环境昆虫学报 2025，47（5）：1457-1466
Journal of Environmental Entomology
http://hjkcxb.alljournals.net
doi:10.3969/j.issn.1674-0858.2025.05.11

成印洁，常海龙，刘键柏，毛永凯，李继虎，张建华．玉米MicroRNAs响应草地贪夜蛾取食胁迫的功能分析[J].环境昆虫学报，2025，47（5）：1457-1466．CHENG Yin-Jie, CHANG Hai-Long, LIU Jian-Bai, MAO Yong-Kai, LI Ji-Hu, ZHANG Jian-Hua. Functional analysis of microRNAs in maize responding to feeding stress of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2025, 47（5）：1457-1466.

玉米MicroRNAs响应草地贪夜蛾取食胁迫的功能分析

成印洁[1]，常海龙[1]，刘键柏[1]，毛永凯[1]，李继虎[1]，张建华[2*]
（1.广东省科学院南繁种业研究所，广州 510316；2.山东省农业科学院经济作物研究所，济南 250100）

摘要：草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*是玉米上的一种重大迁飞性害虫，严重危害玉米产量和粮食安全。为阐明玉米响应草地贪夜蛾取食胁迫防御反应的分子机制，利用高通量测序技术对草地贪夜蛾3龄幼虫取食的玉米叶片进行微小RNA（MicroRNAs，miRNA）组学测序并结合生物信息学分析方法对miRNA的靶基因进行了预测和分析。结果显示，在草地贪夜蛾取食1 d和3 d的玉米叶片内，共检测到500个miRNAs。草地贪夜蛾取食诱导1 d后检测到317个miRNAs差异表达，其中93个miRNAs是玉米叶片被草地贪夜蛾取食1 d后特异检测到的；草地贪夜蛾取食诱导3 d后检测到309个miRNAs差异表达，其中90个miRNAs是玉米叶片被草地贪夜蛾取食3 d后特异检测到的。这些差异表达的miRNAs共预测到170 003个靶基因，靶基因主要富集在蛋白质结合、DNA结合和细胞核等区域，这些基因主要富集在肌醇磷酸代谢以及基因剪切相关信号通路上。通过RT-qPCR验证了草地贪夜蛾取食1 d和3 d的玉米叶片上调表达的部分miRNA，与生物信息学预测的结果一致。本研究增加了对草地贪夜蛾取食诱导玉米中miRNAs的差异表达及其调控的信号通路的了解，并进一步揭示了介导昆虫—宿主植物相互作用的复杂调控机制。本研究结果将为miRNAs在调控昆虫与寄主植物相互作用中的功能提供一定的理论基础，并为作物抗虫提供新的调控靶点。

关键词：草地贪夜蛾；玉米；miRNA；肌醇磷酸代谢通路；基因剪切信号通路
中图分类号：Q963　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-0858（2025）05-1457-10

Functional analysis of microRNAs in maize responding to feeding stress of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*)

CHENG Yin-Jie[1], CHANG Hai-Long[1], LIU Jian-Bai[1], MAO Yong-Kai[1], LI Ji-Hu[1], ZHANG Jian-Hua[2*]
(1. Institute of Nanfan & Seed Industry, Guangdong Academy of Science, Guangzhou 510316, China; 2. Institute of Industrial Crops, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China)

Abstract: The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is a major migratory pest of maize, severely endangering maize yield and food security. To elucidate the molecular mechanism of defense responses of maize to *S. frugiperda* feeding stress, microRNA (miRNA) transcriptome sequencing was performed using high-throughput sequencing technology on maize leaves consumed by the 3rd-instar larvae of *S. frugiperda*, combined with bioinformatics analysis methods for prediction and analysis of miRNAs target genes. The results showed that a total of 500 miRNAs were detected in maize leaves after one day (d) and 3 d of *S. frugiperda* feeding. After 1 d of feeding induction, 317 miRNAs were differentially expressed, of which 93 miRNAs were specifically detected in maize leaves post 1 d of *S. frugiperda* feeding. After 3 d of feeding

基金项目：广东省科学院科技发展项目（2020GDASYL-20200103068）；广州市重点研发计划（2024B03J1272）
作者简介：成印洁，女，1989年生，博士研究生，研究方向为农业昆虫与害虫防治研究，E-mail：chengyinjieys@163.com
*通讯作者 Author for correspondence：张建华，男，博士研究生，研究方向为农业昆虫与害虫防治研究，E-mail：zhangjianhua198904@163.com
收稿日期 Received：2025-02-14；修回日期 Revision received：2025-06-08；接受日期 Accepted：2025-06-09

induction, 309 miRNAs were differentially expressed, with 90 miRNAs specifically detected in maize leaves post 3 d of *S. frugiperda* feeding. A total of 170, 003 target genes were predicted for these differentially expressed miRNAs. These target genes were primarily enriched in categories such as protein binding, DNA binding, and cell nucleus. Furthermore, these genes were mainly enriched in signaling pathways related to inositol phosphate metabolism and gene splicing. The upregulated expression of selected miRNAs in maize leaves at 1 d and 3 d post-*S. frugiperda* feeding was validated by RT-qPCR, which was consistent with the bioinformatics predictions. This study enhances our understanding of the differential expression of miRNAs and their regulated signaling pathways in maize induced by *S. frugiperda* feeding, and further reveals the complex regulatory mechanisms mediating insects and host plants interaction. The findings will provide a theoretical basis for the function of miRNAs in regulating insects and host plants interaction and offer new regulatory targets for crop insect resistance.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; *Zea mays*; miRNA; inositol phosphate metabolic pathway; gene splicing signaling pathway

草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*属于鳞翅目夜蛾科灰翅夜蛾属，被联合国粮农组织列为全球十大预警害虫之一。2019年1月，草地贪夜蛾自缅甸入侵我国云南省（杨学礼等，2019）。此后，该害虫在南方地区成功定殖，并在春、夏两季随着季风迁移至长江流域、黄河流域以及东北等玉米、小麦等重要农作物主产区为害（吴孔明，2020）。草地贪夜蛾为杂食性害虫，寄主植物多达350种，尤其偏爱禾本科植物（Montezano *et al.*，2018）。该害虫对玉米的危害最为严重（张磊等，2019a）。有研究表明，与棉贪夜蛾*Spodoptera littoralis*、甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*和棉铃虫*Helicoverpa armigera*等其他鳞翅目害虫相比，草地贪夜蛾在取食玉米过程中表现出更强的适应性，且诱导玉米释放的抗虫挥发物更少，这或许是草地贪夜蛾对玉米危害更为严重的原因之一（De Lange *et al.*，2020）。

玉米是重要的粮食作物、饲料作物和工业原料，在全球范围内广泛种植。在我国，玉米种植面积较大，产量贡献巨大，在农业中具有极其重要的地位。草地贪夜蛾是玉米上的重大迁飞性害虫，玉米苗期受害一般可导致减产10%~25%，严重危害田块甚至造成毁种绝收。

微小RNA（MicroRNA，简称miRNA）是一类内源性的非编码小RNA分子，长度为20~24个核苷酸（Bartel，2004）。成熟的miRNA主要通过与靶基因的3′非翻译区（3′UTR）、编码区以及5′非翻译区（5′UTR）不完全互补结合，可直接靶向功能基因或通过靶向转录因子间接调节下游功能基因，在植物的生长、发育以及对非生物和生物胁迫的反应中发挥着极其重要的作用（Ha and Kim，2014）。多年来，随着高通量测序技术的广泛应用，更多植物中的miRNA被鉴定出来，它们表现出高度的保守性，在植物生长发育以及应对各种逆境胁迫中发挥作用，被认为是植物抵御胁迫反应转录后调控的重要调节元件（Gadhavi *et al.*，2020；Zhou *et al.*，2020；Li *et al.*，2021）。近年来，越来越多的研究表明，miRNA在植物与害虫的相互作用中具有关键调控功能，为害虫的绿色防控提供了新的靶点。

在植物与昆虫漫长的协同进化进程中，植物为了抵御害虫的取食，逐渐构建起一套复杂且高效的防御体系。深入了解昆虫与植物之间的互作机制，对于研发更为有效的害虫防治策略意义重大。探究昆虫对植物的取食偏好、识别机制以及植物相应的防御反应等内容，能够助力选育抗虫性能卓越的作物品种，或者借助植物的天然防御物质来研制新型生物农药，从而减少化学农药的使用量，降低对环境的污染以及对人体健康造成的危害。

近年来，高通量测序技术在植物诱导抗虫反应的研究领域得到了广泛应用，旨在解析植物抗虫次生代谢物的生物合成与调控机制。已有诸多研究借助RNA-seq技术，揭示了不同昆虫取食所诱导的玉米基因转录水平的变化，这些昆虫涵盖了亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*（Wang *et al.*，

2017；Guo *et al.*，2019）、禾谷缢管蚜*Rhopalosiphum padi*（Song *et al.*，2017）、玉米蚜*Rhopalosiphum maidis*（Tzin *et al.*，2015）、东方黏虫*Mythimna separata*（Qi *et al.*，2016；Malook *et al.*，2019）、甜菜夜蛾（Tzin *et al.*，2017）以及地下害虫暗黑鳃金龟*Holotrichia parallela*（Pan *et al.*，2020）。这些研究成果表明，植食性昆虫宿主植物的改变，往往伴随着各类基因家族成员的转录组变化。

目前，利用高通量测序技术来研究草地贪夜蛾取食诱导的玉米防御反应分子调控机制尚不清楚。本研究借助高通量测序技术，探讨玉米内源性miRNA在应对草地贪夜蛾取食胁迫时的调控机制，解析玉米在响应草地贪夜蛾取食胁迫过程中差异表达的miRNA，挖掘与玉米直接防御和间接防御相关的新基因，期望能为设计靶标昆虫行为调控策略提供新思路，推动应用于草地贪夜蛾的绿色防控实践。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物：玉米品种为郑单958，购自山东种业集团有限公司，种植于温室中，温度为26℃，自然光照条件下培养，每2 d浇水1次，16 d后长至4叶期时供试。

供试昆虫：草地贪夜蛾种群采自山东郯城，置于温度为（25 ± 1）℃、相对湿度为（60 ± 10）%、光周期为16 L∶8 D的人工培养箱中，用新鲜玉米饲养，取同批次的3龄初幼虫供试。

1.2 方法

1.2.1 玉米叶片RNA的提取与测序

取4叶期玉米进行活体接虫，相同时间段每株接2头3龄幼虫，接虫后均置于长70 cm × 宽70 cm × 高50 cm的行为箱中，在室内自然条件下让其自由取食，定时检查幼虫是否逃逸或掉落，并及时补回。按照预试验结果，本研究设定接虫时间为1 d和3 d。待取食时间结束后去除幼虫，剪取受害叶片用于RNA提取。以不接虫的玉米苗（1 d和3 d）为对照。分别取上述各处理玉米叶片进行磨样，采用Trizol法提取玉米样品的RNA。使用Nanodrop微量分光光度计和Agilent 2100生物分析仪进行RNA质量检测，取$1.9 < OD_{260}/OD_{280} < 2.1$、RNA完整度值≥ 7.0的样品。

1.2.2 miRNA测序文库构建和测序

miRNA测序文库制备采用TruSeq Small RNA Sample Prep Kits（Illumina，San Diego，USA）试剂盒，按照Illumina公司提供的标准步骤执行。文库制备工作完成后，对构建好的文库使用Illumina Hiseq 2500进行测序，测序读长为单端1× 50 bp。测序由联川生物完成。

1.2.3 生物信息学分析

miRNA的生物信息学分析由联川生物完成，所提供的miRNA数据分析软件是其公司自主开发的ACGT101-miR（LC Sciences，Houston，Texas，USA），该软件的分析流程如下：（1）去除3’接头和垃圾序列：获取清洁读段（clean data）；（2）长度筛选：保留碱基长度在18~25 nt；（3）RNA数据库比对分析：将剩余序列比对（不包含miRNA）mRNA、RFam和Repbase数据库，并进行过滤；（4）miRNA鉴定：获取有效数据，并比对前体和基因组进行miRNA鉴定；（5）miRNA差异性分析；（6）差异性miRNA靶基因预测分析。测序数据上传到NCBI数据库（登录号：GSE247798）。

1.2.4 qPCR验证差异miRNA

将草地贪夜蛾取食1 d和3 d的玉米叶片总RNA用于定量聚合酶链反应（qPCR）分析。未取食的玉米叶片为阴性对照。每个处理3次生物学重复。反转录（试剂盒为GenStar的StarScript III一步法RT-PCR试剂盒（染料））反应程序如下：37℃保持10 min，50℃保持30 min，85℃保持5 min，4℃保温。使用伯乐CFX96 Touch™ qPCR仪以及标准的SYBR Green PCR试剂盒（广州东盛生物技术有限公司）对筛选的5条miRNAs（zma-miR169a-p3、zma-miR319a-3p_R+1、zma-miR156j-5p_R-1、zma-miR166m-5p_L-2R+2和zma-miR169i-p3）的表达量进行验证。miRNA的引物序列见表1，玉米U6小核RNA（snRNA）作为内参基因。反应条件如下：95℃保持5 min，95℃保持5 s，60℃保持10 s（共40个循环），3次技术重复反应，采用$2^{-(\Delta\Delta CT)}$法对表达量进行相对定量分析。采用t-test进行统计学分析，$P < 0.05$被视为具有统计学显著性。

表1 RT-qPCR引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR

微小RNA名称 Name of miRNA	引物 Primer
zma-miR319a-3p_R+1-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGGAGCA
zma-miR156j-5p_R-1-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCTCTC
zma-miR166m-5p_L-2R+2-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCCTCGA
zma-MIR169i-p3-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGTGAGAG
zma-MIR169a-p3-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCAAGAA
zma-miR319a-3p_R+1-F	TCGGCAGGTTGGACTGAAGGG
zma-miR156j-5p_R-1-F	TCGGCAGGTGACAGAAGAGA
zma-miR166m-5p_L-2R+2-F	TCGGCAGGAATGTTGGCTGGC
zma-MIR169i-p3-F	TCGGCAGGGGGTGTACGTTGGT
zma-MIR169a-p3-F	TCGGCAGGCATCGGCAAGTTG
miR-R	TGCAGGGTCCGAGGTATTCGC
U6-F	TACAGATAAGATTAGCATGGCCCC
U6-R/RT	GGACCATTTCTCGATTTGTACGTG

2 结果与分析

2.1 测序数据质量

利用Illumina HiSeq 2500平台对miRNA测序文库进行测序，每个测序文库平均生成1 000~1 300万条原始读段（表2）。Clean reads占原始读段的98%。大部分Clean reads的长度在18~25个核苷酸之间（在22个核苷酸处出现峰值）。这种长度是由Dicer酶加工产生的产物中获取的miRNAs的典型长度。将大小为18~25个核苷酸的RNA序列与玉米的基因组序列进行匹配，以开展分布分析。每个文库中约90%的序列都能定位到玉米的基因组上。

表2 miRNA文库序列统计信息

Table 2 Sequence statistics of the miRNA library

样品 Sample	原始数据 Raw reads	唯一序列 Unique reads	18~25 nt序列 18~25 nt reads	18~25 nt序列（唯一序列） 18~25 nt reads (unique reads)	总小RNA Total sRNA	映射小RNA Mapped sRNA
对照1 CK1	11 561 861（100.00%）	1 669 397	1 122 316	508 345	194 793	4 383
对照3 CK3	13 421 849（100%）	2 295 897	1 450 152	508 492	310 582	7 403
处理1 T1	13 558 934（100%）	2 280 895	2 394 069	897 479	646 247	10 348
处理3 T3	13 635 087（100%）	2 104 354	2 248 695	762 433	734 849	9 383

注：T1，草地贪夜蛾取食1 d的玉米叶片；T3，草地贪夜蛾取食3 d的玉米叶片；CK1，对照组玉米叶片（1 d）；CK3，对照组玉米叶片（3 d）。Raw reads，一次测序产生的所有原始数据；Unique reads，只能比对到一个位置的测序数据；Total sRNA，选择长度为18~25 nt的读数后，每个样本获得的总读数；Mapped sRNA，可以映射到样本读取中参考序列的sRNA读取的数量。Note: T1, Maize leaves consumed by *S. frugiperda* for 1 d; T3, Maize leaves consumed by *S. frugiperda* for 3 d; CK1, Maize leaves in the control group (1 d); CK3, Maize leaves in the control group (3 d). Raw reads, All the raw data generated from a single sequencing run; Unique reads, Sequencing data that could only be aligned to one location; Total sRNA, Total number of reads obtained per sample after selecting the reads with a length of 18~25 nucleotides (nt); Mapped sRNA, Number of small RNA (sRNA) reads that can be mapped to the reference sequence in the sample reads.

2.2 草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片后的miRNAs鉴定

玉米叶片被草地贪夜蛾取食诱导1 d后共检测到317个miRNAs，其中对照组检测到224个miRNAs，包含特异检测到的13个miRNAs；在草地贪夜蛾取食组检测到304个miRNAs，包含特异检测到的93个miRNAs（图1-A）。玉米叶片被草地贪夜蛾取食诱导3 d后共检测到309个miRNAs，其中对照组检测到219个miRNAs，包含特异检测到的9个miRNAs；在草地贪夜蛾取食组检测到300个miRNAs，包含特异检测到的90个miRNAs（图1-B）。

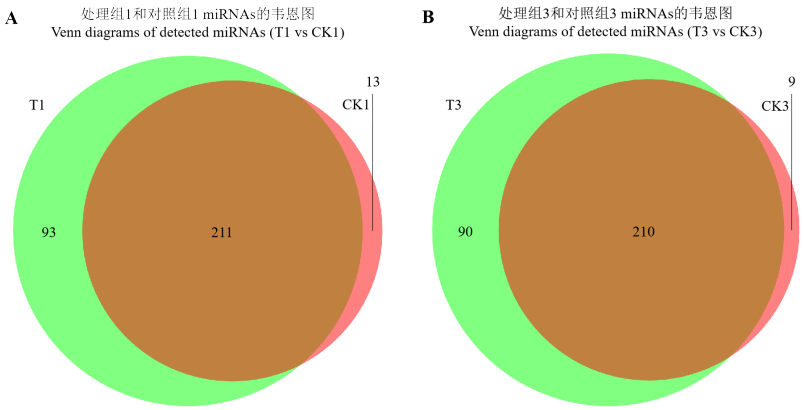

图1 草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片1 d（A）和3 d（B）表达的miRNAs韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of miRNAs expressed in maize leaves induced by *Spodoptera frugiperda* feeding for 1 d (A) and 3 d (B)

注：T1，草地贪夜蛾取食1 d的玉米叶片；T3，草地贪夜蛾取食3 d的玉米叶片；CK1，对照组玉米叶片（1 d）；CK3，对照组玉米叶片（3 d）。Note: T1, Maize leaves subjected to *S. frugiperda* feeding for 1 d; T3, Maize leaves subjected to *S. frugiperda* feeding for 3 d; CK1, Maize leaves in the control group (1 d); CK3, Maize leaves in the control group (3 d).

2.3 草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片的差异表达miRNAs

玉米叶片被草地贪夜蛾取食诱导1 d后，117个miRNAs表达上调（$\log_2$(Foldchange) > 1，FDR < 0.05），42个miRNAs表达下调（$\log_2$(Foldchange) < −1，FDR < 0.05），其中zma-miR169a-p3在玉米叶片被草地贪夜蛾取食诱导1 d后上调表达2.23倍（$\log_2$(Foldchange) > 2，FDR < 0.05）。玉米叶片被草地贪夜蛾取食诱导3 d后，125个miRNAs表达上调（$\log_2$(Foldchange) > 1，FDR < 0.05），64个miRNAs表达下调（$\log_2$(Foldchange) < −1，FDR < 0.05），其中zma-miR169i-p3、zma-miR156j-5p_R-1、zma-miR319a-3p_R+1和zma-miR166m-5p_L-2R+2在玉米叶片被草地贪夜蛾取食诱导3 d后上调表达2倍以上（$\log_2$(Foldchange) > 2，FDR < 0.05）（图2）。

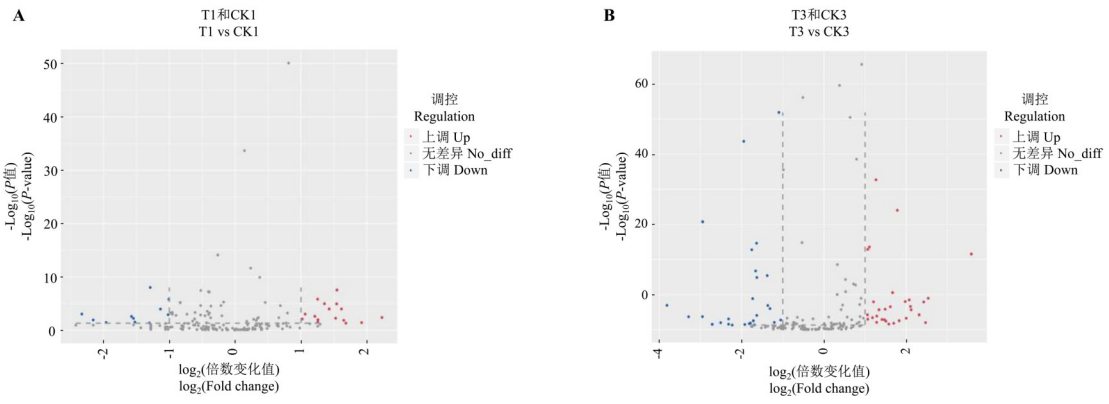

图2 草地贪夜蛾取食诱导玉米1 d（A）和3 d（B）差异表达的miRNAs火山图

Fig. 2 Volcano plots of differentially expressed miRNAs in maize leaves induced by *Spodoptera frugiperda* feeding at 1 d (A) and 3 d (B)

注：T1，草地贪夜蛾取食1 d的玉米叶片；T3，草地贪夜蛾取食3 d的玉米叶片；CK1，对照组玉米叶片（1 d）；CK3，对照组玉米叶片（3 d）。Note: T1, Maize leaves fed on by *S. frugiperda* for 1 d; T3, Maize leaves fed on by *S. frugiperda* for 3 d; CK1, Maize leaves in the control group (1 d); CK3, Maize leaves in the control group (3 d).

2.4 草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片的miRNAs靶基因功能分析

miRNAs靶基因的功能分析采用Gene Ontology（GO）分类体系，其功能注释分为以下三大类：分子功能、细胞成分和生物过程。草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片后miRNAs的靶基因注释为蛋白质结合的有355个（P value=2.77E^{-11}）、DNA结合的有250个（P value=5.48E^{-09}）、细胞定位在细胞核的有500个（P value=7.82E^{-13}）（图3-A），其中有13个基因富集在肌醇磷酸代谢（P value=4.33E^{-03}），25个基因富集在基因剪切（P value=6.71E^{-03}）相关的信号通路上（图3-B）。

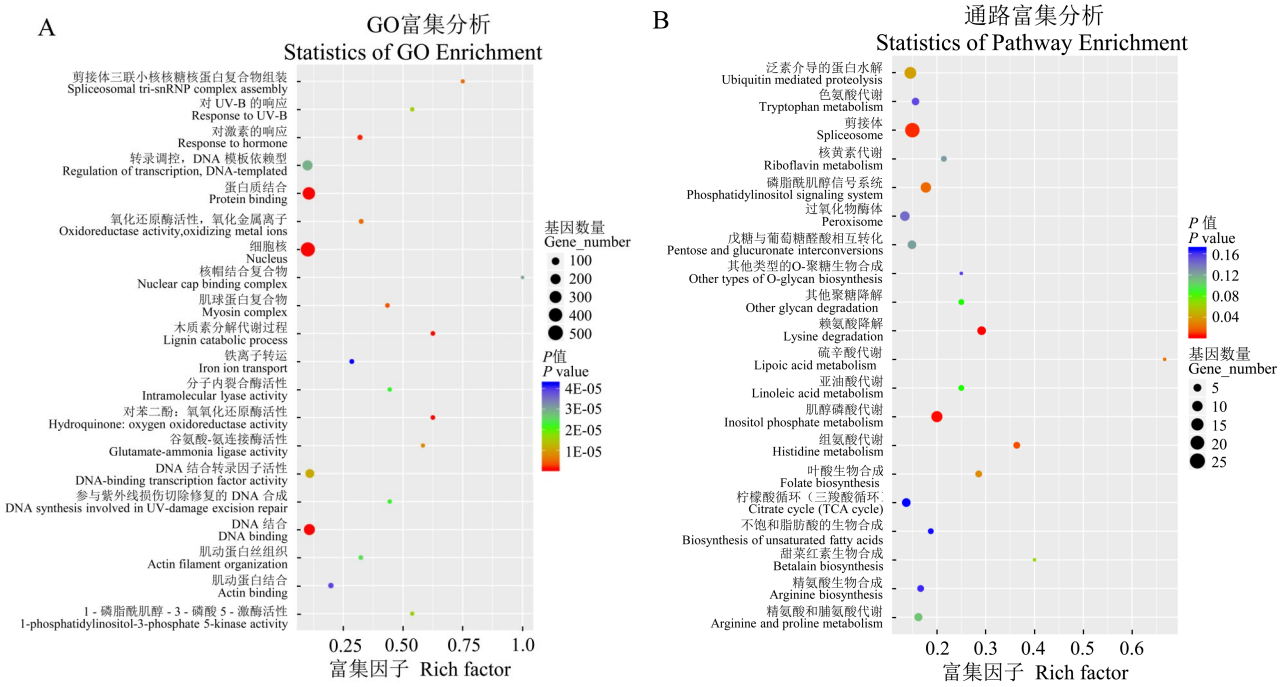

图3 草地贪夜蛾取食诱导玉米miRNAs靶基因的GO功能注释（A）和KEGG通路富集注释（B）

Fig. 3 Gene ontology (GO) functional annotation (A) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment annotation (B) of the target genes of miRNA in maize induced by the feeding of *Spodoptera frugiperda*

2.5 草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片差异miRNAs定量分析

选取草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片后上调表达的5个miRNA进行qPCR验证。检测草地贪夜蛾取食诱导1 d的玉米叶片中zma-miR169a-p3的表达，检测草地贪夜蛾取食诱导3 d的玉米叶片中zma-miR319a-3p_R+1、zma-miR156j-5p_R-1、zma-miR166m-5p_L-2R+2和zma-miR169i-p3的表达。结果显示，在草地贪夜蛾取食诱导1 d的玉米叶片zma-miR169a-p3表达上调2.55倍（*，P < 0.05，t-test）；在草地贪夜蛾取食诱导3 d的玉米叶片zma-miR169i-p3和zma-miR156j-5p_R-1表达分别上调1.57倍和2.63倍（*，P < 0.05，t-test），zma-miR166m-5p_L-2R+2和zma-miR319a-3p_R+1表达分别上调4.41倍和5.02倍（**，P < 0.01，t-test）。

3 结论与讨论

miRNA是一类在转录后基因调控中发挥作用的短链非编码RNA，在植物应对害虫生物胁迫的过程中发挥着关键作用。本研究聚焦于植物响应害虫生物胁迫的关键分子机制，通过整合高通量测序技术与生物信息学方法系统解析了草地贪夜蛾3龄幼虫取食胁迫下玉米叶片miRNA组的动态变化。研究结果不仅揭示了miRNA介导的玉米抗虫响应分子网络，更构建了“miRNA—靶基因—防御通路”的三维调控模型，为深入解析植食性昆虫与宿主植物互作的多层次调控网络提供了新的理论依据。

转基因玉米通过表达苏云金芽孢杆菌*Bacillus thuringiensis*（Bt）杀虫晶体蛋白（Cry毒素）可特异性破坏靶标害虫的中肠细胞，实现对欧洲玉米

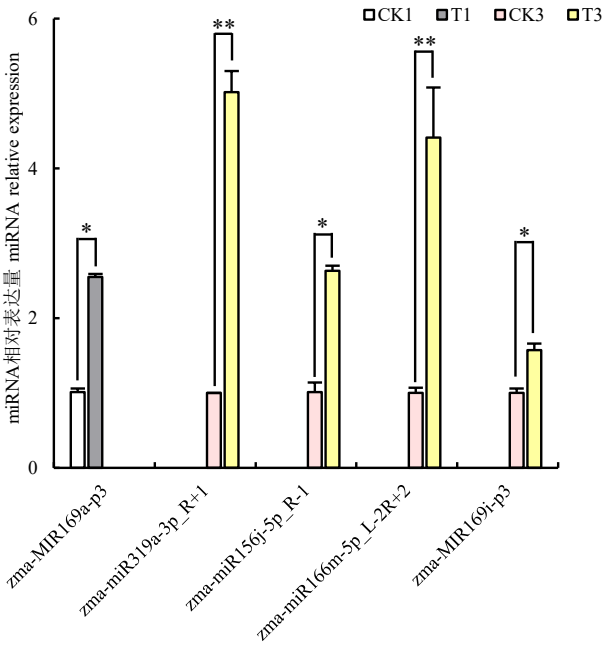

图4　草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片1 d和3 d上调表达的miRNAs验证

Fig. 4　Verification of miRNAs with upregulated expression in maize leaves induced by the feeding of *Spodoptera frugiperda* for 1 d and 3 d

注：T1，草地贪夜蛾取食1 d的玉米叶片；T3，草地贪夜蛾取食3 d的玉米叶片；CK1，对照组玉米叶片（1 d）；CK3，对照组玉米叶片（3 d）。Note: T1, Maize leaves fed on by *S. frugiperda* for 1 d; T3, Maize leaves fed on by *S. frugiperda* for 3 d; CK1, Maize leaves in the control group (1 d); CK3, Maize leaves in the control group (3 d).

螟 *Ostrinia nubilalis* 这一主要玉米害虫的有效防控（Koch *et al.*，2015）。然而，害虫种群中抗性基因型的进化始终威胁着Bt作物的可持续应用。Yu等（2018）通过比较分析Bt敏感型与抗性型欧洲玉米螟幼虫的中肠sRNA文库，发现26个显著上调、9个显著下调的miRNAs通过调控氨肽酶N（APN）和钙黏蛋白（Cadherin）等关键抗性基因的表达，影响细胞膜组成、物质代谢及毒素结合等生理过程。该研究揭示的miRNA–靶基因调控网络为开发基于RNA干扰（RNAi）的抗性治理策略提供了新靶点–通过设计合成特定miRNA类似物或拮抗剂，可精准调控害虫对Bt毒素的敏感性阈值。Zhang等（2019b）突破性地在专食性昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 血淋巴中鉴定出39个具有典型植物特征的miRNAs，其中24个呈现稳定表达。这些植物源miRNAs可通过跨物种调控机制影响昆虫的生长发育，例如miR162a被证实能通过抑制小菜蛾丝氨酸蛋白酶基因表达来削弱其消化功能。这一发现不仅印证了宿主植物与植食性昆虫间的分子协同进化，更启示可利用合成生物学手段设计“人工植物miRNAs”—通过转基因植物持续释放特定miRNAs，构建针对靶标害虫的分子防御屏障。相较于传统化学农药，这种基于共同进化机制开发的生物防治技术具有环境友好、靶向性强且不易产生抗性的显著优势。

本研究结果表明，草地贪夜蛾取食玉米叶片共诱导了500个miRNAs。草地贪夜蛾取食1 d后，有117个miRNAs上调，42个miRNAs下调；取食3 d后，125个miRNAs上调，64个miRNAs下调。这些miRNAs的靶基因主要富集在磷酸肌醇代谢以及与基因剪切相关的信号通路上。这些结果说明草地贪夜蛾取食玉米叶片后激活了抗虫代谢物相关基因的调控机制。

磷酸肌醇属于一类含有肌醇且经磷酸化修饰的脂质分子（Ghosh and Bankaitis，2011）。在植物免疫信号转导过程中，磷酸肌醇作为关键的第二信使，能够对细胞膜上的运输过程进行调节（Munnik *et al.*，1998；Laxalt and Munnik，2002）。当植物察觉到病原体入侵时，磷酸肌醇信号可对细胞壁的合成与修饰起到调控作用（Xue *et al.*，2009）。此外，磷酸肌醇代谢途径与植物激素信号通路相互交织。例如，水杨酸（SA）作为植物防御反应中至关重要的信号分子，能够调节磷酸肌醇激酶的活性，进而影响磷酸肌醇的代谢水平（Hu *et al.*，2020；杨庆喜等，2024）。反之，磷酸肌醇信号同样可以对SA介导的防御基因表达进行调控（李兆亮等，1998；Ruelland *et al.*，2014）。与此同时，茉莉酸（JA）和乙烯（E）信号通路也与磷酸肌醇代谢存在相互作用（Irvine and Osborne，1973；Mosblech *et al.*，2011；Chen *et al.*，2021；Zhu *et al.*，2021）。这种复杂的“交叉对话”能够精准地调节植物的防御反应，使得植物能够依据不同的病原体类型以及侵染程度，做出恰当的防御应对。黄欣蒸等（2020）对草地贪夜蛾取食诱导的玉米叶片转录组进行分析，发现在8个植物激素途径相关基因中存在124个差异表达基因，其中JA途径的差异表达基因数量最多，多达44个，且均为上调表达。这表明在草地贪夜蛾取食诱导的寄主玉米防御反应中，JA途径发挥着核心作用，而SA等其他植物激素途径则起到协同作用。在本研究中，分析得出miRNA的靶基因主要

富集于磷酸肌醇代谢相关的信号通路。这意味着草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片后所表达的miRNA参与了玉米的防御机制，这些miRNA在玉米针对草地贪夜蛾取食的抗虫反应中扮演着重要角色。

剪接体是一种大型核糖核蛋白复合物（RNP），主要由小核核糖核蛋白颗粒（snRNPs，包含U1、U2、U4/U6和U5 snRNPs）以及众多非snRNP蛋白因子组成（Will and Lührmann，2011）。在植物防御反应中，许多防御相关基因会发生可变剪接。例如，植物遭受病原体攻击时，一些参与信号转导的基因（如丝裂原活化蛋白激酶，MAPK）的转录本会通过可变剪接产生不同异构体（Lu *et al.*，2022）。这些剪切体可能具有不同活性或功能，从而精细调节植物的防御信号通路。研究发现一种剪切体可能参与激活早期防御反应，而另一种剪切体可能在后期防御反应中发挥作用，如调节防御相关基因的转录（Gassmann，2008）。剪接体成分本身也会受到植物防御信号的调控。当植物感知到病原体入侵时，一些剪接体相关蛋白的表达水平或活性会发生变化。这些变化会影响整体RNA剪接效率和准确性，进而影响防御相关基因成熟mRNA的产生（Simpson *et al.*，2010）。例如，某些snRNPs的修饰状态可能改变，比如m6A、类泛素化修饰和去甲基化修饰使其对防御相关前体mRNA（pre-mRNA）的识别和剪接更加高效，促进防御基因快速表达，增强植物防御能力（Noh *et al.*，2021；Jian *et al.*，2023；Ge *et al.*，2024）。病原体也可能干扰植物的剪接体功能以促进自身侵染（Du *et al.*，2024）。一些病原体分泌的效应子可以靶向植物的剪接体成分，改变RNA剪接模式，使得植物防御相关基因的表达受到抑制（Huang *et al.*，2017；Jiang *et al.*，2023）。相反，植物也可以通过调节剪接体来识别和应对病原体的干扰，例如通过上调某些剪接体相关的防御蛋白来纠正异常剪接，维持正常的防御基因表达（Shang *et al.*，2017；Rigo *et al.*，2019；Godinho *et al.*，2024）。本研究发现miRNA的靶基因除了富集在磷酸肌醇代谢相关的信号通路外，还主要富集在与剪切有关的信号通路上。这说明草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片后差异表达的miRNAs可以通过调节剪接体来识别和应对昆虫取食的干扰。

本研究显示草地贪夜蛾持续取食3 d可显著诱导玉米叶片中zma-miR319、zma-miR156及zma-miR166的表达上调。非生物胁迫分析进一步揭示zma-miR156与zma-miR166在干旱胁迫下的玉米近交系中持续高表达，而zma-miR319a-3p则在低温胁迫的幼苗中表现出显著激活，表明玉米miRNA在不同类型胁迫中呈现特异性表达模式（Aravind *et al.*，2017；Božić *et al.*，2024）。值得注意的是，zma-miR319通过靶向调控多个关键转录因子参与胁迫响应，包括赤霉素/脱落酸调控的MYB因子（GAMYB）和TCP家族因子（Teosinte branched1/cycloidea/PCF），其核心功能涉及维持叶分生组织的细胞分裂活性，说明这一机制可能为多重胁迫适应提供分子基础（Aydinoglu and Lucas，2019）。

miR-169家族在植物中具有高度保守性，其成员主要通过切割转录本，对编码通用转录因子亚基核因子-Y亚基A（NF-YA）的基因表达进行调控。NF-YA则通过与靶启动子中的CCAAT盒序列相结合，实现对基因表达的调节（Zhao *et al.*，2009；Luan *et al.*，2014；Rao *et al.*，2022）。miR169/NF-YA模块在植物的生长发育以及对非生物胁迫的响应过程中，均发挥着至关重要的作用（Luan *et al.*，2015；Xu *et al.*，2016）。此前，Božić等（2024）针对5日龄遭受冷应激处理的玉米叶片展开高通量测序，共发现145个已知的miRNAs以及876个新的miRNAs，其中zma-miR169参与了玉米应激胁迫的信号转导通路。本研究发现在草地贪夜蛾取食诱导后的玉米叶片中，无论是取食1 d还是3 d，zma-miR169均呈现上调表达态势。这一结果充分表明，zma-miR169在玉米抵御草地贪夜蛾取食的过程中扮演着关键角色。基于miR-169家族在植物中的既定功能，推测zma-miR169可能通过调控玉米靶基因的剪切过程，进而调节NF-YA的表达水平，以此抵御草地贪夜蛾的取食侵害。然而，其具体作用机制仍有待进一步深入探究。

本研究借助高通量测序技术，深入剖析了玉米在应对草地贪夜蛾取食胁迫时差异表达的miRNAs，成功挖掘出与玉米直接防御和间接防御相关的新基因，以及miRNAs靶基因富集的信号通路。上述发现为开发一系列针对靶标昆虫的行为调控策略提供全新思路。首先，借鉴质体介导的RNAi抗虫策略，可设计靶向草地贪夜蛾特定行为相关基因的dsRNA，使其在玉米植株中表达，当草地贪夜蛾取食后，dsRNA触发RNA干扰机制，沉默与其取食、交配、产卵等行为相关的关键基

因。其次，深入研究miRNAs靶基因富集信号通路中与植物挥发性物质合成和释放相关的基因，发掘能够调节玉米释放特定挥发性物质的基因和通路，通过调控这些基因，增加玉米释放对草地贪夜蛾具有驱避作用的挥发性物质，或吸引其天敌的挥发性物质，实现对草地贪夜蛾行为的间接调控。再者，利用基因工程技术开发新型植物源昆虫行为调节剂，依据挖掘出的与玉米防御相关的基因及信号通路，将调节剂基因导入玉米植株，使其自主合成并释放行为调节剂，干扰草地贪夜蛾的感觉系统或神经传导，改变其取食、运动、求偶等行为。最后，结合miRNAs与靶基因的调控关系以及富集的信号通路，构建基因调控网络模型，通过分析和模拟该网络的动态变化，精准识别关键节点基因，再利用基因编辑或基因沉默技术对这些关键基因进行调控，实现对草地贪夜蛾行为的精准、高效调控。这些全新思路有望切实应用于草地贪夜蛾的绿色防控实践，为作物抗虫防控策略和抗虫生物制剂设计提供新的方向和方法。

参考文献（References）

Aravind J, Rinku S, Pooja B, *et al*. Identification, characterization, and functional validation of drought-responsive MicroRNAs in subtropical maize inbreds [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 941.

Aydinoglu F, Lucas SJ. Identification and expression profiles of putative leaf growth related microRNAs in maize (*Zea mays* L.) hybrid ADA313 [J]. *Gene*, 2019, 690: 57-67.

Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.

Božić M, Micić DI, Delić N, *et al*. Maize miRNAs and their putative target genes involved in chilling stress response in 5-day old seedlings [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25 (1): 479.

Chen SQ, Chen MS, Li YL, *et al*. Adjustments of both phospholipids and sphingolipids contribute to cold tolerance in stony hard peach fruit by continuous ethylene [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 171: 111332.

De Lange ES, Laplamche D, Guo HJ, *et al*. *Spodoptera frugiperda* caterpillars suppress herbivore-induced volatile emissions in maize [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2020, 46 (3): 344-360.

Du KT, Peng DZ, Wu JQ, *et al*. Maize splicing-mediated mRNA surveillance impeded by sugarcane mosaic virus-coded pathogenic protein NIa-Pro [J]. *Science Advances*, 2024, 10 (34): eadn3010.

Gadhavi H, Patel M, Mangukia N, *et al*. Transcriptome-wide miRNA identification of *Bacopa monnieri*: A cross-kingdom approach [J]. *Plant Signal and Behavior*, 2020, 15 (1): 1699265.

Gassmann W. Alternative splicing in plant defense [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2008, 326: 219-233.

Ge LH, Pan F, Jia MX, *et al*. RNA modifications in plant biotic interactions [J]. *Plant Communication*, 2024, 101232.

Ghosh R, Bankaitis VA. Phosphatidylinositol transfer proteins: Negotiating the regulatory interface between lipid metabolism and lipid signaling in diverse cellular processes [J]. *Biofactors*, 2011, 37 (4): 290-308.

Godinho DP, Yanez RJR, Duque P. Pathogen-responsive alternative splicing in plant immunity [J]. *Trends in Plant Science*, 2025, 30 (6): 615-628.

Guo JF, Qi JF, He KL, *et al*. The Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* feeding increases the direct and indirect defence of mid-whorl stage commercial maize in the field [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17 (1): 88-102.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis [J]. *Nature Reviews Molecual Cell Biology*, 2014, 15 (8): 509-524.

Hu LY, Zhou K, Ren GJ, *et al*. Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple [J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 138.

Huang J, Gu LF, Zhang Y, *et al*. An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity [J]. *Nature Communications*, 2017, 8 (1): 2051.

Huang ZX, Shan S, Zhang DD, *et al*. Transcriptome analysis of Zea mays leaves infested by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* larvae [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47 (4): 780-788. [黄欣蒸, 单双, 张丹丹, 等. 草地贪夜蛾取食诱导玉米叶片转录组分析 [J]. 植物保护学报, 2020, 47 (4): 780-788]

Irvine RF, Osborne DJ. The effect of ethylene on (1-14C) glycerol incorporation into phospholipids of etiolated pea stems [J]. *Biochemical Journal*, 1973, 136 (4): 1133-1135.

Jian YQ, Chen X, Sun KW, *et al*. SUMOylation regulates pre-mRNA splicing to overcome DNA damage in fungi [J]. *New Phytologist*, 2023, 237 (6): 2298-2315.

Jiang H, Zhang MT, Yu F, *et al*. A geraniol synthase regulates plant defense via alternative splicing in tea plants [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10 (10): uhad184.

Koch MS, Ward JM, Levine SL, *et al*. The food and environmental safety of *Bt* crops [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 283.

Laxalt AM, Munnik T. Phospholipid signalling in plant defence [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5 (4): 332-338.

Li HY, Meng HL, Sun XQ, *et al*. Integrated microRNA and transcriptome profiling reveal key miRNA-mRNA interaction pairs associated with seed development in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21 (1): 132.

Li ZL, Yuan YB, Liu CL, *et al*. Studies of signal transduction of salicylic acid in cucumber cells [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40 (5): 430-436. [李兆亮, 原永兵, 刘成连, 等. 黄瓜细胞中水杨酸的信号传递研究 [J]. 植物学报, 1998, 40 (5): 430]

Lu FZ, Li WC, Peng YL, *et al*. *ZmPP2C26* alternative splicing variants negatively regulate drought tolerance in maize [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 851531.

Luan MD, Xu MY, Lu YM, *et al*. Expression of zma-miR169 miRNAs and their target *ZmNF-YA* genes in response to abiotic stress in maize leaves [J]. *Gene*, 2015, 555 (2): 178-185.

Luan MD, Xu MY, Lu YM, *et al*. Family-wide survey of *miR169s* and *NF-YAs* and their expression profiles response to abiotic stress in maize roots [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (3): e91369.

Malook SU, Qi JF, Hettenhausen C, *et al*. The oriental armyworm (*Mythimna separata*) feeding induces systemic defence responses within and between maize leaves [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2019, 374 (1767): 20180307.

Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, *et al*. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas [J]. *African Entomology*, 2018, 26 (2): 286-300.

Mosblech A, Thurow C, Gatz C, *et al*. Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2011, 65 (6): 949-957.

Munnik T, Irvine RF, Musgrave AP. Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* [J], 1998, 1389 (3): 222-272.

Noh SW, Seo RR, Park HJ, *et al*. Two *Arabidopsis homologs* of human lysine-specific demethylase function in epigenetic regulation of plant defense responses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 688003.

Pan Y, Zhao SW, Tang XL, *et al*. Transcriptome analysis of maize reveals potential key genes involved in the response to belowground herbivore *Holotrichia parallela* larvae feeding [J]. *Genome*, 2020, 63 (1): 1-12.

Qi JF, Sun GL, Wang L, *et al*. Oral secretions from *Mythimna separata* insects specifically induce defence responses in maize as revealed by high-dimensional biological data [J]. *Plant Cell and Environment*, 2016, 39 (8): 1749-1766.

Rao S, Jha S, Bansal C, *et al*. A conserved HSF: miR169: NF-YA loop involved in tomato and Arabidopsis heat stress tolerance [J]. *Plant Journal*, 2022, 112 (1): 7-26.

Rigo R, Bazin J, Crespi M, *et al*. Alternative aplicing in the regulation of plant-microbe interactions [J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60 (9): 1906-1916.

Ruelland E, Pokotylo I, Djafi N, *et al*. Salicylic acid modulates levels of phosphoinositide dependent-phospholipase C substrates and products to remodel the Arabidopsis suspension cell transcriptome [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5 (7): 608.

Shang XD, Cao Y, Ma LG. Alternative splicing in plant genes: A means of regulating the environmental fitness of plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (2): 432.

Simpson CG, Manthri S, Raczynska KD, *et al*. Regulation of plant gene expression by alternative splicing [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2010, 38 (2): 667-671.

Song J, Liu H, Zhuang HF, *et al*. Transcriptomics and alternative splicing analyses reveal large fifferences between maize Lines B73 and Mo17 in response to aphid *Rhopalosiphum padi* infestation [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1738.

Tzin V, Fernandez-Pozo N, Richter A, *et al*. Dynamic maize responses to aphid feeding are revealed by a time series of transcriptomic and metabolomic assays [J]. *Plant Physiol.*, 2015, 169 (3): 1727-1743.

Tzin V, Hojo Y, Strickler SR, *et al*. Rapid defense responses in maize leaves induced by *Spodoptera exigua* caterpillar feeding [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68 (16): 4709-4723.

Wang H, Li SY, Teng SZ, *et al*. Transcriptome profiling revealed novel transcriptional regulators in maize responses to *Ostrinia furnacalis* and jasmonic acid [J]. *PLoS ONE*, 2017, 16 (12): e0177739.

Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function [J]. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 2011, 3 (7): a003707.

Wu K. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China [J]. *Plant Protection*, 2020, 2 (46): 1-5. [吴孔明. 中国草地贪夜蛾的防控策略 [J]. 植物保护, 2020, 2 (46): 1-5]

Xu MY, Zhu JX, Zhang M, *et al*. Advances on plant miR169/NF-YA regulation modules [J]. *Yi Chuan*, 2016, 38 (8): 700-706.

Xue HW, Chen X, Mei Y. Function and regulation of phospholipid signalling in plants [J]. *Biochemical Journal*, 2009, 421 (2): 145-156.

Yang QX, Luo ML, Zhou Q, *et al*. Effect of salicylic acid treatment on postharvest yellowing and nutritional quality of broccoli [J]. *Food Science*, 2024, 45 (9): 181-188. [杨庆喜, 罗曼莉, 周倩, 等. 水杨酸处理对采后西兰花褪绿转黄及营养品质的影响 [J]. 食品科学, 2024, 45 (9): 181-188]

Yang XL, Liu YC, Luo MZ, *et al*. First discovery of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) migrating to southwest China in Jiangcheng country, Yunnan province [J]. *Yunnan Agriculture*, 2019, 1: 72. [杨学礼, 刘永昌, 罗茗钟, 等. 云南省江城县首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾 [J]. 云南农业, 2019, 1: 72]

Yu T, Li X, Coates BS, *et al*. MicroRNA profiling between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab-susceptible and -resistant European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27 (3): 279-294.

Zhang L, Jin MH, Zhang DD, *et al*. Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province [J]. *Plant Protection*, 2019a, 45 (2):19-24. [张磊, 靳明辉, 张丹丹, 等. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定 [J]. 植物保护, 2019a, 45 (2): 19-24]

Zhang LL, Jing XD, Chen W, *et al*. Host Plant-Derived miRNAs potentially modulate the development of a cosmopolitan insect pest, *Plutella xylostella* [J]. *Biomolecules*, 2019b, 9 (10): 602.

Zhao BT, Ge LF, Liang RQ, *et al*. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor [J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 29.

Zhou YY, Luo SZ, Hameed S, *et al*. Integrated mRNA and miRNA transcriptome analysis reveals a regulatory network for tuber expansion in Chinese yam (*Dioscorea opposita*) [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21 (1): 117.

Zhu LP, Dou LL, Shang, HH, *et al*. *GhPIPLC2D* promotes cotton fiber elongation by enhancing ethylene biosynthesis [J]. *IScience*, 2021, 24 (3): 102199.