-CK, Fb-CK, Mg-CK, Tr-CK indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the absence of its symbiont, *B. xylophilus*; Ep-PWN, Fb-PWN, Mg-PWN, Tr-PWN indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the presence of its symbiont, *B. xylophilus*.

2.2 保守 miRNA 鉴定

通过 blast 将 sRNA 和 miRBase 数据库进行比对,鉴定出已知 miR-NA,8个 sRNA 库中共鉴定出 941 个 miRNA(扫描右侧二维码,查看详



情)。其中,未携带松材线虫的天牛表皮、脂肪体、 中肠、气管鉴定出的 miRNA 数分别为 784、723、 713、837 个,携带松材线虫的天牛表皮、脂肪体、中 肠、气管鉴定出的 miRNA 数分别为 780、802、617、 762个。未携带松材线虫的天牛表皮、脂肪体、中 肠、气管的已知 miRNA 总表达量分别为 792808、 854688、832588、1787879,携带松材线虫的天牛表 皮、脂肪体、中肠、气管的已知 miRNA 总表达量分 别为 409794、240149、55264、1224809。因此,从组 织特异性角度来看,两组气管样本的总表达量远高 于其他样本;从有无携带松材线虫角度来看,未携 带松材线虫的样本 miRNA 总表达量远高于携带松 材线虫的样本。 在鉴定到的已知 miRNA 中,表达量前四的 5p 和 miR-31-5p(表 3)。 miRNA 分别为 miR-281-5p、miR-281-2-5p、miR-10-

表 3 8 个小 RNA 文库中预测出的前 10 位保守 miRNA 及其序列、表达量和同源性 Table 3 Sequences, abundance and homologues of top ten predicted conserved miRNA candidates in eight small RNA libraries of *M. alternatus*

友我 Name	运和 C	表达量 Counts								同源 miRNA
石林 Name) Fyl Sequence	Ер-СК	Ep-PWN	Fb-CK	Fb-PWN	Mg-CK	Mg-PWN	Tr-CK	Tr-PWN	Homologues
miR-281-5p	AAGAGAGCUAUCCGUCGACAGU	37054	14816	47559	7528	43976	66610	107677	74536	bmo-miR-281-5p
miR-281-2-5p	AAGAGAGCUAUCCGUCGACAGU	37054	14816	47559	7528	43976	3239	107677	74536	dan-miR-281-2-5p
miR-10-5p	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGU	21968	18180	9811	6400	15985	651	20631	15169	lmi-miR-10-5p
miR-31-5p	AGGCAAGAUGUCGGCAUAGCU	4210	2119	4125	2413	3761	403	6511	3097	tca-miR-31-5p
bantam	UGAGAUCAUUGUGAAAGCUGAUU	3316	2337	2629	1828	932	116	2666	1592	ame-bantam
miR-8-3p	UAAUACUGUCAGGUAAAGAUGUC	2712	1160	2110	951	289	48	2805	875	aae-miR-8-3p
miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGC	1742	1271	368	295	1184	103	2696	1201	aae-miR-184
miR-10	ACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUU	1447	1744	734	649	1385	50	1242	809	aae-miR-10
miR-71-3p	UCUCACUACCUUGUCUUUCAUG	1302	753	976	486	468	56	1242	809	aae-miR-71-3p
miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	1254	2798	2954	4085	590	62	1765	3420	aae-miR-100

Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK分别表示未携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管; Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、Tr-PWN分别表示携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管。

Ep-CK, Fb-CK, Mg-CK, Tr-CK indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the absence of its symbiont, *B. xylophilus*; Ep-PWN, Fb-PWN, Mg-PWN, Tr-PWN indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the presence of its symbiont, *B. xylophilus*.

2.3 新 miRNA 预测结果

由于松墨天牛基因组测序尚未完成,新 miRNA 的 预测就相对困难。表 4 中的新 miRNA 在 8 个新 miR- NA 库中表达量最高,这些新 miRNA 的长度为 21~

23 nt,最小折叠自由能为-128.9~-189.5 kJ·mol⁻¹。

新 miRNA 名称 最小折叠自由能 序列 Sequence 3p/5p 长度 Length/nt Folding energy/(kJ · mol⁻¹) miR_name AAGAGAGCTATCCGTCGACAGT 22 -154.8novel mir 21 5p novel_mir_25 TACCCTGTAGATCCGAATTTGT 22 -158.6 5p novel_mir_22 TGAGATCATTGTGAAAGCTGATT 3p 23 -134.3CTAACGTTAACATCTGCACCGA $5\mathrm{p}$ 22 -156.9novel mir 153 TCTTTGGTTATCTAGCTGTAT 21 -143.9novel_mir_83 5p novel_mir_26 TTTCCGATAATTTGACTTGAATT 3p 23 -128.9novel_mir_40 TAAATGCACTATCTGGTACGAC 3p 22 -189.5novel_mir_3 TTTTTCGATAGGATTAAAGGCT 22 -169.03p 22 -174.9novel_mir_70 CTAATATTGACATCTGCACCGA 3p novel_mir_45 AAATATCAGCTGGTAATTCTG 21 -152.7 5p

表 4 松墨天牛的 8 个小 RNA 文库中预测出的前 10 位新 miRNA 及其序列和表达量 Table 4 Sequences and abundance of top ten predicted novel miRNA candidates in eight small RNA libraries of *M. alternatus*

2.4 差异表达 miRNA 统计

使用 ExpDiff 法对携带和未携带松材线虫的松 墨天牛各组织进行差异表达分析。结果表明,携带 松材线虫的松墨天牛表皮共同表达的 miRNA 中差 异表达的已知 miRNA 数为 65 个,新 miRNA 数为 34 个;脂肪体中差异表达的已知 miRNA 数为 77 个,新 miRNA 数为 42 个;中肠中差异表达的已知 miRNA 数为 85 个,新 miRNA 数为 22 个;气管中差 异表达的已知 miRNA 数为 43 个,新 miRNA 数为 47个。松墨天牛携带松材线虫后,某些 miRNA 表达 量会显著上调,如 miR-14、miR-279和 miR-312等。

对以上结果进行聚类分析(图 3),发现 Tr-CK 与 Tr-PWN 聚成一类, Mg-PWN、Fb-PWN 和 Ep-PWN 聚成一类, Mg-CK、Fb-CK 和 Ep-CK 聚成一类。此外,对携带与未携带松材线虫的松墨天牛 miRNA 差异表达进行比较分析发现,携带松材线虫的天牛 miRNA 表达量总体下调。





2.5 已知 miRNA 的靶基因预测

从表 5 可看出,携带松材线虫的松墨天牛表皮 (Ep-PWN)的 780 个保守 miRNA 对应 81778 个靶 基因,脂肪体(Fb-PWN)的 802 个保守 miRNA 对应 80868 个靶基因,中肠(Mg-PWN)的 617 个保守 miRNA 对应 27467 个靶基因,气管(Tr-PWN)的 762 个保守 miRNA 对应 80453 个靶基因;未携带松 材线虫的松墨天牛表皮(Ep-CK)的 784 个保守 miRNA 对应 79578 个靶基因,脂肪体(Fb-CK)的 723 个保守 miRNA 对应 79993 个靶基因,中肠(Mg-CK)的 713 个保守 miRNA 对应 75788 个靶基因,气 管(Tr-CK)的 837 个保守 miRNA 对应 79001 个靶 基因。

2.6 差异表达的已知 miRNA 的靶基因功能预测

从图 4 中可发现,这些差异表达 miRNA 靶向的基因功能大都相近,主要在合成、代谢和免疫方面起作用。但其在参与生物过程(biological process)中的细胞过程(cellular process)的基因数量有 12856 个,参与代谢过程(metabolic process)的

基因数量为 9751 个;此外参与催化活性(catalytic activity)、免疫系统过程(immune system process)的基因也相对较多。该结果说明松墨天牛在携带线虫过程中可能影响了自身的代谢和免疫反应。

KEGG 通路富集分析结果(图 5)显示,在表皮 富集差异表达 miRNA 较高的通路中,与微生物感 染有关的通路有 5 个,如致病性大肠杆菌感染 (pathogenic *Escherichia coli* infection)、志贺杆菌病 (shigellosis)等;脂肪体富集差异表达 miRNA 较高 的通路与表皮类似;在中肠富集差异表达 miRNA 较高的通路中,可找到免疫相关通路 NF-κB 信号通 路(NF-kappa B signaling pathway)和 JAK/STAT 信 号通路(JAK/STAT signaling pathway),气管富集表 达 miRNA 较高的通路中主要与代谢相关,包括丙 酮酸代谢(pyruvate metabolism)、糖酵解/糖异生 (glycolysis/gluconeogenesis)、果糖和甘露糖代谢 (fructose and mannose metabolism)以及次生代谢产 物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)。 ,

样品 Samples	软件 Software	miRNA 数量/个 miRNA number	靶基因数量/个 Target gene number	(miRNA::相应靶基因)的个数 Number of miRNA:: corresponding target genes	靶基因位点数量/个 Number of target gene loci
Ep-CK	targetscan	784	84168	23090673	30658299
	miRanda	784	79650	1140474	1180410
	结果 Result	784	79578	1136979	-
Ep-PWN	targetscan	780	84168	32819342	43542773
	miRanda	780	81835	1713607	1773379
	结果 Result	780	81778	1708055	-
Fb-CK	targetscan	723	84168	25544455	33949926
	miRanda	723	80064	1232665	1275401
	结果 Result	723	79993	1228496	-
Fb-PWN	targetscan	802	84168	26483553	34921537
	miRanda	802	80934	1422970	1472281
	结果 Result	802	80868	1418331	f(O) 51
Mg-CK	targetscan	713	84168	15965588	21306456
	miRanda	713	75925	777167	802495
	结果 Result	713	75788	774643	-
Mg-PWN	targetscan	617	84168	13138418	16817728
	miRanda	617	27569	50489	52256
	结果 Result	617	27467	50280	-
Tr-CK	targetscan	837	84168	21037722	27919382
	miRanda	837	79089	1092018	1130923
	结果 Result	837	79001	1088622	-
Tr-PWN	targetscan	762	84168	23531619	30753612
	miRanda	762	80534	1287667	1333347
	结果 Result	762	80453	1282564	-

	表 5	松墨天牛保守 miRNAs 的靶基因预测
Fable 5	Predicted target get	nes of the identified conserved miRNAs in the M. alternatus genome

Ep-CK、Fb-CK、Mg-CK、Tr-CK分别表示未携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管;Ep-PWN、Fb-PWN、Mg-PWN、Tr-PWN分别表示携带松材线虫的松墨天牛表皮、脂肪体、中肠、气管。

Ep-CK, Fb-CK, Mg-CK, Tr-CK indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the absence of its symbiont, *B. xylophilus*; Ep-PWN, Fb-PWN, Mg-PWN, Tr-PWN indicate epidermis, fat body, midgut and trachea of *M. alternatus* in the presence of its symbiont, *B. xylophilus*.



Fig.4 Result of GO function classification of target genes of differential expression miRNA in M. alternatus



图 5 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析结果 Fig.5 Result of KEGG pathway enrichment analysis of target gene of differential expression miRNA A:表皮 Epidermis; B:脂肪体 Fat body; C:中肠 Midgut; D:气管 Trachea。

3 讨论

本研究在对松墨天牛的 sRNA 进行测序和分 析后发现,8 个 miRNA 文库所有总表达量结果中, 两组气管样本(Tr-CK、Tr-PWN)的总表达量远高于 其他组织样本;未携带松材线虫的样本 miRNA 总 表达量远高于携带松材线虫的样本。这组结果与 后文的差异表达 miRNA 聚类分析结果相符,说明: (1)气管相较于其他组织可能有较为特异的表达模 式,这可能与气管是携带松材线虫的主要器官有 关;(2)携带松材线虫的天牛中下调表达的 miRNA 可能在携带松材线虫过程中起关键作用;(3)在差 异表达聚类热图中,携带松材线虫的 3 个组织(Ep、 Tr、Fb)聚成一类, 说明有无携带松材线虫在表观遗 传角度对松墨天牛的影响较大。

携带松材线虫的松墨天牛中,某些已知 miRNA 表达量会显著升高,如 miR-14、miR279 和 miR-312 等。在果蝇 Drosophila 中,miR-14 的靶基因是 drice 和 sugarbabe,参与细胞凋亡及物质代谢(Varghese et al.,2010; Xu et al.,2003)。miR-279 的靶基因是 nerfin-1,可调控嗅觉神经元(Cayirlioglu et al., 2008),天牛—线虫互作过程中对某些化学信息物 质的感受可能与此有关;miR-279 还可调节果蝇对 CO₂的感觉回路(Hartl et al.,2010),天牛释放 CO₂ 吸引线虫的过程也可能与此有关。miR-312 的靶基 因是 crebA,能影响昆虫表皮几丁质的发育(Burgler & Macdonald,2005)。

在生物过程 GO 分类中,细胞过程、代谢过程 和单组织过程(single-organism process)3 个分类单 元富集水平最高。以往的研究表明,松墨天牛携带 松材线虫过程中具有重要功能的几类物质,如脂肪 酸类物质、碳氢化合物的合成及分解,均属于代谢 过程。本研究结果表明,携带松材线虫的松墨天牛 与未携带松材线虫的松墨天牛具有不同的代谢特 点。在分子功能 GO 分类中,结合(binding)、催化 活性和转运活性(transporter activity)的富集水平最 高;这3 个分类单元均在代谢过程中起重要作用, 进一步证实了 GO 富集的准确性。在 KEGG 富集 分析中,气管的次级代谢产物的生物合成、糖酵解/ 糖异生、丙酮酸代谢及果糖和甘露糖代谢通路的富 集水平均较高,这可能与松材线虫通过进入松墨天 牛的气管来完成扩散传播有关。在中肠富集差异 表达 miRNA 较高的通路中,可找到免疫相关通路 NF-κB和 JAK/STAT 信号通路,可能与松材线虫进 入松墨天牛时导致的松墨天牛免疫反应有关。总 体来说,松材线虫影响了松墨天牛的新陈代谢和免 疫反应,其机理有待日后进一步研究。

致谢:山西大学附属中学校谢武韬同学协助采样 和整理数据,特此表示感谢!

参考文献

- 刘永平,杨静,刘蕴,2013. 昆虫 microrna 的研究进展. 昆 虫学报,56(9):1026-1037.
- 王玲萍, 2004. 松墨天牛生物学特性的研究. 福建林业科 技, 31(3): 23-26.
- 郑雅楠,杨忠岐,王小艺,2014. 松墨天牛携带松材线虫传播的化学生态学机制. 植物保护,40(1):12-15.
- AUDIC S, CLAVERIE J M, 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7(10): 986–995.
- AXTELL M J, WESTHOLM J O, LAI E C, 2011. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, 12(4): 1-13.
- BARTEL D P, CHEN C Z, 2004. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, 5(5): 396-400.
- BRENNECKE J, STARK A, RUSSELL R B, COHEN S M, 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3(3): e85.
- BURGLER C, MACDONALD P M, 2005. Prediction and verification of microRNA targets by moving targets, a highly adaptable prediction method. *BMC Genomics*, 6(1): 88.
- CAYIRLIOGLU P, KADOW I G, ZHAN X, OKAMURA K, SUH G S, GUNNING D, 2008. Hybrid neurons in a microRNA mutant are putative evolutionary intermediates in insect CO₂ sensory systems. *Science*, 319: 1256–1260.
- DWINELL L D, 1997. The pinewood nematode: regulation and mitigation. Annual Review of Phytopathology, 35(1): 153-166.
- ENRIGHT A J, JOHN B, GAUL U, TUSCHL T, SANDER C, MARKS D S, 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. Genome Biology, 5(1): R1.
- FRIEDLÄNDER M R, MACKOWIAK S D, LI N, CHEN W, RAJEWSKY N, 2012. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 40(1): 37–52.
- FUTAI K, 2008. Host preference of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) and *B. mucronatus* shown

by their aggregation to pine saps. *Applied Entomology & Zo-ology*, 15(3): 193-197.

- HARTL M, LOSCHEK L, KADOW I G, 2010. Prospero and miR-279 regulate CO₂ sensory circuit formation in *Drosophila. Journal of Neurogenetics*, 24(Suppl.1): 9-10.
- KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, HATTORI M, HIRAKA-WA M, ITOH M, 2008. Kegg for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*, 36: 480–484.
- LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P, 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120 (1): 15-20.
- LEWIS B P, SHIH I H, JONES-RHOADES M W, BARTEL D P, BURGE C B, 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7): 787–798.
- MAMIYA Y, 1983. Pathology of the pine wilt disease caused by Bursaphelenchus xylophilus. Annual Review of Phytopathology, 21(21): 201–220.
- MIYAZAKI M, YAMAGUCHI A, ODA K, 1978. Behaviour of Bursaphelenchus lignicolus in response to carbon dioxide released by respiration of Monochamus alternatus pupa. Nippon Ringaku Kaishi Journal of the Japanese Forestry Society, 60: 203-208.
- SHERLOCK G, 2009. Gene ontology: tool for the unification of biology. Canadian Institute of Food Science & Technology Journal, 22(4): 415.
- SHUTO Y, WATANABE H, 1987. Attractants from a vector, Monochamus alternatus, for the pine wood nematode. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 51(5): 1457 -1458.
- TOMICZEK C, HOYER-TOMICZEK U, 2008. Biology studies relevant to the vector role of *Monochamus* species for pine wood nematode // MOTA M, VIEIRA P. *Pine wilt disease*: A worldwide threat to forest ecosystems. Dordrecht, The Netherlands: Springer: 215-221.

- TOMMINEN J, HALIK S, BERGDAHL D R, 1991. Incubation temperature and time effects on life stages of Bursaphelenchus xylophilus in wood chips. Journal of Nematology, 23(4): 477-484.
- VARGHESE J, LIM S F, COHEN S M, 2010. Drosophila miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe. Genes & Development, 24(24): 2748– 2753.
- XU P, VERNOOY S Y, GUO M, HAY B A, 2003. The Drosophila microRNA miR-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. Current Biology Cb, 13 (9): 790-795.
- ZHAO L, MOTA M, VIEIRA P, BUTCHER R A, SUN J, 2014. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends in Parasitology*, 30(6): 299–308.
- ZHAO L, WEI W, KANG L, SUN J, 2007. Chemotaxis of the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus, to volatiles associated with host pine, Pinus massoniana, and its vector Monochamus alternatus. Journal of Chemical Ecology, 33 (6): 1207-1216.
- ZHOU L, CHEN J H, LI Z Z, LI X X, HU X D, HUANG Y, ZHAO X K, LIANG C Z, WANG Y, SUN L, SHI M, XU X H, SHEN F, CHEN M S, HAN Z J, PENG Z Y, ZHAI Q N, CHEN J, ZHANG Z F, YANG R L, YE J X, GUAN Z C, YANG H M, GUI Y T, WANG J, CAI Z M, ZHANG X Q, 2010. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. *PLoS ONE*, 5(12): e15224.
- ZHOU J, ZHAO L L, YU H Y, ZHANG W, AHMAD F, HU S N, ZHAO L L, ZOU Z, SUN J H, 2017. Comparative analysis of the *Monochamus alternatus* immune system. *Insect Science*. DOI:10.1111/1744-7917.12453.

(责任编辑:杨郁霞)