

miR-124 在西方蜜蜂三种蜂型中的表达分析与功能推测*

荀利杰** 张学文 王艳辉***

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 蒙自 661101)

摘要 【目的】 miR-124 与神经系统发育相关, 在多细胞动物脑中特异表达。本研究拟验证 miR-124 是否在西方蜜蜂 3 种蜂型的脑中特异表达以及在 3 种蜂型当中表达差异与功能分析, 为西方蜜蜂中 miR-124 功能研究奠定基础。【方法】设计茎-环状引物反转录 miRNA, 定量 PCR(称为 stem-loop RT-qPCR 检测法)检测 miR-124 在西方蜜蜂 3 种蜂型头部及其他部位表达情况; 以邻位相连法构建 miR-124 系统进化树; 利用 BioEdit 软件对 miR-124 成熟序列进行同源性分析; 查找 miR-124 在西方蜜蜂当中的靶基因并对靶基因进行功能分析。【结果】 miR-124 在 3 种蜂型头部高量表达, 其中工蜂最高, 雄蜂次之, 蜂王最低; miR-124 在 3 种蜂型的其他部位微量表达, 相对于 3 种蜂型头部几乎不表达; 多物种中, miR-124 同源性最低达到 82.6%, 最高达到 100%; 在西方蜜蜂中获得 96 个 miR-124 靶基因, 45 个靶基因获得基因注释, 功能归类显示多个 miR-124 靶基因参与神经发育与调节。【结论】 miR-124 在 3 种蜂型头部特异表达, 其中在工蜂头部表达最高, 雄蜂次之, 蜂王最低, 而在三型蜂中, 由于工蜂的脑最发达, 雄蜂的次之, 蜂王的最小, 推测 miR-124 与西方蜜蜂 3 种蜂型的脑发育和调控 3 种蜂型分工相关。

关键词 miR-124, 神经发育, 分子进化, 同源性, GO 分析, Pathway 分析

The expression and function of miR-124 in the three castes of the honeybee *Apis mellifera*

XUN Li-Jie** ZHANG Xue-Wen WANG Yan-Hui***

(Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China)

Abstract 【Objectives】 miR-124 is related to the development of the nervous system and is expressed specifically in the brains of multicellular animals. This study was designed to verify whether expression of miR-124 is restricted to the brain in all three castes of the honeybee *Apis mellifera*, to analyze the expression of this gene in the three castes, and to provide a foundation for studying the function of miR-124 in the honeybee. 【Methods】 Real-time Polymerase Chain Reaction (known as stem-loop RT-qPCR assay) was used to detect the expression of miR-124 in the head and other parts of honeybees from each caste using stem-loop primer reverse transcription miRNA. Neighbor joining miR-124 phylogenetic trees were constructed and the software package BioEdit used to analyze the homology of mature miR-124 sequences. A search for the target gene of miR-124 in the honeybee was then conducted and the function of the putative target gene analyzed. 【Results】 miR-124 was highly expressed in the heads of honeybees from all three castes but was more highly expressed in workers than drones and least expressed in queens. miR-124 expression in body parts other than the head was negligible in all three castes. In many species, the minimum and maximum homology of miR-124 reached 82.6% and 100%, respectively. Ninety-six potential miR-124 target genes were identified in the honeybee, forty-five of which were annotated. Functional classification revealed that multiple miR-124 target genes are involved in neural development and regulation. 【Conclusion】 miR-124 expression is

*资助项目 Supported projects :国家蜂产业技术体系专项(CARS-45-SYZ 17);云南省科技厅重点新产品开发计划项目(2015BB010);云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金项目(QC2015006)

**第一作者 First author, E-mail: xunlijiecom@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wyh686686@sina.com

收稿日期 Received: 2016-10-12, 接受日期 Accepted: 2017-03-09

predominantly confined to the head in all three honeybee castes where it is more highly expressed in workers than drones and least expressed in queens. Worker's brains are more developed than those of drones and the brains of queens are the least developed. We suspect that the observed variation in the expression of miR-124 among honeybee castes is related to the level of brain development in each caste, and ultimately to the different roles that each caste plays in the hive.

Key words miR-124, neural development, molecular evolution, homology, gene ontology analysis, pathway analysis

microRNA(miRNA)是一类大小为 21~24 nt 的非编码单链小分子 RNA,成熟的 miRNA 通过与靶分子 mRNA 的保守 seed 序列(2~7 nt)互补配对结合(Lewis *et al.*, 2005),诱导靶 mRNA 的降解或翻译抑制,发挥其调控基因表达的功能,从而在转录后水平调节基因表达丰度的重要功能(Krol and Loedige, 2010),进而调控动植物生长发育过程,包括细胞分化、细胞增殖与凋亡、胚胎和组织分化、形态变化、激素分泌、免疫应答、行为改变等过程(Wienholds and Plasterk, 2005; Zhao and Deepak, 2007),几乎包括了动植物所有遗传发育途径(Ryusuke and Frank, 2007)。蜜蜂是社会性昆虫之一,仍然过着一种母系氏族生活。蜜蜂群体中有蜂王、工蜂和雄蜂 3 种类型,其中蜂王和工蜂是由受精卵发育而来的,雄蜂是由未受精的卵细胞发育而来的。一个蜂群体有几千到几万只蜜蜂不等,由一只蜂王、少量的雄蜂和众多的工蜂组成。3 种蜂型分工各不相同,各司其职,在蜂群中发挥不同功能。蜂王负责产卵,繁育后代;工蜂负责采集和哺育幼蜂(The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006);雄蜂负责交配,给蜂王受精(Hrassnigg and Crailsheim, 2005)。蜜蜂的这些行为都是通过神经系统来协调的。蜜蜂的神经系统协调躯体的各个器官,使之适应环境条件和行使功能。蜜蜂的中枢神经系统由脑和腹神经索组成,支配全身的机能器官,统一协调活动。三型蜂中,工蜂的脑最发达,雄蜂的次之,蜂王的最小(杨朝环,1998;曾志将等,2007;黄少康,2011)。神经系统发育过程受到多种因子的精确调控,miRNA 参与了众多的生理过程,很多大脑表达的 miRNA 的表达量在大脑发育过程中呈显著的变化,这表明 miRNA 参与了大脑的发育调控。miRNA 在脑组织的发育和神经分化过程

中发挥着重要作用(Fiore *et al.*, 2008)。miR-124 在多细胞动物的脑中特异表达(Mariana *et al.*, 2002),参与神经细胞分化的调控过程(Lim *et al.*, 2005)。在线虫 *Caenorhabditis elegans* 中,miR-124 控制感觉神经系统基因表达(Clark *et al.*, 2010)。在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,miR-124 通过调控 *ana* 基因来调控神经母细胞增殖,进而调控神经系统发育(Weng and Cohen, 2012)。miR-124 突变体可影响果蝇的移动、飞行和雌性生育能力(Wang *et al.*, 2014)。还有报道称 miR-124 通过调控生物钟神经元来调控果蝇昼夜节律运动行为的阶段变化(Zhang *et al.*, 2016)。在小鼠 *Mus musculus* 中,miR-124 与轴突发育相关,Microarray 分析表明 miR-124 主要负调控一些细胞骨架相关基因,进而控制神经发育过程中轴突的生长(Yu *et al.*, 2008)。还有研究表明 miR-124 调节干细胞向神经元转化(Cheng *et al.*, 2009),并且通过抑制选择性剪切调控蛋白的表达来促进神经元的分化(Makeyev *et al.*, 2007; Boutz *et al.*, 2008)。这些研究证明 miR-124 在多物种中都与神经发育相关。本研究拟鉴定 miR-124 (ame-miR-124)在西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 3 种蜂型当中是否具有脑表达特异性及表达差异和功能预测,为 miR-124 在西方蜜蜂脑和神经发育中功能研究奠定基础,并为西方蜜蜂作为模式生物在社会性行为学研究提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本实验采用的实验蜜蜂品种为西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 亚种意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*, 由国家蜂产业体系红河综合实验站西

方蜜蜂示范场提供。检测样品包括：工蜂头部 (Worker head)，工蜂去头体部 (Worker body)；雄蜂头部 (Drone head)，雄蜂去头体部 (Drone body)；蜂王头部 (Queen head)，蜂王去头体部 (Queen body)。

1.2 引物设计

ame-miR-124 序列信息来自 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>)，参考文献 (Chen *et al.*, 2005)，设计 stem-loop 反转录特异引物序列 ame-124-RT；U6 (作为参考基因，Gene ID:725641) 序列信息来自 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。利用 Primer Premier5.0 软件，参考 stem-loop 序列和 miRNA 序列信息设计定量引物 ame-124-F 和 ame-124-R，参考 U6 序列信息设计定量引物 ame-U6-F 和 ame-U6-R (同时用于 U6 反转录) (表 1)。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取及茎-环状引物反转录 miRNA

依照说明书利用 Trizol 试剂 (Invitrogen 美国) 提取 3 种蜂型头部和去头体部总 RNA，利用分光光度计 (Thermo scientific BioMATE 3S 美国) 测定提取 RNA 浓度，用 2% 琼脂糖 (Biowest, 西班牙) 凝胶电泳检测 RNA 完整性。采用 M-MLV 反转录酶 (Takara, 日本)，以 1 μ g 总 RNA 为模板，以设计 ame-124-RT 和 ame-U6-R 为引物 (表 1) 反转录合成 miRNA 的 cDNA 链。

1.4 qRT-PCR 检测 ame-miR-124 在西方蜜蜂 3 种蜂型中的相对表达情况

根据茎环引物序列和 ame-miR-124 成熟序列设计 ame-miR-124 正向定量引物 ame-124-F 和反向定量引物 ame-124-R，根据蜜蜂 U6 基因序列设计参照基因正向定量引物 ame-U6-F 和反向定量引物 ame-U6-R (表 1)。定量 PCR 反应体系为 20 μ L，包括：SYBR Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$) 10 μ L，Rox 0.4 μ L (Takara 日本)，Rnase-free 水 6 μ L，0.8 μ L 上游引物 (10 μ mol/L)，0.8 μ L 下游引物，cDNA 模板 2 μ L。定量 RCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C，5 min；95 $^{\circ}$ C，15 s，

62 $^{\circ}$ C，35 s，40 个循环。

1.5 西方蜜蜂 ame-miR-124 分子进化和同源性分析

从 miRBase 数据库下载其他物种 miR-124 的 Stem-loop 序列和成熟序列。根据 Stem-loop 序列利用软件 MEGA6 以邻位相连法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树；利用 BioEdit 软件中 Clustalx 对 miR-124 成熟序列进行同源性对比和相似性分析并计算同源率，再利用 GENEDOC 软件将 BioEdit 软件对比结果生成对比图。

1.6 ame-miR-124 靶基因预测及靶基因功能推测

参考相关文献，查找已经预测出的 ame-miR-124 相关靶基因，从 BeeBase 数据库 (<http://hymenopteragenome.org/beebase/>) 下载靶基因蛋白序列，利用 Blast2GO 软件对靶基因进行分析，获取靶基因得基因注释并进行 GO (Gene ontology) 和 Pathway 分析，对 ame-miR-124 靶基因进行功能归类和信号通路分析，预测 ame-miR-124 功能。

表 1 本实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
ame-124-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGGATACGACCTTGGCATTC
ame-124-F	GTTCACTAAGGCACGCGG
ame-124-R	GGTCCGAGGTATTCGCACT
ame-U6-F	GGCACTTTGTTAGGCTTTGA
ame-U6-R	GGTGACTCTTCTTCCTTCCG

2 结果与分析

2.1 miR-124 在 3 种蜂型中表达特异性及相对表达量

通过荧光定量 PCR 结果可知，miR-124 在 3 种蜂型头部相对高量表达，在去头体部相对微量表达 (图 1)，说明 miR-124 在 3 种蜂型头部具

有表达特异性;miR-124 在工蜂头部相对表达量最高,雄蜂次之,蜂王最低,这种表达趋势可能与 miR-124 在 3 种蜂型当中的功能密切相关;在 3 种蜂型中,工蜂的脑最发达,雄蜂的次之,蜂王的最小,miR-124 在 3 种蜂型头部表达高低与 3 种蜂型的脑发达程度正相关,推测 miR-124 与 3 种蜂型脑发育具有一定的关系。

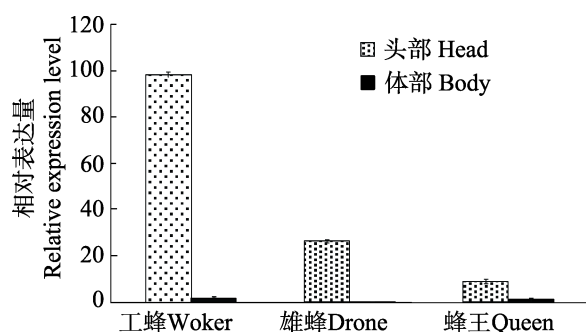


图 1 miR-124 在西方蜜蜂 3 种蜂型头部及去头体部相对表达量

Fig. 1 The relative expression level of miR-124 in the head and body of the three castes in the honeybee *Apis mellifera*

2.2 miR-124 分子进化分析

核酸和蛋白序列中含有生物进化历史的全部信息。分子进化速度恒定,物种的同源基因之间的差异程度与他们共同祖先存在时间(即两者的分歧时间)有一定的数量关系。由于 miRNA 在植物和动物中独立进化,在植物和动物中没有同源的 miRNA,所以本研究选取 25 种动物 miR-124 进行进化分析。利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 以不同物种 miR-124 前体茎环序列构建 miR-124 系统进化树模型 (图 2)。结果显示 miR-124 进化上大致可分为三个大的分类:较低等的寄生虫类、中间的昆虫类和高等的脊椎动物类;西方蜜蜂 miR-124 与同为膜翅目的蝇蛹金小蜂 miR-124 处于同一分支,亲缘关系最近,其次是家蚕和烟草天蛾,然后是果蝇、冈比亚按蚊和赤拟谷盗,它们同处于一个大的分支当中,说明 miR-124 在这些物种中序列具有保守性,分子进化速度相近,推测 miR-124 在这些物种中的功能具有相似性。

2.3 miR-124 成熟序列同源性分析

miR-124 成熟序列在不同物种从 20 nt 到 23 nt 不等。在比较分析的 25 个物种中有 17 碱基序列高度保守,其中西方蜜蜂与蝇蛹金小蜂、黑腹果蝇、冈比亚按蚊、赤拟谷盗以及家蚕序列完全相同 (图 3)。miR-124 成熟序列同源性最低达到 82.6%,最高达到 100%。从最低等的三代虫,到昆虫的西方蜜蜂,再到最高等的人类,miR-124 成熟序列变化很小。miRNA 发挥功能主要是成熟序列与靶基因互补结合抑制 mRNA 翻译或使其降解,miRNA 分子进化具有深度保守性,序列相似说明功能也相似,推测 miR-124 在各物种中功能具有较高的保守性。

2.4 ame-miR-124 靶基因预测及功能分析

获得 96 个 miR-124 在蜜蜂体内靶基因,其中 45 个基因具有基因功能注释;Gene ontology 分析 40 个基因获得 GO 号,其中细胞组成 (Cellular component) 相关的基因有 26 个,分子功能 (Molecular function) 相关的基因有 28 个,生物进程 (Biological process) 相关的基因有 22 个,通过 GO 注释网站 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn>) 对第三层次 GO 分类结果进行分析获得结果如图 4 所示;Blast2GO 软件 Blast 分析获得酶编号的基因有 8 个,Pathway 分析获得 5 个基因分布到 7 个代谢通路上 (表 2)。

3 讨论

miRNA 前体 (Pre-miRNA) 是一类小的非编码 RNA,具有颈环结构,经过 Dicer 酶加工成约 21 个碱基成熟序列行使基因调控的功能,miRNA 在基因转录后调控发挥重要作用。到目前为止,在动植物以及病毒中已经发现有 28 645 个 miRNA 分子 (Release21: June 2014),miR-124 是一个进化上古老、保守的 miRNA (Greenberg *et al.*, 2012),已被在线虫、果蝇、小鼠、人类和蜜蜂等 80 多个物种中鉴定出来。脑和神经发育是一个高度协调的过程,需要精确控制基因表达,miR-124 在脑和正在发育的神经细胞中高量

表达 (Xia *et al.*, 2012), 并在神经分化中扮演重要角色 (Zou *et al.*, 2014)。在西方蜜蜂中, miR-124 在大脑中高量表达 (Greenberg *et al.*, 2012; Cristino *et al.*, 2014), 在工蜂幼虫中表达水平高于蜂王幼虫 (Ashby *et al.*, 2016)。已有

的研究表明 miR-124 参与工蜂的学习与记忆 (Cristino *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2014) 以及与哺育蜂与采集蜂之间转变相关 (Behura and Whitfield, 2010), 说明 miR-124 与西方蜜蜂行为可塑性及蜜蜂神经发育调控相关。

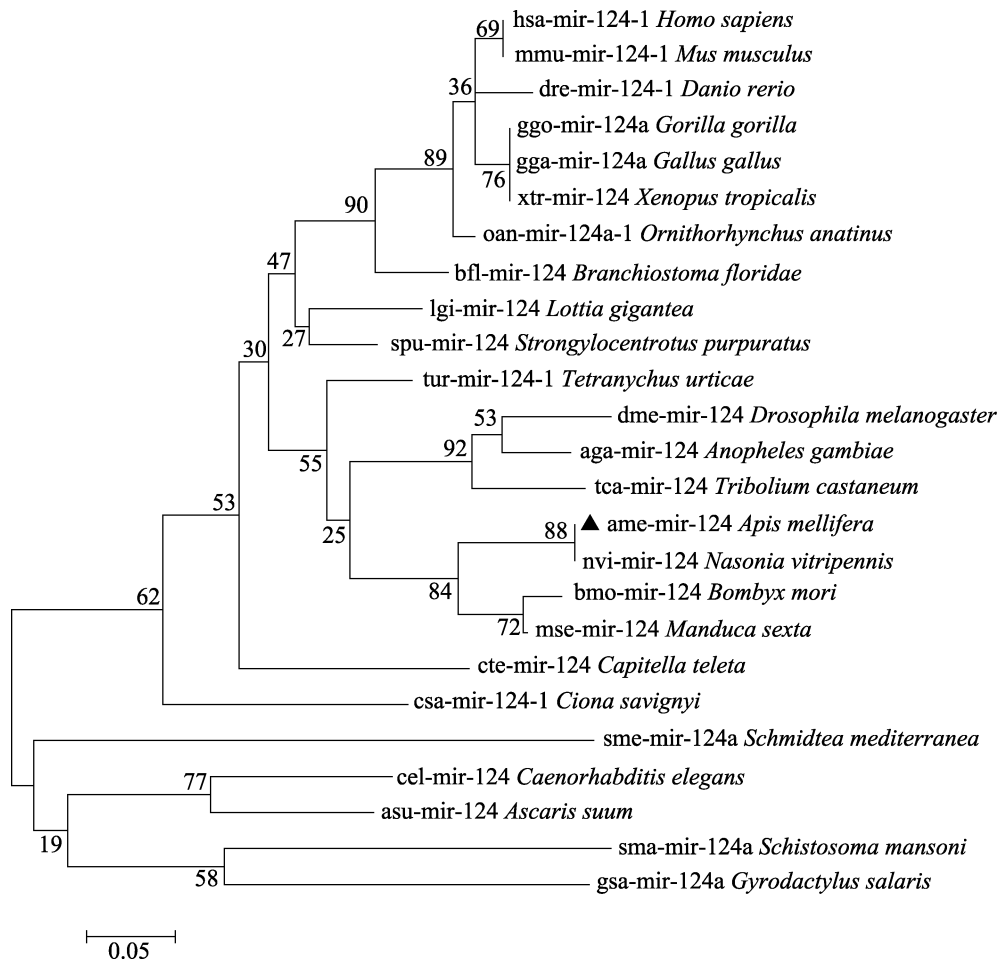


图2 基于 miR-124 的 Stem-loop 序列构建西方蜜蜂与其他物种系统进化树 (邻接法)
Fig. 2 Constructing phylogenetic trees of the *Apis mellifera* and other species based on miR-124 Stem-loop sequence (Neighbor-Joining method)

进化分析物种及 miRBase 登录号: The species and miRBase accession numbers of the phylogenetic analysis: 人类 *Homo sapiens* (MI0000443); 小鼠 *Mus musculus* (MI0000716); 斑马鱼 *Danio rerio* (MI0001966); 大猩猩 *Gorilla gorilla* (MI0002761); 原鸡 *Gallus gallus* (MI0001197); 非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis* (MI0004930); 鸭嘴兽 *Ornithorhynchus anatinus* (MI0006854); 佛罗里达文昌鱼 *Branchiostoma floridae* (MI0010026); 霸王莲花青螺 *Lottia gigantea* (MI0010120); 紫海胆 *Strongylocentrotus purpuratus* (MI0010202); 二斑叶螨 *Tetranychus urticae* (MI0019402); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (MI0000373); 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (MI0001604); 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (MI0008912); 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (MI0001577); 蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis* (MI0014749); 家蚕 *Bombyx mori* (MI0004976); 烟草天蛾 *Manduca sexta* (MI0021024); 海蠕虫 *Capitella teleta* (MI0010098); 海鞘 *Ciona savignyi* (MI0007192); 真涡虫 *Schmidtea mediterranea* (MI0005157); 秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (MI0000302); 猪蛔虫 *Ascaris suum* (MI0018567); 曼氏血吸虫 *Schistosoma mansoni* (MI0021818); 三代虫 *Gyrodactylus salaris* (MI0028956)。标尺代表遗传距离。The scale bar represents the genetic distance.

ame	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	23
nvi	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	23
dme	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	23
aga	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	23
tca	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	23
bmo	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAG	23
bfl	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA-	22
dre	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA-	22
csa	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA-	22
xtr	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	22
gga	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	22
ggo	UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	22
tur	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
mse	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
spu	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
oan	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
cte	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
cel	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
lgi	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
asu	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA--	21
mmu	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCC---	20
hsa	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCC---	20
sme	-UAAGGCACGCGGUGAAUGCUU--	21
sma	-UAAGGCACGCGGUGAAUGUCA--	21
gsa	-UAAGGCACGCGGUGAAUACC---	20

图 3 miR-124 成熟序列同源对比

Fig. 3 miR-124 mature sequence homology comparison

黑色阴影部位为高度同源序列；左侧字母表示物种缩写，右边数字表示 miR-124 成熟序列在相应物种中的碱基数；物种及 miRBase 登录号参见图 2。

The black shadow parts are highly homologous sequences; The left letters indicate species abbreviation, the right number represents the base number of the miR-124 mature sequence with the corresponding species; and the species and miRBase accession numbers refer to Fig. 2.

在本研究中,定量结果显示 miR-124 在西方蜜蜂 3 种蜂型脑部特异表达,这与在已报道的其他物种中表达情况基本一致。同时,miR-124 在工蜂头部表达量最高,雄蜂次之,蜂王最低,由于工蜂脑最发达,雄蜂次之,蜂王最小,miR-124 表达量的高低与脑发达程度存在一一对应关系,miR-124 表达量越高,脑发育程度越高,miR-124 表达量越低,脑发育程度越低,此结果预示 miR-124 可以促进西方蜜蜂脑部发育。miRNA 发挥功能主要是通过成熟序列与其靶基因 3'UTR 结合抑制靶基因翻译或使其降解。miR-124 在多物种高度同源,序列基本一致,靶基因预测结果显示 miR-124 大多靶位点在多个物种中也是保守的 (Takane *et al.*, 2009),说明 miR-124 在多物种当中功能相似。功能分析发现,miR-124 在西方蜜蜂中的靶基因具有细胞骨

架、对刺激和压力反应、神经系统过程等方面的功能,这些功能与西方蜜蜂神经发育或神经调节相关。

多项研究证明 miR-124 具有调控脑和神经发育的功能,推测在西方蜜蜂当中 miR-124 也具有调控脑与神经发育的功能。在已报到的研究中多数与脑功能调节和神经发育有关,但 miR-124 是否影响神经分化尚存争议,有研究认为大多数动物及昆虫中保守的 miRNA 两个种系间对应的靶位点却并不同源,同一 miRNA 在不同物种乃至同一物种不同品系间中的功能存在差异 (Grün *et al.*, 2005)。也有研究报道称改变 miR-124 在神经细胞中的表达并不影响神经分化 (Cao *et al.*, 2008)。miR-124 在西方蜜蜂脑与神经发育当中是否发挥作用以及 miR-124 在西方蜜蜂中的调控机理还需要更多的研究来证明。

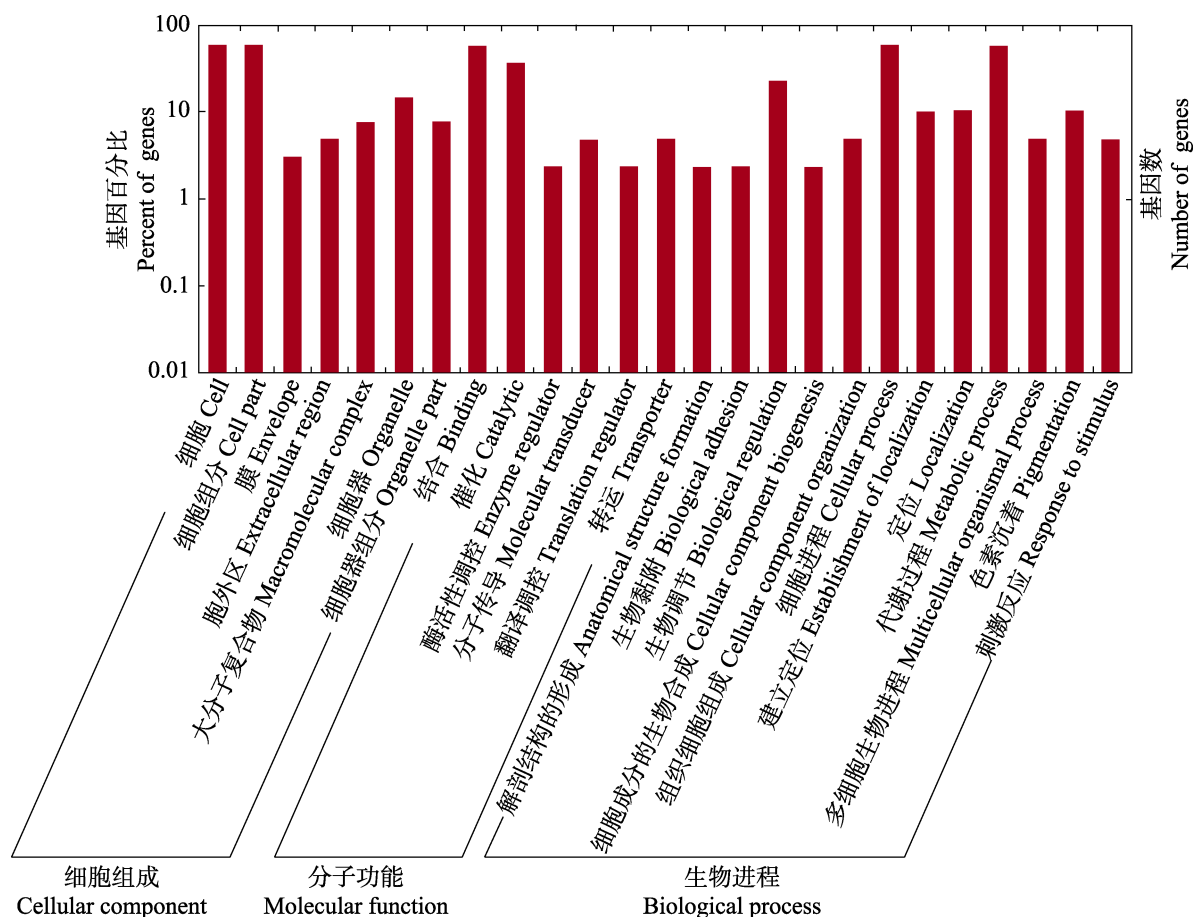


图 4 基因功能归类分析结果
Fig. 4 Gene Ontology analysis results

表 2 信号通路分析结果
Table 2 Pathway analysis results

BeeBase 编号 BeeBase ID	酶 Enzyme	酶编号 Enzyme ID	信号通路 Pathway
GB46217	Hydratase	EC: 4.2.1.3	Carbon fixation pathways in prokaryotes
GB54729 , GB45733 , GB55808	Phosphatase	EC: 3.6.1.15	Purine metabolism
GB54729	Adenylpyrophosphatase	EC: 3.6.1.3	Purine metabolism
GB46217	Hydratase	EC: 4.2.1.3	Biosynthesis of antibiotics
GB54729 , GB45733 , GB55808	Phosphatase	EC: 3.6.1.15	Thiamine metabolism
GB46217	Hydratase	EC: 4.2.1.3	Citrate cycle (TCA cycle)
GB46217	Hydratase	EC: 4.2.1.3	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
GB47955	Adenosyltransferase	EC: 2.5.1.6	Cysteine and methionine metabolism

参考文献 (References)

- Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R, 2016. microRNAs in honey bee caste determination. *Scientific Reports*, 6: 18794.
- Behura SK, Whitfield CW, 2010. Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect Molecular Biology*, 19(4): 431–439.
- Boutz P, Geetanjali C, Peter S, Black D, 2008. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes & Development*, 21(1): 71–84.

- Cao XW, Samuel LP, Fred HG, 2008. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes & Development*, 21(5): 531–536.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ, 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20): e179.
- Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F, 2009. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature Neuroscience*, 12(4): 399–408.
- Clark A, Goldstein L, Maya T, Simon T, Shai S, Miska E, 2010. The microRNA miR-124 controls gene expression in the sensory nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Research*, 38(11): 3780–3793.
- Cristino A, Barchuk A, Freitas F, Narayanan R, Biergans S, Zhao ZY, Simoes Z, Reinhard J, Claudianos C, 2014. Neurologin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. *Nature Communications*, 5: 5529.
- Fiore R, Siegel G, Schrott G, 2008. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(8): 471–478.
- Grün D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus K, Rajewsky, Nikolaus, 2005. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Computational Biology*, 1(1): e13.
- Greenberg JK, Xia J, Zhou X, Thatcher SR, Gu X, Ament SA, Newman TC, Green PJ, Zhang W, Robinson GE, 2012. Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. *Genes, Brain and Behavior*, 11(6): 660–670.
- Grassnigg N, Crailsheim K, 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 36(2): 255–277.
- Huang SK, 2011. Honeybee Physiology. Beijing: China Agriculture Press. 90. [黄少康, 2011. 蜜蜂生理学. 北京: 中国农业出版社. 90.]
- Krol J, Loedige I, 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9): 597–610.
- Lewis B, Burge C, Bartel D, 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1): 15–20.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM, 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027): 769–773.
- Makeyev Ev, Zhang Jw, Carrasco Ma, Maniatis T, 2007. The microRNA mir-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mrna splicing. *Molecular Cell*, 27(3): 435–448.
- Mariana LQ, Reinhard R, Abdullah Y, Jutta M, Winfried L, Thomas T, 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 12(9): 735–739.
- Ryusuke N, Frank JS, 2007. The evolution of animal microRNA function. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(2): 145–150.
- Qin QH, Wang ZL, Tian LQ, Gan HY, Zhang SW, Zeng ZJ, 2014. The integrative analysis of microRNA and mRNA expression in *Apis mellifera* following maze-based visual pattern learning. *Insect Science*, 21(5): 619–636.
- Takane K, Fujishima K, Watanabe Y, Sato A, Saito N, Tomita M, Kanai A, 2009. Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals. *Bmc Genomics*, 11(1): 101.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114): 931–949.
- Wang C, Feng TB, Wan Q, Kong Y, Yuan LD, 2014. miR-124 controls *Drosophila* behavior and is required for neural development. *International Journal of Developmental Neuroscience: the Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 38: 105–112.
- Weng R, Cohen SM, 2012. *Drosophila* miR-124 regulates neuroblast proliferation through its target anachronism. *Development*, 139(8): 1427–1434.
- Wienholds E, Plasterk R, 2005. MicroRNA function in animal development. *Febs Letters*, 579(26): 5911–5922.
- Xia HP, Cheung W, Ng S, Jiang XC, Jiang SS, Sze J, Leung G, Gang L, Chan D, Bian XW, 2012. Loss of brain-enriched miR-124 enhances the stem-like traits and invasiveness of glioma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13): 9962–9971.
- Yang CH, 1998. Basic knowledge of morphology and anatomy of honeybee *Apis cerana* (five): The nervous system of honeybee. *Journal of Bee*, (2): 18–19. [杨朝环, 1998. 中蜂的形态解剖基础知识(五): 蜜蜂的神经系统. 蜜蜂杂志(2): 18–19.]
- Yu JY, Chung KH, Deo M, Thompson R, Turner D, 2008. MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Experimental Cell Research*, 314(14): 2618–2633.
- Zeng ZJ, Tan K, Su SK, 2007. Honeybee Biology. Beijing: China Agriculture Press. 14. [曾志将, 谭垦, 苏松坤, 2007. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社. 14.]
- Zhao Y, Deepak S, 2007. A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(4): 189–197.
- Zhang Y, Lamba P, Guo PY, Emery P, 2016. miR-124 regulates the phase of *Drosophila* circadian locomotor behavior. *The Journal of Neuroscience*, 36(6): 2007–2013.
- Zou DF, Yi C, Han YX, Chen L, Tu GJ, 2014. Overexpression of microRNA-124 promotes the neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neural Regeneration Research*, 9(12): 1241–1248.