

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2022.01.009

小菜蛾幼虫偏好表达的 microRNA 鉴定及功能研究

白建林^{1,2,3,4}, 林桂芳^{1,2,3,4}, 王 月^{1,2,3,4}, 赵 茜^{1,2,3,4}, 彭 露^{1,2,3,4}, 谢 苗^{1,2,3,4,5},
杨 婕^{1,2,3,4}, 何玮毅^{1,2,3,4*}, 尤民生^{1,2,3,4*}

¹福建农林大学闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福建 福州 350002; ²福建农林大学应用生态研究所, 福建 福州 350002; ³福建农林大学教育部害虫生态防控国际合作联合实验室, 福建 福州 350002; ⁴福建农林大学海峡两岸特色作物安全生产省部共建协同创新中心, 福建 福州 350002; ⁵福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

摘要:【目的】microRNA(miRNA)在昆虫生长发育中发挥重要功能,本研究拟通过鉴定小菜蛾不同发育阶段的 miRNA,挖掘幼虫偏好表达的 miRNA 及其潜在功能。【方法】对小菜蛾卵、3 龄幼虫、蛹和成虫的 miRNA 开展高通量测序,结合生物信息学分析方法,筛选在幼虫期偏好表达的 miRNA;借助实时荧光定量 PCR 技术,验证候选 miRNA 在小菜蛾各发育阶段的表达量;利用软件 RNAhybrid 和 miRanda 预测候选 miRNA 的靶基因,筛选其中与生长发育相关的基因,并通过双荧光素酶报告系统验证靶向关系。【结果】从小菜蛾 4 个发育阶段中,共获得了 2116 个已知 miRNA 和 189 个新 miRNA。经差异表达分析发现,幼虫阶段分别有 265、228 和 132 个 miRNA 的表达量显著高于卵、蛹和成虫。通过荧光定量 PCR 进一步筛选出了 11 个幼虫偏好表达的候选 miRNA,与 miRNA 高通量测序结果一致;靶基因预测结果显示,pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、novel-m502、miR-317-3p、miR-1175-3p、miR-750 和 miR-274 这 7 个 miRNA 靶向保幼激素代谢通路,体外试验结果表明,pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、novel-m502 和 miR-274 与保幼激素酯酶基因有靶向关系。【结论】小菜蛾幼虫偏好表达的 miRNA 可能参与调控了幼虫保幼激素代谢。

关键词: 小菜蛾; 生长发育; 幼虫; miRNA; 保幼激素



开放科学标识码
(OSID 码)

Identification and functional characterization of larval-based microRNAs in the diamondback moth, *Plutella xylostella*

BAI Jianlin^{1,2,3,4}, LIN Guifang^{1,2,3,4}, WANG Yue^{1,2,3,4}, ZHAO Qian^{1,2,3,4}, PENG Lu^{1,2,3,4},
XIE Miao^{1,2,3,4,5}, YANG Jie^{1,2,3,4}, HE Weiye^{1,2,3,4*}, YOU Minsheng^{1,2,3,4*}

¹State Key Laboratory for Ecological Pest Control of Fujian and Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; ²Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; ³Joint International Research Laboratory of Ecological Pest Control, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; ⁴Ministerial and Provincial Joint Innovation Centre for Safety Production of Cross-Strait Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; ⁵College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract:【Aim】MicroRNAs (miRNAs) play important regulatory roles in insect growth and development. In this study, miRNAs preferentially expressed in *Plutella xylostella* larvae were identified, and their potential functions in growth and development were ex-

收稿日期(Received): 2021-11-03 接受日期(Accepted): 2022-01-05
基金项目: 国家自然科学基金项目((31701796、32172503); 福建省自然科学基金项目(2018J01618); 福建农林大学科技创新专项基金(KFA17319A)
作者简介: 白建林, 男, 助理研究员, 博士研究生。研究方向: 外来生物入侵控制。E-mail: 274297150@qq.com
* 通信作者(Author for correspondence), 何玮毅, E-mail: wy.he@fafu.edu.cn; 尤民生, E-mail: msyou@fafu.edu.cn

plored. 【Method】 The small RNA libraries of the eggs, 3rd instar larvae, pupae, and adults of *P. xylostella* were sequenced. Based on bioinformatic analysis, miRNAs preferentially expressed in the larvae were selected and verified by quantitative reverse transcription-PCR. The target genes of the miRNAs were predicted using RNAhybrid and miRanda. miRNAs with potential target genes related to growth and development were selected, and an *in vitro* dual luciferase reporter assay was conducted to test miRNA-mRNA interactions. 【Result】 A small RNA library constructed from the four developmental stages of *P. xylostella* was sequenced on an Illumina sequencing platform, revealing 2116 known and 189 novel miRNAs. A total of 265, 228, and 132 miRNAs showed significantly higher expression in larvae than in eggs, pupae, and adults, respectively. Further selection of 11 miRNAs that were highly expressed in the larvae was verified by quantitative reverse transcription-PCR, which exhibited a larval-based pattern and was consistent with the results of small RNA sequencing. Target gene prediction of these miRNAs showed that seven miRNAs may target the juvenile hormone metabolism pathway. *In vitro* analysis of the miRNA-mRNA interactions illustrated that pxy-miR-6094-3p, pxy-miR-750-3p, novel-m502, and miR-274 can target juvenile hormone esterase genes. 【Conclusion】 Larval-based miRNAs of *P. xylostella* may be involved in juvenile hormone metabolism regulation.

Key words: *Plutella xylostella*; development; larva; miRNA; juvenile hormone

microRNA (miRNA) 是一类内源性非编码 RNA, 长度在 18~25 bp, 在动植物中发挥重要的作用。miRNA 的序列和功能在物种之间高度保守, 是多细胞生物重要的基因表达调控分子之一 (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Oliveira *et al.*, 2019)。成熟的 miRNA 的 5' 端第 2~8 位碱基被称为 miRNA 的“种子序列 (seed sequence)”, 种子序列通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 区以碱基互补配对原则进行结合, 进而调控基因表达 (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993)。Lagos-Quintana *et al.* (2001) 从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出了 22 个 miRNA, 且预测了其中 21 个 miRNA 的前体结构, 并测定了其中 17 个 miRNA 在果蝇不同龄期的表达水平, 这是有关昆虫 miRNA 的最早报道。随着研究的逐步深入, miRNA 在多种昆虫的生长发育、生理代谢和免疫等多种生物学过程中的作用及其分子机理也逐步被解析。据预测, 动物体内有接近 30% 的基因转录表达受到 miRNA 调控 (庞剑会等, 2009)。与其他动物一样, 昆虫体内的 miRNA 也在其转录后调控中发挥着重要作用。

miRNA 对昆虫的变态发育, 包括幼虫孵化、蜕皮、幼虫-蛹-成虫的变态发育过程起重要的调控作用 (Zhang *et al.*, 2009)。Gomez-Orte & Belles (2009) 对在 miRNA 加工过程起关键作用的 Dicer-1 进行 RNA 干扰, 发现其在一定程度上抑制了德国小蠊 *Blattella germanica* (L.) 蜕皮后的变态。miR-2 家族通过保幼激素影响昆虫变态发育 (凌琳, 2017; Lozano-Fernandez *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013), miR-14 通过参与蜕皮激素受体的调节来影响昆虫的蜕皮发育 (Chen & Fu, 2021; He *et al.*, 2019; Jay-

achandran *et al.*, 2013), 家蚕 *Bombyx mori* L. 的 let-7 和 miR-281 也都被证实对其变态发育至关重要 (Jiang *et al.*, 2013; Ling *et al.*, 2014)。此外, 在橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* Hendel、水稻褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 等其他昆虫中, 也都发现 miRNA 在生长发育过程中起到了关键作用 (Peng *et al.*, 2019; Puthiyakunnon *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014)。

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 属鳞翅目菜蛾科, 是十字花科蔬菜上的重要世界性害虫之一。近年来, 化学和生物农药的不合理和泛滥使用, 导致小菜蛾天敌大量减少。迄今, 小菜蛾对包括苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在内的 90 多种杀虫剂都产生了高水平抗性 (尤民生和魏辉, 2007; Baxter *et al.*, 2011)。本研究通过高通量测序获得小菜蛾小 RNA (small RNA, sRNA) 转录组数据, 选取幼虫偏好表达的 miRNA, 结合生物信息学分析获得潜在靶基因, 并通过体外试验验证靶向关系。研究结果将有助于深入解析 miRNA 在小菜蛾生长发育方面的功能, 并为开展小菜蛾的遗传防治提供潜在分子靶标, 为有效防治和持续控制小菜蛾的种群暴发与危害提供新思路 and 途径。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验所用的小菜蛾源于 2004 年 7 月采自福州市郊区新店镇菜地 (26.08°N, 119.28°E) 的自然种群, 此后一直在福建农林大学应用生态研究所温室连续继代培养, 与基因组测序的品系遗传背景一致。用于饲养小菜蛾的寄主植物为生长 1 周的萝

卜 *Raphanus sativus* L. 苗(福州立信种苗), 饲养条件为温度(25 ± 1) °C、相对湿度(65 ± 5)%、光周期 16L:8D, 小菜蛾种群与供试植物在生长期均不使用任何农药。

1.2 样品收集和 RNA 提取

取小菜蛾卵(产卵后 24 h 内)、3 龄幼虫(蜕皮后 12 h 内)、蛹(化蛹后 36~48 h)和成虫(羽化后 12 h 内, 不分性别且未交配), 液氮研磨后用 RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen, 美国) 分别提取总 RNA, 用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测 RNA 纯度及浓度, 取 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.2 以及 A_{260}/A_{230} 大于 2.0 的 RNA, 并以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 用于 sRNA 转录组测序。

1.3 文库构建、Illumina 测序和 miRNA 分析

待测序总 RNA 样本上机检测合格后, 用琼脂糖凝胶电泳法将 18~30 bp 的片段从总 RNA 中纯化分离。然后将 3'-adaptor 和 5'-adaptor 先后连接到分离得到的小 RNA 片段上, 通过反转录和 PCR 反应扩增目标 cDNA 至可以满足高通量测序的使用量, 扩增序列进一步纯化用于构建测序文库。测序由深圳华大基因科技有限公司完成, 使用 Illumina HiSeq 2000 平台, 预计每个 sRNA 文库大小 >5 Mb, 测序得到的原始数据经质量控制后获得 clean reads。

1.4 已知 miRNA 的注释和新 miRNA 的预测

将 clean reads 与 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中收录的全部物种的成熟 miRNA 序列进行比对, 使最大错配数不超过 2 个位点, 提取与已知 miRNA 匹配 16 个碱基以上的 miRNA 片段, 包括可以与已知 miRNA 序列匹配的 sRNA, 同时包含长于或小于比对区域的序列; 将剩余的 sRNA 使用 SOAPalign 比对到小菜蛾基因组上并找到可能的靶基因位置。使用华大基因开发的预测软件 Mireap 通过从目标位点两端延伸序列长度来预测 pre-miRNA 所具有的特征, 也就是二级结构(发夹结构)、Dicer 限制位点和自由能。参数设定: 序列长度为 18~26 bp, miRNA 的参考序列长度为 20~24 bp, Drosha/Dicer 切割位点最小深度为 3, miRNA 最大拷贝数为 20, miRNA 前体的折叠自由能 ≤ -75.36 kJ · mol⁻¹, miRNA 与 miRNA* 之间的最大空间为 35 bp, miRNA 和 miRNA* 的碱基对的最小数量为 14 bp, miRNA 和 miRNA* 的最小碱基匹配数为 4 bp, miRNA/miRNA* 双链体的最大不对称性为 5 bp, 并

且 miRNA 的前体侧翼序列长度为 10 bp。未匹配到 miRBase 中但包含假定的 pre-miRNA 结构的 sRNA 被假定为新的 miRNA, 其也可以被分类为不同的 miRNA 变体组。此外, 使用具有一定长度的已知 miRNA 的第一位和所有已知 miRNA 的每个位置上的碱基偏好性来确定新 miRNA 的可靠性。

1.5 候选 miRNA 在小菜蛾不同龄期的表达检测

取 1 µg 总 RNA, 用 miRNA 反转录试剂盒 miScript II RT kit (Qiagen, 美国) 反转录 miRNA, 用 GoTaq qPCR Master Mix (Promega, 美国) 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 用 Primer 5.0 软件设计引物。

miRNA 的 qRT-PCR 反应使用如下程序: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s。反应结束后确认 qRT-PCR 的扩增曲线和溶解曲线, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达水平。使用混合 cDNA 的 5 倍浓度稀释获得标准曲线, 以小菜蛾 U6 作为内参, 试验进行 3 次生物学重复。

1.6 候选 miRNA 靶基因的预测及互作关系的验证

为预测 miRNA 靶基因, 使用 RNAhybrid 和 miRanda 软件预测 miRNA 的潜在靶基因 (Betel *et al.*, 2008; Kruger & Rehmsmeier, 2006)。其中, RNAhybrid 的能量阈值 energy 设为 -20, miRanda 的比对阈值 score 设为 140, 将两者得出的结果取交集。

根据成熟 miRNA 的序列及其与预测靶基因的互作结合位点序列, 由上海生工生物工程股份有限公司合成 miRNA 的 agomir (激动剂)、agomir NC (随机打乱的核酸序列为模板合成的 agomir 的阴性对照)、互作位点序列 WT 及预测到的靶位点被随机打乱造成的突变序列 MUT。以 Promega pmirGLO 试剂盒中的 Annealing Buffer 来合成野生型及突变序列, 用 SalI 和 SacI 对 pmirGLO 载体进行双酶切, 酶切产物切胶回收后与退火产物用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。经菌液 PCR 和质粒双酶切鉴定后, 将菌液送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序验证, 验证引物序列为 pmirGLO_F: GCGGTGCTGTTGTGTTCGTG; pmirGLO_R: GCTTCCTTTCGGGCTTTGTT。本试验使用哺乳动物 HEK293T 细胞系, 基于双荧光素酶报告系统进行 miRNA 与靶基因的互作分析。细胞用 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养于 37 °C、5% CO₂ 条件下, 提前 1 d 将生长状态良好的细胞铺板于 24 孔板中用于后续转染试验。将

合成的 agomir、agomir NC 分别与野生型 WT 及突变体 MUT 质粒共转染, 根据 QIAGEN Attractene Transfection Reagent 转染试剂说明书, 每个孔中质粒 DNA 含量为 4 μg , miRNA 终浓度为 0.12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组设置 3 个技术重复, 试验进行 3 次生物学重复。转染 48 h 收集细胞, 根据双荧光素酶报告系统试剂盒 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, 美国) 说明书, 对细胞进行裂解, 利用荧光检测仪依次检测萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性, 二者比值作为其相对活性。

1.7 数据分析

试验数据采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 (means $\pm$ SE) 表示, 使用单因素方差分析 one-way ANOVA, $P<0.05$ 表示差异显著。双荧光素酶活性检测结果为萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性比值。所有试验结果均采用 GraphPad Prism 6 和 Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同发育阶段小菜蛾 sRNA 的特征

收集小菜蛾卵、3 龄幼虫、蛹和成虫 4 个发育阶段的样品提取总 RNA, 通过高通量测序技术对小菜蛾 sRNA 文库进行测序, 分别得到 10490541、10969254、15533595 和 4297290 条原始 reads。除成虫外, 其他 3 个发育阶段的总原始序列均大于 10 Mb, 其中高质量 reads 的比例在 91%~97%, 说明该测序质量较好。过滤受污染序列、低质量序列、<18

bp 序列、poly (A) 污染序列等无效序列后, 最终分别获得 9396888、9954981、14551793 和 3930977 bp 的有效序列, 4 个发育阶段的有效序列的比例在 89%~93%, 表明获得了高质量的测序数据。

4 个转录组样品中的 sRNA 长度范围在 18~30 bp。在卵和成虫中以长度为 28 bp 的序列比例最高, 分别占总数的 35.05%和 21.42%; 而在幼虫和蛹中以长度为 22 bp 的序列比例最高, 分别占 19.19%和 22.43% (图 1)。

从小菜蛾的 4 个不同发育阶段的测序结果中发现, 大多数 sRNA 的首位碱基偏向 U (尿嘧啶), 4 个样本中的 24 bp sRNA 的首位碱基都偏向 A (腺嘌呤), 26 bp 的 sRNA 也表现出首位碱基偏向 A 的趋势 (图 2)。

为了鉴别已知的非编码 RNA, 将质量控制后的 reads 与 NCBI 的 nr 数据库和 Rfam 数据库进行比对, 其中, 核糖体 RNA (rRNA) 是所有注释 sRNA 中比例最高的, 在所有 sRNA 中的比例为 7.52%。一般而言, 高质量的动物样本总 rRNA 的比例不超过 40%, 由此可见本研究构建了质量较高的小菜蛾 sRNA 文库。核仁小 RNA (small nucleolar RNA, snRNA) 和核小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 是 sRNA 的重要组成部分, 在本次测序中所占的比例分别为 0.49%和 0.40%, 此外, 仍有 79.02%的 sRNA 没有被注释 (表 1)。

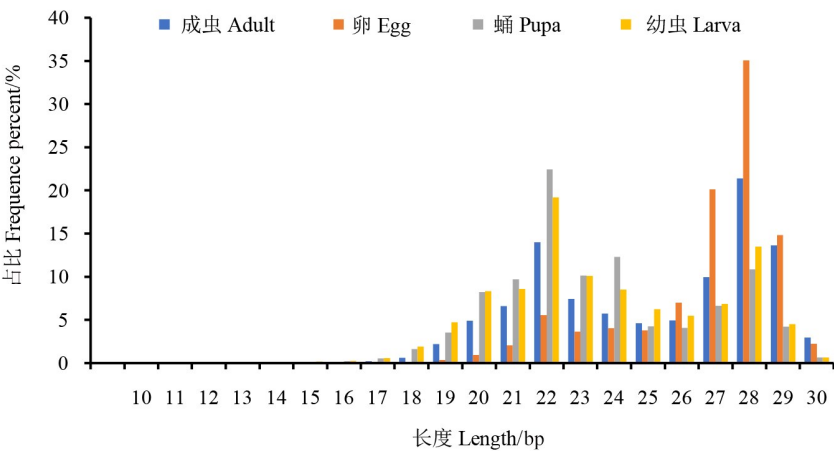


图 1 小菜蛾不同发育阶段 sRNA 长度分布

Fig.1 Length distribution of the sRNAs of different developmental stages of *P. xylostella*

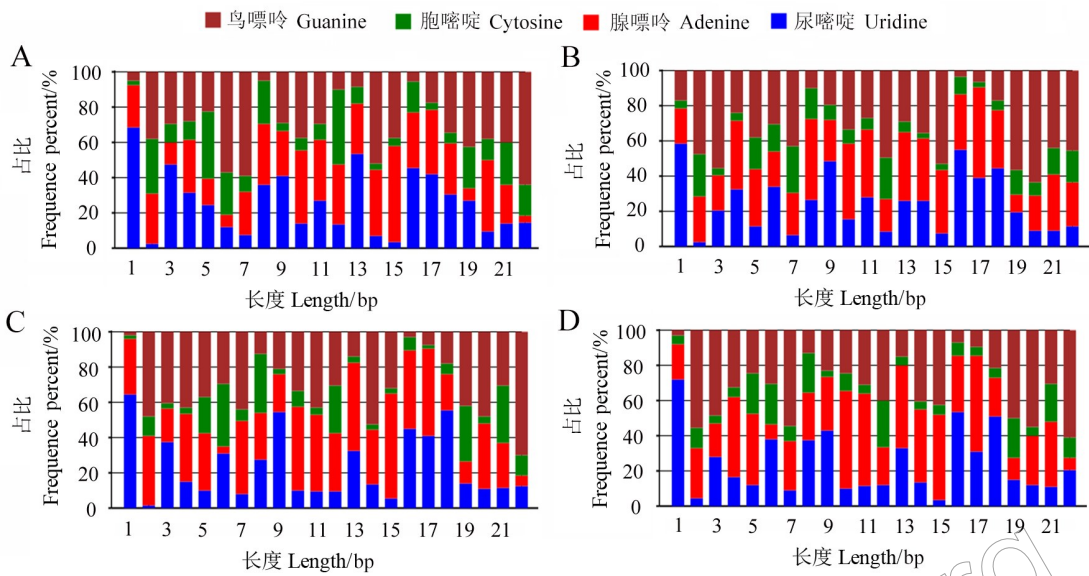


图 2 小菜蛾不同发育阶段 miRNA 首位碱基偏好性
Fig.2 First base bias of the miRNAs of different developmental stages of *P. xylostella*

A: 卵; B: 幼虫; C: 蛹; D: 成虫。
A: Egg; B: Larve; C: Pupa; D: Adult.

表 1 小菜蛾 sRNA 注释结果
Table 1 Annotation of *P. xylostella* sRNA

类型 Category	特有的 sRNA Unique sRNA		总 sRNA Total sRNA	
	数量 Number	占比 Percent/%	数量 Number	占比 Percent/%
外显子反义链 Exon_antisense	196	0.12	199	0.01
外显子正义链 Exon_sense	2094	1.25	2213	0.08
内含子反义链 Intron_antisense	715	0.43	1074	0.04
内含子正义链 Intron_sense	6412	3.83	7305	0.26
小 RNA miRNA	2953	1.76	2053136	74.05
核糖体 RNA rRNA	12589	7.52	58838	2.12
重复序列 Repeat	2832	1.69	3765	0.14
细胞质小 RNA scRNA	150	0.09	476	0.02
核小 RNA snRNA	666	0.40	1070	0.04
核仁小 RNA snoRNA	826	0.49	1858	0.07
核糖体 RNA tRNA	5699	3.40	19348	0.70
未被注释 Unannotated	132286	79.02	623465	22.49
总数 Total	167418		2772747	

2.2 小菜蛾 miRNA 的鉴定和分布

将获得的 clean reads 与 miRBase 和小菜蛾基因组数据进行比对,并进行前体的发夹结构分析,参考此前已经命名的小菜蛾 miRNA 来鉴定已知和新的 miRNA (Etebari *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017)。如图 3 所示,分别从小菜蛾卵、幼虫、蛹和成虫中鉴定出 786、1333、1104、572 个已知的 miRNA,其中在 4 个发育阶段均存在的 miRNA 有 292 个。此外,还从卵、幼虫、蛹和成虫样品中分别鉴定出 98、73、93、72 个新的 miRNA,其中

26 个为 4 个发育阶段共有。有 577 个 miRNA 仅在小菜蛾幼虫阶段表达,有 268、379、110 个 miRNA 分别只在卵、蛹和成虫阶段表达。

选取小菜蛾幼虫与卵、蛹、成虫两两之间均有表达的 miRNA,以两样本间表达量的比值取对数 $|\log_2FC|>1$ 作为筛选条件进行比较分析,结果显示,分别有 265、228 和 132 个 miRNA 在幼虫期的表达量明显高于卵、蛹和成虫(图 3C~E)。与其他 3 个发育阶段相比,幼虫偏好表达的 miRNA 数量明显较多。

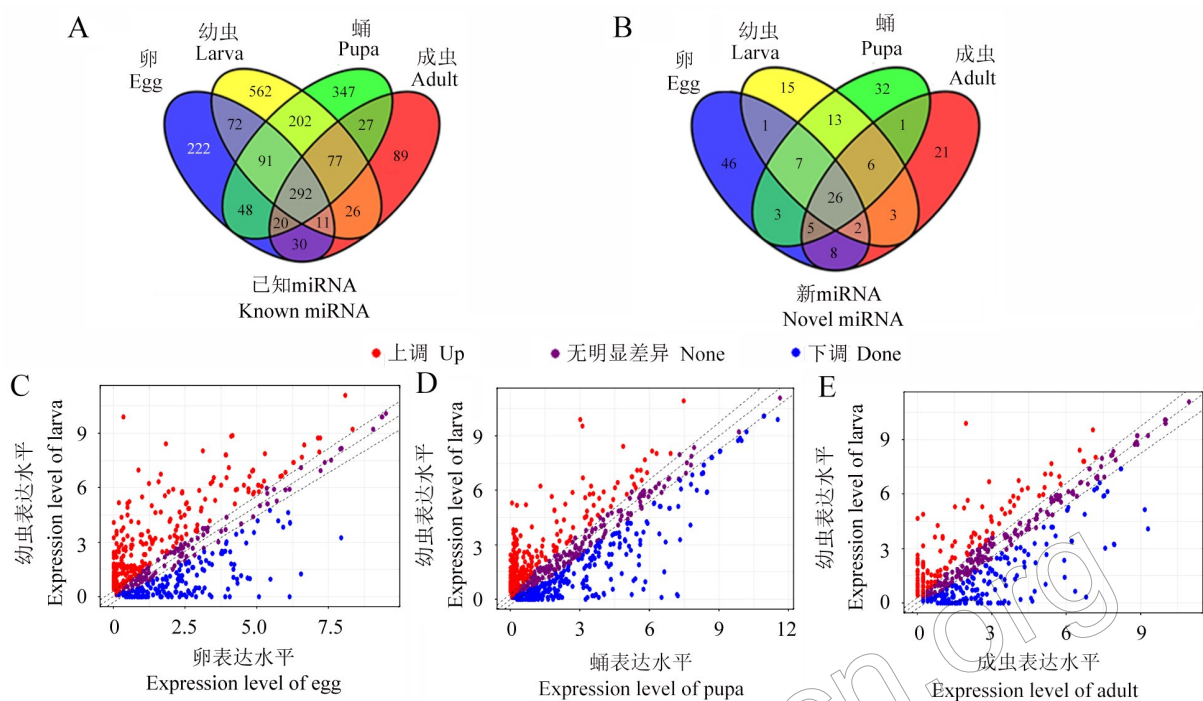


图 3 小菜蛾发育阶段差异表达 miRNA 的分析

Fig.3 Expression analysis of miRNA in different development stages of *P. xylostella*

A、B:分别为已知的和新的 miRNA 在不同样本差异表达的韦恩图;C、D、E:分别为小菜蛾幼虫与卵、蛹、成虫 miRNA 表达量的比较分析。
A, B: Venn diagram of different expression miRNAs among known and novel miRNA samples, respectively;
C, D, E: Comparison of miRNA edpression levels between larva and other stages: egg, pupa and adult, respectively.

2.3 小菜蛾幼虫偏好表达 miRNA 的鉴定

以在小菜蛾幼虫中与其他 3 个龄期均有差异表达为条件筛选 miRNA,选取在幼虫中表达量较高的 25 个 miRNA(图 4),利用 qRT-PCR 定量检测其不同发育时期的表达模式。结果显示,miR-4806-3p 和 miR-317-3p 在小菜蛾 2 和 3 龄的表达量显著高于其他龄期 ($P<0.05$)。此外,miR-281-2-5p、miR-274、miR-750、miR-1175-3p、pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、novel-m502 和 novel-m679 在 4 龄

幼虫的表达量与其他龄期相比也存在显著差异 ($P<0.05$)。miR-1245b-5p 在整个幼虫期的表达量相对高于卵、蛹和成虫期。这 11 个 miRNA 均表现出幼虫偏好表达特征,与 sRNA 测序结果一致,说明这 11 个 miRNA 均可能参与小菜蛾幼虫阶段的生长发育。其中,pxy-miR-750-3p、pxy-miR-6094-3p、novel-m502 和 novel-m679 在幼虫不同发育阶段的表达量呈现上升的趋势,在 4 龄幼虫期表达量达到最高值,到蛹期后表达量均急剧下降(图 5)。

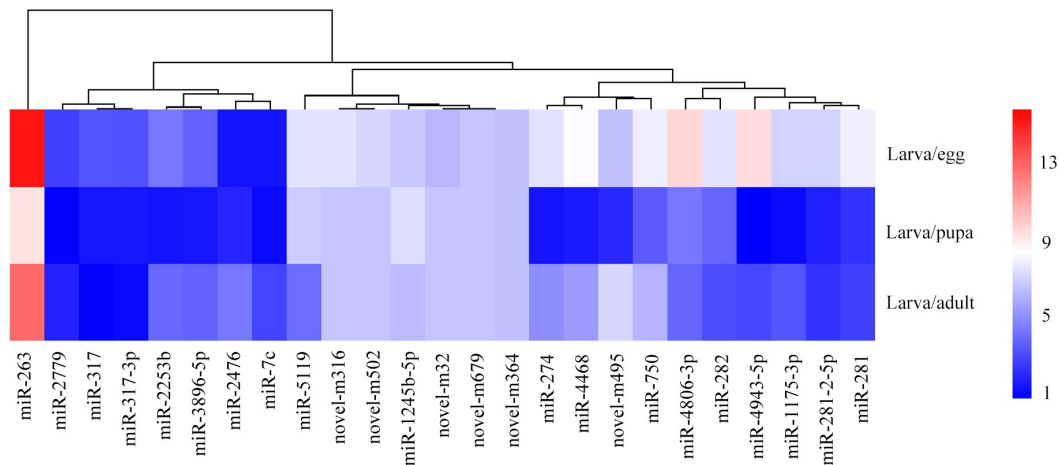


图 4 25 个小菜蛾幼虫与其他发育阶段 miRNA 差异表达的聚类热图

Fig.4 Heatmap of 25 differential expression miRNAs' comparison between larva and other developmental stages

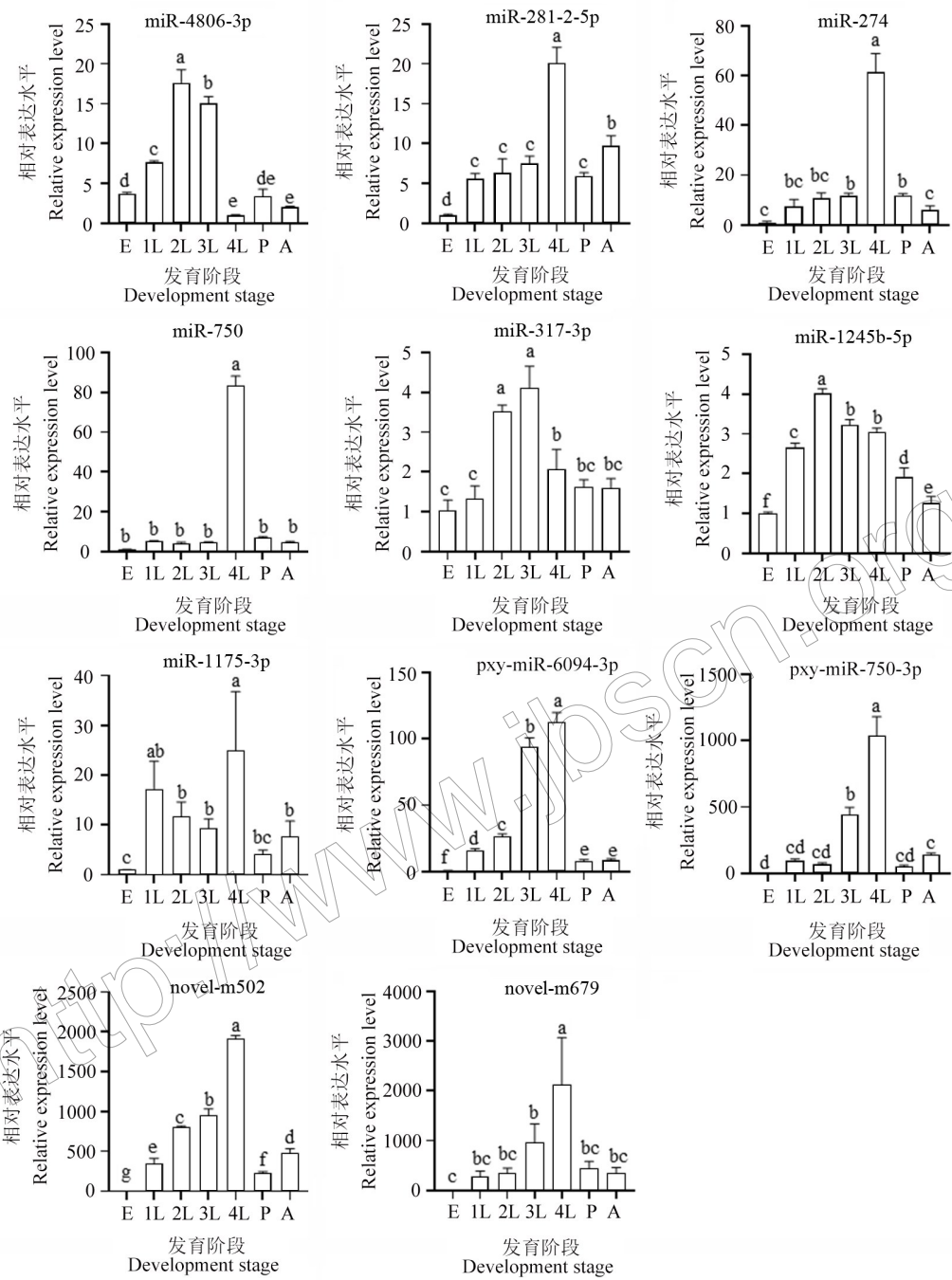


图 5 幼虫偏好 miRNA 在不同发育阶段的表达水平

Fig.5 Expression levels of the selected larva-biased miRNAs in different developmental stages

E: 卵; 1L: 1 龄幼虫; 2L: 2 龄幼虫; 3L: 3 龄幼虫; 4L: 4 龄幼虫; P: 蛹; A: 成虫。

柱上不同字母表示相对表达水平差异显著 ($P < 0.05$, 单因素方差分析, LSD 法)。

E: Egg; 1L: 1st-larva; 2L: 2nd-larva; 3L: 3rd-larva; 4L: 4th-larva; P: Pupa; A: Adult.

Different letters above bars indicate significant difference in the relative expression level ($P < 0.05$, one-way ANOVA, LSD method).

2.4 幼虫偏好表达 miRNA 的靶基因预测和验证

通过预测幼虫偏好表达 miRNA 的靶基因,取交集获得自由能较小且热稳定性较好的潜在靶基因。结果显示,小菜蛾幼虫偏好表达的 miRNA 中有 7 个 (pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、miR-1175-3p、miR-317-3p、miR-274、miR-750 和 novel-m502)均靶向

保幼激素酯酶(juvenile hormone esterase, JHE), pxy-miR-6094-3p 和 miR-317-3p 还同时靶向保幼激素环氧化物水解酶(juvenile hormone epoxide hydrolase, JHEH)(表 2)。JHEH 和 JHE 共同作用,在昆虫中参与终止多种保幼激素信号传导,这几个幼虫偏好表达的 miRNA 可能与调控小菜蛾幼虫发育相关。

通过双荧光素酶报告系统检测转染后的萤火虫荧光素酶值和海肾荧光素酶值,以 Luc/Ren 的比值作为依据,以合成激动剂 miRNA agomir 和靶位点的突变序列 pmirGLO-MUT 共转染 HEK293T 细胞作为对照,体外分析激动剂 miRNA agomir 对 miRNA 结合位点序列 pmirGLO-WT 的影响,用于判断 miRNA 是否会与预测靶位点结合。结果显示:靶向 JHE 的 miRNA 中,pxy-miR-6094-3p agomir、pxy-miR-750-3p agomir、miR-317-3p agomir 和 miR-274 agomir 与其靶基因的靶位点共转染后,其荧光素酶活性与其他 3 个对照组相比显著降低 ($P<0.05$); novel-m502 agomir、miR-1175-3p agomir 和 miR-750 agomir 与对应靶基因的靶位点共转染后与阴性对照 agomir NC 与靶位点的突变体 pmirGLO-MUT 共转染后的酶活性无显著差异 ($P>0.05$)。靶向 JHEH 的 2 个 miRNA (pxy-miR-6094-3p 和 miR-317-3p) agomir 和对应的 JHEH 靶位点共转染后,其荧光素酶活性与对照组相比,没有明显差异 ($P>0.05$) (图 6)。由此表明,pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、miR-317-3p 和 miR-274 能够通过靶基因 CDS 区负调控保幼激素酯酶基因在翻译水平的表达,而 novel-m502、miR-1175-3p 和 miR-750 与 JHE,以及 pxy-miR-6094-3p 和 miR-317-3p 与 JHEH 之间可能不存在靶标关系。

3 讨论

昆虫 miRNA 通过转录抑制或者降解 mRNA 在转录后水平调控基因表达 (Asgari, 2013; Belles *et al.*, 2012; Lucas & Raikhel, 2013),通过对 miRNA 合成和发生作用过程中起到关键作用的 Dicer-1 和 Ago-1 进行干扰和敲除,已证实 miRNA 在昆虫的生长和发育过程中起重要作用 (Azzam *et al.*, 2012; Wynant *et al.*, 2015)。幼虫阶段是小菜蛾危害十字花科蔬菜生产的主要阶段,也是小菜蛾快速生长和

化蛹前准备的关键时期,对小菜蛾幼虫偏好表达的 miRNA 的研究有助于了解和寻找与调控小菜蛾幼虫生长发育相关的 miRNA,进而揭示小菜蛾幼虫基因表达的分子调控机理。

miRNA 成熟体是由前体通过 Dicer 酶切完成的 (鲁莎等, 2019),酶切位点的特异性使 miRNA 成熟体序列的首位碱基有一定的偏向性。本研究对不同龄期小菜蛾进行 sRNA 测序,获得的长度为 22 和 28 bp 的 miRNA 比例较高,与此前报道的多数昆虫的 miRNA 长度基本一致 (沙森, 2015; 孙杨, 2015; 杨兴卓等, 2018)。研究表明,多数 miRNA 序列的 5'端首位碱基具有 U 的偏向性 (Lau *et al.*, 2001);也有研究表明,长度为 24-bp 的 siRNA 趋向于以 A 为 5'端首位碱基 (Czech & Hannon, 2011; Mi *et al.*, 2008),与本研究结果类似。

自从发现 miRNA 在转录后水平上的调控作用以来,miRNA 在特定条件下的表达水平被认为是了解 miRNA 调节功能的先决条件,miRNA 在昆虫不同发育阶段的表达已被证实具有对应的生理生化功能 (Wang *et al.*, 2017)。本研究从小菜蛾卵、幼虫、蛹和成虫中分别鉴定出 786、1333、1104 和 572 个已知的 miRNA,以及 98、73、93 和 72 新的 miRNA。通过对 miRNA 在小菜蛾不同龄期的表达水平的差异分析,发现多数 miRNA 在龄期之间存在特异表达,其中有 577 个 miRNA 仅在小菜蛾幼虫阶段表达;通过比较小菜蛾幼虫与卵、蛹和成虫中 miRNA 的表达,结果显示,与其他发育阶段相比,幼虫偏好表达 miRNA 明显较多。小菜蛾不同发育阶段多种 miRNA 的表达水平具有较大差异,充实了 miRNA 表达在昆虫发育过程中具有时序性特征的理论依据。

表 2 幼虫偏好 miRNA 及其与保幼激素代谢相关的靶基因
Table 2 Larval-based miRNAs and their target genes related to juvenile hormone metabolism

miRNA	预测靶基因 Potential target	注释 Annotations	比数值 Score	能量值 Energy
pxy-miR-6094-3p	Px001687	Juvenile hormone esterase	153	-22.8
pxy-miR-750-3p	Px012592	Juvenile hormone esterase	140	-28.8
novel-m502	Px012592	Juvenile hormone esterase	147	-30.5
miR-317-3p	Px009124	Juvenile hormone esterase	166	-26.5
miR-1175-3p	Px001687	Juvenile hormone esterase	146	-22.4
miR-750	Px007180	Juvenile hormone esterase	144	-25.8
miR-274	Px004818	Juvenile hormone esterase	143	-28.9
pxy-miR-6094-3p	Px013052	Juvenile hormone epoxide hydrolase	149	-25.1
miR-317-3p	Px013052	Juvenile hormone epoxide hydrolase	145	-25.2

qRT-PCR 已经被广泛应用于验证 miRNA 的表达水平,但由于一些客观因素,qRT-PCR 的结果和转录组测序的结果并不一定一致。本研究结果证实,有 11 个 miRNA 在幼虫期的表达量明显高于其他龄期。miR-281-2-5p、miR-274、miR-750、miR-1175-3p、pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、novel-m502 和 novel-m679 在幼虫 4 龄表达量较高,蛹期则显著降低,表明这些 miRNA 有可能参与了小菜蛾幼虫到蛹期的转化的过程。在果蝇中,miR-281-2-5p 也表现出幼虫高表达的现象 (Ruby *et al.*, 2007)。有研究表明,二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 中的 csu-miR-6094 和 csu-miR-281-5p 也表现为幼虫表达量显著高于其他龄期,且从 4 龄幼虫到蛹期,表达量显著降低 (孙杨, 2015)。Zafar *et al.* (2021) 的研究也表明,miR-6094-3p 的表达丰度较高。miR-4806-3p 和 miR-317-3p 在小菜蛾 2 和 3 龄幼虫的表达量显著高于其他各龄期,2~3 龄是小菜蛾发育较快的时期,推测这 2 个 miRNA 可能参与幼虫期蜕皮的过程。miR-1245b-5p 在整个幼虫期的表达量都显著高于其他 3 个时期,幼虫期取食、消化和免疫等过程都比较活跃,miR-1245b-5p 可能参与幼虫期生理生化的调节过程,可能和小菜蛾化蛹和虫态变化相关。

本研究通过预测小菜蛾幼虫偏好表达的 miRNA 潜在靶基因,分析其中靶向保幼激素相关通路基因,结果表明,7 个 miRNA (pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、miR-1175-3p、miR-317-3p、miR-274、miR-750 和 novel-m502) 靶向保幼激素酯酶。双荧光素酶报告系统检测发现,pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、novel-m502 和 miR-274 均与保幼激素代谢通路相关基因有靶向关系。保幼激素酯酶对保幼激素甲酯的水解是保幼激素降解的关键途径,家蚕的胚胎阶段过度表达保幼激素酯酶可导致其更早发生早熟变态 (Tan *et al.*, 2005)。Zhang *et al.* (2017) 通过 CRISPR/Cas9 基因敲除使保幼激素酯酶功能丧失,导致家蚕幼虫期延长。由此推测,pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、miR-317-3p 和 miR-274 可能通过调控保幼激素酯酶影响小菜蛾幼虫阶段的生长发育。

综上,本研究鉴定了 11 个在小菜蛾幼虫期显著高表达的 miRNA,其中,pxy-miR-6094-3p、pxy-miR-750-3p、miR-317-3p 和 miR-274 可通过与保幼激素酯酶基因 CDS 区互作对其表达进行负调控。本研究为阐明 miRNA 介导的小菜蛾生长发育调控

网络及其功能奠定了基础,为筛选小菜蛾遗传防控新靶标提供了线索。miRNA 与靶标基因保幼激素酯酶的互作模式,以及它们共同介导的小菜蛾生长发育的分子调控机制仍有待进一步研究。

参考文献

- 凌琳, 2017. 家蚕发育相关 microRNA let-7 和 miR-2 的功能研究. 博士学位论文. 西安: 西北工业大学.
- 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.
- 庞剑会, 任长虹, 李稚锋, 刘虎岐, 张成岗, 2009. 动物体内 microRNAs 与转录因子及剪接因子之间的相互调控. 生物化学与生物物理进展, 36(2): 151-156.
- 沙森, 2015. 长翅素木蝗, 疣蝗, 日本蚱成虫和若虫 miRNA 的研究. 硕士学位论文. 西安: 陕西师范大学.
- 孙杨, 2015. 二化螟蛋白编码基因和 miRNA 在化蛹和蛹期发育中的功能分析. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 杨兴卓, 张麒麟, 李敏, 贾程琳, 周敏强, 袁明龙, 2018. 栖息于青藏高原不同海拔环境的两种草原毛虫 miRNA 转录组的比较分析. 中国科学: 生命科学, 48(6): 671-683.
- 尤民生, 魏辉, 2007. 小菜蛾的研究. 北京: 中国农业出版社.
- AMBROS V, 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431: 350-355.
- ASGARI S, 2013. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4): 388-397.
- AZZAM G, SMIBERT P, LAI E C, LIU J L J, 2012. *Drosophila* Argonaute 1 and its miRNA biogenesis partners are required for oocyte formation and germline cell division. *Developmental Biology*, 365(2): 384-394.
- BARTEL D P, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281-297.
- BAXTER S W, BADENES-PEREZ F R, MORRISON A, VOGEL H, CRICKMORE N, KAIN W, WANG P, HECKEL D G, JIGGINS C D, 2011. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189(2): 675-679.
- BELLES X, CRISTINO A S, TANAKA E D, RUBIO M, PIULACHS M D, 2012. Insect microRNAs: from molecular mechanisms to biological roles// GILBERT L I. *Insect molecular biology and biochemistry*. Amsterdam: Elsevier: 30-56.
- BELLES X, 2017. MicroRNAs and the evolution of insect metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 62: 111-125.
- CHEN X, FU J, 2021. The microRNA miR-14 regulates egg-laying by targeting EcR in honeybees (*Apis mellifera*). *Insects*, 12(4): 351.
- CZECH B, HANNON G J, 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetics*, 12: 19-31.
- ETEBARI K, HUSSAIN M, ASGARI S, 2013. Identification of

- microRNAs from *Plutella xylostella* larvae associated with parasitization by *Diadegma semiclausum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4): 309–318.
- GOMEZ-ORTE E, BELLES X, 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21678–21682.
- HE K, XIAO H, SUN Y, DING S, SITU G, LI F, 2019. Transgenic microRNA-14 rice shows high resistance to rice stem borer. *Plant Biotechnology Journal*, 17(2): 461–471.
- JAYACHANDRAN B, HUSSAIN M, ASGARI S, 2013. Regulation of *Helicoverpa armigera* ecdysone receptor by miR-14 and its potential link to baculovirus infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2): 151–157.
- JIANG J, GE X, LI Z, WANG Y, SONG Q, STANLEY D W, TAN A, HUANG Y, 2013. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8): 692–700.
- LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T, 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.
- LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5): 843–854.
- LIANG P, FENG B, ZHOU X, GAO X, 2013. Identification and developmental profiling of microRNAs in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *PLoS ONE*, 8(11): e78787.
- LING L, GE X, LI Z, ZENG B, XU J, ASLAM A F, SONG Q, SHANG P, HUANG Y, TAN A, 2014. MicroRNA Let-7 regulates molting and metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 53: 13–21.
- LOZANO-FERNANDEZ J, MONTAÑEZ R M, BELLES X, 2015. MiR-2 family regulates insect metamorphosis by controlling the juvenile hormone signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(12): 3740–3745.
- LUCAS K, RAIKHEL A S, 2013. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1): 24–38.
- MI S, CAI T, HU Y, CHEN Y, HODGES E, NI F, WU L, LI S, ZHOU H, LONG C, 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis argonaute* complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1): 116–127.
- OLIVEIRA A C, BOVOLENTA L A, ALVES L, FIGUEIREDO L, RIBEIRO A O, CAMPOS V F, LEMKE N, PINHAL D, 2019. Understanding the modus operandi of microRNA regulatory clusters. *Cells*, 8(9): 1103.
- PENG W, ZHENG W, TARIQ K, YU S, ZHANG H, 2019. MicroRNA Let-7 targets the ecdysone signaling pathway *E75* gene to control larval-pupal development in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Science*, 26(2): 229–239.
- PUTHIYAKUNNON S, YAO Y, LI Y, GU J, PENG H, CHEN X, 2013. Functional characterization of three microRNAs of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Parasites & Vectors*, 6(1): 1–10.
- RUBIO-SOMOZA I, CUPERUS J T, WEIGEL D, CARINGTON J, 2009. Regulation and functional specialization of small RNA-target nodes during plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5): 622–627.
- TAN A, TANAKA H, TAMURA T, SHIOTSUKI T, 2005. Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 11751–11756.
- WANG X, LI Y, ZHANG J, ZHANG Q, LIU X, LI Z, 2017. De novo characterization of microRNAs in oriental fruit moth *Grapholitha molesta* and selection of reference genes for normalization of microRNA expression. *PLoS ONE*, 12(2): e0171120.
- WANG Y, YANG M, JIANG F, ZHANG J, KANG L, 2013. MicroRNA-dependent development revealed by RNA interference-mediated gene silencing of *LmDicer1* in the migratory locust. *Insect Science*, 20(1): 53–60.
- WIGHTMAN B, HA I, RUVKUN G, 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5): 855–862.
- YANG M, WEI Y, JIANG F, WANG Y, GUO X, HE J, KANG L, 2014. MicroRNA-133 inhibits behavioral aggregation by controlling dopamine synthesis in locusts. *PLoS Genetics*, 10(2): e1004206.
- ZAFAR J, ZHANG Y, HUANG J, FREED S, SHOUKAT R F, XU X, JIN F, 2021. Spatio-temporal profiling of *Metarhizium anisopliae* — Responsive microRNAs involved in modulation of *Plutella xylostella* immunity and development. *Journal of Fungi*, 7(11): 942.
- ZHANG Y, ZHOU X, GE X, JIANG J, LI M, JIA S, YANG X, KAN Y, MIAO X, ZHAO G, 2009. Insect-specific microRNA involved in the development of the silkworm *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 4(3): e4677.
- ZHANG Z, LIU X, SHIOTSUKI T, WANG Z, XU X, HUANG Y, LI M, LI K, TAN A, 2017. Depletion of juvenile hormone esterase extends larval growth in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81: 72–79.
- ZHU B, LI X, LIU Y, GAO X, LIANG P, 2017. Global identification of microRNAs associated with chlorantraniliprole resistance in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). *Scientific Reports*, 7(1): 1–12.