

短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* microRNA 鉴定及四环素响应 microRNA 功能分析*

肖安琪^{1,2**} 沈家安¹ 李迎瑞¹ 吴萌¹ 曹睿³
董旭¹ 张海燕^{1,2,3***} 刘聪鹤^{1,2,3***} 李鹏⁴

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319; 2. 农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 大庆 163319;
3. 黑龙江省秸秆资源化利用工程技术研究中心, 大庆 163319; 4. 黑龙江省植检植保站, 哈尔滨 150090)

摘要 【目的】赤眼蜂是农林害虫的重要卵寄生蜂, 感染沃尔巴克氏菌 *Wolbachia* 后其生殖方式由两性生殖 (Bisexual reproduction) 转为孤雌产雌生殖 (Thelytoky), 四环素 (Tetracycline) 可以去除赤眼蜂体内的共生菌使孤雌产雌的赤眼蜂恢复两性生殖方式。本研究旨在探究与短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* 生殖相关的功能性 miRNA 及其靶基因。【方法】以 2.5 mg/mL 盐酸四环素蜂蜜溶液连续饲喂处理短管赤眼蜂孤雌产雌品系 3 代成蜂, 计算寄生率、羽化率和雌性比, 利用 Illumina 平台进行短管赤眼蜂孤雌产雌品系成蜂体内 small RNA 转录组测序, 筛选差异表达基因并进行 GO/KEGG/COG 分析; 利用 RT-qPCR 检测短管赤眼蜂转录组数据中差异表达的 10 个基因 (*novel_miR_124*、*novel_miR_311*、*novel_miR_176*、*novel_miR_99*、*novel_miR_510*、*novel_miR_48*、*novel_miR_96*、*novel_miR_315*、*novel_miR_280*、*novel_miR_92*) 的表达量。【结果】本研究测定了四环素处理前后短管赤眼蜂的全转录组, 获得短管赤眼蜂差异表达 microRNA 79 个, 上调表达 67 个, 下调表达 12 个, 共预测靶基因 4 129 个, 其中表达量有差异的基因为 1 224 个。GO 分析表明, 靶基因参与了转录调控 (Regulation of transcription, DNA-templated)、跨膜运输 (Transmembrane transport)、催化活性 (Catalytic activity) 等功能。KEGG 分析表明, ECM、神经活性配体-受体相互作用、Mapk 以及 TGF-beta 和 Hippo 等信号通路可能在短管赤眼蜂感染沃尔巴克氏菌后的孤雌生殖机制调节中发挥关键作用。【结论】本研究表明, *novel_miR_280*、*novel_miR_99*、*novel_miR_48* 和 *novel_miR_311* 靶基因及信号通路是调控短管赤眼蜂孤雌产雌的关键, 并且减数分裂和第一次有丝分裂的异常对其生殖机制的转变起着不可或缺的作用。此外, 本研究还为该物种生殖机制改变后的表观遗传研究提供了全面的转录组参考信息。

关键词 短管赤眼蜂; microRNA; 全转录组; 孤雌产雌; 生殖机制

Identification of microRNAs in *Trichogramma pretiosum* and functional analysis of tetracycline-responsive microRNAs

XIAO An-Qi^{1,2**} SHEN Jia-An¹ LI Ying-Rui¹ WU Meng¹ CAO Rui³
DONG Xu¹ ZHANG Hai-Yan^{1,2,3***} LIU Cong-He^{1,2,3***} LI Peng⁴

(1. Agricultural College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northeastern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs P. R. China, Daqing 163319, China;
3. Heilongjiang Straw Resource Utilization Engineering Technology Research Center, Daqing 163319, China;
4. Heilongjiang Provincial Plant Protection Station, Harbin 150090, China)

Abstract [Aim] To explore functional miRNAs and their target genes related to the reproduction of *Trichogramma*

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31301714); 黑龙江省自然科学基金 (C2015039)

**第一作者 First author, E-mail: 2937540718@qq.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: zhanghy51@126.com; liuconghe012@126.com

收稿日期 Received: 2025-12-19; 接受日期 Accepted: 2026-02-23

pretiosum, an important egg parasitoid of agricultural and forestry pests. **[Methods]** The third generation of *T. pretiosum* parthenogenetic strain was continuously fed with 2.5 mg/mL tetracycline hydrochloride honey solution. Parasitic rate, eclosion rate and female ratio were calculated. The Illumina platform was used to sequence the small RNA transcriptome of *T. pretiosum* parthenogenetic strain adults. Differentially expressed genes were screened and GO/KEGG/COG analysis was performed. The expression levels of 10 differentially expressed genes (*novel_miR_124*, *novel_miR_311*, *novel_miR_176*, *novel_miR_99*, *novel_miR_510*, *novel_miR_48*, *novel_miR_96*, *novel_miR_315*, *novel_miR_280*, *novel_miR_92*) in the transcriptome data of *T. pretiosum* were detected by RT-qPCR. **[Results]** The entire transcriptome of *T. pretiosum* was sequenced and a total of 79 differentially expressed microRNAs identified, 67 of which were up-regulated and 12 down-regulated. A total of 4 129 target genes were predicted, of which, 1 224 were differentially expressed. GO analysis indicated that these target genes were involved in transcriptional regulation, transmembrane transport, catalytic activity, and other functions. KEGG analysis suggests that the ECM, neuroactive ligand-receptor interaction, Mapk, and TGF-beta and Hippo, signaling pathways play key roles in regulating thelytoky in *T. pretiosum* after *Wolbachia* infection. **[Conclusion]** This study demonstrates that the target genes and signaling pathways of *novel_miR_280*, *novel_miR_99*, *novel_miR_48*, and *novel_miR_311*, are crucial for regulating thelytoky in *T. pretiosum*, and that abnormal meiosis and first mitosis are indispensable for the transformation of its reproductive mechanism. Additionally, this study provides a comprehensive transcriptome reference information for epigenetic research on the reproductive mechanism of this species after alteration.

Key words *Trichogramma pretiosum*; microRNA; whole transcriptome; parthenogenesis; reproductive mechanism

赤眼蜂隶属于膜翅目 Hymenoptera、赤眼蜂科 Trichogrammatidae, 为赤眼蜂属 *Trichogramma* 的代表性类群。赤眼蜂的生殖方式主要是两性生殖, 少数种类能进行孤雌生殖 (丛斌等, 2011)。有研究指出, 孤雌生殖遵循雄性源自未受精的单倍体卵, 雌性源自二倍体受精卵的特定规律 (Li *et al.*, 2024)。然而, 当赤眼蜂感染沃尔巴克氏菌 *Wolbachia* 后, 其无需交配即可产生受精卵, 且雌性后代占比接近 100% (Werren *et al.*, 2008)。另有研究表明, 感染 *Wolbachia* 的赤眼蜂拥有更强的繁殖力, 在理想条件下仅需单头雌性个体即可建立种群 (Fast *et al.*, 2011)。因此, 利用 *Wolbachia* 可诱导赤眼蜂产生孤雌生殖品系的生物学特性有望提高生物防治资源的生产能力, 并降低害虫防控的成本 (Rahimi-Kaldehy *et al.*, 2018)。

目前, 关于 *Wolbachia* 诱导寄生蜂生殖方式改变的内在机制已多有研究报道。如 *Wolbachia* 通过细胞质不亲和性、杀雄、雌性化等手段来操纵寄生蜂的生殖方式 (张艳凯等, 2015; Somayeh *et al.*, 2017; 王迎, 2023)。此外, *Wolbachia* 可在宿主体内进行迁移, 能够从卵母细胞周围的滋养细胞转移至卵巢, 并稳定存在于极原生质体及原始生殖细胞中 (Serbus and Sullivan, 2007; Dregni *et al.*, 2025)。*Wolbachia* 还拥有一种称

为衍生传递的传播方式, 即从感染 *Wolbachia* 的卵细胞开始, 历经胚胎、幼虫至成虫各发育阶段, 以及成虫生殖细胞的分裂与分化过程中, *Wolbachia* 均伴随宿主的生长发育进行持续迁移 (Tom *et al.*, 2021)。*Wolbachia* 的体内移动方式, 直接影响着其能否在寄生蜂种群中高效且稳定地完成垂直传播。

Wolbachia 调控对昆虫生殖体现在分子水平上。分子水平的调控是决定昆虫发育的关键因素, 而表观遗传机制在其中发挥着不可或缺的作用 (Yocum *et al.*, 2015)。表观遗传是指在 DNA 序列不发生改变的情况下, 基因表达模式或细胞表型发生的可遗传变化的现象, 其调控机制涉及核小体定位、染色质重塑、组蛋白修饰、DNA 甲基化、RNA 可变剪接、非编码 RNA、RNA 修饰和假基因等多个层面 (Mehler, 2008; Bonasio *et al.*, 2010; 赵秀娟等, 2012; 杨莹等, 2022; Zekry *et al.*, 2023)。在昆虫中, 表观遗传机制具有广泛的作用, 可能参与调控变态发育、寿命、生殖功能及性别决定等生物学过程 (Kang *et al.*, 2017; Kohno and Kubo, 2019; Phillipp *et al.*, 2020; Rui *et al.*, 2020; 陈凤, 2024)。其中, 非编码小 RNA 与表观遗传调控之间的关联并非单向作用, 而是通过构建闭环调节网络, 实现对目的基

因表达的精准调控,以响应细胞发育及环境应激等多种生理需求 (Marco and Giorgio, 2022)。

microRNA 自发现至今,在各种领域都被发现,并在昆虫的生长发育、变态发育、免疫调节、昼夜节律、表型可塑等各个方面都发挥着重要的调控作用 (王海超, 2024)。随着对昆虫 microRNAs 研究的不断深入,发现 microRNA 广泛参与昆虫的免疫、生殖、发育和抗药性等生物学过程,在转录后水平的调控上发挥重要作用 (Etebari *et al.*, 2018; 朱宇和刘洋, 2025)。

为明确赤眼蜂响应 *Wolbachia* 感染的 microRNA 及其潜在生物学功能,深入探究短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* 生殖调控机制的基础,本研究系统分析了短管赤眼蜂孤雌产雌品系与两性生殖品系全转录组中 microRNA 的分子特征及表达差异,初步明晰了差异表达 microRNA 及其靶基因所涉及的信号通路,为后续短管赤眼蜂生殖机制的 RNAi 研究提供候选基因,同时也为探究 microRNA 在 *Wolbachia* 调控短管赤眼蜂孤雌产雌生殖机制中的作用提供了重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试寄主:米蛾 *Corcyra cephalonica* 长期饲养在黑龙江八一农垦大学农学院昆虫实验室的光照培养箱内 (HC-05B, 上海一恒科学仪器有限公司),温度 (25±1)℃、相对湿度为 71%±5%、光周期为 16 L : 8 D。

供试蜂种:孤雌产雌短管赤眼蜂 (孤雌产雌品系,下文同)由沈阳农业大学生物研究室提供,在黑龙江八一农垦大学养虫室人工气候培养箱 (生元 RQH880/H, 郑州生元仪器有限公司)[温度为 (25±1)℃、相对湿度为 71%±5%、光周期 16 L : 8 D]中使用杀胚米蛾卵连续饲养多代。

1.2 试虫处理

取 30 头羽化 24 h 内的 F₀ 代短管赤眼蜂,喂食含有盐酸四环素 (2.5 mg/mL) 的蜂蜜水 (30%), 24 h 后接入杀胚 20 min 的新鲜米蛾卵

卡,自然寄生。24 h 后收回卵卡,在培养箱内正常饲养。获得的 F₁ 和 F₂ 代均喂食含有四环素的蜂蜜水,最终得到两性生殖品系;以喂食不含四环素的蜂蜜水作为对照。

各取 30 粒上述 F₁、F₂ 和 F₃ 代短管赤眼蜂寄生的米蛾卵,分装到指型管中,羽化后立即统计雌雄寄生蜂数量。同时给雌蜂提供新鲜米蛾卵卡,用于统计下一代的寄生和羽化情况。统计期间,收集子代新羽化成虫样本,一部分用于检测 *Wolbachia* 去除情况,另一部分经液氮冷冻后保存在 -80℃ 冰箱,用于后续的测序和 qRT-PCR 分析。共重复 3 代,每代进行 10 次重复。统计每一子代寄生数、羽化数、雌性比,计算公式如下。

寄生率 = (被寄生卵粒数 / 总卵粒数) × 100%;

羽化率 = (羽化卵粒数 / 寄生卵粒数) × 100%;

雌性比 = (羽化雌蜂数 / 羽化总蜂数) × 100%。

1.3 microRNA 测序

利用 Trizol 提取盐酸四环素 (2.5 mg/mL) 处理的短管赤眼蜂孤雌产雌成蜂总 RNA,使用 Nanodrop One (赛默飞,美国)和 1% 琼脂糖凝胶电泳分别检测总 RNA 的纯度与质量。采用 EZ-press microRNA Reverse Transcription Kit (EZBioscience, 南京)反转试剂盒对合格的总 RNA 样品进行反转录获得 cDNA 样品,反转体系参照说明书进行。

采用边合成边测序 (Sequencing-by-synthesis, SBS) 技术,利用 Illumina HiSeq 平台对构建的 cDNA 样本进行高通量测序。接着,对产生的高通量测序原始数据进行初步质量评估,并基于 Q 值公式 ($Q_{\text{score}} = -10 \times \lg P$) 计算其 Q10、Q20 与 Q30 碱基占比,其中 P 代表碱基识别出错的概率。随后,为保障数据质量,剔除了含接头序列、N 碱基比例超过 10%、或 Q 值 ≤ 10 的碱基占整条读段 50% 以上的低质量读段。以短管赤眼蜂 2.0 基因组 (GenBank 登录号: GCF_000599845.2) 作为参考基因组,采用 HISAT2 将质控后获得的高质量 Clean data 与参考基因组进行比对。随后利用 StringTie 对映射到基因组上的测序片段 (Reads) 进行转录本组装及定量分析。基因表达水平以外显子每千

碱基片段百万比 (Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) 值表示, 计算公式如下:

$$\text{FPKM} = \text{cDNA 片段计数/有效比对读段总数} \times \text{转录本长度 (千碱基)}.$$

1.4 microRNA 筛选及其靶基因预测

利用生物信息学软件 TargetScan (http://www.targetscan.Org/vert_60/) 和 miRanda(<http://www.Ebi.Ac.uk/enright-srv/mierocosm/htdocs/targets/v5>) 对显著性差异的 miRNA 分别进行靶基因预测倍数变化 (Fold change, FC) 为 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1.00$; $P\text{-value} \leq 0.05$ 。其中, 在 79 个高表达差异 miRNA 中共预测 4 129 个靶基因, 取此三款软件的交集后共有 1 224 个靶基因。

1.5 差异表达 microRNA 的靶基因功能注释

采用 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$, $P < 0.05$ 和 $\text{FDR} < 0.05$ 作为筛选阈值, 用于界定差异表达的 microRNA 或 mRNA。接着, 使用 Blast 软件将预测靶基因序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KEGG、KOG、Pfam 数据库比对, 获得靶基因的注释信息。利用 Cluster Profiler 软件, 基于超几何检验对差异表达 microRNA 的靶基因进行 GO 功能富集分析, 涵盖生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个

类别。同时, 利用 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库对差异表达 microRNA 靶基因的信号通路进行注释与富集分析。利用富集因子 (Enrichment factor) 分析通路的富集程度, 并利用 Fisher 精确检验方法 ($P < 0.05$) 计算富集显著性。

1.6 qRT-PCR 验证

为检测转录组测序结果的准确性, 本研究从盐酸四环素处理前后短管赤眼蜂孤雌产雌成蜂体内 *Wolbachia* 属的转录组数据中选择 3 个影响生长发育的通路, 分别为 AGE-RAGE 信号通路、Hippo 信号通路和 TGF- β 信号通路, 从中选取 10 个基因进行验证, 分别为 *novel_miR_124*、*novel_miR_311*、*novel_miR_176*、*novel_miR_99*、*novel_miR_510*、*novel_miR_48*、*novel_miR_96*、*novel_miR_315*、*novel_miR_280*、*novel_miR_92*。以 50 头孤雌产雌成蜂总 RNA 为模板, 采用 Aidlab 公司的 TUREscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录反应。使用 Vazyme 公司 (南京) 的 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂, 按照说明书推荐的反应体系, 在 analytikjena-qTOWER2.2 型荧光定量 PCR 仪 (德国) 上进行 qRT-PCR 检测。以 *GAPDH* 作为内参基因, 对基因的表达量进行校正 (表 1),

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

基因 Genes	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequences (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequences (5'-3')
<i>novel-miR-124</i>	CCTTCTCTTTGGTTGTTACCACTA	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-311</i>	CTATCAGATCGGATGTCAGATCC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-176</i>	CTATCAGATCGGATGTCAGATCC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-99</i>	TTTTGCTTGCCGTTGGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel_miR_510</i>	CCTTGACTGCAGGACGGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel_miR_48</i>	TATTGCACTCGTCCCGGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-96</i>	CGTGCTCTGGGGCTTTCTT	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-315</i>	CCATTTCTGAACGCAAATTGT	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-280</i>	TCCCTACGAGTCGTTCCGT	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>novel-miR-92</i>	ACCCCCAGAAATTCAATCAAA	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTCCG
<i>GAPDH</i>	TCAACGGCAACAAGATCACC	CTTTGTGGCTTGGGTCGTAC

反应体系 (20 μL): cDNA 模板 2 μL , 2 $\times$ SYBR Mix 10 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , 6.4 μL ddH₂O。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 随后 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s)。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各样品中目标基因的相对表达量。每个基因均设置 2 个孤雌产雌品系短管赤眼蜂处理组, 一组为处理组, 一组为对照组, 所有 qRT-PCR 实验均设置 3 次生物学重复以及 3 次技术重复。

1.7 数据分析

盐酸四环素处理前后孤雌产雌品系短管赤眼蜂成蜂的寄生率、羽化率、雌性比参数由 Excel 2020 进行整理, 采用 Graphpad Prism9.5.1 进行绘图; 同一处理组孤雌产雌品系短管赤眼蜂各世代间的寄生率、羽化率、雌性比数据处理使用 SPSS 26.0, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 对各组数据进行显著性检验, 并结合 Duncan 氏多

重极差法开展多重比较, 以明确不同处理组间的差异显著性水平, $P<0.05$ 设定为差异显著, 对照组与处理组间使用独立样本 t 检验。

2 结果与分析

2.1 抗生素处理对短管赤眼蜂寄生率、羽化率及性比的影响

四环素处理后短管赤眼蜂寄生率 F_1 代最多, F_1 到 F_3 递减, 且 F_2 与 F_1 寄生率中差异显著 ($P<0.05$), F_3 与 F_2 差异不显著 ($P>0.05$); 短管赤眼蜂羽化率 F_1 代最少, F_1 到 F_3 递增, 且 F_2 与 F_1 羽化率差异不显著 ($P>0.05$), F_3 与 F_2 羽化率差异显著 ($P<0.05$); 短管赤眼蜂雌性比处理后数量自 F_1 代递减, 且各代际间差异显著 ($P<0.05$); 对照组短管赤眼蜂寄生率、羽化率以及雌性比 (除 F_2 与 F_1 间寄生率外, 可能为试验误差) 各代际均无显著差异 ($P>0.05$) (表 2)。

表 2 抗生素处理前后对短管赤眼蜂生物学特性的影响

Table 2 Effects of antibiotic treatment on biological characteristics of *Trichogramma pretiosum*

世代 Generation	寄生率 (%) Parasitism rate (%)	羽化率 (%) Mergence rate (%)	雌性比 (%) Female ratio (%)
TF ₁	40.33 $\pm$ 0.88 b	41.67 $\pm$ 3.38 c	88.67 $\pm$ 2.40 a
CF ₁	74.00 $\pm$ 2.52 a	68.67 $\pm$ 4.70 a	100.00 $\pm$ 0.00 a
TF ₂	28.67 $\pm$ 2.03 c	51.67 $\pm$ 3.76 bc	74.33 $\pm$ 5.78 b
CF ₂	68.67 $\pm$ 5.24 a	73.67 $\pm$ 3.18 a	100.00 $\pm$ 0.00 a
TF ₃	22.00 $\pm$ 2.08 c	53.33 $\pm$ 0.88 b	32.33 $\pm$ 6.57 c
CF ₃	71.67 $\pm$ 2.03 a	76.67 $\pm$ 3.28 a	100.00 $\pm$ 0.00 a

TF₁、TF₂、TF₃: 以 2.5 mg/mL 质量浓度的盐酸四环素连续饲喂 1、2、3 代后的短管赤眼蜂孤雌产雌品系成蜂处理组; CF₁、CF₂、CF₃: 未施用盐酸四环素的 1、2、3 代短管赤眼蜂孤雌产雌品系成蜂对照组; 雌性比: 雌/雄。表中数据为平均值 $\pm$ 标准误, 同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著 (Duncan 氏多重极差法)。

TF₁, TF₂, TF₃: The *T. pretiosum* parthenogenetic female strain adult treatment group was fed with 2.5 mg/mL tetracycline hydrochloride for 1, 2 and 3 generations; CF₁, CF₂, CF₃: The 1st, 2nd and 3rd generation of *T. pretiosum* parthenogenesis strain adult bee control group without tetracycline hydrochloride application; Female ratio: Female/male. The data in the table are mean $\pm$ SE. The different letters after the data in the same column indicate significant difference at the 0.05 level (Duncan's multiple range test).

2.2 测序数据质控

由表 3 可知, 以施用四环素的孤雌产雌品系短管赤眼蜂样品作为处理, 以未施用四环素的孤雌产雌品系短管赤眼蜂样品作为对照, 共产生 6 个 cDNA 文库, 并进行转录组测序。测序后的数

据经质量控制后得到 147 080 931 个有效数据, 从 6 个样品中共得到 184.4 Gb 的原始数据。质检结果显示, 各样品质控后碱基含量均在 49.75%-51.23% 之间, 且所有样本的 Q30 值均大于 96.08%, 说明转录组测序获得的数据质量较高, 可以用于后续分析。

表 3 样品测序数据及质量检验
Table 3 Sample sequencing data and quality inspection

样本 Sample	总 reads 数 Total reads	BaseSum	GC (%)	Q30 (%)
gc1	32 118 127	2 432 284 707	49.98	98.72
gc2	29 668 675	2 492 295 030	50.22	98.62
gc3	18 040 550	1 814 286 036	51.23	98.68
lx1	22 183 217	1 919 628 066	50.55	98.59
lx2	28 007 356	2 422 825 788	50.33	98.63
lx3	17 063 006	1 306 426 965	49.75	96.08

gc1、gc2、gc3 为孤雌产雌品系短管赤眼蜂的 1、2、3 代; lx1、lx2、lx3 为两性生殖品系短管赤眼蜂的 1、2、3 代; BaseSum: Clean data 总碱基数; GC (%): Clean data 中 G、C 碱基占总碱基的百分比; Q30 (%): Clean data 质量值≥Q30 的碱基所占的百分比。
gc1, gc2 and gc3 were the first, second and third generations of the parthenogenetic *T. pretiosum*; lx1, lx2 and lx 3 are the 1st, 2nd and 3rd generations of the hermaphroditic *T. pretiosum*; BaseSum: Total base count in clean data; GC (%): Percentage of G and C bases in total bases in clean data; Q30 (%): Percentage of bases with quality value≥Q30 in clean data.

如图 1 (A, B) 所示, 新预测到的 microRNA 长度与已知 microRNA 长度集中位置高度吻合, 已知 microRNA 分布相对分散 (22-23 nt 为主), 符合已知 microRNA 因物种/家族差异。microRNA 长度会影响与靶 mRNA 的互补配对, 可推测靶标范围可能有共性。

2.3 差异表达 microRNA 鉴定和表征

两组样本的比较显示, 孤雌产雌品系和两性生殖品系之间差异表达 79 个 microRNA。12 个 (15.19%) 差异表达 microRNA 为下调表达, 上调表达的 microRNA 为 67 个 (84.81%) (图 2: A), 差异表达 microRNA 的热图如图 2 (B)。

差异表达 microRNA 的亚细胞定位预测结果表明, 分别有 47.32%、30.53%、21.37%和 0.76% 的 microRNA 定位于细胞核、细胞质、外泌体和核糖体中, 而胞质溶胶中没有定位到 microRNA (图 2: C)。

2.4 基于全转录组的 microRNA 靶基因分析

为了深入了解差异表达的 microRNA, 对其靶基因进行了 GO 和 KEGG 注释分析。GO 富集分析显示, 差异表达 microRNA 的靶基因富集在生物过程、细胞组分和分子功能三大类别。GO 富集分析表明, 差异表达 microRNA 的靶基因在生物过程中显著富集在代谢过程、细胞过程、单

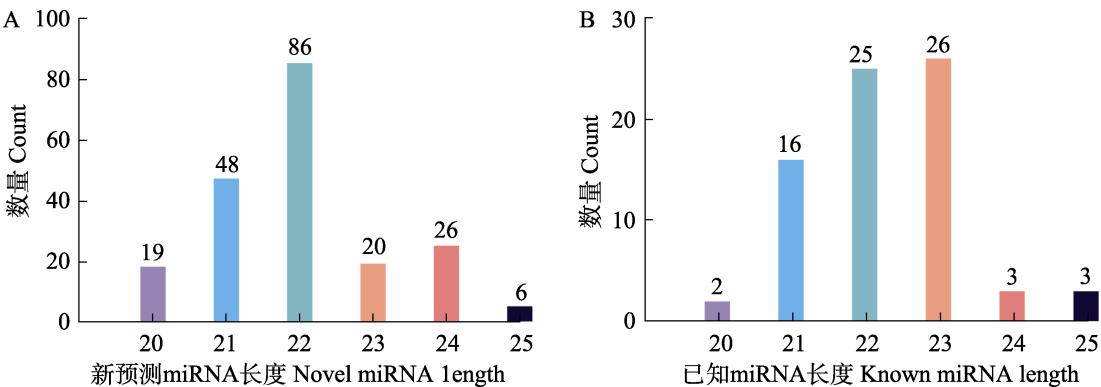


图 1 短管赤眼蜂 microRNA 长度
Fig. 1 Length of *Trichogramma pretiosum* microRNA
A. 新预测 microRNA 的长度; B. 已知 microRNA 的长度。
A. Length of newly predicted microRNA; B. The length of known microRNA.

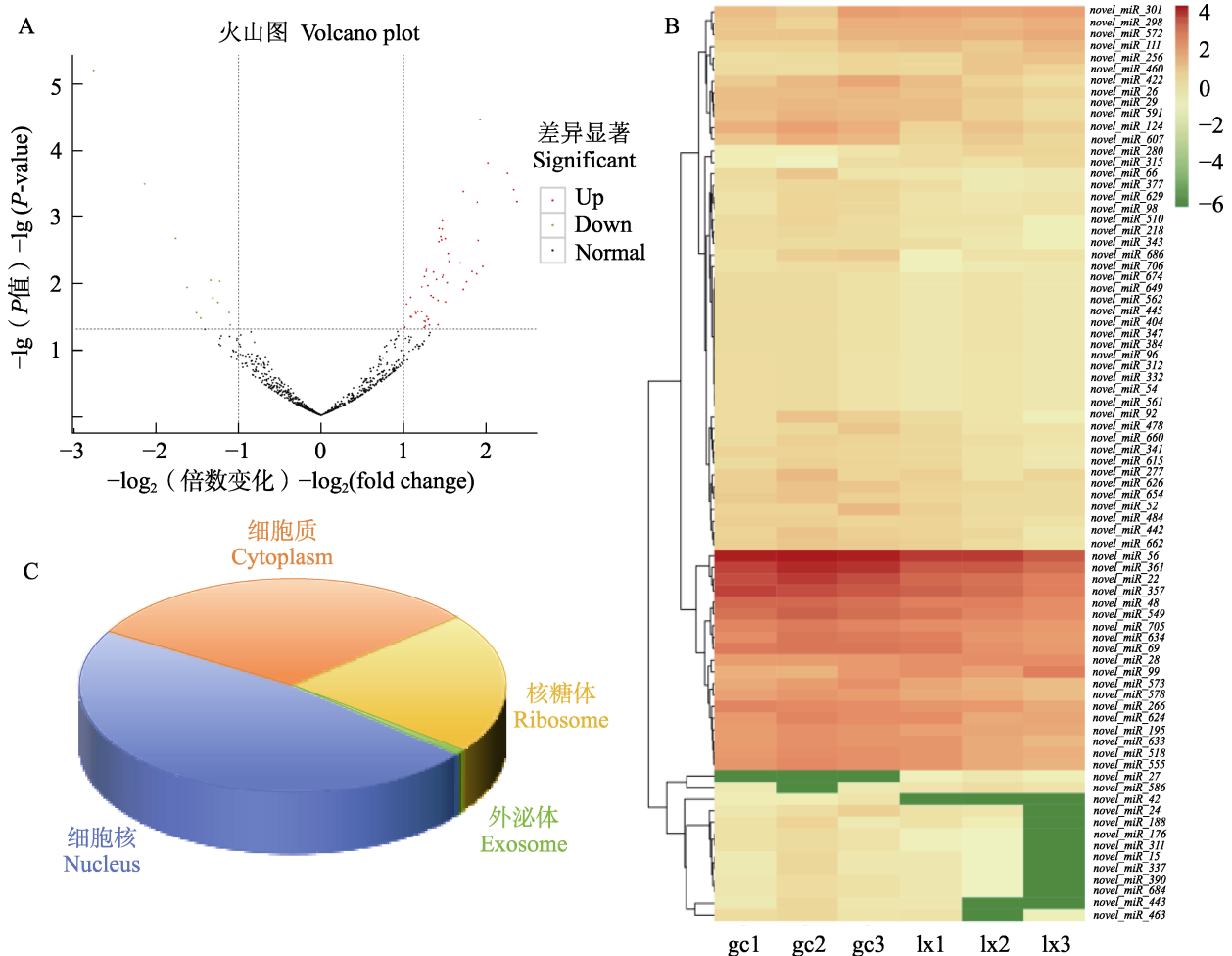


图 2 差异表达 microRNA 表达量

Fig. 2 Expression levels of differentially expressed microRNAs

A. 差异表达 microRNA 的火山图；红色：基因上调；绿色：基因下调；B. 79 个差异表达 microRNA 表达量热图；gc1、gc2、gc3 为孤雌产雌品系短管赤眼蜂的 1、2、3 代；lx1、lx2、lx3 为两性生殖品系短管赤眼蜂的 1、2、3 代；C. 差异表达 microRNA 亚细胞定位饼状图。

A. Volcano plot of differentially expressed microRNAs; Red: Upregulated genes; Green: Downregulated genes; B. Heatmap of expression levels of 79 differentially expressed microRNAs; gc1, gc2 and gc3 were the 1st, 2nd and 3rd generations of the parthenogenetic *T. pretiosum*; lx1, lx2 and lx3 are the 1st, 2nd and 3rd generations of the hermaphroditic *T. pretiosum*; C. Pie chart of subcellular localization of differentially expressed microRNAs.

一有机体过程及生物调节等类别；在细胞组分层面，则主要富集在细胞、细胞连接和细胞外区域等结构。此外，在分子功能方面，基因差异表达（Differentially expressed genes, DEGs）富含抗氧化活性、结合、催化活性、电子载体活性、核酸结合等（图 3）。

KEGG 通路富集分析显示，差异表达 microRNA 的靶基因显著富集在 45 条通路中。在细胞过程通路中，靶基因显著富集在内吞作用和溶酶体两个功能模块。在环境信息处理中，靶

基因最为富集的信号通路是细胞外基质、神经活性配体-受体相互作用、Hippo 信号通路、TGF- β 信号通路（Shi and Massagué, 2003）以及 MAPK 信号通路（图 4），这些通路是调控细胞功能、神经功能、生殖过程及激素合成等生物学过程的重要调节因子。

2.5 microRNA 调控差异靶基因分析

为了更准确的筛选出 microRNA 在转录水平上调的靶基因，对预测的 microRNA 靶基因进

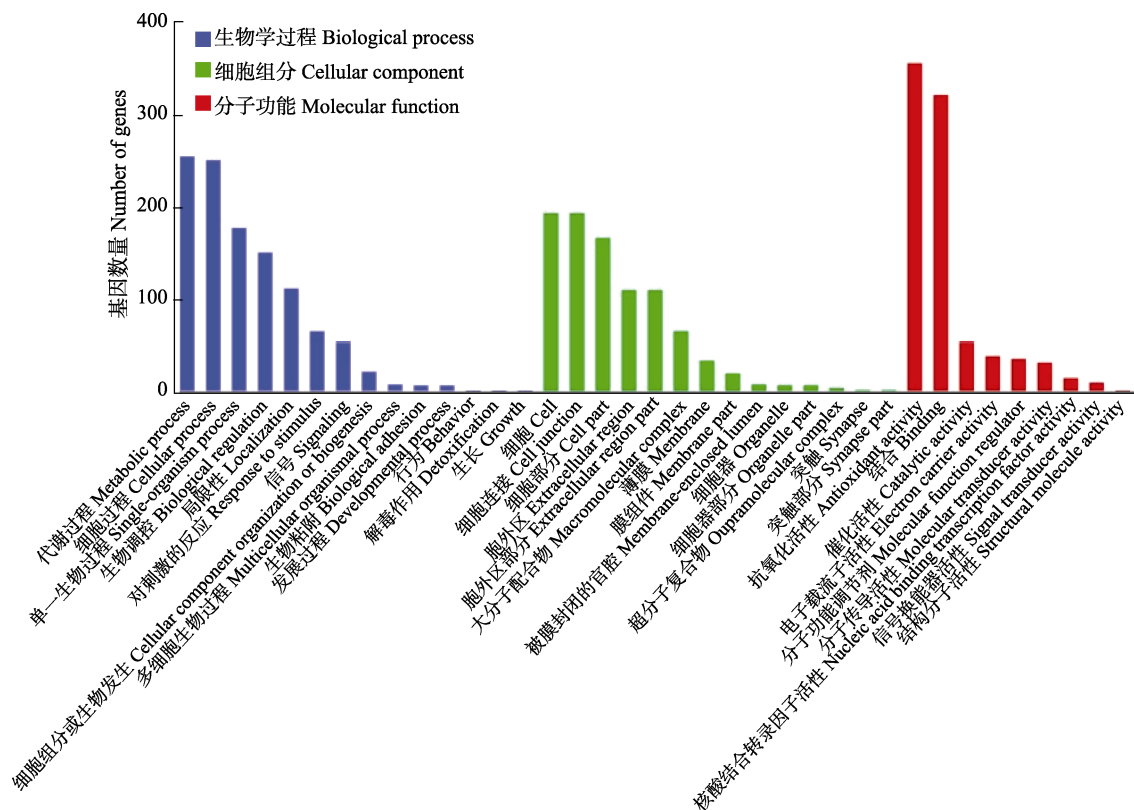


图 3 差异表达 microRNA 靶基因 GO 分类

Fig. 3 Gene ontology (GO) classification of differentially expressed microRNA target genes

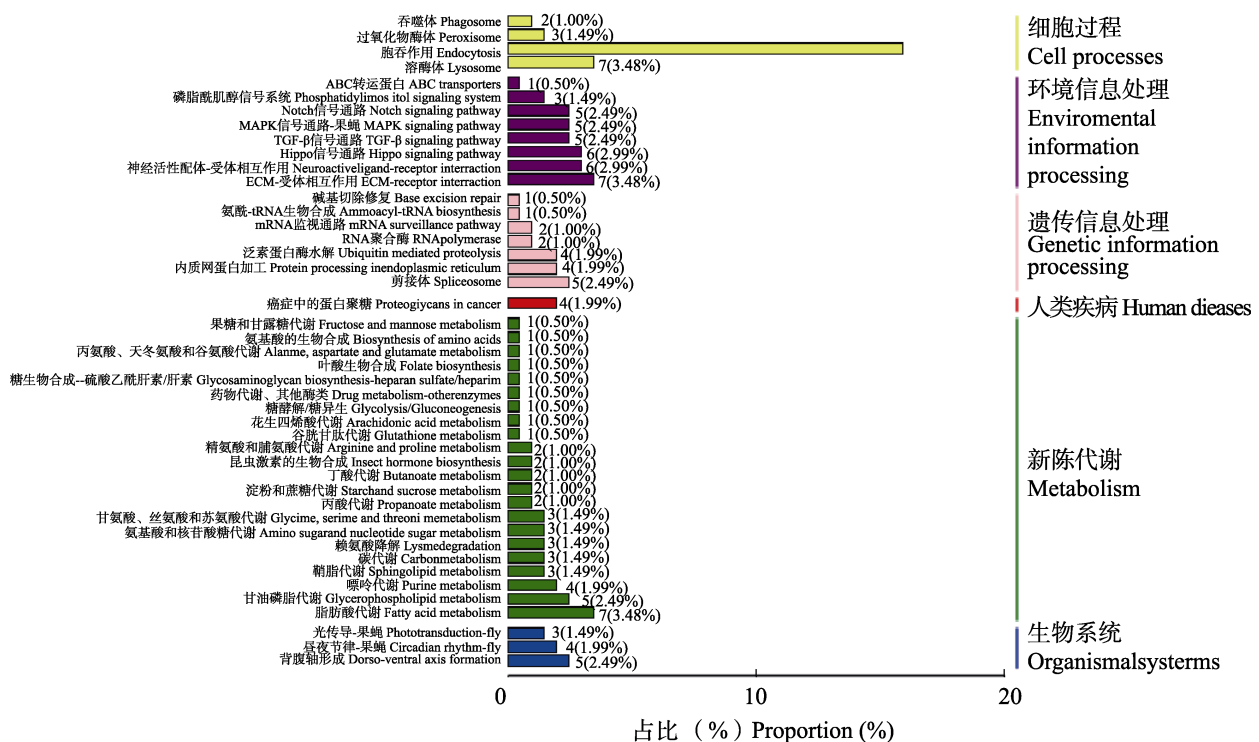


图 4 差异表达 microRNA 靶基因 KEGG 分析

Fig. 4 KEGG pathway analysis of target genes for differentially expressed microRNAs

行筛选,去除其中 $|\log_2FC| < 1$ 的基因,最终得到 975 个靶基因,并对筛选后的基因进行 GO 和 KEGG 分析。

GO 分析结果表明,三个大类分别包括 20、14 和 11 个 GO 功能亚类(图 5)。靶基因注释显著的 4 个生物学过程为转录调控、跨膜运输、氧

化还原过程、代谢过程。从细胞成分来看,靶基因仅在膜的整体组成部分、细胞核、细胞膜、细胞等注释中。此外,分析其分子功能,靶基因被注释于 ATP 结合、金属离子结合、序列特异性 DNA 结合转录因子活性、DNA 结合、核酸结合等。

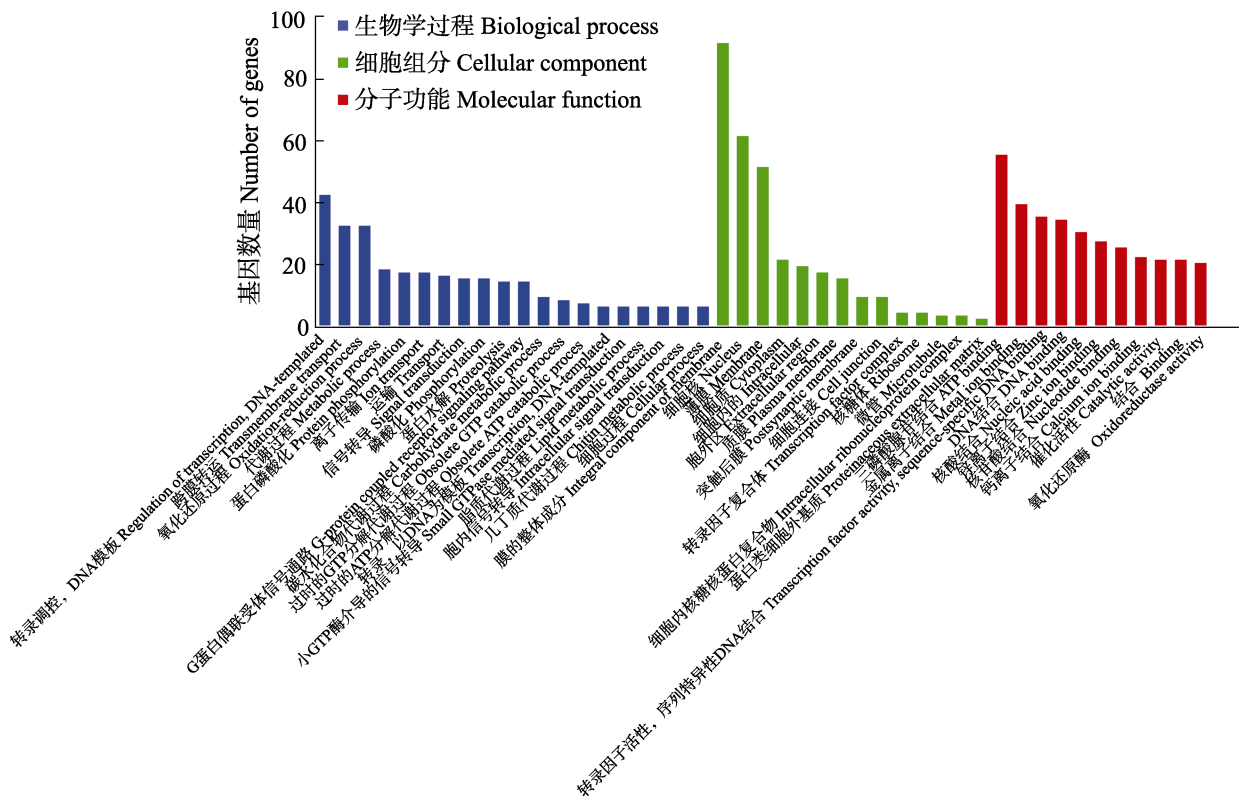


图 5 差异表达 microRNA 转录水平上调的靶基因 GO 分析

Fig. 5 Gene ontology (GO) analysis of target genes regulated at the transcriptional level by differentially expressed microRNAs

KEGG 分析表明,差异表达靶基因被注释到 20 个通路中(图 6)。microRNA 差异靶基因涉及的 4 个信号通路分别是癌症中的蛋白葡聚糖、AGE-RAGE 信号通路、溶酶体和 TGF- β 信号通路,以及 Hippo 信号通路、内吞作用和胚胎背腹轴形成,这些通路已被证实广泛参与卵巢发育过程。

2.6 qRT-PCR 验证

为验证转录组测序结果,本研究从短管赤眼蜂体内全转录组数据中随机选取了 10 个差异表达的 microRNA 进行 qRT-PCR 验证。分别为

novel_miR_124、*novel_miR_311*、*novel_miR_176*、*novel_miR_99*、*novel_miR_510*、*novel_miR_48*、*novel_miR_96*、*novel_miR_315*、*novel_miR_280* 和 *novel_miR_92*。对照组为未施用四环素的孤雌产雌短管赤眼蜂品系。qRT-PCR 验证结果如图 7 所示,所验证的 10 个 microRNA 上下调关系与转录组的分析结果相符,表明测序结果可靠。利用多因素方差分析多重比较相对表达量,其中, *novel_miR_176*、*novel_miR_510* 和 *novel_miR_92* 的相对表达量极显著高于对照 ($P < 0.01$), *novel_miR_176* 和 *novel_miR_99* 的相对表达量极显著低于对照 ($P < 0.01$)。

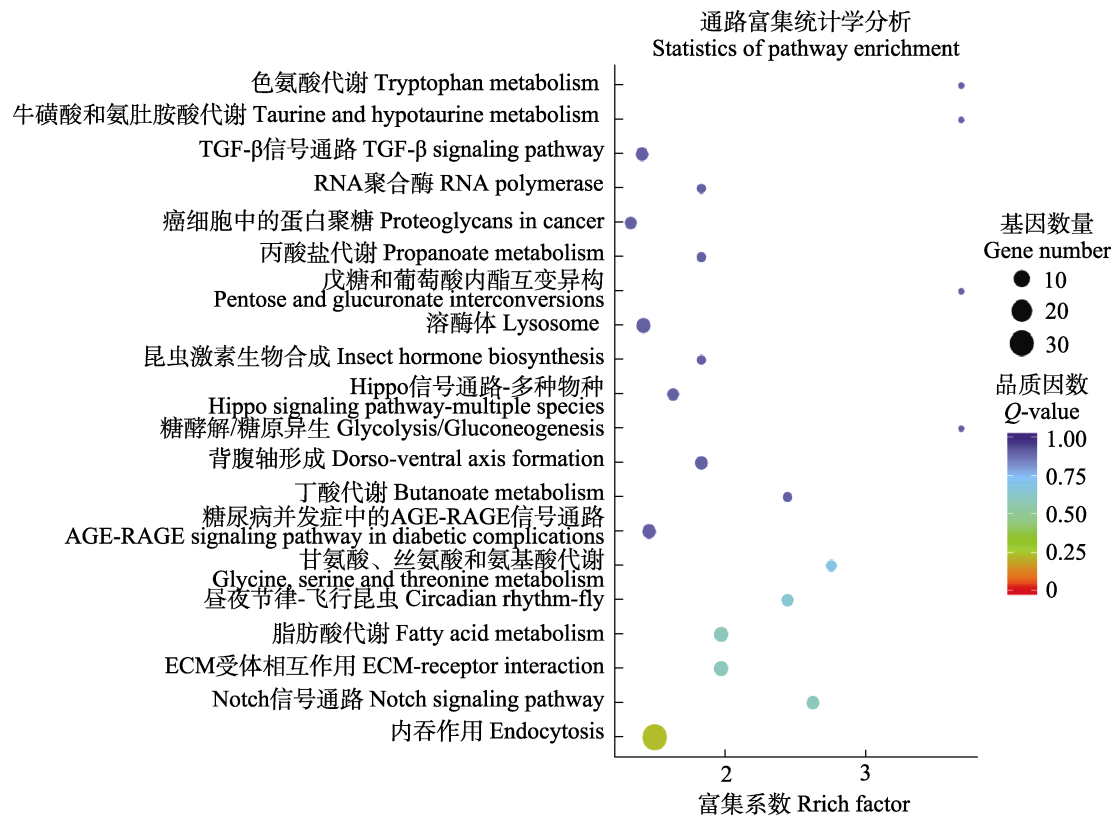


图 6 差异表达 microRNA 转录水平上调的靶基因 KEGG 富集分析
Fig. 6 KEGG enrichment analysis of target genes regulated by differentially expressed microRNAs at the transcriptional level

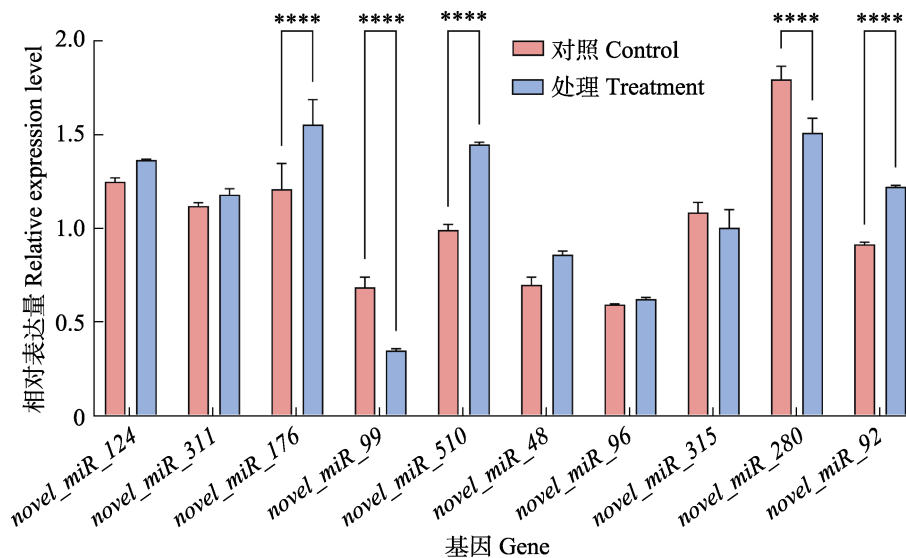


图 7 盐酸四环素处理前后孤雌产雌品系成蜂体内 10 个差异表达基因的 RT-qPCR 检测
Fig. 7 RT-qPCR analysis of 10 differentially expressed genes in adult bees of the thelytokous lineage before and after tetracycline hydrochloride treatment

柱上标有****表示经处理与对照之间差异极显著 ($P < 0.0001$, t 检验);

对照组为未施用四环素的孤雌产雌短管赤眼蜂品系。

**** above bars indicate extremely significant difference between the treatment and the control ($P < 0.0001$, t -test);

The control group was a parthenogenetic female *T. pretiosum* strain without tetracycline application.

2.7 盐酸四环素处理短管赤眼蜂体内差异表达基因的表达式

将 4 个上调的 DEGs (*novel_miR_218* *novel_miR_176*、*novel_miR_48* 和 *novel_miR_96*) 通过 KEGG 数据库进行功能注释 (表 4), 分别富

集于癌症中的蛋白葡聚糖通路、真核生物中核糖体生物发生通路、泛素介导的蛋白水解通路和脂质运输与代谢通路。进一步分析表明, 这 4 个 DEGs 编码的酶分别被注释为细胞骨架蛋白、周期性色氨酸蛋白 2、环盒蛋白 2 和脂肪酶 3 类。

表 4 盐酸四环素处理短管赤眼蜂孤雌产雌品系成蜂体内差异基因表达量及注释信息
Table 4 Differentially expressed gene expression and annotation information in *Trichogramma pretiosum* parthenogenetic female strain adults treated with tetracycline hydrochloride

基因	Genes	每百万映射读取中每千碱基转录本的读取数平均值		基因描述	Genes description
		Average reads per kilobase of transcript per million mapped reads value			
		对照	CK		
	<i>novel_miR_218</i>	43.15	65.25	细胞骨架蛋白	Cytoskeleton proteins
	<i>novel_miR_176</i>	23.63	50.91	周期性色氨酸蛋白 2	Periodic tryptophan protein 2
	<i>novel_miR_48</i>	16.89	29.42	RING-box 蛋白 2	RING-box protein 2
	<i>novel_miR_96</i>	40.62	60.45	脂肪酶	Lipase (EC3.1.1.3)

CK: 未施用盐酸四环素的短管赤眼蜂孤雌产雌品系成蜂对照组; 处理: 以 2.5 mg/mL 质量浓度的盐酸四环素连续饲喂 3 代后的 F₃ 代短管赤眼蜂孤雌产雌品系成蜂处理组。
CK: Control group of *T. pretiosum* parthenogenetic strain without tetracycline hydrochloride; Treatment: The treatment group of F₃ generation of *T. pretiosum* parthenogenetic strain after continuous feeding with 2.5 mg/mL tetracycline hydrochloride for 3 generations.

3 结论与讨论

随着测序技术的成熟, microRNA 的研究拓展到了各个领域, 越来越多的证据表明 microRNA 在多种生物的生殖中具有重要调节作用, 目前关于 microRNA 在单倍体配子无需受精即可恢复二倍体、促使原本分化为雄性的子代转向雌性发育这一孤雌产雌过程中的调控作用, 相关作用机制仍尚不明确 (Li *et al.*, 2024)。本研究中, 我们对短管赤眼蜂进行了全转录组测序分析, 以系统性地在这两个性别决定模式内识别赤眼蜂的 microRNA。我们鉴定并分析了在两种生殖机制短管赤眼蜂中差异表达的 microRNA 的表征, 鉴于不同作用机制的 microRNA 在细胞内所处位置不同, 对差异表达的 microRNA 进行了亚细胞定位和基因位预测。本研究是首次对短管赤眼蜂全转录组进行分析, 为与短管赤眼蜂生殖相关的功能性 microRNA 研究提供了有价值的理论依据。

通过筛选分析, 在两种生殖机制下的短管赤眼蜂 microRNA 中, 共鉴定出 79 个表达存在显著差异的 microRNA, 并进一步确定了受其调控的 1 224 个靶基因。短管赤眼蜂恢复两性生殖方式依赖于四环素的作用。有研究表明, 细胞内共生菌 *Wolbachia* 通过获取真核源水平转移基因影响性别决定途径调控粉虱寄生蜂丽蚜小蜂 *Encarsia formosa* 孤雌产雌, 阐明了细胞内共生菌通过调控激素信号途径影响昆虫的生殖 (李晶晶, 2023)。而四环素作为一种抗生素不仅作用于 *Wolbachia*, 同时对短管赤眼蜂也会产生影响, 短管赤眼蜂取食后需要做出适应反应, 这些基因可能是短管赤眼蜂适应抗生素及改变生殖方式的重要基因。此外, microRNA 亚细胞定位结果显示 47.32% 的差异表达 microRNA 都处于细胞核中, 这表明在 microRNA 对短管赤眼蜂生殖机制的调控中, 转录水平的调控起着至关重要的作用, 但由于 miRanda 是一个通过计算核苷酸序列来进行预测的工具而不是基于物种数据库进行

位置定位, 所以定位结果仅作为参考, 转录后水平的调控仍然不可忽视。

通过 KEGG 分析得到了一些可能与短管赤眼蜂生殖、细胞周期和免疫相关的信号通路 (Pathway) 及其调控 microRNA, 例河马 (Hippo signaling pathway, Hippo)、丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 以及转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 等信号通路。Hippo 通路在卵巢生理与病理研究中扮演着关键角色, 它不仅调控着内分泌激素的合成与代谢、卵泡的生长发育及卵巢组织重塑, 也与生育力保存等方面研究紧密相关 (王铭丰等, 2025)。在本研究中, 孤雌产雌短管赤眼蜂相比于两性品系短管赤眼蜂的 Hippo 信号通路中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 LATS1/2 调控 *novel_miR_99* 下调表达。研究表明, 在 LATS1/2 激酶激活阶段会与 MOB1A/B 结合, 从而促进 Yes 关联蛋白 (YAP) 与含转录调控因子 1 的 WW 结构域 (WW domain containing transcription regulator 1, WWTR1, 亦称 TAZ) 的磷酸化, 进而影响细胞核内的转录调控机制 (李金晖, 2025)。核内蛋白激酶发生变化以及 YAP 调控 *novel_miR_311* 的下调表达可能发挥协同作用, 进而影响了 YAP 的正常发挥, YAP 的过度激活能够诱导多种细胞类型出现生长停滞现象, 包括人原代卵巢上皮细胞、卵巢颗粒细胞、宫颈上皮细胞及血管内皮细胞 (何春波, 2017)。Hippo 信号通路的核心作用机制是调控其效应分子 YAP1 与 TAZ 的磷酸化状态, 从而来实现核易位。此外, 该通路的活性在卵巢环境中还受到多种信号途径的整合调控, 包括 Wnt 信号通路、Notch 信号通路、表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 以及 TGF- β 信号通路。这与本研究结果相符, 因此推断 Hippo 的变化主要体现在去丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 LATS1/2 导致的 Hippo 在核内分布的变化。

细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 是调节细胞分化、增殖与凋亡的重要旁分泌因素。所有动物物种的组织都具有器官特异性 ECM 结构, 该结构在细胞增殖和迁移中起关键

作用 (Manikantan *et al.*, 2017)。胞外基质 (ECM) 再生过程中至关重要, 其关键成分如纤维粘连蛋白 (Fibronectin, FN), 层粘连蛋白 (Laminin, LN) 和胶原纤维 (Collagen, CL) 均被证实参与其中。

Hippo 信号通路存在于果蝇和哺乳动物中, 且表现出相对保守性。已有研究表明, 在果蝇卵子发生过程中, 卵室形状的变化引起的细胞间的粘附与张力的改变能活化该通路, 即这条信号通路远在原始卵泡组装前就被激活 (Badouel *et al.*, 2009; Georg and Johnson, 2011)。在果蝇卵巢中, Hippo 信号通路不仅调控了卵泡细胞的增殖、分化与结构, 更可以维持卵巢功能的稳定。因此, 该通路的失调会严重影响卵巢功能, 包括多囊卵巢综合征、卵巢功能不全等生殖系统的病变 (张喆等, 2024)。TGF- β 信号通路广泛参与维持胚胎干细胞干性及中内胚层分化等过程 (孙宏瑶等, 2024)。此外, MAPK 的敲除可诱发卵细胞自发激活, 这两种信号通路在 *Wolbachia* 感染短管赤眼蜂后可能发挥至关重要的作用。剪接体组装、内质网蛋白质加工及泛素介导的蛋白质降解等过程, 是遗传信息加工通路中基因注释数量最多、富集程度最高的代谢途径。这表明, 本研究中的 microRNA 可能对靶基因实施了多种调控: 不仅在转录前后阶段, 还延伸至转录后的 mRNA 剪接、蛋白质加工及蛋白质结合等过程。

MAPK 信号通路之所以引起关注, 是因为在爪蟾和小鼠的卵母细胞减数分裂研究中发现, 其活性水平与细胞周期蛋白 (Bcycln) B 的合成在时间上呈现高度同步性 (李静静, 2009)。本实验中, 孤雌产雌短管赤眼蜂相比于两性品系短管赤眼蜂的 MAPK 受体蛋白基因 *EGFR* 调控 microRNA *novel_miR_99* 和 *novel_miR_280* 下调表达, MAPK 活性相关靶点 MKK4 调控 microRNA *novel_miR_48* 上调表达, 这说明两种生殖方式品系的短管赤眼蜂在细胞周期上存在较大差异。MAPK 的活性呈正相关 (Yan *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2023)。关注重点并不仅仅是纺锤体形成受阻本身, 而在于赤眼蜂未受精卵在随之发生的第一次有丝分裂中所表现出的关键异

常行为：其染色体在末期未被拉向两极，并最终以此方式恢复了二倍体状态。纺锤体在赤眼蜂感染 *Wolbachia* 后发挥的作用发生了怎样的变化成为不可忽视的问题。虽然已经证明了孤雌产雌的赤眼蜂二倍体的恢复是在第一次有丝分裂后期完成的，但是 *Wolbachia* 对短管赤眼蜂细胞周期的影响还未见报道，因此对其的研究不能仅限于第一次有丝分裂后期，但是 MAPK 的失活是否是促使赤眼蜂恢复二倍体的直接原因这仍然是未知的。同时 MAPK 是 M2 期阻滞的关键因子，卵母细胞进行 M2 期的条件是受精，未受精卵细胞由于阻滞无法进行 M2 期及以后的细胞分化活动，而 MAPK 的敲除可以引发卵细胞的自发激活。例如敲除小鼠卵母细胞中 MAPK 亚族基因 *c-mos*，能够解除其排卵后 MII 期发育阻滞状态 (Miyagaki *et al.*, 2014)。本实验中短管赤眼蜂营孤雌产雌后 MAPK 的活性相关 microRNA *novel_miR_99* 和 *novel_miR_280* 下调，microRNA *novel_miR_48* 上调，推测这可能是短管赤眼蜂卵母细胞自发激活 M2 期的重要因素之一。

功能富集分析显示，差异表达 microRNA 的靶基因在 KEGG 通路中被显著注释到 TGF- β 信号通路和溶酶体信号通路。值得注意的是，卵母细胞发育过程中的纺锤体形成与 TGF- β 信号通路在成熟有机体和胚胎发育中均发挥广泛作用，二者都是至关重要的调控环节 (王雪等, 2023)。并且许多生物学过程也受到 TGF- β 信号通路的调节，目前没有研究表明短管赤眼蜂感染 *Wolbachia* 后其形态发生变化，TGF- β 更可能通过影响细胞周期，并调节因 *Wolbachia* 入侵或四环素摄入引发的免疫反应来发挥作用。处于 G1 期的细胞是非增殖状态的，这种非增殖状态可以由 TGF- β 信号通过 TGF- β 受体和 Smad 蛋白转导导致 (Andrew and Abraham, 2004)。转化生长因子 β 通路在上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程中起着关键作用，通过激活下游的 Smad 蛋白，促进 EMT 相关基因的表达，从而增强 microRNA 转移能力 (王宝金等, 2025)。短管赤眼蜂在感染 *Wolbachia* 孤雌产雌后 TGF- β 受体基因骨形态发生蛋白

(Bone morphogenetic protein, BMP)、激活素 (Activin, ACV) 调控 microRNA *novel_miR_48* 表达量显著下调，这可能促使了短管赤眼蜂提前突破 G1 期阻滞。溶酶体是大分子降解的中心细胞器，在自噬、胞吐和膜修复等多种细胞过程中起着关键作用。自噬是一个复杂的过程，受多个步骤的调节，通常用“自噬通量”一词表示自噬的过程 (Ecker *et al.*, 2010; Mauvezin and Neufeld, 2015)。自噬通量代表了自噬过程的动态完整性，涵盖了从自噬体的生物合成、成熟，到其与溶酶体融合，随后的分解直至降解产物被释放至细胞质的整个过程 (Shen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016)。自噬受体蛋白 [Refractory to sigma P, Ref(2)P] 是哺乳动物 P62 在果蝇中的同源物，是反应自噬活性的标志蛋白之一 (Devorkin and Gorski, 2014)。Ref(2)P 被广泛用于反应自噬溶酶体的降解水平，当自噬降解发生缺陷时，Ref(2)P 无法降解，堆积在自噬溶酶体中。自噬参与细胞生长、存活、发育和死亡，因此推断自噬体通量受损与短管赤眼蜂生殖细胞有关。推测这可能是差异表达 microRNA 靶基因注释到 TGF- β 信号通路和溶酶体信号通路的原因。

我们推测短管赤眼蜂完全孤雌产雌的原因是 *novel_miR_280* 下调表达使 YAP 引起核内外 Hippo 分布的变化，同时 YAP 调控 *novel_miR_256* 的下调表达，以及 microRNA *novel_miR_510* 上调导致 TGF- β 受体基因 BMP、Activin 无法正常发挥功能，三者共同抑制 YAP 的功能使卵细胞突破 G1 期阻滞；microRNA *novel_miR_45* 表达量升高导致 MAPK 受体蛋白基因 *EGFR* 功能被抑制，microRNA *novel_miR_96*、*novel_miR_99* 和 *novel_miR_510* 下调表达导致 MAPK 活性相关靶点 MKK4 功能被抑制，促使未受精配子自发激活 M2 期进而进入有丝分裂；并且由于 MAPK 活性的降低以及 microRNA *novel_miR_48* 下调导致 EMT 功能被抑制，进而最终发育为雌性。

总之，本研究提供了短管赤眼蜂孤雌产雌生殖机制中 microRNA 的第一个系统描述。本研究利用生物信息学方法，筛选出可能与短管赤眼蜂孤雌产雌生殖表型相关的 microRNA 及其靶基

因。通过 GO 和 KEGG 功能注释发现, 这些差异 microRNA 的靶基因被显著富集到多个与生殖和免疫相关的生物学通路中。

参考文献 (References)

- Andrew L, Abraham DJ, 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB Journal*, 8(7): 816–827.
- Badouel C, Garg A, McNeill H, 2009. Herding hippos: Regulating growth in flies and man. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6): 837–843.
- Bonasio R, Tu S, Reinberg D, 2010. Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330(6004): 612–616.
- Chen F, 2024. Functional study on the METTL3/METTL14 complex of m6A methyltransferase in silkworm. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [陈凤, 2024. 家蚕 m6A 甲基转移酶 METTL3/METTL14 复合物的功能研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Cong B, Dong H, Qian HT, 2011. The application potential of parthenogenesis strain of *Trichogramma dendrolimi* in pest biological control. Proceedings of the 2011 Cross-Strait Symposium on Biological Control. Taipei City: 93–94. [丛斌, 董辉, 钱海涛, 2011. 松毛虫赤眼蜂孤雌产雌品系在害虫生物防治中的应用潜力. 2011 海峡两岸生物防治研讨会论文集. 台北市: 93–94.]
- Devorkin L, Gorski SM, 2014. Monitoring autophagic flux using Ref(2)P, the *Drosophila* p62 ortholog. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(9): 959–966.
- Dregni J, Lindsey ARI, Ferrer-Suay M, Celis SL, Heimpel GE, 2025. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis induction in the aphid hyperparasitoid *Alloxysta brevis* (Hymenoptera: Figitidae: Charipinae). *Applied and Environmental Microbiology*, 91(12): e01308–e01325.
- Ecker N, Mor A, Journo D, Abeliovich H, 2010. Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy. *Autophagy*, 6(7): 879–890.
- Etebari K, Afrad MH, Tang B, Silva R, Furlong MJ, Asgari S, 2018. Involvement of microRNA miR-2b-3p in regulation of metabolic resistance to insecticides in *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*, 27(4): 478–491.
- Fast EM, Toomey ME, Panaram K, Desjardins D, Kolaczyn ED, Frydman HM, 2011. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. *Science*, 334(6058): 990–992.
- Georg H, Johnson RL, 2011. Hippo signaling: Growth control and beyond. *Development*, 138(1): 9–22.
- He CB, 2017. The hippo/YAP pathway regulates cellular senescence in ovarian cells. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [何春波, 2017. Hippo/YAP 信号通路调节卵巢细胞的老化. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Kang H, Yang S, Huamei X, Chang G, Fei L, Zhaojun H, 2017. Multiple miRNAs jointly regulate the biosynthesis of ecdysteroid in the holometabolous insects, *Chilo suppressalis*. *RNA*, 23(12): 1817–1833.
- Kohno H, Kubo T, 2019. Genetics in the honey bee: Achievements and prospects toward the functional analysis of molecular and neural mechanisms underlying social behaviors. *Insects*, 10(10): 348.
- Li C, Li QC, Chen BZ, Liu BQ, Sun X, Wei KH, Li CY, Luan JB, 2024. *Wolbachia* symbionts control sex in a parasitoid wasp using a horizontally acquired gene. *Current Biology*, 34(11): 2359–2372.
- Li JH, 2025. The expression of hippo signaling pathway core proteins YAP1 and LATS1/2 in gastric cancer and their correlation with clinicopathological features and molecular typing. Master dissertation. Guangzhou: Guangzhou Medical University. [李金晖, 2025. Hippo 信号通路核心蛋白 YAP1 和 LATS1/2 在胃癌中的表达及其与临床病理特征和分子分型的相关性研究. 硕士学位论文. 广州: 广州医科大学.]
- Li JJ, 2009. Roles of the MAPK and MPF activities in fusion of nucleolar precursor bodies following activation of mouse oocytes. Master dissertation. Taian: Shandong Agricultural University. [李静静, 2009. MAPK 和 MPF 在小鼠卵母细胞激活后核仁前体 (NPBs) 融合中的作用. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Li JJ, 2023. Molecular mechanisms of DNA methylation and alternative splicing regulation in the cold adaptation of *Pardosa pseudoannulata*. Doctor dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [李晶晶, 2023. DNA 甲基化和可变剪接调控拟环纹豹蛛低温适应性的分子机制. 博士毕业论文. 南京: 南京农业大学.]
- Manikantan AP, Tristan TT, Baker AA, Randa A, Jong MS, 2017. Protocols for rat uterus isolation and decellularization: Applications for uterus tissue engineering and 3D cell culturing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 1577: 161–175.
- Marco M, Giorgio D, 2022. Epigenetic regulation of human non-

- coding RNA gene transcription. *Trends in Genetics*, 50(2): 723–736.
- Mauvezin C, Neufeld TP, 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both v-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11(8): 1437–1438.
- Mehler FM, 2008. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 86(4): 305–341.
- Miyagaki Y, Kanemori Y, Tanaka F, Baba T, 2014. Possible Role of p38 MAPK-MNK1-EMI2 cascade in metaphase-II arrest of mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 91(2): 1–8.
- Phillipp K, Marisa S, Jens G, Tobias K, Michaelis S, Katja M, Andreas V, 2020. Inhibition of histone acetylation and deacetylation enzymes affects longevity, development, and fecundity in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(3): e21614.
- Qiu CL, Hua XC, Yan XL, Jian HB, 2023. Osteomodulin contributes to keloid development by regulating p38 MAPK signaling. *The Journal of Dermatology*, 50(7): 895–905.
- Rahimi-Kaldehy S, Ashouri A, Bandani A, Hasani SAM, 2018. Maternal age influence on diapause induction in sexual and asexual *Trichogramma brassicae*. *International Journal of Pest Management*, 64(4): 345–351.
- Rui G, Chun LL, Xiao LT, Han MJ, Lu KP, Liang SB, Hu H, Luan Y, Zhang BL, Liu YY, Dai FY, 2020. Identification, expression, and artificial selection of silkworm epigenetic modification enzymes. *BMC Genomics*, 21(1): 740.
- Serbus RL, Sullivan W, 2007. A cellular basis for *Wolbachia* recruitment to the host germline. *PLoS Pathogens*, 3(12): 1090–1100.
- Shen K, Sidik H, Talbot WS, 2016. The rag-ragulator complex regulates lysosome function and phagocytic flux in microglia. *Cell Reports*, 14(3): 547–559.
- Shi Y, Massagué J, 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6): 685–700.
- Somayeh R, Ahmad A, Alireza B, Kenji T, 2017. The effect of *Wolbachia* on diapause, fecundity, and clock gene expression in *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Development Genes and Evolution*, 227(6): 401–410.
- Sun HY, Wei SX, Xi QR, 2024. Regulation of TGF- β signaling pathway in development and disease. *Chinese Science Bulletin*, 69(30): 4356–4372. [孙宏瑶, 魏思璇, 郝乔然, 2024. TGF- β 信号通路在发育和疾病中的调控. 科学通报, 69(30): 4356–4372.]
- Tom H, Unckless RL, Perlmutter JJ, 2021. Positive selection and horizontal gene transfer in the genome of a male-killing *Wolbachia*. *Molecular Biology and Evolution*, 9(1): 303.
- Wang BJ, Liu ZP, Zhao XX, Zhang ZG, Zhang RT, Wang L, Wu XX, 2025. VERU-111 regulates EMT through the TGF- β pathway and inhibits the proliferation and metastasis of ovarian cancer cells. *Frontiers in Pharmaceutical Sciences*, 29(3): 374–380. [王宝金, 刘子平, 赵欣欣, 张志广, 张瑞涛, 王蕾, 吴鑫鑫, 2025. VERU-111 通过 TGF- β 通路调控 EMT 抑制卵巢癌细胞的增殖及转移. 药学前沿, 29(3): 374–380.]
- Wang HC, 2024. Function of MiRNAs in the regulation of growth and development in *Galeruca daurica*. Doctor dissertation. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University. [王海超, 2024. MiRNA 在沙葱萤叶甲生长发育中的调控作用. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学.]
- Wang MF, Shan XY, Cai ZF, Zhang Y, Xu Q, Chen GH, 2025. Research progress of hippo signaling pathway and its role in chicken ovary development. *China Poultry*, 47(6): 1–7. [王铭丰, 单晓雨, 曹正锋, 张杨, 徐琪, 陈国宏, 2025. Hippo 信号通路及其在鸡卵巢发育中的研究进展. 中国家禽, 47(6): 1–7.]
- Wang X, Zhang JP, Guo LL, Wang Y, Man D, Shi CX, Zhang WG, 2023. Research progress on the role of TGF- β /SMAD signaling pathway in the regulation of mammalian ovarian development. *Chinese Journal of Animal Science*, 59(3): 61–69. [王雪, 张景萍, 郭丽丽, 王宇, 满达, 石彩霞, 张文广, 2023. TGF- β /SMAD 信号通路在哺乳动物卵巢发育调控中的作用研究进展. 中国畜牧杂志, 59(3): 61–69.]
- Wang Y, 2023. Preliminary study of intersex offspring deposited by *Wolbachia* infected parasitoid wasp, *Trichogramma dendrolimi* Matsumura. Master dissertation. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [王迎, 2023. *Wolbachia* 诱导松毛虫赤眼蜂雌雄间体形成的基础研究. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学.]
- Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(10): 741–751.
- Yan WJ, Qing Y, Qiuhong F, 2014. Schedule-dependent synergistic interaction between docetaxel and gefitinib in NSCLC cell lines regardless of the mutation status of EGFR and KRAS and its molecular mechanisms. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(7): 1087–1095.

- Yang Y, Wang Q, Wang Y, Song N, Yang X, Liu ZY, Sun GJ, Pei YP, 2022. The molecular mechanism of sijunzi decoction improving liver lipid deposition in ApoE/atherosclerotic mice through miR-375/xCT/GPX4 pathway. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 33(12): 2868–2870. [杨莹, 王群, 王莹, 宋因, 杨潇, 刘子玉, 孙广江, 裴宇鹏, 2022. 四君子汤通过 miR-375/xCT/GPX4 途径改善 ApoE/动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质沉积的分子机制. 时珍国医国药, 33(12): 2868–2870.]
- Yocum DG, Rinehart PJ, Horvath PD, Kemp PW, Bosch J, Alroobi R, Salem S, 2015. Key molecular processes of the diapause to post-diapause quiescence transition in the alfalfa leafcutting bee *Megachile rotundata* identified by comparative transcriptome analysis. *Physiological Entomology*, 40(2): 103–112.
- Zekry ME, Sallam AM, AbdelHamid SG, Zarouk WA, ElBassyouni HT, ElMesallamy HO, 2023. Genetic and epigenetic regulation of MEFV gene and their impact on clinical outcome in auto-inflammatory familial Mediterranean fever patients. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(1): 721–737.
- Zhang T, Shen S, Qu J, Ghaemmaghami S, 2016. Global analysis of cellular protein flux quantifies the selectivity of basal autophagy. *Cell Reports*, 14(10): 2426–2439.
- Zhang YK, Zhang KJ, Xie RR, Zhao XD, Hong XY, 2015. Research progress in cytoplasmic incompatibility induced by endosymbiont *Wolbachia*. *Acta Entomologica Sinica*, 58(12): 1344–1355. [张艳凯, 张开军, 谢蓉蓉, 赵晓东, 洪晓月, 2015. 共生菌 *Wolbachia* 引起宿主细胞质不亲和的研究进展. 昆虫学报, 58(12): 1344–1355.]
- Zhang Z, Sun HX, Yan GJ, 2024. Analysis of hippo signaling pathway in ovaries. *Journal of Reproductive Medicine*, 33(12): 1676–1682. [张喆, 孙海翔, 颜桂军, 2024. 浅析卵巢中的 Hippo 信号通路. 生殖医学杂志, 33(12): 1676–1682.]
- Zhao XJ, Pei ZY, Liu J, Qin S, Cai L, 2012. Prediction of human DNA methylation sites by discrete increment combined with quadratic discriminant analysis. *Journal of Biomathematics*, 27(3): 563–570. [赵秀娟, 裴智勇, 刘佳, 秦笙, 蔡禄, 2012. 离散增量结合二次判别分析预测人类 DNA 甲基化位点. 生物数学学报, 27(3): 563–570.]
- Zhu Y, Liu Y, 2025. Analysis of miRNA expression profiles in different developmental stages of *Cnaphalocrocis medinalis*. *Zhejiang Agricultural Science*, 66(4): 979–985. [朱宇, 刘洋, 2025. 稻纵卷叶螟不同发育阶段 miRNA 表达谱分析. 浙江农业科学, 66(4): 979–985.]