分类号：S436.3　　单位代码：10335

密　级：无　　学　　号：11516070

浙江大学

博　士　学　位　论　文

营养、高温和病毒 PpNSRV-1 对蝶蛹金小蜂成虫寿命的影响及其机理

Effects of nutrition, high temperature and PpNSRV-1 on the lifespan of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) and its mechanism

申请人姓名：熊时姣

指导教师：叶恭银 教授

专业名称：农业昆虫与害虫防治

研究方向：昆虫生理生化与分子生物学

所在学院：农业与生物技术学院

论文提交日期 二零二一年六月

本研究承蒙

国家自然科学基金重点项目
（31830074）
国家重点研发计划
（No. 2017YFD0200400）

资助

目 录

致 谢

合上这本博士论文，我人生中最轻松的学生时代就要结束了，我想了很久要写些什么作为注脚。人行于世，自有诸多际遇。在浙江大学攻读博士学位的六年，我遇到了睿智可亲的老师、温厚可靠的前辈、活泼正直的同学、温柔体贴的姐妹和合心合意的伴侣。在此向过去六年关心、帮助过我的师长亲朋表达由衷的感谢。

首先，我想以最诚挚的心意感谢恩师叶恭银教授，本论文从立意、实验和写作的整个过程中都倾注了叶老师的心血。叶老师严谨扎实的治学之道和宽和温良的处世之道为我树立了一辈子的学习典范，将激励我在未来的道路上不断前行。

感谢实验室的姚洪渭老师在我的实验和心态上提供的帮助，看到姚老师总是感觉很开心。感谢方琦老师对我的帮助，遇到困难时方老师总是能提供好的建议。感谢汪芳老师和黄佳老师对我的实验提供的帮助，非常感谢。

感谢 David Stanley 教授和密苏里大学的宋齐生教授在英文写作方面给我的指导和建议，我的第一篇英文论文写的十分艰难，是两位教授帮助我学会了写作的逻辑。感谢罗彻斯特大学的 John Werren 教授，这篇论文中的一些灵感来源于他的宝贵建议。十分感谢他在我即将延期毕业时看出我的情绪不佳，提出希望帮助我梳理实验的提议。各位老师的关心和鼓励帮助我度过了许多困难的时刻。

感谢我的师兄滕子文博士，在我开启博士生生涯的时候，师兄的严格要求和严肃的人生态度深深影响了我，让我从以前快乐活泼的性格变成现在现实可靠的样子。

感谢实验室的同志们，感谢王蓓蓓、王飞、肖山、叶昕海、万滨、党聪、常学飞、杨磊、杨义、俞凯丽、钟馥骏、吴慧子和应玥，谢谢你们对我的科研实验的帮助。感谢王蓓蓓、常学飞和杨磊在我第一次去往加拿大参加学术报告时的陪伴和相助，在温哥华冬天初升的阳光下跟你们一起赶去会场是我永远不会忘记的快乐记忆。感谢我的挚友万琼声女士，十七年的漫长岁月里风景不断变换，谢谢你一直都在我身边。

此外，我也要感谢在这六年里一起奋斗过的其他同人们，感谢陈利鹏、杜玉萍、陈晓昂、严智超、尹传林、杨蕾、倪旭阳、李晶晶、王龙、任朝都、仇黎明、

张佼、倪旭阳、卢婉君、洪锐、宋吉强、袁博、白雪、于艳平和周振东等人的关心和帮助。还有很多未能提到名字的同学们，在此一并表示衷心的感谢。

感谢我在浙大的室友朱琳、黄敏华和陈梦影，我们是同一年的博士生，今年也要全部毕业了，希望三位姐妹前程似锦，希望我们以后还能时常见面。

感谢我的伴侣邓易先生，你的真诚、正直和自律一直深深地吸引和激励着我，非常幸运能够相遇。我想将你比作夏日，但你比夏日更可爱温柔。

最后，我要感谢我的父母家人对我的支持、关心和爱。感谢我的父亲熊运才先生和母亲李秋红女士对我的拳拳爱意、经济支持和安慰鼓励，让我可以自由无虑地做我想做的事情。

人的一生大概都要学会保留当下，学会告别。衷心感谢帮助过我的各位老师同学家人朋友。我在2019年的学年小结里写着，“前日香港暴徒作乱，不禁想起香港还是殖民地的那些年，当年国是日非，战乱频仍，教育不兴。若我身在彼时，一位昆虫学家，该如何为国家效力？有幸生在如今的和平年代，我又怎样选择以后的道路”。 现在我的学生时代结束了，我要往前走啦。不论选择怎样的岗位，都愿我虽位卑力薄，也能竭尽所能发光发热，一往无前。

熊时姣

初夏于紫金港

摘 要

寄生蜂具有种类繁多、表型可塑性强和寄主范围广的特点，是一类重要的生物防治资源。蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 寄生多种鳞翅目害虫，是菜青虫 *Pieris rapae* 的蛹期优势寄生蜂。寄生蜂对寄主种群的寄生潜力与寄生蜂的寿命密切相关，延长其寿命有利于提高其田间控害防效。蝶蛹金小蜂的寿命随着环境因素变化的可塑性强。为了探明蝶蛹金小蜂寿命的影响因子及其调控机制，本论文就营养条件、热胁迫和病毒 PpNSRV-1 感染三种影响因素对该蜂寿命的影响和机制进行研究。主要研究结果如下：

1. 蝶蛹金小蜂寿命相关基因的注释

结合基因组和转录组数据，根据已知的长寿基因和衰老基因序列从蝶蛹金小蜂中预测出 229 个可能的寿命相关基因。这些基因在 IIS-PI3K/Akt 途径、TOR 途径、MAPK/ERK 途径和 AMPK 途径等四个信号通路和自噬、应激反应和代谢等三个生理过程中发挥作用。预测了这些基因的保守域结构并分析了它们的表达模式。氨基酸序列排列和结构域分析表明，大多数基因在膜翅目、鳞翅目、半翅目、双翅目、鞘翅目的昆虫中是保守的。

2. 糖类营养对蝶蛹金小蜂成虫寿命的影响

评估了在 0-40% (w/v)范围内饲喂蔗糖和蜂蜜对蝶蛹金小蜂寿命的影响。结果表明，蔗糖和蜂蜜溶液对蝶蛹金小蜂雌成虫的寿命有显著的正向影响。相关性分析证实，高浓度的蔗糖与延长寿命之间有很强的正相关关系。蔗糖溶液的最适浓度为 20%，蜂蜜的最适浓度为 10%。通过 15 个寿命相关基因的表达模式分析表明，*PpPTEN*、*PpSOD1-1* 和 *PpSOD1-3* 等 14 个基因的相对表达水平与蔗糖喂养蝶蛹金小蜂的平均寿命显著相关，*PpTSC2-2*、*PpHDAC1* 和 *PpTSC2-3* 等 6 个基因与蜂蜜喂养蝶蛹金小蜂的平均寿命相关。最后，构建了用以上 6 个寿命相关基因的表达量预测寿命的回归模型并用定量 PCR 对该模型进行了验证。

3. 热胁迫对蝶蛹金小蜂成虫寿命的影响

根据 RNA 测序得到的高质量转录组数据，对蝶蛹金小蜂雌成虫在 35℃和25℃两种环境下的基因表达情况进行了分析。结果表明蝶蛹金小蜂基因表达量从处理 6h 开始显著变化以响应热胁迫，逐渐积累到处理 5 d 时产生巨大影响。短期和长期热应激的基因差异表达情况显然不同。短期热应激的差异表达基因主要参与了“多物种的寿命调控”和“内质网蛋白的加工途径”等信号通路。长期热应激的差异表达基因主要参与了一些疾病与癌症信号通路。另外，对短期和长期热应激转录组进行基因加权共表达网络分析，对共表达网络中的枢纽基因进行了预测。对转录组数据的可靠性进行验证之后，通过 RNA 干扰实验对预测的枢纽基因进行验证，并确认了在热应激过程中起关键作用的 3 个新的寿命相关基因，分别是 *PpXAP5*、*PpELL* 和 *PpCathL*。

4. 病毒 PpNSRV-1 对蝶蛹金小蜂成虫寿命的影响

根据 RNA 测序得到的高质量转录组数据，对带病毒 PpNSRV-1 和不带病毒 PpNSRV-1 的蝶蛹金小蜂雌成虫的基因表达情况进行了分析。结果显示差异表达基因数目较少，且没有显著富集的基因本体（GO）功能和 KEGG 信号通路。基因加权共表达网络分析的结果鉴定出了一个与病毒引起的长寿性状高度相关的模块，并筛选出了基因共表达网络中的枢纽基因。枢纽基因可能在自噬途径、p53 信号通路和疾病相关途径中发挥作用。

5. 寿命相关基因抑制剂对蝶蛹金小蜂成虫寿命的作用

以注释到的蝶蛹金小蜂寿命相关基因和转录组中新鉴定的寿命相关基因作为靶标基因，选取一些抑制剂对蝶蛹金小蜂进行经口给药实验。结果发现三个抑制剂可以显著延长蝶蛹金小蜂雌蜂的成虫寿命，分别是：TOR 通路抑制剂雷帕霉素（Rapamycin）、MAPK/ERK 通路抑制剂曲美替尼（Trametinib）和组织蛋白酶抑制剂（Cathepsin Inhibitor）。它们对蝶蛹金小蜂的平均寿命分别延长了 34%、56%和 51%。

关键词：蝶蛹金小蜂；寿命相关基因；营养；热胁迫；病毒 PpNSRV-1

Abstract

Parasitic wasps are important biological control resources due to their diversity, phenotypic plasticity and wide host range. *Pteromalus puparum* parasitizes a variety of lepidopteran pests and is the dominant parasitoid of *Pieris rapae* pupae. The parasitic potential of parasitic wasps is closely related to their lifespan. Extending the lifespan of parasitic wasps has significant benefits on field control and economic efficiency. The lifespan of *P. puparum* is highly plastic with changes in environmental factors. To understand the longevity regulating mechanisms of *P. puparum*, this study investigated the effects of three factors of aging, including nutritional conditions, heat stress, and virus infection. The main findings are as follows.

1. Annotation of lifespan-related genes of *P. puparum*

Combining genomic and transcriptomic data, 229 putative lifespan-related genes were predicted from *P. puparum* genome based on known lifespan-related gene sequences. These genes function in four signaling pathways, including the IIS-PI3K/Akt pathway, TOR pathway, MAPK/ERK pathway and AMPK pathway, along with three physiological processes, including autophagy, stress response and metabolism. We predicted the conserved domain structures of these genes and analyzed their expression patterns. Amino acid sequence alignment and domain structure analysis showed that most genes are conserved in six orders of insects.

2. Effects of sugar sources on adult lifespan, survival and related gene expression of *P. puparum*

We assessed the effect of feeding sucrose and honey on the lifespan of *P. puparum* in the range 0-40% (w/v). The results indicated a statistically significant positive effect of sucrose and honey solutions on the lifespan of *P. puparum* female adults. Correlation analyses confirmed a strong positive correlation between high concentrations of sugar and extended lifespan. The optimum concentration of sucrose solution for wasps was 20%, while 10% for honey. Then, we examined the expression patterns of 15 lifespan-related genes. The results showed that the relative expression levels of 14 genes were significantly correlated with the mean lifespan of sucrose-fed wasps, and six genes

correlated with the mean lifespan of honey-fed wasps. In addition, the models for lifespan prediction were constructed.

3. Effect of heat stress on the adult lifespan of *P. puparum*

Based on the high-quality transcriptome data obtained from RNA sequencing, we analyzed the gene expression patterns of female adult *P. puparum* in 25℃ and 35℃ environments. The results showed that the gene expression of *P. puparum* changed significantly from 6 h of treatment in response to heat stress, gradually accumulating to achieve a dramatic effect by 5 days of treatment. The gene expression patterns were clearly divided into two group: short-term and long-term. The differentially expressed genes for short-term heat stress were mainly involved in signaling pathways such as antigen processing and presentation, multispecies lifespan regulation and endoplasmic reticulum protein processing pathways. The differentially expressed genes of long-term heat stress are mainly involved in several disease and cancer signaling pathways. In addition, nine hub genes were discovered using weighted gene co-expression network analysis. After validation of the transcriptome data, the predicted hub genes were verified by RNA interference and three novel lifespan-related genes were identified, namely *PpXAP5, PpELL* and *PpCathL.*

4. Effect of PpNSRV-1 on the adult lifespan of *P. puparum*

Based on high-quality transcriptome data obtained from RNA sequencing, we analyzed gene expression in female adult *P. puparum* with and without the virus PpNSRV-1. The results showed a low number of differentially expressed genes and no significant enrichment of gene ontology (GO) functions and KEGG signaling pathway. Using gene weighted co-expression network analysis, we identified a module highly associated with virus-induced longevity traits and screened for hub genes in the gene co-expression network. The hub genes may function in the autophagy pathway, p53 signaling pathway and amoebiasis pathway.

5. The role of lifespan regulating pathway inhibitors on the adult lifespan of *P. puparum*

Several inhibitors were selected for oral delivery to *P. puparum* using annotated lifespan-related genes and newly identified lifespan-related genes in the transcriptomes

as target genes. Three inhibitors were found to significantly prolong the adult lifespan of *P. puparum* females, namely Trametinib, Rapamycin and Cathepsin Inhibitor. They prolonged the mean lifespan of *P. puparum* by 34%, 56% and 51%, respectively.

Key words: *P. puparum*; lifespan-related genes; sugar source; heat stress; PpNSRV-1

第一章 文献综述

1 前言

昆虫隶属节肢动物门 Arthropoda 昆虫纲 Insecta，作为地球上数目最多的动物群体，其不同种类之间寿命差异巨大，从朝生暮死的蜉蝣到生命周期漫长的十七年蝉皆在其中。不同物种间寿命的差异和同一物种个体间衰老表型的异质性表明了遗传和环境因素在生物寿命调控过程中的影响力。生物衰老的过程是生理、代谢、生殖等一系列活动的变化综合作用的结果，它可以说是机体生理完整性的逐渐丧失，进而导致功能损伤并最终决定了生物的寿命。关于衰老机制的研究非常广泛，近年来将衰老视为一个极其复杂的多因素过程的观点取代了早先寻找单一关键衰老因子的理论学说 (Weinert and Timiras, 2003)。影响生物寿命的环境因素有：营养与取食、温湿度、有害物质（如细菌和病毒）和辐射等。昆虫的衰老研究主要集中在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 这个模式系统中。果蝇上的衰老研究为保守的寿命调控机制作出了卓越的贡献，科学家们已从果蝇中鉴定出了 200 多个与寿命调控相关的基因 (Tacutu *et al.*, 2018)。寄生蜂（膜翅目 Hymenoptera：细腰亚目 Aprocrita）占昆虫总量的 20%-25% (Godfray, 1994)。作为物种最丰富的动物群体之一，寄生蜂可以为衰老机制和寿命调控的研究提供许多衰老类型和重要的补充系统。多样性为研究生物寿命的可塑性及衰老进化的各种调节因子和机制提供了平台。因此，对非模式生物系统中衰老机制的理解和衰老调节因子的识别变得越来越重要。本章就衰老的理论学说和寿命的限制因素进行综述，并对昆虫寿命调控机制的研究进展进行总结。

2 衰老机制的理论学说

多年来，科学家们已经提出了数百种理论学说试图解释衰老的成因，衰老机制的学说浩如烟海，难以对衰老理论进行完整的概述。大部分的衰老假说都是一元论，它们通常只聚焦复杂系统中某一个因素的作用而忽略了其他衰老的关键因素。这些理论大致可分为程序理论和误差理论。程序理论认为存在着内部或外部的程序决定了衰老的过程，误差理论认为生命过程中的功能紊乱和衰老可部分归因于偶发病变或损伤的积累 (Cristofalo *et al.*, 1994)。误差理论中有一个隐含的观

点，即如果没有这些偶发因素导致突变、错配和调节紊乱，衰老就不会发生。在此整理了一些代表性理论（表 1.1），并将讨论其中的一些理论。

表 1.1 主要衰老机制学说的分类和描述

Table 1.1 Classification and brief description of main theories of aging

衰老机制的学说	主要内容
误差理论	
体细胞突变理论 (Morley, 1995)	生物分子（主要是 DNA）受到辐射的破坏发生突变，最终导致生物寿命减短。
DNA 修复理论 (Hart and Setlow, 1975)	DNA 的复制次数决定了物种的寿命，DNA 复制产生的突变可能通过转录损害蛋白质。
误差灾变论 (Gallant *et al.*, 1997)	蛋白质的合成错误长期存在，降低了其产物的可靠性，产生了畸变和致死蛋白。
化学键断裂理论 (Trevisan *et al.*, 2019)	蛋白质的翻译后修饰过程可能导致细胞代谢的功能衰竭。
高级糖基化理论 (Cerami, 1985)	葡萄糖与蛋白质和核酸的非酶促反应导致生物功能丧失，糖基化导致衰老。
自由基衰老理论 (Harman, 1981)	细胞代谢过程中产生自由基，氧自由基对细胞成分的有害攻击导致线粒体 DNA 突变的积累和氧化损伤，是衰老的根本原因之一。
神经内分泌理论 (Weinert and Timiras, 2003)	神经内分泌功能对生物的生存和繁殖至关重要，神经和内分泌功能的变化往往是有害的，进而导致衰老。
免疫理论 (Weinert and Timiras, 2003)	免疫反应会随着衰老而降低，导致感染和产生疾病。
交联衰老理论 (Bjorksten, 1968)	衰老与核酸和蛋白质的交联反应造成的功能损伤和结构硬化息息相关。
程序理论	
程序化衰老理论 (Goldsmith, 2017)	衰老是基于一种有机的细胞发育遗传程序，通过调节基因有规律地激活和关闭神经、内分泌和免疫系统信号，来维持稳态和做出应激反应，内源性地决定了生物的寿命。
端粒理论 (Mikhelson and Gamaley, 2012)	端粒在生命中负责细胞分裂过程中染色体的完整性，随着年龄增长被不断地消耗，使染色体的体积减小。完整的端粒的存在依赖于端粒酶的作用，端粒酶的作用下降，导致端粒缩短，是细胞衰老的原因之一。
内在突变理论 (Burnet, 1974)	生物的寿命取决于 DNA 复制的可靠性，DNA 复制的失败可能产生突变，导致机体功能丧失从而导致衰老。
拮抗基因多效性理论 (Williams, 1957)	有些基因在生命早期被选择了有益的作用，但随着年龄的增长却产生了未被选择的有害作用，从而直接导致了衰老。
生物钟理论 (Edmunds, 1978)	细胞分裂周期可能被一种内源性的昼夜振荡机制所调控。衰老和寿命是一种类似生命周期时钟调控的程序性细胞轨迹的间接结果。
基因调控理论 (Kanungo, 1975; Kenyon, 2010)	衰老是由调节发育和衰老的基因的表达变化引起的。

自由基衰老理论由 Denham Harman 在 1956 年首次提出，可能是最著名的衰老理论之一，至今仍有争议。Harman 的理论认为，分子损伤是衰老的根本原因，细胞代谢过程中产生的 $O_2^{\cdot-}$自由基及其衍生物诱导了细胞在衰老过程中所遭受的大部分损伤。根据这一理论研究者们得出两个推论：第一，清除有害的活性自由基可以减轻细胞损伤，即抗氧化酶的过度表达可以减缓机体的衰老，甚至可能促进寿命；第二，如果去除抗氧化剂，机体应该出现衰老的表型。研究者们在不同的模式生物中进行了大量的实验试图证明这两个推论。例如，在黑腹果蝇中去除主要的抗氧化酶会缩短果蝇寿命 (Kirby *et al.*, 2002)，与推论二一致。然而，缺乏过氧化氢酶活性的突变体果蝇寿命却没有变化 (Orr *et al.*, 1992)。在酿酒酵母中，通过热量限制或失活过氧化氢酶诱导过氧化氢水平升高，激活超氧化物岐化酶（SOD）从而延长了酵母的时序寿命 (Mesquita *et al.*, 2010)。而在线虫中去除了 5 个 *SOD* 基因后对线虫的寿命没有显著影响。这些结果并不支持自由基衰老理论。因为自由基理论的种种缺陷，在 1990 年 Sohal 提出了氧化应激学说 (Sohal and Allen, 1990)，对自由基衰老学说进行了调和。这一假说的主要前提是，衰老是发育的持续过程和终结阶段，受到遗传基因的影响。衰老过程中积累的损伤是一种次要效应，而不是衰老的直接原因。Sohal 认为，细胞的抗氧化水平和氧化剂的产生速度都是可控的。衰老的速度与氧化应激的水平有关，氧化应激导致了衰老过程中基因表达的改变。在调和后的理论中，自由基通过影响特定的遗传程序来促进衰老，它们在细胞中造成的附带损伤只是这一过程的副产品。

高级糖基化理论是分子水平上的一个重要衰老理论，它认为葡萄糖与蛋白质、核酸的非酶促反应导致的生物功能丧失是引起衰老的原因 (Cerami, 1985)。葡萄糖能与多种氨基酸、多肽和蛋白质中的氨基发生反应，由此造成结构蛋白交联硬化、抗氧化酶的活性下降、代谢功能降低和稳态失衡等老化过程。这一学说将生物能量的重要成分——葡萄糖与衰老关联起来。糖基化和自由基氧化是目前观测到的两大造成生物衰老的基本生化过程，高级糖基化理论与自由基衰老理论即相互独立又相互补充，可以解释许多衰老现象。

拮抗基因多效性（Antagonistic pleiotropy）理论是当今公认的从进化层面上解释衰老原因的最佳理论。多效性指的是某些基因对表型有不止一种效应。AP 理论认为，有些基因可能在生命早期因其对适合度的有益作用被选择，但随着年龄的增长却产生了未被选择的有害作用，从而直接导致了衰老 (Mitteldorf, 2019)。

根据这一理论，有些基因因为其对生殖力和个体健康的作用在进化过程中被选择，而这些早期增强生殖力或健康的基因会导致个体健康在长期生命过程中的恶化，亦即，高生育率、健康与长寿之间存在着拮抗作用。这种拮抗作用已被实验证实，许多研究表明生殖力、健康与寿命之间存在着某种平衡 (Lemaître *et al.*, 2015)。例如在果蝇中破坏生殖细胞可以延长寿命 (Sgrò and Partridge, 1999)。然而，这种取舍并不总是成立，实验观察到有一些果蝇的长寿品系相比对照组具有更强的繁殖力 (Arking *et al.*, 2002)。维持生物的低生殖力和长寿命之间的拮抗性关系，可能对生物群体有一种适应性价值。高生育率和长寿命的结合对个体来说是一种诱惑，但对种群的稳定来说却可能是一种危险 (Mitteldorf, 2019)。然而，社会性昆虫似乎是一个例外，蜜蜂、蚂蚁和白蚁的蜂后、蚁后等不仅实现了超长的寿命，还有着超高的繁殖量 (Carey, 2001)。这些情况表明可能存在着其他因子的调控使它们摆脱了生殖-生存之间的权衡关系 (Pamminger *et al.*, 2016)，实现了高生殖力和长寿命的结合的同时，还保持了种群的稳定性。

从现存的众多学说可以发现，生物的寿命研究具有以下几个特点：首先，所有理论都默认同一物种的生物个体存在相同的衰老模式，其次，似乎大部分的理论都假设存在一个普遍的衰老原因对不同物种的生物都有效，存在一个衰老调控机制可以从模式生物推及所有生物。从酵母到人类的衰老研究大多聚焦于衰老的一般、共同特征 (Fontana *et al.*, 2010)，表明物种之间存在一些高度保守的衰老因素。第三，物种之间的寿命差异很大，即使很多寿命调控相关的基因在不同生物中高度保守，不同的生物系统还是不尽相同，可能不同类型的生物的最大寿命是由不同因素共同影响的。最后，生物寿命的可塑性强，以人类为例，人类的预期寿命在不断地延长，从古希腊和罗马时期的人均寿命 20-35 岁已经提高到现在的 70 多岁 (Kyriazis, 2020)。衰老和寿命研究的一个隐含的目标是延长生物的健康预期寿命，并最终实现人类的长生。

3 寿命的限制因素

迄今为止，衰老的理论和寿命的调控机制还没有一个普遍适用的定论，对于衰老到底是随机发生还是程序化的过程始终存在争议。然而，多种生物中的研究表明有一些外部环境和生理信号，如压力环境，是生物寿命的限制因素。长期暴露于环境应激因素，导致损伤的积累，超出了稳态修复机制的能力就会影响生物

寿命 (Lopez-Otin *et al.*, 2013)。在复杂的多细胞生物中，研究外在（环境）和内在（基因）因素之间的互相作用有助于全面地理解衰老的表观现象和产生机制。

3.1 饮食热量摄入与寿命调控

一般普遍认为，生物的寿命与其取食营养直接相关。饮食限制或卡路里限制（caloric restriction, CR）作为一种被广泛研究的延长生物寿命的方法，数百份报告已经证实了其对长寿的作用，影响了迄今为止测试的大多数生物，是目前最有效和可重复的调控寿命的环境变量。CR 是通过向实验生物提供含有所有营养素和维生素的饮食，但显著限制热量（降低 30-70%）来实现的 (Weinert and Timiras, 2003)。在这些研究中，饮食限制延长了从酵母到哺乳动物等不同生物的中位寿命和最大寿命 (Testa *et al.*, 2014)。这些物种不仅包括酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、线虫（*Caenorhabditis. elegans*）、黑腹果蝇、小鼠（*Mus musculus*）和大鼠（*Rattus norvegicus*）等模式生物，对其他一些物种，如轮虫、蚕、蜘蛛、狗和恒河猴等都有影响 (Le Bourg, 2010)。然而也有研究报道饮食限制并不能增加寿命 (Le Bourg and Minois, 2005)。

从酵母到人类的模式生物中的研究都证明了营养感受网络与寿命调控的分子机制之间的广泛联系 (Fontana *et al.*, 2010; Lopez-Otin *et al.*, 2013)。生物中有多种营养感受传导途径来监测营养物质的可得性及调整营养状态。其中包括三个在大多数真核生物中保守的信号途径，即腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）信号通路，一般性调控阻遏蛋白激酶 2（general amino acid control non-derepressible 2（GCN2））和雷帕霉素靶蛋白（Target of Rapamycin（TOR））信号通路 (Chantranupong *et al.*, 2015)。在黑腹果蝇中，有两个高度保守的营养感受途径，分别是胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IIS）信号通路和 TOR 信号通路 (Bettedi and Foukas, 2017)。TOR 激酶可以响应多种输入因子，包括能量水平、营养物质、生长因子和压力刺激等 (Johnson *et al.*, 2013)，并作用于许多转录调控因子的上游，如 *FOXO*，*FOXA* 和 *Nrf* (Antikainen *et al.*, 2017)。IIS 和 TOR 信号通路作为一个集成的营养感受调控网络，可能是介导 CR 抗衰老作用的关键分子信号通路 (Partridge *et al.*, 2011)。

CR 不仅介导了寿命的延长，同时也增强了代谢反应、神经内分泌和免疫反应，以及交联反应等生理过程 (Mobbs *et al.*, 2001)。CR 引起的种种生理过程改变也可看作一种对不良营养环境的应激反应。强烈的压力刺激可能引起生物内生理过程的失调而缩短寿命，但温和的压力刺激能强化生物应对压力的能力，从而

延长寿命，这被称为毒物兴奋效应 (Rattan, 2008)。CR 延长生物寿命的具体机制尚未明确，有数十种不同的假说试图阐明饮食限制的作用机制（图 1.1），CR 有益作用的生物学机制包括能量代谢、氧化应激、胰岛素敏感性、炎性反应、自噬、神经内分泌功能、诱导激素发生和毒物兴奋效应等。但是，这些假说都不能完全解释 CR 调控长寿的观测结果。尽管如此，已有大量证据表明 CR 激活了更高效的代谢反应，增强了细胞损伤的保护机制并激活了重塑机制 (López-Lluch and Navas, 2016)。

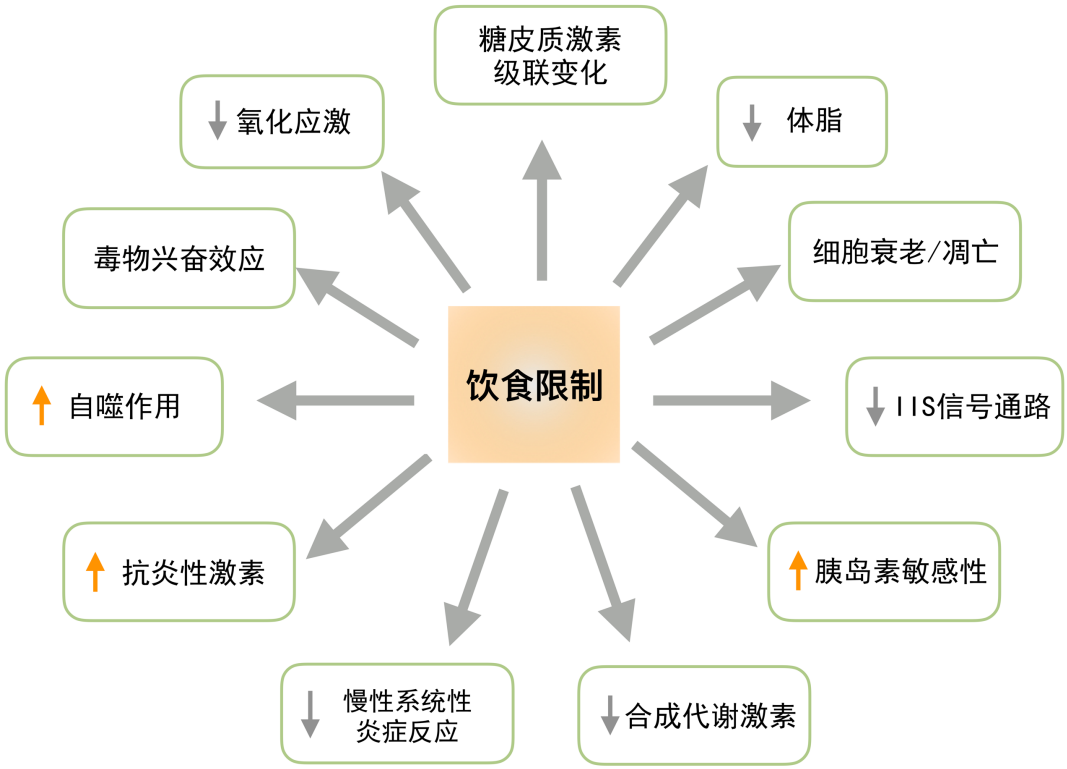

图 1.1 饮食限制诱导长寿的假说 (Testa *et al.*, 2014)
Figure1.1 Biological mechanisms that have been proposed to explain lifespan extension by calorie restriction (CR).

3.2 温度胁迫与寿命调控

温度是影响生物衰老和寿命的主要因素之一。昆虫是变温动物，它们的生长发育、个体寿命、生殖力、取食和羽化都受到极端温度的影响 (Hoffmann *et al.*, 2003; Lemoine *et al.*, 2013)。早期研究认为温度对昆虫寿命的影响与能量消耗率、生长率和活动量相关，即高温加快昆虫活动和代谢过程，低温减缓昆虫活动 (Lints, 1989)。显然这一理论并不具有普适性，实验证据也十分薄弱。近期对温度

影响寿命的研究显示，温度通过影响基因的表达激活或抑制细胞信号传导通路、影响生物生化反应等途径影响寿命。

高温胁迫下，许多昆虫的发育周期变短、成虫寿命显著缩短。柑橘木虱 *Diaphorina citri* 成虫在 41℃下寿命显著下降了 74%，约 20%的成虫在 2 h 内死亡 (Hussain *et al.*, 2017)。38℃处理梨小食心虫 48h，雌、雄成虫的寿命急剧降低，几乎不能存活 (鲍晓文 *et al.*, 2019)。家蝇 *Musca domestica L.*在环境温度升高时激活了氧化应激过程，导致寿命缩短 (Farmer and Sohal, 1987)。昆虫对中等热胁迫具有一定的适应能力，研究报道麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Jeffs and Leather, 2014)、桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) (Li *et al.*, 2015)和家蚕 *Bombyx mori* (Manjunatha *et al.*, 2010)的高温应激反应在经历过接近极端温度的较高温度后，对极端温度的耐受力会增强，反而对长寿有益，可能是引起了毒物兴奋效应。类似的结果在果蝇中也有报道 (Sarup *et al.*, 2014)。

目前，昆虫热应激反应的分子反应尚不清楚。昆虫响应高温的一个普遍的细胞反应是诱导热激蛋白（HSP）的表达。HSP 是一类高度保守且广泛存在的应激蛋白或分子伴侣，自从在果蝇中被发现以来，HSP 已被大量研究证明在应对极端温度、辐射、干燥等多种压力环境下发挥作用，对应激反应和寿命调控有重要意义 (Tower, 2011)。HSP 根据其分子量和同源性大致可被分为六个家族，包括 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和 sHSP。sHSP 是一类具有一个保守的 α-晶状结构域的小分子量热激蛋白，有实验表明 HSPs 与热耐受性相关 (King and MacRae, 2015)。Hsp70、Hsp90 和 Hsp60 分别为 70、90 和 60kDa，通常会与蛋白质相互作用，包括 HSPs 的结构重排、蛋白质折叠、降解、解聚和细胞定位，从而影响蛋白质合成、细胞信号传导、转录和代谢等重要过程 (Clare and Saibil, 2013)。转录组分析结果表明中等热胁迫条件下果蝇寿命的延长是由于 HSP 的表达 (Sarup *et al.*, 2014)。当昆虫暴露于压力环境下，HSP 的表达量就会增加，结合异常蛋白质并促进重新折叠，影响蛋白质合成、细胞信号传导、转录和代谢等重要过程，保护细胞免于损伤 (King and MacRae, 2015)。此外，果蝇 HSP 可以调控一些下游转录因子的活性，如 p53 和 HSF，推测 HSP 可能是通过这些转录因子影响寿命 (Tower, 2011)。

3.3 病毒与寿命调控

病毒通常会对被感染生物造成明显的影响。它们会损害被感染生物的细胞从而导致体内稳态失调。病毒对生物的遗传物质和调节系统的影响可能非常大，甚至引起细胞死亡。细胞数量的变化会影响一个器官的功能，也会导致组织和细胞系统的功能下降，从而可能导致生物的寿命缩短 (Semsei, 2000)。对虫媒病毒的研究发现，病毒对其载体昆虫的适合度会造成不同的影响。对黑尾脉毛蚊 *Culiseta melanura* 的研究中发现，东部马脑脊髓炎（EEE）病毒降低了蚊子载体的成虫寿命和繁殖力 (Scott and Lorenz, 1998)。而马亚罗（Mayaro）病毒的载体成年雌蚊的存活率以及相关免疫途径中的目标基因表达没有因病毒感染变化，成虫寿命和繁殖力与蚊子体内测量的病毒滴度无关 (Alto *et al.*, 2020)。这些病毒感染对蚊子的影响差异可能与病毒的作用方式有关，病毒可能在载体蚊子中作为互利共生物，而在脊椎动物宿主中作为有害寄生物存在。

在蝶蛹金小蜂中存在一种非节段负义单链 RNA 病毒 PpNSRV-1，其分布于带毒蝶蛹金小蜂各个组织，且存在于在雌蜂和雄蜂的各个发育阶段 (Wang *et al.*, 2017)。PpNSRV-1 的病毒量在蝶蛹金小蜂成蜂羽化后的 4 d 以内迅速积累并在 5 d 左右达到峰值，带毒寄生蜂品系相比于不带毒寄生蜂品系的寿命显著延长，且这种长寿效果在高温 35℃的条件下仍然成立。目前 PpNSRV-1 病毒造成的寿命延长和后代性比下降等生理现象的分子机理仍不清楚。

3.4 寿命相关基因和信号通路

通过极端温度、辐射和营养等环境因素对生物寿命的缩短或延长作用，已经有许多与调控寿命相关的基因被鉴定出来。多年来，通过基因敲除和诱导过度表达等实验手段确定了 2000 余个衰老基因和长寿基因 (Tacutu *et al.*, 2018)。当某些基因发生单基因突变时，生物寿命显著提高，这些基因被称为“衰老基因”。反之，如果有些基因的突变引起了个体应激能力下降，导致生物寿命显著缩短，则将这些基因称为“长寿基因”。大多数长寿基因参与代谢调节过程和抗应激反应，属于 IGF-1R、PI3K、PKB、AMPK 和 TOR 代谢调控群和 FOXO、HDAC、p53 应激反应群 (Proshkina *et al.*, 2015)。

在多种模式生物中的广泛研究发现，这些基因参与多条寿命调控通路，包括胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IIS） (Altintas *et al.*, 2016)，sirtuins (Dang, 2014)，单磷酸腺苷激活蛋白激酶（AMPK） (Burkewitz *et al.*, 2014)，以及雷帕霉素靶标

（TOR）通路 (Johnson *et al.*, 2013)等。IIS 途径将能量代谢、细胞生长和行为与营养状况联系起来。在酵母、线虫、果蝇、小鼠等模式生物中，抑制胰岛素/胰岛素样生长因子-1 信号通路（IIS）都能够健康地延长生物的寿命。IIS 在进化上十分保守，在从酵母到人体内都能发现类似的胰岛素通路，因而被认为是寿命决定中一个非常重要的信号途径。IIS 在多细胞有机体中有着广泛的调控功能，其突变可以影响生物的生长发育、代谢平衡、繁殖力、抗逆性及寿命。TOR 是一种调节多种细胞功能的激酶，TOR（Target of Rapamycin）通路是进化上很保守的调控蛋白合成和生长发育的一条信号通路，影响生长、细胞增殖、细胞运动、细胞存活、蛋白质合成、自噬和转录等多种生理过程 (Weichhart, 2018)。抑制 IIS 会降低 TOR 活性从而延长寿命。在节食条件下编码胰岛素样肽的基因转录水平会降低而延长果蝇寿命 (Mair and Dillin, 2008)，然而去除这些基因却会导致食物消耗水平增加寿命延长 (Grönke *et al.*, 2010)。抑制 TOR 活性对寿命的效果与节食的效果是相似的 (Partridge *et al.*, 2011)。细胞内 IIS 和 TOR 信号通路之间存在密切的互作，他们与其他信号通路对环境因子的综合反应共同影响寿命。MAPK/ERK 信号通路是 IIS 通路的一个完善的信号中路， MAPK/ERK 和 PI3K-Akt 通路对寿命的调控作用在同一量级。MAPK/ERK 通路的下游关键转录因子 Aop 和 PI3K-Akt 通路下游转录因子 *FOXO* 在转录水平上共同调节寿命相关的基因，两者都是必要且有效的。但是关于两者的互作关系还不明确 (Slack *et al.*, 2015)。*AMPK* 是一种能量传感器，作用于细胞能量平衡，并控制抗衰老信号网络。*AMPK* 的激活能力在衰老过程中下降 (Salminen and Kaarniranta, 2012)。与 TOR 通路不同，AMPK 通路在营养丰富的条件下被激活 (Gwinn *et al.*, 2008)。*AMPK* 的过度表达和被药物（如二甲双胍）激活，可延长线虫和果蝇的寿命 (Funakoshi *et al.*, 2011; Onken and Driscoll, 2010)。

显然，营养途径及其与其他几种信号通路的相互作用在寿命调控中有着重要作用，调控这些途径对寿命的影响都是充分的。基于这些结果，研究者们认为衰老并不是一个被动的退化过程，而是一个进化上保守的基因调控的过程。然而，对寿命调控相关基因的功能还没有研究透彻。有关这些基因调控寿命的分子机制的详细研究表明，它们有时会延长生物的寿命，有时会限制寿命 (Honjoh and Nishida, 2011)。目前尚不清楚调控这些途径到何种程度上能够最大的保留它们的有利功能又能延长寿命，同时调控这些生物途径的副作用也没有被充分研究过。

4 本研究的目的、内容和思路

昆虫的衰老和寿命调控研究大多以果蝇和社会性昆虫作为研究对象。通过在果蝇幼虫上应用 RNA 干扰技术和基因编辑技术（CRISPR），或是果蝇成虫上使用 RU486 诱导的 GAL4/UAS 系统进行实验研究，揭示了对果蝇寿命调控有着关键影响的 202 个基因 (Tacutu *et al.*, 2018)和多条信号通路。这些与寿命调控相关的基因在进化上大多是保守的。就膜翅目昆虫而言，有关衰老和寿命研究则主要集中于社会性昆虫，如欧洲蜜蜂和蚂蚁等，究其原因主要在于社会性昆虫具有极端长寿的可育雌性成虫及显著的寿命级型差异。生物衰老机制十分复杂，虽然已取得很多进展，但是昆虫的衰老机制及寿命调控过程还是研究甚少。

蝶蛹金小蜂 *P. puparum* 是一种寄主范围广泛的内寄生蜂，可以寄生许多鳞翅目害虫的蛹或预蛹 (Peck, 1963; Takagi, 1986)。其中，十字花科蔬菜的重要害虫菜粉蝶 *P. rapae* 是其主要寄主。田间调查表明，该蜂在杭州等华东地区对菜粉蝶的寄生率相当高，冬季为 58.97%，6 月为 62.35%，最高寄生率达 90%以上 (胡萃, 1983)。作为一种重要的害虫天敌资源，寄生蜂对寄主种群的潜在影响依赖于寄生蜂的寿命、生殖力和搜寻寄主的效率。蝶蛹金小蜂的生殖力在整个成虫期随着年龄的增长没有显著的下降，延长其寿命有望提高其田间生防效果。兼之基因组数据完整、易于饲养、操作简捷、寿命可塑性强等特点，蝶蛹金小蜂可以作为研究寿命调控机制的一种合适模型。对蝶蛹金小蜂的寿命变化规律进行研究，不仅能够更加理解天敌昆虫的生理过程，为探明寿命的调控机制提供数据，同时也能为其他生物研究提供参考，比如发现潜在的药物靶标，研发抗衰老药物等。本章综述的衰老理论和寿命限制因子对研究蝶蛹金小蜂的寿命调控机制提供了思路。基于本实验室前期测序获得的基因组和转录组数据，本文特对蝶蛹金小蜂的寿命调控机制进行了探索，具体思路见图 1.2。首先，根据组装的基因组数据和已知的模式生物的寿命相关基因的信息对蝶蛹金小蜂中的寿命相关基因（包括长寿基因和衰老基因）进行注释。其次，分别从三个可能的寿命限制因素（营养、热应激和蝶蛹金小蜂共生 RNA 病毒 PpNSRV-1）进行实验和转录组综合分析。最后，在鉴定出新的寿命相关基因之后，筛选出新的寿命相关基因的抑制剂，对蝶蛹金小蜂进行药理学实验，验证新基因的延寿功能和生产应用潜力。

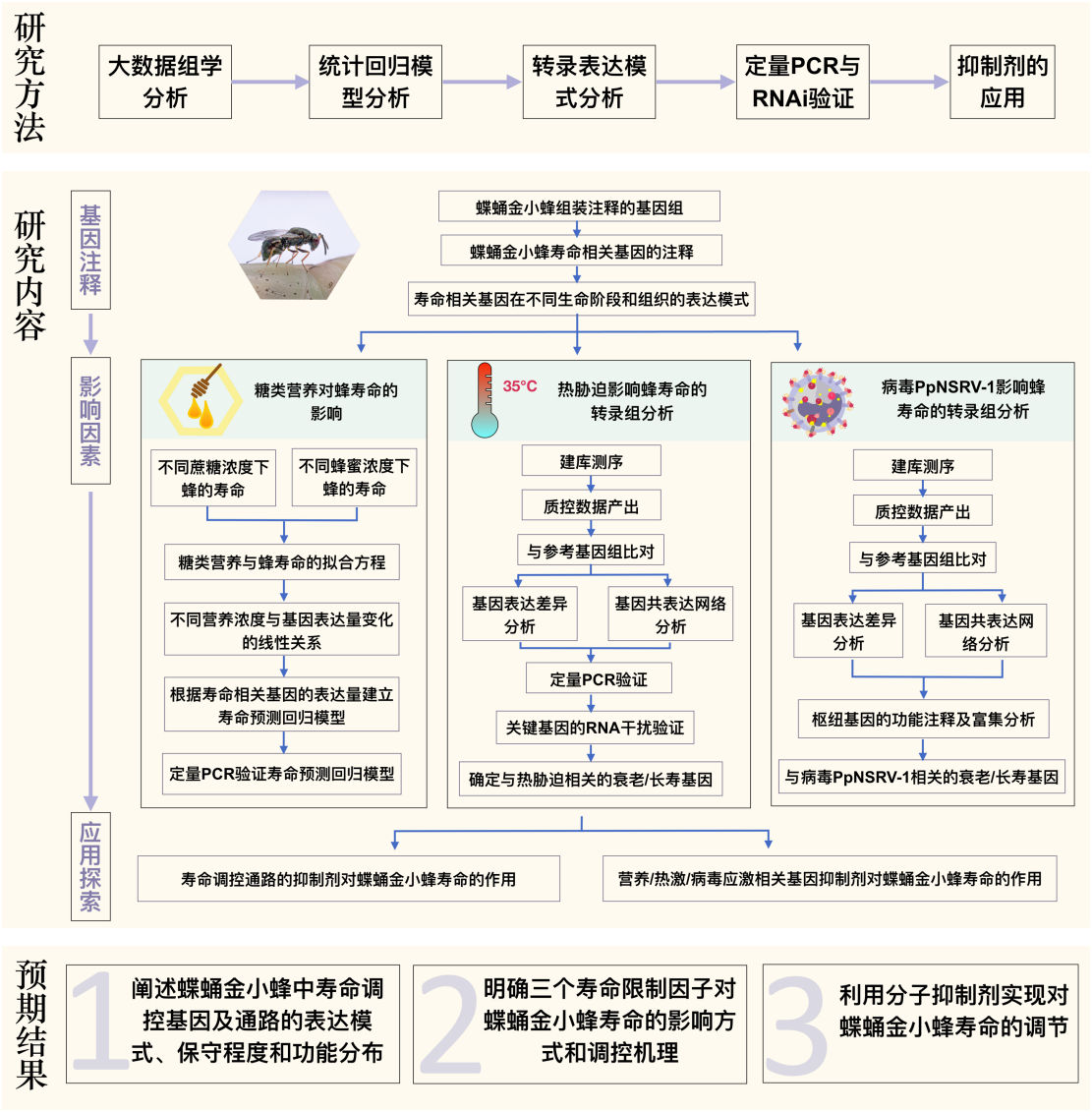

图 1.2 本文研究思路与技术路线

Figure 1.2 Research idea and technical route of this paper.

第二章 蝶蛹金小蜂寿命相关基因的鉴定和分析

结合 Illumina、PacBio 测序技术和 Hi-C 辅助组装技术，蝶蛹金小蜂的高质量染色体级基因组在近期完成组装注释 (Ye *et al.*, 2020)。组装后的基因组大小为 338 Mb，contig N50 为 38.7 kb，scaffold N50 为 1.16 Mb。Hi-C 分析将基因组 scaffold 组装到 5 条染色体上，使 scaffold N50 提高到 65.8 Mb，96%以上的组装碱基位于染色体上。通过两种性别和 4 个不同生命阶段的转录组测序数据辅助完成了基因注释。

根据综述可知，已知的寿命相关基因分布在 IIS、TOR 和 AMPK 等众多途径上，包括介导生长、代谢、发育、抵抗力等过程的基因 (Moskalev *et al.*, 2014)。在此基础上，参照果蝇、丽蝇蛹集金小蜂等昆虫寿命与衰老相关基因的注释 (Proshkina *et al.*, 2015; Tacutu *et al.*, 2018; Werren *et al.*, 2010)，就蝶蛹金小蜂寿命与衰老相关基因进行注释、鉴定与分析。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂 *P. puparum* 及其寄主菜粉蝶 *P. rapae* 幼虫最初采自浙江省杭州市浙江大学农场试验田，在实验室连续纯化培养了十多代后进行 *de nova* 测序，其饲养方法参考蔡峻等方法 (Cai *et al.*, 2004)。蝶蛹金小蜂及其寄主菜粉蝶被饲养在温度人工气候室内（温度为 25 ± 1℃，湿度为 60 ± 5%，光周期为 L : D = 14 h : 10 h）。蝶蛹金小蜂的生命周期约为 40 d，其胚胎在寄生后 48 h 左右孵化成幼虫，幼虫期为 8 d 左右，蛹期为 10 d 左右，然后羽化为成虫。蝶蛹金小蜂成虫的寿命在 25℃条件下约为 20 d。

蝶蛹金小蜂成蜂饲养于果蝇管（直径为 24 mm，长度为 95 mm）中，每管放置 30 头左右。其繁殖过程如下：（1）羽化后的雌蜂和雄峰大约 1:1 的比例饲养在果蝇管中，用改良过的毛细管喂食法（CAFE）饲喂 10%蜂蜜水 (Ja *et al.*, 2007)；（2）将充分交配 3 d 的雌蜂轻轻吹入玻璃管（直径 1.1 mm，长度 7.8 mm）中，玻璃管中同时放入化蛹 1 d 的菜粉蝶的蛹寄生 24 h 后，将雌蜂吸走；（3）经过 15 d 左右，寄生蜂开始羽化，羽化后的寄生蜂即可用于实验及新一轮的寄生。

1.2 RNA-seq 数据的分析

RNA-seq 数据的采集和处理按照 Yang *et al.* (2017)描述的流程进行。采集样品时，在 12 h 内从新寄生的菜粉蝶蛹中采集蝶蛹金小蜂胚胎，使所有样品保持在早期胚胎阶段。在寄生后 2、4、6 d 采集 1、2、3 龄幼虫。随后分别收集早期阶段蛹和羽化后 2 d 的雌蜂和雄蜂。处理后进行测序，得到胚胎、幼虫、雌蛹、雄蛹、雌成虫和雄成虫等六个不同时期和不同性别的转录组数据集。使用 RSEM 计算每个样本的基因表达水平 (Li and Dewey, 2011)。蝶蛹金小蜂相关基因的 FPKM 值列于附表I中。使用 TBtools (Chen *et al.*, 2020)对蝶蛹金小蜂寿命相关基因在各发育阶段的转录谱进行可视化分析。

1.3 蝶蛹金小蜂基因组中寿命相关基因的鉴定

寿命相关基因的鉴定有两种常用的实验手段：一是使基因失活，若基因缺失或表达量降低后生物寿命延长，则认为它是衰老基因；二是使基因过量表达，若生物寿命延长则认为该基因为长寿基因。首先，整理已发表研究中有实验证明与生物寿命相关的基因，并从黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和其他模式生物基因组中提取了每个基因的核酸和蛋白质序列建立索引库。使用 BLASTP 对蝶蛹金小蜂基因组进行检索，获得 e 值小于 $1.0*10^{-5}$ 的候选同源蛋白序列。通过 HMMER 与 Pfam 数据库对所有寿命相关的候选基因进行分析，以确保每个序列都包含标志性的结构域 (Prakash *et al.*, 2017)。筛选出含有特定结构域的预测蛋白序列后，将数据提交至 BlastKOALA（http://www.kegg.jp/blastkoala/）上进行验证。最后，在基因的表达谱中进行筛选去除在所有不同时期 FPKM 值均<1 的基因，得到预测的蝶蛹金小蜂的寿命相关基因。使用 Omicshare 云平台（https://www.omicshare.com/）进行基因本体（GO）分析。

1.4 RT-qPCR 分析

验证表达谱所用的样本与转录组测序样品按同样的流程采集和处理。采集热应激处理及其对照组的成蜂样品时，将刚羽化的成蜂置于 25℃和 35℃的人工气候室中。在成蜂羽化后第 5、10 和 15 d 分别采集成年雌蜂，分别代表青年、中年和老年阶段。采集所有样品，根据 TRIzol®（Invitrogen，California，USA）的使用说明提取各年龄段成蜂的总 RNA。提取的总 RNA 用 NanoDrop（Thermo Scientific，Wil mington，DE）微量分光光度计进行测定。以提取的总 RNA 为模

板，使用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit（Takara, Japan）逆转录试剂盒根据试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。

在 25 μl 反应体积中使用 1 ng cDNA 作为模板。引物用 Primer3 v4.1.0 和 Primer-Blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/）设计（表 2.1）。用 RT-PCR 及其产物的测序来校正所选基因的核苷酸序列。为每个测试基因设计了至少两对特异性引物。为了验证 qPCR 引物的特异性，在每个 qPCR 反应结束时加入 60-95℃的解离曲线。为了确定引物的效率，分别用 10～100,000 倍的连续稀释液对模板进行 qPCR，并计算其效率值。根据特异性和效率验证的结果，选择合适的引物进行基因表达谱的测定。qPCR 采用 SYBR® Premix Ex TaqTM II（Tli RNaseH Plus）（日本 Takara 公司）进行。每个样品设置 3 个生物独立重复分析和 3 个技术重复分析，以稳定表达的 18S rRNA 作为内参基因，将热应激组的 mRNA 积累量与对照组进行比较。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 mRNA 表达水平进行定量分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。统计学分析利用 GraphPad Prism 6（http://www.graphpad.com）进行。

表 2.1 本章所用引物

Table 2.1 Primers used in this chapter

引物名称	核苷酸序列 (5'-3')	用途
qpphspa1-1f	ATCCACCCGTATCCCCAAGA	转录组数据的定量 PCR 验证
qpphspa1-1r	CGTCGAGAAGCAGGAGATCC	
qpphspa1-2f	TGAGAACAGCAGCAGAACGT	
qpphspa1-2r	GGTTCAAGAGTGGAGCGGAA	
qppcryab-4f	GCAGTTCAAACCCGAGGAGA	
qppcryab-4r	ATGACATACCTGCGCACGAA	
qpppptenf	GACCCACCAGCAACCGATTA	
qpppptenr	CCTGCTGTGGTCTAAGAGCC	
qppPIK3R1_2_3f	CTCAGACAGCAGCTCAACGA	
qppPIK3R1_2_3r	TTGTCGTACCACTGAACCGG	
qppaktf	GAGGGCTGGCTTTTCAAACG	
qppaktr	GCTGCCATTTGTTGATCGGG	
qpphspa1-4f	GACACCCAGCTATGTTGCCT	热应激相关基因的定量 PCR
qpphspa1-4r	GGTCGCTCTGGATCTTCTCG	
qpphspa1-3f	GCGTGCCAAAGATCGATGTC	
qpphspa1-3r	GTCTGCCAACATCCTGTCGA	
qppsod2-f	CAACCACAGGCCTGATTCCT	
qppsod2-r	TGAAACGAGCGCTGACATCT	

qppETV6_7f	CTACACGCACTACATCGCCT
qppETV6_7r	CAGGATGTTGACGCGGTAGT
qppfoxo3f	CCGATCTCATCACTCAGGCC
qppfoxo3r	AGTTCTTCCATCCGGCACTG
qppnfkb-f	CCTTCTGAGACTTGGGGCTG
qppnfkb-r	TGCGCCTCCAGATTCAACTT
qppsod1-1f	GTAACGTTGAGGCTGGCTCT
qppsod1-1r	TTGGAGAGTTCATGGCCACC

2 结果与讨论

2.1 寿命调控通路上的基因

在蝶蛹金小蜂的基因组中共鉴定出了 229 个寿命相关基因（表 2.2），根据文献报道的基因功能对它们在寿命调控途径中的作用整合成一个模拟示意图（图 2.1）。根据蝶蛹金小蜂的候选基因与已知模式生物的寿命调控相关基因的同源性，预测了候选基因的功能和可能的对寿命的影响（表 2.2）。根据这些基因的同源物参与不同模式生物寿命调控的功能报道，推测它们也可能与蝶蛹金小蜂的寿命调控有关。基因本体（Gene Ontology，GO）分析表明这些基因可分为 7 个功能组。其中，结合功能组的基因最多，包含 68 个基因。其次是催化活性组，包含 46 个基因。此外，有 16 个基因具有转录因子活性（附录II）。

根据基于 RNA-seq 数据的热图（图 2.2）可知，预测的蝶蛹金小蜂寿命相关基因在胚胎中表达较多，少数基因在成蜂中表达较高。这些寿命相关基因在果蝇中的同源基因参与生长、代谢和发育等细胞过程，因此推测这些基因在胚胎期的高转录水平可能与胚胎发生有关。聚类分析大致将基因表达模式分为三种类型。在不同发育阶段高表达的基因大多与抗应激性有关。在下面的章节中，将讨论作用于特定途径的基因。

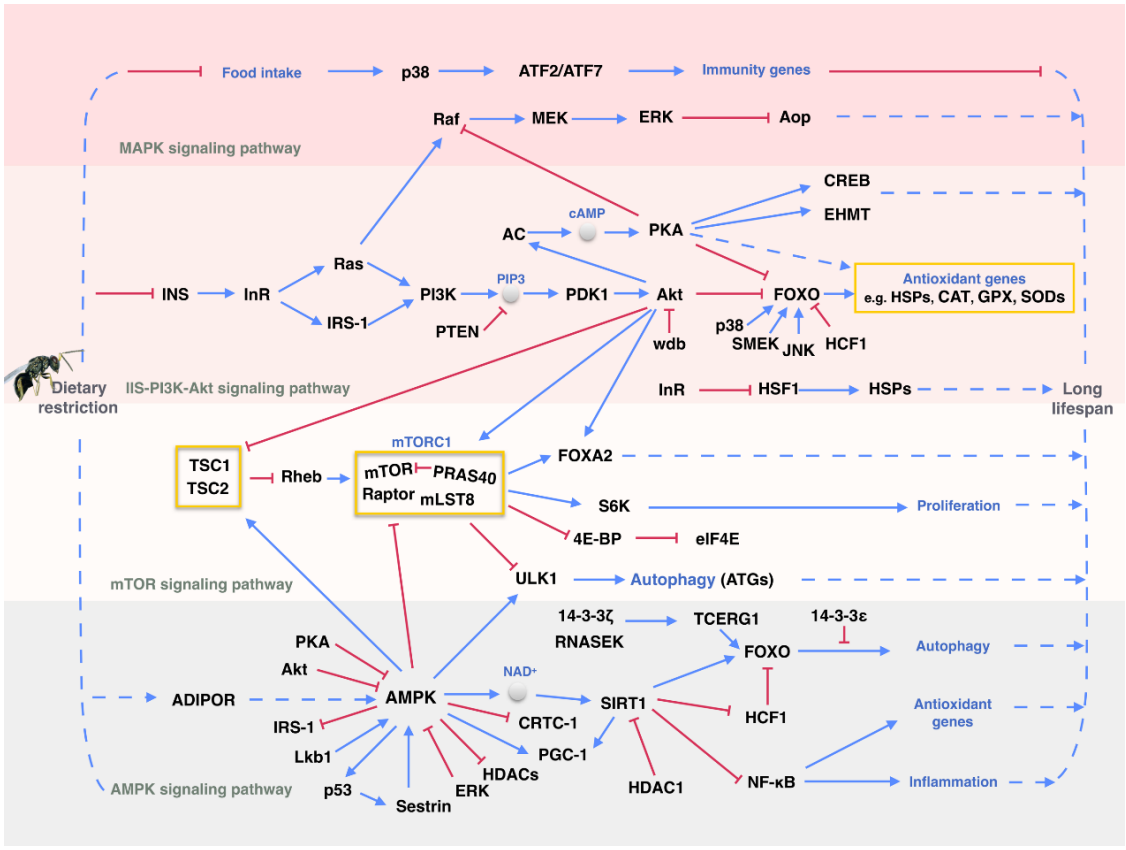

图 2.1 蝶蛹金小蜂寿命相关基因及通路示意图

Figure 2.1 Putative signaling pathways and regulators/mediators/effectors for *P. puparum* longevity regulation.

注：这张示意图汇编了已知参与寿命调控的基因。四种不同颜色的背景表示它们大致属于哪种信号通路。用线条来显示它们的关系。带有停止标志的红线表示抑制，而带有箭头的蓝线表示激活。This schematic map compiled regulators, mediators, and effectors that were reported to be involved in longevity regulation in multiple species. We used four different colored backgrounds to indicate which signaling pathway they roughly belong to. Multiple pathways may converge on some key regulators. We use lines to show their relationships. Red line with a stop sign means inhibition, while blue line with an arrow means activation.

2.1.1 IIS-PI3K/Akt 信号通路

胰岛素（Insulin）参与调节糖类、脂质和蛋白质代谢 (Nassel and Vanden Broeck, 2016)。IIS（Insulin/IGF-1 signaling pathway）影响人类的寿命、繁殖和多种疾病 (Mazucanti *et al.*, 2015) 。在蝶蛹金小蜂中注释到了果蝇胰岛素受体（*InR*）、胰岛素受体底物 1（*IRS-1*）和胰岛素样肽（Insulin-like peptide, *ILP*）的同源基因（表 2.2）。相比于果蝇中的 8 个胰岛素样肽（dILP），蝶蛹金小蜂中只注释到 1 个。蝶蛹金小蜂中没有注释到胰岛素样生长因子 1（IGF-1）。ILP 和 IGF-1 与 InR（一种酪氨酸激酶受体）结合，随后 IRS-1 通过磷酸化被激活。蝶蛹金小蜂的胰岛素受体底物 1（PpIRS-1）与果蝇蛋白 Chico 同源。Chico 的表达量降低可

使同源体中蝇的中位寿命延长 48%，异源体中延长 36% (Clancy *et al.*, 2001)。*PpILP* 的 mRNA 表达水平在胚胎期达到顶峰，在幼虫期后变得更高。这表明 *PpILP* 参与了营养物质的吸收和生长调节过程。*PpInR* 的转录水平在胚胎期高于幼虫期后各阶段，这可能表明 *PpInR* 在寄生蜂的胚胎发育过程中发挥作用。*PpIRS-1* 在各发育阶段的表达水平相对稳定，最高的 FPKM 值接近 53（图 2.2）。据此，推测在蝶蛹金小蜂中 IIS 的功能可能还与营养物质的摄取和生长代谢调节有关。

在蝶蛹金小蜂中注释到了一组 IIS 下游的 PI3K-Akt 信号簇的基因，包括 2 个 *PI3K*、1 个 *Akt*、两个 *wdb*、1 个 *FOXO*、1 个 *FOXA2*、1 个 *PTEN* 和 1 个 14-3-3ε（表 2.2）。Akt 可以通过 PI3K 依赖性和非依赖性的机制被激活 (Mahajan *et al.*, 2010)。它通过抑制细胞凋亡作用于细胞生存途径，也参与蛋白质合成、应激反应和衰老 (Moskalev *et al.*, 2014)。Akt 具有一个 PH 结构域，它能与 PIP3 或 PIP2 结合。在果蝇中，ILPs 与 InR 结合，激活 PI3Ks。被 InR 激活后，PI3Ks 将 PIP2 磷酸化为 PIP3，从而激活 3-磷酸肌苷依赖性激酶 1（PDK1），后者又通过磷酸化 Akt 蛋白上的苏氨酸（Thr308）和丝氨酸（Ser473）残基来激活 *Akt* (Moskalev *et al.*, 2014)。wdb 是一个 Ser/Thr 磷酸酶 PP2A 调节亚基。在果蝇中过表达 wdb 可使 Akt 失活并延长寿命 (Funakoshi *et al.*, 2011)。PTEN 是一种酪氨酸磷酸酶，被称为许多癌症药物的靶点。它包含一个张力样和一个催化域，用于磷脂酰亚胺底物的去磷酸化。它通过将 PIP3 去磷酸化为 PIP2 来负向调节 PI3K/Akt 通路 (Shi *et al.*, 2014)。

PpFOXO 在果蝇中的同源基因 *dFOXO* 已被确定为调控 *Akt* 下游寿命的关键转录因子。*dFOXO* 表达量上调可诱导寿命延长 (Giannakou *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2008)。叉头盒（FOX）家族共享一个保守的 DNA 结合域，可分为 *FOXA* 至 *FOXS* (Lam *et al.*, 2013)。*PpFOXA2* 的果蝇同源基因 *FKH* 是调节肠道衰老的关键转录因子。*FKH* 与 Akt 和 TOR 通路相互作用，使果蝇的中位生存期延长了 18% (Bolukbasi *et al.*, 2017)。基于这些同源基因的功能，在蝶蛹金小蜂中注释的 PI3K-Akt 通路可能在细胞功能上起重要作用，参与寄生蜂的转录、翻译、生长和寿命调控。

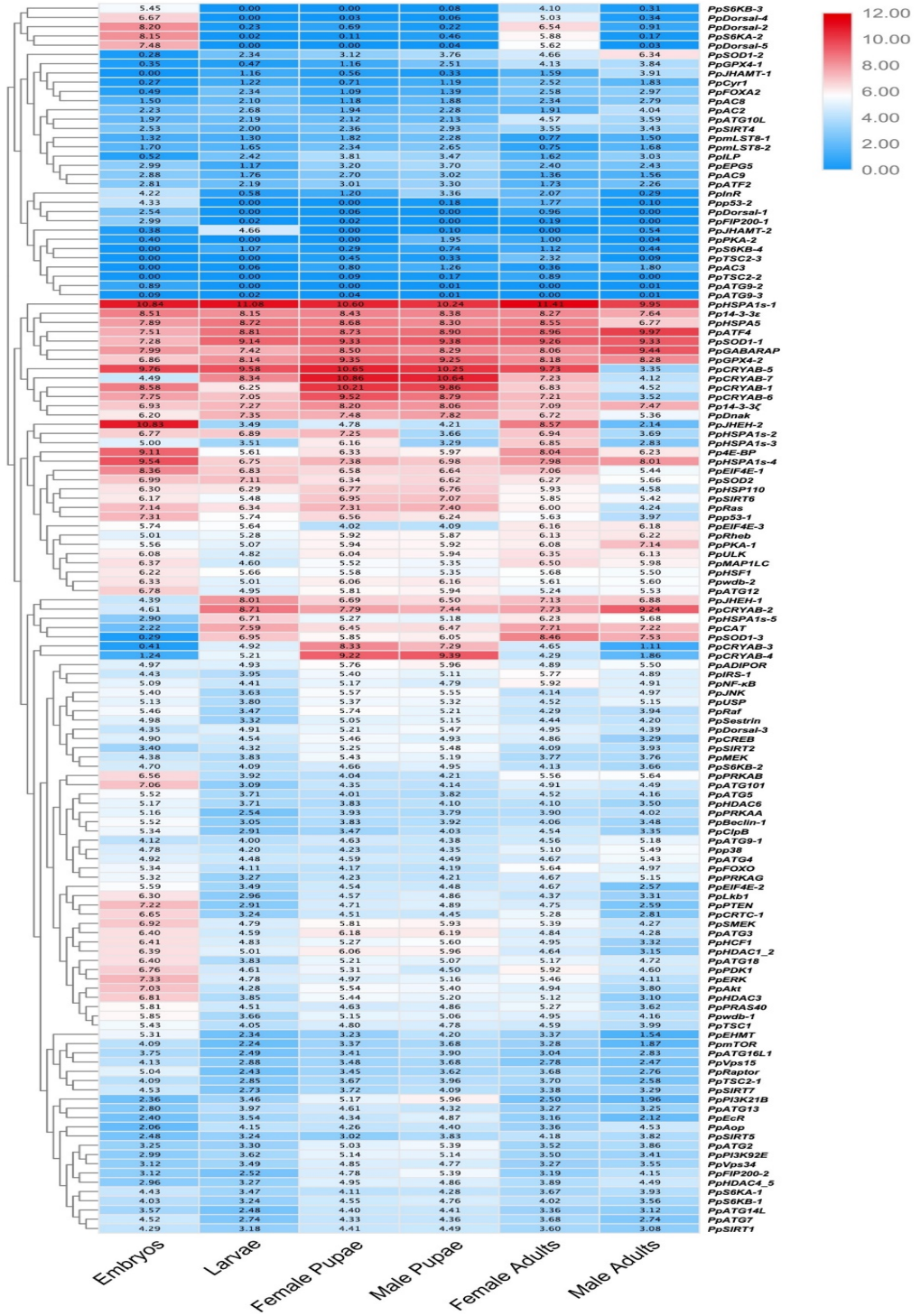

图 2.2 蝶蛹金小蜂寿命相关通路基因在不同发育阶段的表达谱

Figure 2.2 Expression profiles of *P. puparum* putative lifespan‐related genes in different development stages.

注：用 FPKM 值表示寿命相关基因的表达水平，显示在从浅粉色到红色的梯度热图中。基因的 mRNA 水平是由 $\log_2$（FPKM＋1）值四舍五入表示。处理后的值在梯度热图中从蓝色（0）到红色（≥10）。E：胚胎；L：幼虫；FP：雌性蛹；MP：雄性蛹；FA：雌性成虫；MA：雄性成虫。The expression levels of all putative lifespan-related genes, as represented by FPKM values, are shown in the gradient heat map from light pink to red. Panel B-I. The mRNA levels of the putative signaling genes are represented by $\log_2$(FPKM+1) values and rounded. The processed values are shown in the gradient heat map from blue (0) to red (≥10). E: embryo; L: larva; FP: female pupa; MP: male pupa; FA: female adult; MA: male adult.

2.1.2 MAPK/ERK 信号通路

蝶蛹金小蜂的 MAPK 相关基因可能参与了应激反应、细胞凋亡和生存等细胞过程。每个果蝇 MAPK/ERK 组分在蝶蛹金小蜂中都注释到了 1 个同源基因。在信号转导过程中，激活的 *Ras* 激活 Raf 激酶，从而导致 MEK 激酶的磷酸化和激活，进而激活 *ERK*。Raf 和 ERK 是丝氨酸/苏氨酸选择性蛋白激酶，MEK 是丝氨酸/酪氨酸/苏氨酸激酶。Raf 激酶是由 A-Raf、B-Raf 和 C-Raf 这三种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶组成的家族，它们与逆转录病毒癌基因有关 (Roskoski, 2010)。与其果蝇同源蛋白一样，*PpRaf* 属于 B-Raf 激酶。在 20 个昆虫基因组中，柑橘木虱 *D. citri* 中的 dRaf 同源基因是唯一的 A-Raf。短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* 中有 3 个果蝇 Raf 同源体，中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 中有 2 个。*D. citri* 中有两个 *MEK*，其他昆虫中有一个。在榕小蜂 *Ceratosolen solmsi* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中有 2 个 *ERK*，其他昆虫中有 1 个。*ERK* 作为多种信号通路的整合节点作用于多个生理过程，如信号转导和转录调节 (Slack, 2017)。

2.1.3 AMPK 信号通路

AMPK 在寿命调控通路网络中是一个重要的节点（图 2.1）。*AMPK* 可以调节所有长寿调节器的功能，如 *FOXO*、*TOR*、肿瘤抗原 *p53*、sirtuin 1（*SIRT1*）和 cAMP 调节转录联合激活子-1（*CRTC-1*） (Salminen and Kaarniranta, 2012)。在蝶蛹金小蜂中注释到了 26 个通过 AMPK 途径发挥作用的蛋白，包括 3 个 AMPK 亚基、2 个 PKA、1 个 NF-κB、5 个 Dorsal、5 个腺苷酸环化酶（AC）、2 个 p53 蛋白、1 个 Sestrin、1 个 Lkb1、1 个 CRTC-1 和 1 个 cAMP 反应元件结合蛋白（CREB）（表 2.2）。推测在蝶蛹金小蜂 AMPK 途径中发现的基因参与了能量代谢和稳态的维持。*NF-κB* 是应激反应、自噬和细胞凋亡的另一个调节器，它同时也参与了 PI3K/Akt 和 MAPK 等多条信号通路。毒物兴奋效应可以指任何对环境物质具有双相反应的生物过程。*NF-κB* 可能通过毒物兴奋效应的方式作用，延长生物寿命 (Chirumbolo, 2012)。*PpNF-κB* 与果蝇 *Relish* 同源。五个 *PpREL* 是另外两个果蝇 *NF-κB*（Dorsal 和 Dif）的同源物。推测蝶蛹金小蜂的 6 个 *NF-κB* 作用于抗菌等免疫过程。

2.1.4 自噬基因

自噬过程是由自噬相关基因（*ATG*）实现的 (Vellai, 2009)。蝶蛹金小蜂中共注释有 25 个 *ATG* 基因（表 2.2）。这些 ATG 蛋白可能参与不同阶段的自噬过程，在寄生蜂的衰老、发育、细胞稳态、细胞死亡和生存等一些多重生理过程中发挥作用。图 2.3 中描述了 ATGs 的一些作用 (Hansen, 2016)。AMPK 和 TOR 通过抑制哺乳动物 *ATG1* 的同源基因 *ULK* 来调节自噬 (Chan, 2012)。根据线虫 *ATG* 在衰老调控中的作用 (Hashimoto *et al.*, 2009)，推测蝶蛹金小蜂的 *ATG* 在寿命调控中也起到一定作用。果蝇 *ATG8* 同源基因（*PpGABARAP* 和 *PpMAP1LC*）在各发育阶段的基因表达水平均高于其他 ATG 基因，最高的 FPKM 值为 692。

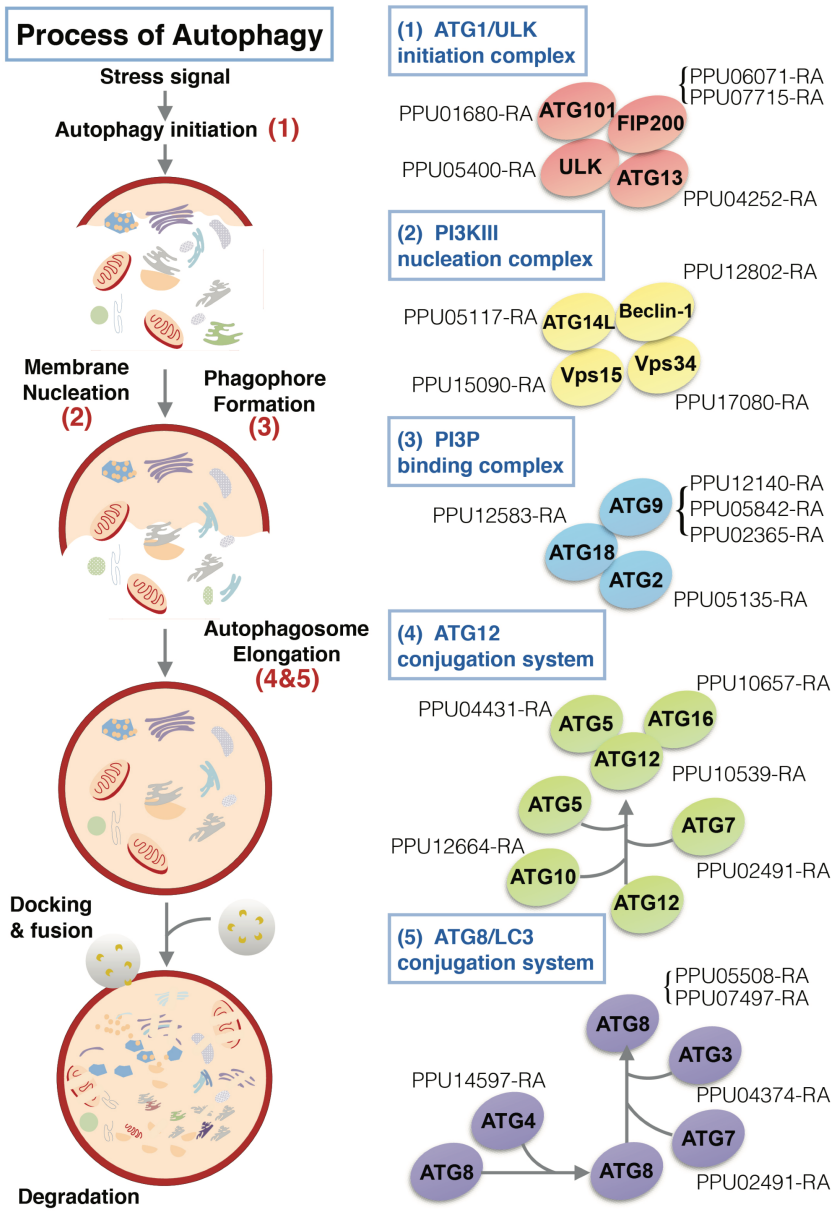

图 2.3 蝶蛹金小蜂自噬过程示意图（参考 Hansen, 2016）

Figure 2.3 Overview of macroautophagy process and *PpATG*s.

2.1.5 应激过程中的寿命相关基因

作用于应激反应中的寿命相关基因包含了响应热应激的热激蛋白类、响应氧化应激的氧化酶类、去乙酰化酶类（*HDAC* 和 sirtuins）以及其他调控寿命的基因。在蝶蛹金小蜂中共注释到了 3 个 Cu-Zn 超氧化物歧化酶（*CuZnSOD*）、1 个 Fe-Mn 超氧化物歧化酶（*FeMnSOD*）、1 个 *CAT* 和 2 个 *GPX*（表 2.2）。这些抗氧化应激反应基因的功能可能是保护细胞免受氧化应激损伤和抗衰老。

在蝶蛹金小蜂基因组中，通过注释得到了 24 个热激蛋白 HSP，其中有 8 个 sHSP（PpCRYAB1-8）。同时注释到了 4 个组蛋白去乙酰化酶 PpHDAC 和 6 个 NAD+依赖性去乙酰化酶 PpSirtuin（PpSIRT1，2，4 到 7）。相比其他生物，酵母和果蝇中有 5 种 sirtuin 蛋白，线虫有 4 种，小鼠和人类有 7 种 (Giblin *et al.*, 2014)，寄生蜂中去乙酰化酶类数量较多，推测与蝶蛹金小蜂中存在共生细菌和病毒有关。HDAC 作用于 HSP 基因的转录。Sirtuins 是一类从细菌到人类中高度保守的去乙酰化酶类 (Bitto *et al.*, 2015)，属于 III 类 HDAC，调节各种细胞过程，包括代谢和衰老 (Grabowska *et al.*, 2017)。*SIRT1* 是果蝇 *dSir2* 的同源基因，响应 CR 并介导 IIS 信号。它通过包括 *FOXO*、*p53* 和 *NF-κB* 在内的几个转录因子在抗应激中起作用（Haigis & Sinclair，2010），被认为与 DNA 修复、抗炎症和抗衰老有关。*SIRT6* 在基因组 DNA 稳定性和 DNA 修复中起作用。过度表达 *SIRT6* 可以显著延长雄性小鼠的寿命。*SIRT6* 转基因小鼠表现出 *IGF-1* 的表达水平降低 (Kanfi *et al.*, 2012)。*SIRT7* 可能是一个癌基因，在一些人类癌症中高表达 (Roth and Chen, 2014)。*SIRT7* 作用于 DNA 双链断裂修复和基因组完整性的维持 (Vazquez *et al.*, 2016)。参与抗应激性的基因的 FPKM 值在 0.2～2726 之间，普遍高于其他寿命相关基因。

2.1.6 代谢过程中的寿命相关基因

作用于代谢过程中的寿命相关基因除了前文提到的 IIS、TOR 和 AMPK 等通路上的基因，还包括调控能量代谢、脂质代谢、生殖发育与信号传导等其他生理过程中的基因（表 2.2）。关于脂质代谢的基因，在蝶蛹金小蜂基因组中注释得到了 JH 核受体（*PpUSP*）、2 个 JH 转移酶（*JHAMT*）、2 个 JH 环氧水解酶（*JHEH*）和蜕皮酮受体（*PpEcR*）。JHAMT 是一种 JH-III 合成酶，可激活 JH。JHEH 催化 JH 环氧化物的水解 (Niwa *et al.*, 2008)。在线虫和一些昆虫中的研究表明，脂质代谢与寿命有关 (Russell and Kahn, 2007)。果蝇有两种主要的亲脂性

激素，蜕皮激素（ecdysteroid）和保幼激素（JH），它们被认为与成虫寿命有关(Toivonen and Partridge, 2009)。JH 作用于果蝇和其他昆虫的寿命调控，以及寿命与生殖力之间的平衡关系 (Flatt and Kawecki, 2007; Yamamoto *et al.*, 2013)。用 JH 类似物甲壳素处理 InR 突变的长寿果蝇会缩短其寿命，说明降低 JH 足以延长寿命，且 JH 和 IIS 之间存在联系 (Tatar *et al.*, 2001)。

蜕皮酮受体 *PpEcR* 的果蝇同源基因 *dEcR* 编码一种与 USP 异构的核激素受体 (Schwedes and Carney, 2012)。Ecdysone 是昆虫主要蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮（20E）的促激素。与 JH 相似，ecdysone 似乎在 IIS 下游发挥与寿命相关的功能(Tu *et al.*, 2005)，其机制可能是通过调节核激素受体的转录水平 (Russell and Kahn, 2007)。EcR 杂合突变体果蝇的寿命从 20%延长到 50%，且其寿命在两种性别和不同遗传背景的几个品系中都有所增加。它们表现出对氧化应激、热和失水三种应激的抵抗力增强 (Simon *et al.*, 2003)。

表 2.2 蝶蛹金小蜂寿命相关基因的基因 ID 和注释

Table 2.2 Gene ID and annotation of *P. puparum* lifespan-related genes

基因编号	基因名称	描述	图 2.1 中对应元素	对寿命影响	参考文献
IIS-PI3K/Akt signaling pathway					
PPU01146-RA	PpILP	Insulin	INS		(Bai *et al.*, 2012; Broughton *et al.*, 2008)
PPU07299-RA	PpInR-1	Insulin receptor	InR	Anti	(Tatar *et al.*, 2001)
PPU00285-RA	PpInR-2	Insulin-like peptide receptor			
PPU08276-RA	PpIRS-1	Insulin receptor substrate 1	IRS-1	Anti	(Clancy *et al.*, 2001)
PPU11776-RA	PpHCF1	Host cell factor	HCF1	Anti	(Li *et al.*, 2008)
PPU04680-RA	PpSMEK	Protein phosphatase 4 regulatory subunit 3	SMEK	Pro	(Samuelson *et al.*, 2007)
PPU14715-RA	PpAkt	RAC serine/threonine-protein kinase	Akt	Pro	(Biteau *et al.*, 2010)
PPU02657-RA	PpPDK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	PDK1	Anti	(Paradis *et al.*, 1999)
PPU00499-RA	PpPI3K92E	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha/beta/delta	PI3K	Pro	(Biteau *et al.*, 2010)
PPU14545-RA	Ppwdb_1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B	wdb	Pro	(Funakoshi *et al.*, 2011)
PPU01704-RA	Ppwdb_2				
PPU05718-RA	PpPTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	PTEN	Pro	(Demontis and Perrimon, 2010)
PPU13406-RA	PpFOXO_1	Forkhead box protein O	FOXO	Pro	(Hwangbo *et al.*, 2004)
PPU10813-RA	PpFOXO_2				
PPU05162-RA	PpFOXA2	Forkhead box protein A2	FOXA2	Pro	(Bolukbasi *et al.*, 2017)
PPU02803-RA	Ppp38	P38 MAP kinase	p38	Pro	(Vrailas-Mortimer *et al.*, 2011)
PPU15278-RA	Pp14-3-3ε	14-3-3 protein epsilon	14-3-3ε	Anti	(Nielsen *et al.*, 2008)
PPU02576-RA	Pp14-3-3ζ	14-3-3 protein zeta	14-3-3ζ	Pro	(Li *et al.*, 2007)
PPU11704-RA	PpRNASEK	Ribonuclease kappa	RNASEK	Pro	(McCormick *et al.*, 2012)
PPU07542-RA	PpTCERG1	Transcription elongation regulator 1	TCERG1	Pro	(Ghazi *et al.*, 2009)

PPU04213-RA	PpTGFBR1	TGF-beta receptor type-1		Anti	(Bai *et al.*, 2013)
MAPK/ERK					
PPU04462-RA	PpJNK	C-Jun N-terminal kinase	JNK	Pro	(Biteau *et al.*, 2010)
PPU10958-RA	PpRas	GTPase K-Ras	Ras		(Slack *et al.*, 2015)
PPU16623-RA	PpMEK	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	MEK	Pro	(Okuyama *et al.*, 2010)
PPU05765-RA	PpERK	Mitogen-activated protein kinase 1/3	ERK		(Slack *et al.*, 2015)
PPU01990-RA	PpAop	ETS translocation variant 6/7	Aop		
PPU09895-RA	PpRaf	B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	Raf		
PPU13999-RA	PpLnk	SH2B adapter protein 2		Anti	(Song *et al.*, 2010)
PPU07049-RA	PpATF2	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2	ATF2	undirectly related	(Waas *et al.*, 2001)
TOR signaling pathway					
PPU04166-RA	PpEIF4E-1	Translation initiation factor 4E	EIF4E	Anti	(Pan *et al.*, 2007)
PPU13693-RA	PpEIF4E-2				
PPU04123-RA	PpEIF4E-3				
PPU00322-RA	Pp4E-BP	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein	4E-BP	Pro	(Zid *et al.*, 2009)
PPU11457-RA	PpTOR	Serine/threonine-protein kinase mtor	mTOR	Anti	(Kapahi *et al.*, 2004)
PPU03798-RA	PpRaptor	Regulatory associated protein of mtor	Raptor		
PPU06343-RA	PpPRAS40	Proline-rich Akt substrate 1	PRAS40		
PPU16116-RA	PpmLST8-1	Target of rapamycin complex subunit LST8	mLST8		
PPU10534-RA	PpmLST8-2				
PPU12236-RA	PpmLST8-3				
PPU15964-RA	PpS6KB-1	Ribosomal protein S6 kinase beta	S6K	Anti	(Kapahi *et al.*, 2004)
PPU05285-RA	PpS6KB-2				
PPU05284-RA	PpS6KB-3				
PPU10327-RA	PpS6KB-4				
PPU06188-RA	PpTSC1	Tuberous sclerosis 1	TSC1	Pro	(Kapahi *et al.*, 2004)

PPU08526-RA	PpTSC2-1	Tuberous sclerosis 2	TSC2	Pro	(Kapahi *et al.*, 2004)
PPU00208-RA	PpTSC2-2				
PPU00209-RA	PpTSC2-3				
PPU03684-RA	PpRheb	Ras homolog enriched in brain	Rheb	Anti	(Honjoh *et al.*, 2009)
AMPK signaling pathway					
PPU00059-RA	PpPRKAA	5'-AMP-activated protein kinase, catalytic alpha subunit	AMPK	Pro	(Ulgherait *et al.*, 2014)
PPU10800-RA	PpPRKAB	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory beta subunit	AMPK	Pro	(Ha *et al.*, 2006)
PPU02727-RA	PpPRKAG	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory gamma subunit	AMPK	Pro	(Tóth *et al.*, 2008)
PPU06179-RA	PpNFKB1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	NF-κB	Pro	(Jurk *et al.*, 2014)
PPU09281-RA	PpLkb1	Serine/threonine-protein kinase 11	Lkb1	Pro	(Funakoshi *et al.*, 2011)
PPU12340-RA	PpPKA-1	Protein kinase A	PKA	Pro	(Tong *et al.*, 2007)
PPU07580-RA	PpPKA-2				
PPU03651-RA	PpNFKB3-1	C-Rel proto-oncogene protein	NF-κB	unclear	(Beg *et al.*, 1995)
PPU14444-RA	PpNFKB3-2				
PPU14463-RA	PpNFKB3-3				
PPU03121-RA	PpNFKB3-4				
PPU08282-RA	PpNFKB3-5				
PPU07824-RA	PpAC2	Adenylate cyclase 2	AC		
PPU11296-RA	PpAC3	Adenylate cyclase 3	AC		
PPU10905-RA	PpAC8	Adenylate cyclase 8	AC		
PPU11536-RA	PpAC9	Adenylate cyclase 9	AC		
PPU06056-RA	PpCyr1	Adenylate cyclase 2	AC		(Tong *et al.*, 2007)
PPU02268-RA	Ppp53-1	Cellular tumor antigen p53 isoform X1	p53	Anti	(Bauer *et al.*, 2007)
PPU12298-RA	Ppp53-2				
PPU13750-RA	PpSestrin	Sestrin-3	Sestrin	Pro	(Yang *et al.*, 2013)
PPU11611-RA	PpCREB	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3	CREB		(Rudolph *et al.*, 1998)
PPU13552-RA	PpCRTC-1	CREB-regulated transcription coactivator 1	CRTC-1	Anti	(Mair *et al.*, 2011)

PPU08093-RA	PpATF4	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4	CREB		
PPU03775-RA	PpADIPOR	Adiponectin receptor	ADIPOR		
PPU04412-RA	PpEHMT	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase	EHMT		
PPU09133-RA	PpPGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1	PGC-1	Pro	(Rera *et al.*, 2011)
Autophagy					
PPU05400-RA	PpULK	Serine/threonine-protein kinase ULK2	ULK	Pro	(Ulgherait *et al.*, 2014)
PPU05135-RA	PpATG2	Autophagy-related protein 2	ATG2	Pro	(Simonsen *et al.*, 2008)
PPU04374-RA	PpATG3	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	ATG3	Pro	(Tóth *et al.*, 2008)
PPU14597-RA	PpATG4	Cysteine protease ATG4	ATG4	Pro	(Hashimoto *et al.*, 2009)
PPU04431-RA	PpATG5	Autophagy-related protein 5	ATG5	Pro	(Pyo *et al.*, 2013)
PPU12802-RA	PpATG6	Beclin	Beclin-1	Pro	(M'Angale and Staveley, 2016)
PPU02491-RA	PpATG7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	ATG7	Pro	(Juhász *et al.*, 2007)
PPU05508-RA	PpATG8a	GABA(A) receptor-associated protein	GABARAP	Pro	(Simonsen *et al.*, 2007a)
PPU07497-RA	PpATG8b	Microtubule-associated protein 1 light chain	MAP1LC	Pro	
PPU12140-RA	PpATG9-1	Autophagy-related protein 9	ATG9	Pro	(Tóth *et al.*, 2008)
PPU05842-RA	PpATG9-2				
PPU02365-RA	PpATG9-3				
PPU12664-RA	PpATG10	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10	ATG10L		(Matecic *et al.*, 2010)
PPU10539-RA	PpATG12	Ubiquitin-like protein ATG12	ATG12	Pro	(Mai *et al.*, 2012)
PPU04252-RA	PpATG13	Autophagy-related protein 13	ATG13		(Matecic *et al.*, 2010)
PPU05117-RA	PpATG14L	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator	ATG14L		
PPU10657-RA	PpATG16L1	Autophagy-related protein 16-1	ATG16L1		
PPU06071-RA	PpFIP200-1	RB1-inducible coiled-coil protein 1	FIP200		(Tang *et al.*, 2008)
PPU07715-RA	PpFIP200-2				
PPU12583-RA	PpATG18a	Autophagy-related protein 18	ATG18		(Laschober *et al.*, 2010)
PPU07359-RA	PpATG18b	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3	ATG18		(Tóth *et al.*, 2008)

PPU12417-RA	PpEPG5	Ectopic P-Granules Autophagy Protein 5	EPG5		
PPU15090-RA	PpVps15	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	Vps15		
PPU17080-RA	PpVps34	Phosphatidylinositol 3-kinase	Vps34		(Smith *et al.*, 2008)
PPU01680-RA	PpATG101	Autophagy-related protein 101	ATG101	Pro	(Guo *et al.*, 2019)
Stress Resistance					
PPU04128-RA	PpCRYAB-1	Protein lethal (2) essential for life	HSPs		(Hsu *et al.*, 2003)
PPU04129-RA	PpCRYAB-2				
PPU04130-RA	PpCRYAB-3				
PPU04131-RA	PpCRYAB-4				
PPU04132-RA	PpCRYAB-5				
PPU04133-RA	PpCRYAB-6				
PPU15439-RA	PpCRYAB-7				
PPU10133-RA	PpCRYAB-8				
PPU09172-RA	PpHDAC1	Histone deacetylase 1/2	HDACs		(Rogina *et al.*, 2002)
PPU03371-RA	PpHDAC3	Histone deacetylase 3			
PPU08145-RA	PpHDAC4	Histone deacetylase 4/5			
PPU04851-RA	PpHDAC6	Histone deacetylase 6			
PPU12453-RA	PpHSP110	Heat shock 70 kDa protein 4L	HSPs		
PPU05744-RA	PpHSPA1s-1	Heat shock 70 kDa protein cognate 4			
PPU03831-RA	PpHSPA1s-5				
PPU09869-RA	PpHSPA1s-2	Heat shock protein 68			(Biteau *et al.*, 2010)
PPU09871-RA	PpHSPA1s-3				
PPU04479-RA	PpHSPA1s-4				
PPU09930-RA	PpHSPA5	Heat shock 70 kDa protein cognate 3			
PPU16234-RA	PpgroEL	60 kDa heat shock protein, mitochondrial			
PPU16233-RA	PpHSP10	10 kDa heat shock protein, mitochondrial			
PPU13369-RA	PpHSP70-3	Heat shock 70 kDa protein cognate 5			
PPU06211-RA	PpHSP75	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial			

PPU00804-RA	PpHSP90-1	Heat shock protein 83			
PPU11712-RA	PpHSP90-2	Heat shock protein 83			
PPU01735-RA	PpHSPAb	Major heat shock 70 kDa protein Ab			
PPU12454-RA	PpClpB	Caseinolytic peptidase B protein homolog	HSPs		
PPU13369-RA	PpDnak	Molecular chaperone	HSPs		
PPU04710-RA	PpCAT	Catalase	CAT	Pro	(Orr and Sohal, 1994)
PPU13433-RA	PpSOD1-1	Superoxide dismutase, Cu-Zn family	SODs		(Orr and Sohal, 1994)
PPU08377-RA	PpSOD1-2				
PPU08376-RA	PpSOD1-3				
PPU06431-RA	PpSOD1-4				
PPU08194-RA	PpSOD2	Superoxide dismutase, Fe-Mn family	SODs		
PPU04683-RA	PpHSF1	Heat shock transcription factor 1	HSF1	Pro	(Orr and Sohal, 1994)
PPU04356-RA	PpHSF4	Heat shock transcription factor, X-linked member 4			
PPU06557-RA	PpHSBP1	Heat shock factor-binding protein 1			
PPU05088-RA	PpGPX4-1	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase	GPX	Anti	(Ran *et al.*, 2007)
PPU05089-RA	PpGPX4-2				
PPU13728-RA	PpSIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin 1	SIRT1	Pro	(Rogina *et al.*, 2002)
PPU11183-RA	PpSIRT2	NAD-dependent deacetylase sirtuin 2		Pro	(Hoffmann *et al.*, 2013)
PPU15351-RA	PpSIRT4	NAD-dependent deacetylase sirtuin 4		Pro	(Wood *et al.*, 2018)
PPU05545-RA	PpSIRT5	NAD-dependent deacetylase sirtuin 5			
PPU03042-RA	PpSIRT6	Mono-ADP-ribosyltransferase sirtuin 6		Pro	(Kanfi *et al.*, 2012)
PPU00054-RA	PpSIRT7	NAD-dependent deacetylase sirtuin 7		Pro	(Vakhrusheva *et al.*, 2008)
PPU03180-RA	PpPrdx1	Peroxiredoxin 1	PRDX1	Pro	(Lee *et al.*, 2009)
PPU08165-RA	Pppark	E3 ubiquitin-protein ligase parkin		Pro	(Rana *et al.*, 2013)
PPU00508-RA	Ppposh	E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1		Pro	
PPU02280-RA	PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase		Pro	(Mangerich *et al.*, 2010)
PPU02277-RA	PARP-2	Poly [ADP-ribose] polymerase		Pro	
PPU10964-RA	PpMrp4-1	Multidrug resistance-associated protein 4		Pro	(Huang *et al.*, 2014)

PPU12675-RA	PpMrp4-2			
PPU03220-RA	PpMrp4-3			
PPU10960-RA	PpMrp4-4			
PPU03221-RA	PpMrp4-5			
PPU13858-RA	PpMrp4-6			
PPU07198-RA	PpPrx5	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	Pro	(Radyuk *et al.*, 2009)
PPU01693-RA	PpTrxT-1	Thioredoxin, mitochondrial	Pro	(Umeda-Kameyama *et al.*, 2007)
PPU12709-RA	PpTrxT-2	Thioredoxin, mitochondrial	Pro	
PPU12823-RA	Ppfh	Frataxin homolog, mitochondrial	Pro	(Runko *et al.*, 2008)
PPU04976-RA	PpGclc	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	Pro	(Dalton *et al.*, 2000)
PPU05620-RA	PpGclm	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	Pro	
PPU05100-RA	Ppxdh-1	Xanthine dehydrogenase	Pro	(Simonsen *et al.*, 2007b)
PPU05101-RA	Ppxdh-2			
PPU05102-RA	Ppxdh-3			
PPU07069-RA	Ppxdh-4			
PPU10855-RA	Ppxdh-5			
PPU10858-RA	Ppxdh-6			
PPU03981-RA	Ppazot-1	Calmodulin	Pro	(Merino *et al.*, 2015)
PPU07061-RA	Ppazot-2		Pro	
PPU03834-RA	Ppazot-3		Pro	
PPU07176-RA	PpPcmt-1	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	Pro	(Chavous *et al.*, 2001)
PPU13926-RA	PpPcmt-2		Pro	
PPU02599-RA	PpPcmt-3		Pro	
PPU07179-RA	PpPcmt-4		Pro	
PPU07178-RA	PpPcmt-5		Pro	
PPU09994-RA	PpSdhA-1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Anti	(McCormick *et al.*, 2015)
PPU09995-RA	PpSdhA-2			

PPU02206-RA	PpSdhB-1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Pro	(Walker *et al.*, 2006)
PPU08349-RA	PpSdhB-2			
PPU07649-RA	PpSdhC	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	Pro	(Tsuda *et al.*, 2007)
Metabolism genes				
PPU00881-RA	PpFAR-1	Fatty acyl-CoA reductase	Pro	(Paik *et al.*, 2012)
PPU03565-RA	PpFAR-2			
PPU03566-RA	PpFAR-3			
PPU03567-RA	PpFAR-4			
PPU03568-RA	PpFAR-5			
PPU03569-RA	PpFAR-6			
PPU03649-RA	PpFAR-7			
PPU03650-RA	PpFAR-8			
PPU07683-RA	PpFAR-9			
PPU15731-RA	PpFAR-10			
PPU03661-RA	PpFAR-11			
PPU03662-RA	PpFAR-12			
PPU03663-RA	PpFAR-13			
PPU07680-RA	PpFAR-14			
PPU07681-RA	PpFAR-15			
PPU07682-RA	PpFAR-16			
PPU13211-RA	PpFAR-17			
PPU13212-RA	PpFAR-18			
PPU13213-RA	PpFAR-19			
PPU16285-RA	PpFAR-20			
PPU01346-RA	PpNaam-1	Nicotinamidase	Pro	(Balan *et al.*, 2008)

PPU05710-RA	PpNaam-2			
PPU03769-RA	PpMen-1	NADP-dependent malic enzyme	Pro	(Kim *et al.*, 2015)
PPU08515-RA	PpMen-2		Pro	
PPU07630-RA	PpG6PD-1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Pro	(Nóbrega-Pereira *et al.*, 2016)
PPU14818-RA	PpG6PD-2			
PPU14833-RA	PpG6PD-3			
PPU13254-RA	Ppyata	N-terminal kinase-like protein	Pro	(Sone *et al.*, 2009)
PPU16549-RA	PpVhaSFD	V-type proton ATPase subunit H	Pro	(Landis *et al.*, 2003)
PPU16710-RA	Ppfwd	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	Pro	
PPU02531-RA	Ppmagu	SPARC-related modular calcium-binding protein 1	Pro	(Li and Tower, 2009)
PPU10594-RA	PpImpL2	Neural/ectodermal development factor IMP-L2	Pro	(Roed *et al.*, 2018)
PPU03672-RA	PpinaE	Sn1-specific diacylglycerol lipase alpha	Pro	(Lin *et al.*, 2014)
PPU10709-RA	PpDci	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	Pro	(Lee *et al.*, 2012)
PPU03832-RA	Ppfabp	Fatty acid-binding protein, muscle	Pro	(Boord *et al.*, 2004)
PPU09234-RA	PpJHAMT-1	Juvenile hormone acid methyl transferase		
PPU03176-RA	PpJHAMT-2	Juvenile hormone acid methyl transferase		
PPU06147-RA	PpJHEH-1	Juvenile hormone epoxide hydrolase		
PPU06149-RA	PpJHEH-2	Juvenile hormone epoxide hydrolase		
PPU07489-RA	PpJhebp29	m-AAA protease-interacting protein 1, mitochondrial	Pro/Anti	
PPU04084-RA	PpJhI-21-1	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Anti	
PPU05966-RA	PpJhI-21-2			
PPU03934-RA	Pptrh	Protein trachealess	Anti	
PPU04342-RA	PpEcR	Ecdysone receptor	Anti	(Tricoire *et al.*, 2009)
PPU14600-RA	PpUSP	Ultraspiracle		
PPU12867-RA	PpCbs	Cystathionine beta-synthase	Pro	(Shaposhnikov *et al.*, 2018)
PPU03142-RA	PpMnt	Max-binding protein MNT	Pro	(Loo *et al.*, 2005)
PPU16588-RA	PpAPOD-1	Apolipoprotein D	Pro	(Ruiz *et al.*, 2011)

PPU16589-RA	PpAPOD-2

注：Anti-longevity influence 表示通过实验降低该基因表达量后寿命延长，或该基因表达量增加后寿命缩短。反之则为 Pro-longevity influence。没有标出 Anti-或 Pro-的表示已有的研究只是报道该基因与寿命调控相关，但没有直接的实验证据，或者实验结果有争议。Anti-longevity influence indicates that the experimentally reduced expression of the gene resulted in longer lifespan or increased expression of the gene resulted in shorter lifespan. The reverse is Pro-longevity influence. The absence of longevity influence means that the gene has only been reported to be associated with lifespan regulation, but there is no direct experimental evidence or the experimental results are controversial.

2.2 RNA-seq 数据的验证

得到 RNA-seq 测序数据并计算全基因表达量(用 FPKM 值表示)后,用 qPCR 进行了 RNA-seq 数据的可靠性验证。对 qPCR 的结果和 RNA-seq 数据的 FPKM 值进行了相关性分析,相关性由 spearman's 相关系数计算的 R 值表示(图 2.4)。分析发现,有两个基因的相关性极强(R>0.80),分别是 *PpAkt*(R=0.89)和 *PpCRYAB-4*(R=0.94),而其他 4 个基因则为中等相关(R 值范围为 0.60～0.79)。在一些发育阶段,qPCR 数据和 FPKM 值之间有明显的差异。这些差异的来源可能是 RNA-seq 和 qPCR 之间的技术差别,以及用于 RNA-seq 和 qPCR 的不同样品的批次效应。这种差异在转录水平的分析中很常见。另外,RNA-seq 数据曲线和 qPCR 直方图的变化趋势十分相似。这些结果表明,本研究的 RNA-seq 和 qPCR 数据都是可靠的。

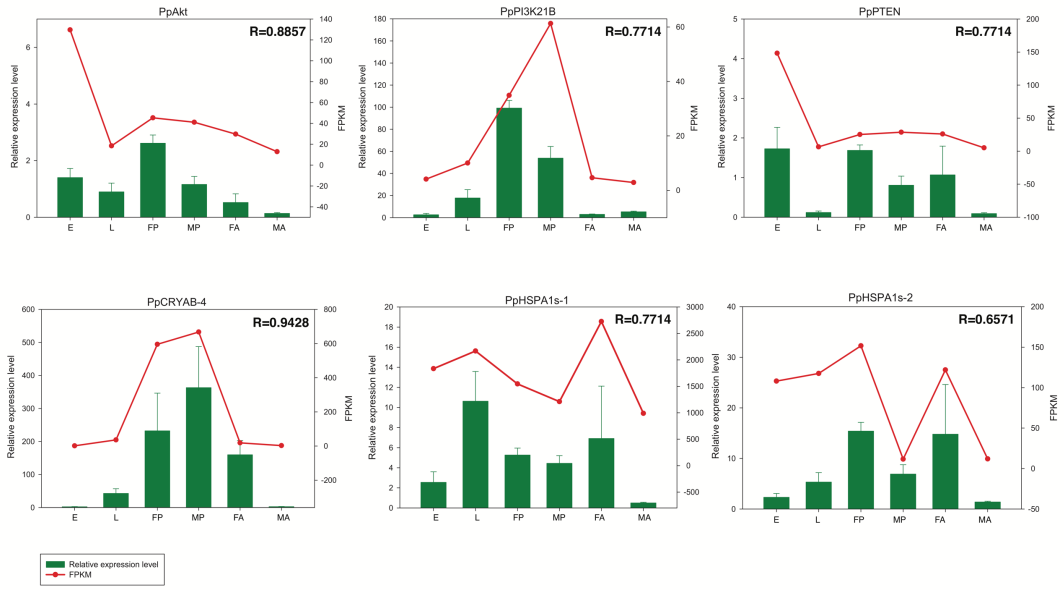

图 2.4 所选基因的转录谱和 qPCR 结果相关性分析

Figure 2.4 Transcript profile and qPCR results of selected genes in RNA-seq Data.

注:FPKM 值由红色折线表示,绿色柱状图表示基因的相对表达水平。计算 spearman 秩相关系数,用 R 值表示 qPCR 和 RNA-seq 结果之间的相关性。E:胚胎;L:幼虫;FP:雌性蛹;MP:雄性蛹;FA:雌性成虫;MA:雄性成虫。FPKM values are indicated by red lines. Green bars represent relative expression levels. R value represents the correlations between the qPCR and RNA-seq results, calculated from spearman's rank correlation coefficient. E: embryo; L: larva; FP: female pupa; MP: male pupa; FA: female adult; MA: male adult.

2.3 热应激对寄生蜂寿命和基因表达的影响

在应激条件下，细胞过程受损，寿命缩短，应激蛋白很可能被激活（Moskalev *et al.*，2014）。蝶蛹金小蜂成虫在35℃的高温条件下寿命相比25℃条件下极为显著地缩短（图2.5）。因此，选取雌性成虫进行正常和热应激处理下的基因表达分析。

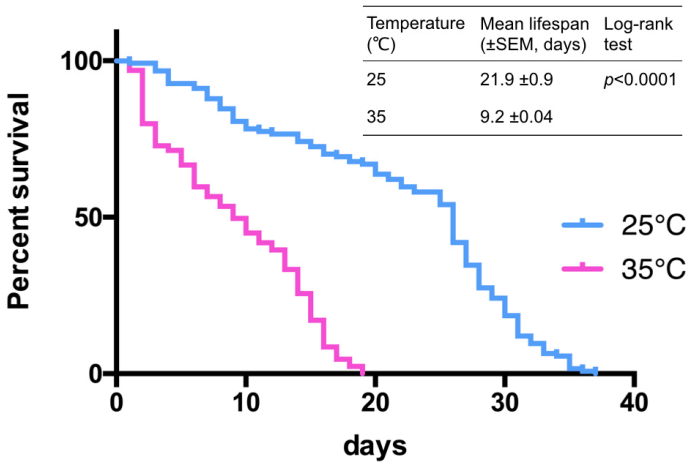

图 2.5 25℃和 35℃条件下的蝶蛹金小蜂雌成虫寿命
Figure2.5 Lifespans of *P. puparum* at 25°C and 35°C.

在所选的9个基因中，3个 *HSP* 的表达水平在热应激下显著增加，对其他生物的研究表明了同样的结果（图2.6 A-C）。特别是 *PpCRYAB-4*，与对照组相比，其表达量增加了10～20倍。这表明，*PpCRYAB* 可能在响应热应激的过程中起作用。

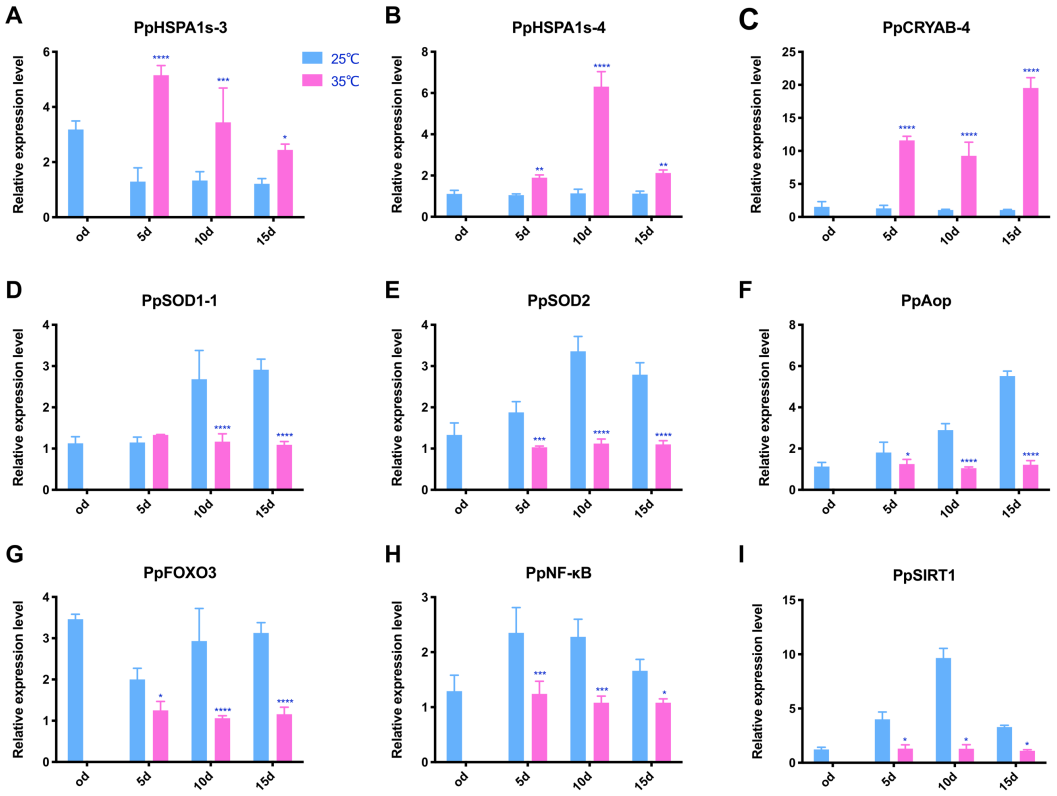

图 2.6 25℃和 35℃下所选基因的表达模式

Figure 2.6 Expression patterns of selected genes under 25℃ and 35℃ conditions.

注：数值以三个重复的平均值±标准误差表示，*表示 $p<0.05$，**表示 $p<0.01$，***表示 $p<0.001$ 以及 ****表示 $p<0.0001$。Values represent the mean ±SEM of three assays. *means $p<0.05$ when compared to its corresponding control. **means $p<0.01$, ***means $p<0.001$ and ****means $p<0.0001$.

然而，*PpSOD1-1*、*PpSOD2*、*PpFOXO*、*PpAop*、*PpNF-κB* 和 *PpSIRT1* 的表达量在 35℃时明显低于 25℃。由图 2.6 D-H 中 y 轴的刻度可知，与图 2.6 C 相比，5 个基因的表达差异相对较小。*PpSIRT1* 的表达量在 35℃时显著降低（图 2.6 I），该基因在第 10 天的表达水平几乎只有对照组的 10%。据报道，*SIRT1* 通过 *FOXO* 等转录因子介导 IIS (Giannakou and Partridge, 2004)。由于 *PpFOXO* 和 *PpSIRT1* 在热应激条件下的表达模式相似，可能说明 *PpFOXO* 和 *PpSIRT1* 在热应激反应中起着一定的作用，它们以某种方式相互作用。

3 小结

在本章中，根据最近测序组装的基因组和转录组数据，以及果蝇等生物中已鉴定出的寿命调控相关的基因，通过序列同源性比对，从蝶蛹金小蜂中预测出了229 个寿命相关基因。预测了这些基因的保守结构域并分析了它们的表达模式。氨基酸序列排列和结构域分析表明，大多数基因在至少在膜翅目、鳞翅目、半翅目、双翅目和鞘翅目的部分昆虫中是保守的。这些基因在 IIS-PI3K/Akt 途径、TOR 途径、MAPK/ERK 途径和 AMPK 途径等四个信号通路和自噬、应激反应和代谢等三个生理过程中发挥作用。表达谱的数据显示，参与应激反应的基因在两种性别和不同阶段的表达量均高于其他寿命调控通路上的基因。随后，初步探索了热应激反应中寿命相关基因的变化情况，结果表明 3 个热激蛋白基因的表达量明显升高，参与氧化应激过程的 *PpSOD1-1*、*PpSOD2* 和 *PpSIRT1*，以及寿命调控通路中的关键转录因子 *PpFOXO*、*PpAop* 和 *PpNF-κB* 的表达量显著降低。这些基因的注释，为下一步寿命相关基因在各自路径中的功能研究，以及寿命影响因子及其调控机理研究奠定了很好的数据信息基础。

第三章 成虫营养对蝶蛹金小蜂寿命及其相关基因的影响

大多数寄生蜂的成虫取食糖类作为能量来源 (Jervis *et al.*, 1993)，并对不同的糖源表现出不同的寿命和繁殖力。糖类对寄生蜂成虫寿命和繁殖力的影响已被实验证实 (Heimpel *et al.*, 1997)。因此，适宜的糖源配置对延长寄生蜂寿命或提高寄生蜂繁殖力至关重要，对调节田间寄生蜂种群动态并发挥更好的控害效果有着重要意义。

寄生蜂成虫的营养来源主要包括三种形式：取食寄主、花蜜等植物营养和昆虫排泄的蜜露 (Harvey *et al.*, 2012)。许多花蜜和蜜露的主要成分包括蔗糖及其己糖成分，即葡萄糖和果糖 (Rodríguez-Riaño *et al.*, 2014; Stahl *et al.*, 2012)。在实验室中，蔗糖常被用于寄生蜂的饲养。同时蜂蜜也是实验室寄生蜂群体的另一种常见的液体食物。蜂蜜是一种复合营养成分的混合物，它含有超过 181 种物质，包括 95%（w/w）的糖，大约 0.5%（w/w）的蛋白质，矿物质，游离氨基酸，酶和维生素 (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010)。不同的营养物质对寄生蜂的影响是不同的，既有正面的，也有负面的 (Wäckers, 2001)。菜粉蝶盘绒茧蜂 *Cotesia glomerata* 的实验表明，14 种天然糖类大多数能延长其寿命，少数有其他效果。具体来说，用蔗糖、葡萄糖和果糖溶液饲养的寄生蜂与仅用水饲养的对照组相比，寿命增加了 15 倍。然而，乳糖和棉子糖并没有增加寄生蜂的寿命，而鼠李糖实际上降低了寄生蜂的存活率 (Wäckers, 2001)。有研究表明，糖类对寄生蜂寿命的有益作用与其浓度有关，不同浓度的糖源对寄生蜂的寿命和繁殖力有不同程度的影响。饲喂不同种类和浓度的糖溶液会影响螟蛉盘绒茧蜂 *Cotesia ruficrus* 的寿命。与不喂水的空白对照组相比，饲喂蜂蜜、蔗糖、葡糖糖、果糖溶液和清水的雌蜂寿命均有延长，且其寿命的延长依次递减。当分别喂食 15%、10%、20%和 5%的蜂蜜溶液时，雌蜂的寿命延长时间依次增加 (李小敏等, 2018)。同样，蜂蜜、葡萄糖和蔗糖也能显著延长细点扁股小蜂 *Elasmus punctulatus* 的寿命 (周亚奎等, 2013)，且 20%的蜂蜜溶液效果最好。用蔗糖、葡萄糖和果糖等量混合的混合糖溶液在 0-70% (w/v)的系列浓度下饲喂斑痣悬茧蜂 *Meteorus pulchricornis*，寄生蜂的寿命并没有随着糖浓度的增加而改变，但在没有寄主的情况下，30%混合糖溶液喂养的寄生蜂寿命更长 (Wu *et al.*, 2008)。由此可见，取食糖类可以影响昆虫的寿命。

由第一章文献综述可知，取食影响生物寿命的分子机制包括两个保守的营养感受通路，IIS 和 TOR。通过对胰岛素受体或其他相关基因进行遗传学操作抑制 IIS 途径，可以延长小鼠和黑腹果蝇的寿命 (Kenyon, 2010)。下调 TOR 途径也可以使实验室动物的寿命延长 (Antikainen *et al.*, 2017)。磷酸酶和腱鞘蛋白同源物（*PTEN*）拮抗 *AKT* 基因，因而可能是 IIS 途径的一个负向调控因子 (Goberdhan *et al.*, 1999)。*FOXO* 是一种受 *AKT* 调控的转录因子，参与应激反应、衰老、细胞生长和增殖等多种细胞过程，并在多种信号途径中发挥关键作用 (Nowak *et al.*, 2018)。*TSC1* 和 *TSC2* 通过抑制 TOR 激酶的上游激活剂 *Rheb* 来拮抗 TOR 通路 (Long *et al.*, 2005)，同时，他们还可以作为 IIS 途径的负向调节器 (Gao and Pan, 2001)。此外，其他细胞过程的基因如超氧化物歧化酶（*SOD*）、过氧化氢酶（*CAT*）、热休克蛋白（*HSPs*）、组蛋白去乙酰化酶（*HDAC1*，与果蝇 *Rpd3* 同源）和腺苷环化酶（*ADCY*）也参与了生物寿命的调控 (Beere *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2004; Rogina *et al.*, 2002)。

虽然已经有一些营养物质对寄生蜂生理发育如寿命和产卵量的考查研究，但相关的机理揭示很少。本研究测试了蜂蜜和蔗糖这两种常用糖源对蝶蛹金小蜂雌性成虫生存的影响，并讨论了最有利寄生蜂长寿的糖源浓度。随后，在蝶蛹金小蜂高质量的染色体水平基因组组装 (Ye *et al.*, 2020)和基因注释的基础上 (Xiong *et al.*, 2020)，分析了参与营养感受途径的部分寿命相关基因的表达模式及其变化水平与寄生蜂寿命的相关性。这些发现揭示了寄生蜂寿命调控相关基因的作用，为研究寄生蜂的寿命调控和衰老机制提供了一个新的工具。同时，也为提高人工繁殖寄生蜂的群体寿命提供了数据支持，以更有效发挥其生产应用潜力。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

蝶蛹金小蜂的饲养见第二章 1.1。

1.2 寿命实验

蝶蛹金小蜂雌蜂羽化后立即收集到果蝇管中，采用改良的毛细管喂食法（CAFE） (Ja *et al.*, 2007)，通过插在海绵塞上的玻璃电极（1B100F-3; WPI, Sarasota, Florida）递送食物。随机将 10 头雌蜂分成一组，放入果蝇管中。每个果蝇管有三根玻璃电极。

设置了 6 种浓度梯度的蔗糖溶液和 4 种浓度梯度的蜂蜜溶液饲喂蝶蛹金小蜂雌成虫，并考察死亡率直至所有试虫死亡。蔗糖溶液的浓度从 1.25%到 40% (w/v)。将 40 g 蔗糖溶于 100 ml 去离子水中制成 40%的蔗糖溶液，然后用去离子水 1 : 2 稀释，依次制备 20%、10 %、5%、2.5%和 1.25%的蔗糖溶液。用同样的梯度稀释法，分别制备 5%、10%、20%和 40% (w/v)的 4 种不同浓度的蜂蜜溶液。2 种糖溶液均以去离子水作为空白对照。每 24 h 记录一次寄生蜂的存活率和食物摄取量，同时添加新鲜的液体食物。

1.3 寿命相关基因的 RT-qPCR 分析

在进行寿命实验的同时对寄生蜂进行采样，并检测基因表达水平的变化。所有用于 qPCR 的样品都来自同一批用于寿命实验的寄生蜂。设置 5 个采样点，分别为羽化后 12 h 内（定义为 0 d）、2 d、6 d、12 d 和 18 d。每个采样点采集 5 个样本，每个样本包含 5 头雌蜂。选择用 2.5%、10%和 40%蔗糖溶液以及 5%和 10%蜂蜜溶液喂养的寄生蜂进行基因表达研究，用 qPCR 检测 15 个基因的表达水平变化。所选寿命相关基因见表 3.1。样品总 RNA 的提取、cDNA 的反转录合成和具体的 qPCR 流程同第二章 1.4。本章所用的引物序列见表 3.2。

表 3.1 选定的与寿命相关的基因列表

Table 3.1 List of the selected lifespan-related genes which were tested with qPCR

基因名称	KEGG 通路注释	对应图 3.4 中的元素	对寿命的影响
PpHSP110	Longevity regulating pathway	HSP	Pro
PpHDAC1	Longevity regulating pathway	Rpd3	Anti
PpFOXO	IIS pathway; Longevity regulating pathway	FOXO	Pro
PpADCY3	Longevity regulating pathway	ADCY	Anti
PpCYR1	Longevity regulating pathway	ADCY	Anti
PpPTEN	IIS pathway; Longevity regulating pathway	PTEN	Pro
PpAKT	IIS pathway; Longevity regulating pathway	Akt	Anti
PpTSC1	mTOR pathway; Longevity regulating pathway	TSC1	Pro
PpTSC2-1	mTOR pathway; Longevity regulating pathway	TSC2	Pro
PpTSC2-2	mTOR pathway; Longevity regulating pathway	TSC2	Pro
PpTSC2-3	mTOR pathway; Longevity regulating pathway	TSC2	Pro
PpSOD1-1	Longevity regulating pathway	SOD	Pro

PpSOD1-2	Longevity regulating pathway	SOD	Pro
PpSOD1-3	Longevity regulating pathway	SOD	Pro
PpSOD2	Longevity regulating pathway	SOD	Pro

注：每个基因参与的途径信息来自 KEGG。每个基因的推定长寿影响来自人类衰老基因组资源（HAGR）。Information about the pathways in which each gene is involved comes from KEGG (https://www.kegg.jp/kegg/). Putative longevity influence of each gene comes from the Human Ageing Genomic Resources (HAGR) (Tacutu *et al.*, 2018).

表 3.2 本章所用引物

Table 3.2 Primers used in this chapter

引物名称	核苷酸序列 (5'-3')
PpHSP110_F	CGCTCTACAGTTGGCCAAGA
PpHSP110_R	GGAGTCTGGTTCAGCTGGAC
PpHDAC1_F	AGCTATTCCAGAAGACGGCG
PpHDAC1_R	CCTTCTGCCACCTTCACCTT
PpFOXO_F	CCGATCTCATCACTCAGGCC
PpFOXO_R	AGTTCTTCCATCCGGCACTG
PpADCY3_F	GTGGCAGTTCGACGTCTACA
PpADCY3_R	ACTTCGAACTCACCGCTCAG
PpCYR1_F	CCTACATGGCAGCTTGTGGA
PpCYR1_R	ACATCATCTCGGCTGCGAAT
PpPTEN _F	GACCCACCAGCAACCGATTA
PpPTEN_R	CCTGCTGTGGTCTAAGAGCC
PpAKT_F	GAGGGCTGGCTTTTCAAACG
PpAKT_R	GCTGCCATTTGTTGATCGGG
PpTSC1_F	ATGACGTCGTTGCAGAGTGT
PpTSC1_R	CGGTGTGAAGCGCATATTGG
PpTSC2-1_F	GTTCCACGAGAGCACAGACA
PpTSC2-1_R	GCCTCAGCCCAATGTCTTCT
PpTSC2-2_F	ACCAGCCAGCTACTAAACCAG
PpTSC2-2_R	GCCTCCTGCGCCATAAAATT
PpTSC2-3_F	CCGACATGCTGCCTCAAAAG
PpTSC2-3_R	GAATGTCGATGGGTCCGGAA
PpSOD1-1_F	GTAACGTTGAGGCTGGCTCT
PpSOD1-1_R	TTGGAGAGTTCATGGCCACC
PpSOD1-2_F	AGAAGCTTGCCGGGTTATCC
PpSOD1-2_R	GCTTTCAGTTCCACCATCGC
PpSOD1-3_F	CCGGAAGTGTTAGCGGTCTT
PpSOD1-3_R	GCCGTGCTTCACCTTTTCAG
PpSOD2_F	CAACCACAGGCCTGATTCCT
PpSOD2_R	TGAAACGAGCGCTGACATCT

每个基因至少设计了 2 对特异引物用于特异地检测寿命相关基因的表达量变化。使用 ChamQ^{TM} SYBR qPCRMaster Mix（Without ROX）（Vazyme Biotech Co., Ltd）试剂进行 qPCR 反应。以 10 ng cDNA 为模板，25 μl 反应体系进行 qPCR。每个样品设置三个独立的生物重复进行分析。首先，验证了每对引物的特异性。在每个 qPCR 反应后面包括一条 60–95 °C 的解离曲线。为了确定引物的效率，以 cDNA 的 10 到 100,000 稀释的梯度稀释液作为模板进行 qPCR，并计算其效率值。根据特异性和效率验证的结果，选择合适的引物进行基因表达谱的测定。将不同年龄组 mRNA 的表达水平与其 2 d 的对照组进行比较，各浓度下的 2 d 对照组与 0 d 的对照组进行比较。以 18sr RNA 作为内参基因。然后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对 mRNA 表达水平 (Livak and Schmittgen, 2001)。数据使用 GraphPad Prism6 for Mac（https://www.graphpad.com）进行绘图。

1.4 统计分析及模型构建

用 7 种浓度的蔗糖溶液（0%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10%, 20% 和 40%）和 5 种浓度的蜂蜜溶液（0%, 5%, 10%, 20% 和 40%）饲喂寄生蜂的寿命数据，采用分位数-分位数（Q-Q）图进行正态性检验，采用 Levene's 检验进行方差的同质性检验。数据分析过程使用的软件为 IBM SPSS Statistics for Mac（Version 25.0; https://www.ibm.com/products/spss-statistics）。不同浓度的糖溶液对寄生蜂寿命的影响通过各组寄生蜂的平均寿命差异来评价，采用单因素方差分析（ANOVA）和 Dunnett's 多重比较进行检验。生存分析采用 Log-rank（Mantel-Cox）检验。寄生蜂寿命实验的生存曲线和柱状图使用软件 GraphPad Prism 6 for mac 绘制。糖浓度和寄生蜂寿命的关系通过线性回归分析确定。所有 qPCR 数据均采用数据处理系统（DPS）进行分析 (Tang and Zhang, 2013)。寿命相关基因的表达水平数据采用双因素方差分析和 Tukey's 多重比较检验进行分析，以 $p<0.05$ 为差异显著。采用线性回归分析研究基因的相对表达水平与寄生蜂寿命的关系。随后，使用 IBM SPSS Statistics for Mac 采用逐步回归法以表达量发生显著变化的基因为因变量构建寿命预测模型。

2 结果与分析

2.1 蔗糖对蝶蛹金小蜂寿命的影响

蔗糖溶液的浓度对蝶蛹金小蜂雌蜂的寿命有非常显著的影响(图 3.1，表 3.3)。与水喂养对照组的寿命相比，在所有的糖浓度下寄生蜂的寿命都增加了（图 3.1A）。其中≥2.5%的蔗糖浓度下，蜂的寿命显著延长了 3 倍以上（>平均 3.4 d，p<0.05（图 3.1B））。直方图（图 3.1B）显示出一个明显的趋势，即随着蔗糖浓度的增加，寄生蜂的寿命变长。对平均寿命、中位寿命和最大寿命的统计也显示了同样的趋势（表 3.3）。然而，在蔗糖浓度提高到 20%以后，≥20%的糖浓度之间没有发现显著差异。饲喂 40%蔗糖的寄生蜂平均寿命最长，为 27.9 d，最大寿命可以达到 50 d。

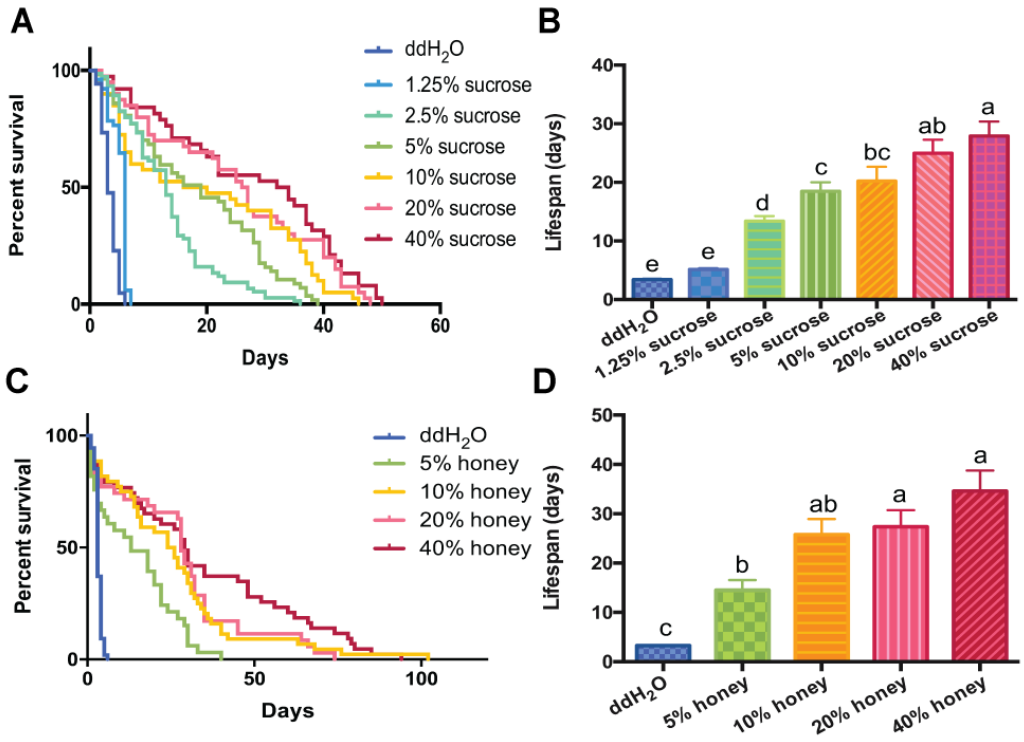

图 3.1 用不同浓度的蜂蜜和蔗糖溶液喂养的蝶蛹金小蜂的寿命

Figure 3.1 Lifespans of *P. puparum* fed with various concentrations of honey and sucrose solution.

注：(A) 6 种不同浓度的蔗糖和纯水对照的生存率曲线图。(B)蝶蛹金小蜂的平均寿命，数据以平均值±标准误(n=30)表示，不同的字母以上列表示存活率的差异。(C) 4 种不同浓度的蜂蜜和纯水对照组的寄生蜂寿命。(D) 数据以平均值±标准误表示，柱子上面不同的字母表示存活率的差异。相同的字母表示没有显著差异的数值。(A) Lifespans of *P. puparum* fed on six different sucrose concentrations and water-only control. (B) Data are represented as mean ± standard error (SE), different letters above column indicate differences in survival. (C) Lifespans of *P. puparum* fed on four different honey concentrations and water-only control. (D) Data are represented as mean ±standard error (SE), and different letters above bars indicate differences in survival. The same letters are marked for values that were not significantly different.

表 3.3 两种不同浓度糖类营养对蝶蛹金小蜂雌性成虫寿命的影响

Table 3.3 Effects of two carbohydrate nutrients with different concentrations on the lifespan of *P. puparum* female adults

糖源	浓度 (%)	平均寿命 (±SEM, 天)	LT50	寿命延长 (%)	中位寿命 (天)	最大寿命 (天)
纯水对照	0	3.4±0.1e	3.0	base	3	6
蔗糖溶液	1.25	5.1±0.2e	4.7	49.8	6	7
	2.5	13.4±0.9d	13.2	290.1	13	36
	5	18.5±1.5c	17.0	439.3	19	39
	10	20.2±2.4bc	19.1	489.9	18	46
	20	25.0±2.3ab	23.2	628.4	26.5	48
	40	27.9±2.5a	28.1	714.4	33	50
纯水对照	0	3.3±0.1c	2.9	base	3	6
蜂蜜溶液	5	14.5±2.1b	12.9	342.8	13	40
	10	25.8±3.2ab	24.9	686.3	25	102
	20	27.4±3.4a	24.9	735.1	28	74
	40	34.6±4.1a	32.5	955.7	29	94

注：在每个糖源在每个浓度下（列），相同字母后面的处理均值没有显著差异（Tukey's，p<0.05）。平均寿命是各组的平均寿命。LT50 是指 50%的测试蜂死亡的时间。中位寿命是曲线与 50%存活率相交的年龄。最大寿命是指该组中寿命最长的寄生蜂的寿命。寿命延长（%）=（处理平均寿命-对照平均寿命）/对照平均寿命*100。对营养组进行了单因素方差分析。不同字母表示存活率的差异。

In each sugar source at each concentration (columns), treatment means followed by the same letter are not significantly different (Tukey's, p<0.05). Mean lifespan is the average lifespan of each group. LT50 is the time at which 50% of the tested wasps died. Median lifespan is the age at which the curves intersect with 50% survivorship. Maximum lifespan is the lifespan of the wasp that lived the longest in the group. Lifespan extension (%) = (treatment mean lifespan - water mean lifespan)/ water mean lifespan *100. One-way ANOVA was carried out for nutrition groups. Different letters indicate differences in survival.

为了解释寄生蜂存活率与蔗糖浓度的相关关系，进行了相关和回归分析。自变量x代表蔗糖的浓度，因变量y为寄生蜂的平均寿命。根据实验结果推测浓度与寿命的关系是非线性的，计算过程中将y换算成x/y（图 3.2）。方程（$y = x/(0.1125 + 0.0335x)$, F=296.167; R^2=0.98; p<0.0001; 0≤ x≤40%）显示了高浓度蔗糖和寿命延长之间有很强的正相关性，另外，这个方程可以预测寿命增长速度在浓度 40%以后会放缓并达到一个阈值。这可能表明，如果继续增加蔗糖溶液的浓度，随之而来的寿命的增加会在一定程度上停止。结果表明，随着蔗糖浓度的增加，蝶蛹金小蜂雌蜂的中位数和最大寿命逐渐延长。统计结果表明，对蝶蛹金小蜂雌蜂寿命最有利的蔗糖溶液浓度为 20%左右。当用 2.5%、10%和 40%的蔗糖溶液喂养寄生蜂时，两两之间均存在显著差异。

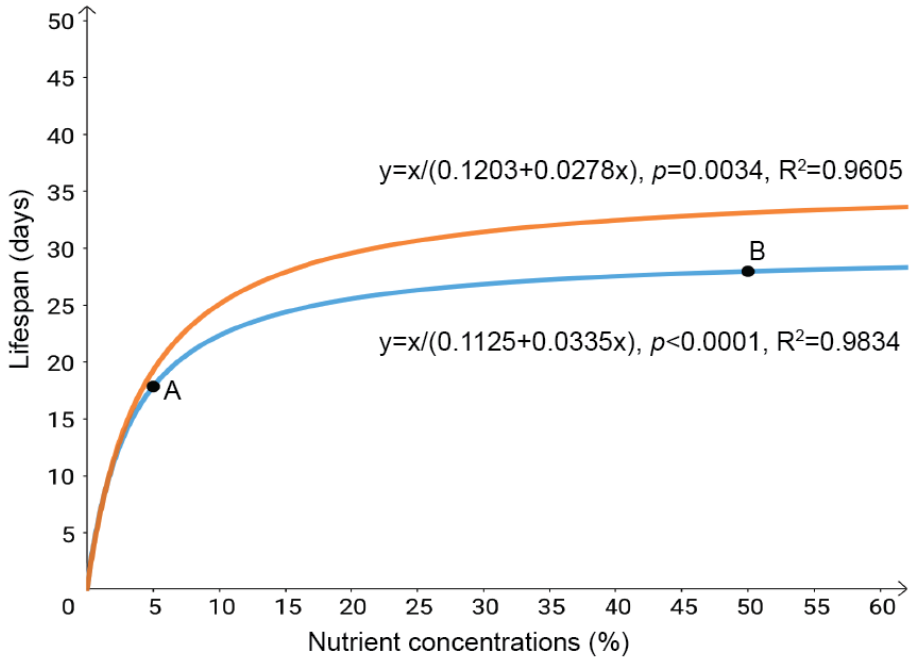

图 3.2 用不同浓度的蜂蜜和蔗糖溶液喂养蝶蛹金小蜂的寿命模型预测

Figure 3.2 Model predictions of *P. puparum* lifespan fed with honey and sucrose solution at different concentrations.

注：x 轴代表蔗糖或蜂蜜的浓度。y 轴代表蝶蛹金小蜂雌性成虫的平均寿命。上部橙色曲线表示蝶蛹金小蜂寿命与蜂蜜浓度之间的回归模型分析，下部蓝色曲线表示蝶蛹金小蜂寿命与蔗糖浓度之间的回归模型分析。A 表示当蔗糖浓度为 5%时，蝶蛹金小蜂的预测寿命；B 表示当蔗糖浓度为 50%时，蝶蛹金小蜂的预测寿命。

The x-axis represented concentrations of sucrose or honey. The y-axis represented mean lifespan of *P. puparum* female adults. The upper orange curve shows the regression model analysis between lifespan of *P. puparum* and honey concentrations, and the lower blue curve shows the regression model analysis between lifespan of *P. puparum* and sucrose concentrations. A represents the predicted lifespan of *P. puparum* when sucrose concentration is 5%, and B represents the predicted lifespan of *P. puparum* when sucrose concentration is 50%.

2.2 蜂蜜对蝶蛹金小蜂寿命的影响

饲喂蜂蜜溶液能显著延长蝶蛹金小蜂雌蜂的寿命（图 3.1，表 3.3）。与水喂养对照组的寿命相比，在所有的糖浓度下寄生蜂的寿命都增加了 4 倍以上（>平均 3.3d，p<0.05（图 3.1D））。在 0 到 10%的蜂蜜浓度区间里，随着蜂蜜浓度的增加，寄生蜂的寿命变长，而≥20%的蜂蜜浓度之间，寄生蜂寿命没有显著差异（表 3.3）。生存曲线显示，10%和 20%蜂蜜浓度的曲线在前期几乎重合，但 10%蜂蜜浓度的蜂最大寿命更长，达到了 102 天（图 3.1C）。与之前类似地，建立了一个回归方程（$y = x/(0.1203 + 0.0278x)$, F=72.996, R^2=0.96, p<0.01; 0≤ x≤40%）来解释蜂蜜浓度（x）与寄生蜂的平均寿命（y，转换为x/y）。该方程与蔗糖组回归方程的趋势相同（图 3.2）。综上所述，用蜂蜜溶液喂养蝶蛹金小蜂雌蜂，

大大延长了它们的寿命。蜂蜜溶液的最佳浓度应为 10%。虽然随着浓度的增加，平均寿命继续增长，但≥10%的蜂蜜处理之间没有明显差异。

蜂蜜处理的水对照组的寄生蜂平均寿命 3.3 d，与蔗糖处理的水对照组的寄生蜂平均寿命（平均 3.4 d）十分接近，说明批次效应很小可以忽略不计。使得比较两种不同营养物质的实验结果成为可能。首先考虑平均寿命，在最佳浓度下平均寿命非常接近，蔗糖喂养的蜂为 25.0 d，蜂蜜喂养的蜂为 25.8 d。其次，在最大寿命方面，饲喂蔗糖可达到的寿命上限约为 50 d，而饲喂蜂蜜的寿命约为其两倍。再次，两种营养物质的最佳浓度不同，蔗糖为 20%，而蜂蜜在 10%表现最佳，因此要想获得同样的延寿效应，需要的蜂蜜量更少。此外，如果将 20%蔗糖和 10%蜂蜜的存活曲线进行拟合，可以发现它们在前 43 d 几乎是重合的，43 d 之后开始分裂（图 3.3）。最后，将两种糖源的回归方程曲线进行对比可以发现，虽然两个处理的方程有相似的趋势，但因变量的上限是不同的。这说明喂养蜂蜜能较大限度地延长寄生蜂的寿命。

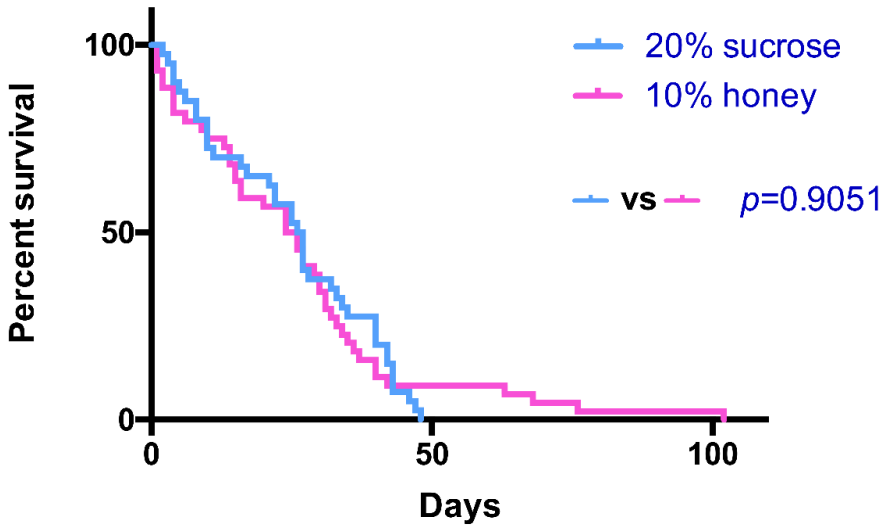

图 3.3 饲喂 20%蔗糖和 10%蜂蜜的蝶蛹金小蜂寿命

Figure 3.3 Lifespans of *P. puparum* fed on 20% sucrose and 10% honey.

注释：对数秩检验表明无显著差异（p=0.9051）。Log-rank test indicates no significant difference (p=0.9051).

2.3 蔗糖浓度对寿命相关基因的影响

进化保守的 IIS 和 TOR 途径的示意图见图 3.4，选择的寿命相关基因用橙色框标记。这些基因在第二章中注释为寿命相关基因（表 3.1）(Xiong *et al.*, 2020)。以刚刚羽化的寄生蜂的基因相对表达量作为对照，即第 0 d 相对表达量为 1，计算了第 2 d、第 6 d、第 12 d 和第 18 d 基因的相对表达量（图 3.5）。

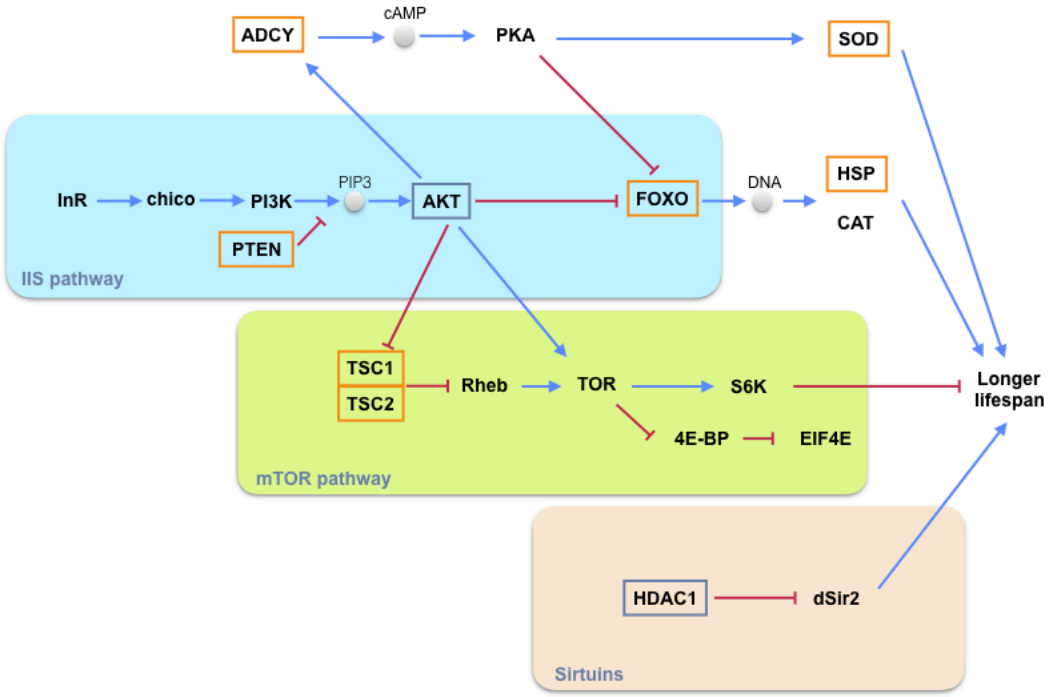

图 3.4 进化上保守的模式生物的 IIS 和 TOR 通路示意图

Figure 3.4 Evolutionary conservation of IIS and TOR pathways on model organisms.

注：每个基因在通路上的关系根据 KEGG（https://www.kegg.jp/kegg/）用箭头或线段表示，橙色框表示该基因是选择的基因。The relationship of each gene in the pathway refers to KEGG (https://www.kegg.jp/kegg/). The orange box indicates that the gene is the selected gene.

所选寿命相关基因的相对表达水平在不同生命阶段的不同蔗糖浓度间有显著差异（图 3.5），其中 7 个基因在 4 个时期都大致呈现出蔗糖浓度越高基因表达量越高的规律，它们是 *PpPTEN*, *PpFOXO*, *PpTSC2-1*, *PpTSC2-3*, *PpSOD1-1*, *PpSOD1-2* and *PpSOD1-3*（图 3a-g）。这些基因的表达量在>2.5%的浓度下与 2.5%的蔗糖浓度组相比表现出了极为显著的差异，如 *PpFOXO* 在高浓度蔗糖处理（10%, 40%）中的相对表达量比 2.5%蔗糖组增加了 30 倍以上（图 3.5C）。5 个基因在某些时期蔗糖浓度越高表达量越高，在其他时期表达量无差异，它们是 *PpSOD2*, *PpAKT*, *PpHSP110*, *PpTSC1* and *PpTSC2-2*（图 3.5 H-I）。选择了 2 个

ADCY 基因 *PpADCY3* 和 *PpCYR1* 进行分析。*PpADCY3* 在 6 d、12 d、18 d 三个时期显著地呈现出蔗糖浓度越高，基因表达量越低的结果（图 3.5 M）。*PpHDAC1* 和 *PpCYR1* 的表达量变化似乎没有明显的规律（图 3.5 N, O）。

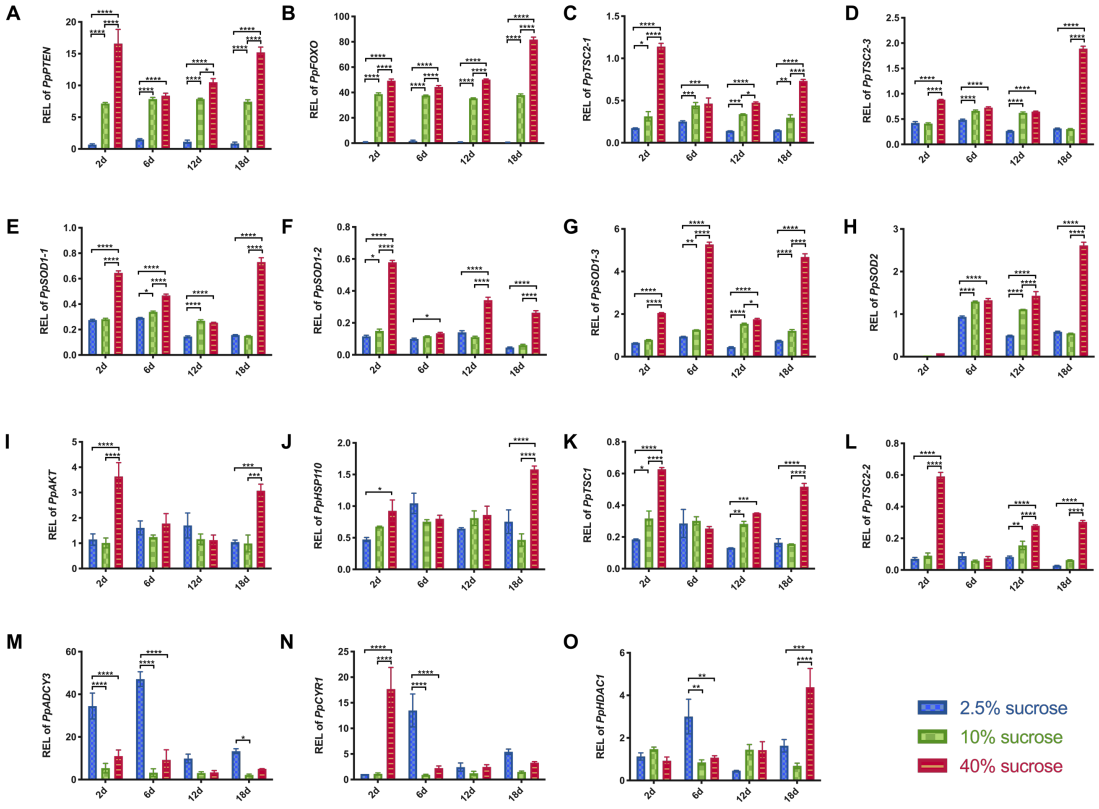

图 3.5 蔗糖对所选寿命相关基因相对表达水平的影响

Figure 3.5 Effects of sucrose on the relative expression levels of selected lifespan-related genes.

注释：蔗糖对选定的寿命相关基因的相对表达水平的影响。x 轴代表四个采样时间点。y 轴代表选定的寿命相关基因的相对表达水平（REL）。0 d 时采样的寄生蜂的相对基因表达量计算为 1.在每个时间点内进行 Tukey 的多重比较检验。数据以平均值±标准误差表示。与其相应对照相比，*表示 p<0.05。**表示 p<0.01，***表示 p<0.001 和****表示 p<0.0001。本图显示了 4 个时期所选寿命相关基因在处理间的相对表达水平。The x-axis represented four sampling time points. The y-axis represented the relative expression levels (REL) of selected lifespan-related genes. The relative gene expression of parasitic wasps sampled at 0 days was calculated as 1. Tukey's multiple comparisons test was performed within each time point. Data are represented as mean ± standard error. *means p<0.05 when compared to its corresponding control. **means p<0.01, ***means p<0.001 and ****means p<0.0001. This Figure shows the relative expression levels of selected lifespan-related genes among treatments in four periods. A: *PpPTEN*; B: *PpFOXO*; C: *PpTSC2-1*; D: *PpTSC2-3*; E: *PpSOD1-1*; F: *PpSOD1-2*; G: *PpSOD1-3*; H: *PpSOD2*; I: *PpAKT*; J: *PpHSP110*; K: *PpTSC1*; L: *PpTSC2-2*; M: *PpADCY3*; N: *PpCYR1*; O: *PpHDAC1*.

接着，进行相关分析和回归分析，探讨不同处理中寿命相关基因的表达水平与寄生蜂平均寿命之间的关系（表 3.4）。对喂食不同蔗糖浓度下的寄生蜂平均寿命和所测生命阶段对基因表达水平的影响进行了双因素方差分析，结果发现 14 个基因的相对表达水平与寄生蜂平均寿命显著相关。其中 9 个基因的相对表达水平与寄生蜂平均寿命的关系呈线性关系，包括 *PpFOXO*, *PpPTEN*, *PpTSC1, PpTSC2-1, PpTSC2-2, PpTSC2-3*, *PpSOD1-1*, *PpSOD1-2*, *PpSOD1-3*。随后，用 14 个寄生蜂寿命显著相关基因的表达水平通过逐步回归法建立寿命预测模型（表 3.5）。所有纳入模型的变量均满足 p<0.05 的标准，未满足该标准的变量不引入方程。三个基因 *PpPTEN*, *PpSOD1-1* 和 *PpSOD1-3* 被纳入寿命预测模型 Model 1（$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 * PpPTEN + \beta_2 * PpSOD1-3 + \beta_3 * PpSOD1-1$）中。模型 Model 1 的解释方差为 93.1%，计算了各变量的标准化β值，以确定各基因的个体贡献（表 3.5）。

表 3.4 蔗糖饲喂蝶蛹金小蜂的相对基因表达水平和寿命的相关性分析

Table 3.4 Correlation analysis of relative gene expression levels and lifespan of *P. puparum* fed with sucrose

基因名称	一元线性回归方程	*p* 值	决定系数 R^2	残差
PpPTEN	$y = 12.9618 + 1.0632x$	0.0000	0.8470	2.5458
PpFOXO	$y = 13.5005 + 0.2217x$	0.0000	0.8382	2.6186
PpTSC2-1	$y = 13.4610 + 17.1970x$	0.0022	0.6237	3.9933
PpTSC2-3	$y = 14.6294 + 9.2509x$	0.0211	0.4273	4.9262
PpSOD1-1	$y = 12.7828 + 23.1513x$	0.0106	0.4953	4.6245
PpSOD1-2	$y = 15.5983 + 27.3066x$	0.0191	0.4378	4.8808
PpSOD1-3	$y = 15.2192 + 2.9743x$	0.0046	0.5681	4.2780
PpTSC1	$y = 11.6018 + 29.9377x$	0.0091	0.5095	4.5589
PpTSC2-2	$y = 16.6052 + 24.9219x$	0.0214	0.4260	4.9318

注：x 轴代表所选基因的相对表达水平，y 轴代表蝶蛹金小蜂雌成虫的平均寿命。The x-axis represented relative expression levels of selected genes. The y-axis represented mean lifespan of *P. puparum* female adults.

表 3.5 通过逐步回归法构建的蔗糖处理的寿命预测模型
Table 3.5 Lifespan prediction modeling of the sucrose treatments constructed through step-wise method

	模型 1				
	系数	标准差	*p* 值	决定系数 R^2	校正后 R^2
Constant (β_0)	13.748	0.997	0	0.950	0.931
PpPTEN (β_1)	1.091	0.149	0		
PpSOD1-3 (β_2)	1.870	0.464	0.004		
PpSOD1-1 (β_3)	-12.904	5.028	0.033		

注：预测寿命方程为$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 * PpPTEN + \beta_2 * PpSOD1-3 + \beta_3 * PpSOD1-1$。
Predicted wasp lifespan $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 * PpPTEN + \beta_2 * PpSOD1-3 + \beta_3 * PpSOD1-1$.

2.4 蜂蜜浓度对寿命相关基因的影响

蜂蜜饲喂寄生蜂的基因相对表达量的变化不明显（图 3.6）。由于>10%蜂蜜喂养的寄生蜂的平均寿命没有差异，主要关注 5%浓度蜂蜜和 10%浓度处理之间的差异。5 个基因大致表现出了高浓度蜂蜜处理组中基因相对表达量更高的规律，并在某些时间点表现出显著差异（p<0.05）。这些基因包括 *PpTSC2-1*, *PpTSC2-3*, *PpAKT* 和 *PpTSC1* （图 3.6 C, D, I, K）。三个基因 *PpTSC2-2*, *PpADCY3* 和 *PpHDAC1* 的表达量在 5%浓度比 10%浓度更高。特别是 *PpADCY3* 在四个时间点都表现出了浓度处理间显著的差异。相关性和回归分析进一步证明了这一点（表 3.6）。双因素方差分析的结果显示 6 个基因的表达水平与寄生蜂寿命显著相关，它们是 *PpTSC2-2*, *PpHDAC1*, *PpSOD1-2*, *PpTSC1*, *PpTSC2-3* 和 *PpADCY3*。其中 2 个基因，*PpTSC2-2* 和 *PpHDAC1* 的表达量与寄生蜂的平均寿命存在线性关系。

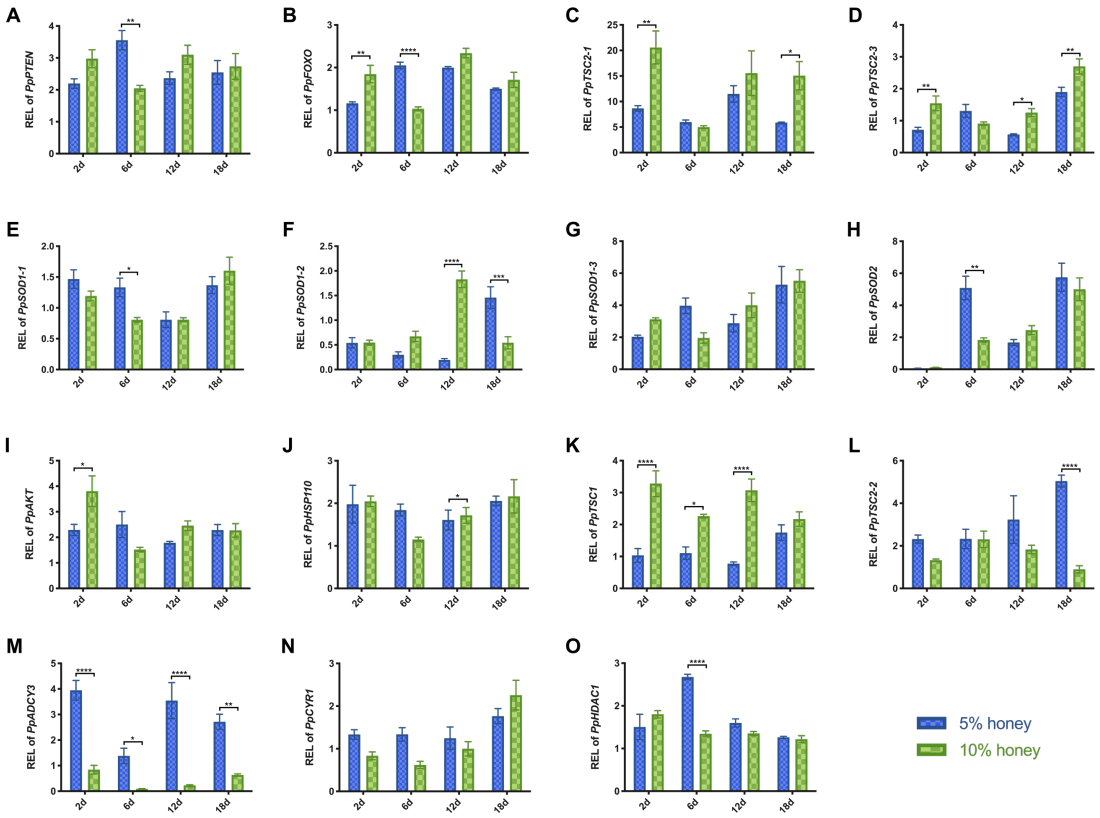

图 3.6 蜂蜜对所选寿命相关基因相对表达水平的影响

Figure 3.6 Effects of honey on the relative expression levels of selected lifespan-related genes.

注：x 轴代表 4 个采样时间点，y 轴代表选定的寿命相关基因的相对表达水平（REL）。y 轴代表所选寿命相关基因的相对表达水平（REL）。0 d 时采样的寄生蜂的相对基因表达量计算为 1.在每个时间点内进行 Tukey 的多重比较检验。数据以平均值±标准误差表示。与其相应对照相比，*表示 p<0.05。**表示 p<0.01，***表示 p<0.001 以及****表示 p<0.0001。本图显示了四个时期所选寿命相关基因在处理之间的相对表达水平。The x-axis represented four sampling time points. The y-axis represented the relative expression levels (REL) of selected lifespan-related genes. The relative gene expression of parasitic wasps sampled at 0 days was calculated as 1. Tukey's multiple comparisons test was performed within each time point. Data are represented as mean ± standard error. *means p<0.05 when compared to its corresponding control. **means p<0.01, ***means p<0.001 and ****means p<0.0001. This Figure shows the relative expression levels of selected lifespan-related genes between treatments in four periods. A: *PpPTEN*; B: *PpFOXO*; C: *PpTSC2-1*; D: *PpTSC2-3*; E: *PpSOD1-1*; F: *PpSOD1-2*; G: *PpSOD1-3*; H: *PpSOD2*; I: *PpAKT*; J: *PpHSP110*; K: *PpTSC1*; L: *PpTSC2-2*; M: *PpADCY3*; N: *PpCYR1*; O: *PpHDAC1*.

表 3.6 用蜂蜜饲喂蝶蛹金小蜂的相对基因表达水平与寿命的相关性分析
Table 3.6 Correlation analysis of relative gene expression levels and lifespan of *P. puparum* fed with honey

基因名称	一元线性回归方程	*p* 值	决定系数 R^2	残差
PpTSC2-2	$y = 36.1579 - 5.7349x$	0.0013	0.6610	5.4176
PpHDAC1	$y = 40.3684 - 10.6650x$	0.0464	0.3405	7.5562

注：x 轴代表所选基因的相对表达水平，y 轴代表蝶蛹金小蜂雌成虫的平均寿命。The x-axis represented relative expression levels of selected genes. The y-axis represented mean lifespan of *P. puparum* female adults.

之后，通过逐步回归法建立了食蜂蜜的寄生蜂的寿命预测模型 Model 2（$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 * PpTSC2-2 + \beta_2 * PpHDAC1 + \beta_3 * PpTSC2-3$，表 3.7）。三个基因 *PpTSC2-2*, *PpHDAC1* 和 *PpTSC2-3* 被纳入模型 2。所有被引入模型的因变量均满足 p<0.05 的标准，未满足该标准的变量不引入方程。模型 Model 2 的解释方差 R^2 为 86.4%。

表 3.7 通过逐步回归法构建的蜂蜜处理的寿命预测模型
Table 5. Lifespan prediction modeling of the honey treatments constructed through step-wise method.

	模型 2				
	系数	标准差	*p* 值	决定系数 R^2	校正后 R^2
Constant (β_0)	40.085	3.718	0	0.901	0.864
Pp TSC2 − 2 (β_1)	-4.94	0.81	0		
PpHDAC1 (β_2)	-7.52	2.099	0.007		
Pp TSC2 − 3 (β_3)	3.955	1.48	0.028		

注：预测寿命方程为$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 * PpTSC2-2 + \beta_2 * PpHDAC1 + \beta_3 * PpTSC2-3$。
Predicted wasp lifespan $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 * PpTSC2-2 + \beta_2 * PpHDAC1 + \beta_3 * PpTSC2-3$.

2.5 寿命预测模型的验证

由于蔗糖处理对寿命相关基因的表达有较大的影响，选择高浓度（50%）和低浓度（5%）的蔗糖溶液进行模型验证。首先，测试了预测寿命随蔗糖浓度变化的回归方程。用5%和50%浓度的蔗糖喂养寄生蜂，统计平均寿命分别为17.5 d和28.1 d。通过该方程，预测蝶蛹金小蜂的寿命应为17.8 d和27.9 d，与实测结果吻合度较高。因此，可以扩大方程$y = x/(0.1125 + 0.0335x)$中x（即蔗糖浓度）的范围至0-50%。

接下来，分别在 0、2、6、12 和 18d，计 4 个时间点取样进行 qPCR，研究基因相对表达水平回归模型对寄生蜂平均寿命的预测能力（表 3.8）。用 5%蔗糖喂养的寄生蜂在 4 个取样点的平均寿命测量值均在预测值的 95%置信区间内。除 6 d 外，用 50%蔗糖喂养的寄生蜂在 3 个时间点的平均寿命都在预测值的 95%置信区间内。

表 3.8 用 5%和 50%蔗糖饲喂蝶蛹金小蜂验证模型 1

Table 3.8 Validation of Model 1 using *P. puparum* fed with two sucrose concentrations

		5%蔗糖溶液				50%蔗糖溶液			
		2d	**6d**	**12d**	**18d**	**2d**	**6d**	**12d**	**18d**
预报因子$x1$	*PpPTEN*	3.32	3.05	5.13	8.88	7.80	11.97	20.23	17.77
预报因子$x2$	*PpSOD1-3*	5.50	4.84	0.87	1.37	4.24	5.07	7.36	7.01
预报因子$x3$	*PpSOD1-1*	0.61	0.93	0.69	1.42	0.34	1.37	1.46	1.39
预测值y（d）		19.8	14.1	12.1	7.7	25.8	18.5	30.7	28.3
95%预测区间		13.929～25.749	6.789～21.508	5.957～18.171	-3.613～18.925	21.031～30.644	10.241～26.834	24.237～37.253	21.640～34.909
实际测量寿命（d）		17.5				28.1			

注：预测值 x 是所选基因的相对表达水平，预测值 y 为蝶蛹金小蜂的预测寿命。置信度 α 为 0.05。Predictor x is the relative expression level of the selected gene. Predicted y is the predicted lifespan of *P. puparum.* Confidence level α is 0.05.

3 讨论

用 CAFE 喂食的方法研究了实验室条件下蝶蛹金小蜂的营养需求，由于装置是寄生蜂持续自主取食，摄取的糖液量可以认为是饱和的。加上先前的研究表明寿命主要取决于糖液的浓度而不是摄取糖液的量，因此并没有对糖液的消耗量进行比较 (Azzouz *et al.*, 2004)。结果表明，补充蔗糖和蜂蜜对蝶蛹金小蜂成虫的寿命存在显著影响，且成蜂寿命随着糖源浓度的提高而延长，相关和回归分析确认了高浓度蔗糖和寿命延长之间有很强的正相关性。统计结果表明，最有利于蝶蛹金小蜂雌蜂长寿的蔗糖溶液浓度为 20%，蜂蜜浓度为 10%。要想获得同样的延寿效应，需要的蜂蜜量更少。此外，两种营养物质预测寿命的回归方程表明喂养蜂蜜对寄生蜂寿命延长效果的上限更高。回归方程反映了一定范围内（0-40%）的糖源浓度与寄生蜂寿命的关系。虽然用 50%的蔗糖溶液喂养寄生蜂的结果表明，回归方程具有一定的预测能力，但是用更高浓度的糖溶液饲喂寄生蜂的寿命不可以随意预测。 本章结果与 Wu 等报道的糖源对寿命的影响部分相似，而与 Azzouz 等报道的寿命不受糖源溶液浓度影响的结论不一致 (Azzouz *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2008)。由此可见，不同浓度的糖源对寄生蜂寿命的影响因寄生蜂种类的不同存在较大的差异。寄生蜂作为一种天敌资源，研究寄生蜂成虫使用的最佳糖源浓度，能以最经济的成本达到最大的防治效果。在田间应用中，该研究可以指导延长寄生蜂的保质期，延长其作用时间，降低放蜂频率和成本，从而提高经济效益。在实际应用中，可在农田附近种植蜜源植物，满足寄生蜂对糖分和水分的需求，并人工喷洒 20%蔗糖溶液以补充营养。储运方面，寄生蜂的 2 天内短期储运可提供清水，长期储运可提供 10%的蜂蜜水。这些措施将有助于寄生蜂大规模商业化生产的应用。

本实验进一步研究了寿命相关基因的表达模式与寄生蜂寿命的关系。寿命相关基因的表达模式在蔗糖和蜂蜜处理组中有一定相似，5 个基因 *PpAKT*，*PpHSP110*，*PpTSC1*，*PpTSC2-1* 和 *PpTSC2-3* 均表现出了表达量随着寿命延长而增大的趋势，*PpADCY3* 的表达量随着寿命延长而降低。然而随后建立的模型中并没有纳入以上基因作为预报因子。预测个体寿命的模型可以为寄生蜂寿命调控机制的研究提供有价值的工具。全长存活实验需要的时间较长，如本研究中的一轮实验需要 100 天左右的周期，是一个限速步骤。完善的经过验证的模型可以在短期内通过几个变量预测寿命。开发预测模型时，最重要的一步是变量的选择标

准。本研究选择的变量是已知的与衰老过程和寿命调控相关的基因。其次，本研究选择了多元线性回归中的逐步回归方法进行模型的建立，它的优点在于从大量的因子中把对寄生蜂寿命影响显著的因子找出来。然而，缺点是可能无法充分考虑到复杂的非线性关系，具体的来说，有一些影响较大的基因与寄生蜂寿命的关系可能是非线性的，因此没有纳入模型中。在预测模型建立之后，选取了两个蔗糖浓度进行对模型 1 进行验证。模型 1（$\hat{y} = 13.748 + 1.091x1 + 1.87x2 - 12.904x3$）包含了两个 SOD，可能表明 *PpSOD1-1* 和 *PpSOD1-3* 的表达模式存在某种平衡。其他昆虫中关于 SOD 的功能研究存在争议。果蝇 SOD 的功能丧失突变体导致了果蝇寿命的缩短和对亲氧化剂、铜离子、百草枯、电离辐射和高氧的高度敏感 (Boulianne, 2001)。然而，在黑毛蚁 *Lasius niger* 的研究中，长寿蚁后的 SOD 活性与相对短命的工蚁和雄蚁相比略低或大致相似 (Parker *et al.*, 2004)。虽然模型 1 的预测平均寿命大致符合实测值，但并不能证明模型中纳入的寿命相关基因表达量变化与寄生蜂寿命的延长具有因果关系。

总之，本章证明了 2 种糖源对蝶蛹金小蜂寿命的量化影响并建立了有效的寿命预测方程，且进一步研究了喂食不同糖源时的寄生蜂寿命相关基因的表达模式，并据此建立了比较可信的寿命预测模型。在蔗糖处理的寿命预测模型中，筛选并验证了三个最重要的变量 *PpPTEN*、*PpSOD1-1* 和 *PpSOD1-3*。在蜂蜜处理的寿命预测模型中，筛选出了 PpTSC2-2、PpHDAC1 和 PpTSC2-3 三个最重要的基因。本研究结果在分子水平上阐述了营养摄入与寿命之间的联系，为今后研究寄生蜂的寿命调控机制提供了新的工具。

第四章 热胁迫下蝶蛹金小蜂的转录组分析

高温胁迫下，许多昆虫的发育周期变短、成虫寿命显著缩短。蝶蛹金小蜂在25℃下的平均寿命为21.9 d，在35℃下雌蜂的平均寿命显著缩短为9.2 d（图2.5）。昆虫响应热应激的一个普遍的细胞反应是诱导热激蛋白HSP的表达。如综述所述，昆虫的HSP根据分子量大致可分为Hsp70、Hsp90、Hsp60和sHSP等。当昆虫暴露在压力环境下，HSP大量表达以帮助蛋白质折叠保护其免受损伤 (King and MacRae, 2015)。其中sHSP是一类具有一个保守的α-晶状结构域的小分子量热激蛋白，在蝶蛹金小蜂基因组中被鉴定出了8个sHSP（PpCRYAB1-8，表2.2）。通过qPCR实验初步探究了几个寿命相关基因响应热应激的表达量变化，但对高温胁迫下蝶蛹金小蜂的系统性分子反应及这些反应如何影响寿命的机制尚不清楚。本章中，选取了蝶蛹金小蜂雌蜂不同生命阶段的成虫进行高温胁迫处理，基于RNA测序技术探究寄生蜂响应高温胁迫的分子机制。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及样品准备

蝶蛹金小蜂的饲养见第二章1.1，本章中用到的是蝶蛹金小蜂的雌成虫。蝶蛹金小蜂雌蜂在25℃培养箱中羽化后，立即挑选大小相近、活力良好的个体，随机分成两组，一组继续在25℃培养箱中饲养，一组放入35℃培养箱中饲养。在六个时间点取样，分别是（一）热处理组：羽化后35℃处理3 h、6 h、12 h、5d、10 d和15 d；（二）对照组：羽化后25℃处理3 h、6 h、12 h、5 d、10 d和15 d。每个处理设置3个重复，每个重复收集5头雌蜂，用TRIzol处理后快速冷冻在-80℃下保存。共有12组36个样品用于RNA-Seq及后续差异表达分析。

1.2 RNA-seq 文库构建及分析

将蝶蛹金小蜂雌蜂的36个样品分别抽提RNA后进行质检，样品的处理和RNA抽提过程同第二章1.4。质检合格的样品构建文库进行测序。测序基于HiSeq平台，对蝶蛹金小蜂特定时间点转录的所有mRNA进行测序。实验采用Illumina Truseq^{TM} RNA sample prep Kit方法进行文库构建，取样及文库构建的操作流程图如图4.1所示。测序得到原始数据（raw data），随后对原始数据进行质量控制，使用cutadapt v1.16（http://cutadapt.readthedocs.io/）进行剪切过滤，去除原始数据

中的测序接头序列、低质量读段及长度过短序列的数据，得到高质量的测序数据（clean data）。基于 Trinity 组装算法对于测序数据进行拼接，结合基因组数据进行后续分析。

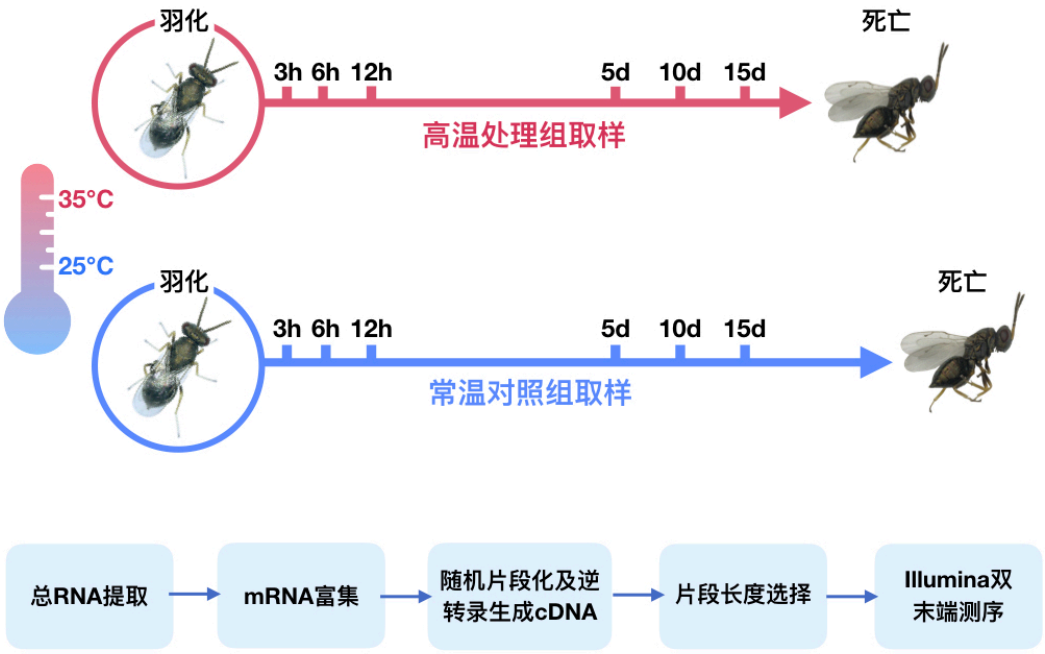

图 4.1 转录组取样及测序实验流程

Figure4.1 Transcriptome sampling and sequencing experiment flow.

1.3 基因表达分析

首先，使用 RSEM 分别计算各处理各样品的基因表达水平。然后，使用 R 包 DESeq2 对 RSEM 表达定量结果（counts）进行两个处理间基因的差异表达分析。使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法对 *p* 值进行校正以控制假发现率（False discovery rate，FDR），结果用 *q* 值表示，并计算差异倍数（Fold change）。如果基因的 q <0.05，且$|\log_2(\text{Fold change})|$ >1，则认为该基因是差异表达基因（DEG）。在 6 个时间点的每一对处理组和对照组之间进行基因差异表达的比较。对蝶蛹金小蜂基因组上所有基因进行表达模式聚类分析，计算欧式距离：样本间为 spearman 相关系数，基因间为 pearson 相关系数，采用 hcluster 聚类方法。本章中差异表达基因的表达模式聚类热图使用 R 包 pheatmap 作图，差异表达基因的主成分分析（PCA）、火山图和维恩图用 OmicShare（http://www.omicshare.com/tools）作图。

1.4 差异基因 GO 和 KEGG 通路富集分析

使用 OmicShare 平台对差异基因进行了 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析，将 FDR 校正后 p 值（即 q 值）<0.05 的 GO 项和 KEGG 通路视为差异基因富集的 GO 项和 KEGG 通路。

1.5 基因加权共表达网络分析（WGCNA）

根据 Lanfelder 和 Horvath 开发的基因加权共表达网络分析流程（Weighted gene co-expression network analysis，即 WGCNA），使用 R 包 WGCNA v1.66 对所有样本的 RNA-seq 数据集构建了基因共表达网络（图 4.2）。首先对基因组数据进行处理，并按下列原则进行过滤：1）过滤掉在所有样本中的表达量之和小于 10 的基因；2）过滤掉在所有样本中表达量都几乎没有差异的基因。用过滤后的数据计算基因间的相似性，用于衡量基因表达水平的一致性。对于每一对基因 i 和 j，计算皮尔森相关系数的绝对值$S_{ij} = |cor(i,j)|$，构建基因的共表达相关性矩阵$S = [S_{ij}]$。随后用幂指数（power）邻接函数将相关性矩阵转换邻接矩阵$a_{ij} = power(S_{ij}, \beta) = |S_{ij}|^{\beta}$，经过 power 的多次迭代来确定最佳参数$\beta$值，确定软阈值为 8，使得基因表达关系接近无尺度网络。然后，构建拓扑重叠（topological overlap measure, TOM）矩阵，从直接和间接两个方面综合分析两个基因之间的关系。基于 TOM 值的相异度进行层次聚类分析，得到聚类树状图，用动态剪枝法进行模块划分，其中设定最小模块大小为 30，合并模块阈值为 0.2。由于高温下蝶蛹金小蜂寿命显著缩短，为评估共表达基因簇与蝶蛹金小蜂寿命的相关性，设定所有热处理组样本为 0（寿命缩短），对照组样本为 1（寿命较长）。对一个模块中的基因进行主成分分析，用最主要的成分（PC1）来代表这个模块的特征，即模块特征向量（Module eigengene，ME）。计算 ME 和性状之间的相关性系数，展示为一个热图。计算模块里面每一个基因与长寿命这一性状的相关性（GS）和模块里的基因与该模块的相关性（MM），计算 GS 和 MM 的相关性并作图。如果某个基因的 GS 和 MM 接近于 1，则认为该基因与模块中的其他基因具有较高的正相关关系，与性状高度正相关。筛选出与性状高度相关的目标模块之后，使用 cytoscape 3.8.2 软件对基因互作网络进行可视化，设置权重 weight 值为 0.18 对目标模块内的基因进行筛选。随后用 cytoscape 的 cytoHubba 工具鉴定模块内高关联度的关键基因 (Chin *et al.*, 2014)。CytoHubba 提供了 12 种拓扑分析方法，包括 Degree、Edge percolated component（EPC）、Maximum neighborhood component

（MNC）、Density of maximum neighborhood component（DMNC）、Maximum clique centrality（MCC）、基于最短路径的 6 种中心性测定方法（Bottleneck、Ecentricity、Closeness、Radiality、Betweenness 和 Stress）和 Clustering coefficient。以 MCC>5 作为候选的关键基因进行后续实验验证。

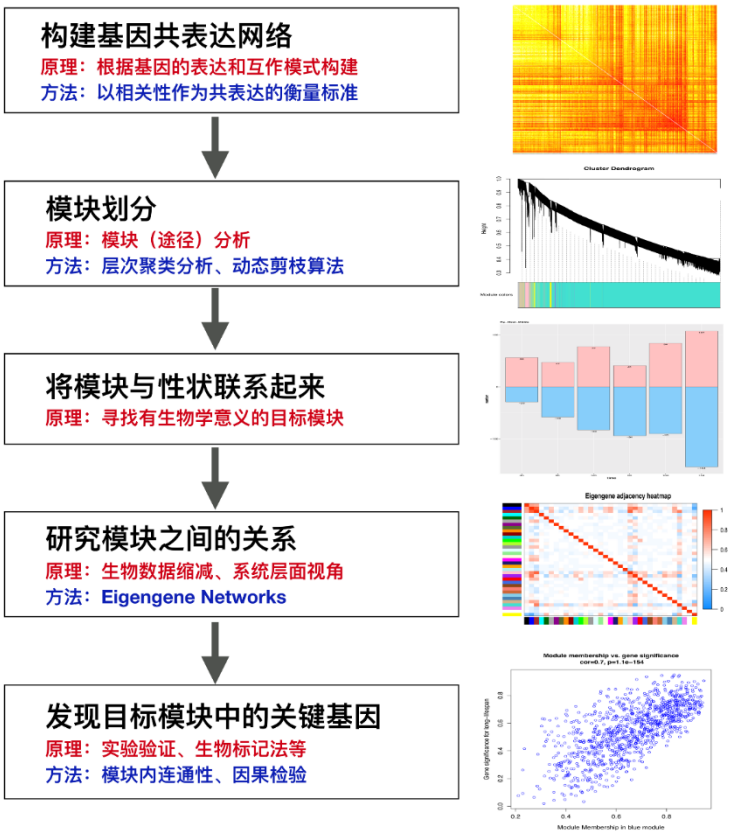

图 4.2 WGCNA 分析流程图（参考 Langfelder and Horvath, 2008）
Figure 4.2 Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) workflow.

1.6 RT-qPCR 验证和 RNA 干扰实验

为了验证转录组测序结果的可靠性和可重复性，按照转录组样品的处理条件（对照组 25℃下饲养，处理组 35℃下饲养）和取样时间点（3 h、6 h、12 h、5 d、10 d、15 d）收集蝶蛹金小蜂雌蜂样品，每个处理设置 3 个重复，每个重复收集 5 头雌蜂，进行 qPCR 验证。qPCR 定量验证流程参考第二章 1.4。

表 4.1 本章所用引物
Table 4.1 Primers used in this chapter

引物名称	核苷酸序列 (5'-3')
qPpCRYAB5_F	TTCCAGGTGATCATCGACGT
qPpCRYAB5_R	GTCCTTCTTCTCCTCGTGCT
qPpHSP68-2_F	CGACGTCTTAGAACAGCAGC

qPpHSP68-2_R	CTCCATCAAAGAGTGCGTCG
qPpHSP83_F	AACTCGTCTGATGCCTTGGA
qPpHSP83_R	GAGCGTGCGATCATTCTTGT
qPpXAP5_F	CGAGAAATCGCACAGCAAGA
qPpXAP5_R	GTTCGACGGCATTGTAGTGG
qPpPPP6A_F	GAACTGGTGCCGTTGTTGAT
qPpPPP6A_R	TTCGAGCGAGACACCTTTCT
qPpCathL_F	CACAACGGCAGCCTGATATC
qPpCathL_R	GGGGTAGCTTTTCTCCGAGT
qPpMf2_F	GGAAAGGACCGTCAACATCC
qPpMf2_R	TATCTCTAACTGTGCGGCGT
qPpSEC11C_F	CGGAAGAGCTCGAGGATTCT
qPpSEC11C_R	CCAAGACATGCAAGAATCGC
qPpOSBP2_F	CTTCCATGGCAGCATACACC
qPpOSBP2_R	GTTGACGTTCTGCCAAGTGT
rnaiPpEll-F2	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCTACTCTGCTTGGCCCAAA
rnaiPpEll-R2	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACGTCATGGGGTAGGTGTTT
rnaiPpXAP5-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGAGAAATCGCACAGCAAGA
rnaiPpXAP5-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGTGTCCTGATCCATCCCA
rnaiPpCathL-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCGAGTGGATCAAGCGTTG
rnaiPpCathL-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTTACTCTCGCTGCCTGT
rnaippPP6A-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATACATCGGACGAACGTGAAA
rnaippPP6A-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAACGGATAGTTTCGGTCACG
rnaiPpCRYAB1-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTTTGGCTTGGGATTACGC
rnaiPpCRYAB1-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCGTCAGCTCGATTTTGAT
rnaiPpCRYAB2-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTTTGGACTGGGACTTCACC
rnaiPpCRYAB2-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGACTTTGGGCCATTTTCTT
rnaiPpCRYAB3-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCCACTGCTTTTCTCCGACT
rnaiPpCRYAB3-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACTCCGTCCGAAGACAGTT
rnaiPpCRYAB4-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACTTCAGCGTCATCGACAG
rnaiPpCRYAB4-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCTTTGCTGAGGGACGACTT
rnaiPpCRYAB5-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCAACTCAGCGCAAGTACA
rnaiPpCRYAB5-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCACACCGTCAGAGGAGAG

体外合成 dsRNA，根据靶基因的序列以及 Lucifer 的序列信息设计在 Primer3（http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/）网站设计含 T7 启动子的特异引物（表 4.1），利用这些引物进行 PCR 扩增，得到大小为 400-600 bp 的产物，这些产物都经过了测序验证并纯化回收。TRIzol 法提取总 RNA、制备 cDNA 同第二章 1.4。以合成的 cDNA 为模版，用 dsRNA 引物进行 PCR 扩增，得到条带符合目标条带大小（400-600 bp）的产物，经测序验证后作为体外转录模版。随后根据体外转录试剂盒 MEGAscript® T7 Transcription Kit（Ambion，Austin，TX）的说明书，体外

合成 dsRNA。利用苯酚/氯仿抽提法纯化 dsRNA，以用于显微注射。剖开成功寄生的菜粉蝶蛹，挑出蝶蛹金小蜂雌性黄蛹并按同一方向排在排蛹片上，进行注射。待注射过 dsRNA 的蜂羽化 2 d 后，取样进行相对定量 qPCR 来确定基因表达量变化。qPCR 的流程参考第二章 1.4。

2 结果与分析

2.1 转录组组装质量与测序数据

经过质量控制过滤后，蝶蛹金小蜂雌蜂短期常温（25°C）对照组、短期高温（35°C）处理组、长期常温对照组和长期高温处理组共 36 个样品总共得到 1,567,502,192 条高质量的测序数据（clean data）。全部 36 组测序数据 Q30 碱基百分比均大于 90%，表明测序质量较好（表 4.2）。

表 4.2 转录组测序产量统计

Table 4.2 Transcriptome sequencing yield

样品名称	处理	序列数（条）	碱基数（bp）	Error%	Q30%	GC%
25°C-12h-1	Control	49753462	7378146352	0.0141	92.75	45.11
25°C-12h-2	Control	50858970	7536521065	0.014	92.82	46.15
25°C-12h-3	Control	47230686	7006272779	0.0148	92	46.17
25°C-3h-1	Control	41392638	6152595106	0.0154	91.62	45.53
25°C-3h-2	Control	47569472	7069680155	0.0154	91.59	46.2
25°C-3h-3	Control	47023264	6986606049	0.0151	91.85	45.94
25°C-6h-1	Control	52855190	7828897681	0.0138	93	46.04
25°C-6h-2	Control	50030786	7433578852	0.0142	92.59	45.7
25°C-6h-3	Control	48659968	7225207686	0.0143	92.44	45.97
35°C-12h-1	Heat Stress	62326694	9260987176	0.0136	93.44	44.98
35°C-12h-2	Heat Stress	58103654	8634307047	0.0137	93.37	44.79
35°C-12h-3	Heat Stress	51540568	7673061782	0.0137	93.29	45.15
35°C-3h-1	Heat Stress	46604600	6914792241	0.0143	92.47	47.03
35°C-3h-2	Heat Stress	59692556	8883543727	0.0137	93.29	46
35°C-3h-3	Heat Stress	64530892	9597522571	0.0137	93.33	45.88
35°C-6h-1	Heat Stress	61502074	9152798567	0.0139	93.09	45.16
35°C-6h-2	Heat Stress	52426108	7806019475	0.0137	93.31	45.35
35°C-6h-3	Heat Stress	40937556	6091373690	0.0137	93.34	44.95
25°C-5d-1	Control	29076602	4210845493	0.0137	93.44	43.75
25°C-5d-2	Control	27474136	3986090763	0.0135	93.68	43.73
25°C-5d-3	Control	30067336	4370707708	0.0131	94.04	43.97
25°C-10d-1	Control	34922211	5081339064	0.0131	94.13	43.2
25°C-10d-2	Control	35775439	5218811099	0.013	94.26	43.94
25°C-10d-3	Control	43534137	6355482247	0.0129	94.31	43.9
25°C-15d-1	Control	28283731	4127442956	0.0094	96.44	44.51

25°C-15d-2	Control	25295888	3682315661	0.0094	96.38	43.98
25°C-15d-3	Control	27625805	4022208231	0.013	94.19	44.22
35°C-5d-1	Heat Stress	43149469	6305126549	0.013	94.28	44.9
35°C-5d-2	Heat Stress	47047098	6882807720	0.0127	94.62	44.76
35°C-5d-3	Heat Stress	44117527	6422236834	0.013	94.25	44.22
35°C-10d-1	Heat Stress	42218457	6179692935	0.0127	94.61	44.96
35°C-10d-2	Heat Stress	49250728	7204492352	0.0127	94.59	45.3
35°C-10d-3	Heat Stress	30898487	4520838280	0.0093	96.6	45.25
35°C-15d-1	Heat Stress	30407472	4411730086	0.0132	93.95	45.12
35°C-15d-2	Heat Stress	30817803	4496036422	0.0095	96.36	44.85
35°C-15d-3	Heat Stress	34500728	5054463130	0.0092	96.77	45.11

注：Q30% ：Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基的百分比；Error %：碱基错误率；GC %：碱基 G 和 C 的数量总和占总的碱基数量的百分比。Q30%: percentage of bases with Phred values greater than 30 to the total number of bases; Error %: base error rate; GC %: sum of the number of bases G and C as a percentage of the total number of bases.

2.2 热应激对基因表达的影响

对基因组上所有基因进行主成分分析（图 4.3 A），每组处理的 3 个生物学重复取质心作图，连线的 3 个顶点代表 1 个生物学重复。通过样本的分布情况可以看出生物学重复的样品大致聚类在一起，没有出现离群样本，这表明实验的重复性较好。聚类分析的结果表明了同样的结论（图 4.3 B）。在 6 h 及以上的同一时间点对照组和高温处理组均可用主成分 PC1（57.9%）进行区分。PC2（9.9%）可以区分所有时期的对照组和高温处理组。对于不同的温度处理，35℃处理下的样本分布的更离散，可能说明在高温刺激下寄生蜂更敏感，个体差异更大。对于不同的年龄阶段，长期的 5 d 以上的高温刺激显然比短期的 12 h 内高温刺激的样本产生了更大的基因表达量的变化。结合聚类分析的结果可以发现在 3 h 对照组和高温处理组的基因表达模式十分相近，而自 6 h 起处理组和对照组的基因表达模式开始出现分支。这些结果说明高温刺激诱导了蝶蛹金小蜂雌蜂基因表达的显著分化，高温对蝶蛹金小蜂的影响可能从 6 h 左右开始出现效应，并逐渐积累最终在蝶蛹金小蜂的老龄阶段产生巨大影响，使寿命缩短。

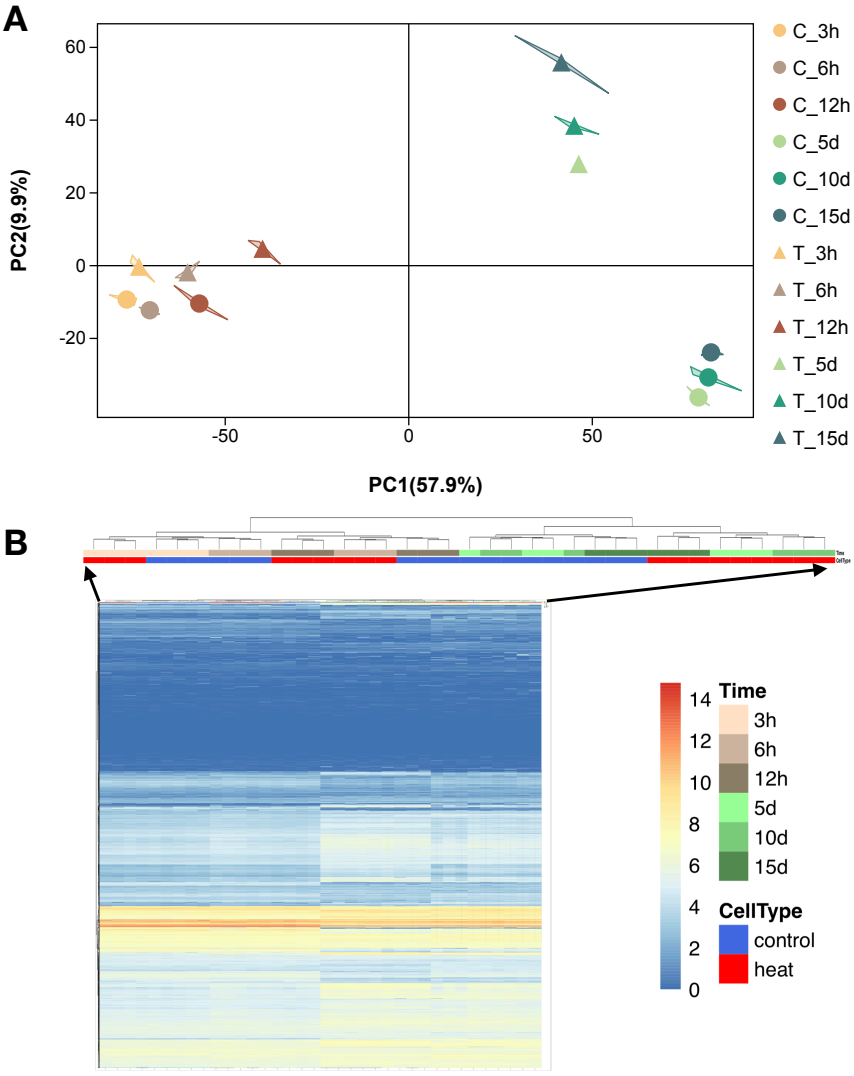

图 4.3 热胁迫下蝶蛹金小蜂的基因表达模式

Figure 4.3 Gene expression patterns of *P. puparum* under heat stress.

注：（A）样品 PCA 分析结果。用圆形图标表示对照组，向上的三角形表示高温处理组，在图右侧标注。（B）聚类分析热图。每一列包括一个转录组样本里的所有基因，其分组信息在右侧图注标示为“Time”和“CellType”。棕色色块由浅到深分别表示 3 h、6 h 和 12 h，绿色色块由浅到深分别表示 5 d、10 d 和 15 d。蓝色色块表示对照组，红色色块表示高温处理组。每一行表示一个基因。每个单元表示一个样本中某一个基因的表达量，用 $\log_2$(FPKM+1)表示，从 0 到 14 对应颜色从蓝色到红色。(A) Results of PCA analysis of samples. The control group is indicated by a circular icon and the upward triangle indicates the 35℃ treated group, which is labeled on the right side of the figure. (B) Heatmap of cluster analysis. Each column includes all genes in a transcriptome sample, and the grouping information is labeled as "Time" and "CellType" on the right side of the figure. The brown blocks from light to dark indicate 3 h, 6 h and 12 h respectively, while the green blocks from light to dark indicate 5 d, 10 d and 15 d respectively. Blue blocks indicate the control group and red blocks indicate the 35℃ treated group. Each row indicates one gene. Each cell represents the expression of a gene in a sample, expressed as $\log_2$(FPKM+1), from 0 to 14 corresponding to the color from blue to red.

2.3 基因差异表达分析

蝶蛹金小蜂雌蜂的差异表达基因数目随着时间的推移而逐渐增加（图 4.4），长期高温处理组的差异表达基因均远多于短期高温处理组。高温刺激 3 h 蝶蛹金小蜂雌蜂仅有 86 个基因显著上调，82 个基因显著下调，而在成蜂老龄期（15 d）已经有 969 个基因显著上调，1046 个基因显著下调。在整个生命过程中，差异下调基因的数目增速更快（附录II）。基因的表达情况分别在短期和长期的处理组中表现出了明显的聚类，差异表达基因的维恩图显示有 13 个基因的表达量在短期三个时期都有显著差异，而长期三个时期有 59 个基因显著差异表达（图 4.5 A 和 B）。对这些基因进行进一步的分析发现，有 2 个基因在所有时期都显著上调，分别是 *PpCRYAB1* 和 *PpCRYAB2*（图 4.5 C）。有 1 个基因在所有时期都显著下调，即 *PpDnah3*（图 4.5 D）。

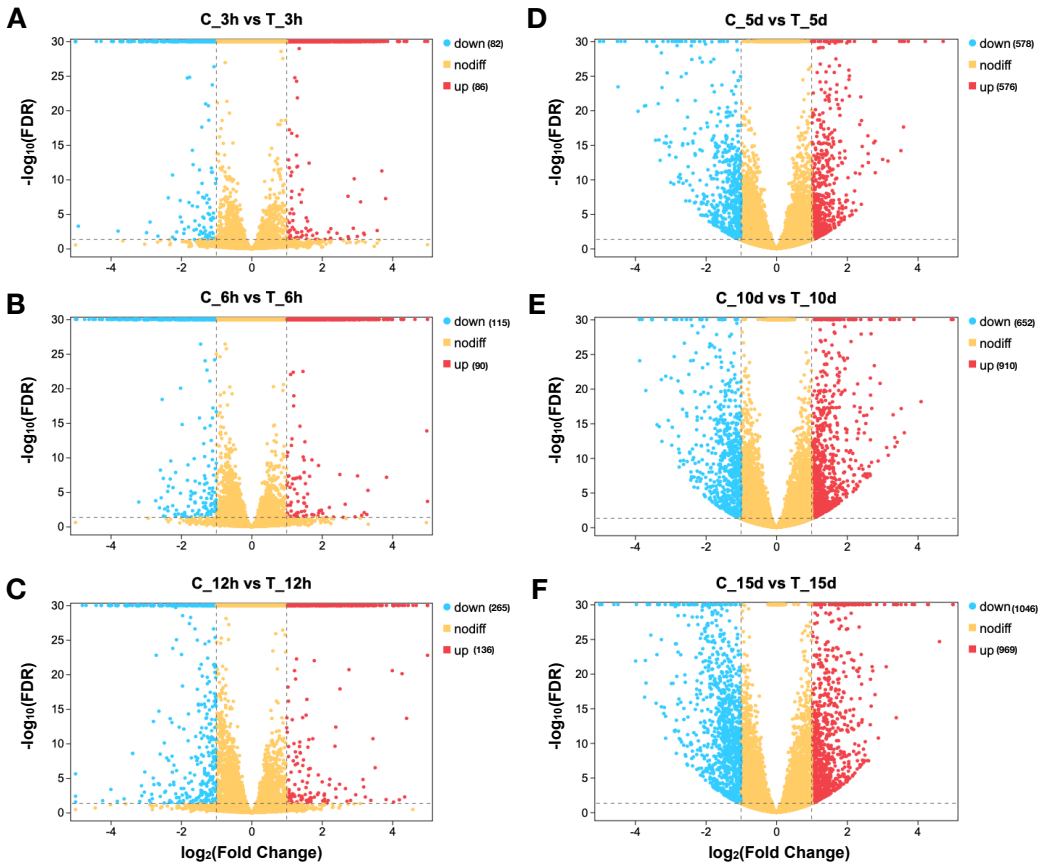

图 4.4 差异表达基因火山图
Figure 4.4 volcano of DEGs.

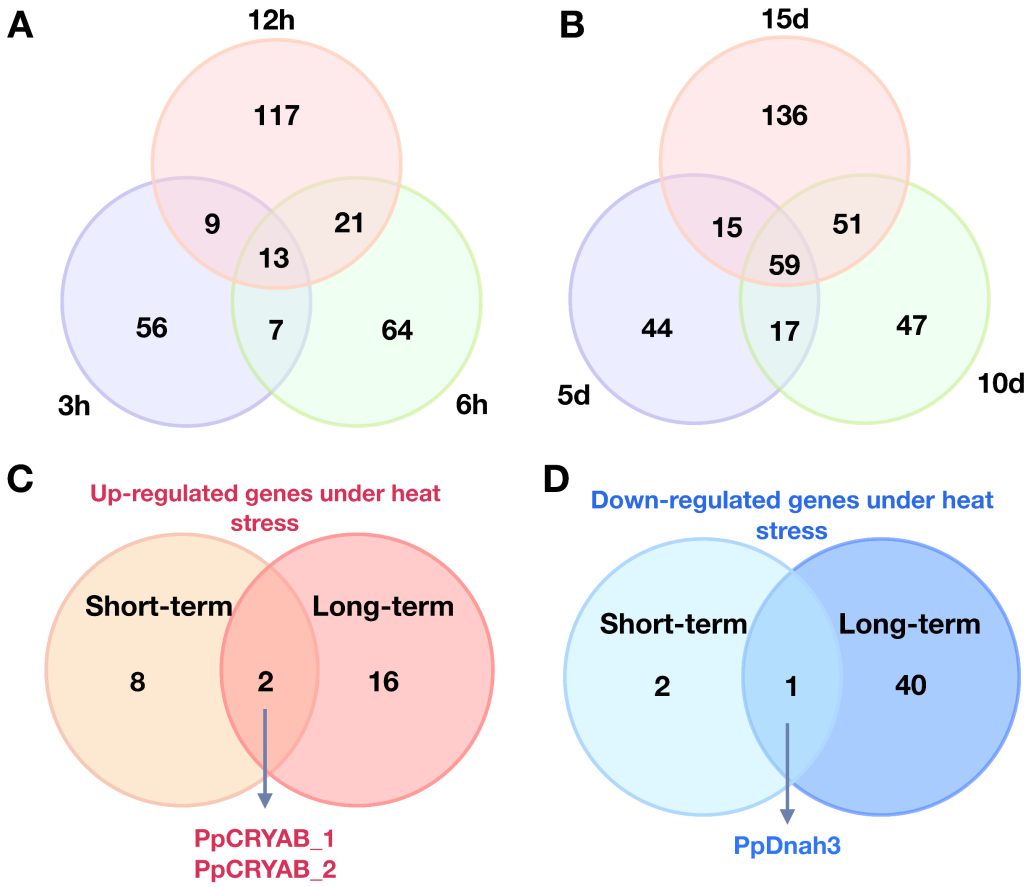

图 4.5 不同时期的差异表达基因数目

Figure 4.5 Number of DEGs in different period.

（A）短期高温处理组差异表达基因的维恩图；（B）长期高温处理组差异表达基因的维恩图；（C）高温处理显著上调基因的维恩图；（D）高温处理显著下调基因的维恩图。(A) Venn diagram of DEGs in the short-term 35°C treatment group; (B) Venn diagram of DEGs in the long-term 35°C treatment group; (C) Venn diagram of genes significantly up-regulated by 35°C treatment; (D) Venn diagram of genes significantly down-regulated by 35°C treatment.

为了进一步探究蝶蛹金小蜂高温胁迫下差异表达基因的功能和参与的生物过程，对各时期差异表达基因进行了 GO 富集和 KEGG 通路富集分析。对差异上调和下调基因进行 GO 注释，并将它们分为生物过程（BP，Biological Process）、细胞组分（CC，Cellular Component）和分子功能（Molecular function）三个大类下的子项（图 4.6）。

蝶蛹金小蜂雌蜂高温处理不同时间的差异上调和下调基因的 GO 注释结果相差不大。在 BP 类别下均最多注释到代谢过程（metabolic process，GO:0044237）。在 MF 类别下的差异表达基因的功能注释到结合绑定（binding，GO:0005488）和催化活性（catalytic activity，GO:0003824）的数量最多。在 CC 类别下差异表达

基因的注释分类比较多，主要注释组分有膜（membrane，GO:0016020）、细胞（cell，GO:0005623）、细胞部分（cell part，GO:0044464）、膜部分（membrane part，GO:0044425）和细胞器（organelle，GO:0043226）等。

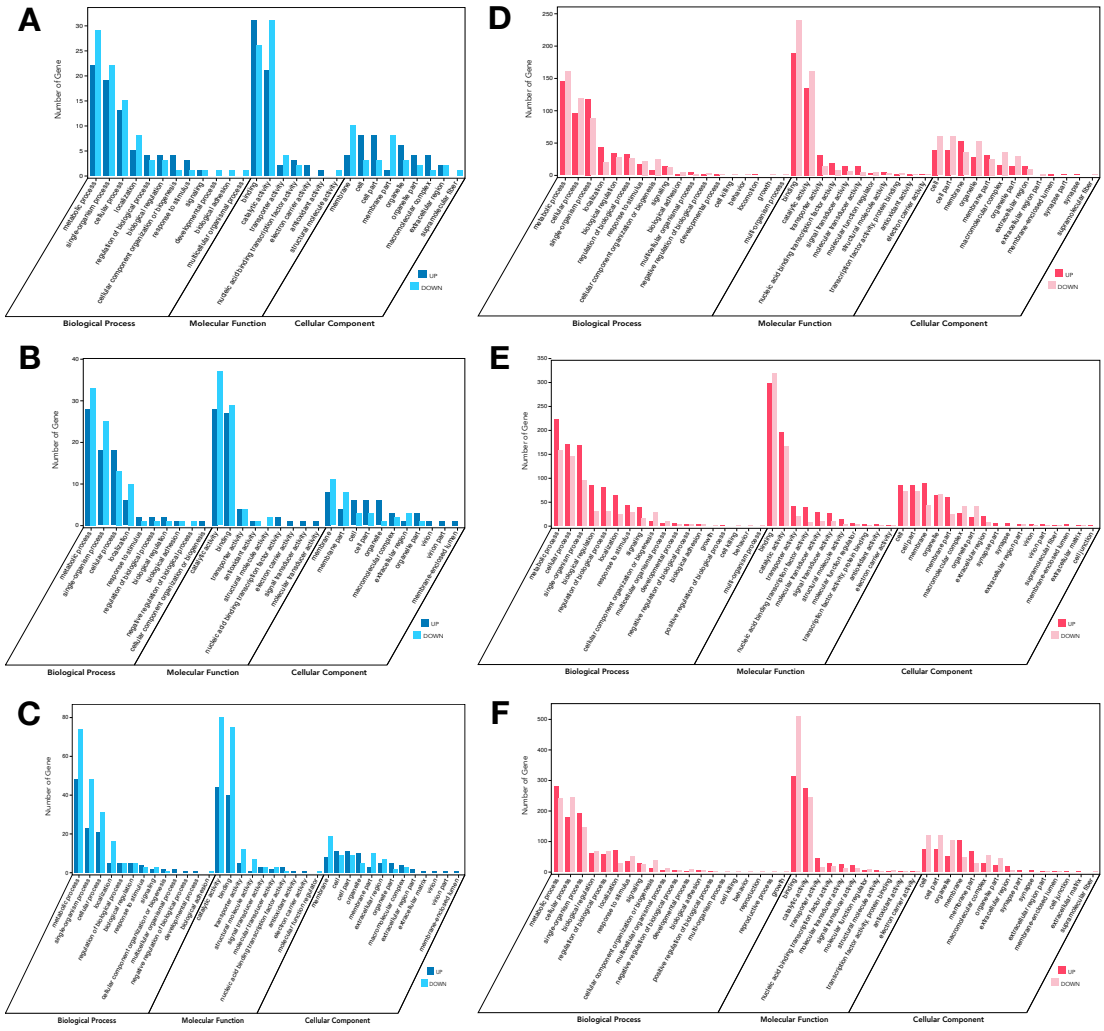

图 4.6 差异表达基因 GO 注释结果

Figure 4.6 GO annotation of DEGs

注:图中横坐标表示 GO 的二级分类术语，纵坐标表示包含在该二级分类中的基因的数量，每个图中基因的 GO 功能分为三大类，分别为生理过程，细胞组分和分子功能。The horizontal coordinates of the figure indicate the secondary classification terms of GO, and the vertical coordinates indicate the number of genes included in that secondary classification. The GO functions of the genes in each figure are divided into three major categories, namely biological process, cellular component and molecular function.

对高温处理 3 h 的 168 个差异表达基因进行 GO 富集分析（表 4.3），在 BP 分类下显著富集到氧化还原过程（oxidation-reduction process），在 MF 分类下的 6 个功能分类显著富集，其中有 22 个差异表达基因显著富集到了氧化还原酶活性（oxidoreductase activity），有 9 个基因富集到了作用于成对的供体结合或还原分子氧的氧化还原酶的活性（oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen），还有 10 个基因显著富集到了铁离子结合（iron ion binding）、四吡咯结合（tetrapyrrole binding）和血红素结合（heme binding）。差异表达基因在高温处理 3 h 的 GO 分子功能富集结果表明差异表达的基因可能参与氧化应激过程。将高温处理 6 h 的 205 个差异表达基因进行 GO 富集分析，结果发现在 MF 类别下显著富集到了 12 个项目。具体而言，有 65 个基因显著富集到了催化活性，有 32 个基因显著富集到了水解酶活性（hydrolase activity），18 个基因显著富集到了肽酶活性（peptidase activity），17 个基因显著富集到了作用于 L-氨基酸肽的肽酶活性（peptidase activity, acting on L-amino acid peptides），以及 14 个基因显著富集到内肽酶活性（endopeptidase activity）等。GO 分子功能富集结果表明在高温处理 6 h 下表达量发生显著变化的基因可能大多是酶类。对高温处理 12 h 的 401 个差异表达基因进行 GO 富集分析，结果显著富集到 6 个 MF 类别和 4 个 BP 类别下的小项。其中，有 55 个基因的分子功能显著富集到了水解酶活性，21 个基因富集到内肽酶活性，还有 5 个基因显著富集到脂肪酰基辅酶 A 还原酶（成醇）活性（fatty-acyl-CoA reductase (alcohol-forming) activity）。BP 类别中基因显著富集到氧化还原过程、氨基糖代谢过程（amino sugar metabolic process）、氨基聚糖代谢过程（aminoglycan metabolic process）和含葡萄糖胺化合物代谢过程（glucosamine-containing compound metabolic process）。GO 富集结果表明高温处理 12 h 的差异基因可能参与脂质代谢、糖代谢和蛋白质糖化过程。

对高温处理 5 d 的 1154 个差异表达基因进行富集分析，MF 类别下基因显著富集到了铁离子结合、四吡咯结合和血红素结合绑定，主要显著富集到的细胞组分有染色体（chromosome）、染色体部分（chromosomal part）、染色质（chromatin）、核小体（nucleosome）和蛋白质-DNA 复合体（protein-DNA complex）等。这一结果可能表明高温处理 5 d 后 DNA 复制、转录和翻译等活动加剧。高温处理 10 d 的 1562 个差异表达基因显著富集到了 9 个 MF 类别下和 1 个 CC 类别下的小

项。主要富集到的细胞组分为细胞核（nucleus），富集到的分子功能有 DNA 结合（DNA binding）、内肽酶活性、核酸结合转录因子活性（nucleic acid binding transcription factor activity）和序列特异性 DNA 结合转录因子活性（transcription factor activity, sequence-specific DNA binding）等。高温处理 15 d 的 2015 个差异表达基因显著富集到了 10 个 CC 类别下的小项。细胞内膜结合细胞器（intracellular membrane-bounded organelle）和膜结合细胞器（membrane-bounded organelle）是最多基因富集到的细胞组分。长期高温处理的富集分析结果显示各类转录因子功能活跃，可能说明长期高温处理对下游基因的调控产生了广泛影响。

表 4.3 差异表达基因 GO 功能富集结果
Table 4.3 GO enrichment of DEGs

比较组	GO 项	Ontology	GO ID	DEGs	FDR
25 ºC vs. 35ºC 3 h	oxidation-reduction process	BP	GO:0055114	20	0.04014631
	oxidoreductase activity	MF	GO:0016491	22	0.00218475
	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	MF	GO:0016705	9	0.00218475
	iron ion binding	MF	GO:0005506	10	0.00025167
	tetrapyrrole binding	MF	GO:0046906	10	0.00025167
	heme binding	MF	GO:0020037	10	0.00025167
25 ºC vs. 35ºC 6 h	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	MF	GO:0016705	7	0.04556047
	iron ion binding	MF	GO:0005506	7	0.03458524
	phospholipase A2 activity	MF	GO:0004623	2	0.029645
	phosphopantetheine binding	MF	GO:0031177	2	0.029645
	modified amino acid binding	MF	GO:0072341	2	0.029645
	hydrolase activity	MF	GO:0016787	32	0.012875
	tetrapyrrole binding	MF	GO:0046906	8	0.00856034
	heme binding	MF	GO:0020037	8	0.00856034
	catalytic activity	MF	GO:0003824	65	0.00516284
	endopeptidase activity	MF	GO:0004175	14	0.00207741
	peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	MF	GO:0070011	17	0.00207741
	peptidase activity	MF	GO:0008233	18	0.00104443
25 ºC vs. 35ºC 12 h	carboxypeptidase activity	MF	GO:0004180	4	0.03848012
	hydrolase activity	MF	GO:0016787	55	0.02589007
	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	MF	GO:0016620	5	0.01920572
	oxidation-reduction process	BP	GO:0055114	32	0.03618798
	aminoglycan metabolic process	BP	GO:0006022	8	0.03618798
	structural constituent of cuticle	MF	GO:0042302	8	0.00410179

	fatty-acyl-CoA reductase (alcohol-forming) activity	MF	GO:0080019	5	0.00263748
	endopeptidase activity	MF	GO:0004175	21	0.00260802
	amino sugar metabolic process	BP	GO:0006040	8	0.00858687
	glucosamine-containing compound metabolic process	BP	GO:1901071	8	0.0074996
25 ºC vs. 35ºC 5 d	chromatin	CC	GO:0000785	17	0.04950373
	myosin complex	CC	GO:0016459	5	0.03902346
	nucleosome	CC	GO:0000786	17	0.03859749
	protein-DNA complex	CC	GO:0032993	17	0.03859749
	chromosome	CC	GO:0005694	21	0.03269723
	iron ion binding	MF	GO:0005506	24	0.0260216
	chromosomal part	CC	GO:0044427	21	0.01628753
	DNA packaging complex	CC	GO:0044815	19	0.01628753
	heme binding	MF	GO:0020037	26	0.00188989
	tetrapyrrole binding	MF	GO:0046906	27	0.00097799
25 ºC vs. 35ºC 10 d	cation channel activity	MF	GO:0005261	14	0.04587089
	3'-5' DNA helicase activity	MF	GO:0043138	3	0.02993229
	ATP-dependent 3'-5' DNA helicase activity	MF	GO:0043140	3	0.02993229
	heme binding	MF	GO:0020037	28	0.02993229
	nucleus	CC	GO:0005634	83	0.04679314
	DNA binding	MF	GO:0003677	94	0.02174511
	tetrapyrrole binding	MF	GO:0046906	29	0.02174511
	nucleic acid binding transcription factor activity	MF	GO:0001071	45	0.02076655
	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	MF	GO:0003700	45	0.02076655
	endopeptidase activity	MF	GO:0004175	57	0.01524246
25 ºC vs. 35ºC 15 d	myosin complex	CC	GO:0016459	6	0.04791504
	condensin complex	CC	GO:0000796	3	0.04791504
	chromatin	CC	GO:0000785	25	0.04204288
	cytoskeleton	CC	GO:0005856	26	0.04204288
	nucleosome	CC	GO:0000786	25	0.02500058
	protein-DNA complex	CC	GO:0032993	25	0.02500058
	cytoskeletal part	CC	GO:0044430	22	0.02500058
	dynein complex	CC	GO:0030286	7	0.02500058
	membrane-bounded organelle	CC	GO:0043227	115	0.02500058
	intracellular membrane-bounded organelle	CC	GO:0043231	115	0.02500058

为了研究蝶蛹金小蜂在高温胁迫下不同生命阶段的差异表达基因参与的信号通路，对这些基因进行了 KEGG 通路注释及富集分析（图 4.7、4.8 和 4.9）。高温处理 3 h 的差异表达基因富集到了 110 个通路，其中显著富集到 14 个通路（附录III），主要参与通路有抗原的加工与呈递途径（Antigen processing and presentation）、多物种的寿命调控途径（Longevity regulating pathway - multiple species）、朊病毒疾病（Prion diseases）、军团菌病（Legionellosis）、内质网蛋白的加工途径（Protein processing in endoplasmic reticulum）等。参与内质网蛋白的加工途径的基因数目最多，包括 5 个热激蛋白 HSP、3 个晶体蛋白 CRYAB 和 BAG2。以上的热激蛋白和晶体蛋白还参与到多物种的寿命调控途径等其他富集通路。除了 5 个热激蛋白，还有一个组织蛋白酶 Cathepsin L 参与抗原的加工与呈递途径。

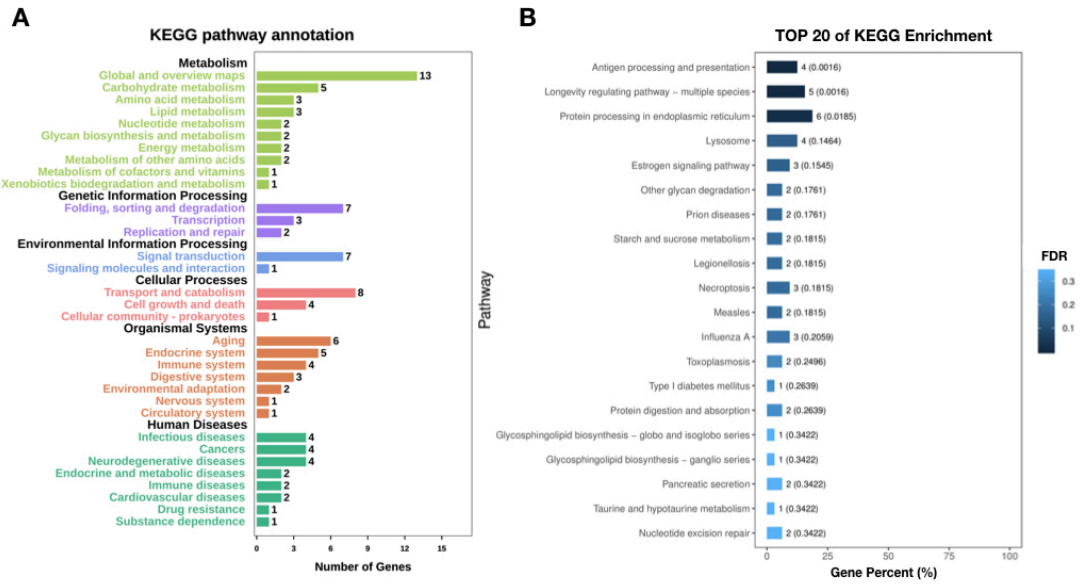

图 4.7 高温处理 3 h 差异表达基因的 KEGG 注释分类和富集结果
Figure 4.7 KEGG annotation and enrichment of DEGs at 3 h.

高温处理 6 h 的差异表达基因共富集到 93 个通路，其中显著富集到了 3 个通路（附录III），分别是抗原的加工与呈递途径、多物种的寿命调控途径和内质网蛋白的加工途径。有 3 个热激蛋白和 1 个 Cathepsin L 参与了抗原的加工与呈递途径。富集到多物种的寿命调控途径和内质网蛋白的加工途径的基因均为 HSP 和 CRYAB。

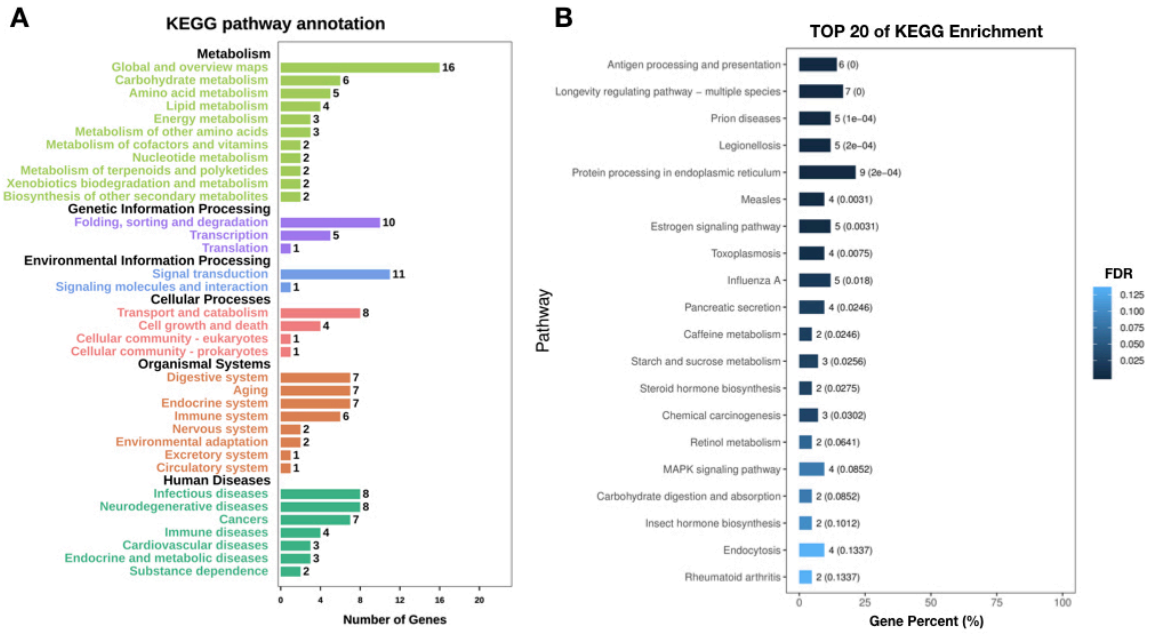

图 4.8 高温处理 6 h 差异表达基因的 KEGG 注释分类和富集结果

Figure 4.8 KEGG annotation and enrichment of DEGs at 6 h.

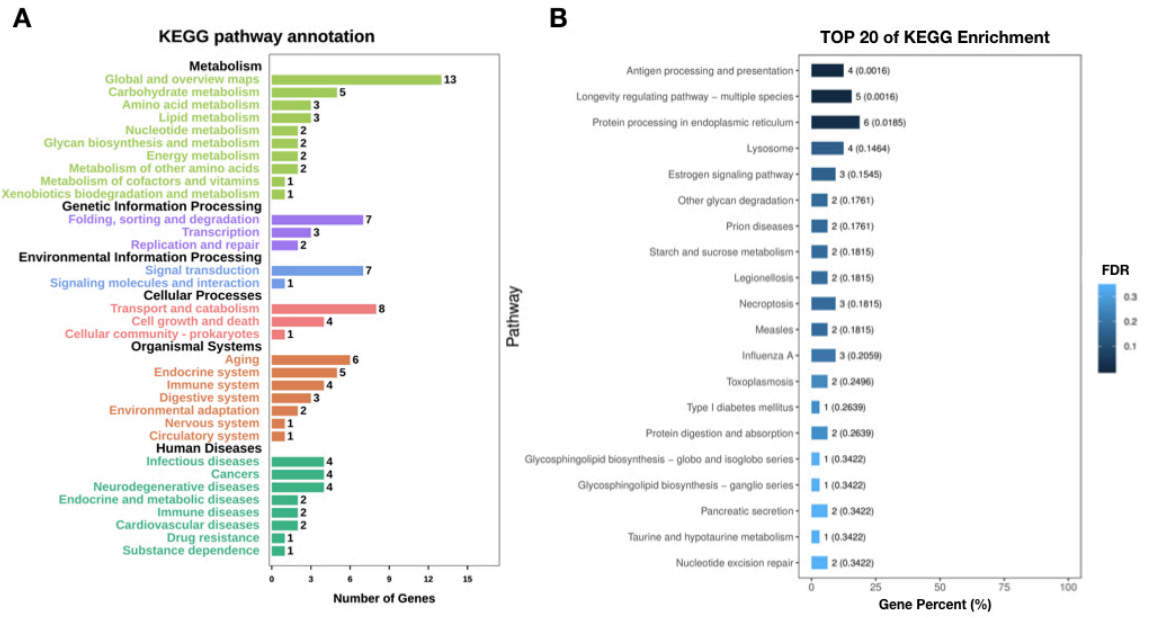

图 4.9 高温处理 12 h 差异表达基因的 KEGG 注释分类和富集结果

Figure 4.9 KEGG annotation and enrichment of DEGs at 12 h.

高温处理 12 h 的差异表达基因共富集到 154 个通路，其中显著富集到了抗原的加工与呈递途径、多物种的寿命调控途径、朊病毒疾病、群体效应（Quorum sensing）、军团菌病、内质网蛋白的加工途径等 6 个通路（附录III）。群体效应是一种广泛存在微生物细胞间的基因调控系统，有 3 个几丁质酶基因和 2 个谷氨酸脱羧酶基因富集到了这一途径中。可以发现，短期高温胁迫 3 h 至 12 h 的差异表达基因的 KEGG 富集结果大致相似（表 4.4）。

表 4.4 短期高温胁迫下差异表达基因 KEGG 通路富集结果

Table 4.4 KEGG enrichment of DEGs under short-term heat stress

KEGG 通路	-LOG$_{10}$(FDR)			差异基因 DEGs		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
Antigen processing and presentation	4.89	2.80	2.24	CTSL, HSP70, HSP90A	CTSL, HSP70, HSP90A	CTSL, HSP70, HSP90A
Longevity regulating pathway - multiple species	4.57	2.80	2.02	HSP70, CRYAB	HSP70, CRYAB	HSP70, CRYAB
Prion diseases	4.06	ns	1.70	HSP70, STIP1	0	HSP70, STIP1
Legionellosis	3.76	ns	1.53	SdhA, HSP70	0	SdhA, HSP70
Protein processing in endoplasmic reticulum	3.76	1.73	1.40	HSP70, HSP90A, CRYAB, BAG2	HSP70, HSP90A, CRYAB	HSP70, HSP90A, CRYAB, FBXO2
Measles	2.51	ns	ns	HSP70	0	0
Estrogen signaling pathway	2.51	ns	ns	HSP70, HSP90A	0	0
Toxoplasmosis	2.13	ns	ns	HSP70	0	0
Influenza A	1.75	ns	ns	trypsin, HSP70	0	0
Pancreatic secretion	1.61	ns	ns	amyA, trypsin, PNLIP	0	0
Caffeine metabolism	1.61	ns	ns	xdh, uaZ	0	0
Starch and sucrose metabolism	1.59	ns	ns	amyA, malZ	0	0
Steroid hormone biosynthesis	1.56	ns	ns	UGT, CYP3A	0	0
Chemical carcinogenesis	1.52	ns	ns	UGT, CCBL, CYP3A	0	0
Quorum sensing	ns	ns	1.70	0	0	chitinase, GAD

同样地，对长期高温胁迫下 3 个生命阶段的差异表达基因进行了 KEGG 注释分类和富集分析，结果显示通路富集情况与短期高温胁迫的结果相差较大（表 4.5）。高温处理 5 d 的差异表达基因富集到了 249 个通路，其中显著富集到 7 个通路，分别是细胞周期（Cell cycle）、DNA 复制（DNA replication）、内质网蛋白的加工途径、朊病毒疾病、果蝇的刺猬信号通路（Hedgehog signaling pathway - fly）和酵母的减数分裂途径（Meiosis - yeast）等。其中有 6 个热激蛋白基因富集到内质网蛋白的加工途径，相比于短期高温胁迫富集通路的热激蛋白，增加了 1 个新的 HSP70 蛋白，可能表明不同的热激蛋白响应高温胁迫的阶段不同。高温处理 10 d 差异表达基因富集到了 281 个通路，其中显著富集到了细胞周期、酒精中毒（Alcoholism）、范可尼贫血病途径（Fanconi anemia pathway）、溶酶体（Lysosome）、糖胺聚糖（Glycosaminoglycan）、同源重组（Homologous recombination）和 p53 信号通路（p53 signaling pathway）等 9 个通路。其中 p53 信号通路中，*PpPTEN* 的 FPKM 值在高温处理 10 d 时显著下调为对照组的 45.7%，由此推测 *PpPTEN* 的表达量降低可能促进了 IIS/TOR 信号通路网的上调。高温处理 15 d 的差异表达基因富集到了 317 个通路，共有 24 个显著富集通路。高温胁迫 15 d 时已经接近蝶蛹金小蜂寿命的终点，可以发现显著富集的通路中包含与癌症有关的通路，如癌症途径（Pathways in cancer）、前列腺癌（Prostate cancer）和癌症中的微 RNA（MicroRNAs in cancer）。此外，*PpPTEN* 在高温处理 15 d 时进一步下调为对照的 40.6%，且显著富集到了 FOXO 信号通路和 p53 信号通路。从图 4.10 可以发现，高温处理 15 d 时 FOXO 信号通路上的差异表达基因可能与蝶蛹金小蜂寿命相关基因存在广泛联系。

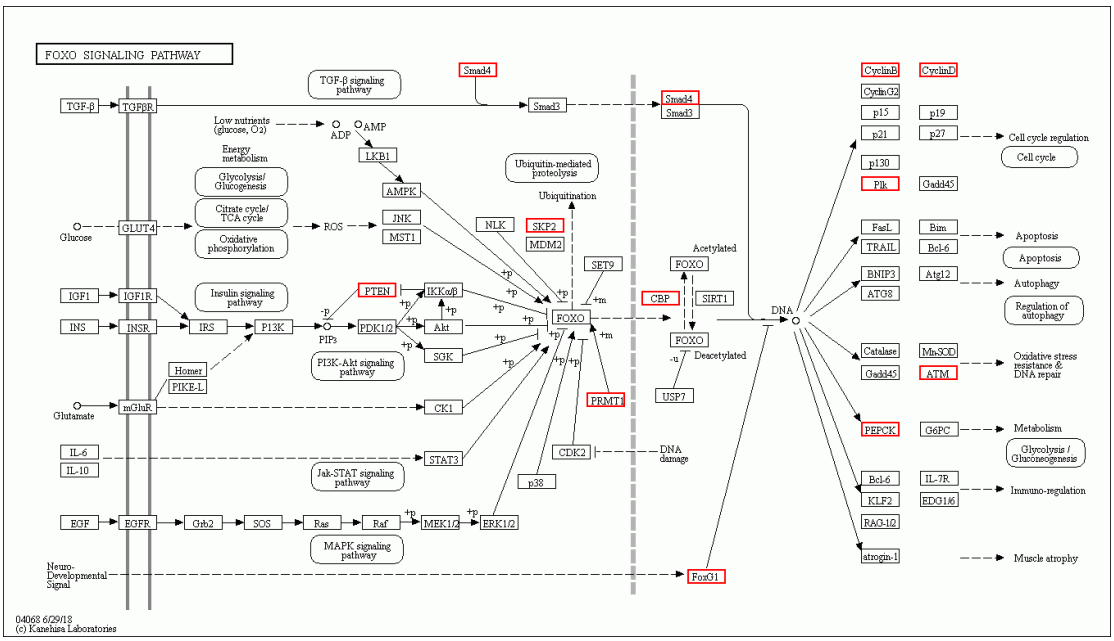

图 4.10 高温处理 15 d 的 FOXO 信号通路的基因差异表达情况

Figure 4.10 DEGs of FOXO signaling pathway at 15 d.

表 4.5 长期高温胁迫下差异表达基因 KEGG 通路富集结果

Table 4.5 KEGG enrichment of DEGs under long-term heat stress

通路	-LOG10(FDR)			差异基因 DEGs		
	5 d	10 d	15 d	5 d	10 d	15 d
Antigen processing and presentation	2.11	ns	ns	CTSL, HSP70, HSP90A, HSPA5	0	0
Prion diseases	1.54	ns	ns	HSP70, HSPA5, STIP1	0	0
Cell cycle	5.70	2.41	14.59	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MAD2, MCM3, MCM6, SKP1, EP300, PCNA, CCNE, CDC45, ATR, CHEK2, TTK, CCND2	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MCM3, MCM6, SKP1, CDC20, EP300, CCNB1, CCNE, CDC45, ATR, CHEK2, TTK	CDK1, MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MAD2, MCM2, MCM3, MCM6, ORC3, SKP1, CDC20, SKP2, EP300, SMAD4, ATM, PCNA, CCNB1, CCNE, CCNA, CDC45, PLK1, ATR, CHEK2, PRKDC, TTK, CCND2
DNA replication	4.19	1.76	4.16	MCM5, MCM7, MCM4, POLA2, POLE, POLD2, MCM3, MCM6, PRI1, PCNA, RFA1, RFA2, DNA2, LIG1	MCM5, MCM7, MCM4, POLE, POLD2, MCM3, MCM6, PRI1, RFA1, RFA2, DNA2, RFC3	MCM5, MCM7, MCM4, POLA2, POLE, POLD2, MCM2, MCM3, MCM6, PRI1, PRI2, PCNA, RFA1, RFA2, DNA2, LIG1, RFC2 4, RFC3_5
Cell cycle - yeast	4.19	2.06	8.73	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MAD2, MCM3, MCM6, SKP1, CDC45, CHEK2, SMC2, YCG1, TTK	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MCM3, MCM6, SKP1, CDC20, CDC45, CHEK2, SMC2, YCG1, TTK	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, PRMT5, MAD2, MCM2, MCM3, MCM6, ORC3, SKP1, CDC20, CDC45, CHEK2, SMC2, BRRN1, YCS4, YCG1, TTK
Hedgehog signaling pathway - fly	1.50	ns	5.30	SKP1, FU, EN, SPOP	0	SKP1, PKA, HH, SMO, FU, SPOP
Meiosis - yeast	1.37	ns	1.72	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MAD2, MCM3, MCM6, CDC45	0	MCM5, MCM7, MCM4, CDC6, CDC7, MAD2, MCM2, MCM3, MCM6, ORC3, CDC20, PKA, CDC45
Alcoholism	ns	2.06	1.33	0	CALM, PKA, ATF4, GNAO, GRIN2B, SLC18A1 2, H2A, H2B, H3, H4, HAT1	CALM, PKA, ATF4, GNAO, SLC18A1 2, H2A, H2B, H3, H4, HAT1

Fanconi anemia pathway	ns	1.93	2.81	0	RAD51, ATR, RFA1, RFA2, FANCD2, FANCI, BLM, BRIP1	RAD51, ATR, RFA1, MLH1, RFA2, PMS2, FANCD2, FANCI, FANCM, BLM
Lysosome	ns	1.47	ns	0	GNS, uidA, FUCA, CTSL, GLB1, SLC11A1, HEXA_B, NPC1, NPC2	0
Glycosaminoglycan degradation	ns	1.47	ns	0	GNS, uidA, GLB1, HEXA_B	0
Homologous recombination	ns	1.47	1.56	0	POLD2, RAD51, RFA1, RFA2, RAD54L, RAD54B, BLM, BRIP1	POLD2, RAD51, ATM, RFA1, RFA2, RAD54L, RAD54B, BLM, BRCC3
p53 signaling pathway	ns	1.47	2.63	0	PTEN, CCNB1, CCNE, ATR, CHEK2, RRM2	PTEN, CDK1, ATM, CCNB1, CCNE, ATR, CHEK2, CCND2, RRM2
Pathways in cancer	ns	ns	3.56	0	0	GST, PTEN, CALM, FZD9_10, SKP1, SKP2, HSP90A, PKA, RAD51, EP300, SMAD4, XIAP, ITGB1, PLCB, SMO, CCNE, CCNA, BIRC5, MLH1, MSH2, MSH6, HEY, TRAF4, CCND2
Oocyte meiosis	ns	ns	3.14	0	0	CDK1, CALM, MAD2, CPEB, SKP1, CDC20, PKA, PPP3C, CCNB1, CCNE, PLK1, AURKA
FoxO signaling pathway	ns	ns	3.14	0	0	PTEN, PCK, SKP2, EP300, SMAD4, ATM, CCNB1, PLK1, PLK4, FOXG, CCND2, PRMT1
TGF-beta signaling pathway	ns	ns	3.06	0	0	SKP1, EP300, SMAD4, FST
Mismatch repair	ns	ns	2.63	0	0	POLD2, PCNA, RFA1, MLH1, MSH2, MSH6, RFA2, EXO1, LIG1, RFC2_4, RFC3_5, PMS2
Herpes simplex infection	ns	ns	2.61	0	0	CDK1, PER2, SKP1, TAF5, SKP2, EP300, EIF2AK3, THOC4, SFRS7
Wnt signaling pathway	ns	ns	2.32	0	0	FZD9 10, SKP1, PKA, PPP3C, EP300, SMAD4, PLCB, CCND2

Circadian rhythm	ns	ns	2.32	0	0	PER2, SKP1
Prostate cancer	ns	ns	2.29	0	0	GST, PTEN, HSP90A, ATF4, EP300, CCNE
Hepatitis B	ns	ns	2.26	0	0	PTEN, ATF4, EP300, SMAD4, PCNA, CCNE, CCNA, BIRC5
HTLV-I infection	ns	ns	1.72	0	0	POLE, POLD2, MAD2, FZD9 10, CDC20, PKA, PPP3C, ATF4, EP300, SMAD4, XIAP, ATM, PCNA, ATR, CHEK2, TRRAP, MSX, CCND2
Hedgehog signaling pathway	ns	ns	1.72	0	0	PKA, SMO, LRP2, CCND2, SPOP
Glucagon signaling pathway	ns	ns	1.56	0	0	LDH, PCK, CALM, FBP, PKA, PPP3C, ATF4, EP300, PLCB, PRMT1
MicroRNAs in cancer	ns	ns	1.56	0	0	DNMT1, PTEN, EP300, ATM, CCNE, CCND2, TPM1, TRIM71
Progesterone-mediated oocyte maturation	ns	ns	1.44	0	0	CDK1, MAD2, CPEB, HSP90A, PKA, CCNB1, CCNA, PLK1, AURKA

2.4 基因加权共表达网络分析（WGCNA）

对短期和长期高温处理的蝶蛹金小蜂转录组的差异表达基因的分析可以发现，虽然不同生命阶段的差异表达基因的 GO 功能富集和 KEGG 通路富集可以解释一些基因调控与热胁迫造成短寿的相关性，但差异基因的分析只能分析同一个时间点的一对处理组和对照组之间的基因差异表达情况。同时，由于表达量的硬阈值设定问题（即以表达量的 p<0.05，|log2FC|>1 作为差异基因），使得差异基因的筛选具有一定的主观性和不确定性。具体地说，基因随着高温胁迫处理的时间推移表现出一个连续变化的过程，高温胁迫对基因表达量的影响可能是随着时间不断放大的，因此可能存在着一些关键的基因，其表达量的差异却没有达到显著水平，这点在基因聚类分析结果也有体现。所以，本实验样本量大、生命阶段众多、数据繁杂的特点使得传统的分析方法很难从海量的信息中筛选出关键基因。为了系统性地识别高温胁迫造成蝶蛹金小蜂雌蜂短寿的转录信号，对短期和长期高温处理的 6 个不同生命阶段共 36 个样品产生的 RNA-seq 数据集进行了基因加权共表达网络分析。

2.4.1 构建所有生命阶段的基因共表达网络

用高温胁迫下蝶蛹金小蜂的 RNA-seq 数据集构建了一个基因共表达网络（图 4.11），系统性地测量了 36 个样品中所有表达基因的成对相关性，高度相关的基因簇会被划分到一起。对相似的模块进行合并之后，共表达网络中的所有基因被划分到了 36 个基因簇模块。

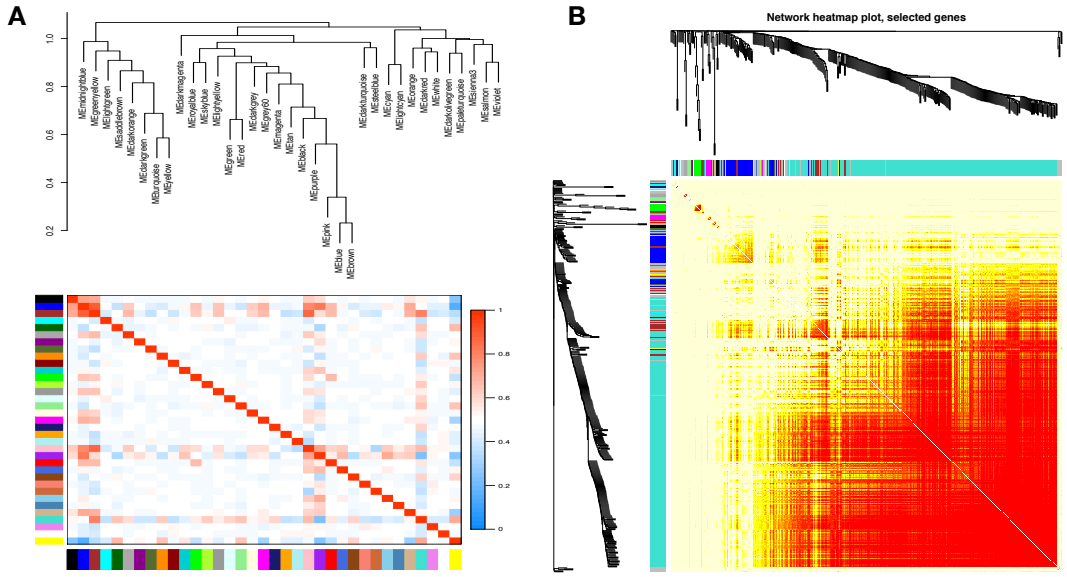

图 4.11 基因共表达网络的可视化

Figure 4.11 Visualization of gene co-expression network

注：（A）模块聚类树状图和模块特征向量（MEs）的层次聚类图，显示模块之间的关系，左侧和底部的每个色块表示一个模块，相同的颜色表示同一个色块。热图中红色表示高邻接度（~+1），蓝色表示低邻接度（~0）；（B）随机选取 500 个基因的拓扑重叠矩阵（TOM）热图，显示了基因之间的配对关系。每个行/列对应一个基因。浅黄色表示低拓扑重叠，深红色表示高拓扑重叠，意味着在 36 个样本中，基因对的表达具有高相关性。基因树状图和模块划分图用不同的颜色沿着左边和顶部描绘。(A) Hierarchical clustering diagram of module clustering dendrograms and module eigengenes (MEs) showing the relationship between modules, with each color block on the left and bottom indicating a module, and the same color indicating the same block. Red in the heat map indicates high adjacency (~ +1) and blue indicates low adjacency (~ 0); (B) Heat map of topological overlap matrix (TOM) of 500 randomly selected genes showing the pairwise relationships between genes. Each row/column corresponds to one gene. Light yellow indicates low topological overlap and dark red indicates high topological overlap, implying high correlation in the expression of gene pairs across the 36 samples. Gene dendrograms and module delineation maps are depicted in different colors along the left and top.

2.4.2 鉴定与寿命相关的模块

构建了基因共表达网络之后，又对所有模块与蝶蛹金小蜂寿命的关系进行了相关性分析，以确定哪些模块和高温胁迫下蝶蛹金小蜂寿命相关（图 4.12 A）。根据模块-性状的热图中每个模块与性状的相关性和 *p* 值，鉴定出了 5 个可能和高温胁迫下蝶蛹金小蜂长寿命性状相关的候选模块，并计算了 5 个候选模块中与其他基因关联度最高的枢纽基因（表 4.6）。其中有 4 个模块与长寿命性状负相关，模块名称和包含的基因数目如下：blue 模块（1045 个基因）、brown 模块（697 个基因）、pink 模块（110 个基因）和 purple 模块（83 个基因）。另外，还有一个 yellow 模块与长寿命性状正相关，该模块中包含 149 个基因。通过聚

类分析研究候选模块之间的关系（图 4.12 A）发现，blue 模块和 brown 模块被聚在一起，purple 模块和 pink 模块也被聚在了一起，而 yellow 模块与其他候选模块都在聚类分析中分开。

表 4.6 候选模块中关联度最高的枢纽基因

Table 4.6 The most highly connected hub genes in the candidate modules

模块颜色	基因 ID	描述
blue	PPU15815-RA	Protein FAM50 homolog
brown	PPU08660-RA	RNA polymerase II elongation factor ELL
pink	PPU12978-RA	Venom serine protease Bi-VSP
purple	PPU16576-RA	60S ribosomal protein L8
yellow	PPU08277-RA	Piwi-like protein Ago3

对以上 5 个候选模块进一步分析，计算模块中每一条基因与目标性状的相关性（GS）与模块里的基因与该模块的相关性（MM）的相关性，用散点图表示（图 4.12 B-F）。可以发现，blue 模块的所有基因散点呈现出一条斜率为 1 的直线，GS 和 MM 的相关性达到了 0.7，显著地高度相关（p<0.05）。这说明 blue 模块中的基因既与目标性状显著相关，又与该模块显著相关。此外，brown 模块和 purple 模块的 GS 和 MM 相关性也达到中度相关（cor>0.4，p<0.05）。

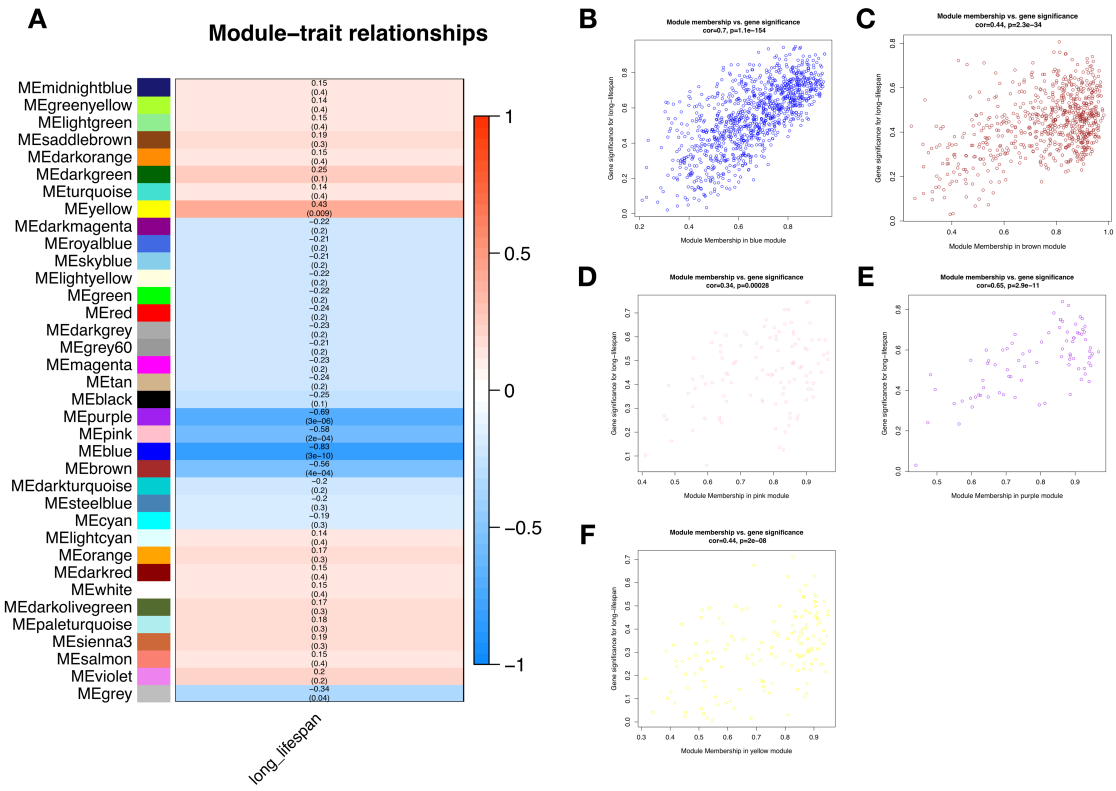

图 4.12 与高温胁迫下蝶蛹金小蜂寿命相关的模块鉴定

Figure 4.12 Identification of modules related to long lifespan of *P. puparum* under heat stress.

注：（A）模块-性状相关性热图。每一行都是一个模块的特征向量（ME），模块的名字在热图左侧用文字和色块标记。纵列代表的性状是蝶蛹金小蜂寿命较长。每一单元中标记了这一模块与长寿命的相关性和 p 值，其中 p 值在括号中标出，$p<0.05$ 表示该模块与长寿命性状显著相关。蓝色表示负相关（～ -1），红色表示模块和性状之间的正相关（～ +1）；（B）模块 blue 的 GS 和 MM 的相关性散点图，每个点表示一个基因；（C）模块 brown 的 GS 和 MM 的相关性散点图；（D）模块 pink 的 GS 和 MM 的相关性散点图；（E）模块 purple 的 GS 和 MM 的相关性散点图；（F）模块 yellow 的 GS 和 MM 的相关性散点图。(A) Heat map of module-trait correlations. Each row is a module eigengene (ME), and the module's name is marked with text and a color block on the left side of the heatmap. The vertical columns represent traits with longer lifespan of *P. puparum*. The correlation and *p*-value of this module with longevity are marked in each cell, where *p*-values are indicated in parentheses and $p<0.05$ indicates that the module is significantly correlated with the longevity trait. Blue indicates negative correlation (~ -1) and red indicates positive correlation (~ + 1) between the module and the trait; (B-F) Scatter plot of correlations between GS and MM of candidate modules. Each point indicates a module member (i.e. gene) assigned to each module.

确定 blue 模块为关键模块后，运用 cytoscape 软件工具 cytoHubba 对 blue 模块中的枢纽基因进行网络可视化（图 4.13），计算了 MCC、DMNC、Degree 等 12 个参数。根据节点基因在网络中的属性进行排名，筛选出 Degree>5 的基因作为关键基因（表 4.7）。从图表中可以看出，blue 模块中 Degree>5 的基因有 9 个，分别是 *PpXAP5*（PPU15815-RA）、*PpINO1*（PPU15477-RA）、*PpPPP6A*（PPU06685-RA）、*PpESD17B8*（PPU11226-RA）、*PpCathL*（PPU00866-RA）、*PpGST1C*（PPU08124-RA）、*PpMf2*（PPU10765-RA）、*PpSEC11C*（PPU16943-RA）和 *PpCRYAB1*（PPU04131-RA）。其中在基因互作网络中关联度最高的基因有 *PpXAP5*、*PpPPP6A*、*PpCathL*、*PpCRYAB1* 和 *PpINO1*。

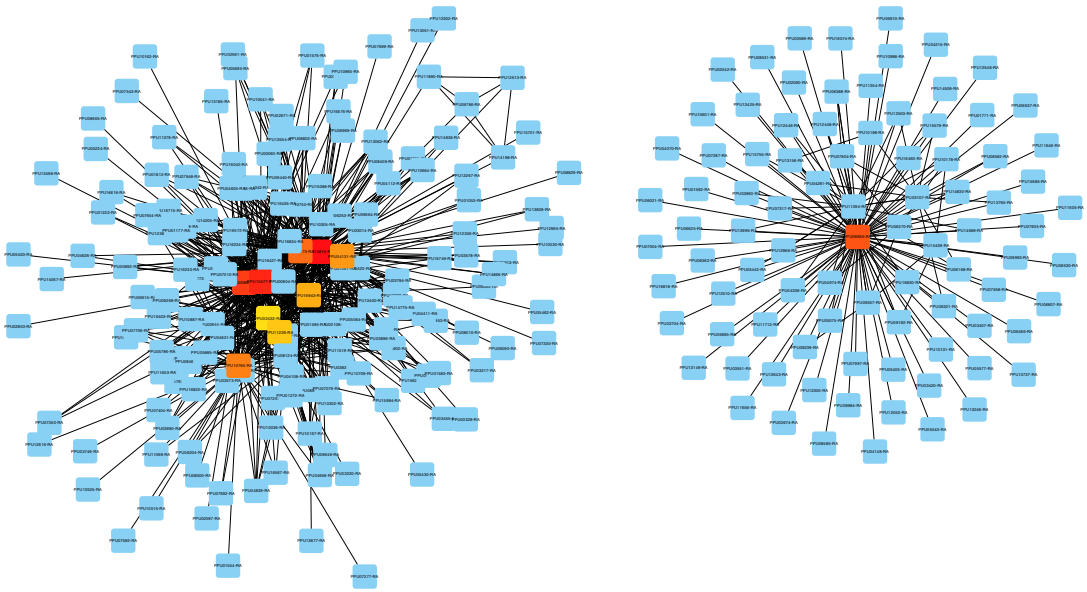

图 4.13 CytoHubba 工具实现基因网络图可视化

Figure 4.13 Gene network visualization using CytoHubba.

注：基因互作网络中的每一个节点（node）表示一个基因，红色表示 Degree 值高，每一条连线表示两个基因间的关系。Each node (node) in the gene interaction network represents a gene, red color indicates a high Degree value, and each connecting line indicates the relationship between two genes.

表 4.7 CytoHubba 中 12 种计分方法排序靠前的基因

Table 4.7 Top-ranked genes for 12 scoring methods in CytoHubba

节点基因 ID	MCC	DMNC	MNC	Degree	EPC	Bottle Neck	EcCentricity	Closeness	Radiality	Betweenness	Stress	Clustering Coefficient
PPU15815-RA	29.00	0.26	7.00	22.00	30.64	41.00	0.08	47.17	1.94	2846.90	6768.00	0.03
PPU15477-RA	36.00	0.22	11.00	19.00	31.84	29.00	0.08	46.25	1.95	1768.79	5124.00	0.08
PPU06685-RA	18.00	0.00	1.00	18.00	7.75	22.00	0.03	19.33	0.34	402.00	402.00	0.00
PPU11226-RA	35.00	0.19	13.00	16.00	31.74	45.00	0.08	46.92	1.98	1898.12	4838.00	0.13
PPU00866-RA	16.00	0.00	1.00	16.00	27.05	18.00	0.07	41.63	1.85	1870.91	5492.00	0.00
PPU08124-RA	26.00	0.24	9.00	13.00	30.01	8.00	0.07	41.77	1.88	1305.29	3122.00	0.13
PPU10765-RA	13.00	0.31	3.00	12.00	23.91	11.00	0.07	36.20	1.71	1216.95	2914.00	0.03
PPU16943-RA	10.00	0.31	2.00	10.00	25.20	9.00	0.07	37.60	1.81	906.27	2302.00	0.02
PPU04131-RA	7.00	0.00	1.00	7.00	17.41	5.00	0.07	30.97	1.60	682.11	2676.00	0.00

注：根据 CytoHubba 提供了 12 种拓扑分析方法计算，基因按 Degree 排名。The genes are ranked by Degree, calculated according to 12 topological analysis methods provided by CytoHubba.

2.5 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

结合转录组差异表达基因和 WGCNA 分析结果，选择了一些基因（包括热激蛋白、组织蛋白酶等），在高温胁迫处理后重新取样，进行 qPCR 检验。尽管高温和常温下这些基因的定量结果与转录组测序的结果存在一定的差异，但总体的表达趋势大致相同（图 4.14）。

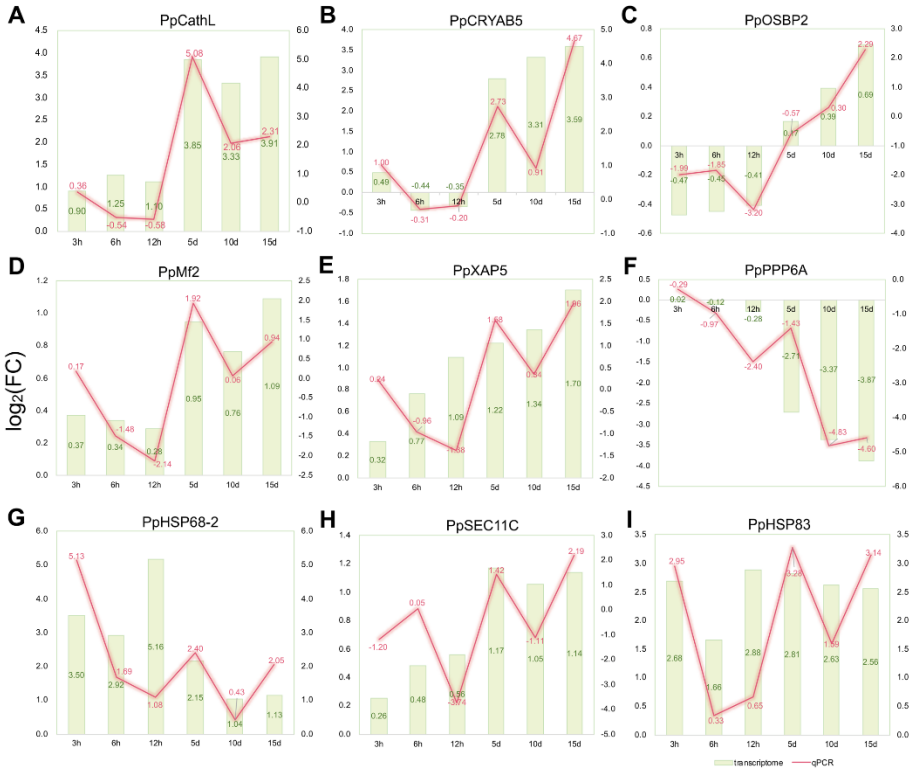

图 4.14 转录组中差异基因的表达量及其 qPCR 结果比较

Figure 4.14 Comparison of fold change in gene expression from DEGs and qPCR results.

注：横坐标为蝶蛹金小蜂的 6 个生命阶段。纵坐标为 log_2FC。主要纵坐标为 RNA-seq 结果，以柱状图表示。次要纵坐标为 qPCR 结果，以折线图表示。The x-axis is the six sampling time points. The y-axis is log_2FC. The primary y-axis is the RNA-seq results, represented as a bar graph. The secondary y-axis is the qPCR results, represented as a line graph.

2.6 候选基因在热应激反应中的功能研究

从上文中的转录组差异表达基因的筛选富集和 WGCNA 分析结果中，鉴定出了一些候选的关键基因。在 qPCR 检测确定了这些基因或相关基因响应热胁迫处理的可靠性后，对这些候选基因进行 RNA 干扰实验。经过显微注射双链 RNA 的蝶蛹金小蜂雌蛹在 3 d 左右羽化，在羽化后 48 h 取样检测双链 RNA 的干扰效率（图 4.15 和图 4.16）。

对基因共表达网络的几个关键基因进行 RNA 干扰的显示，RNA 干扰 *PpELL* 效果极显著，*dsPpELL* 的表达量仅为对照组的 0.13，干扰效率为 87.0%（p=0.0002，图 4.15 A）。*PpXAP5* 的干扰效果显著，*dsPpXAP5* 的干扰效率为 69.3%（p=0.0322，图 4.15 B）。*PpCathL* 的干扰效果达到极显著水平，*dsPpCathL* 的干扰效率为 66.9%（p=0.0063，图 4.15 C）。*dsPpPPP6A* 的干扰效率为 47.7%，表达量显著降低（p=0.0320，图 4.15 D）。

统计 RNA 干扰后的蝶蛹金小蜂雌蜂的寿命，生存曲线表明注射 *dsPpELL* 后蝶蛹金小蜂的寿命相比注射 *dsLuc* 的对照组显著缩短（p<0.0001），平均寿命为 5.9 d 相比对照组的平均寿命 21 d 缩短了 72%（图 4.15 E）。注射 *dsPpXAP5* 后蝶蛹金小蜂的平均寿命为 7.0 d，相比对照组的平均寿命 13 d 显著缩短（p<0.0001，图 4.14F）。注射 *dsPpCathL* 后蝶蛹金小蜂的寿命平均寿命为 9.4 d，相比注射 *dsLuc* 的对照组显著缩短了 18%（p<0.0001，图 4.15 G）。注射 *dsPpPPP6A* 后蝶蛹金小蜂的平均寿命为 12.3 d，与注射 *dsLuc* 对照组的平均寿命 11.5 d 相比无显著差异（p=0.9172，图 4.15 H）。

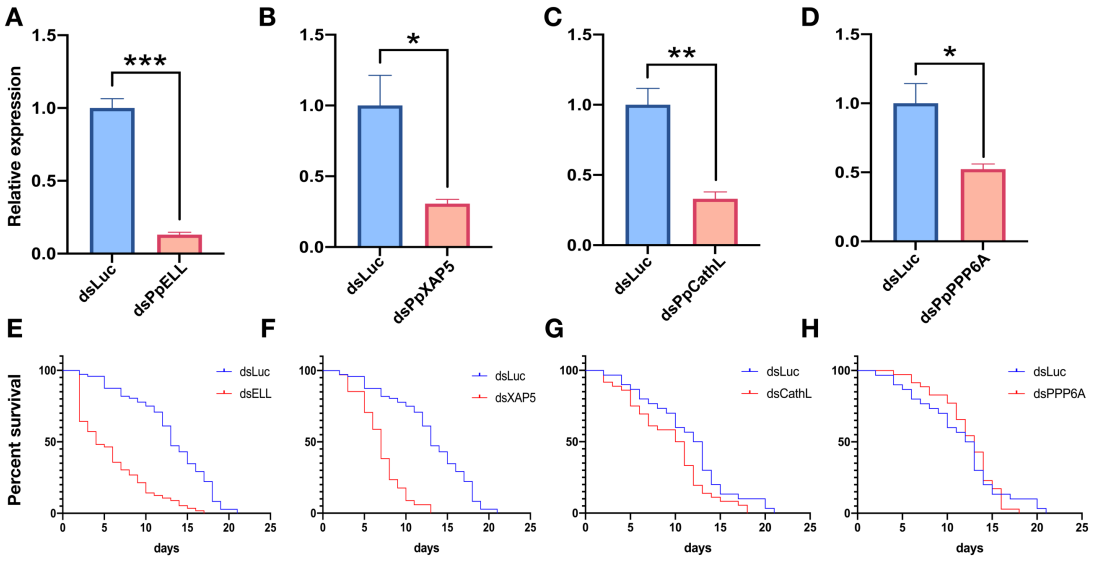

图 4.15 双链 RNA 对目标基因的干扰效率及寿命统计

Figure 4.15 RNAi efficiency and lifespan influence of five dsPpCRYAB

注：柱状图的 x 轴代表注射的 dsRNA，y 轴代表干扰的基因的相对表达水平。数据以平均值±标准误差表示。进行 Student's *t* 测验，与其相应对照相比*表示 p<0.05，**表示 p<0.01 以及***表示 p<0.001。The x-axis in the bar graph represents the injected dsRNA and the y-axis represents the relative expression levels of the interfered genes. Data are represented as mean ± standard error. Student's *t*-tests were performed, *means p<0.05 when compared to its corresponding control, **means p<0.01 and ***means p<0.001.

转录组数据中，有 5 个 CRYAB 基因在多个时期差异表达并显著富集到了寿命相关通路，*PpCRYAB1* 是其中表达量增加倍数最大的 CRYAB 基因。通过重复热胁迫处理的 qPCR 检验也确定了 *PpCRYAB1* 对高温环境的响应。注射双链 *dsPpCRYAB1* 进行干扰后，*PpCRYAB1* 表达量下降为对照组的 0.03，干扰效率高达 96.7%（p=0.0154，图 4.16 A）。然而，注射过 *dsPpCRYAB1* 的蝶蛹金小蜂平均寿命为 12.6 d，相比对照组的平均寿命 13.0 d 没有差异（图 4.16 B）。

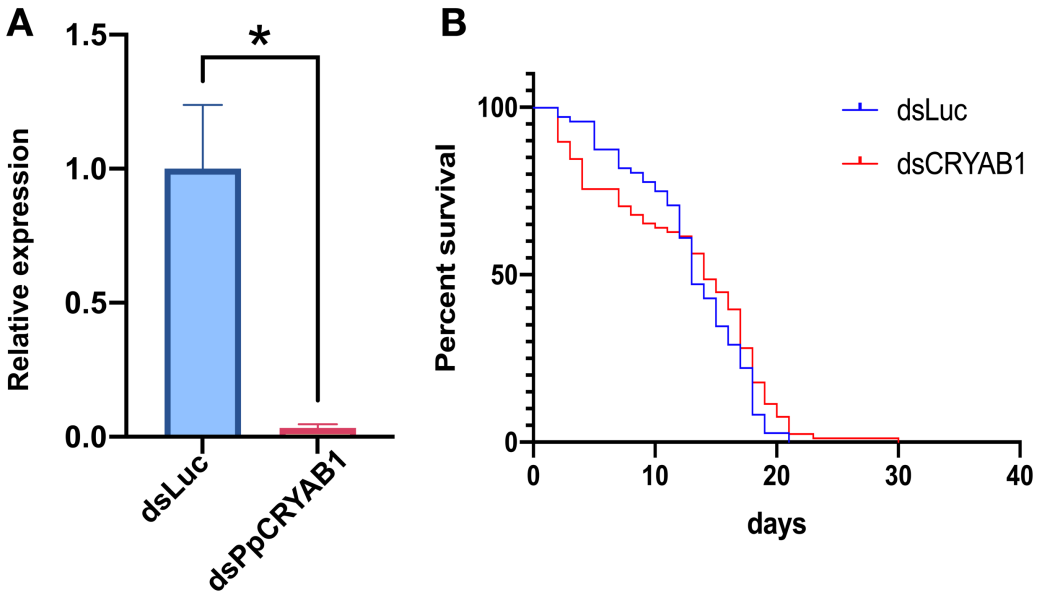

图 4.16 双链 RNA 对 *PpCRYAB1* 基因的干扰效率及寿命统计

Figure 4.16 RNAi efficiency and lifespan influence of five dsPpCRYAB1.

注：柱状图的 x 轴代表注射的 dsPpCRYAB1，y 轴代表干扰后 *PpCRYAB1* 的相对表达水平。数据以平均值±标准误差表示。进行 Student's *t* 测验，*表示 p<0.05。The x-axis in the bar graph represents the injected dsRNA and the y-axis represents the relative expression levels of *dsPpCRYAB1*. Data are represented as mean ± standard error. Student's *t*-tests were performed, *means p<0.05.

差异基因的分析结果显示有 5 个 *PpCRYAB* 基因都在热刺激后表达量显著增加，而单独干扰 *PpCRYAB1* 对蝶蛹金小蜂的平均寿命没有产生显著影响。推测它们的作用方式可能是相似且饱和式的。因此，接下来将靶向干扰 *PpCRYAB1*、*PpCRYAB2*、*PpCRYAB3*、*PpCRYAB4* 和 *PpCRYAB5* 的双链 RNA 等量混合并同时注射进蝶蛹金小蜂雌蛹中，检测干扰效率并进行寿命统计。qPCR 结果显示，所有 5 个 *PpCRYAB* 的表达量都有下降，其中 3 个基因的表达量被显著降低。*dsPpCRYAB1* 的干扰效率为 77.0%（p=0.0326），*dsPpCRYAB2* 的干扰效率为 63.9%（p=0.0109），*dsPpCRYAB3* 的干扰效率为 73.4%（p=0.0006），*dsPpCRYAB4* 的

干扰效率为 58.2%（p=0.0987），*dsPpCRYAB5* 的干扰效率为 40.8%（p=0.0659）。混合注射 *dsPpCRYAB* 的蝶蛹金小蜂寿命相比 *dsLuc* 显著降低了 47.8%，分别为 6.0 d 和 11.5 d（图 4.17）。

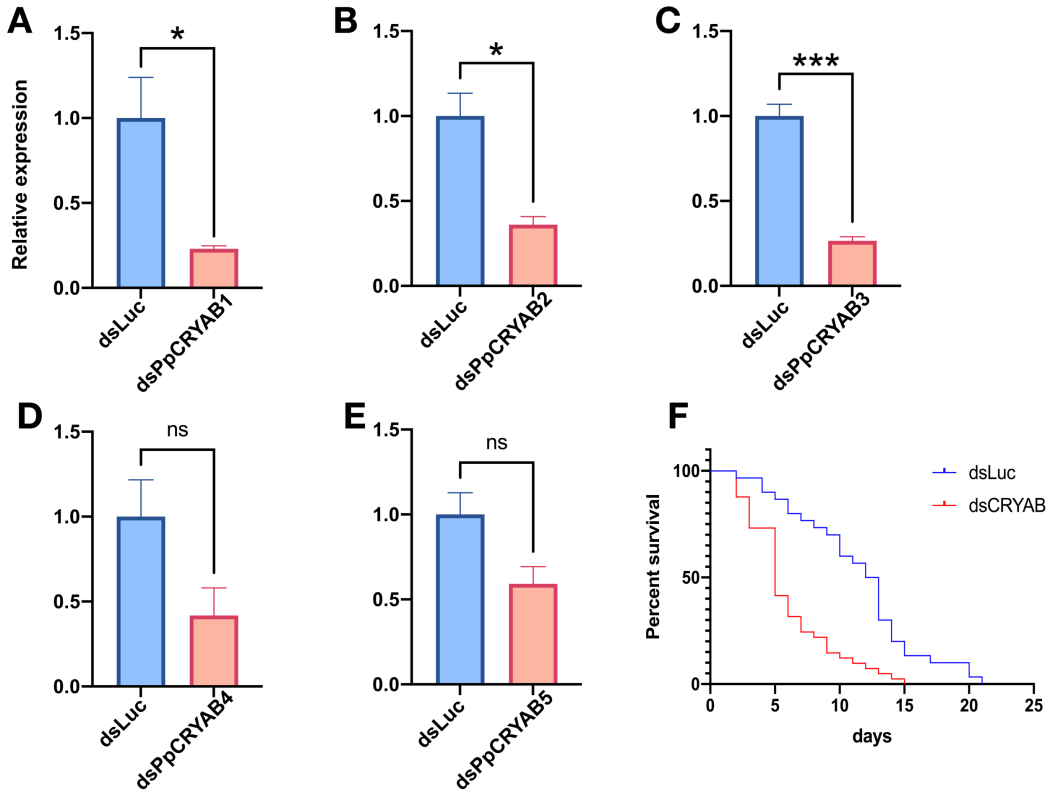

图 4.17 双链 RNA 对 5 个 *PpCRYAB* 基因的干扰效率及寿命统计

Figure 4.17 RNAi efficiency and lifespan influence of five dsPpCRYAB.

注：柱状图的 x 轴代表注射的 dsRNA，y 轴代表干扰的基因的相对表达水平。数据以平均值±标准误差表示。进行 Student's *t* 测验，与其相应对照相比*表示 p<0.05，***表示 p<0.001 以及 ns 表示 p>0.05。The x-axis in the bar graph represents the injected dsRNA and the y-axis represents the relative expression levels of the interfered genes. Data are represented as mean ± standard error. Student's *t*-tests were performed, *means p<0.05 when compared to its corresponding control, ***means p<0.001 and ns means p>0.05.

3 讨论

转录组测序可以系统地识别高温胁迫下寄生蜂分子水平的信号变化，预测其体内参与热应激的功能簇和信号通路，便于研究蝶蛹金小蜂响应和对抗热胁迫的分子机制。本章选取了蝶蛹金小蜂雌蜂的成虫样品分别对短期和长期高温（35ºC）处理后的系统进行了 RNA 测序。通过高质量的测序组装结合已知的基因组数据，得到了 14,946 个基因的表达模式，在高温处理的过程中差异表达的基因有 388 个可以注释到功能。在各个生命阶段中，差异上调和下调的基因数目大致相等。

GO 和 KEGG 的功能注释和富集分析描述了差异表达基因的功能和参与的生理过程。短期高温压力下，主要是氧化还原和代谢过程变化以响应热暴露。长期的高温压力下，细胞内 DNA 复制、转录和翻译等活动加剧。短期高温处理引起的差异基因主要是热激蛋白家族基因，包括 *HSP70*、*HSP90* 和 *sHSP*（*CRYAB*），富集在抗原加工、内质网蛋白加工和寿命调控通路。这一结果与果蝇、螟黄赤眼蜂温度胁迫转录组的结果相似 (Liu *et al.*, 2020)，HSP90 基因的转录在热诱导处理的黑腹果蝇幼虫中显著上调，且蛋白水平增加 (Neal *et al.*, 2006)。长期高温处理引起差异表达的基因主要是各种转录因子，在寄生蜂老龄阶段，差异基因显著富集到 FOXO 信号通路。作为一个公认的寿命因子，FOXO 信号通路的显著变化可能参与响应热胁迫的分子机制。

通过构建加权基因共表达网络，根据基因表达模式将所有基因分为 35 个模块，将模块与高温胁迫的性状相关联，本研究找到了可能与高温胁迫性状相关的几个模块。接着根据 MM 和 GS 的相关性筛选出了可能与高温胁迫影响关系最密切的模块。随后，对核心模块进行进一步的分析预测了几个可能的调控寿命的关键基因。通过定量 PCR 检测和 RNA 干扰实验，验证了几个 *sHSP* 在蝶蛹金小蜂响应热胁迫的应激反应中的有益作用。混合注射干扰 5 个 *PpCRYAB* 的 dsRNA 后蝶蛹金小蜂成虫寿命的急剧下降，表明 *PpCRYAB* 对寄生蜂抗热应激性有重要作用。值得注意的是，在干扰单基因 *PpCRYAB1* 时，在成虫羽化后的前 12d 的时间里，注射 dsPpCRYAB1 的处理组相比对照，其生存曲线有一个明显的下降，但 12d 后的曲线反而寿命更长。这可能说明高温处理会持续诱导 *PpCRYAB1* 的表达，在 *dsPpCRYAB1* 的干扰效果丧失之后，成蜂接近老龄期时 *PpCRYAB1* 的表达量上调仍然可以延长寄生蜂在热胁迫作用下的寿命。

同时，通过注射 dsRNA 对蛹期蝶蛹金小蜂分别降低 *PpELL*、*PpXAP5* 和 *PpCathL* 的表达量，羽化后在 35℃饲养，寄生蜂的成虫寿命相比对照组显著降低。认为 *PpELL*、*PpXAP5* 和 *PpCathL* 是蝶蛹金小蜂的热胁迫响应过程中的关键基因。*PpELL* 编码一个转录伸长因子，其果蝇中的同源基因 *dELL* 在整个发育过程中的各种组织中的基因表达中具有广泛的作用，能修饰各种突变表型，对多种基因的正常表达是必要的 (Eissenberg *et al.*, 2002)。*dELL* 可以抑制 RNA 聚合酶 II 的短暂停顿来提高其催化速率，可以调节 Ras 和 Notch 信号通路 (Eissenberg *et al.*, 2002)。细胞实验也证实了 p53 和 *ELL* 之间存在相互抑制的相互作用。在本

研究中，根据差异基因的通路富集情况，推测 *PpELL* 可能是通过 p53 信号通路或与其相关的 FOXO 信号通路发挥作用。在酵母中的研究显示，*XAP5* 在色氨酸修饰中起作用，参与染色质的调控，与组蛋白变体 H2A.Z 共同作用抑制异常转录 (Anver *et al.*, 2014)。在拟南芥中，*XAP5* 可作为光传感器，参与昼夜周期中的光调节。XAP5 家族蛋白在真核生物中高度保守，它们在不同生物中可能具有相似的分子功能 (Ellison *et al.*, 2011)。由此推测 *PpXAP5* 在热胁迫的响应有着类似的传感器和抑制异常转录保护细胞的功能。卡介素 Cathepsin 属于蛋白酶家族，由丝氨酸、天门冬氨酸和半胱氨酸肽酶组成，表现出内肽酶或外肽酶的活性 (Cao *et al.*, 2017)。半胱氨酸蛋白酶 Cathepsin L 通常在炎症条件下被激活，与细胞凋亡、抗原处理、肿瘤的发生和转移、肾脏疾病和病毒感染等有关 (Fonović and Turk, 2014)。抑制 Cathepsin L 常被作为一种治疗性靶点。与现有资料不太一致的是，本研究中 *PpCathL* 的表达量降低在高温下会显著缩短蝶蛹金小蜂寿命，说明它的诱导对寄生蜂在热应激下的生存是有益的。这一结果可能暗示 *PpCathL* 基因具有双相性，随环境条件的差异对寄生蜂的寿命表现出延长或缩短两种作用。

第五章 病毒 PpNSRV-1 对蝶蛹金小蜂影响的转录组分析

病毒或类病毒颗粒 VLPs（virion-like particles）作为一种环境应激因素，与多种寄生蜂之间存在广泛而密切的互作关系。在本实验室之前的研究中，Wang *et al.* (2017)在蝶蛹金小蜂中发现了一种新的非节段负义单链 RNA 病毒（命名为蝶蛹金小蜂负链病毒 PpNSRV-1）并对 PpNSRV-1 在寄生蜂种群中的流行分布情况和其对寄生蜂的影响进行了研究。该研究发现：病毒 PpNSRV-1 分布于带毒蝶蛹金小蜂各个组织，且存在于在雌蜂和雄蜂的各个发育阶段；PpNSRV-1 的病毒量在蝶蛹金小蜂成蜂羽化后的 4 d 以内迅速积累并在 5 d 左右达到峰值；带毒寄生蜂品系相比于不带毒寄生蜂品系的寿命显著延长，且这种长寿的效果在高温 35℃的条件下仍然成立。为了进一步确认病毒 PpNSRV-1 对寄生蜂寿命的影响，将病毒注入 PpNSRV-1(-)品系寄生蜂体内得到了 Injected(+)蝶蛹金小蜂。对照则是注入无病毒粗提液，得到了 Injected(-)蝶蛹金小蜂，消除了品系间遗传背景的差异。病毒 PpNSRV-1 注入后，病毒含量随着寄生蜂不断地发育也在稳步的增加。羽化后 3 d，病毒注射处理的寄生蜂其体内的病毒含量与自然品系寄生蜂体内的病毒含量很接近。对 Injected(+)和 Injected(-)的蝶蛹金小蜂进行寿命统计发现，Injected(+)寄生蜂的寿命要显著长于 Injected(-)寄生蜂。目前 PpNSRV-1 病毒造成的寿命延长和后代性比下降等生理现象的分子机理仍不清楚。在本章中，就对带病毒 PpNSRV-1 的 Injected(+)和不带病毒的 Injected(-)蝶蛹金小蜂进行了转录组测序分析，以探索 PpNSRV-1 对蝶蛹金小蜂的寿命调控机制。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及样品准备

转录组测序建库所用的是带病毒 PpNSRV-1 的 Injected(+)和不带病毒的 Injected(-)蝶蛹金小蜂雌成虫。蝶蛹金小蜂的饲养方法同第二章 1.1。实验室 Injected(+)蝶蛹金小蜂群体通过提取病毒 PpNSRV-1 注入 PpNSRV-1(-)品系寄生蜂体内得到，注入无病毒粗提液得到 Injected(-)蝶蛹金小蜂 (Wang *et al.*, 2017)。每一代进行病毒 PpNSRV-1 的 qPCR 检测，选取带毒的蝶蛹金小蜂雌蜂和雄蜂充分交配后收集子代，在实验室连续培养三代后获得稳定带毒 Injected(+)群体。病毒 PpNSRV-1 的 qPCR 定量检测参考第二章 1.4。

分别在羽化后 12 h 内（设定为 0 d）、5 d、10 d 和 15 d 取稳定带毒 Injected(+)蝶蛹金小蜂雌蜂作为病毒处理组，同样地取不带毒的 Injected(-)蝶蛹金小蜂雌蜂作为对照组。每个处理设置 3 个重复，每个重复收集 5 头雌蜂，用 TRIzol 处理后快速冷冻在-80℃下保存。共有 8 组 24 个样品用于 RNA-Seq 及后续差异表达分析。

1.2 RNA-seq 文库构建及分析

将 Injected(+)和 Injected(-)的蝶蛹金小蜂雌蜂的 24 个样品分别抽提 RNA 后进行质检，样品的处理和 RNA 抽提过程同第二章 1.4。质检合格的样品构建文库进行测序。测序基于 HiSeq 平台，对蝶蛹金小蜂特定时间点转录的所有 mRNA 进行测序。实验采用 Illumina TruseqTM RNA sample prep Kit 方法进行文库构建，文库构建的操作流程参考第四章 1.2。

1.3 基因表达分析

参照第四章 1.3。

1.4 差异基因 GO 和 KEGG 通路富集分析

参照第四章 1.4。

1.5 基因加权共表达网络分析（WGCNA）

根据 WGCNA 流程，用所有 24 个样本的 RNA-seq 数据集构建了基因共表达网络，过程参考第四章 1.5。首先对基因组数据进行处理，用过滤后的数据构建了一个基因的共表达相关性矩阵，用 power 邻接函数将相关性矩阵转换邻接矩阵，确定软阈值为，使得基因表达关系接近无尺度网络。然后，构建拓扑重叠矩阵，从直接和间接两个方面综合分析两个基因之间的关系。基于 TOM 值的相异度进行层次聚类分析，得到聚类树状图，用动态剪枝法进行模块划分，其中设定最小模块大小为 30，合并模块阈值为 0.2。为了评估共表达基因簇与 PpNSRV-1 病毒影响下蝶蛹金小蜂寿命的相关性，设定所有带毒 Injected(+)处理组样本为 0（寿命延长），不带毒对照组样本为 1（寿命较短）。对一个模块里的基因做主成分分析计算 ME，随后计算 ME 和性状之间的相关性系数，展示为一个热图。计算模块的基因相关性 GS 和模块成员 MM，计算 GS 和 MM 的相关性并作散点图。如果某个基因的 GS 和 MM 接近于 1，则认为该基因与模块中的其他基因具有较高的正相关关系，与性状高度正相关。筛选出与性状高度相关的目标模块之

后，选择模块内 kME>0.8 的基因作为待定的枢纽基因。随后，用 cytoscape 的 cytoHUBBA 软件计算节点连接度，取靠前的基因作为枢纽基因。

2 结果与分析

2.1 转录组组装质量与测序数据

对质量修剪过滤后的序列进行数据量统计（表 5.1），带 PpNSRV-1 病毒的 FM+处理组和不带病毒的 FM-对照组共 24 个样品共获得了 803,858,185 条高质量测序数据。全部 24 组测序数据 Q30 碱基百分比均大于 94%，测序质量较好。

表 5. 1 转录组测序产量统计

Table 5.1 Transcriptome sequencing yield

样品名称	处理	序列数（条）	碱基数（bp）	Error%	Q30%	GC%
FM-Pp0d-1	Control	30608569	4413357555	0.0125	94.61	44.45
FM-Pp0d-2	Control	30811050	4444960266	0.0125	94.57	44.57
FM-Pp0d-3	Control	25150505	3611544246	0.0127	94.42	44.38
FM-Pp5d-2	Control	30600584	4417935793	0.0122	95.14	44.91
FM-Pp5d-3	Control	32023961	4623711643	0.0121	95.21	44.53
FM-Pp5d-4	Control	46424212	6749465469	0.0122	95.04	45.83
FM-Pp10d-1	Control	35042336	5079836920	0.0121	95.15	43.66
FM-Pp10d-2	Control	42878624	6219628312	0.012	95.33	43.49
FM-Pp10d-3	Control	37166733	5385167142	0.012	95.31	43.39
FM-Pp15d-1	Control	41741043	6044064810	0.0123	94.92	44.24
FM-Pp15d-2	Control	36171366	5252292049	0.012	95.24	44.37
FM-Pp15d-3	Control	21486758	3100647657	0.0124	94.84	44.28
FM+Pp0d-1	PpNSRV-1	26298715	3772752757	0.0126	94.43	44.49
FM+Pp0d-2	PpNSRV-1	33405204	4803081616	0.0125	94.67	44.01
FM+Pp0d-3	PpNSRV-1	25847867	3708284152	0.0126	94.51	44.65
FM+Pp5d-1	PpNSRV-1	31993322	4621938444	0.0125	94.59	44.48
FM+Pp5d-2	PpNSRV-1	31151644	4478457002	0.0127	94.35	44.36
FM+Pp5d-3	PpNSRV-1	35123679	5087512808	0.0122	94.95	44.75
FM+Pp10d-1	PpNSRV-1	29922354	4319261895	0.0122	95.14	43.53
FM+Pp10d-2	PpNSRV-1	31288108	4526567791	0.0121	95.24	44.43
FM+Pp10d-3	PpNSRV-1	36170837	5253423120	0.012	95.27	43.82
FM+Pp15d-1	PpNSRV-1	33267895	4815958697	0.0122	95.03	44.19
FM+Pp15d-3	PpNSRV-1	28607469	4105780250	0.0124	94.79	43.83
FM+Pp15d-4	PpNSRV-1	50675350	7405754092	0.0124	94.85	45.33

注：Q30% ：Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基的百分比；Error %：碱基错误率；GC %：碱基 G 和 C 的数量总和占总的碱基数量的百分比。Q30%: percentage of bases with Phred values greater than 30 to the total number of bases; Error %: base error rate; GC %: sum of the number of bases G and C as a percentage of the total number of bases.

2.2 病毒 PpNSRV-1 对基因表达的影响

对基因组上所有基因进行主成分分析（图 5.1A），每组处理的 3 个生物学重复取质心作图，连线的 3 个顶点代表每一个生物学重复。图中样品的分布情况显示，有 3 个处理组和 3 个对照组的样品重复性较好，没有离群样本。在 4 个生命阶段，同一时间的 FM+处理组和 FM-对照组均可用主成分 PC1（42.9%）进行区分。FM+处理组在 0 d 时的三个重复样品存在一定差异，但每个重复都可用 PC2（29.2%）与 0 d 的对照组样品进行区分。FM-对照组在 5 d 时的“FM-Pp5d-4”样本与其他两个重复存在差异，为了结果的准确性，在后续分析中剔除了这一样本。在 4 个生命阶段中，FM+处理组相对于对照组的差异表达基因均较少（附录V）。其中 5 d 时的差异表达基因最多，有 18 个基因显著上调，73 个基因显著下调（图 5.1C）。从差异表达基因的数量可以看出，病毒 PpNSRV-1 对蝶蛹金小蜂体内基因表达并没有造成广泛剧烈的影响。对差异表达基因进行分析发现仅有一个基因 *PpspopB_1*（*PPU06594-RA*）在 4 个时期均显著下调（图 5.1F）。

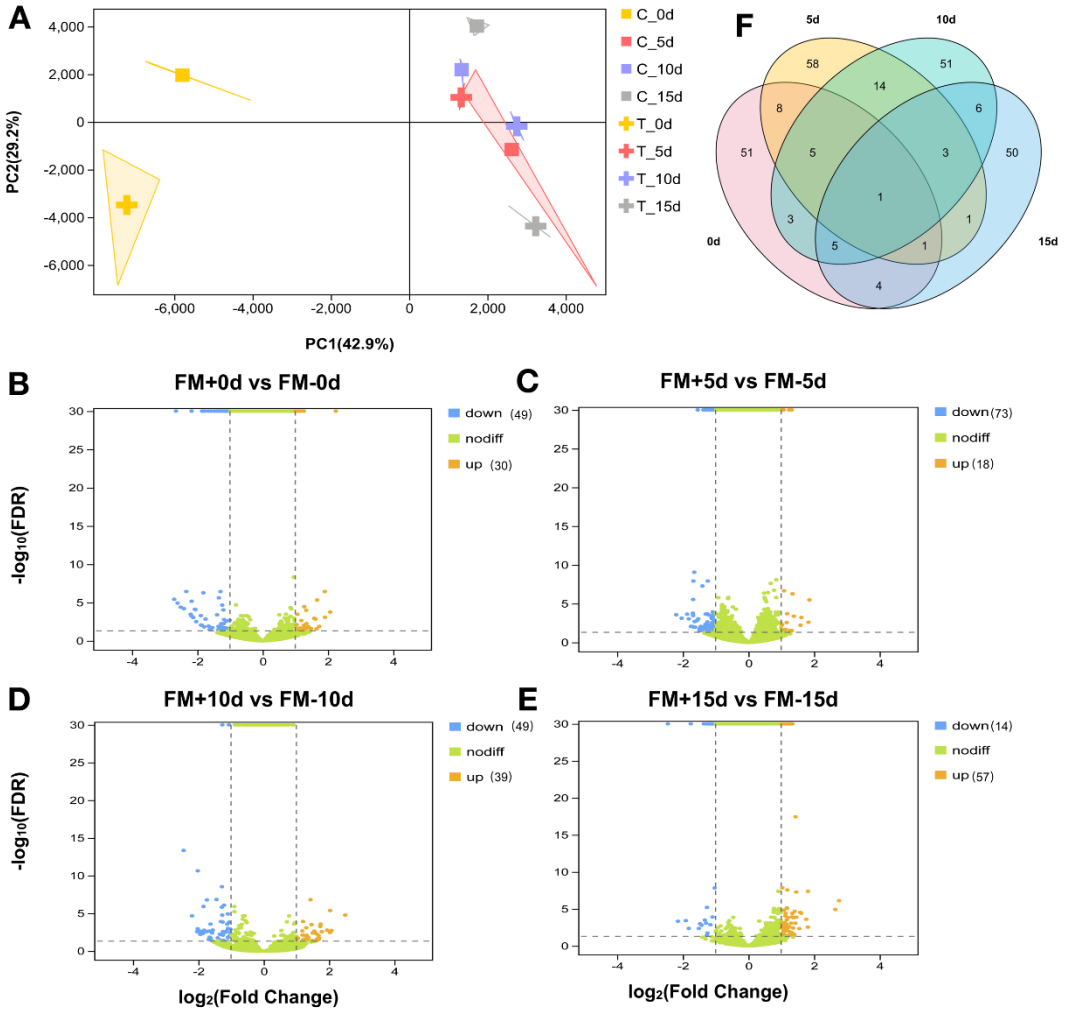

图 5.1 带病毒 PpNSRV-1 的蝶蛹金小蜂转录组分析

Figure 5.1 Transcriptome analysis of *P. puparum* injected with PpNSRV-1

注：（A）样品 PCA 分析结果（B）0 d 时差异表达基因火山图（C）5 d 时差异表达基因火山图（D）10 d 时差异表达基因火山图（E）15 d 时差异表达基因火山图（F）差异表达基因维恩图 (A) Results of PCA analysis of samples (B) Volcano plot of DEGs at 0 d (C) Volcano plot of DEGs at 5 d (D) Volcano plot of DEGs at 10 d (E) Volcano plot of DEGs at 15 d (F) Venn diagram of DEGs

2.3 差异表达基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析

为了进一步探究蝶蛹金小蜂受病毒 PpNSRV-1 影响的差异表达基因的功能和参与的生物过程及信号通路，对各时期差异表达基因进行了 GO 和 KEGG 通路的注释和富集分析。对差异表达基因进行 GO 富集发现，在 0 d、5 d 和 10 d 的转录组中均没有显著富集，仅在 15 d 时显著富集到了 3 个通路（图 5.2），分别是甲壳素的分解过程（Chitin catabolic process，GO:0006032）、氨基糖分解过程（Amino sugar catabolic process，GO:0046348）和含葡萄糖胺化合物的分解代谢过程（Glucosamine-containing compound catabolic process，GO:1901072）。

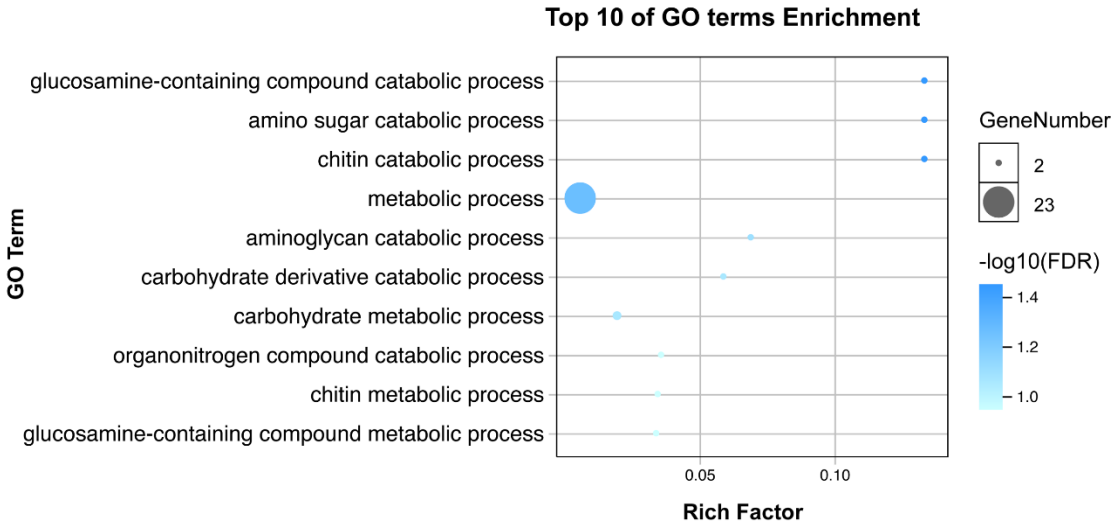

图 5.2 差异表达基因 GO 分析结果

Figure 5.2 GO annotation of DEGs.

注：图中纵坐标是差异表达基因富集到的 GO 项，横坐标代表-$\log_{10}$(FDR)。The vertical coordinates in the graph are the GO terms that differentially expressed genes were enriched to, and the horizontal coordinates represent -$\log_{10}$(FDR).

对差异表达基因进行 KEGG 通路富集，0 d 带毒转录组（FM+0d vs. FM-0d）差异表达基因共富集到 52 个 KEGG 通路，其中 p< 0.5 的有 4 个（表 5.2），但

校正之后没有显著富集通路。其他时期转录组差异表达基因的富集结果也与之相似，均没有显著富集到任何 KEGG 通路。

表 5.2 差异表达基因 KEGG 通路富集结果
Table 5.2 KEGG enrichment of DEGs

比较组	通路 ID	KEGG 通路	差异基因数目	总基因数	Q 值
FM+0d vs FM-0d	ko04152	AMPK signaling pathway	2	68	0.249837
	ko04910	Insulin signaling pathway	2	77	0.249837
	ko05033	Nicotine addiction	1	10	0.249837
	ko04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	1	16	0.249837
FM+5d vs FM-5d	ko04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	2	9	0.097918
	ko04512	ECM-receptor interaction	2	20	0.249506
	ko05414	Dilated cardiomyopathy (DCM)	2	25	0.258499
	ko04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	2	43	0.305827
	ko04211	Longevity regulating pathway - mammal	2	44	0.305827
	ko04611	Platelet activation	2	44	0.305827
	ko04724	Glutamatergic synapse	2	44	0.305827
	ko04072	Phospholipase D signaling pathway	2	55	0.305827
	ko04145	Phagosome	2	57	0.305827
	ko04140	Autophagy - animal	2	63	0.305827
	ko04723	Retrograde endocannabinoid signaling	2	64	0.305827
	ko05140	Leishmaniasis	1	9	0.305827
FM+10d vs FM-10d	ko05146	Amoebiasis	2	30	0.248495
	ko04744	Phototransduction	1	7	0.248495
	ko04016	MAPK signaling pathway - plant	1	13	0.248495
FM+15d vs FM-15d	ko02024	Quorum sensing	2	39	0.213525
	ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	2	55	0.213525
	ko00521	Streptomycin biosynthesis	1	9	0.216428
	ko04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	1	12	0.216428

2.4 基因加权共表达网络分析（WGCNA）

带毒蝶蛹金小蜂转录组的差异表达基因分析结果显示，不同生命阶段的差异表达基因几乎没有显著富集到的 GO 功能和 KEGG 通路。这说明 PpNSRV-1 病毒的存在没有对蝶蛹金小蜂的发育和生理过程产生剧烈影响，所以与 PpNSRV-1 病毒引起蝶蛹金小蜂寿命延长相关的基因表达量变化可能更低。具体地说，对关键基因的发掘可能需要降低对差异表达基因的筛选标准，但需要降低到何种程度很难判断。因此，为了系统性地识别 PpNSRV-1 病毒引起蝶蛹金小蜂雌蜂寿命延长的转录信号，对 4 个不同生命阶段的样品产生的 RNA-seq 数据集进行了基因加权共表达网络分析。

2.4.1 构建所有生命阶段的基因共表达网络

用带 PpNSRV-1 病毒的蝶蛹金小蜂 RNA-seq 数据集构建了一个基因共表达网络（图 5.3），系统性地测量了 23 个样品中所有表达基因的成对相关性，高度相关的基因簇会被划分到一起。对相似的模块进行合并之后，共表达网络中的所有基因被划分到了 34 个基因簇模块。

构建了基因共表达网络之后，对所有模块与蝶蛹金小蜂寿命的关系进行了相关性分析，以确定哪些模块和 PpNSRV-1 影响下蝶蛹金小蜂寿命相关（图 5.3 A）。根据模块-性状的热图中每个模块与性状的相关性和 p 值，鉴定出了 1 个可能和 PpNSRV-1 影响下蝶蛹金小蜂长寿命性状相关的候选模块 black 模块。black 模块中共有 500 个基因，该模块中基因的表达量与长寿命性状负相关。

计算 black 模块中每一条基因与目标性状的相关性（GS）与模块里的基因与该模块的相关性（MM）的相关性，用散点图表示（图 5.3 C）。可以发现，black 模块的所有基因散点呈现出一条斜率为 1 的直线，GS 和 MM 的相关性达到了 0.86，显著地高度相关（p<0.05）。这说明 black 模块中的基因既与目标性状显著相关又与该模块显著相关，值得进一步分析。black 模块中的连接度最大的基因为 *PpGCC2*（*PPU13656-RA*）。

确定 black 模块为关键模块后，运用 cytoscape 软件工具 cytoHubba 筛选 black 模块中的枢纽基因（图 4.12），计算了 MCC、DMNC、Degree 等 12 个参数。根据节点基因在网络中的属性进行排名，筛选出 Degree 排名靠前的基因作为基因共表达网络的枢纽基因，随后对枢纽基因进行 KEGG 通路富集分析（表 5.2）。

预测的枢纽基因显著富集到了三个通路，分别是自噬（Autophagy-animal）、p53 信号通路和阿米巴病（Amoebiasis）。

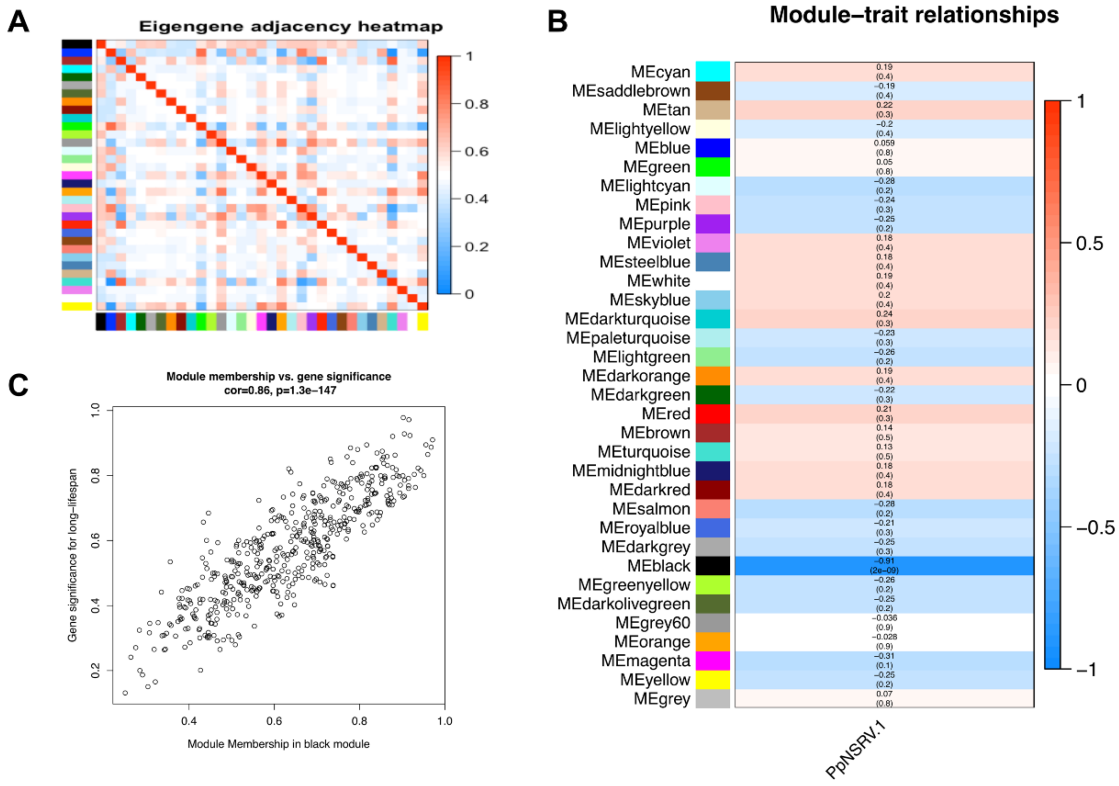

图 5.3 基因加权共表达网络分析

Figure 5.3 Weighted gene co-expression network analysis.

注：（A）模块特征向量（MEs）的层次聚类图，显示模块之间的关系，左侧和底部的每个色块表示一个模块，相同的颜色表示同一个色块。热图中红色表示高邻接度（~+1），蓝色表示低邻接度（~0）。（B）模块-性状相关性热图。每一行都是一个模块的特征向量（ME），模块的名字在热图左侧用文字和色块标记。纵列代表的性状是蝶蛹金小蜂寿命较长。每一单元中标记了这一模块与长寿命的相关性和 *p* 值，其中 *p* 值在括号中标出，$p<0.05$ 表示该模块与长寿命性状显著相关。蓝色表示负相关（～ -1），红色表示模块和性状之间的正相关（～ +1）；（C）black 模块的 GS 和 MM 的相关性散点图。每个点表示一个模块成员（即基因）分配到各个模块。(A) Hierarchical clustering diagram of module eigengenes (MEs) showing the relationship between modules, with each color block on the left and bottom indicating a module, and the same color indicating the same block. Red in the heatmap indicates high adjacency (~ +1) and blue indicates low adjacency (~ 0). (B) Module-trait correlation heatmap. Each row is a module eigengene (ME), and the names of the modules are marked with text and color blocks on the left side of the heatmap. The vertical column represents the trait of long lifespan of *P. puparum*. The correlation and *p*-value of this module with longevity are marked in each cell, where *p*-values are indicated in parentheses and $p<0.05$ indicates that the module is significantly correlated with the longevity trait. Blue indicates negative correlations (~ -1) and red indicates positive correlations (~ + 1) between the module and the trait; (C) scatter plot of correlations between GS and MM for the black module. Each point indicates a module member (i.e. gene) assigned to each module.

表 5.3 black 模块排名前 20 的基因

Table 5.3 Top 20 genes of black module

基因 ID	MCC	DMNC	MNC	Degree	EPC	Bottle Neck	EcCentricity	Closeness	Radiality	Betweenness	Stress	Clustering Coefficient
PPU05921-RA	214	0.13	51	59	87.32	4	0.24	260.08	3.88	8705.52	66932	0.06
PPU15957-RA	146	0.11	44	50	81.23	11	0.24	250.58	3.80	4230.23	38436	0.06
PPU14753-RA	133	0.11	41	50	79.41	7	0.33	249.00	3.78	4518.62	41296	0.05
PPU10887-RA	167	0.12	45	50	82.66	3	0.24	251.75	3.82	4945.72	42754	0.07
PPU16749-RA	130	0.12	40	46	73.87	14	0.24	246.92	3.77	3536.09	32422	0.06
PPU09686-RA	168	0.14	40	44	77.24	2	0.24	249.42	3.81	3194.16	31968	0.08
PPU00386-RA	113	0.13	34	43	71.67	1	0.24	246.00	3.77	3638.64	30958	0.06
PPU00280-RA	121	0.11	38	43	73.50	1	0.33	245.33	3.77	3375.84	30166	0.06
PPU05391-RA	93	0.12	31	42	69.40	2	0.24	242.75	3.74	4090.58	31782	0.05
PPU03766-RA	113	0.13	34	41	68.78	1	0.24	242.42	3.74	3260.60	27570	0.06
PPU02203-RA	75	0.10	30	41	67.30	1	0.24	242.50	3.74	4422.42	32936	0.04
PPU13656-RA	100	0.13	30	40	70.76	5	0.24	240.08	3.71	2992.53	25844	0.06
PPU09202-RA	113	0.13	35	40	72.52	3	0.24	245.58	3.78	3318.62	29880	0.07
PPU06527-RA	95	0.12	31	40	71.88	1	0.24	242.50	3.74	2898.08	26846	0.06
PPU06017-RA	99	0.11	35	40	69.62	1	0.24	242.08	3.74	2986.08	27054	0.06
PPU00209-RA	94	0.13	30	40	70.18	2	0.24	244.75	3.77	4541.92	34378	0.05
PPU14766-RA	87	0.12	31	38	69.39	4	0.24	238.75	3.71	2885.88	24624	0.06
PPU16861-RA	102	0.16	25	37	67.81	16	0.24	238.00	3.70	2772.72	23452	0.06
PPU16764-RA	60	0.11	22	37	65.97	17	0.24	233.00	3.64	3049.86	23740	0.04
PPU16748-RA	71	0.11	28	37	64.44	12	0.24	237.33	3.69	3673.02	29358	0.05

注：根据 CytoHubba 提供了 12 种拓扑分析方法计算，基因按 Degree 排名。The genes are ranked by Degree, calculated according to 12 topological analysis methods provided by CytoHubba.

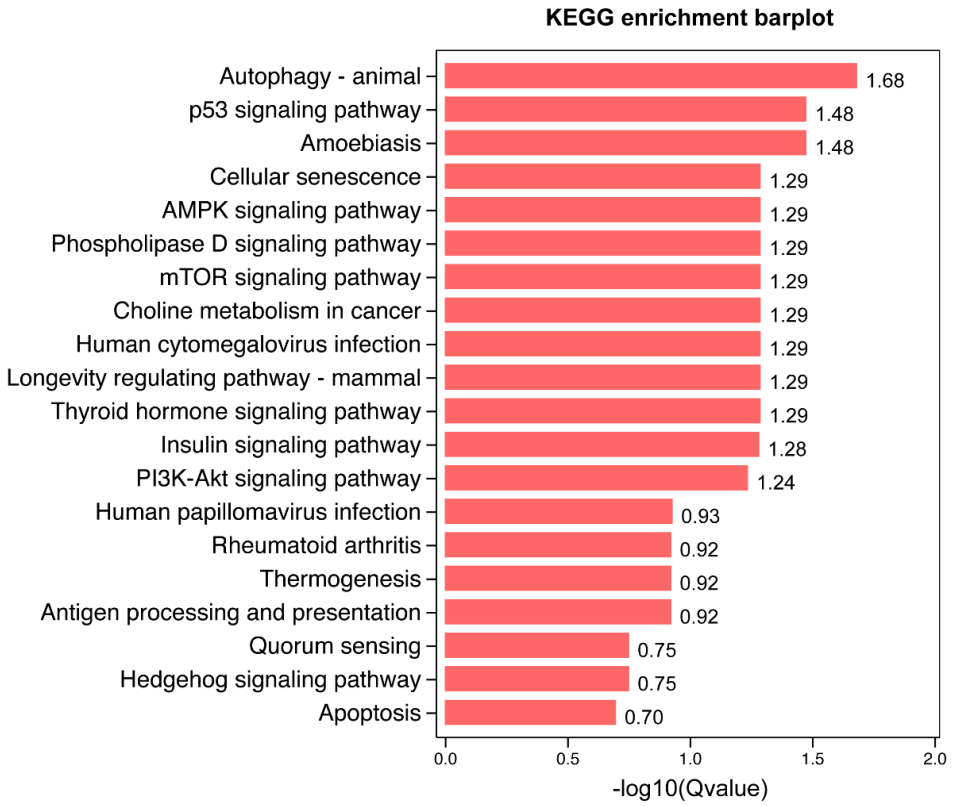

图 5.4 基因共表达网络枢纽基因的 KEGG 富集分析
Figure 5.4 KEGG enrichment analysis of hub genes.

3 讨论

本章分别选取了带病毒 PpNSRV-1 和不带病毒的蝶蛹金小蜂雌蜂的成虫样品进行了 RNA 测序。通过高质量的测序组装结合已知的基因组数据，分析得到了 271 个可以注释到功能的差异表达基因。在蝶蛹金小蜂雌蜂的老龄期以前，差异下调的基因数目比差异上调的多。*PpspopB_1* 基因在各个生命阶段都显著的下调，其表达量在所有时期都显著下调到处理组的 1/2 左右。*PpspopB_1* 即 Speckle-type BTB/POZ 蛋白，其同源基因编码一种 E3-泛素连接酶复合体的底物识别蛋白。目前大约有 30 种蛋白质被鉴定为 E3-泛素连接酶复合体的泛素化底物 (Maekawa and Higashiyama, 2020)。泛素化是一种蛋白质的翻译后修饰，该过程的功能障碍会导致炎症、代谢综合征和癌症等严重的疾病 (Popovic *et al.*, 2014)。*spopB* 是外源性 DNA 损伤的修复过程中所必需的 (Maekawa and Higashiyama, 2020)。另外，*spopB* 可与转录因子 PDX1 结合触发其泛素化和蛋白酶体降解，进而抑制 PDX1/IPF1 靶点（如胰岛素）的转录激活 (Ostertag *et al.*, 2019)。*PpspopB_1*

的显著下调表明病毒 PpNSRV-1 的感染对蝶蛹金小蜂造成了损害，其最终产生的延寿作用有别的生理过程调控。

将差异基因的注释结果与前文中注释的蝶蛹金小蜂寿命相关基因比对，发现 *PpCRYAB*、*PpFAR* 等参与应激过程和能量代谢的基因表达量显著上调。对所有差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析，虽然均没有发现显著聚类（q>0.05），但以 p<0.05 筛选到的信号通路集中于寿命调控通路（ko04211）和与寿命调控相关的 AMPK 信号通路（ko04152）、自噬途径（ko04140）和 MAPK 信号通路（ko04016）等。原因可能是病毒 PpNSRV-1 对寄生蜂的整体分子水平影响并不剧烈，虽然引起了许多寿命相关基因的差异表达，但对于信号通路的影响没有达到设定的阈值。因此，构建了所有基因的加权共表达网络，计算得到关键模块 black 模块及其枢纽基因。枢纽基因显著富集到了自噬、p53 信号通路和阿米巴病等响应外源因子引起的疾病相关信号通路。自噬过程和 p53 信号通路都与生物的寿命调控密切相关，表明病毒 PpNSRV-1 可能通过自噬等过程引起了蝶蛹金小蜂寿命的延长。

将高温和病毒 PpNSRV-1 两种不良条件下蝶蛹金小蜂的转录组进行比较，发现了一些共同的响应基因，主要是热激蛋白 HSP 和组织蛋白酶 CathL。响应高温的 HSP 主要是 *PpHSP70*、*PpHSP90* 和 *PpCRYAB*，响应病毒 PpNSRV-1 的 HSP 主要是 *PpCRYAB*。*PpCathL* 的表达量在热应激条件下显著上调，而在病毒 PpNSRV-1 感染条件下显著下调。这一结果进一步表明了 *PpCathL* 基因的在应激过程中的双相作用。

第六章 3 种寿命相关基因抑制剂对蝶蛹金小蜂寿命的影响

根据对糖类营养与蝶蛹金小蜂寿命的回归模型可知，营养影响寄生蜂寿命的关键基因作用于 TOR 信号通路和应激过程。转录组分析结果表明，热应激条件下蝶蛹金小蜂中差异表达的基因集中在寿命调控途径上，调控网络的一个关键基因 *PpELL* 可能是通过 p53 或 FOXO 信号通路发挥作用。蝶蛹金小蜂在感染病毒 PpNSRV-1 后，其基因表达网络的关键基因通过自噬过程和 p53 信号通路发挥作用。以上结果共同表明了抑制或激活寿命调控相关的信号通路基因可能实现对蝶蛹金小蜂寿命的可变控制。以上通路基因的抑制剂有许多已被开发作为抗衰老药物，如雷帕霉素（Rapamycin）作为一种 TOR 抑制剂已被广泛用于衰老相关疾病的治疗 (Kaeberlein, 2014)。曲美替尼（Trametinib）是 MAPK/ERK 通路上的抑制剂，被证明可显著延长果蝇中年以后的寿命 (Slack *et al.*, 2015)。

另外，值得注意的是在热应激和病毒 PpNSRV-1 感染这两种寿命限制因子的作用下，*PpCathL* 表现出了明显的双相性。在 35℃下，*PpCathL* 的敲低缩短了对蝶蛹金小蜂的寿命，证明了其有益作用，但同时该基因在病毒 PpNSRV-1 作用下表达量显著下调，蝶蛹金小蜂寿命延长，似乎是不利于带病毒寄生蜂的长寿。由于 *CathL* 在炎症发生和病毒感染中的促进作用，其抑制剂被认为是病毒感染的一种治疗剂。但因 *CathL* 在正常生理过程中的复杂作用，其抑制剂具体的作用还不得而知 (Gomes *et al.*, 2020)。在本章中，初步探究了饲喂寿命相关基因的抑制剂实现蝶蛹金小蜂长寿的可能性。

1 材料与方法

1.1 试虫分组与寿命实验

蝶蛹金小蜂雌蜂的饲养过程参考第二章 1.1。蝶蛹金小蜂雌蜂羽化后立即收集到果蝇管中，采用改良的毛细管喂食法（CAFE） (Ja *et al.*, 2007)，通过插在海绵塞上的玻璃电极（1B100F-3; WPI, Sarasota, Florida）递送液体食物和药物。实验设置药物处理组和溶剂对照组，各三个重复，每个重复中包含 10 头随机分组的蝶蛹金小蜂雌成蜂。每个果蝇管有三根玻璃电极。成蜂从有刻度的玻璃微电极中取食液体食物和药物，随着蜂的取食，玻璃微电极内的液体液面下降，记录每日消耗药液的高度，测量使用数显式游标卡尺，根据药液下降的高度算出药液消

耗量。并记录每日各处理试虫生存情况。

1.2 药物溶液的配制

本章中用到的抑制剂有雷帕霉素 Rapamycin、曲美替尼 Trametinib 和组织蛋白酶抑制剂 Cathepsin I（Selleck，中国）。根据寄生蜂的体重估算其所需的药量，确定药剂的终浓度为 10 μM。首先用二甲基亚砜（DMSO）配制母液，随后用 10%蔗糖水（V/V）中将母液稀释到 10 μM。具体过程如下：

1）向 5 mg Rapamycin 粉末中加入 0.05469 ml DMSO 配制浓度为 10^5 μM 的母液，充分溶解后取 1 μl 母液加入 9,999 μl 的 10%蔗糖水稀释到 10 μM，作为 Rapamycin 处理组。取 1 μl DMSO 加入 9,999 μl 的 10%蔗糖水作为溶剂对照组。

2）向 10 mg Trametinib 粉末中加入 0.27083 ml DMSO 配制浓度为 $3*10^4$ μM 的母液，充分溶解后取 1 μl 母液加入 2,999 μl 的 10%蔗糖水稀释到 10 μM，作为 Trametinib 处理组。取 1 μl DMSO 加入 2,999 μl 的 10%蔗糖水作为溶剂对照组。

3）向 5 mg Cathepsin I 粉末中加入 0.124412 ml DMSO 配制浓度为 10^5 μM 的母液，充分溶解后取 1 μl 母液加入 9,999 μl 的 10%蔗糖水稀释到 10 μM，作为 Cathepsin inhibitor 处理组。取 1 μl DMSO 加入 9,999 μl 的 10%蔗糖水作为溶剂对照组。

表 6.1 本章用到的抑制剂
Table 6.1 Inhibitors used in this chapter

	靶标基因	描述
Rapamycin	TOR (Edwards and Wandless, 2007)	一种特定的 TOR 抑制剂，在 HEK293 细胞中，IC_{50} 为~0.1 nM。
Trametinib	MEK1/2 (Yamaguchi *et al.*, 2011)	无细胞试验中 IC50 为 0.92 nM/1.8 nM，对 c-Raf，B-Raf，ERK1/2 没有抑制活性。可激活自噬并诱导凋亡。
Cathepsin I	Cathepsin L (Asaad *et al.*, 2009)	一种 Cathepsin (L, L2, S, K, B)的抑制剂，pIC_{50} 分别为 7.9、6.7、6.0、5.5、5.2。

1.3 统计分析

每日取食量的值取三个生物学重复的平均数，采用 Levene's 检验进行方差的同质性检验，确定方差齐性。随后对药物处理组和其对应的溶剂的每日取食量做 Student's *t* 测验，分析过程使用的软件为 IBM SPSS Statistics for Mac（Version 25.0; https://www.ibm.com/products/spss-statistics）。寄生蜂寿命实验的生存曲线

和柱状图使用软件 GraphPad Prism 6 for mac 绘制。生存分析采用 Log-rank（Mantel-Cox）检验，以 $p<0.05$ 作为差异显著。

2 结果与分析

2.1 3 种抑制剂对蝶蛹金小蜂取食量的影响

抑制剂的口味和气味与糖类营养物质存在差别，可能对寄生蜂产生拒食或者诱食作用。据第一章 3.1 所述，寄生蜂的取食量会影响其寿命，因此首先统计了对蝶蛹金小蜂雌成虫喂食三种抑制剂时的取食量（表 6.2）。结果表明雷帕霉素、曲美替尼和组织蛋白酶抑制剂均不影响蝶蛹金小蜂的取食量（$p>0.05$），它们对蝶蛹金小蜂寿命的影响与其药效有关。

表 6.2 喂食药剂对蝶蛹金小蜂取食量的影响
Table 6.2 Effect of inhibitors on food intake of *P. puparum*

	平均每日取食量 / μl	标准差（SD）	*p* 值
Control	0.2597	0.11365	0.181
Rapamycin	0.2991	0.09551	
Control	0.2085	0.14464	0.721
Trametinib	0.1945	0.12383	
Control	0.2597	0.11365	0.573
Cathepsin I	0.278	0.11929	

2.2 3 种寿命相关基因抑制剂对蝶蛹金小蜂寿命的影响

相比溶剂对照组，喂食 3 种抑制剂的蝶蛹金小蜂的寿命均显著延长（图 6.1 和表 6.3）。雷帕霉素处理组的平均寿命增加了 34%，中位寿命增加了 35%（$p=0.0103$，图 6.1A）。曲美替尼处理组的平均寿命增长了 56%以上，中位寿命的增长达到了 165%（$p=0.0045$，图 6.1B）。组织蛋白酶抑制剂组的平均寿命增长了 51%，中位寿命增加了 70%（$p=0.0003$，图 6.1C）。

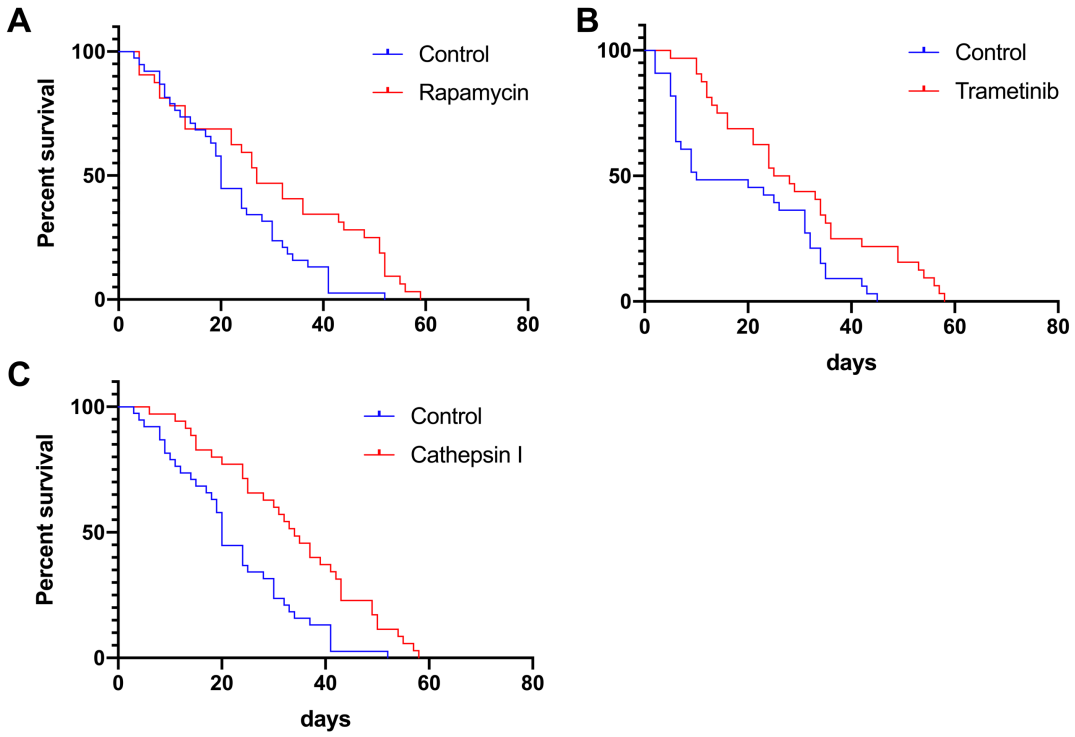

图 6.1 抑制剂对蝶蛹金小蜂寿命的影响

Figure 6.1 Survival curves of *P. puparum* fed with inhibitors

表 6.3 抑制剂对蝶蛹金小蜂寿命的影响

Table 6.3 Lifespan of *P. puparum* fed with inhibitors

	平均寿命 / d	中位寿命 / d	*p* 值
Control	22.3	20	0.0103
Rapamycin	29.9	27	
Control	18.8	10	0.0045
Trametinib	29.4	26.5	
Control	22.3	20	0.0003
Cathepsin	33.7	34	

3 讨论

本章应用了玻璃微电极喂食法对蝶蛹金小蜂进行药物递送，对蝶蛹金小蜂的取食量进行持续而准确的监测。寄生蜂口服药物实验的结果发现，三种寿命相关基因的抑制剂均能在常温条件下显著延长蝶蛹金小蜂的寿命（p<0.05）。药物的浓度根据文献中提供的果蝇等其他生物的最佳药量计算而来。雷帕霉素、曲美替尼和组织蛋白酶抑制剂的浓度均为 10 μM，它们对蝶蛹金小蜂的平均寿命分别延长了 34%、56%和 51%。同样的浓度下，曲美替尼的延寿作用最好。

值得注意的是，*PpCathL* 抑制剂在 25℃正常情况下对寄生蜂具有极显著的延寿作用。Covid-19 中的研究表明 *CathL* 与病毒感染过程和多种疾病相关，*CathL* 是新冠病毒 SARS-CoV-2 进入宿主细胞的重要因素，该基因可作为一种治疗靶点 (Gomes *et al.*, 2020)。在第四章中，高温条件下对 *PpCathL* 的敲低显著缩短了蝶蛹金小蜂的寿命，而本章中寄生蜂经口取食组织蛋白酶抑制剂后寿命显著延长。这可能暗示了 *PpCathL* 在寿命调控中的作用可能是依赖于背景的，其在高温环境中的大量表达对寄生蜂是有益的，降低其表达量会降低寄生蜂生存能力，而正常条件下的表达量降低是有益的。总的来说，本研究证实了 *TOR*、*MEK* 和 *CathL* 三个寿命相关基因的抑制剂可以实现对蝶蛹金小蜂的延寿作用。

第七章 总结

1 蝶蛹金小蜂寿命相关通路及基因

蝶蛹金小蜂的寿命可塑性强和便于操作等特点为研究寿命调控机制提供了优良的体系。结合高质量的组学数据和已知的模式生物寿命调控基因序列，最终鉴定了蝶蛹金小蜂的 229 个候选的寿命相关基因。这些基因在 IIS-PI3K/Akt 途径、TOR 途径、MAPK/ERK 途径和 AMPK 途径等四个信号通路和自噬、应激反应和代谢等三个生理过程中发挥作用。预测了这些基因的保守结构域并分析了它们的表达模式，表达谱的结果表明作用于应激反应的基因表达量较高。

2 蝶蛹金小蜂成虫寿命的影响因子

营养条件、温度和病毒是常见的寿命限制因素。建立糖类营养与蝶蛹金小蜂长寿的回归模型，发现营养条件影响寄生蜂寿命的关键基因作用于 TOR 信号通路和应激过程，并确定了 6 个在此过程中起作用的寿命相关基因，分别是 *PpPTEN*、*PpSOD1-1*、*PpSOD1-3*、*PpTSC2-2*、*PpHDAC1* 和 *PpTSC2-3*。对热应激条件下蝶蛹金小蜂进行转录组测序，分析结果表明响应热暴露的基因主要是 HSP70、HSP90 和 CRYAB 等热激蛋白。热应激下差异表达的基因集中在寿命调控途径上，构建基因共表达网络鉴定出 3 个关键基因，分别是 *PpXAP5*、*PpELL* 和 *PpCathL*。蝶蛹金小蜂在感染病毒 PpNSRV-1 后，其基因表达网络的关键基因通过自噬过程和 p53 信号通路发挥作用。本研究初步探究了营养条件、温度和共生病毒 PpNSRV-1 对蝶蛹金小蜂寿命的作用机理。

3 延长蝶蛹金小蜂成虫寿命的药剂

对营养条件、温度和共生病毒 PpNSRV-1 三种寿命限制因素的研究表明，抑制或激活寿命调控相关的信号通路基因可能实现对蝶蛹金小蜂寿命的调控。以上通路基因的抑制剂有许多已被开发作为抗衰老药物，选择了雷帕霉素（Rapamycin）、曲美替尼（Trametinib）和组织蛋白酶抑制剂（Cathepsin Inhibitor）进行经口药物递送实验，药剂浓度均为 10 μM，它们对蝶蛹金小蜂的平均寿命分别延长了 34%、56%和 51%。本研究表明雷帕霉素、曲美替尼和组织蛋白酶抑制剂等寿命相关基因的抑制剂有望用于延长寄生蜂寿命。

4 本研究创新之处

1. 综合基因组和转录组数据注释了蝶蛹金小蜂的寿命相关通路及其基因；

2. 对营养、热胁迫和共生病毒 PpNSRV-1 感染的蝶蛹金小蜂，采用多种方法，明确了它们影响寿命的途径；

3. 明确了营养影响蝶蛹金小蜂成虫寿命的关键基因作用于 TOR 信号通路和应激过程；热胁迫条件下基因可能通过 p53 和 FOXO 信号通路发挥作用，并鉴定了新的寿命相关基因，分别是 *PpXAP5*、*PpELL* 和 *PpCathL*；蝶蛹金小蜂在感染病毒 PpNSRV-1 后，体内自噬过程和 p53 信号通路进行响应；

4. 应用寿命相关基因抑制剂延长了蝶蛹金小蜂的成虫寿命，明确了雷帕霉素、曲美替尼和组织蛋白酶抑制剂有望用于延长寄生蜂成虫寿命。

5 不足之处与未来研究方向

1. 未对病毒 PpNSRV-1 引起寿命延长的枢纽基因进行实验验证；

2. 重点只放在雌性蝶蛹金小蜂上，因为雌性产卵和寄生能力对生产应用意义更大，对不同应激源的反应之间的能量分配权衡应该更加明显；

3. 缺少对其他适合度的描述；

4. 未来可以利用基因编辑技术验证相关寿命基因功能，培育长寿寄生蜂品系。

参考文献

鲍晓文, 房爱省, 仵均祥和许向利 (2019) 短期高温对梨小食心虫成虫生殖及寿命的影响. *果树学报* **36**: 486-492.

胡萃 (1983) 中国菜粉蝶寄生昆虫调查. *昆虫学报* **26**: 287-294.

李小敏, 刘君昂, 董文统, 何苑皞, 张茜和周国英 (2018) 补充外源营养对螟蛉绒茧蜂寿命和繁殖力的影响. *植物保护学报* **45**: 208-213.

周亚奎, 甘丙春, 杨新全, 黄良明和卢丽兰 (2013) 不同营养源对细点扁骨小蜂寿命和产卵量的影响. *植物保护* **39**: 77-79.

Altintas O., Park S. and Lee S.J. (2016) The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Rep* **49**: 81-92.

Alto B.W., Civana A., Wiggins K., Eastmond B. and Shin D. (2020) Effect of oral infection of mayaro virus on fitness correlates and expression of immune related genes in *Aedes aegypti*. *Viruses* **12**: 719.

Alvarez-Suarez J., Miguel, Tulipani S., Romandini S., Bertoli E. and Battino M. (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab* **3**: 15-23.

Antikainen H., Driscoll M., Haspel G. and Dobrowolski R. (2017) TOR-mediated regulation of metabolism in aging. *Aging Cell* **16**: 1219-1233.

Anver S., Roguev A., Zofall M., Krogan N.J., Grewal S.I. and Harmer S.L. (2014) Yeast X-chromosome-associated protein 5 (Xap5) functions with H2A.Z to suppress aberrant transcripts. *EMBO Rep* **15**: 894-902.

Arking R., Buck S., Novoseltev V.N., Hwangbo D.S. and Lane M. (2002) Genomic plasticity, energy allocations, and the extended longevity phenotypes of *Drosophila*. *Ageing Res Rev* **1**: 209-228.

Asaad N., Bethel P.A., Coulson M.D., Dawson J.E., Ford S.J., Gerhardt S.*, et al.* (2009) Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 4280-4283.

Azzouz H., Giordanengo P., Wackers F.L. and Kaiser L. (2004) Effects of feeding frequency and sugar concentration on behavior and longevity of the adult aphid parasitoid: *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera : Braconidae). *Biol Control* **31**: 445-452.

Bai H., Kang P., Hernandez A.M. and Tatar M. (2013) Activin signaling targeted by insulin/dFOXO regulates aging and muscle proteostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet* **9**: e1003941.

Bai H., Kang P. and Tatar M. (2012) *Drosophila* insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* **11**: 978-985.

Balan V., Miller G.S., Kaplun L., Balan K., Chong Z.Z., Li F.*, et al.* (2008) Life span extension and neuronal cell protection by *Drosophila* nicotinamidase. *J Biol Chem* **283**: 27810-27819.

Bauer J.H., Chang C., Morris S.N., Hozier S., Andersen S., Waitzman J.S.*, et al.* (2007) Expression of dominant-negative Dmp53 in the adult fly brain inhibits insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13355-13360.

Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T.*, et al.* (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of

procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**: 469-475.
Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S. and Baltimore D. (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**: 167-170.
Bettedi L. and Foukas L.C. (2017) Growth factor, energy and nutrient sensing signalling pathways in metabolic ageing. *Biogerontology* **18**: 913-929.
Biteau B., Karpac J., Supoyo S., Degennaro M., Lehmann R. and Jasper H. (2010) Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet* **6**: e1001159.
Bitto A., Wang A.M., Bennett C.F. and Kaeberlein M. (2015) Biochemical Genetic Pathways that Modulate Aging in Multiple Species. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**: a025114.
Bjorksten J. (1968) The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* **16**: 408-427.
Bolukbasi E., Khericha M., Regan J.C., Ivanov D.K., Adcott J., Dyson M.C.*, et al.* (2017) Intestinal Fork Head regulates nutrient absorption and promotes longevity. *Cell Rep* **21**: 641-653.
Boord J.B., Maeda K., Makowski L., Babaev V.R., Fazio S., Linton M.F.*, et al.* (2004) Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **110**: 1492-1498.
Boulianne G.L. (2001) Neuronal regulation of lifespan: clues from flies and worms. *Mech Ageing Dev* **122**: 883-894.
Broughton S., Alic N., Slack C., Bass T., Ikeya T., Vinti G.*, et al.* (2008) Reduction of DILP2 in *Drosophila* triages a metabolic phenotype from lifespan revealing redundancy and compensation among DILPs. *PLoS ONE* **3**: e3721.
Burkewitz K., Zhang Y. and Mair W.B. (2014) AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metab* **20**: 10-25.
Burnet F.M. (1974) Intrinsic mutagenesis: a genetic basis of ageing. *Pathology* **6**: 1-11.
Cai J., Ye G. and Hu C. (2004) Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. *J Insect Physiol* **50**: 315-322.
Cao Y., Liu X., Li Y., Lu Y., Zhong H., Jiang W.*, et al.* (2017) Cathepsin L activity correlates with proteinuria in chronic kidney disease in humans. *Int Urol Nephrol* **49**: 1409-1417.
Carey J.R. (2001) Demographic mechanisms for the evolution of long life in social insects. *Exp Gerontol* **36**: 713-722.
Cerami A. (1985) Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am Geriatr Soc* **33**: 626-634.
Chan E.Y. (2012) Regulation and function of uncoordinated-51 like kinase proteins. *Antioxid Redox Signal* **17**: 775-785.
Chantranupong L., Wolfson R.L. and Sabatini D.M. (2015) Nutrient-sensing mechanisms across evolution. *Cell* **161**: 67-83.
Chavous D.A., Jackson F.R. and O'Connor C.M. (2001) Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14814-14818.
Chen C., Chen H., Zhang Y., Thomas H.R., Frank M.H., He Y.*, et al.* (2020) TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant* **13**: 1194-1202.
Chin C.H., Chen S.H., Wu H.H., Ho C.W., Ko M.T. and Lin C.Y. (2014) cytoHubba:

identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol* **8**: S11.

Chirumbolo S. (2012) Possible role of NF-κB in hormesis during ageing. *Biogerontology* **13**: 637-646.

Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E*., et al.* (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292**: 104-106.

Clare D.K. and Saibil H.R. (2013) ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers* **99**: 846-859.

Cristofalo V.J., Gerhard G.S. and Pignolo R.J. (1994) Molecular biology of aging. *Surg Clin North Am* **74**: 1-21.

Dalton T.P., Dieter M.Z., Yang Y., Shertzer H.G. and Nebert D.W. (2000) Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 324-329.

Dang W. (2014) The controversial world of sirtuins. *Drug Discov Today Technol* **12**: e9-e17.

Demontis F. and Perrimon N. (2010) FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell* **143**: 813-825.

Edmunds L.N., Jr. (1978) Clocked cell cycle clocks: implications toward chronopharmacology and aging. *Adv Exp Med Biol* **108**: 125-184.

Edwards S.R. and Wandless T.J. (2007) The rapamycin-binding domain of the protein kinase mammalian target of rapamycin is a destabilizing domain. *J Biol Chem* **282**: 13395-13401.

Eissenberg J.C., Ma J., Gerber M.A., Christensen A., Kennison J.A. and Shilatifard A. (2002) dELL is an essential RNA polymerase II elongation factor with a general role in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9894-9899.

Ellison C.T., Vandenbussche F., Van Der Straeten D. and Harmer S.L. (2011) XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER regulates ethylene responses in aerial tissues of Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**: 988-999.

Farmer K.J. and Sohal R.S. (1987) Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp Gerontol* **22**: 59-65.

Flatt T. and Kawecki T.J. (2007) Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **61**: 1980-1991.

Fonović M. and Turk B. (2014) Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 2560-2570.

Fontana L., Partridge L. and Longo V.D. (2010) Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* **328**: 321-326.

Funakoshi M., Tsuda M., Muramatsu K., Hatsuda H., Morishita S. and Aigaki T. (2011) A gain-of-function screen identifies *wdb* and *lkb1* as lifespan-extending genes in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* **405**: 667-672.

Gallant J., Kurland C., Parker J., Holliday R. and Rosenberger R. (1997) The error catastrophe theory of aging point counterpoint. *Exp Gerontol* **32**: 333-346.

Gao X. and Pan D. (2001) *TSC1* and *TSC2* tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev* **15**: 1383-1392.

Ghazi A., Henis-Korenblit S. and Kenyon C. (2009) A transcription elongation factor that links signals from the reproductive system to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **5**: e1000639.

Giannakou M.E., Goss M., Jünger M.A., Hafen E., Leevers S.J. and Partridge L. (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* **305**: 361.

Giannakou M.E. and Partridge L. (2004) The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* **14**: 408-412.

Giblin W., Skinner M.E. and Lombard D.B. (2014) Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet* **30**: 271-286.

Goberdhan D.C., Paricio N., Goodman E.C., Mlodzik M. and Wilson C. (1999) *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* **13**: 3244-3258.

Godfray H.C.J. (1994) *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. i-ix, 1-473 pp.

Goldsmith T.C. (2017) Externally Regulated Programmed Aging and Effects of Population Stress on Mammal Lifespan. *Biochemistry. Biokhimiia* **82**: 1430-1434.

Gomes C.P., Fernandes D.E., Casimiro F., da Mata G.F., Passos M.T., Varela P.*, et al.* (2020) Cathepsin L in COVID-19: from pharmacological evidences to genetics. *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 589505.

Grabowska W., Sikora E. and Bielak-Zmijewska A. (2017) Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology* **18**: 447-476.

Grönke S., Clarke D.F., Broughton S., Andrews T.D. and Partridge L. (2010) Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS Genet* **6**: e1000857.

Guo T., Nan Z., Miao C., Jin X., Yang W., Wang Z.*, et al.* (2019) The autophagy-related gene Atg101 in *Drosophila* regulates both neuron and midgut homeostasis. *J Biol Chem* **294**: 5666-5676.

Gwinn D.M., Shackelford D.B., Egan D.F., Mihaylova M.M., Mery A., Vasquez D.S.*, et al.* (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**: 214-226.

Ha M.K., Soo Cho J., Baik O.R., Lee K.H., Koo H.S. and Chung K.Y. (2006) *Caenorhabditis elegans* as a screening tool for the endothelial cell-derived putative aging-related proteins detected by proteomic analysis. *Proteomics* **6**: 3339-3351.

Hansen M. (2016) Autophagy and Ageing. In: *Ageing: Lessons from C. elegans* (Olsen, A and Gill, MS, eds.). Vol. 5, pp. 331-354. Springer International Publishing, Cham.

Harman D. (1981) The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 7124-7128.

Hart R.W. and Setlow R.B. (1975) DNA repair and life span of mammals. *Basic Life Sci* **5b**: 801-804.

Harvey J.A., Cloutier J., Visser B., Ellers J., Wackers F.L. and Gols R. (2012) The effect of different dietary sugars and honey on longevity and fecundity in two hyperparasitoid wasps. *J Insect Physiol* **58**: 816-823.

Hashimoto Y., Ookuma S. and Nishida E. (2009) Lifespan extension by suppression of autophagy genes in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* **14**: 717-726.

Heimpel G.E., Rosenheim J.A. and Kattari D. (1997) Adult feeding and lifetime reproductive success in the parasitoid *Aphytis melinus*. *Entomol Exp Appl* **83**: 305-315.

Hoffmann A.A., Sørensen J.G. and Loeschcke V. (2003) Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches.

J Therm Biol **28**: 175-216.
Hoffmann J., Romey R., Fink C., Yong L. and Roeder T. (2013) Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging (Albany NY)* **5**: 315-327.
Honjoh S. and Nishida E. (2011) Two sides of lifespan regulating genes: pro-longevity or anti-longevity? *J Biochem* **149**: 381-388.
Honjoh S., Yamamoto T., Uno M. and Nishida E. (2009) Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* **457**: 726-730.
Hsu A., Murphy C.T. and Kenyon C. (2003) Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300**: 1142-1145.
Huang H., Lu-Bo Y. and Haddad G.G. (2014) A *Drosophila* ABC transporter regulates lifespan. *PLoS Genet* **10**: e1004844.
Hussain M., Lin Y. and Wang L. (2017) Effect of temperature on longevity of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) studied by microcalorimeter. *J Therm Anal Calorim* **127**: 1245-1252.
Hwangbo D.S., Gershman B., Gersham B., Tu M.P., Palmer M. and Tatar M. (2004) *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429**: 562-566.
Ja W.W., Carvalho G.B., Mak E.M., de la Rosa N.N., Fang A.Y., Liong J.C.*, et al.* (2007) Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8253-8256.
Jeffs C.T. and Leather S.R. (2014) Effects of extreme, fluctuating temperature events on life history traits of the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Entomol Exp Appl* **150**: 240-249.
Jervis M.A., Kidd N.A.C., Fitton M.G., Huddleston T. and Dawah H.A. (1993) Flower-visiting by hymenopteran parasitoids. *J Nat Hist* **27**: 67-105.
Johnson S.C., Rabinovitch P.S. and Kaeberlein M. (2013) mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**: 338-345.
Juhász G., Erdi B., Sass M. and Neufeld T.P. (2007) Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev* **21**: 3061-3066.
Jurk D., Wilson C., Passos J.F., Oakley F., Correia-Melo C., Greaves L.*, et al.* (2014) Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun* **2**: 4172.
Kaeberlein M. (2014) Rapamycin and ageing: when, for how long, and how much? *J Genet Genomics* **41**: 459-463.
Kanfi Y., Naiman S., Amir G., Peshti V., Zinman G., Nahum L.*, et al.* (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* **483**: 218-221.
Kanungo M.S. (1975) A model for ageing. *J Theor Biol* **53**: 253-261.
Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V. and Benzer S. (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* **14**: 885-890.
Kenyon C.J. (2010) The genetics of ageing. *Nature* **464**: 504-512.
Kim G.H., Lee Y.E., Lee G.H., Cho Y.H., Lee Y.N., Jang Y.*, et al.* (2015) Overexpression of malic enzyme in the larval stage extends *Drosophila* lifespan. *Biochem Biophys Res Commun* **456**: 676-682.
King A.M. and MacRae T.H. (2015) Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annu Rev Entomol* **60**: 59-75.
Kirby K., Hu J., Hilliker A.J. and Phillips J.P. (2002) RNA interference-mediated

silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16162-16167.

Kyriazis M. (2020) Ageing throughout history: the evolution of human lifespan. *J Mol Evol* **88**: 57-65.

Lam E.W., Brosens J.J., Gomes A.R. and Koo C.Y. (2013) Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer* **13**: 482-495.

Landis G.N., Bhole D. and Tower J. (2003) A search for doxycycline-dependent mutations that increase *Drosophila melanogaster* life span identifies the VhaSFD, Sugar baby, filamin, fwd and Cctl genes. *Genome Biol* **4**: R8.

Langfelder P. and Horvath S. (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinf* **9**: 559.

Laschober G.T., Ruli D., Hofer E., Muck C., Carmona-Gutierrez D., Ring J.*, et al.* (2010) Identification of evolutionarily conserved genetic regulators of cellular aging. *Aging Cell* **9**: 1084-1097.

Le Bourg É. (2010) Predicting whether dietary restriction would increase longevity in species not tested so far. *Ageing Res Rev* **9**: 289-297.

Le Bourg É. and Minois N. (2005) Does dietary restriction really increase longevity in *Drosophila melanogaster*? *Ageing Res Rev* **4**: 409-421.

Lee K.S., Iijima-Ando K., Iijima K., Lee W.J., Lee J.H., Yu K.*, et al.* (2009) JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span. *J Biol Chem* **284**: 29454-29461.

Lee S.H., Lee S.K., Paik D. and Min K.J. (2012) Overexpression of fatty-acid-β-oxidation-related genes extends the lifespan of Drosophila melanogaster. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**: 854502.

Lemaître J.F., Berger V., Bonenfant C., Douhard M., Gamelon M., Plard F.*, et al.* (2015) Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proc Biol Sci* **282**: 20150209.

Lemoine N.P., Drews W.A., Burkepile D.E. and Parker J.D. (2013) Increased temperature alters feeding behavior of a generalist herbivore. *Oikos* **122**: 1669-1678.

Li B. and Dewey C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinf* **12**: 323.

Li D., Zhao H., Gao H., Hu Z. and Hu X. (2015) Temperature-Mediated Effects of Host Alternation on the Adaptation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Environ Entomol* **44**: 379-391.

Li J., Ebata A., Dong Y., Rizki G., Iwata T. and Lee S.S. (2008) *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator. *PLoS Biol* **6**: e233.

Li J., Tewari M., Vidal M. and Lee S.S. (2007) The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **301**: 82-91.

Li Y. and Tower J. (2009) Adult-specific over-expression of the *Drosophila* genes magu and hebe increases life span and modulates late-age female fecundity. *Mol Genet Genomics* **281**: 147-162.

Lin Y.H., Chen Y.C., Kao T.Y., Lin Y.C., Hsu T.E., Wu Y.C.*, et al.* (2014) Diacylglycerol lipase regulates lifespan and oxidative stress response by inversely modulating TOR signaling in *Drosophila* and *C. elegans*. *Aging Cell* **13**: 755-764.

Lints F.A. (1989) The rate of living theory revisited. *Gerontology* **35**: 36-57.

Liu J., Yi J., Wu H., Zheng L. and Zhang G. (2020) Prepupae and pupae transcriptomic characterization of *Trichogramma chilonis*. *Genomics* **112**: 1651-1659.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using

real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408.

Long X., Lin Y., Ortiz-Vega S., Yonezawa K. and Avruch J. (2005) Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* **15**: 702-713.

Loo L.W., Secombe J., Little J.T., Carlos L.S., Yost C., Cheng P.F.*, et al.* (2005) The transcriptional repressor dMnt is a regulator of growth in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **25**: 7078-7091.

López-Lluch G. and Navas P. (2016) Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol* **594**: 2043-2060.

Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M. and Kroemer G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194-1217.

M'Angale P.G. and Staveley B.E. (2016) Inhibition of Atg6 and Pi3K59F autophagy genes in neurons decreases lifespan and locomotor ability in *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res* **15**: gmr15048953.

Maekawa M. and Higashiyama S. (2020) The roles of SPOP in DNA damage response and DNA replication. *Int J Mol Sci* **21**: 7293.

Mahajan K., Coppola D., Challa S., Fang B., Chen Y.A., Zhu W.*, et al.* (2010) Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. *PLoS ONE* **5**: e9646.

Mai S., Muster B., Bereiter-Hahn J. and Jendrach M. (2012) Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy* **8**: 47-62.

Mair W. and Dillin A. (2008) Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* **77**: 727-754.

Mair W., Morantte I., Rodrigues A.P., Manning G., Montminy M., Shaw R.J.*, et al.* (2011) Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature* **470**: 404-408.

Mangerich A., Herbach N., Hanf B., Fischbach A., Popp O., Moreno-Villanueva M.*, et al.* (2010) Inflammatory and age-related pathologies in mice with ectopic expression of human PARP-1. *Mech Ageing Dev* **131**: 389-404.

Manjunatha H.B., Rajesh R.K. and Aparna H.S. (2010) Silkworm thermal biology: a review of heat shock response, heat shock proteins and heat acclimation in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Sci* **10**: 204.

Matecic M., Smith D.L., Pan X., Maqani N., Bekiranov S., Boeke J.D.*, et al.* (2010) A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet* **6**: e1000921.

Mazucanti C.H., Cabral-Costa J.V., Vasconcelos A.R., Andreotti D.Z., Scavone C. and Kawamoto E.M. (2015) Longevity pathways (mTOR, SIRT, Insulin/IGF-1) as key modulatory targets on aging and neurodegeneration. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**: 2116-2138.

McCormick M., Chen K., Ramaswamy P. and Kenyon C. (2012) New genes that extend *Caenorhabditis elegans*' lifespan in response to reproductive signals. *Aging Cell* **11**: 192-202.

McCormick M.A., Delaney J.R., Tsuchiya M., Tsuchiyama S., Shemorry A., Sim S.*, et al.* (2015) A comprehensive analysis of replicative lifespan in 4,698 single-gene deletion strains uncovers conserved mechanisms of aging. *Cell Metab* **22**: 895-906.

Merino M.M., Rhiner C., Lopez-Gay J.M., Buechel D., Hauert B. and Moreno E. (2015) Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell* **160**: 461-476.

Mesquita A., Weinberger M., Silva A., Sampaio-Marques B., Almeida B., Leão C.*, et*

al. (2010) Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H_2O_2 and superoxide dismutase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 15123-15128.

Mikhelson V.M. and Gamaley I.A. (2012) Telomere shortening is a sole mechanism of aging in mammals. *Curr Aging Sci* **5**: 203-208.

Mitteldorf J. (2019) What is antagonistic pleiotropy? *Biochemistry. Biokhimiia* **84**: 1458-1468.

Mobbs C.V., Bray G.A., Atkinson R.L., Bartke A., Finch C.E., Maratos-Flier E.*, et al.* (2001) Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**: 34-44.

Morley A.A. (1995) The somatic mutation theory of ageing. *Mutat Res* **338**: 19-23.

Moskalev A.A., Aliper A.M., Smit-McBride Z., Buzdin A. and Zhavoronkov A. (2014) Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **13**: 1063-1077.

Nassel D.R. and Vanden Broeck J. (2016) Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* **73**: 271-290.

Neal S.J., Karunanithi S., Best A., So A.K.-C., Tanguay R.M., Atwood H.L.*, et al.* (2006) Thermoprotection of synaptic transmission in a *Drosophila* heat shock factor mutant is accompanied by increased expression of Hsp83 and DnaJ-1. *Physiol Genomics* **25**: 493-501.

Nielsen M.D., Luo X., Biteau B., Syverson K. and Jasper H. (2008) 14-3-3 Epsilon antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*. *Aging Cell* **7**: 688-699.

Niwa R., Niimi T., Honda N., Yoshiyama M., Itoyama K., Kataoka H.*, et al.* (2008) Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 714-720.

Nóbrega-Pereira S., Fernandez-Marcos P.J., Brioche T., Gomez-Cabrera M.C., Salvador-Pascual A., Flores J.M.*, et al.* (2016) G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice. *Nat Commun* **7**: 10894.

Nowak K., Gupta A. and Stocker H. (2018) FoxO restricts growth and differentiation of cells with elevated TORC1 activity under nutrient restriction. *PLoS Genet* **14**: e1007347.

Okuyama T., Inoue H., Ookuma S., Satoh T., Kano K., Honjoh S.*, et al.* (2010) The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **285**: 30274-30281.

Onken B. and Driscoll M. (2010) Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS ONE* **5**: e8758.

Orr W.C., Arnold L.A. and Sohal R.S. (1992) Relationship between catalase activity, life span and some parameters associated with antioxidant defenses in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* **63**: 287-296.

Orr W.C. and Sohal R.S. (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**: 1128-1130.

Ostertag M.S., Messias A.C., Sattler M. and Popowicz G.M. (2019) The Structure of the SPOP-Pdx1 Interface Reveals Insights into the Phosphorylation-Dependent Binding Regulation. *Structure* **27**: 327-334.

Paik D., Jang Y.G., Lee Y.E., Lee Y.N., Yamamoto R., Gee H.Y.*, et al.* (2012) Misexpression screen delineates novel genes controlling *Drosophila* lifespan. *Mech Ageing Dev* **133**: 234-245.

Pamminger T., Treanor D. and Hughes W.O. (2016) Pleiotropic effects of juvenile hormone in ant queens and the escape from the reproduction-immunocompetence trade-off. *Proc Biol Sci* **283**: 20152409.

Pan K.Z., Palter J.E., Rogers A.N., Olsen A., Chen D., Lithgow G.J.*, et al.* (2007) Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **6**: 111-119.

Paradis S., Ailion M., Toker A., Thomas J.H. and Ruvkun G. (1999) A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **13**: 1438-1452.

Parker J.D., Parker K.M., Sohal B.H., Sohal R.S. and Keller L. (2004) Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3486-3489.

Partridge L., Alic N., Bjedov I. and Piper M.D.W. (2011) Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Exp Gerontol* **46**: 376-381.

Peck O. (1963) A catalogue of the *Nearctic chalcidoidea* (Insecta: Hymenoptera). *Canadian Entomologists* **Suppl. 30**: 718-721.

Popovic D., Vucic D. and Dikic I. (2014) Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* **20**: 1242-1253.

Prakash A., Jeffryes M., Bateman A. and Finn R.D. (2017) The HMMER web server for protein sequence similarity search. *Curr Protoc Bioinformatics* **60**: 3.15.1-3.15.23.

Proshkina E.N., Shaposhnikov M.V., Sadritdinova A.F., Kudryavtseva A.V. and Moskalev A.A. (2015) Basic mechanisms of longevity: A case study of *Drosophila* pro-longevity genes. *Ageing Res Rev* **24**: 218-231.

Pyo J.O., Yoo S.M., Ahn H.H., Nah J., Hong S.H., Kam T.I.*, et al.* (2013) Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun* **4**: 2300.

Radyuk S.N., Michalak K., Klichko V.I., Benes J., Rebrin I., Sohal R.S.*, et al.* (2009) Peroxiredoxin 5 confers protection against oxidative stress and apoptosis and also promotes longevity in *Drosophila*. *Biochem J* **419**: 437-445.

Ran Q., Liang H., Ikeno Y., Qi W., Prolla T.A., Roberts L.J.I.*, et al.* (2007) Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**: 932-942.

Rana A., Rera M. and Walker D.W. (2013) Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8638-8643.

Rattan S.I. (2008) Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* **7**: 63-78.

Rera M., Bahadorani S., Cho J., Koehler C.L., Ulgherait M., Hur J.H.*, et al.* (2011) Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab* **14**: 623-634.

Rodríguez-Riaño T., Ortega-Olivencia A., López J., Pérez-Bote J.L. and Navarro-Pérez M.L. (2014) Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biol (Stuttg)* **16**: 1075-1086.

Roed N.K., Viola C.M., Kristensen O., Schluckebier G., Norrman M., Sajid W.*, et al.* (2018) Structures of insect Imp-L2 suggest an alternative strategy for regulating the bioavailability of insulin-like hormones. *Nat Commun* **9**: 3860.

Rogina B., Helfand S.L. and Frankel S. (2002) Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* **298**: 1745.

Roskoski R.J. (2010) RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation.

Biochem Biophys Res Commun **399**: 313-317.
Roth M. and Chen W.Y. (2014) Sorting out functions of sirtuins in cancer. *Oncogene* **33**: 1609-1620.
Rudolph D., Tafuri A., Gass P., Hämmerling G.J., Arnold B. and Schütz G. (1998) Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4481-4486.
Ruiz M., Sanchez D., Canal I., Acebes A. and Ganfornina M.D. (2011) Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz. *Exp Gerontol* **46**: 579-589.
Runko A.P., Griswold A.J. and Min K.T. (2008) Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *FEBS Lett* **582**: 715-719.
Russell S.J. and Kahn C.R. (2007) Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 681-691.
Salminen A. and Kaarniranta K. (2012) AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev* **11**: 230-241.
Samuelson A.V., Carr C.E. and Ruvkun G. (2007) Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants. *Genes Dev* **21**: 2976-2994.
Sarup P., Sørensen P. and Loeschcke V. (2014) The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan. *Exp Gerontol* **50**: 34-39.
Schwedes C.C. and Carney G.E. (2012) Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* **58**: 293-302.
Scott T.W. and Lorenz L.H. (1998) Reduction of *Culiseta melanura* fitness by eastern equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg* **59**: 341-346.
Semsei I. (2000) On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* **117**: 93-108.
Sgrò C.M. and Partridge L. (1999) A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* **286**: 2521-2524.
Shaposhnikov M., Proshkina E., Koval L., Zemskaya N., Zhavoronkov A. and Moskalev A. (2018) Overexpression of *CBS* and *CSE* genes affects lifespan, stress resistance and locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)* **10**: 3260-3272.
Shi Y., Wang J., Chandarlapaty S., Cross J., Thompson C., Rosen N.*, et al.* (2014) PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 522-527.
Simon A.F., Shih C., Mack A. and Benzer S. (2003) Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science* **299**: 1407-1410.
Simonsen A., Cumming R.C., Brech A., Isakson P., Schubert D.R. and Finley K.D. (2008) Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* **4**: 176-184.
Simonsen A., Cumming R.C. and Finley K.D. (2007a) Linking lysosomal trafficking defects with changes in aging and stress response in *Drosophila*. *Autophagy* **3**: 499-501.
Simonsen A., Cumming R.C., Lindmo K., Galaviz V., Cheng S., Rusten T.E.*, et al.* (2007b) Genetic modifiers of the *Drosophila* blue cheese gene link defects in lysosomal transport with decreased life span and altered ubiquitinated-protein profiles. *Genetics* **176**: 1283-1297.
Slack C. (2017) Ras signaling in aging and metabolic regulation. *Nutr Healthy Aging*

4: 195-205.

Slack C., Alic N., Foley A., Cabecinha M., Hoddinott Matthew P. and Partridge L. (2015) The Ras-Erk-ETS-signaling pathway is a drug target for longevity. *Cell* **162**: 72-83.

Smith E.D., Tsuchiya M., Fox L.A., Dang N., Hu D., Kerr E.O.*, et al.* (2008) Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species. *Genome Res* **18**: 564-570.

Sohal R.S. and Allen R.G. (1990) Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol* **25**: 499-522.

Sone M., Uchida A., Komatsu A., Suzuki E., Ibuki I., Asada M.*, et al.* (2009) Loss of yata, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, induces deterioration of neural tissues and lifespan shortening. *PLoS ONE* **4**: e4466.

Song W., Ren D., Li W., Jiang L., Cho K.W., Huang P.*, et al.* (2010) SH2B regulation of growth, metabolism, and longevity in both insects and mammals. *Cell Metab* **11**: 427-437.

Stahl J.M., Nepi M., Galetto L., Guimarães E. and Machado S.R. (2012) Functional aspects of floral nectar secretion of *Ananas ananassoides*, an ornithophilous bromeliad from the Brazilian savanna. *Ann Bot* **109**: 1243-1252.

Tacutu R., Thornton D., Johnson E., Budovsky A., Barardo D., Craig T.*, et al.* (2018) Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases. *Nucleic Acids Res* **46**: D1083-D1090.

Takagi M. (1986) The reproductive strategy of the gregarious parasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): 2. Host size discrimination and regulation of the number and sex ratio of progeny in a single host. *Oecologia* **70**: 321-325.

Tang F., Watkins J.W., Bermudez M., Gray R., Gaban A., Portie K.*, et al.* (2008) A life-span extending form of autophagy employs the vacuole-vacuole fusion machinery. *Autophagy* **4**: 874-886.

Tang Q.Y. and Zhang C.X. (2013) Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci* **20**: 254-260.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M. and Garofalo R.S. (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292**: 107-110.

Testa G., Biasi F., Poli G. and Chiarpotto E. (2014) Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Design* **20**: 2950-2977.

Toivonen J.M. and Partridge L. (2009) Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. *Mol Cell Endocrinol* **299**: 39-50.

Tong J.J., Schriner S.E., McCleary D., Day B.J. and Wallace D.C. (2007) Life extension through neurofibromin mitochondrial regulation and antioxidant therapy for neurofibromatosis-1 in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **39**: 476-485.

Tóth M.L., Sigmond T., Borsos E., Barna J., Erdélyi P., Takács-Vellai K.*, et al.* (2008) Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **4**: 330-338.

Tower J. (2011) Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Exp Gerontol* **46**: 355-362.

Trevisan K., Cristina-Pereira R., Silva-Amaral D. and Aversi-Ferreira T.A. (2019) Theories of aging and the prevalence of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2019**: 9171424.

Tricoire H., Battisti V., Trannoy S., Lasbleiz C., Pret A.M. and Monnier V. (2009) The

steroid hormone receptor EcR finely modulates *Drosophila* lifespan during adulthood in a sex-specific manner. *Mech Ageing Dev* **130**: 547-552.

Tsuda M., Sugiura T., Ishii T., Ishii N. and Aigaki T. (2007) A mev-1-like dominant-negative SdhC increases oxidative stress and reduces lifespan in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* **363**: 342-346.

Tu M.P., Yin C.M. and Tatar M. (2005) Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen Comp Endocr* **142**: 347-356.

Ulgherait M., Rana A., Rera M., Graniel J. and Walker D.W. (2014) AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner. *Cell Rep* **8**: 1767-1780.

Umeda-Kameyama Y., Tsuda M., Ohkura C., Matsuo T., Namba Y., Ohuchi Y.*, et al.* (2007) Thioredoxin suppresses Parkin-associated endothelin receptor-like receptor-induced neurotoxicity and extends longevity in *Drosophila*. *J Biol Chem* **282**: 11180-11187.

Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P., Kostin S., Boettger T., Kubin T.*, et al.* (2008) Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res* **102**: 703-710.

Vazquez B.N., Thackray J.K., Simonet N.G., Kane-Goldsmith N., Martinez-Redondo P., Nguyen T.*, et al.* (2016) SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *EMBO J* **35**: 1488-1503.

Vellai T. (2009) Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ* **16**: 94-102.

Vrailas-Mortimer A., del Rivero T., Mukherjee S., Nag S., Gaitanidis A., Kadas D.*, et al.* (2011) A muscle-specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD pathway regulates stress, motor function, and life span in *Drosophila*. *Dev Cell* **21**: 783-795.

Waas W.F., Lo H.H. and Dalby K.N. (2001) The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem* **276**: 5676-5684.

Wäckers F.L. (2001) A comparison of nectar- and honeydew sugars with respect to their utilization by the hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. *J Insect Physiol* **47**: 1077-1084.

Walker D.W., Hájek P., Muffat J., Knoepfle D., Cornelison S., Attardi G.*, et al.* (2006) Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16382-16387.

Wang F., Fang Q., Wang B., Yan Z., Hong J., Bao Y.*, et al.* (2017) A novel negative-stranded RNA virus mediates sex ratio in its parasitoid host. *PLoS Pathog* **13**: e1006201.

Weichhart T. (2018) mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: a mini-review. *Gerontology* **64**: 127-134.

Weinert B.T. and Timiras P.S. (2003) Theories of aging. *J Appl Physiol* **95**: 1706-1716.

Werren J.H., Richards S., Desjardins C.A., Niehuis O., Gadau J., Colbourne J.K.*, et al.* (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science* **327**: 343-348.

Williams G.C. (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11**: 398-411.

Wood J.G., Schwer B., Wickremesinghe P.C., Hartnett D.A., Burhenn L., Garcia M.*, et al.* (2018) Sirt4 is a mitochondrial regulator of metabolism and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 1564-1569.

Wu H., Meng L. and Li B. (2008) Effects of feeding frequency and sugar concentrations

on lifetime reproductive success of *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). *Biol Control* **45**: 353-359.

Xiong S., Yu K., Ye X., Fang Q., Deng Y., Xiao S.*, et al.* (2020) Genes acting in longevity-related pathways in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *Arch Insect Biochem Physiol* **103**: e21635.

Yamaguchi T., Kakefuda R., Tajima N., Sowa Y. and Sakai T. (2011) Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol* **39**: 23-31.

Yamamoto R., Bai H., Dolezal A.G., Amdam G. and Tatar M. (2013) Juvenile hormone regulation of *Drosophila* aging. *BMC Biol* **11**: 85.

Yang L., Lin Z., Fang Q., Wang J., Yan Z., Zou Z.*, et al.* (2017) The genomic and transcriptomic analyses of serine proteases and their homologs in an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *Dev Comp Immunol* **77**: 56-68.

Yang Y.L., Loh K.S., Liou B.Y., Chu I.H., Kuo C.J., Chen H.D.*, et al.* (2013) SESN-1 is a positive regulator of lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* **48**: 371-379.

Ye X., Yan Z., Yang Y., Xiao S., Chen L., Wang J.*, et al.* (2020) A chromosome-level genome assembly of the parasitoid wasp *Pteromalus puparum*. *Mol Ecol Resour* **20**: 1384-1402.

Zid B.M., Rogers A.N., Katewa S.D., Vargas M.A., Kolipinski M.C., Lu T.A.*, et al.* (2009) 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell* **139**: 149-160.

附录I 蝶蛹金小蜂寿命相关基因的不同时期 FPKM 值汇总

Gene ID	Embryos	Larvae	Female Pupae	Male Pupae	Female Adults	Male Adults
PPU00054-RA	22.0292	5.62121	12.1644	15.9785	9.40911	8.77383
PPU00059-RA	34.6593	4.81631	14.2425	12.8502	13.8841	15.2527
PPU00208-RA	0	0	0.0622601	0.122928	0.855202	0
PPU00209-RA	0	0	0.366808	0.253555	3.98303	0.0634414
PPU00285-RA	0.168098	8.39859	11.2176	11.977	8.64987	7.92877
PPU00322-RA	552.968	47.8744	79.5413	61.865	262.767	73.861
PPU00499-RA	6.93049	11.3293	34.3342	34.1701	10.2886	9.64926
PPU00508-RA	0.318201	0	0	0.142633	0	0.0655864
PPU00881-RA	4.80073	0.180836	1.01725	3.05683	3.46237	4.72095
PPU01146-RA	0.43214	4.35725	13.0279	10.0554	2.07056	7.15364
PPU01346-RA	7.96187	3.63727	1.42012	2.41511	9.54155	11.9544
PPU01680-RA	132.667	7.52697	19.3502	16.5775	29.1262	21.5165
PPU01693-RA	11.5081	17.0612	36.0888	39.1909	8.93151	21.3344
PPU01704-RA	79.4925	31.3273	65.8038	70.278	47.6831	47.3778
PPU01990-RA	3.16132	16.8094	18.1284	20.0596	9.27737	22.0316
PPU02206-RA	106.592	178.873	153.282	159.47	212.659	592.076
PPU02268-RA	158.03	52.5749	93.6042	74.466	48.678	14.6531
PPU02277-RA	1.7675	26.4603	34.6824	7.11629	4.74171	3.64107
PPU02280-RA	59.6755	10.6401	7.66364	14.0213	18.4258	3.79667
PPU02365-RA	0.0634248	0.0145622	0.027788	0.00686184	0	0.00608917
PPU02491-RA	21.9017	5.65947	19.0966	19.4669	11.816	5.69512
PPU02531-RA	145.309	12.6294	34.7816	28.1494	33.2247	5.03364
PPU02576-RA	121.023	153.435	292.443	266.034	134.953	176.395
PPU02599-RA	0.680063	0.714098	1.01339	3.12634	0.173902	2.58853
PPU02657-RA	107.755	23.4999	38.6152	21.6052	59.7131	23.2331
PPU02727-RA	38.9458	8.62287	17.7849	17.5221	24.5232	34.507
PPU02803-RA	26.5688	17.3297	17.7072	19.3656	33.2671	43.8276
PPU03042-RA	70.9826	43.7566	122.952	133.028	56.7322	41.8343
PPU03121-RA	101.095	0	0.0203595	0.0402171	31.7341	0.266655
PPU03142-RA	36.9641	14.8481	40.2998	36.6612	20.3408	16.2295
PPU03176-RA	0.297211	24.3131	0	0.0736742	0	0.451467
PPU03180-RA	935.209	595.457	590.089	579.432	891.205	335.249
PPU03220-RA	4.30805	12.9213	4.4966	7.14855	27.1229	53.9448
PPU03221-RA	0.0183876	0.0189666	0	0.0178357	1.58153	7.11089
PPU03371-RA	111.532	13.441	42.3818	35.7868	33.8346	7.57257
PPU03565-RA	0.688344	44.3774	3.71443	3.6202	17.1889	6.96045
PPU03566-RA	0.0785513	1.73845	205.359	88.3326	17.1477	9.18474
PPU03567-RA	13.2195	31.797	34.9655	32.6073	23.7366	18.3463
PPU03568-RA	6.80508	1.82179	0.270614	0.315859	1.24084	0.235694

PPU03569-RA	18.6099	4.35872	13.2693	11.3192	38.966	40.2089
PPU03649-RA	0.0508315	4.13847	0	0.0249679	0.0708145	8.81494
PPU03650-RA	0.0309288	0.128549	0	0.0305163	0.0862989	0.697147
PPU03651-RA	4.80626	0	0.0447878	0	0.94236	0
PPU03661-RA	0	14.8614	14.788	3.25339	0.0664385	0.0413034
PPU03662-RA	0.153345	4.72016	0.239022	0.278993	0.914714	2.91946
PPU03663-RA	0.0480147	11.9956	3.91192	5.27703	5.21555	2.20315
PPU03672-RA	1.6612	1.43669	3.37466	3.56686	1.02111	2.42999
PPU03684-RA	31.1462	37.7885	59.6813	57.3253	69.2615	73.3761
PPU03769-RA	31.057	12.8789	8.61801	10.9579	30.7101	139.316
PPU03775-RA	30.4122	29.5154	53.2132	61.0935	28.6931	44.2026
PPU03798-RA	31.9618	4.39673	9.91534	11.3004	11.8263	5.75053
PPU03831-RA	6.47574	103.906	37.4634	35.2844	73.86	50.3221
PPU03832-RA	9.23317	1741.43	651.721	625.2	221.339	292.765
PPU03834-RA	0	0	1.58289	1.33978	1.57316	6.41675
PPU03934-RA	0.0999109	2.86104	3.78538	4.93432	1.46717	2.49128
PPU03981-RA	519.637	330.212	478.559	468.295	1160.15	966.182
PPU04084-RA	19.1149	4.79418	3.30127	4.52776	6.33199	3.74304
PPU04123-RA	52.2777	48.7581	15.2102	16.0639	70.7434	71.5505
PPU04128-RA	868.423	762.367	1604.13	1213.06	848.018	9.17654
PPU04129-RA	213.678	131.157	734.244	442.31	147.26	10.4717
PPU04130-RA	21.4273	323.2	1863.63	1595.3	149.425	16.387
PPU04131-RA	1.35897	35.9217	595.999	667.77	18.5424	2.64143
PPU04132-RA	0.330818	29.3016	321.627	155.728	24.0936	1.15909
PPU04133-RA	380.975	74.9966	1184.05	927.371	112.473	21.9343
PPU04166-RA	327.93	112.477	94.4932	99.0109	132.566	42.3324
PPU04213-RA	11.1575	8.06607	33.1938	28.738	3.8948	4.20388
PPU04252-RA	5.95468	14.6954	23.4889	19.0347	8.65384	8.49649
PPU04342-RA	4.26224	10.6498	19.1986	28.3147	7.9297	3.34053
PPU04374-RA	83.3255	23.1266	71.718	72.1015	27.6548	18.3692
PPU04412-RA	38.6097	4.07314	8.37783	17.4049	9.35165	1.91081
PPU04431-RA	44.7434	12.1255	15.1465	13.1596	21.8704	16.8692
PPU04462-RA	41.1456	11.3449	46.6226	45.7226	16.62	30.387
PPU04479-RA	742.468	106.318	165.554	124.896	251.948	257.341
PPU04680-RA	120.009	26.6195	55.0049	59.8397	41.0485	18.3383
PPU04683-RA	73.6693	49.6133	46.9303	39.6775	50.0931	44.3148
PPU04710-RA	3.66987	191.212	86.5355	87.8671	208.722	148.038
PPU04851-RA	35.039	12.1063	13.1732	16.1436	16.1067	10.2919
PPU04976-RA	59.3123	17.8677	18.7354	29.2863	50.7965	30.1671
PPU05088-RA	0.272086	0.38473	1.23644	4.69251	16.4519	13.2882
PPU05089-RA	115.152	281.423	650.054	606.227	289.707	310.831
PPU05100-RA	7.24756	3.17414	3.08845	6.03486	9.27767	9.88413
PPU05101-RA	0.277658	1.27964	4.50545	6.42754	2.33489	7.27953

PPU05102-RA	0.146827	7.37517	0.381486	0.544313	0.14376	0.357826
PPU05117-RA	10.8845	4.57858	20.1852	20.3032	9.24284	7.69096
PPU05135-RA	8.53434	8.83779	31.7756	41.0729	10.4425	13.5083
PPU05162-RA	0.400734	4.05792	1.13332	1.62457	4.98798	6.86097
PPU05284-RA	42.6418	0	0	0.0554439	16.0952	0.242664
PPU05285-RA	25.0539	15.9797	24.2436	29.8931	16.5317	11.6822
PPU05400-RA	66.5774	27.3408	65.0266	60.5342	80.686	68.8117
PPU05508-RA	252.775	170.433	361.729	311.885	266.714	692.143
PPU05545-RA	4.57137	8.42176	7.12615	13.2428	17.1304	13.1299
PPU05620-RA	12.6195	6.8548	14.5883	18.6781	12.7661	19.6851
PPU05710-RA	0.0402009	0.125709	0.566515	0.439535	0.449767	1.36172
PPU05718-RA	148.298	6.51283	25.2222	28.6894	25.9358	5.02926
PPU05744-RA	1835	2168.71	1546.57	1211.75	2725.75	989.381
PPU05765-RA	160.264	26.5108	30.4083	34.7986	42.8818	16.2991
PPU05842-RA	0.849243	0	0	0.00694975	0	0.00616654
PPU05966-RA	67.5537	4.51835	6.37138	8.40729	10.2871	0.874032
PPU06056-RA	0.209919	1.32141	0.639673	1.279	4.7484	2.5466
PPU06071-RA	6.96946	0.0172003	0.0164301	0	0.138719	0
PPU06147-RA	19.9152	256.41	102.043	89.5914	138.755	116.548
PPU06149-RA	1818.21	10.2724	26.4578	17.5382	379.923	3.42011
PPU06179-RA	33.1446	20.2038	34.9078	26.6931	59.6009	29.0332
PPU06188-RA	42.0849	15.5597	26.79	26.392	23.0316	14.9048
PPU06343-RA	55.0963	21.8286	23.6942	28.0785	37.5305	11.2572
PPU06431-RA	3.16491	5.00458	20.7184	22.7602	3.1085	6.46387
PPU06557-RA	26.6287	14.3702	39.5697	50.221	52.3598	15.9912
PPU07049-RA	5.99899	3.56275	7.05559	8.84626	2.31293	3.79464
PPU07061-RA	0.32147	1.14867	0.330006	3.71381	1.99065	3.14216
PPU07069-RA	0.00917881	0.0946781	0.414609	0.338322	1.80815	1.41035
PPU07176-RA	3.15709	0.0618714	0.178377	0.1468	1.32927	0.490484
PPU07178-RA	0.338164	1.92346	1.13594	1.61697	6.67492	1.63719
PPU07179-RA	5.49318	6.12469	7.68913	10.2771	4.65942	25.9433
PPU07198-RA	47.7742	297.752	207.708	241.289	128.673	180.941
PPU07299-RA	17.6315	0.499621	1.2951	9.25745	3.18549	0.223456
PPU07359-RA	88.4994	9.94877	28.3763	30.4707	21.469	5.4578
PPU07489-RA	46.0919	46.2458	29.7267	38.5411	37.4955	25.3595
PPU07497-RA	81.6768	23.1911	44.7479	39.8916	89.3935	62.1389
PPU07542-RA	40.3107	28.7822	66.4413	67.4752	41.5157	21.8606
PPU07580-RA	0.322656	0	0	2.87637	1.0016	0.0311106
PPU07630-RA	7.70066	72.2615	0.341261	5.10124	15.312	4.98286
PPU07649-RA	32.6686	60.8884	58.3316	88.3935	36.053	293.273
PPU07680-RA	16.3717	2.02998	0.80454	2.33967	55.8636	28.5536
PPU07681-RA	163.214	22.9891	0.993647	1.45074	50.5008	7.76501
PPU07682-RA	0.681685	2.43637	8.3112	31.1276	18.8531	18.8428

PPU07683-RA	0.0709634	1.29948	0.0939837	0.0232054	0.131754	0.511936
PPU07715-RA	7.69566	4.72481	26.5266	41.0163	8.15727	16.7708
PPU07824-RA	3.68021	5.4103	2.84169	3.85953	2.74835	15.409
PPU08093-RA	181.093	447.294	422.679	475.648	498.391	1001.48
PPU08145-RA	6.75722	8.65257	29.826	28.0046	13.7856	21.471
PPU08165-RA	4.73926	6.51919	11.6231	13.358	9.413	9.32082
PPU08194-RA	126.479	137.517	80.0607	97.3084	76.0318	49.4515
PPU08276-RA	20.5232	14.4599	41.3526	33.5497	53.3861	28.6092
PPU08282-RA	177.173	0	0	0.0268363	48.2833	0.0238187
PPU08349-RA	0.160766	0.112225	0.0545311	18.359	0.150412	0.980018
PPU08376-RA	0.221738	122.263	56.7208	65.2582	350.1	183.513
PPU08377-RA	0.214968	4.07678	7.69629	12.5639	24.2496	80.0372
PPU08515-RA	33.0342	78.7634	38.2052	78.5535	147.615	124.957
PPU08526-RA	16.0063	6.23455	11.6854	14.5769	12.027	4.96405
PPU09133-RA	21.9626	10.5429	15.001	19.8555	8.97555	3.47667
PPU09172-RA	83.0518	31.1544	65.5196	61.1812	23.9119	7.85966
PPU09234-RA	0	1.23667	0.469785	0.257684	2.01815	14.0458
PPU09281-RA	77.9658	6.8019	22.7954	28.0945	19.6314	8.8843
PPU09869-RA	108.086	117.568	151.696	11.6241	121.908	11.9487
PPU09871-RA	31.0146	10.389	70.6406	8.77945	114.391	6.09578
PPU09895-RA	43.0238	10.0934	52.4431	36.1318	18.6056	14.3592
PPU09930-RA	235.72	421.667	408.321	314.324	374.435	108.359
PPU09994-RA	0.0188302	0.370239	0.0372647	21.5499	0.157128	1.18885
PPU09995-RA	71.6408	52.1645	50.1533	67.4676	61.1311	116.345
PPU10133-RA	102.341	353.689	165.749	174.011	242.792	1093.55
PPU10327-RA	0	1.10444	0.225154	0.664723	1.17007	0.359613
PPU10534-RA	2.25109	2.14224	4.07828	5.28122	0.679711	2.20606
PPU10539-RA	108.546	29.8708	55.1802	60.6006	36.7523	45.1494
PPU10594-RA	1.49487	6.51597	21.9292	27.5705	8.8629	10.2417
PPU10657-RA	12.493	4.61502	9.6353	13.9049	7.24958	6.08867
PPU10709-RA	0	16.7408	18.3527	22.7274	8.14239	13.9908
PPU10800-RA	93.4514	14.1047	15.4472	17.5396	46.0196	48.7904
PPU10813-RA	10.7293	0	0.0291527	0.0143976	2.66911	0
PPU10855-RA	0	0	0	0	0.169184	0
PPU10858-RA	0.168526	0	0	0.199973	0.376455	0.116946
PPU10905-RA	1.83299	3.29221	1.26258	2.67123	4.04826	5.91179
PPU10958-RA	140.138	80.0248	157.305	168.442	62.9283	17.882
PPU10960-RA	7.12502	3.06288	1.90229	4.56597	4.49615	9.34656
PPU10964-RA	22.2416	20.2181	9.06596	16.7172	35.667	35.5914
PPU11183-RA	9.54954	19.0377	37.044	43.739	16.0621	14.212
PPU11296-RA	0	0.0453989	0.73655	1.39797	0.284817	2.49297
PPU11457-RA	16.0771	3.73399	9.33832	11.7832	8.69134	2.64854
PPU11536-RA	6.38106	2.39491	5.50924	7.13233	1.55975	1.94824

PPU11611-RA	28.8356	22.1866	43.1664	29.448	28.1122	8.76064
PPU11704-RA	49.4621	38.3981	101.075	98.231	26.4388	60.2748
PPU11776-RA	84.0451	27.5244	37.4914	47.3386	30.0108	8.97052
PPU12140-RA	16.4258	14.9564	23.74	19.8806	22.5186	35.2567
PPU12236-RA	26.6792	8.90296	27.2466	21.8673	16.1181	8.75779
PPU12298-RA	19.1587	0	0	0.128996	2.41363	0.0681945
PPU12340-RA	46.022	32.6643	60.5294	59.4294	66.4703	139.947
PPU12417-RA	6.95295	1.25713	8.16274	11.9613	4.27484	4.39217
PPU12453-RA	77.8882	77.026	107.919	107.383	59.8016	22.8679
PPU12454-RA	39.5095	6.50045	10.058	15.3439	22.2358	9.16132
PPU12583-RA	83.7248	13.2319	36.075	32.4753	35.0603	25.3307
PPU12664-RA	2.90791	3.55342	3.33244	3.3674	22.689	11.0462
PPU12675-RA	1.02631	0.343569	0.167943	0.0785812	0.624433	0.101024
PPU12709-RA	55.8901	48.241	87.1145	102.719	75.3685	60.1672
PPU12802-RA	44.8284	7.27702	13.223	14.1854	15.7003	10.1638
PPU12823-RA	83.0432	11.4469	4.80915	15.26	26.7707	12.1541
PPU12867-RA	8.79941	49.3385	33.8238	33.7289	11.6579	6.43429
PPU13211-RA	0	16.8486	1.00192	2.53414	78.2743	11.9626
PPU13212-RA	5.64203	26.865	1.57448	1.60359	274.571	145.681
PPU13213-RA	2.19176	5.66867	2.50055	3.78425	58.0666	17.0813
PPU13254-RA	47.7486	20.9931	30.4487	37.3298	30.3554	21.8289
PPU13369-RA	72.3157	162.165	177.99	225.587	104.264	39.9567
PPU13406-RA	39.6335	16.25	16.9724	17.2784	48.8007	30.3276
PPU13433-RA	154.639	563.049	640.589	663.203	613.055	644.336
PPU13552-RA	99.6679	8.46362	21.7109	20.7903	37.7258	6.01516
PPU13693-RA	47.197	10.2184	22.3045	21.3685	24.4471	4.95692
PPU13728-RA	18.5926	8.078	20.3316	21.4393	11.1507	7.43013
PPU13750-RA	30.5488	9.00111	32.2247	34.5708	20.7395	17.4396
PPU13858-RA	1.79559	0.00916806	0.095994	0.0948226	0.369918	0.13811
PPU13926-RA	17.3452	6.19919	5.8564	7.00529	9.62022	8.30365
PPU13999-RA	6.73893	9.07787	27.4232	23.681	4.98587	7.41809
PPU14444-RA	292.626	0.176881	0.613149	0.168194	92.3145	0.88509
PPU14463-RA	19.3826	29.1122	36.1377	43.3311	29.9654	19.9332
PPU14545-RA	56.8716	11.6396	34.4733	32.4472	29.8659	16.8303
PPU14597-RA	29.3091	21.3216	23.1357	21.4095	24.4707	42.1081
PPU14600-RA	34.0892	12.9293	40.395	38.9426	21.869	34.5331
PPU14715-RA	129.684	18.4388	45.4018	41.1212	29.7259	12.8877
PPU14818-RA	87.4382	22.9013	6.17649	12.3389	170.494	35.0936
PPU14833-RA	0	0	1.89882	0	0	0
PPU15090-RA	16.5357	6.3653	10.1937	11.7893	5.84624	4.52948
PPU15278-RA	362.361	283.071	344.259	332.746	306.91	198.316
PPU15351-RA	4.78037	2.99298	4.12277	6.62603	10.7056	9.7822
PPU15439-RA	23.4348	417.126	220.995	172.41	210.743	603.903

PPU15731-RA	0.262939	40.4587	90.63	82.8286	1.03295	5.44864
PPU15964-RA	15.3032	8.4514	22.4051	26.1602	15.2356	10.7717
PPU16116-RA	1.49527	1.46264	2.53602	3.84556	0.702726	1.83565
PPU16234-RA	65.1427	150.767	210.578	258.6	72.2978	22.3299
PPU16285-RA	0	10.4574	4.91146	7.61124	41.4919	8.19918
PPU16549-RA	37.3798	82.3468	69.4158	82.8031	40.1651	156.77
PPU16588-RA	0.0668106	0.555835	31.134	55.2499	0.0932691	2.43386
PPU16589-RA	0.16069	0.594322	0.835631	3.9586	110.145	80.191
PPU16623-RA	19.852	13.2171	42.1658	35.379	12.656	12.5386
PPU16710-RA	24.399	21.5887	34.0408	40.0408	21.8763	17.2961
PPU17080-RA	7.68946	10.2533	27.8374	26.355	8.67249	10.7074

附录II 寿命相关基因的 GO 富集分析

GO ID (level1)	GO Term (level1)	GO ID (level2)	GO Term (level2)	Count	Gene List
GO:0008150	Biological Process	GO:0008152	metabolic process	43	PPU03651-RA;PPU04710-RA;PPU05088-RA;PPU05089-RA;PPU08194-RA;PPU08376-RA;PPU08377-RA;PPU13433-RA;PPU05718-RA;PPU00499-RA;PPU17080-RA;PPU00059-RA;PPU02657-RA;PPU02803-RA;PPU04462-RA;PPU04711-RA;PPU05283-RA;PPU05284-RA;PPU05285-RA;PPU05400-RA;PPU05765-RA;PPU07299-RA;PPU07580-RA;PPU09281-RA;PPU09895-RA;PPU10327-RA;PPU12340-RA;PPU14715-RA;PPU15090-RA;PPU15964-RA;PPU16623-RA;PPU04412-RA;PPU03371-RA;PPU09172-RA;PPU04123-RA;PPU04166-RA;PPU13693-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU10905-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU00209-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0009987	cellular process	55	PPU10539-RA;PPU04342-RA;PPU00499-RA;PPU17080-RA;PPU01704-RA;PPU03684-RA;PPU09895-RA;PPU10958-RA;PPU12539-RA;PPU14545-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU10905-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU05718-RA;PPU14600-RA;PPU13552-RA;PPU02491-RA;PPU04431-RA;PPU05135-RA;PPU12802-RA;PPU03798-RA;PPU06343-RA;PPU08194-RA;PPU08376-RA;PPU08377-RA;PPU13433-RA;PPU00059-RA;PPU02657-RA;PPU02803-RA;PPU04462-RA;PPU04711-RA;PPU05283-RA;PPU05284-RA;PPU05285-RA;PPU05400-RA;PPU05765-RA;PPU07299-RA;PPU07580-RA;PPU09281-RA;PPU10327-RA;PPU12340-RA;PPU14715-RA;PPU15090-RA;PPU15964-RA;PPU16623-RA;PPU04412-RA;PPU03371-RA;PPU09172-RA;PPU02268-RA;PPU12298-RA;PPU04123-RA;PPU04166-RA;PPU13693-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0023052	signaling	18	PPU04342-RA;PPU00499-RA;PPU17080-RA;PPU01704-RA;PPU03684-RA;PPU09895-RA;PPU10958-RA;PPU12539-RA;PPU14545-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU10905-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU14600-RA;PPU03798-RA;PPU06343-RA;PPU07299-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0044699	single-organism process	31	PPU04342-RA;PPU00499-RA;PPU17080-RA;PPU01704-RA;PPU03684-RA;PPU09895-RA;PPU10958-RA;PPU12539-RA;PPU14545-RA;PPU03651-RA;PPU04710-RA;PPU05088-RA;PPU05089-RA;PPU08194-RA;PPU08376-RA;PPU08377-RA;PPU13433-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU10905-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU14600-RA;PPU03798-RA;PPU06343-RA;PPU04412-RA;PPU07299-RA;PPU03371-RA;PPU09172-RA;PPU02268-RA;PPU12298-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0050896	response to stimulus	21	PPU04342-RA;PPU00499-RA;PPU17080-RA;PPU01704-RA;PPU03684-RA;PPU09895-RA;PPU10958-RA;PPU12539-RA;PPU14545-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU10905-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU14600-RA;PPU03798-RA;PPU06343-RA;PPU07299-RA;PPU04710-RA;PPU05088-RA;PPU05089-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0051179	localization	2	PPU10958-RA;PPU03684-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0065007	biological regulation	38	PPU04342-RA;PPU00499-RA;PPU17080-RA;PPU01704-RA;PPU03684-RA;PPU09895-RA;PPU10958-RA;PPU12539-RA;PPU14545-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU10905-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU14600-RA;PPU13750-RA;PPU03798-RA;PPU06343-RA;PPU01990-RA;PPU02268-RA;PPU03121-RA;PPU03651-RA;PPU04683-RA;PPU06179-RA;PPU07049-RA;PPU08093-RA;PPU08282-RA;PPU11611-

					RA;PPU12298-RA;PPU13406-RA;PPU14444-RA;PPU14463-RA;PPU13552-RA;PPU00322-RA;PPU07299-RA;PPU00208-RA;PPU08526-RA;PPU05117-RA
GO:0008150	Biological Process	GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	5	PPU10539-RA;PPU13552-RA;PPU04412-RA;PPU03371-RA;PPU09172-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0001071	nucleic acid binding transcription factor activity	16	PPU01990-RA;PPU02268-RA;PPU03121-RA;PPU03651-RA;PPU04342-RA;PPU04683-RA;PPU06179-RA;PPU07049-RA;PPU08093-RA;PPU08282-RA;PPU11611-RA;PPU12298-RA;PPU13406-RA;PPU14444-RA;PPU14463-RA;PPU14600-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0003824	catalytic activity	46	PPU00209-RA;PPU05088-RA;PPU05089-RA;PPU03651-RA;PPU10958-RA;PPU12454-RA;PPU04710-RA;PPU02491-RA;PPU06147-RA;PPU06149-RA;PPU07299-RA;PPU10905-RA;PPU00059-RA;PPU02657-RA;PPU04462-RA;PPU04711-RA;PPU05285-RA;PPU05400-RA;PPU05765-RA;PPU07580-RA;PPU09281-RA;PPU09895-RA;PPU10327-RA;PPU12340-RA;PPU14715-RA;PPU15090-RA;PPU15964-RA;PPU16623-RA;PPU03371-RA;PPU09172-RA;PPU05718-RA;PPU02803-RA;PPU05283-RA;PPU05284-RA;PPU06056-RA;PPU07824-RA;PPU11296-RA;PPU11536-RA;PPU00499-RA;PPU11457-RA;PPU17080-RA;PPU08194-RA;PPU08376-RA;PPU08377-RA;PPU13433-RA;PPU04412-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0004871	signal transducer activity	7	PPU04342-RA;PPU14600-RA;PPU07299-RA;PPU02803-RA;PPU04462-RA;PPU05765-RA;PPU09895-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0005488	binding	68	PPU02268-RA;PPU04342-RA;PPU04683-RA;PPU11611-RA;PPU12298-RA;PPU14600-RA;PPU08276-RA;PPU03651-RA;PPU02576-RA;PPU15278-RA;PPU04123-RA;PPU04166-RA;PPU13693-RA;PPU01990-RA;PPU07049-RA;PPU08093-RA;PPU13406-RA;PPU03121-RA;PPU03798-RA;PPU04412-RA;PPU06179-RA;PPU07299-RA;PPU10534-RA;PPU10657-RA;PPU10800-RA;PPU11457-RA;PPU12454-RA;PPU12539-RA;PPU12583-RA;PPU14463-RA;PPU15090-RA;PPU16116-RA;PPU13552-RA;PPU02727-RA;PPU03684-RA;PPU10958-RA;PPU00322-RA;PPU00054-RA;PPU03042-RA;PPU05545-RA;PPU11183-RA;PPU13728-RA;PPU15351-RA;PPU08194-RA;PPU08376-RA;PPU08377-RA;PPU13433-RA;PPU04710-RA;PPU04851-RA;PPU01146-RA;PPU00059-RA;PPU02657-RA;PPU02803-RA;PPU04462-RA;PPU04711-RA;PPU05283-RA;PPU05284-RA;PPU05285-RA;PPU05400-RA;PPU05765-RA;PPU07580-RA;PPU09281-RA;PPU09895-RA;PPU10327-RA;PPU12340-RA;PPU14715-RA;PPU15964-RA;PPU16623-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0016209	antioxidant activity	7	PPU05088-RA;PPU05089-RA;PPU04710-RA;PPU08194-RA;PPU08376-RA;PPU08377-RA;PPU13433-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0060089	molecular transducer activity	3	PPU04342-RA;PPU14600-RA;PPU07299-RA
GO:0003674	Molecular Function	GO:0098772	molecular function regulator	5	PPU12539-RA;PPU00208-RA;PPU08526-RA;PPU01704-RA;PPU14545-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0005576	extracellular region	1	PPU01146-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0005623	cell	29	PPU02491-RA;PPU04123-RA;PPU04166-RA;PPU04431-RA;PPU10539-RA;PPU13552-RA;PPU13693-RA;PPU00208-RA;PPU08526-RA;PPU03798-RA;PPU01704-RA;PPU14545-RA;PPU01990-RA;PPU02268-RA;PPU03121-RA;PPU03651-RA;PPU04342-RA;PPU04412-RA;PPU04683-RA;PPU06179-RA;PPU08282-

					RA;PPU11611-RA;PPU12298-RA;PPU13750-RA;PPU14444-RA;PPU14463-RA;PPU14600-RA;PPU03684-RA;PPU10958-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0016020	membrane	6	PPU03775-RA;PPU10905-RA;PPU12539-RA;PPU03684-RA;PPU07299-RA;PPU10958-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0032991	macromolecular complex	6	PPU00208-RA;PPU08526-RA;PPU03798-RA;PPU12539-RA;PPU01704-RA;PPU14545-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0043226	organelle	16	PPU01990-RA;PPU02268-RA;PPU03121-RA;PPU03651-RA;PPU04342-RA;PPU04412-RA;PPU04683-RA;PPU06179-RA;PPU08282-RA;PPU11611-RA;PPU12298-RA;PPU13552-RA;PPU13750-RA;PPU14444-RA;PPU14463-RA;PPU14600-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0044425	membrane part	3	PPU03775-RA;PPU10905-RA;PPU12539-RA
GO:0005575	Cellular Component	GO:0044464	cell part	29	PPU02491-RA;PPU04123-RA;PPU04166-RA;PPU04431-RA;PPU10539-RA;PPU13552-RA;PPU13693-RA;PPU00208-RA;PPU08526-RA;PPU03798-RA;PPU01704-RA;PPU14545-RA;PPU01990-RA;PPU02268-RA;PPU03121-RA;PPU03651-RA;PPU04342-RA;PPU04412-RA;PPU04683-RA;PPU06179-RA;PPU08282-RA;PPU11611-RA;PPU12298-RA;PPU13750-RA;PPU14444-RA;PPU14463-RA;PPU14600-RA;PPU03684-RA;PPU10958-RA

附录III 热应激转录组 KEGG 显著富集通路及基因

Pathway	Pathway ID	K_id	DEGs	Desciption
25℃ vs. 35℃ 3h				
Antigen processing and presentation	ko04612			
		K01365	PPU00866-RA	CTSL; cathepsin L
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
Longevity regulating pathway - multiple species	ko04213			
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K09542	PPU04128-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04131-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04132-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
Prion diseases	ko05020			
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K09553	PPU11533-RA	STIP1; stress-induced-phosphoprotein 1
Legionellosis	ko05134			
		K00239	PPU09994-RA	sdhA, frdA; succinate dehydrogenase / fumarate reductase, flavoprotein subunit
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141			
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K09542	PPU04128-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04131-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04132-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09556	PPU07557-RA	BAG2; BCL2-associated athanogene 2
Measles	ko05162			

		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
Estrogen signaling pathway	ko04915			
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
Toxoplasmosis	ko05145			
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
Influenza A	ko05164			
		K01312	PPU06222-RA	PRSS1_2_3; trypsin
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
Pancreatic secretion	ko04972			
		K01176	PPU13714-RA	AMY, amyA, malS; alpha-amylase
		K01176	PPU11451-RA	AMY, amyA, malS; alpha-amylase
		K01312	PPU06222-RA	PRSS1_2_3; trypsin
		K14073	PPU03462-RA	PNLIP, PL; pancreatic triacylglycerol lipase
Caffeine metabolism	ko00232			
		K00106	PPU05100-RA	XDH; xanthine dehydrogenase/oxidase
		K00365	PPU11141-RA	uaZ; urate oxidase
Starch and sucrose metabolism	ko00500			
		K01176	PPU13714-RA	AMY, amyA, malS; alpha-amylase
		K01176	PPU11451-RA	AMY, amyA, malS; alpha-amylase
		K01187	PPU09682-RA	malZ; alpha-glucosidase
Steroid hormone biosynthesis	ko00140			
		K00699	PPU07393-RA	UGT; glucuronosyltransferase
		K07424	PPU09664-RA	CYP3A; cytochrome P450 family 3 subfamily A
Chemical carcinogenesis	ko05204			
		K00699	PPU07393-RA	UGT; glucuronosyltransferase
		K00816	PPU12436-RA	CCBL; kynurenine---oxoglutarate transaminase / cysteine-S-conjugate beta-lyase / glutamine---phenylpyruvate transaminase
		K07424	PPU09664-RA	CYP3A; cytochrome P450 family 3 subfamily A
25℃ vs. 35℃ 6h				

Antigen processing and presentation	ko04612			
		K01365	PPU00866-RA	CTSL; cathepsin L
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
Longevity regulating pathway - multiple species	ko04213			
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K09542	PPU04128-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04131-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04132-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141			
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K09542	PPU04128-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04131-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04132-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
25℃ vs. 35℃ 12h				
Antigen processing and presentation	ko04612			
		K01365	PPU00866-RA	CTSL; cathepsin L
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
Longevity regulating pathway - multiple species	ko04213			
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K09542	PPU04128-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04131-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04132-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
Prion diseases	ko05020			
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K09553	PPU11533-RA	STIP1; stress-induced-phosphoprotein 1
Quorum sensing	ko02024			
		K01183	PPU07620-RA	E3.2.1.14; chitinase
		K01183	PPU11290-RA	E3.2.1.14; chitinase
		K01183	PPU00035-RA	E3.2.1.14; chitinase
		K01580	PPU12550-RA	E4.1.1.15, gadB, gadA, GAD; glutamate decarboxylase

		K01580	PPU00249-RA	E4.1.1.15, gadB, gadA, GAD; glutamate decarboxylase
Legionellosis	ko05134			
		K00239	PPU09994-RA	sdhA, frdA; succinate dehydrogenase / fumarate reductase, flavoprotein subunit
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
Protein processing in endoplasmic reticulum	ko04141			
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K09542	PPU04128-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04131-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K09542	PPU04132-RA	CRYAB; crystallin, alpha B
		K10099	PPU08677-RA	FBXO2, NFB42; F-box protein 2
25℃ vs. 35℃ 5d				
Cell cycle	ko04110			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K08866	PPU09941-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2

DNA replication	ko03030			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02321	PPU12790-RA	POLA2; DNA polymerase alpha subunit B
		K02324	PPU04634-RA	POLE; DNA polymerase epsilon subunit 1
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K02684	PPU15828-RA	PRI1; DNA primase small subunit
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10742	PPU08022-RA	DNA2; DNA replication ATP-dependent helicase Dna2
		K10747	PPU07349-RA	LIG1; DNA ligase 1
Cell cycle - yeast	ko04111			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K06674	PPU04676-RA	SMC2; structural maintenance of chromosome 2
		K06678	PPU16717-RA	YCG1, CAPG; condensin complex subunit 3
		K08866	PPU09941-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
Antigen processing and presentation	ko04612			
		K01365	PPU00866-RA	CTSL; cathepsin L
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8

		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K09490	PPU09930-RA	HSPA5, BIP; heat shock 70kDa protein 5
Prion diseases	ko05020			
		K03283	PPU03831-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU04479-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09869-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K03283	PPU09871-RA	HSPA1s; heat shock 70kDa protein 1/2/6/8
		K09490	PPU09930-RA	HSPA5, BIP; heat shock 70kDa protein 5
		K09553	PPU11533-RA	STIP1; stress-induced-phosphoprotein 1
Hedgehog signaling pathway - fly	ko04341			
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K06228	PPU12377-RA	FU; fused
		K09319	PPU06502-RA	EN; homeobox protein engrailed
		K10523	PPU03547-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU07297-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU11297-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU08689-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
Meiosis - yeast	ko04113			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
25°C vs. 35°C 10d				
Cell cycle	ko04110			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3

		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K08866	PPU09941-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
Alcoholism	ko05034			
		K02183	PPU07061-RA	CALM; calmodulin
		K02183	PPU10310-RA	CALM; calmodulin
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04374	PPU08093-RA	ATF4, CREB2; cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
		K04534	PPU09386-RA	GNAO, G-ALPHA-O; guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
		K05210	PPU01978-RA	GRIN2B; glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B
		K08155	PPU08459-RA	SLC18A1_2, VMAT; MFS transporter, DHA1 family, solute carrier family 18 (vesicular amine transporter), member 1/2
		K11251	PPU08396-RA	H2A; histone H2A
		K11251	PPU08465-RA	H2A; histone H2A
		K11251	PPU12448-RA	H2A; histone H2A
		K11252	PPU08466-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU12449-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU12505-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU12526-RA	H2B; histone H2B
		K11253	PPU08186-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU08400-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU12446-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU12504-RA	H3; histone H3
		K11254	PPU08177-RA	H4; histone H4
		K11254	PPU08405-RA	H4; histone H4
		K11254	PPU12445-RA	H4; histone H4
		K11254	PPU12527-RA	H4; histone H4
		K11303	PPU11070-RA	HAT1, KAT1; histone acetyltransferase 1
Cell cycle - yeast	ko04111			

		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K06674	PPU04676-RA	SMC2; structural maintenance of chromosome 2
		K06678	PPU16717-RA	YCG1, CAPG; condensin complex subunit 3
		K08866	PPU09941-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
Fanconi anemia pathway	ko03460			
		K04482	PPU12792-RA	RAD51; DNA repair protein RAD51
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10891	PPU10147-RA	FANCD2; fanconi anemia group D2 protein
		K10895	PPU05919-RA	FANCI; fanconi anemia group I protein
		K10901	PPU04995-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU12559-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU11278-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K15362	PPU13983-RA	BRIP1, BACH1, FANCJ; fanconi anemia group J protein
DNA replication	ko03030			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02324	PPU04634-RA	POLE; DNA polymerase epsilon subunit 1
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K02684	PPU15828-RA	PRI1; DNA primase small subunit
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2

		K10742	PPU08022-RA	DNA2; DNA replication ATP-dependent helicase Dna2
		K10756	PPU07648-RA	RFC3_5; replication factor C subunit 3/5
Lysosome	ko04142			
		K01137	PPU10678-RA	GNS; N-acetylglucosamine-6-sulfatase
		K01195	PPU05475-RA	uidA, GUSB; beta-glucuronidase
		K01195	PPU05477-RA	uidA, GUSB; beta-glucuronidase
		K01206	PPU09218-RA	FUCA; alpha-L-fucosidase
		K01365	PPU00866-RA	CTSL; cathepsin L
		K12309	PPU07966-RA	GLB1, ELNR1; beta-galactosidase
		K12309	PPU07967-RA	GLB1, ELNR1; beta-galactosidase
		K12347	PPU16040-RA	SLC11A1, NRAMP1; natural resistance-associated macrophage protein 1
		K12347	PPU16041-RA	SLC11A1, NRAMP1; natural resistance-associated macrophage protein 1
		K12347	PPU03016-RA	SLC11A1, NRAMP1; natural resistance-associated macrophage protein 1
		K12373	PPU00496-RA	HEXA_B; hexosaminidase
		K12385	PPU07908-RA	NPC1; Niemann-Pick C1 protein
		K13443	PPU16722-RA	NPC2; Niemann-Pick C2 protein
		K13443	PPU16796-RA	NPC2; Niemann-Pick C2 protein
		K13443	PPU14747-RA	NPC2; Niemann-Pick C2 protein
Glycosaminoglycan degradation	ko00531			
		K01137	PPU10678-RA	GNS; N-acetylglucosamine-6-sulfatase
		K01195	PPU05475-RA	uidA, GUSB; beta-glucuronidase
		K01195	PPU05477-RA	uidA, GUSB; beta-glucuronidase
		K12309	PPU07966-RA	GLB1, ELNR1; beta-galactosidase
		K12309	PPU07967-RA	GLB1, ELNR1; beta-galactosidase
		K12373	PPU00496-RA	HEXA_B; hexosaminidase
Homologous recombination	ko03440			
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K04482	PPU12792-RA	RAD51; DNA repair protein RAD51
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10875	PPU10628-RA	RAD54L, RAD54; DNA repair and recombination protein RAD54 and RAD54-like protein
		K10877	PPU10708-RA	RAD54B; DNA repair and recombination protein RAD54B
		K10901	PPU04995-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU12559-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU11278-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K15362	PPU13983-RA	BRIP1, BACH1, FANCJ; fanconi anemia group J protein
p53 signaling pathway	ko04115			
		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN

		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K10808	PPU10975-RA	RRM2; ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
25℃ vs. 35℃ 15d				
Cell cycle	ko04110			
		K02087	PPU15354-RA	CDK1, CDC2; cyclin-dependent kinase 1
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02540	PPU12990-RA	MCM2; DNA replication licensing factor MCM2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K02605	PPU12496-RA	ORC3; origin recognition complex subunit 3
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K03875	PPU04058-RA	SKP2, FBXL1; F-box and leucine-rich repeat protein 1 (S-phase kinase-associated protein 2)
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4

		K04728	PPU00481-RA	ATM, TEL1; serine-protein kinase ATM
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06627	PPU01123-RA	CCNA; cyclin-A
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
		K06631	PPU06867-RA	PLK1; polo-like kinase 1
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K06642	PPU12368-RA	PRKDC; DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
		K08866	PPU09698-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
		K08866	PPU09941-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
Cell cycle - yeast	ko04111			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02516	PPU00490-RA	PRMT5, HSL7; type II protein arginine methyltransferase
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02540	PPU12990-RA	MCM2; DNA replication licensing factor MCM2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K02605	PPU12496-RA	ORC3; origin recognition complex subunit 3
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45

		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K06674	PPU04676-RA	SMC2; structural maintenance of chromosome 2
		K06676	PPU06494-RA	BRRN1, BRN1, CAPH; condensin complex subunit 2
		K06677	PPU06746-RA	YCS4, CNAP1, CAPD2; condensin complex subunit 1
		K06677	PPU15366-RA	YCS4, CNAP1, CAPD2; condensin complex subunit 1
		K06678	PPU16717-RA	YCG1, CAPG; condensin complex subunit 3
		K08866	PPU09698-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
		K08866	PPU09941-RA	TTK, MPS1; serine/threonine-protein kinase TTK/MPS1
Hedgehog signaling pathway - fly	ko04341			
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K06224	PPU11228-RA	HH; hedgehog
		K06226	PPU04359-RA	SMO; smoothened
		K06228	PPU12377-RA	FU; fused
		K10523	PPU03547-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU05484-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU06018-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU06067-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU07297-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU14734-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU08689-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
DNA replication	ko03030			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02321	PPU12790-RA	POLA2; DNA polymerase alpha subunit B
		K02324	PPU04634-RA	POLE; DNA polymerase epsilon subunit 1
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K02540	PPU12990-RA	MCM2; DNA replication licensing factor MCM2

		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K02684	PPU15828-RA	PRI1; DNA primase small subunit
		K02685	PPU06749-RA	PRI2; DNA primase large subunit
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K07466	PPU04285-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10742	PPU08022-RA	DNA2; DNA replication ATP-dependent helicase Dna2
		K10747	PPU07349-RA	LIG1; DNA ligase 1
		K10755	PPU13800-RA	RFC2_4; replication factor C subunit 2/4
		K10756	PPU07648-RA	RFC3_5; replication factor C subunit 3/5
Pathways in cancer	ko05200			
		K00799	PPU08124-RA	GST, gst; glutathione S-transferase
		K00799	PPU08125-RA	GST, gst; glutathione S-transferase
		K00799	PPU10608-RA	GST, gst; glutathione S-transferase
		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
		K02183	PPU10310-RA	CALM; calmodulin
		K02842	PPU07897-RA	FZD9_10, CD349_50; frizzled 9/10
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03875	PPU04058-RA	SKP2, FBXL1; F-box and leucine-rich repeat protein 1 (S-phase kinase-associated protein 2)
		K04079	PPU11712-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04482	PPU12792-RA	RAD51; DNA repair protein RAD51
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein

		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4
		K04725	PPU15774-RA	XIAP, BIRC4; E3 ubiquitin-protein ligase XIAP
		K05719	PPU16642-RA	ITGB1, CD29; integrin beta 1
		K05858	PPU09235-RA	PLCB; phosphatidylinositol phospholipase C, beta
		K06226	PPU04359-RA	SMO; smoothened
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06627	PPU01123-RA	CCNA; cyclin-A
		K08731	PPU10541-RA	BIRC5; baculoviral IAP repeat-containing protein 5
		K08734	PPU01239-RA	MLH1; DNA mismatch repair protein MLH1
		K08735	PPU07570-RA	MSH2; DNA mismatch repair protein MSH2
		K08737	PPU01100-RA	MSH6; DNA mismatch repair protein MSH6
		K09091	PPU07653-RA	HEY; hairy and enhancer of split related with YRPW motif
		K09848	PPU05667-RA	TRAF4; TNF receptor-associated factor 4
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
Oocyte meiosis	ko04114			
		K02087	PPU15354-RA	CDK1, CDC2; cyclin-dependent kinase 1
		K02183	PPU10310-RA	CALM; calmodulin
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02602	PPU16672-RA	CPEB, ORB; cytoplasmic polyadenylation element-binding protein
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04348	PPU10776-RA	PPP3C, CNA; serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit
		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06631	PPU06867-RA	PLK1; polo-like kinase 1
		K11481	PPU04852-RA	AURKA; aurora kinase A
FoxO signaling pathway	ko04068			

		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
		K01596	PPU08675-RA	E4.1.1.32, pckA, PCK; phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)
		K03875	PPU04058-RA	SKP2, FBXL1; F-box and leucine-rich repeat protein 1 (S-phase kinase-associated protein 2)
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4
		K04728	PPU00481-RA	ATM, TEL1; serine-protein kinase ATM
		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06631	PPU06867-RA	PLK1; polo-like kinase 1
		K08863	PPU05979-RA	PLK4; polo-like kinase 4
		K09385	PPU07194-RA	FOXG; forkhead box protein G
		K09385	PPU00814-RA	FOXG; forkhead box protein G
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
		K11434	PPU13256-RA	PRMT1; type I protein arginine methyltransferase
TGF-beta signaling pathway	ko04350			
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4
		K04661	PPU05137-RA	FST; follistatin

Fanconi anemia pathway	ko03460			
		K04482	PPU12792-RA	RAD51; DNA repair protein RAD51
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K07466	PPU04285-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K08734	PPU01239-RA	MLH1; DNA mismatch repair protein MLH1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10858	PPU01701-RA	PMS2; DNA mismatch repair protein PMS2
		K10891	PPU10147-RA	FANCD2; fanconi anemia group D2 protein
		K10895	PPU05919-RA	FANCI; fanconi anemia group I protein
		K10896	PPU12439-RA	FANCM; fanconi anemia group M protein
		K10901	PPU04995-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU12559-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU11278-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
p53 signaling pathway	ko04115			
		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
		K02087	PPU15354-RA	CDK1, CDC2; cyclin-dependent kinase 1
		K04728	PPU00481-RA	ATM, TEL1; serine-protein kinase ATM
		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
		K10808	PPU10975-RA	RRM2; ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
Mismatch repair	ko03430			
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K07466	PPU04285-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K08734	PPU01239-RA	MLH1; DNA mismatch repair protein MLH1
		K08735	PPU07570-RA	MSH2; DNA mismatch repair protein MSH2
		K08737	PPU01100-RA	MSH6; DNA mismatch repair protein MSH6
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10746	PPU12681-RA	EXO1; exonuclease 1
		K10747	PPU07349-RA	LIG1; DNA ligase 1
		K10755	PPU13800-RA	RFC2_4; replication factor C subunit 2/4
		K10756	PPU07648-RA	RFC3_5; replication factor C subunit 3/5
		K10858	PPU01701-RA	PMS2; DNA mismatch repair protein PMS2
Herpes simplex infection	ko05168			

		K02087	PPU15354-RA	CDK1, CDC2; cyclin-dependent kinase 1
		K02633	PPU00892-RA	PER2; period circadian protein 2
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03130	PPU13760-RA	TAF5; transcription initiation factor TFIID subunit 5
		K03875	PPU04058-RA	SKP2, FBXL1; F-box and leucine-rich repeat protein 1 (S-phase kinase-associated protein 2)
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K08860	PPU07856-RA	EIF2AK3; eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
		K12881	PPU11021-RA	THOC4, ALY; THO complex subunit 4
		K12896	PPU13741-RA	SFRS7; splicing factor, arginine/serine-rich 7
Wnt signaling pathway	ko04310			
		K02842	PPU07897-RA	FZD9_10, CD349_50; frizzled 9/10
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04348	PPU10776-RA	PPP3C, CNA; serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein

		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4
		K05858	PPU09235-RA	PLCB; phosphatidylinositol phospholipase C, beta
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
Circadian rhythm	ko04710			
		K02633	PPU00892-RA	PER2; period circadian protein 2
		K03094	PPU08315-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08316-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08318-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08319-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08321-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU08322-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU13873-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
		K03094	PPU09757-RA	SKP1, CBF3D; S-phase kinase-associated protein 1
Prostate cancer	ko05215			
		K00799	PPU08124-RA	GST, gst; glutathione S-transferase
		K00799	PPU08125-RA	GST, gst; glutathione S-transferase
		K00799	PPU10608-RA	GST, gst; glutathione S-transferase
		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
		K04079	PPU11712-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K04374	PPU08093-RA	ATF4, CREB2; cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
Hepatitis B	ko05161			
		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
		K04374	PPU08093-RA	ATF4, CREB2; cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein

		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K06627	PPU01123-RA	CCNA; cyclin-A
		K08731	PPU10541-RA	BIRC5; baculoviral IAP repeat-containing protein 5
HTLV-I infection	ko05166			
		K02324	PPU04634-RA	POLE; DNA polymerase epsilon subunit 1
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02842	PPU07897-RA	FZD9_10, CD349_50; frizzled 9/10
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04348	PPU10776-RA	PPP3C, CNA; serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit
		K04374	PPU08093-RA	ATF4, CREB2; cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04501	PPU03472-RA	SMAD4; mothers against decapentaplegic homolog 4
		K04725	PPU15774-RA	XIAP, BIRC4; E3 ubiquitin-protein ligase XIAP
		K04728	PPU00481-RA	ATM, TEL1; serine-protein kinase ATM
		K04802	PPU04168-RA	PCNA; proliferating cell nuclear antigen
		K06640	PPU09784-RA	ATR; serine/threonine-protein kinase ATR
		K06641	PPU08348-RA	CHEK2; serine/threonine-protein kinase CHEK2
		K08874	PPU05371-RA	TRRAP; transformation/transcription domain-associated protein
		K09341	PPU04885-RA	MSX; homeobox protein MSX
		K09341	PPU04886-RA	MSX; homeobox protein MSX
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
Hedgehog signaling pathway	ko04340			
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K06226	PPU04359-RA	SMO; smoothened
		K06233	PPU15372-RA	LRP2; low density lipoprotein-related protein 2
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2

		K10523	PPU03547-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU05484-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU06018-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU06067-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU07297-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU14734-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
		K10523	PPU08689-RA	SPOP; speckle-type POZ protein
Meiosis - yeast	ko04113			
		K02209	PPU04675-RA	MCM5, CDC46; DNA replication licensing factor MCM5
		K02210	PPU04184-RA	MCM7, CDC47; DNA replication licensing factor MCM7
		K02212	PPU10584-RA	MCM4, CDC54; DNA replication licensing factor MCM4
		K02213	PPU04952-RA	CDC6; cell division control protein 6
		K02214	PPU01594-RA	CDC7; cell division control protein 7
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02540	PPU12990-RA	MCM2; DNA replication licensing factor MCM2
		K02541	PPU10175-RA	MCM3; DNA replication licensing factor MCM3
		K02542	PPU12749-RA	MCM6; DNA replication licensing factor MCM6
		K02605	PPU12496-RA	ORC3; origin recognition complex subunit 3
		K03363	PPU11775-RA	CDC20; cell division cycle 20, cofactor of APC complex
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K06628	PPU05434-RA	CDC45; cell division control protein 45
Homologous recombination	ko03440			
		K02328	PPU04154-RA	POLD2; DNA polymerase delta subunit 2
		K04482	PPU12792-RA	RAD51; DNA repair protein RAD51
		K04728	PPU00481-RA	ATM, TEL1; serine-protein kinase ATM
		K07466	PPU04285-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K07466	PPU08237-RA	RFA1, RPA1, rpa; replication factor A1
		K10739	PPU12692-RA	RFA2, RPA2; replication factor A2
		K10875	PPU10628-RA	RAD54L, RAD54; DNA repair and recombination protein RAD54 and RAD54-like protein
		K10877	PPU10708-RA	RAD54B; DNA repair and recombination protein RAD54B
		K10901	PPU04995-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU12559-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K10901	PPU11278-RA	BLM, RECQL3, SGS1; bloom syndrome protein
		K11864	PPU04159-RA	BRCC3, BRCC36; BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3
Glucagon signaling pathway	ko04922			
		K00016	PPU09368-RA	LDH, ldh; L-lactate dehydrogenase
		K01596	PPU08675-RA	E4.1.1.32, pckA, PCK; phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)

		K02183	PPU10310-RA	CALM; calmodulin
		K03841	PPU05038-RA	FBP, fbp; fructose-1,6-bisphosphatase I
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04348	PPU10776-RA	PPP3C, CNA; serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit
		K04374	PPU08093-RA	ATF4, CREB2; cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K05858	PPU09235-RA	PLCB; phosphatidylinositol phospholipase C, beta
		K11434	PPU13256-RA	PRMT1; type I protein arginine methyltransferase
MicroRNAs in cancer	ko05206			
		K00558	PPU04864-RA	DNMT1, dcm; DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
		K01110	PPU05718-RA	PTEN; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
		K04498	PPU04339-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12403-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU12444-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU11822-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04498	PPU09898-RA	EP300, CREBBP, KAT3; E1A/CREB-binding protein
		K04728	PPU00481-RA	ATM, TEL1; serine-protein kinase ATM
		K06626	PPU16016-RA	CCNE; G1/S-specific cyclin-E1
		K10151	PPU02951-RA	CCND2; G1/S-specific cyclin-D2
		K10373	PPU15645-RA	TPM1; tropomyosin 1
		K10373	PPU15646-RA	TPM1; tropomyosin 1
		K12035	PPU03859-RA	TRIM71; tripartite motif-containing protein 71
		K12035	PPU11630-RA	TRIM71; tripartite motif-containing protein 71
Progesterone-mediated oocyte maturation	ko04914			
		K02087	PPU15354-RA	CDK1, CDC2; cyclin-dependent kinase 1
		K02537	PPU07955-RA	MAD2; mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2
		K02602	PPU16672-RA	CPEB, ORB; cytoplasmic polyadenylation element-binding protein
		K04079	PPU11712-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K04079	PPU00804-RA	HSP90A, htpG; molecular chaperone HtpG
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K05868	PPU11311-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1

		K05868	PPU11762-RA	CCNB1; G2/mitotic-specific cyclin-B1
		K06627	PPU01123-RA	CCNA; cyclin-A
		K06631	PPU06867-RA	PLK1; polo-like kinase 1
		K11481	PPU04852-RA	AURKA; aurora kinase A
Alcoholism	ko05034			
		K02183	PPU10310-RA	CALM; calmodulin
		K04345	PPU13149-RA	PKA; protein kinase A
		K04374	PPU08093-RA	ATF4, CREB2; cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
		K04534	PPU09386-RA	GNAO, G-ALPHA-O; guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
		K08155	PPU08459-RA	SLC18A1_2, VMAT; MFS transporter, DHA1 family, solute carrier family 18 (vesicular amine transporter), member 1/2
		K11251	PPU08178-RA	H2A; histone H2A
		K11251	PPU08465-RA	H2A; histone H2A
		K11251	PPU12448-RA	H2A; histone H2A
		K11251	PPU11206-RA	H2A; histone H2A
		K11251	PPU02559-RA	H2A; histone H2A
		K11252	PPU08466-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU08470-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU12449-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU10549-RA	H2B; histone H2B
		K11252	PPU16755-RA	H2B; histone H2B
		K11253	PPU08186-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU08400-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU12446-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU12504-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU16757-RA	H3; histone H3
		K11253	PPU00032-RA	H3; histone H3
		K11254	PPU08177-RA	H4; histone H4
		K11254	PPU08405-RA	H4; histone H4
		K11254	PPU12445-RA	H4; histone H4
		K11303	PPU11070-RA	HAT1, KAT1; histone acetyltransferase 1

附录IV 热应激转录组的差异表达基因

ID	GENE	DESCRIPTION
高温下调（226）		
PPU02468-RA	Pp4CLL7	4-coumarate--CoA ligase-like 7
PPU04648-RA	PpA10	Putative odorant-binding protein A10
PPU02860-RA	PpAbs	ATP-dependent RNA helicase abstrakt
PPU09744-RA	PpAcph1	Venom acid phosphatase Acph-1
PPU03334-RA	PpAda2_3	Adenosine deaminase 2
PPU16128-RA	PpAdamts16	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16
PPU03751-RA	PpAdf1_2	Transcription factor Adf-1
PPU03477-RA	PpAkr1	Akirin-1
PPU03682-RA	PpAN1ZF6	AN1-type zinc finger protein 6
PPU06512-RA	PpANK1_2	Ankyrin-1
PPU11233-RA	PpANK2_1	Ankyrin-2
PPU03123-RA	PpANK3_1	Ankyrin-3
PPU06819-RA	PpANK3_2	Ankyrin-3
PPU07804-RA	PpANK3_3	Ankyrin-3
PPU07517-RA	PpANKHD1_2	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1
PPU04445-RA	PpAnkr0381_1	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU06699-RA	PpAnkr0381_2	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11018-RA	PpAnkr0381_3	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11066-RA	PpAnkr0381_4	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11234-RA	PpAnkr0381_5	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11316-RA	PpAnkr0381_6	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11318-RA	PpAnkr0381_7	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11321-RA	PpAnkr0381_8	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11335-RA	PpAnkr0381_9	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU11336-RA	PpAnkr0381_10	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU13513-RA	PpAnkr0381_11	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU14478-RA	PpAnkr0381_12	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU16934-RA	Pparx_2	Gametocyte-specific factor 1 homolog
PPU12325-RA	PpAryrA	Arylphorin subunit alpha
PPU06748-RA	PpAuB	Aurora kinase B
PPU04613-RA	PpBMPER_1	BMP-binding endothelial regulator protein
PPU13295-RA	PpBMPER_2	BMP-binding endothelial regulator protein
PPU10781-RA	PpC1B	Pupal cuticle protein C1B
PPU08837-RA	PpCad89D	Cadherin-89D
PPU12338-RA	PpCathD	Cathepsin D
PPU11098-RA	PpCCCP	Circadian clock-controlled protein
PPU01594-RA	PpCDC7/2	Probable cell division control protein 7 homolog 2

PPU04761-RA	PpCHDS	Cholesterol 7-desaturase
PPU00925-RA	PpCht10_1	Probable chitinase 10
PPU00926-RA	PpCht10_2	Probable chitinase 10
PPU15708-RA	PpCht10_3	Probable chitinase 10
PPU06756-RA	Ppck	Myosin-VIIa
PPU03877-RA	Ppcort	Protein cortex
PPU07369-RA	Ppcpv4_1	Pacifastin-like protease inhibitor cvp4
PPU07370-RA	Ppcpv4_2	Pacifastin-like protease inhibitor cvp4
PPU07674-RA	Ppcpv4_3	Pacifastin-like protease inhibitor cvp4
PPU12403-RA	PpCREBBP	CREB-binding protein
PPU05293-RA	PpCTR1_1	Chymotrypsin-1
PPU05858-RA	PpCTR2_1	Chymotrypsin-2
PPU07216-RA	PpCTR2_2	Chymotrypsin-2
PPU10521-RA	PpCTR2_3	Chymotrypsin-2
PPU10522-RA	PpCTR2_4	Chymotrypsin-2
PPU10524-RA	PpCTR2_5	Chymotrypsin-2
PPU10525-RA	PpCTR2_6	Chymotrypsin-2
PPU13846-RA	PpCTR2_7	Chymotrypsin-2
PPU12956-RA	PpCTRC	Chymotrypsin-C
PPU03764-RA	Ppcut1	Cuticlin-1
PPU07752-RA	PpCYB561d1	Cytochrome b561 domain-containing protein 1
PPU03759-RA	PpCYP12A2	Cytochrome P450 CYP12A2
PPU08057-RA	PpCYP6a14_1	Probable cytochrome P450 6a14
PPU14016-RA	PpCYP6a14_2	Probable cytochrome P450 6a14
PPU05525-RA	PpD1044.1_2	Uncharacterized kinase-like protein D1044.1
PPU12285-RA	PpDaple_1	Protein Daple
PPU12295-RA	PpDaple_2	Protein Daple
PPU03542-RA	PpDERF3_1	Mite allergen Der f 3
PPU12921-RA	Ppdf	Defensin-2
PPU08282-RA	Ppdl	Embryonic polarity protein dorsal
PPU12369-RA	PpDnah3	Dynein heavy chain 3, axonemal
PPU06340-RA	PpDNAT	Dopamine N-acetyltransferase
PPU07949-RA	PpDpep1	Dipeptidase 1
PPU06983-RA	PpE4	Esterase E4
PPU05762-RA	PpEEED8.10	Putative RNA-binding protein EEED8.10
PPU11264-RA	PpEF1G	Elongation factor 1-gamma
PPU13498-RA	PpEGT	Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase
PPU05485-RA	Ppeve	Segmentation protein even-skipped
PPU12492-RA	Ppexd	Homeobox protein extradenticle
PPU03649-RA	PpFACR	Putative fatty acyl-CoA reductase CG5065
PPU03662-RA	PpFAR	Fatty acyl-CoA reductase wat
PPU13996-RA	PpFASN_2	Fatty acid synthase

PPU06447-RA	Ppfln	Flightin
PPU11304-RA	PpFPV162_1	Putative ankyrin repeat protein FPV162
PPU11320-RA	PpFPV162_2	Putative ankyrin repeat protein FPV162
PPU11271-RA	PpFPV234	Putative ankyrin repeat protein FPV234
PPU09186-RA	PpFPV244	Putative ankyrin repeat protein FPV244
PPU12377-RA	Ppfu	Serine/threonine-protein kinase fused
PPU12686-RA	Ppgbb	Protein 60A
PPU07988-RA	PpGld_1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU03138-RA	PpGld_2	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU08393-RA	PpGld_3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU16038-RA	PpGld_4	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU06783-RA	PpGr32a	Gustatory and pheromone receptor 32a
PPU07240-RA	Ppgw_1	Serine/threonine-protein kinase greatwall
PPU13793-RA	Ppgw_2	Serine/threonine-protein kinase greatwall
PPU08473-RA	PpH1	Histone H1
PPU12503-RA	PpH1_2	Histone H1, early embryonic
PPU12447-RA	PpH1C	Histone H1C
PPU12448-RA	PpH2A_3	Histone H2A
PPU13733-RA	Pphb	Protein hunchback (Fragment)
PPU01079-RA	PpHoxa3	Homeobox protein Hox-A3
PPU10673-RA	PpHpgd_1	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]
PPU13856-RA	PpHpgd_2	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]
PPU14756-RA	PpHpgd_3	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]
PPU16579-RA	PpIQCG_2	IQ domain-containing protein G
PPU01124-RA	Ppkbp	Glutamate receptor U1
PPU12436-RA	PpKyat1	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 1
PPU12438-RA	Ppkyat3	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3
PPU04227-RA	PpLCC4_1	Laccase-4
PPU10156-RA	PpLCP17	Larval cuticle protein LCP-17
PPU07195-RA	Pplinprp2	Pancreatic lipase-related protein 2
PPU13511-RA	PpLIP3_1	Lipase 3
PPU10150-RA	PpLIP3_2	Lipase 3
PPU07948-RA	PpLIPHB	Lipase member H-B
PPU11431-RA	PpLIPK_2	Lipase member K
PPU10601-RA	PpLMPEP	Leucyl-cystinyl aminopeptidase
PPU05756-RA	PpLRP2_1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
PPU12625-RA	PpLRP2_2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
PPU11300-RA	PpLRP5	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5
PPU00431-RA	PpLTE_2	Lectizyme
PPU03873-RA	Pplyrm2	LYR motif-containing protein 2
PPU03963-RA	PpMENT	Heterochromatin-associated protein MENT
PPU05850-RA	PpMIMIL88	Putative ankyrin repeat protein L88
PPU07177-RA	PpMIMIL93_1	Putative ankyrin repeat protein L93

PPU16155-RA	PpMIMIL93_2	Putative ankyrin repeat protein L93
PPU07677-RA	PpmodSP	Modular serine protease
PPU07513-RA	PpMRJP2_1	Major royal jelly protein 2
PPU07602-RA	PpMRJP2_2	Major royal jelly protein 2
PPU05112-RA	PpmrkA	Probable serine/threonine-protein kinase MARK-A
PPU11283-RA	PpMRSP4_3	Multidrug resistance-associated protein 4
PPU00504-RA	Ppmth2	G-protein coupled receptor Mth2
PPU09724-RA	PpMYO5B	Unconventional myosin-Vb
PPU11163-RA	Ppnap1/1	Nucleosome assembly protein 1-like 1
PPU03690-RA	PpNep2_1	Neprilysin-2
PPU07364-RA	PpNep2_2	Neprilysin-2
PPU02791-RA	PpNotch3	Neurogenic locus notch homolog protein 3
PPU07908-RA	PpNpc1b	Niemann-Pick type protein homolog 1B
PPU16722-RA	PpNpc2a_1	Protein NPC2 homolog
PPU16723-RA	PpNpc2a_2	Protein NPC2 homolog
PPU00874-RA	Ppnrf6_1	Nose resistant to fluoxetine protein 6
PPU05185-RA	Ppnrf6_2	Nose resistant to fluoxetine protein 6
PPU06362-RA	Ppnrf6_3	Nose resistant to fluoxetine protein 6
PPU12913-RA	Ppnrf6_4	Nose resistant to fluoxetine protein 6
PPU02003-RA	PpNUDT8	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 8
PPU10494-RA	PpobstE_2	Protein obstructor-E
PPU15272-RA	PpOR9a	Odorant receptor 9a
PPU09355-RA	PpPAT1	Proton-coupled amino acid transporter 1
PPU05387-RA	PpPicot_1	Putative inorganic phosphate cotransporter
PPU05389-RA	PpPicot_2	Putative inorganic phosphate cotransporter
PPU14880-RA	PpPicot_3	Putative inorganic phosphate cotransporter
PPU03622-RA	Pppll	Serine/threonine-protein kinase pelle
PPU06394-RA	PpPNLIPRP1	Inactive pancreatic lipase-related protein 1
PPU06103-RA	PpPNLIRP2	Pancreatic lipase-related protein 2
PPU03628-RA	PpPP6R1_1	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A
PPU06685-RA	PpPP6R1_2	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A
PPU09706-RA	PpPP6R1_3	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A
PPU05839-RA	PpPP6R2_1	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B
PPU10982-RA	PpPP6R2_2	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B
PPU11319-RA	PpPP6R2_3	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B
PPU11375-RA	PpPP6R2_4	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B
PPU12957-RA	PpPRDM13	PR domain zinc finger protein 13
PPU10198-RA	PpPTTH	Prothoracicotropic hormone
PPU15762-RA	PpPxd	Peroxidase
PPU07588-RA	Pprdx_1	Protein roadkill
PPU08691-RA	Pprdx_2	Protein roadkill

PPU12687-RA	Pprdx_3	Protein roadkill
PPU14026-RA	Pprdx_4	Protein roadkill
PPU15336-RA	PpRNOY	Ribonuclease Oy
PPU15337-RA	PpRNS2	Ribonuclease 2
PPU09764-RA	PpRPA70_1	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit
PPU12953-RA	PpRpn11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14
PPU04134-RA	PpSaS	Probable salivary secreted peptide
PPU06913-RA	PpSb	Serine proteinase stubble
PPU16275-RA	PpSCD5	Stearoyl-CoA desaturase 5
PPU13873-RA	Ppscon3	E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit scon-3
PPU06525-RA	PpScpep1_1	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase
PPU06541-RA	PpScpep1_2	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase
PPU13555-RA	PpSDR1	Farnesol dehydrogenase
PPU03404-RA	PpSerpin	Serine protease inhibitor I/II
PPU13072-RA	PpSgAbd2	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2
PPU04277-RA	PpshakB	Innexin shaking-B
PPU08316-RA	Ppskp1_1	S-phase kinase-associated protein 1
PPU09757-RA	Ppskp1_2	S-phase kinase-associated protein 1
PPU02066-RA	PpSlc16a9	Monocarboxylate transporter 9
PPU08573-RA	PpSmox	Spermine oxidase
PPU08517-RA	PpSMYD4_1	SET and MYND domain-containing protein 4
PPU03217-RA	PpSP34	Venom serine protease 34
PPU04679-RA	PpSpdya	Speedy protein A
PPU06598-RA	Ppspop_1	Speckle-type POZ protein
PPU13683-RA	Ppspop_2	Speckle-type POZ protein
PPU15582-RA	Ppspop_3	Speckle-type POZ protein
PPU06599-RA	PpspopB_1	Speckle-type POZ protein B
PPU06595-RA	PpspopB_2	Speckle-type POZ protein B
PPU12258-RA	PpSSP1	Serine protease SSP1 (Fragment)
PPU12362-RA	PpSUN1	SUN domain-containing protein 1
PPU04600-RA	PpSV2C	Synaptic vesicle glycoprotein 2C
PPU09907-RA	PpTl	Protein toll
PPU10310-RA	PpTnC1	Troponin C, isoform 1
PPU09275-RA	PpTnks	Tankyrase
PPU09689-RA	PpTnks1	Tankyrase-1
PPU16736-RA	PpToll7	Toll-like receptor 7
PPU03506-RA	PpTret1	Facilitated trehalose transporter Tret1 quinquefasciatus
PPU03107-RA	PpTRY1_1	Trypsin-1
PPU00429-RA	PpTRY1_2	Trypsin-1
PPU05992-RA	PpTRY1_3	Trypsin-1
PPU04266-RA	PpTRY1_4	Trypsin-1
PPU13016-RA	PpTRY3_2	Trypsin-3 (Fragment)
PPU05993-RA	PpTRY7_1	Trypsin-7

PPU03540-RA	PpTRYe_1	Trypsin epsilon
PPU03541-RA	PpTRYe_2	Trypsin epsilon
PPU06048-RA	PpTuba1b	Tubulin alpha-1B chain
PPU06638-RA	PpTZAP	Telomere zinc finger-associated protein
PPU16165-RA	PpU1snr70	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa
PPU03476-RA	PpU1snrC	U1 small nuclear ribonucleoprotein C
PPU03239-RA	PpVA3_1	Venom allergen 3
PPU10163-RA	PpVA5.02	Venom allergen 5.02 (Fragment)
PPU00241-RA	PpVCEST6_1	Venom carboxylesterase-6
PPU04230-RA	PpVCEST6_2	Venom carboxylesterase-6
PPU15329-RA	PpVCEST6_3	Venom carboxylesterase-6
PPU16639-RA	PpVCEST6_4	Venom carboxylesterase-6
PPU13499-RA	PpVGLUT1	Vesicular glutamate transporter 1
PPU16400-RA	PpVP_2	Capsid protein VP1
PPU07926-RA	PpVSCEST	Venom serine carboxypeptidase
PPU14689-RA	PpVWF	von Willebrand factor
PPU16765-RA	PpwarA	Homeobox protein Wariai
PPU13471-RA	Ppy_2	Protein yellow
PPU09846-RA	PpZasp	PDZ and LIM domain protein Zasp
PPU05006-RA	PpZCPA1	Zinc carboxypeptidase A 1
PPU10994-RA	PpZfp120	Zinc finger protein 120
PPU11011-RA	PpZNF512B	Zinc finger protein 512B
PPU10993-RA	PpZNF624	Zinc finger protein 624
高温上调（166）		
PPU13131-RA	Pp5HH	Probable 5-hydroxyisourate hydrolase R09H10.3
PPU04648-RA	PpA10	Putative odorant-binding protein A10
PPU01996-RA	PpAADAT	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial
PPU13382-RA	PpAC10	Adenylate cyclase type 10
PPU15657-RA	PpAce	Acetylcholinesterase
PPU03332-RA	PpAda2_1	Adenosine deaminase 2
PPU03333-RA	PpAda2_2	Adenosine deaminase 2
PPU07922-RA	PpAdh	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]
PPU04408-RA	Ppak8	Adenylate kinase 8
PPU13419-RA	Ppakie1	Adenylate kinase isoenzyme 1
PPU04811-RA	PpAllc	Probable allantoicase
PPU11610-RA	Ppamn	Protein amnionless
PPU06490-RA	PpANK1_1	Ankyrin-1
PPU16771-RA	PpANK2_2	Ankyrin-2
PPU00448-RA	PpANKHD1_1	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1
PPU16169-RA	PpAnkle1	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 1
PPU14478-RA	PpAnkr0381_12	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU16411-RA	PpAnkr0381_13	Putative ankyrin repeat protein RF_0381

PPU10609-RA	PpAPN	Aminopeptidase N
PPU03208-RA	Pparx_1	Aristaless-related homeobox protein
PPU01055-RA	PpASPM	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein homolog
PPU05932-RA	PpATRY	Anionic trypsin
PPU07947-RA	PpAZI2	Antizyme inhibitor 2
PPU15566-RA	PpBend6	BEN domain-containing protein 6
PPU12822-RA	PpBglub	Beta-1,3-glucan-binding protein
PPU07384-RA	PpC21orf59h	UPF0769 protein C21orf59 homolog
PPU00866-RA	PpCathL	Cathepsin L
PPU11062-RA	PpCCDC96	Coiled-coil domain-containing protein 96
PPU04265-RA	PpCela1	Chymotrypsin-like elastase family member 1
PPU08118-RA	PpCela2a	Chymotrypsin-like elastase family member 2A
PPU04336-RA	PpChchd2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2
PPU04761-RA	PpCHDS	Cholesterol 7-desaturase
PPU01333-RA	PpCNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase
PPU09882-RA	Ppcops5	COP9 signalosome complex subunit 9
PPU07367-RA	Ppcpv4_4	Pacifastin-like protease inhibitor cvp4
PPU04131-RA	PpCRYAB_1	Protein lethal(2)essential for life
PPU04132-RA	PpCRYAB_2	Protein lethal(2)essential for life
PPU04133-RA	PpCRYAB_3	Protein lethal(2)essential for life
PPU10133-RA	PpCRYAB_4	Protein lethal(2)essential for life
PPU15439-RA	PpCRYAB_5	Protein lethal(2)essential for life
PPU13933-RA	PpCTL2	CTL-like protein 2
PPU08497-RA	PpCTR2_8	Chymotrypsin-2
PPU12255-RA	PpCTRYOB	Chymotrypsinogen B
PPU12642-RA	PpCts8	Cathepsin 8
PPU13146-RA	PpCU19	Cuticle protein 19
PPU07306-RA	PpCYP6a14_3	Probable cytochrome P450 6a14
PPU09664-RA	PpCYP6a14_4	Probable cytochrome P450 6a14
PPU01268-RA	PpCYP9E2_1	Cytochrome P450 9e2
PPU10857-RA	PpCYP9E2_2	Cytochrome P450 9e2
PPU05524-RA	PpD1044.1_1	Uncharacterized kinase-like protein D1044.1
PPU05525-RA	PpD1044.1_2	Uncharacterized kinase-like protein D1044.1
PPU16585-RA	PpDCTD	Deoxycytidylate deaminase
PPU15257-RA	PpDcxr	L-xylulose reductase
PPU10845-RA	PpDdx5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
PPU16921-RA	PpDERF3_2	Mite allergen Der f 3
PPU03960-RA	PpDESI1	Desumoylating isopeptidase 1
PPU11811-RA	PpDHC10	Dynein-1-beta heavy chain, flagellar inner arm I1 complex
PPU04947-RA	PpDnah7	Dynein heavy chain 7, axonemal
PPU05335-RA	PpDnr1	Dynein regulatory complex protein 1 homolog
PPU07699-RA	PpDSM3A2	Doublesex- and mab-3-related transcription factor A2

PPU14134-RA	Ppexog_2	Nuclease EXOG, mitochondrial
PPU13995-RA	PpFASN_1	Fatty acid synthase
PPU13996-RA	PpFASN_2	Fatty acid synthase
PPU10749-RA	PpFCL3	Fasciclin-3
PPU07936-RA	PpFD3	Fork head domain-containing protein FD3
PPU16783-RA	PpFsip2	Fibrous sheath-interacting protein 2
PPU03357-RA	Ppft	Cadherin-related tumor suppressor
PPU09218-RA	PpFUCA2	Plasma alpha-L-fucosidase
PPU12550-RA	Ppgadl1	Acidic amino acid decarboxylase GADL1 (Fragment)
PPU11188-RA	PpGGT1	Glutathione hydrolase 1 proenzyme
PPU12514-RA	PpGHSR1	Growth hormone secretagogue receptor type 1
PPU03152-RA	PpGld_5	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU03138-RA	PpGld_2	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU04102-RA	PpGr2a	Putative gustatory receptor 2a
PPU05184-RA	PpGr64f	Gustatory receptor for sugar taste 64f
PPU08473-RA	PpH1_1	Histone H1
PPU08178-RA	PpH2A_1	Histone H2A
PPU08355-RA	PpH2A_2	Histone H2A
PPU08466-RA	PpH2B_1	Histone H2B.1/H2B.2
PPU16755-RA	PpH2B_2	Histone H2B.1/H2B.2
PPU08359-RA	PpH2B_3	Histone H2B.1/H2B.2
PPU08186-RA	PpH3	Histone H3
PPU08177-RA	PpH4	Histone H4
PPU16121-RA	PpHecw2	E3 ubiquitin-protein ligase HECW2
PPU08588-RA	PpHLPSB_1	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein
PPU09440-RA	PpHLPSB_2	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein
PPU12734-RA	PpHMCN1	Hemicentin-1
PPU01779-RA	PpHNF4a	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha
PPU09869-RA	PpHSP68_1	Heat shock protein 68
PPU09871-RA	PpHSP68_2	Heat shock protein 68
PPU00804-RA	PpHSP83	Heat shock protein 83
PPU10858-RA	PphxA	Xanthine dehydrogenase
PPU11400-RA	PpI(3)mbn	Protein lethal(3)malignant blood neoplasm 1
PPU12618-RA	PpIft172	Intraflagellar transport protein 172 homolog
PPU14111-RA	PpIQCG_1	IQ domain-containing protein G
PPU14836-RA	Ppjingh	Zinc finger protein jing homolog
PPU04838-RA	Pplcc2	Laccase-2
PPU04839-RA	PpLCC4_2	Laccase-4
PPU16612-RA	PpLip1	Lipase 1
PPU11430-RA	PpLIPK_1	Lipase member K
PPU12483-RA	PpLRP2_3	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
PPU05930-RA	PpLTE_3	Lectizyme
PPU10739-RA	PpLTE_1	Lectizyme

PPU09682-RA	PpMAL1	Maltase 1
PPU05921-RA	PpMIPP1	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1
PPU12871-RA	PpMP1	Melanization protease 1
PPU06909-RA	PpMRC1	Macrophage mannose receptor 1
PPU05414-RA	Ppmsta_1	Protein msta, isoform A
PPU13063-RA	Ppmsta_2	Protein msta, isoform A
PPU13895-RA	Ppnas14	Zinc metalloproteinase nas-14
PPU00390-RA	Ppndl	Serine protease nudel
PPU13318-RA	PpNep2_3	Neprilysin-2
PPU13319-RA	PpNep2_4	Neprilysin-2
PPU11630-RA	Ppnhl1	RING finger protein nhl-1
PPU12812-RA	PpNPL	N-acetylneuraminate lyase
PPU06505-RA	Ppnr2e1	Nuclear receptor subfamily 2 group E member 1
PPU06361-RA	Ppnrf6_5	Nose resistant to fluoxetine protein 6
PPU09230-RA	PpLIPRP2	Pancreatic lipase-related protein 2
PPU15679-RA	PpOBP56d	General odorant-binding protein 56d
PPU03978-RA	PpobstE_1	Protein obstructor-E
PPU01603-RA	PpOCL1	Omega-conotoxin-like protein 1
PPU12965-RA	PpOdc1	Ornithine decarboxylase
PPU01104-RA	PpOR4_1	Odorant receptor 4
PPU10504-RA	PpOR4_2	Odorant receptor 4
PPU12298-RA	Ppp53_2	Cellular tumor antigen p53
PPU00892-RA	Ppper	Period circadian protein
PPU05388-RA	PpPicot_4	Putative inorganic phosphate cotransporter
PPU04615-RA	PpPNLIP	Pancreatic triacylglycerol lipase (Fragment)
PPU11379-RA	PpPP6R1_4	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A
PPU04214-RA	PpPrm	Paramyosin, long form
PPU05064-RA	PpRAB28	Ras-related protein Rab-28
PPU06071-RA	PpRB1CC1	RB1-inducible coiled-coil protein 1
PPU16658-RA	PpRDH1	Retinal dehydrogenase 1
PPU11746-RA	PpRHGAP6	Rho GTPase-activating protein 6
PPU03347-RA	PpRrm1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
PPU05090-RA	Ppsas	Putative epidermal cell surface receptor
PPU03936-RA	Ppscmct2	Sodium-coupled monocarboxylate transporter 2
PPU00858-RA	PpScrt1	Transcriptional repressor scratch 1
PPU09994-RA	PpSdhA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
PPU00404-RA	PpSDR1	Farnesol dehydrogenase
PPU12256-RA	PpSerp55	Serine protease 55
PPU12508-RA	PpSMYD4_2	SET and MYND domain-containing protein 4
PPU12509-RA	PpSMYDDDB	SET and MYND domain-containing protein DDB_G0273591
PPU08543-RA	PpSnk	Serine protease snake
PPU06529-RA	Ppspop_4	Speckle-type POZ protein

PPU13472-RA	Ppspop_5	Speckle-type POZ protein
PPU06527-RA	Ppspop_2	Speckle-type POZ protein
PPU08364-RA	PpTHAP4	THAP domain-containing protein 4
PPU02310-RA	PpTICC	Trimeric intracellular cation channel type 1B.1
PPU09242-RA	PpTom40	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog 1
PPU05989-RA	PpTRY1_5	Trypsin-1
PPU05996-RA	PpTRY1_6	Trypsin-1
PPU05994-RA	PpTRY7_2	Trypsin-7
PPU14727-RA	Pptwist	Twist-related protein
PPU07441-RA	PpUDPGLUT	Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase
PPU13924-RA	Ppugt3	UDP-glucuronosyltransferase (Fragment)
PPU05825-RA	PpULP5	Ubiquitin-like protein 5
PPU10113-RA	PpURH2	Probable uridine nucleosidase 2
PPU12748-RA	PpUT1	Urea transporter 1
PPU11653-RA	PpVA3_2	Venom allergen 3
PPU05997-RA	PpVDP	Vitellin-degrading protease
PPU00556-RA	PpVP_1	Capsid protein VP1
PPU12302-RA	Ppy_1	Protein yellow
PPU01716-RA	PpYNG2	Chromatin modification-related protein YNG2
PPU06911-RA	PpZAN	Zonadhesin
PPU16568-RA	PpZNF683	Tissue-resident T-cell transcription regulator protein ZNF683

附录V 病毒转录组中的差异表达基因

ID	Gene	Description
带病毒下调		
PPU10782-RA	PpAADAT	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial
PPU16316-RA	PpAbcg1	ATP-binding cassette sub-family G member 1
PPU11296-RA	PpADCY3	Adenylate cyclase type 3
PPU01589-RA	PpAdf1_1	Transcription factor Adf-1
PPU03812-RA	PpAdh_1	Alcohol dehydrogenase
PPU04113-RA	PpAdh_2	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)] A
PPU03906-RA	PpAGRB1	Adhesion G protein-coupled receptor B1
PPU07659-RA	PpAgrn	Agrin
PPU16169-RA	PpAnkle1	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 1
PPU15284-RA	PpAnkr0381_3	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU03604-RA	PpAnkr2	Ankyrin repeat domain-containing protein 2
PPU15283-RA	PpAnkr49	Ankyrin repeat domain-containing protein 49
PPU11253-RA	PpAurka	Aurora kinase A
PPU06396-RA	PpBAIP2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2
PPU06172-RA	Ppbanf1	Barrier-to-autointegration factor
PPU05912-RA	Ppboca	LDLR chaperone boca
PPU11365-RA	PpC594.04c	Uncharacterized protein C594.04c
PPU12338-RA	PpCathD	Cathepsin D
PPU00866-RA	PpCathL	Cathepsin L
PPU09137-RA	PpCBPA1	Zinc carboxypeptidase A 1
PPU11098-RA	PpCCCP	Circadian clock-controlled protein
PPU03402-RA	PpCCDC141	Coiled-coil domain-containing protein 141
PPU06107-RA	PpCdk2ap1	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1
PPU06007-RA	PpCGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
PPU12466-RA	PpCGL	Cystathionine gamma-lyase
PPU07620-RA	PpChia_1	Acidic mammalian chitinase
PPU11443-RA	PpChia_2	Acidic mammalian chitinase
PPU12435-RA	PpCHIT1	Chitotriosidase-1
PPU03344-RA	PpCHS8	Chitin synthase 8
PPU07637-RA	PpCIB1	Calcium and integrin-binding protein 1
PPU03199-RA	PpCOX15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog
PPU06986-RA	PpCOX17	Cytochrome c oxidase copper chaperone
PPU02385-RA	PpCP12	Flexible cuticle protein 12
PPU12628-RA	PpCpg1	Chondroitin proteoglycan 1
PPU10095-RA	PpCTL2	CTL-like protein 2
PPU04549-RA	PpCtnnal1	Alpha-catulin
PPU14690-RA	PpCTRIN	Chymotrypsin inhibitor
PPU12247-RA	PpCTROA	Chymotrypsinogen A

PPU07752-RA	PpCYB561d1	Cytochrome b561 domain-containing protein 1
PPU03759-RA	PpCYP12A2	Cytochrome P450 CYP12A2
PPU01689-RA	PpCYP4C1_1	Cytochrome P450 4C1
PPU09202-RA	PpCYP4C1_2	Cytochrome P450 4C1
PPU10700-RA	PpCYP4C1_3	Cytochrome P450 4C1
PPU12259-RA	PpCYP4C1_4	Cytochrome P450 4C1
PPU06358-RA	PpCYP6a13	Probable cytochrome P450 6a13
PPU00386-RA	PpDcaf5	DDB1- and CUL4-associated factor 5
PPU07249-RA	PpDcp1	Caspase-1
PPU12369-RA	PpDnah3	Dynein heavy chain 3, axonemal
PPU07871-RA	PpDnah7	Dynein heavy chain 7, axonemal
PPU06340-RA	PpDNAT	Dopamine N-acetyltransferase
PPU09618-RA	PpDS	Protein dachsous
PPU01371-RA	PpEFGM	Elongation factor G, mitochondrial
PPU13498-RA	PpEGT	Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase
PPU06266-RA	PpELVL	Elongation of very long chain fatty acids protein AAEL008004
PPU16914-RA	PpEST6	Venom carboxylesterase-6
PPU14134-RA	Ppexog_2	Nuclease EXOG, mitochondrial
PPU03662-RA	PpFAR	Fatty acyl-CoA reductase wat
PPU13996-RA	PpFASN	Fatty acid synthase
PPU03926-RA	PpFucTC	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase C
PPU01120-RA	PpGBRB	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-like
PPU13656-RA	PpGcc2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2
PPU08554-RA	PpGGPS1	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase
PPU08391-RA	PpGld_3	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU08392-RA	PpGld_4	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU10678-RA	PpGNS	N-acetylglucosamine-6-sulfatase
PPU16460-RA	PpGT2_1	Trihelix transcription factor GT-2
PPU16074-RA	PpGT2_2	Trihelix transcription factor GT-2
PPU08584-RA	PpGUC2	Retinal guanylyl cyclase 2
PPU13674-RA	PpHly	Hemolysin E coli O157：H7
PPU14753-RA	PpHpgd_2	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]
PPU10503-RA	PpIFT74	Intraflagellar transport protein 74 homolog
PPU05391-RA	PpIPCT	Putative inorganic phosphate cotransporter
PPU05897-RA	PpISL1	Insulin gene enhancer protein ISL-1
PPU03162-RA	PpITGA9	Integrin alpha-9
PPU14758-RA	PpJBR1	Jouberin
PPU06370-RA	PpKANK1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1
PPU04234-RA	PpKCNT2	Potassium channel subfamily T member 2
PPU14683-RA	PpLOX3	Lysyl oxidase homolog 3A
PPU09193-RA	PpLPSBP_2	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein
PPU05756-RA	PpLRP2_1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
PPU12625-RA	PpLRP2_2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2

PPU03914-RA	PpLRP4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
PPU13534-RA	PpLRP5	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5
PPU10738-RA	PpLRRC4C	Leucine-rich repeat-containing protein 4C
PPU00431-RA	PpLTE_2	Lectizyme
PPU14762-RA	PpMETTL22	Methyltransferase-like protein 22
PPU05921-RA	PpMIPP1	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1
PPU10960-RA	PpMRSP4_1	Multidrug resistance-associated protein 4
PPU10963-RA	PpMRSP4_2	Multidrug resistance-associated protein 4
PPU11283-RA	PpMRSP4_3	Multidrug resistance-associated protein 4
PPU06491-RA	Ppmys	Integrin beta-PS
PPU09225-RA	PpNCP2	Nucleolar complex protein 2 homolog
PPU09631-RA	PpNLG1	Neuroligin-1
PPU07704-RA	PpNLG3	Neuroligin-3
PPU02791-RA	PpNotch3	Neurogenic locus notch homolog protein 3
PPU15203-RA	PpNPH	Nephrin
PPU15397-RA	PpNthl1	Endonuclease III-like protein 1
PPU15661-RA	PpOBP56d_2	General odorant-binding protein 56d
PPU09374-RA	PpOdf2	Outer dense fiber protein 2
PPU08048-RA	PpOR10a	Odorant receptor 10a
PPU12455-RA	PpOR2	Odorant receptor Or2
PPU01106-RA	PpOR43a	Odorant receptor 43a
PPU09355-RA	PpPAT1	Proton-coupled amino acid transporter 1
PPU08675-RA	PpPepck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]
PPU03480-RA	PpPFM	Parafibromin
PPU11235-RA	PpPLB1	Phospholipase B1, membrane-associated
PPU09687-RA	PpPNLIP	Pancreatic triacylglycerol lipase (Fragment)
PPU00494-RA	PpPTL	Pancreatic triacylglycerol lipase
PPU00445-RA	Ppqvr	Protein quiver
PPU03757-RA	Ppresil	Pro-resilin
PPU09764-RA	PpRPA70_1	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit
PPU02517-RA	PpS35E1	Solute carrier family 35 member E1 homolog
PPU04036-RA	PpSC2	Peptidoglycan-recognition protein SC2
PPU08555-RA	PpScd3	Acyl-CoA desaturase 3
PPU06541-RA	PpScpep1	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase
PPU03404-RA	PpSerpin	Serine protease inhibitor I/II
PPU08261-RA	PpShaw	Potassium voltage-gated channel protein Shaw
PPU02771-RA	Ppsnmp	Sensory neuron membrane protein 1
PPU05884-RA	PpSNO	Senecionine N-oxygenase
PPU10160-RA	PpSNX25	Sorting nexin-25
PPU07058-RA	PpSP4	Transcription factor Sp4
PPU06096-RA	PpSPB8	Serpin B8
PPU04828-RA	PpSPCE	Probable sodium/potassium/calcium exchanger CG1090
PPU06527-RA	Ppspop_2	Speckle-type POZ protein

PPU06596-RA	Ppspop_3	Speckle-type POZ protein
PPU08155-RA	Ppspop_4	Speckle-type POZ protein
PPU06594-RA	PpspopB_1	Speckle-type POZ protein B
PPU06595-RA	PpspopB_2	Speckle-type POZ protein B
PPU06706-RA	PpspopB_3	Speckle-type POZ protein B
PPU13842-RA	PpSSP	Probable salivary secreted peptide
PPU11299-RA	PpSSPO	SCO-spondin
PPU03436-RA	Ppstan	Protocadherin-like wing polarity protein stan
PPU06413-RA	PpSvep1	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1
PPU06852-RA	Ppteme151b	Transmembrane protein 151B
PPU02496-RA	Ppteme26	Transmembrane protein 26
PPU03364-RA	PpTK1782	Uncharacterized serpin-like protein TK1782
PPU04993-RA	PpTMA7	Translation machinery-associated protein 7 homolog
PPU10310-RA	PpTnC1	Troponin C, isoform 1
PPU03446-RA	PpTret1_2	Facilitated trehalose transporter Tret1
PPU08997-RA	PpTRY	Trypsin
PPU04837-RA	PpTRY3_1	Trypsin-3 (Fragment)
PPU13016-RA	PpTRY3_2	Trypsin-3 (Fragment)
PPU08996-RA	PpTRY6	Putative trypsin-6
PPU00208-RA	PpTSC2_1	Tuberin
PPU00209-RA	PpTSC2_2	Tuberin
PPU11024-RA	Ppttc25	Tetratricopeptide repeat protein 25
PPU12498-RA	PpTTLL9	Probable tubulin polyglutamylase TTLL9
PPU03403-RA	Ppunc89	Muscle M-line assembly protein unc-89
PPU07827-RA	PpURH1_1	Probable uridine nucleosidase 1
PPU10760-RA	PpURH1_2	Probable uridine nucleosidase 1
PPU05626-RA	PpVGLUT2	Vesicular glutamate transporter 2
PPU03352-RA	PpVNNL1	Vanin-like protein 1
PPU12992-RA	Ppzag1	Zinc finger E-box-binding homeobox protein zag-1
PPU07753-RA	Ppzig8_2	Zwei Ig domain protein zig-8
带病毒上调		
PPU04797-RA	Pp4CL1	Probable 4-coumarate--CoA ligase 3
PPU13131-RA	Pp5HH	Probable 5-hydroxyisourate hydrolase R09H10.3
PPU13774-RA	PpAcph1	Venom acid phosphatase Acph-1
PPU03335-RA	PpADA2	Adenosine deaminase 2
PPU03751-RA	PpAdf1_2	Transcription factor Adf-1
PPU04017-RA	PpALP1	Protein ANTAGONIST OF LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1
PPU11233-RA	PpAnk2	Ankyrin-2
PPU10907-RA	PpAnkr0381_1	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU16767-RA	PpAnkr0381_2	Putative ankyrin repeat protein RF_0381
PPU02785-RA	PpArg	Arginase, hepatic
PPU05053-RA	PpArsb	Arylsulfatase B
PPU06331-RA	PpAST5	Achaete-scute complex protein T5

PPU07947-RA	PpAZI2	Antizyme inhibitor 2
PPU10950-RA	PpB1	B1 protein (Fragment)
PPU04715-RA	PpBBS4	Bardet-Biedl syndrome 4 protein
PPU11062-RA	PpCCDC96	Coiled-coil domain-containing protein 96
PPU04761-RA	PpCHDS	Cholesterol 7-desaturase
PPU01199-RA	PpChp	Chaoptin
PPU07268-RA	PpCREG1	Protein CREG1
PPU04133-RA	PpCRYAB	Protein lethal(2)essential for life
PPU03539-RA	PpCTR2	Chymotrypsin-2
PPU12955-RA	PpCTRC	Chymotrypsin-C
PPU02070-RA	PpCYB5	Cytochrome b5
PPU03487-RA	PpCYP6a14	Probable cytochrome P450 6a14
PPU06135-RA	PpCYP6k1_1	Cytochrome P450 6k1
PPU08018-RA	PpCYP6k1_2	Cytochrome P450 6k1
PPU10637-RA	PpDbp80	DEAD-box helicase Dbp80
PPU10094-RA	PpDEAF1	Deformed epidermal autoregulatory factor 1 homolog
PPU15789-RA	PpDET1	DET1 homolog
PPU01979-RA	PpDHDH	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase
PPU04224-RA	PpDnah5	Dynein heavy chain 5, axonemal
PPU05134-RA	PpDNR7	Dynein regulatory complex subunit 7
PPU15755-RA	PpERI3	ERI1 exoribonuclease 3
PPU06125-RA	Ppexog_1	Nuclease EXOG, mitochondrial
PPU13904-RA	Ppfastkd1	FAST kinase domain-containing protein 1, mitochondrial
PPU09186-RA	PpFPV244	Putative ankyrin repeat protein FPV244
PPU07988-RA	PpGld	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU03136-RA	PpGld_1	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU03138-RA	PpGld_2	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
PPU07321-RA	PpGnmt	Glycine N-methyltransferase
PPU02084-RA	PpGST_1	Glutathione S-transferase
PPU16784-RA	PpGST_2	Glutathione S-transferase
PPU04018-RA	PpGTL1	Trihelix transcription factor GTL1
PPU12443-RA	PpH1_1	Histone H1, early embryonic
PPU12503-RA	PpH1_2	Histone H1, early embryonic
PPU08101-RA	PpH2B_1	Histone H2B.1/H2B.2
PPU08403-RA	PpH2B_2	Histone H2B.1/H2B.2
PPU08359-RA	PpH2B_3	Histone H2B.1/H2B.2
PPU08404-RA	PpH3	Histone H3
PPU08356-RA	PpH4_1	Histone H4
PPU08401-RA	PpH4_2	Histone H4
PPU08405-RA	PpH4_3	Histone H4
PPU13733-RA	Pphb	Protein hunchback (Fragment)
PPU04334-RA	PpHexa	Hexamerin
PPU01076-RA	Pphoxa1	Homeobox protein Hox-A1 (Fragment)

PPU14766-RA	PpHpgd_1	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]
PPU07024-RA	PpIrrc58	Leucine-rich repeat-containing protein 58
PPU12054-RA	PpKazal4	Serine protease inhibitor Kazal-type 4
PPU06073-RA	PpKMT5AB	N-lysine methyltransferase KMT5A-B
PPU12436-RA	PpKyat1	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 1
PPU12438-RA	Ppkyat3	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3
PPU08109-RA	PpLARP7	La-related protein 7
PPU10868-RA	PpLDM6A	Lysine-specific demethylase 6A
PPU13511-RA	PpLIP3_1	Lipase 3
PPU13932-RA	PpLIP3_2	Lipase 3
PPU08587-RA	PpLPSBP_1	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein
PPU12279-RA	PpLRP1_1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1
PPU14829-RA	PpLRP1_2	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1
PPU07450-RA	PpLRP1b	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B
PPU15356-RA	PpLRRC27	Leucine-rich repeat-containing protein 27
PPU10739-RA	PpLTE_1	Lectizyme
PPU09682-RA	PpMAL1	Maltase 1
PPU14413-RA	PpMIDH	Myo-inositol 2-dehydrogenase
PPU14834-RA	PpMRPS17	28S ribosomal protein S17, mitochondrial
PPU11254-RA	PpNBN	Nibrin
PPU04381-RA	PpNDK6	Nucleoside diphosphate kinase 6
PPU03690-RA	PpNep2	Neprilysin-2
PPU10951-RA	PpOBP56d_1	General odorant-binding protein 56d
PPU15680-RA	PpObp69a	General odorant-binding protein 69a
PPU04576-RA	PpOCL1	Omega-conotoxin-like protein 1
PPU11061-RA	PpPADO	Probable phytanoyl-CoA dioxygenase
PPU06295-RA	PpPAGR1	PAXIP1-associated glutamate-rich protein 1
PPU13121-RA	PpPCDH3	Protocadherin-3
PPU03466-RA	PpPLR2	Pancreatic lipase-related protein 2
PPU03628-RA	PpPP6R	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A
PPU10939-RA	PpProm1	Prominin-1
PPU03451-RA	PpPTGR1	Prostaglandin reductase 1
PPU16349-RA	PpPTRH2	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial
PPU16296-RA	PpRDX	Protein roadkill
PPU16764-RA	PpRFWD3	E3 ubiquitin-protein ligase RFWD3
PPU15336-RA	PpRNOY	Ribonuclease Oy
PPU15101-RA	PpRPA70_2	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit
PPU08318-RA	PpsconC	E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit sconC
PPU08261-RA	PpShaw	Potassium voltage-gated channel protein Shaw
PPU10054-RA	PpSlob	Slowpoke-binding protein
PPU08572-RA	PpSmox	Spermine oxidase
PPU06017-RA	Ppspop_1	Speckle-type POZ protein
PPU11297-RA	Ppspop_5	Speckle-type POZ protein

PPU14733-RA	PpspopB_4	Speckle-type POZ protein B
PPU12095-RA	PpTKFC	Triokinase/FMN cyclase
PPU02789-RA	PpTPH1	Tryptophan 5-hydroxylase 1
PPU14844-RA	PpTret1_1	Facilitated trehalose transporter Tret1
PPU00428-RA	PpTRY1_1	Trypsin-1
PPU00429-RA	PpTRY1_2	Trypsin-1
PPU05993-RA	PpTRY7	Trypsin-7
PPU03541-RA	PpTRYe	Trypsin epsilon
PPU14838-RA	PpTRYP1	Trypsin I-P1
PPU07388-RA	PpUGT2C1_1	UDP-glucuronosyltransferase 2C1 (Fragment)
PPU13923-RA	PpUGT2C1_2	UDP-glucuronosyltransferase 2C1 (Fragment)
PPU03230-RA	PpVA3	Venom allergen 3
PPU15692-RA	Ppvlacd	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
PPU07958-RA	Ppvn	Protein vein
PPU14689-RA	PpVWF	von Willebrand factor
PPU16765-RA	PpwarA	Homeobox protein Wariai
PPU12787-RA	PpZF107	Zinc finger protein 107
PPU12649-RA	PpZF512B	Zinc finger protein 512B
PPU07526-RA	Ppzig8_1	Zwei Ig domain protein zig-8

作者简历

教育经历

2015.09-2021.06	浙江大学	攻读博士学位	农业昆虫与害虫防治
2011.09-2015.06	华中农业大学	攻读学士学位	植物保护

博士期间已发表论文

1. **Xiong S.**, Yu K., Yao H., Wang F., Fang Q., Song Q.*, et al.* (2021) Effects of sugar sources on adult longevity, survival and related gene expression in an endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Pest Manag Sci* **77**: 1282-1291.
2. **Xiong S.**, Yu K., Ye X., Fang Q., Deng Y., Xiao S.*, et al.* (2020) Genes acting in longevity-related pathways in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *Arch Insect Biochem Physiol* **103**: e21635.
3. Yu K., **Xiong S.**, Xu G., Ye X., Yao H., Wang F.*, et al.* (2020) Identification of neuropeptides and their receptors in the ectoparasitoid, *Habrobracon hebetor*. *Frontiers in Physiology* **11**: 575655.
4. Ye X., Yan Z., Yang Y., Xiao S., Chen L., Wang J., Wang F., **Xiong S.**, Mei Y., Wang F., Yao H., Song Q., Li F., Fang Q., Werren J.H., Ye G. (2020) A chromosome-level genome assembly of the parasitoid wasp *Pteromalus puparum*. *Mol Ecol Resour* **20**: 1384-1402.
5. Xiao S., Wang B., Li K., **Xiong S.**, Ye X., Wang J.*, et al.* (2020) Identification and characterization of miRNAs in an endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum*. *Arch Insect Biochem Physiol* **103**: e21633.
6. Teng Z., Wu H., Ye X., **Xiong S**., Xu G., Wang F.*, et al.* (2019) An ovarian protein involved in passive avoidance of an endoparasitoid to evade its host immune response. *J Proteome Res* **18**: 2695-2705.
7. Teng Z., **Xiong S.**, Xu G., Gan S., Chen X., Stanley D.*, et al.* (2017) Protein discovery: combined transcriptomic and proteomic analyses of venom from the endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae). *Toxins* **9**: 135.

博士期间获得的发明专利

1. 叶恭银，**熊时姣**，黄佳，滕子文，方琦.延长昆虫寿命的药剂及其鉴别方法:中国，ZL201710426985.8[P]. 2020-06-16.
2. 叶恭银，滕子文，**熊时姣**，方琦.二化螟盘绒茧蜂毒液和卵巢丝氨酸蛋白酶抑制剂 CcSPN 及其应用:中国，ZL201711304696.7[P]. 2020-04-17.
3. 叶恭银，滕子文，**熊时姣**，方琦.二化螟盘绒茧蜂毒腺和卵巢分泌的钙网蛋白 CcCRT 及其应用:中国，ZL201711305075.0[P]. 2020-04-17.

博士期间参加会议

1. Longevity regulating pathways and their components of the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. 2018 ESA, ESC and ESBC Joint Annual Meeting, November 11-14, 2018, Vancouver, BC, Canada (Poster in English).
2. Transcriptome analysis of endoparasitoid *Pteromalus puparum* in reaction to heat stress. The 4th International Conference of Insect Genomics (ICIG) and the 7th International Symposium on Insect Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (IPBMB), July 2-6, 2019, Chongqing, China (Poster in English).