

室内饲养与野外采集的松墨天牛幼虫 microRNA 表达谱比较分析

杨炳琰^{1,2}, 赵莉茵^{1,2*}

¹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;

²中国科学院生物互作卓越创新中心, 中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】昆虫随着生长环境的变化常常会有不同的生物学特性,其表观遗传调控机制研究值得关注。松墨天牛是松树萎焉病中松材线虫的媒介昆虫,但松墨天牛在实验室饲养和野外的不同条件下,其形态及发育速率有较大的区别,其表观遗传响应机制并不明确。通过比较分析 microRNA 表达谱揭示室内饲养和野外采集松墨天牛幼虫之间的差异,以期对松墨天牛幼虫的表观遗传研究提供参考。【方法】使用 illuminaHiSeq 2000 平台进行 microRNA 高通量测序,得到了实验室饲养和野外采集松墨天牛老熟幼虫的表皮、中肠 microRNA 库。鉴定保守 microRNA 和预测新 microRNA,并对 microRNA 进行差异表达分析、靶基因预测、靶基因 GO 注释和 KEGG 功能富集分析。【结果】在室内饲养的松墨天牛表皮、中肠中分别鉴定出 16、14 个 microRNA;在野外生存的松墨天牛表皮、中肠中均鉴定出 13 个 microRNA。与表皮相比,中肠的 miRNA 的表达量更高。与野外采集相比,在室内饲养天牛的 microRNA 表达量更高。17 个 microRNA 表达量在室内饲养与野外采集的天牛之间有显著差异,比如 novel-mir-62127、novel-mir-184731、novel-mir-290819 等有明显上调,novel-mir-251851 等明显下调。差异表达的 miRNA 的靶基因的功能主要富集在氨基糖代谢、几丁质代谢等糖代谢和甘油磷脂代谢、脂肪酸代谢等脂代谢过程。【结论】室内饲养和野外采集松墨天牛老熟幼虫的 microRNA 库存在明显差异,且不同的组织 microRNA 表达谱存在明显差异,提示经历室内恒定培养条件的松墨天牛具有表观遗传调控特征,为进一步研究松墨天牛发育、代谢的 microRNA 调控机制奠定了基础。



开放科学标识码
(OSID 码)

关键词: 松墨天牛幼虫; 高通量测序; 野生; 室内饲养; microRNA

Comparative analysis of miRNA expression profiles of artificially reared and field-collected *Monochamus alternatus* larvae

YANG Bingyan^{1,2}, ZHAO Lilin^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ²CAS Center for Excellence in Biotic Interactions, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract:【Aim】Insects show different biological characteristics as they develop under variable environmental conditions, and their epigenetic regulatory mechanisms are worthy of study. The longhorn beetle, *Monochamus alternatus* is a vector of the pinewood nematode, the causal agent of the devastating pine wilt disease. Numerous studies show differences in morphology and development rate of *M. alternatus* larvae between laboratory and field populations, yet their epigenetic response mechanism is not clear. Therefore, this paper aims to describe the difference between these two populations by microRNA expression profiling, in order to provide a reference for epigenetic research in *M. alternatus*.【Method】High-throughput sequencing of microRNA using the illuminaHiSeq 2000 platform resulted in the construction of microRNA libraries from two laboratory-bred and two field-collected beetle populations. The identification of conserved microRNAs and prediction of new microRNAs was also done. In addition, differential expression of microRNA was analyzed, and the function of target genes for these miRNA was predicted by GO annotation and KEGG pathway enrichment.

收稿日期(Received): 2019-11-06 接受日期(Accepted): 2020-01-21

基金项目: 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-SMC014); 国家自然科学基金面上项目(31572272)

作者简介: 杨炳琰, 女, 硕士研究生。研究方向: 化学生态与入侵生物学。E-mail: yangby815@163.com

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

ment analysis. 【Result】 A total of 16 and 14 microRNA were identified in the epidermis and midgut of indoor-reared larvae, respectively, while 13 microRNA each were identified in the epidermis and midgut of the field-collected larvae. Compared to the epidermis, miRNA expression in the midgut was higher. Compared to the wild population, the expression of microRNA in the *M. alternatus* in the laboratory-reared colony was higher. Here, 17 microRNA expression levels changed significantly, such as novel-mir-62127, novel-mir-184731, novel-mir-290819 were significantly up-regulated, and novel-mir-251851 were significantly down-regulated. The function of the target gene of the differentially expressed miRNA mainly points to sugar metabolism such as amino sugar metabolism, chitin metabolism, and lipid metabolism, mainly those of glycerophospholipid and fatty acids. 【Conclusion】 There were obvious differences in the microRNA inventory between field-collected and laboratory-bred mature larvae of *M. alternatus*, and the microRNA expression profiles of different tissues were also significantly different. It is suggested that *M. alternatus* under laboratory-reared conditions has the characteristics of epigenetic regulation. This lays the foundation for further studying the microRNA regulation mechanism not only for *M. alternatus*' development and metabolism, but may also uncover similar patterns of epigenetic differences between wild and laboratory populations for other insects reared for research purposes.

Key words: *Monochamus alternatus* larvae; high-throughput sequencing; wild environment; indoor rearing; miRNA

松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 又名松褐天牛, 属鞘翅目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 沟胫天牛亚科 Lamiinae 墨天牛属 *Monochamus* (宋士涵和崔锡明, 1991)。寄主有马尾松 *Pinus massoniana* Lamb.、黑松 *P. thunbergii* Parl.、湿地松 *P. taeda* L.、云南松 *P. yunnanensis* Franch. 等, 也会危害雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don、冷杉 *Abies fabri* (Mast.) Craib 和落叶松 *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen (吕传海等, 2000), 是林业上重要的蛀干害虫。松墨天牛幼虫时期钻蛀树干和大枝条, 取食韧皮部与木质部 (Wu *et al.*, 2016), 虫口密度较大时可导致松树死亡。此外, 松墨天牛还是国际公认的重要检疫性有害生物松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Bühner) Nickel 的主要传播媒介, 威胁全球森林生态系统 (徐华潮等, 2012)。自 20 世纪 80 年代初松材线虫侵入我国境内, 松墨天牛协助松材线虫扩散, 最终暴发成灾, 使松材线虫病成为我国最危险的林业病害 (骆有庆, 2001)。

松墨天牛的老熟幼虫化蛹时, 会吸引大量松材线虫向其聚集, 聚集在蛹室的 4 龄线虫被松墨天牛携带, 随着天牛补充营养或产卵侵染到健康的松树中 (杨宝君等, 2003; Zhao *et al.*, 2014)。此外, 调节线虫和松墨天牛发育的信息素 ascarosides 在野外松墨天牛老熟幼虫体内起重要作用 (Zhao *et al.*, 2016)。因此, 对松墨天牛幼虫期的研究将有助于研究松材线虫和松墨天牛的种间互作及 ascarosides 的合成机理, 并有助于松材线虫病的早期监测及传播阻断 (陈井荣和彭小忠, 2014)。然而, 室内饲养与野外捕获的松墨天牛在发育速率、产卵、寿命、体型大小等方面有较明显的差异 (吴桂康等, 2019;

徐金华等, 2009)。发生这一现象的表观遗传响应机制尚不明确。因此, 本实验通过研究 microRNA 的表达谱, 以期对室内饲养和野外松墨天牛幼虫之间的代谢差异以及对 ascarosides 合成差异的研究提供新的思路与方法。

MicroRNAs (miRNA) 由约 22 个核苷酸 (nt) 组成, 是一类内源性非编码的单链小分子 RNA, 在动植物中广泛表达, 且结构保守 (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Carrington & Ambros, 2003; Lau *et al.*, 2001)。研究发现, 它们在多种生物过程中发挥关键作用, 包括细胞分化、凋亡、增殖和脂肪储存, 并且可能在昆虫对病毒抗性的产生中起作用 (陈研等, 2019; 鲁莎等, 2019; 史宏利等, 2019; Chen *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2003)。因此, 松墨天牛 miRNA 的测序鉴定, 对于室内饲养与野外天牛发育与代谢的表观遗传调控研究将有很大帮助。

本实验通过构建 4 个 miRNA 文库, 2 个南京采集的野外松墨天牛幼虫组织样品和 2 个实验室饲养的松墨天牛幼虫组织样品, 使用 illuminaHiseq 高通量测序, 通过目标序列分类注释, 获得样品中包含的各组分及表达量信息。对未注释的小 RNA 片段进行新 miRNA 的预测; 对保守 miRNA 和新 miRNA 进行差异分析、靶基因预测和靶基因的 GO 功能注释以及 KEGG pathway 注释, 旨在为松墨天牛幼虫发育与代谢的表观调控机制研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野外松墨天牛是 2016 年 10 月于南京 (江苏省

林科院提供)林间捕获的 5 龄老熟幼虫(NJ)。实验室饲养的松墨天牛是在南京采回来的松墨天牛进行实验室(温度 25 °C,湿度 35%,无光照)内饲养 10 代的 5 龄老熟幼虫(LKY)。将 2 种天牛分别在无菌条件下解剖,获得表皮(epidermis, Ep)和中肠(mgmidgut, Mg)的样本。

1.2 文库构建及测序

使用 RNeasy Micro Kit 试剂盒(Qiagen, German)提取总 RNA,并使用 DNaseI 消化 DNA 后,用 Urea-PAGE 纯化总 RNA 中的 sRNA,在纯化后的 sRNA 的 3'末端和 5'末端分别连接特异性的接头,再以已连接接头的 sRNA 为模板,逆转录合成 cDNA,再通过 PCR 扩增,从而完成整个文库制备工作。构建文库,使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 对其进行质量和产量的检测,因为松墨天牛的基因组数据尚未完全公布,所以本文参考光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* Motsch 的基因组数据(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=217634>)。最后用 HiSeq 2000 (illumina®, San Diego, CA, USA)平台对 cDNA 文库测序。一系列检测及测序由深圳华大基因科技有限公司完成。

1.3 数据过滤及分类注释

去掉接头序列、污染、低拷贝、低质量序列,得到可信的 clean reads,统计小 RNA (sRNA) 的序列种类(unique)及序列数量(total),并对 sRNA 做序列的长度和数量统计。将处理后的 clean reads 与各类 RNA 进行 Genbank (<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)和 Rfam11.0 (<http://rfam.janelia.org/>)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 rRNA>known miRNA>piRNA>repeat>exon>intron 的优先级顺序对 sRNA 进行遍历,没有比上任何注释信息的用 unann 表示(Burge *et al.*, 2013)。由于 rRNA 是由 NCBI Genbank 和 Rfam 2 个数据库比对所得,规定这 2 个数据库间的优先级为 Genbank>Rfam11.0。

1.4 已知 miRNA 比对

将 sRNA 和 miRBase 数据库(<http://www.mirbase.org/>)中所有昆虫 miRNAs 进行比对,鉴定样本中保守 miRNA,并预测保守 miRNA 的靶基因(Ambros, 2003; Ana & Sam, 2010, 2013; Griffiths-jones *et al.*, 2006, 2008; Meyers *et al.*, 2009)。

1.5 新 miRNA 预测

新 miRNA 是指在与 miRBase 数据库中所有昆虫 miRNAs 进行比对时,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 mitp(miRNA identification and target prediction pipeline)筛选 miRNA 的生物特征得到的(Friedländer *et al.*, 2008)。

1.6 miRNA 差异表达分析

使用 ExpDiff 方法对 miRNA 进行差异表达分析,将野外采集的松墨天牛的 miRNA 库(NJ)和室内饲养的松墨天牛的 miRNA 库(LKY)的各组织进行比对。对所有数据进行归一化并对数转化。对归一化后的数据进行组间 *t* 检验,差异表达 miRNA 筛选条件: $P\text{-value} \leq 0.05$ 且 $\text{fold change} \geq 2$ (魏明辉等, 2014)。

1.7 miRNA 的靶基因预测及功能预测

使用 miRanda 软件对差异表达的 miRNA 进行生物信息学分析,预测靶基因(Hsu *et al.*, 2008)。将靶基因投射到 Gene Ontology 数据库(<http://www.geneontology.org/>),进行基因 GO 分析(Harris *et al.*, 2004)。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。用 KEGG (Kyoto Encyclopedia Genes Genomes)数据库(<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)提供代谢通路信息进行 Pathway 富集分析,当 $Q\text{-value} \leq 0.05$ 时,表示差异表达基因在该通路中显著富集(Kanehisa *et al.*, 2000, 2008)。

2 结果与分析

2.1 miRNA 测序的结果统计

应用 illumina 测序平台完成野外松墨天牛的表皮(NJ-Ep)和中肠(NJ-Mg)与室内饲养的松墨天牛的表皮(LKY-Ep)和中肠(LKY-Mg)4个样品的 miRNA 测序。经分析,4个库的 clean reads 中, LKY-Ep、NJ-Ep、LKY-Mg、NJ-Mg 的 GC 含量分别为 40.53593%、41.26336%、41.62256%、41.69211%, GC 含量位于 35%~65%之间,说明测序质量好。测序长度集中分布在 21~22 nt 范围内,长度为 22 nt 的 reads 占总 reads 的比例最高。野外采集与室内饲养的松墨天牛的测序片段分布具有明显的相似性。

通过 bowtie 将 sRNA 定位到基因组上,4个库中得到的原始序列分别为 11842208、11528297、11852104、12118488 个,过滤低质量($Q\text{-value} < 30$)

和接头序列后, NJ-Ep 样品中, 高质量 reads 为 11692536 个, clean reads 为 10976643 个, 占高质量 reads 的 93.88%; NJ-Mg 的样本中, 高质量 reads 为 11383034 个, clean reads 为 10750830 个, 占高质量 reads 的 94.45%; LKY-Ep 的样本中, 高质量的 reads 为 11704237 个, clean reads 为 11165380 个, 占高质量 reads 的 95.40%; LKY-Mg 的样本中, 高质量的 reads 为 11965143 个, clean reads 为 11579370 个, 占高质量 reads 的 96.78%。说明测序所获得的数据量大, 测序读长质量高。将得到的所有有效数据比对光肩星天牛的基因组, 发现分别有 25.62%、25.99%、37.06%、33.45% 的 unique sRNA 在 NJ-Ep、NJ-Mg、LKY-Ep、LKY-Mg 中能定位到基因组上。

通过 blast 将 sRNA 与 Genbank 和 Rfam 数据库中的非编码 RNA 进行比对, 包括核糖体 RNA (rRNA)、核仁小 RNA (snoRNA)、核内小 RNA (snRNA)、转运 RNA (tRNA)。筛选和去除其中的其他非编码 RNA 的干扰。其丰度分布如图 1 所示, 可以看出实验室饲养的松墨天牛老熟幼虫的 miRNA 丰度大于野外松墨天牛。

2.2 保守 miRNA 的鉴定

将 sRNA 和 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中所有昆虫 miRNAs 进行比对, 构建保守 miRNA 表达谱。

在 LKY-Ep、LKY-Mg、NJ-Ep、NJ-Mg 的样本中,

鉴定到保守 miRNA 分别为 16、14、13、13 个, 表达量分别为 1509、2296、1301、1621。从组织特异性来看, 中肠比表皮的 miRNA 表达量高; 从室内饲养与野外捕获的角度来看, 室内饲养的松墨天牛 miRNA 表达量更高一些。

通过 miRDeep2 根据比对到基因组上 sRNA 的序列, 识别保守 miRNA 的丰度和表达量情况。在表 1 中列出了在 4 个库中表达量最高的 10 个保守 miRNA。

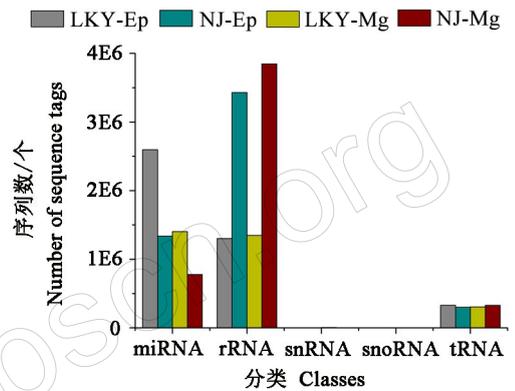


图 1 室内饲养与野外采集的松墨天牛幼虫的小 RNAs 的分类图

Fig.1 Distribution of different small RNA classes in indoor rearing and wild *M. alternatus* larvae

LKY-Ep、LKY-Mg 分别表示室内饲养松墨天牛幼虫的表皮、中肠; NJ-Ep、NJ-Mg 分别表示野外松墨天牛幼虫的表皮、中肠。LKY-Ep, LKY-Mg indicate epidermis, midgut of indoor-raised *M. alternatus* larvae; NJ-Ep, NJ-Mg indicate epidermis, midgut of wild *M. alternatus* larvae.

表 1 松墨天牛幼虫的 4 个库中保守 miRNA 中表达量最高 10 个 miRNA 的序列和表达量

Table 1 Sequences and abundance of top ten conserved miRNA candidates in four small RNA libraries of *M. alternatus* larvae

名称 Name	序列 Sequences	表达量 Counts				同源 miRNA Closet known miRNA
		LKY-Ep	LKY-Mg	NJ-Ep	NJ-Mg	
mir-292569	CUGUCAUGGAGUUGCUCUCUU	172	513	128	407	tca-miR-281-3p
mir-208984	CAUCUCACUACCCAUGUCUUUCA	260	266	216	209	api-miR-71
mir-451248	UCAGGUACCUAAGUAGCGCG	241	287	213	162	nvi-miR-275
mir-292566	AAGAGAGCUAUCCGUCGACAGU	128	388	74	278	dme-miR-281-2-5p
mir-200574	UGGAGUGUGUUAGCUGGUU	186	215	172	139	nvi-miR-34
mir-324927	CGUGAAUUCUUCUAGUGCCAUI	215	191	174	108	dme-miR-263a-5p
mir-434267	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU	164	223	172	147	nvi-let-7
mir-208983	CAUGAAAGACAAGGUAGUGAGA	58	70	50	75	tca-miR-71-3p
mir-421370	UAUUGCACCAAGUCCCGCCUGA	36	70	38	39	tca-miR-92c-3p
mir-34305	GCUCACUCAAGGAGGUUGUGA	24	17	31	17	dvi-miR-307

LKY-Ep、LKY-Mg 分别表示室内饲养松墨天牛幼虫的表皮、中肠; NJ-Ep、NJ-Mg 分别表示野外松墨天牛幼虫的表皮、中肠。

LKY-Ep, LKY-Mg indicate epidermis, midgut of indoor-raised *M. alternatus* larvae; NJ-Ep, NJ-Mg indicate epidermis, midgut of wild *M. alternatus* larvae.

2.3 新 miRNA 的预测及表达量结果

在 LKY-Ep、LKY-Mg、NJ-Ep、NJ-Mg 的样本中,

分别鉴定到 431、514、344、414 个新 miRNA, 表达量分别为 3581、5050、2487、3217。表 2 中是从 4 个文

库中筛选出表达量前 10 位的新 miRNA。

2.4 保守 miRNA 的靶基因预测

用 miRanda 对保守 miRNA 进行靶基因预测, 选取能量值低于 $-84 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 且得分值大于 140 的进行统计, 可得出室内饲养的松墨天牛表皮

(LKY-Ep) 的 16 个保守 miRNA 对应 16673 个靶基因, 中肠(LKY-Mg) 的 14 个保守 miRNA 对应 14451 个靶基因。野外松墨天牛表皮(NJ-Ep) 的 13 个保守 miRNA 对应 13763 个靶基因, 中肠(NJ-Mg) 的 13 个保守 miRNA 对应 13763 个靶基因。

表 2 松墨天牛幼虫的 4 个小 RNA 文库中预测出的前 10 位新 miRNA 及其序列和表达量

Table 2 Sequences and abundance of top ten predicted novel miRNA candidates in four small RNA libraries of *M. alternatus* larvae

新 miRNA New miRNA	序列 Sequences	长度 Length/nt	最小折叠自由能 MFE/(KJ · mol ⁻¹)	校正最小折叠自由能 AMFE/(KJ · mol ⁻¹)
novel-mir-251851	ACTATCTAGCGAAACCACTGCC	22	-75.5	-62.4
novel-mir-205692	CTAACGTTAACATCTGCACCG	21	-31.4	-54.14
novel-mir-62127	ACTTATTCAGTTTGATACAACAGTA	25	-60.6	-48.48
novel-mir-429219	AATTCGAGACCACAATCAGTTA	22	-29.4	-33.41
novel-mir-252069	TTCAGGTCTTCTTACTTCTGCTTCG	25	-50.5	-65.58
novel-mir-293004	TAACTTCTCCACGGCATTTCAGA	22	-31.4	-52.33
novel-mir-205687	TGTGGATGTTAATATTGGAGA	21	-29.7	-46.41
novel-mir-143677	TCTTACGATTTTATAGAACA	21	-26.3	-26.84
novel-mir-263267	TCTTACGATTTTATAGAACA	21	-26.3	-26.84
novel-mir-263263	TATGGTATAAGTGTGTAAGAACGT	25	-26.7	-26.18

LKY-Ep, LKY-Mg 分别表示室内饲养松墨天牛幼虫的表皮、中肠; NJ-Ep, NJ-Mg 分别表示野外松墨天牛幼虫的表皮、中肠。

LKY-Ep, LKY-Mg indicate epidermis, midgut of indoor-raised *M. alternatus* larvae; NJ-Ep, NJ-Mg indicate epidermis, midgut of wild *M. alternatus* larvae.

2.5 差异表达的 miRNA 的靶基因功能预测

保守 miRNA 差异分析发现, 分析到的保守 miRNA 无显著差异。故对所有的 miRNA 进行分析, 在室内饲养后, 中肠的 miRNA 表达量总体高于表皮, 室内饲养的松墨天牛的表达量较高于野外松

墨天牛。某些 microRNA 表达量与野外捕获的天牛有明显变化, 如 novel-mir-62127、novel-mir-184731、novel-mir-290819 明显上调, novel-mir-251851 明显下调(图 2)。

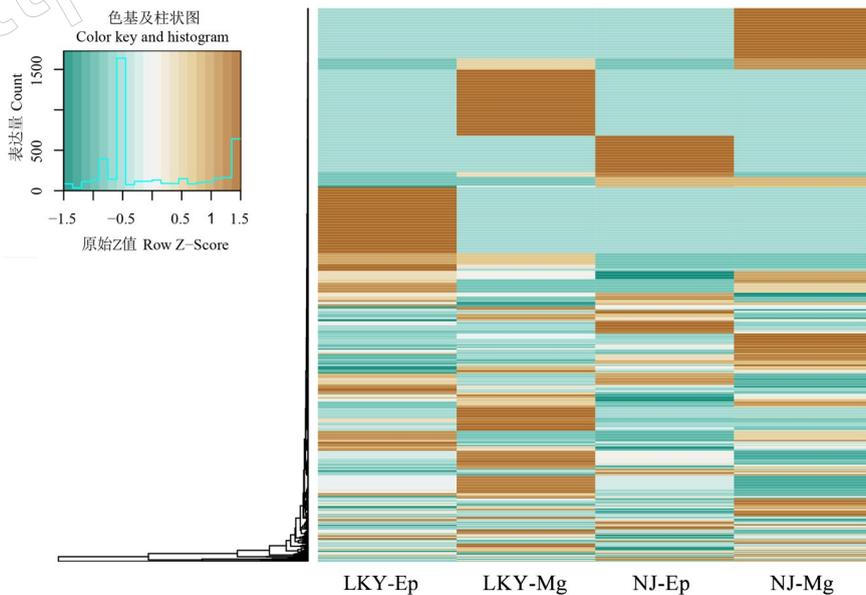


图 2 松墨天牛幼虫 4 个库中差异表达 miRNA 聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of the expression profiles of verified miRNAs in 4 small RNA libraries of *M. alternatus* larvae

LKY-Ep, LKY-Mg 分别表示室内饲养松墨天牛幼虫的表皮、中肠; NJ-Ep, NJ-Mg 分别表示野外松墨天牛幼虫的表皮、中肠。

LKY-Ep, LKY-Mg indicate epidermis, midgut of indoor-raised *M. alternatus* larvae;

NJ-Ep, NJ-Mg indicate epidermis, midgut of wild *M. alternatus* larvae.

从图 3 中可以看出,这些差异表达 miRNA 靶向的基因功能大都相近,主要集中在氧化还原过程、细胞外组分、氧化还原酶活性 3 个分类单元。并且富集到很多代谢途径,如氨基糖、几丁质、含氨基葡萄糖的化合物、碳水化合物代谢途径等。说明室内饲养可能影响了天牛的代谢与形态结构,并且酶活性受到很大影响,如氧化还原酶、几丁质酶、水解酶、酰基辅酶 A 脱氢酶的活性等,可能是由于室内饲养的恒温条件与野外环境变化的温度导致。

KEGG 通路富集分析发现(图 4),室内饲养与野外天牛的表皮和中肠中,代谢水平发生了巨大的变化,如丙酸酯、甘油磷脂、脂肪酸、色氨酸代谢等,说明不同的生活环境对于天牛的代谢有重要影响。

3 讨论

本研究通过高通量测序分析鉴定室内饲养与野外捕获松墨天牛的 miRNA,得到基因序列的注释信息。结果发现,从长度分布上可以看到,主要分

布在 21~23 nt,该长度符合 miRNA 长度分布模式(Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001)。并且在 4 个 miRNA 文库所有表达量结果中,室内饲养后的松墨天牛 miRNA 的表达量高于野外采集天牛,2 组中肠的表达量高于表皮,此结果与宁静等(2018)的结果一致。这可能说明:从表观遗传的角度上,中肠相对表皮组织在冷适应方面响应更强烈,比表皮发挥更多的功能(Hung *et al.*, 2000; Cristofolletti *et al.*, 2003; Matthews *et al.*, 2010)。室内饲养的松墨天牛 miRNA 上调表达可能会通过抑制一些生理过程的基因,从而影响其代谢、发育过程。此外,由于本研究用光肩星天牛的基因组作为 miRNA 的鉴定依据,限制了比对的范围,导致鉴定到的总 miRNA 的数量较少。随着高通量测序以及生物信息学的迅猛发展,待松墨天牛基因组测序完成,对于松墨天牛 miRNA 组学的研究将会更加简便、全面。

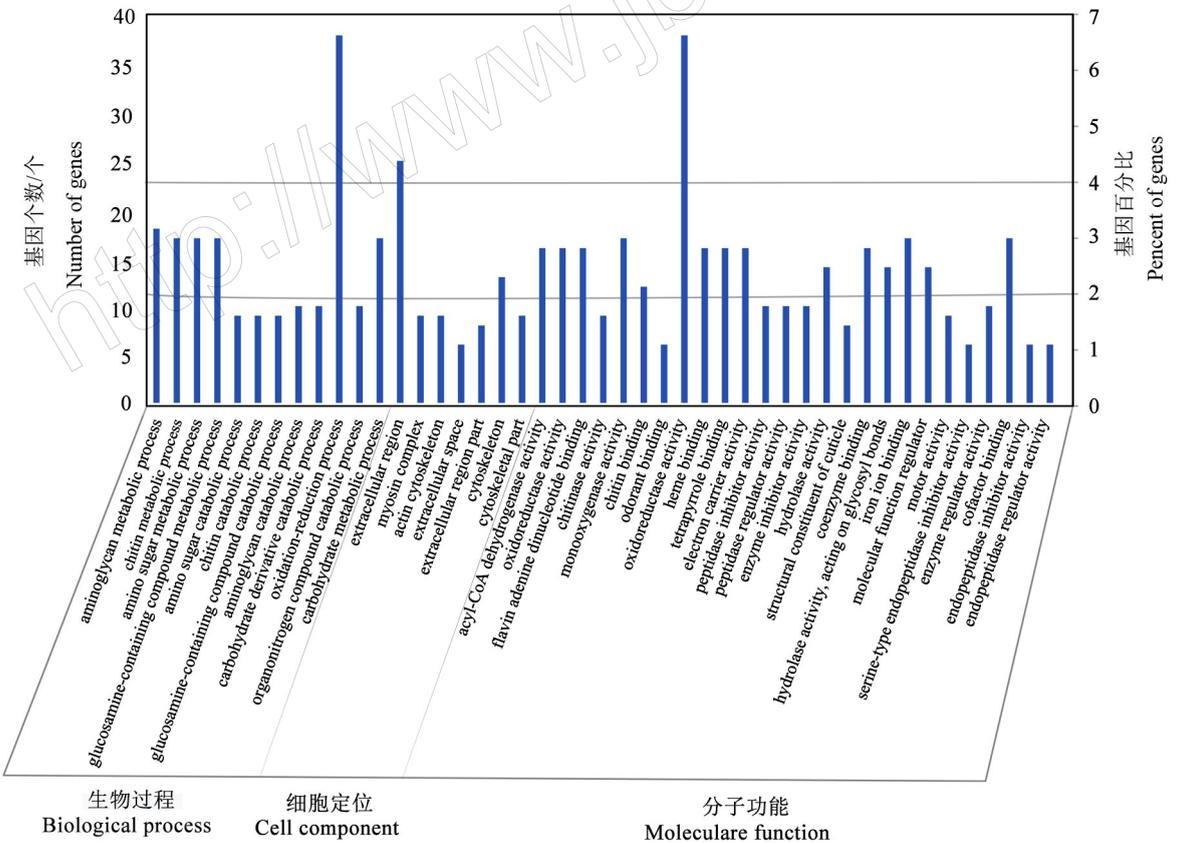


图 3 松墨天牛幼虫差异表达 miRNA 靶基因的 GO 功能分类结果

Fig.3 Result of GO function classification of target genes of differential expression miRNA in *M. alternatus* larvae
 LKY-Ep, LKY-Mg 分别表示室内饲养松墨天牛幼的表皮、中肠;NJ-Ep, NJ-Mg 分别表示野外松墨天牛幼的表皮、中肠。
 LKY-Ep, LKY-Mg indicate epidermis, midgut of indoor-raised *M. alternatus* larvae;
 NJ-Ep, NJ-Mg indicate epidermis, midgut of wild *M. alternatus* larvae.

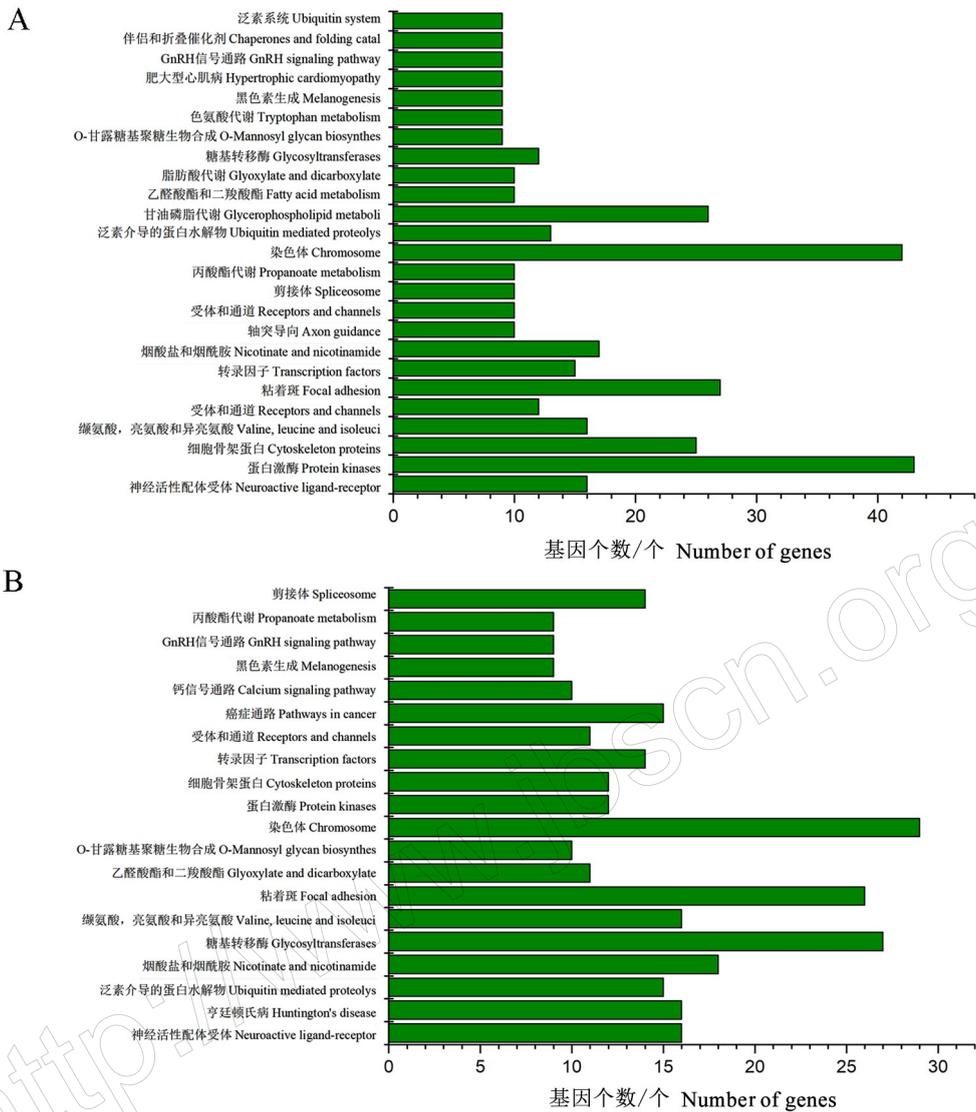


图 4 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析结果

Fig.4 Results of the KEGG pathway enrichment analysis of target genes of differential expression miRNA

A: 室内饲养 (LKY-Ep) 和野外采集 (NJ-Ep) 松墨天牛幼虫的表皮差异 miRNA 的靶基因的 KEGG 功能分析;
B: 室内饲养 (LKY-Mg) 和野外采集 (NJ-Mg) 松墨天牛幼虫的中肠差异 miRNA 的靶基因的 KEGG 功能分析。

A: KEGG function analysis of target genes of differential miRNA in the epidermis of indoor-raised (LKY-Ep) and field (NJ-Ep) *M. alternatus* larvae;
B: KEGG function analysis of target genes of differential miRNA in the midgut of indoor-raised (LKY-Mg) and field (NJ-Mg) *M. alternatus* larvae.

在室内饲养后,有些 miRNA 表达量有明显的变化,比如 novel-mir-62127、novel-mir-184731、novel-mir-290819 明显上调。由于分析得到的差异表达 miRNA 未在昆虫中注释,故比对到其他物种鉴定同源 miRNA。novel-mir-62127 比对到的同源 miRNA 为 osa-miR166i-5p,与耐热性相关,可能由于实验室与野外环境的温度不同 (Liu *et al.*, 2017)。mir-62127 等一系列的具有显著差异的 miRNA,目前在昆虫中未有注释,这些松墨天牛的新 miRNA 可能调节新的靶标基因,具有新的功能。本研究只是一个初步的数据分析,有关基因的挖掘及其表达和功

能验证还需进一步研究。

以往研究发现,室内饲养会很大程度影响松墨天牛的代谢以及形态结构的变化,会使其发育历期缩短,体型变小,产卵量减少 (徐金华等,2009)。GO 功能预测发现,差异基因很多与糖代谢途径相关,比如:氨基糖代谢途径、氨基糖分解代谢过程、几丁质代谢途径、几丁质分解代谢过程、含氨基葡萄糖的化合物代谢途径、碳水化合物代谢途径等代谢途径中有较多的富集,表明实验室饲养对松墨天牛的糖代谢有重要影响,这可能与信息素 ascarosides 的产生或者代谢相关。几丁质代谢途径、几丁

质分解代谢过程的富集意味着在蜕皮时间上有所调控,如野外的松墨天牛幼虫是一年一代,从12月到来年的4月一直处于老熟幼虫期,5月才开始变态发育进行蜕皮,但是在室内恒温培养下发育蜕皮速度加快,一年为3~4代,因此,这2个信号途径有助于进一步探究其在蜕皮速度调控中的功能。在KEGG富集分析中也发现,室内饲养对脂肪酸代谢、甘油磷脂代谢等脂代谢相关过程有影响,这为后续实验提供了思路。利用室内 miRNA 抑制的代谢靶标基因进一步研究及开发代谢抑制剂或干扰剂,可扰乱松墨天牛代谢过程以达到防治目标。所以本研究对野外干扰剂的开发具有一定的指导意义。并且在KEGG通路中发现染色体的富集水平较高,室内外的温度差异可能是对染色体产生影响的主要原因(Bora & Soper, 1971)。总体来说,室内饲养与野外捕获的松墨天牛存在一定的差异,希望本研究结果为后续挖掘两者不同表型的表观遗传调控机制及防治害虫研究提供一定的帮助。

致谢: 江苏省林业科学院帮助采样,特此表示感谢!

参考文献

陈井荣, 彭小忠, 2014. 松墨天牛防治技术综述. 农业灾害研究 (12): 20-22.

陈妍, 郎立敏, 臧树成, 连帅, 徐彬, 杨焕民, 2019. miRNA(miRNA)对细胞凋亡的调控作用. 中国兽医学报, 39(4): 808-812.

陈卓, 2014. 松材线虫病防治措施. 北京农业 (15): 129.

鲁莎, 郭建洋, 席羽, 万方浩, 2019. miRNA 调控昆虫与病毒互作的研究进展. 生物安全学报, 28(2): 89-94.

骆有庆, 2001. 高度重视虫传危险性森林病害——松材线虫病. 昆虫知识, 38(2): 150-128.

吕传海, 濮厚平, 韩兵, 王蒙, 杨琴, 2000. 松墨天牛生物学特性研究. 安徽农业大学学报, 27(3): 243-246.

宁静, 张宾, 田浩楷, 柳小龙, 杨炳琰, 赵莉茜, 2018. 携带与非携带松材线虫的松墨天牛 miRNA 表达谱比较分析. 生物安全学报, 27(1): 20-30.

史宏利, 姜鑫, 徐翠娣, 程群, 2019. mir-124-3p 抑制骨髓间充质干细胞向成骨分化降低骨质量在老年骨质疏松中的作用. 中华内分泌代谢杂志, 35(3): 233-239.

宋士涵, 崔锡明, 1991. 松墨天牛生物学的初步研究. 林业科技通讯 (6): 9-13.

汪海洋, 郑月, 李惠侠, 韩兆玉, 王根林, 2013. 西门塔尔牛肌内和皮下脂肪 miRNA 表达谱及 mir-27b 靶基因分析. 中国农业科学, 46(18): 3894-3900.

魏明辉, 张宗敏, 李琳, 高燕宁, 唐平章, 2014. 喉鳞癌及癌旁正常组织 miRNA 差异表达分析. 中华肿瘤防治杂志, 21(7): 506-508.

吴桂康, 陈章铭, 杨桦, 杨伟, 2019. 云南松林松墨天牛发生规律及生物学特性. 四川林业科技, 40(3): 82-86.

徐华潮, 骆有庆, 张琴, 2012. 松材线虫自然侵染对黑松、马尾松针叶含水量、色素及抗氧化酶活性的影响. 林业科学, 48(11): 143-146.

徐金华, 黄秀凤, 徐华潮, 程剑明, 江勇, 方卫军, 2009. 松墨天牛室内人工饲养及其生物学特性观察. 浙江林业科技, 29(4): 89-91.

杨宝军, 潘宏阳, 汤坚, 王玉嫵, 汪来发, 2003. 松材线虫病. 北京: 中国林业出版社.

AMBROS V, 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3): 277-279.

AMBROS V, 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431: 350-355.

ANA K, SAM G J, 2010. Mirbase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, (S1): 152-159.

ANA K, SAM G J, 2013. Mirbase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* (D1): 68-73.

BARTEL D P, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.

BORA K C, SOPER L, 1971. Influence of temperature on the induction and repair of radiation induced aberrations in the human chromosome. *Genome*, 13(2): 364-368.

BURGE S W, JENNIFER D, RUTH E, JOHN T, LARS B, NAWROCKI E P, EDDY S R, GARDNER P P, BATEMAN A, 2013. Rfam11.0: 10 years of rna families. *Nucleic Acids Research*, 41: 226-258.

CARRINGTON J C, AMBROS V, 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301: 336-338.

CHEN Z, ZENG H, GUO Y, PEI L, 2010. mir-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-myc. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 29(1): 151.

FRIEDLÄNDER M R, CHEN W, ADAMIDI C, MAASKOLA J, EINSPANIER R, KNESPEL S, RAJEWSKY N, 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using mirdeep. *Nature Biotechnology*, 26(4): 407-415.

GRIFFITHSJONES S, GROCOCK R J, DONGEN S V, BATE-

- MAN A, ENRIGHT A J, 2006. MirBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(S1): 140–144.
- GRIFFITHSJONES S, SAINI H K, VAN D S, ENRIGHT A J, 2008. MirBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36: 154.
- HARRIS M A, CLARK J, IRELAND A, LOMAX J, ASHBURNER M, FOULGER R, EILBECK K, LEWIS S, MARSHALL B, MUNGALL C, RICHTER J, RUBIN GM, BLAKE J A, BULT C, DOLAN M, DRABKIN H, EPPIG J T, HILL D P, NI L, RINGWALD M, BALAKRISHNAN R, CHERRY J M, CHRISTIE K R, COSTANZO M C, DWIGHT S S, ENGEL S, FISK D G, HIRSCHMAN J E, HONG E L, NASH R S, SETHURAMAN A, THEESFELD C L, BOTSTEIN D, DOLINSKI K, FEIERBACH B, BERARDINI T, MUNDODI S, RHEE S Y, APWEILER R, BARRELL D, CAMON E, DIMMER E, LEE V, CHISHOLM R, GAUDET P, KIBBE W, KISHORE R, SCHWARZ E M, STERNBERG P, GWINN M, HANNICK L, WORTMAN J, BERRIMAN M, WOOD V, DE LA CRUZ N, TONELLATO P, JAISWAL P, SEIGFRIED T, WHITE R, 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*, 32: 258–319.
- HSU S D, CHU C H, TSOU A P, CHEN S J, CHEN H C, HSU P W, WONG Y H, CHEN Y H, CHEN G H, HUANG H D, 2008. miRNAmap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Research*, 36: 165–169.
- HUNG C N, LIN T L, LEE W Y, 2000. Morphology and ultrastructure of the alimentary canal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (2): the structure of the Midgut. *Aoological Studies*, 39(4): 387–394.
- LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853–858.
- LAU N C, LIM L P, WEINSTEIN E G, BARTEL D P, 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294: 858–862.
- MATTHEWS H J, DOWN R E, AUDSLEY N, 2010. Effects of *Manduca sexta* allatostatin and an analogue on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and degradation by enzymes in the aphid gut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 75(3): 139–157.
- MEYERS B C, AXTELL M J, BARTEL B, BARTEL D P, ZHU J K, 2009. Criteria for annotation of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 20(12): 3186–3190.
- WU S, ZHU X, LIU Z, SHAO E, ZHANG F, 2016. Identification of genes relevant to pesticides and biology from global transcriptome data of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *PLoS ONE*, 11(1): e0147855.
- 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*, 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, ZHANG X, WEI Y, ZHOU J, ZHANG W, QIN P, SATYA C, KONG X, LIU Y, YU H, HU S, ZOU Z, BUTCHER R A, SUN J, 2016. Ascarosides coordinate the dispersal of a plant-parasitic nematode with the metamorphosis of its vector beetle. *Nature Communications*, 7(1): 12341.

(责任编辑:郭莹)