

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.01.006

家蚕 *BmHsp19.5* 基因的鉴定及 在滞育卵中的表达分析

龚竞, 尚杉, 郑茜, 于新波, 朱勇

农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室/西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

摘要: 基于前期转录组学研究结果, 从家蚕滞育卵和发育蚕卵中筛选出差异表达基因家蚕 *BmHsp19.5*. 为了进一步了解该基因的序列信息、表达特征以及在家蚕卵滞育过程中的功能, 本文采用基因克隆、生物信息学方法以及 qPCR 检测等技术手段对该基因进行分析. 结果表明: 家蚕 *BmHsp19.5* 基因的 ORF(open reading frame) 框全长 504 bp, 共编码 167 个氨基酸, 其蛋白的理论相对分子质量为 1.95×10^4 . 该蛋白 65-157 位氨基酸为 Hsp20 功能结构域, 符合小热激蛋白家族结构特征. 该基因在滞育卵和非滞育卵中表达量存在显著差异, 在滞育卵中呈上调表达, 且在第 3 d 达到最大值, 推测该基因与滞育过程有关, 可能在家蚕滞育进入时发挥了重要作用.

关键词: 家蚕; *BmHsp19.5* 基因; 滞育; 表达分析

中图分类号: S882 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2022)01-0057-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Expression Analysis of *BmHsp19.5* Gene in Diapause Eggs of *Bombyx mori*

GONG Jing, SHANG Shan, ZHENG Xi, YU Xinbo, ZHU Yong

Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture/

College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Based on the results of previous transcriptomics research, the differentially expressed *BmHsp19.5* gene was screened from the diapause eggs and developing silkworm eggs of the silkworm. To further understand the sequence information, expression characteristics and function of the *BmHsp19.5* gene during the diapause process, we used gene cloning, bioinformatics methods and qPCR detection to analyze the gene. The results showed that the ORF of the *BmHsp19.5* gene was 504 bp in length, encoding a total of 167 amino acids, and the theoretical molecular weight of the protein was 1.95×10^4 . The 65-157

收稿日期: 2021-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802139, 31872429); 重庆市自然科学基金项目(cstc2021jcyj-msxmX1166).

作者简介: 龚竞, 博士, 副教授, 主要从昆虫滞育机理研究及昆虫抗逆机制研究.

通信作者: 朱勇, 博士, 教授.

amino acid fragment of the protein was Hsp20 functional domain, which was consistent with the structural characteristics of small heat shock protein family. The expression level of the gene in diapause and non-diapause eggs was significantly different, and the expression of the gene was up-regulated in diapause eggs, and reached the maximum on the 3rd day. Taken together, it is speculated that *BmHsp19.5* gene is related to diapause process and may play an important role in diapause entry of silkworm.

Key words: silkworm; *BmHsp19.5* gene; diapause; expression analysis

滞育是生物体发育到某一特定阶段停滞生长发育来抵抗外界不利环境的一种生理现象,普遍发生在线虫、昆虫、鱼类甚至哺乳动物上^[1-5]. 当生物体受到光照、温度等外界信号诱导时,机体会发生一系列变化:呼吸减弱、代谢降低、抗逆性增强、发育逐渐停滞进入滞育. 不同于休眠,滞育通常发生在不利条件来临前,在滞育过程中即使适宜的条件到来也不会立即打破滞育,需要经历一定时间或受到某一因子刺激后,生物体才能解除滞育. 家蚕是典型的卵滞育昆虫,在胚胎早期进入滞育^[6],根据滞育程度的差异可以划分为一化性品种,自然条件下 1 年只孵化 1 次;二化性品种,自然条件下 1 年只孵化 2 次;多化性品种,自然条件下 1 年孵化多次. 其中,二化性家蚕可以通过对其母代家蚕催青时期条件进行设置来控制子代家蚕的滞育性^[7],即高温长光照催青获得子代滞育卵,低温黑暗获得子代非滞育卵.

热激蛋白(heat shock proteins, Hsps)是一种高度保守的蛋白,可防止底物蛋白的不可逆变性,从而增强生物体的抗逆性,广泛存在于各种原核和真核生物中. 根据 Hsps 的分子量和同源关系可以分为 4 种^[8],分别为 Hsp90, Hsp70, Hsp60 和 sHsps(small Hsps, sHsps). 其中, sHsps 的相对分子质量在 $1.2 \times 10^4 \sim 4.2 \times 10^4$ 之间,通常在 3.0×10^4 以下,有一个 α -晶体区域包含约 100 个氨基酸残基的保守序列^[8-9]. Hsps 最初是在果蝇的研究中被发现^[10],是对高温有应激反应的一种蛋白,并因此得名. 随后的研究发现, Hsps 可以在寒冷、干燥、缺氧和化学药品等应激条件下上调表达^[11].

热激蛋白广泛参与到生物生长发育的调控过程中. 在昆虫滞育过程中,麦红吸浆虫 *Sitotiplosis mosellana* 的 Hsp70 和 Hsp90 在幼虫滞育和一定范围的冷热胁迫下表达上调,而 Hsp70 在滞育之前和滞育期间丰度相当^[11];蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 滞育幼虫中 Hsp90 的表达量增加,而 Hsp70 在滞育过程中减少^[13];非洲棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 滞育期间脑中 Hsp20.7 和 Hsp90 的表达量下降,而 Hsp21.4 和 Hsp70 表达量升高^[14]. 热激蛋白在滞育过程中含量的变化,暗示其可能在当中发挥了重要作用,在滞育过程和应急反应时可能具有相似功能.

目前,有多个家蚕 Hsps 被研究鉴定: Fan 等^[15]采用鸟枪蛋白组学法对蚕卵进行研究,发现了 9 个 Hsp 蛋白; Li 等^[16]通过全基因组分析鉴定了 16 个家蚕 *sHsp* 基因,并发现昆虫 sHSPs 显示出与脊椎动物完全不同的进化模式. 在我们前期的转录组学研究中^[17],通过对产后 32 h 的滞育卵和发育蚕卵进行 RNASeq 测序分析,发现了一些差异表达的家蚕 *Hsp* 基因. 本文中我们选取 *BmHsp19.5* 基因(BGIB-MGA013545)进行进一步分析,完成了克隆鉴定和生物信息学分析,并对该基因在滞育卵和非滞育卵中产后时期的表达情况进行了调查分析. 这些结果将为揭示家蚕滞育过程中 *Hsps* 基因的表达特征及功能提供重要的研究信息,也为研究其他昆虫的 *Hsps* 提供有价值的参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究使用的家蚕二化性品种‘大造’由西南大学家蚕基因资源库提供,母代家蚕通过高温 25 ℃、长光照条件下催青产下滞育卵,低温 15 ℃、短日照条件下催青产下非滞育卵为实验材料. 按照常规方法饲养家蚕,取子代蚕卵作为实验材料. 将蚕卵置于 1.5 mL 离心管中,用液氮速冻,保存于-80 ℃冰箱备用.

1.2 引物设计

根据前期转录组测序结果获得的家蚕 *BmHsp19.5* 基因序列, 通过家蚕基因组数据库 Silkdb 3.0 (<http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb/>) Blast 检索, 采用 Primer 5.0 软件在预测序列上设计克隆引物. 基因鉴定后, 为调查 *BmHsp19.5* 基因在产后时期的表达情况设计了 qPCR 引物序列(表 1).

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	用 途
<i>BmActin3-F</i>	AACACCCCGTCCTGCTCACTG	克隆
<i>BmActin3-R</i>	GGGCGAGACGTGTGATTTCCT	克隆
<i>BmHsp19.5-F</i>	ATGTCGCTTGTAACCGTACTGGCTA	克隆
<i>BmHsp19.5-F</i>	TCACTTTGTTTGCTCACTGTTTAC	克隆
<i>sw22934-F</i>	TTCGTACTGGCTCTTCTCGT	qPCR
<i>sw22934-R</i>	CAAAGTTGATAGCAATTCCT	qPCR
<i>BmHsp19.5-F1</i>	CGACACTTGAGGAATCTGGCGTAC	qPCR
<i>BmHsp19.5-R1</i>	GTGAGGTGGCTTGCTGATGTAC	qPCR

1.3 基因克隆

PCR 循环参数为: 94 ℃ 预变性 1.5 min; 94 ℃ 变性 20 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 28 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min. 扩增产物与 pMD19-T 载体连接, 转化进入 *E.coli* DH5α 感受态细胞中, 涂布含有氨苄抗性的平板筛选后, 送至上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定.

1.4 *BmHsp19.5* 生物信息学分析

利用 ProtParm 在线程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)分析家蚕 *BmHsp19.5* 蛋白理化参数; 应用 Mega 7.0 软件、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 (<http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb/>)程序对 *BmHsp19.5* 蛋白序列做同源性比较, 绘制系统进化树. 采用 SignalP 在线程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)分析 *BmHsp19.5* 蛋白信号肽的功能; 使用 TMHMM 在线程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 Expasy ProtScale 在线程序 (<http://web.expasy.org/protscale/>)进行 *BmHsp19.5* 蛋白质跨膜区预测和疏水性分析; 使用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对蛋白功能结构域预测.

1.5 家蚕 *BmHsp19.5* 在蚕卵产后不同时期的检测

qPCR 采用 ABI Step One 仪器进行两步法反应. 反应程序为: 94 ℃ 预变性 1 min, 94 ℃ 变性 20 s, 60 ℃ 退火延伸 40 s, 30 个循环. 每个时期设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复设置 3 个技术重复, 根据荧光定量所得到的 *Ct* 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行分析, GraphPad Prism 7.0 软件作图.

1.6 数据统计学分析

数据结果用平均值±标准差表示, 使用 GraphPadPrism 5.0 软件进行统计分析, 同时采用多重 T-test 方法来比较不同样品的差异具有统计学意义($p<0.05$).

2 结果与分析

2.1 家蚕 *BmHsp19.5* 克隆

目的基因以家蚕产下 32 h 的蚕卵 cDNA 为模板, 用克隆引物进行 PCR 扩增, 随后用琼脂糖凝胶电泳检验(图 1a), 结果显示 PCR 产物大小在 504 bp, 与预测编码区序列大小一致. 随后进行凝胶回收并验证(图 1b), 并将回收片段连接到载体上(图 1c). 测序结果在 Silkdb 3.0 网站比对分析后, 表明 *BmHsp19.5* 基因没有内含子, 全长为 732 bp, 其中 ORF 为 504 bp, 编码的氨基酸序列为 167 个氨基酸(图 1d), 与预测序列结果一致.

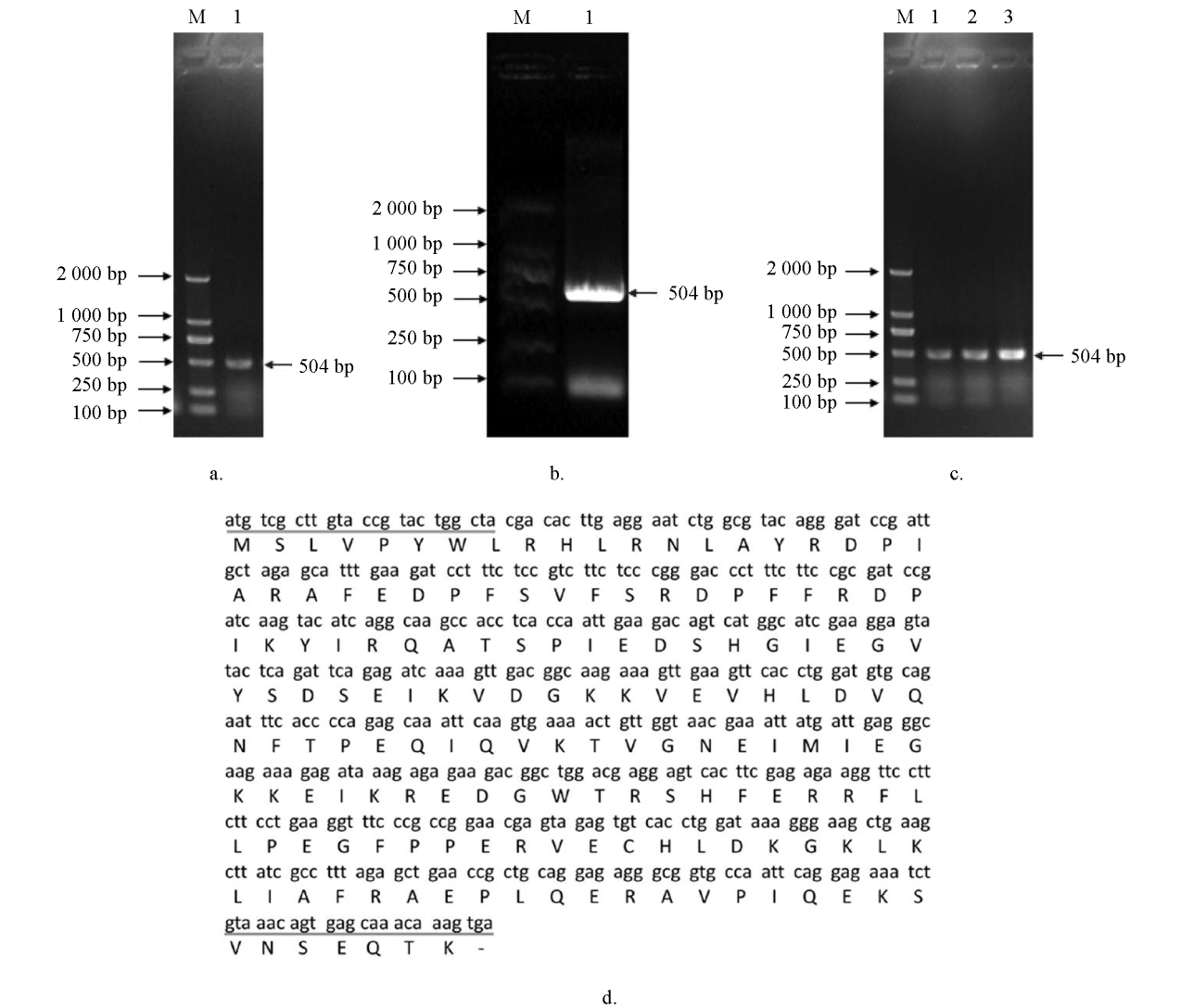


图 1 家蚕 *BmHsp19.5* 电泳图和测序序列

2.2 家蚕 *BmHsp19.5* 序列分析

利用 Protparam 软件对家蚕 *BmHsp19.5* 基因所编码的目的蛋白进行预测分析, 其理论相对分子质量为 1.95×10^4 , 等电点为 5.21. 不稳定指数(II)为 38.29, 说明蛋白质稳定. 利用 SignalP 4.1Server 软件分析预测 *BmHsp19.5* 蛋白的信号肽, 结果显示未发现信号肽结构, 可能该目的蛋白为非分泌蛋白. 利用 TMHMM 在线预测网站预测家蚕 *BmHsp19.5* 蛋白跨膜结构域, 可知该蛋白不具有跨膜结构域, 为非跨膜蛋白.

利用 SMART 软件对 *BmHsp19.5* 蛋白进行功能结构域预测, 发现该目的蛋白 65-157 位氨基酸为 Hsp20 功能结构域(图 2a), 故该蛋白属于小分子热激蛋白家族. 利用 ProtScale 软件对家蚕 *BmHsp19.5* 蛋白进行蛋白亲疏水性预测(图 2b), 图 2b 中横坐标表示氨基酸序列位置; 纵坐标表示氨基酸的标度值; 通过标度值判定氨基酸的亲疏水性, 标度值大于 0 表示疏水性, 标度值小于 0 表示亲水性. 从图 2b 中可知最低值为-2.522, 最高值为 0.989, 且大部分峰值位于 0 值以下, 该目的蛋白为亲水性蛋白.

2.3 家蚕 *BmHsp19.5* 同源基因分析判定

使用家蚕 *BmHsp19.5* 蛋白序列在 NCBI(National center for biotechnology information)数据库进行 BlastP 搜索, 检索发现多个鳞翅目的同源物, 最终选择 6 个具有代表性的序列进行同源序列比对分析. 结

果发现, *BmHsp19.5* 与柞蚕 *ApHsp19.5* (GenBank 登录号: APX61064.1)、小木蠹蛾 *EhHsp20.1* (GenBank 登录号: AYA93247.1) 和东方果蛾 *GmHsp19.6* (GenBank 登录号: AKS40076.1) 的氨基酸序列相似性较高, 分别为 94%, 93% 和 92%, 同源性分别为 83%, 85% 和 79%。*BmHsp19.5* 与桑螟 *GpHsp19.5* (GenBank 登录号: QGZ00457.1)、云杉芽虫 *CfHsp19.8* (GenBank 登录号: AAZ14792.1) 和苹果蠹蛾 *CpHsp19.8* (GenBank 登录号: ADX96000.1) 的氨基酸序列相似性分别为 62%, 50% 和 50%, 同源性分别为 48%, 39% 和 38%。所有氨基酸序列都含有一个典型的 α -晶状体蛋白结构域(图 3)。

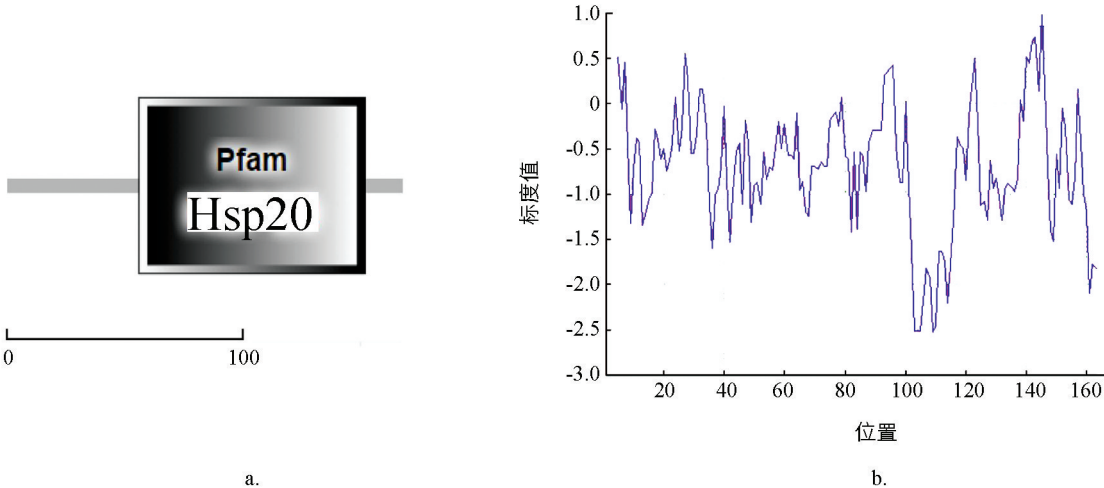
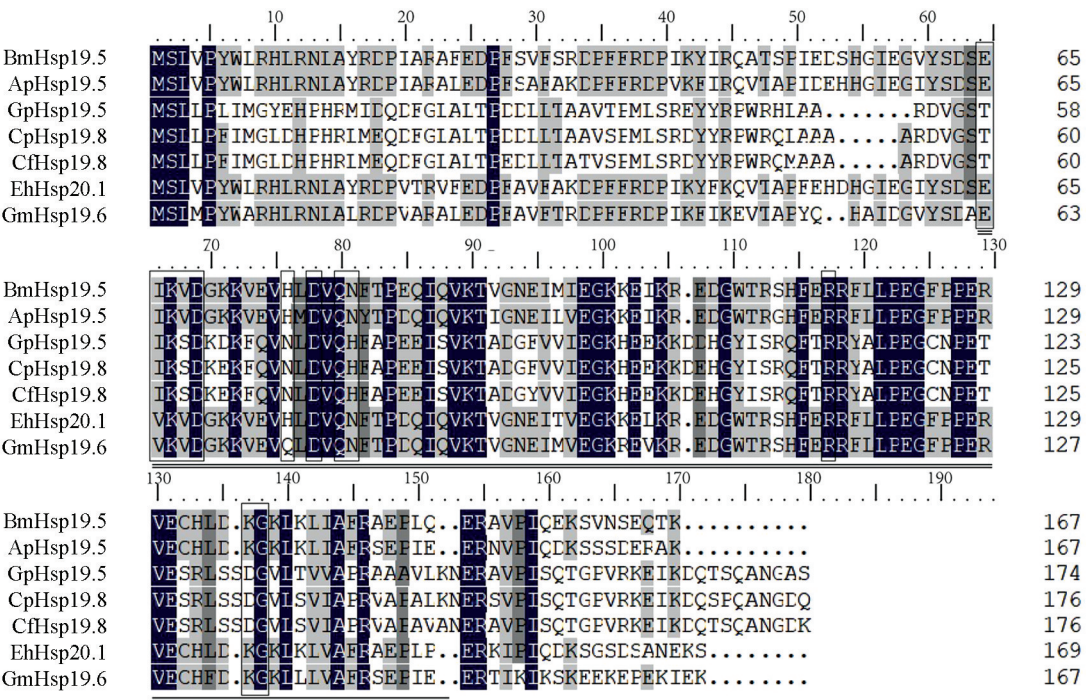


图 2 *BmHsp19.5* 蛋白功能结构域预测分析(a)和蛋白的疏水性预测(b)



双下划线表示 α -晶体区域, 方框表示二聚体界面位点, 深色区域表示高度保守的氨基酸。

图 3 *BmHsp19.5* 与其他 6 种同源鳞翅目昆虫的氨基酸序列比对

利用 Mega 7.0 软件对家蚕、柞蚕、小菜夜蛾等 11 种不同物种的小分子热激蛋白构建系统进化树, 结果显示物种序列形成两个大的分支, 其中云杉蚜虫单独为一支, 其他 10 个物种序列为一支。家蚕与黑脉金斑蝶、沙棘蛾这两类首先聚在一起(图 4), 然后再与亲缘关系最近的柞蚕聚在一起, 之后与梨小食心虫、夏威夷虹蛱蝶、小菜蛾等聚为一支。

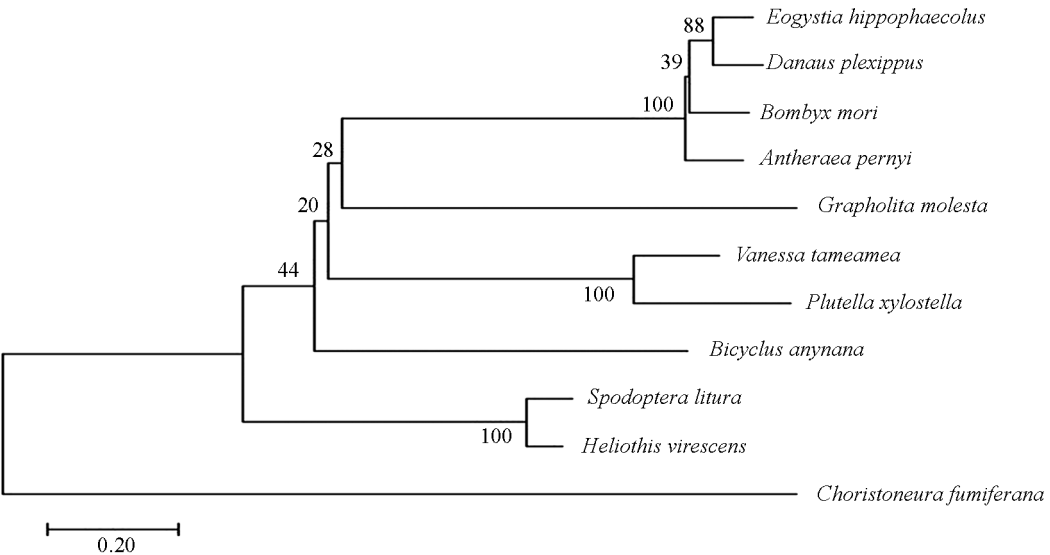


图 4 *BmHsp19.5* 与其他物质小分子热激蛋白序列系统进化树

2.4 家蚕 *BmHsp19.5* 在蚕卵产后的表达分析

利用 qPCR 技术检测 *BmHsp19.5* 基因在滞育卵与非滞育卵不同时期的表达量(图 5). 在滞育卵中, 1~3 d 呈上升趋势, 在 3 d 时达到峰值, 随后逐渐下降, 此时胚胎形态经历了由产后第 1 d 梨形的头叶分化, 到第 2 d 胚胎明显拉长、尾节分化, 在产后第 3 d 不再有明显变化, 整个滞育期保持不变进入滞育 I 期^[18]. 通常认为蚕卵在产后 2~3 d 开始进入滞育期, 由此推断 *BmHsp19.5* 基因可能在蚕卵进入滞育的准备阶段发挥了重要作用.

从图 5 中我们还可以看到, *BmHsp19.5* 基因在滞育卵的表达量显著高于非滞育卵的表达量. 在非滞育卵中产后 1 d 表达量最高, 到第 5 d 呈持续下将的趋势, 在第 6 d 蚕卵点青的时候表达量又小幅升高, 孵化前第 8 d 略微下降; 点青期蚁蚕头部黑色素开始附着, 这时蚕体充满了卵壳, 为孵化做着最后的准备. 这期间蚕卵需氧量大幅度增加^[19], 同时活性氧(ROS)含量也增加^[20], *BmHsp19.5* 基因的小幅升高似乎与这些变化有关.

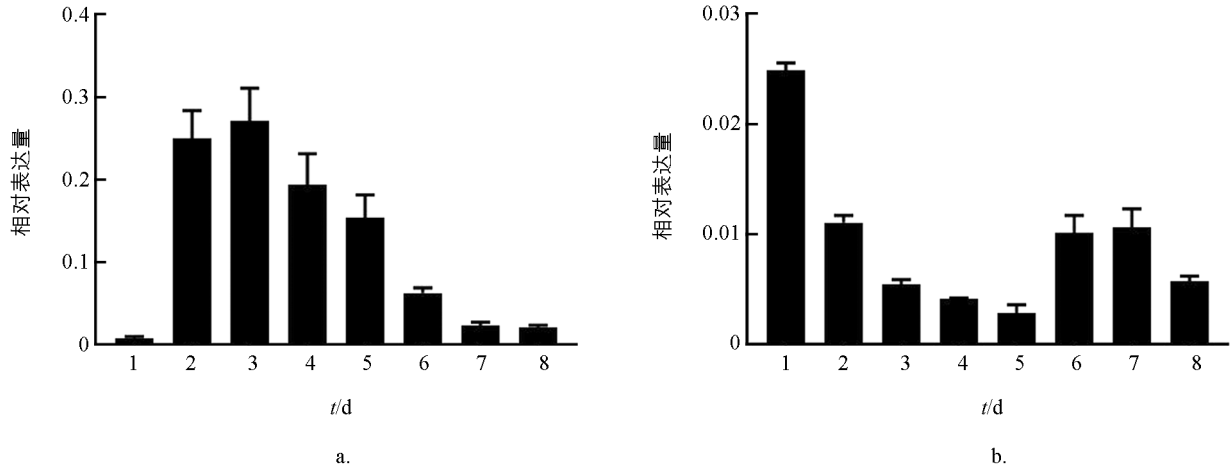


图 5 家蚕 *BmHsp19.5* 在滞育卵(a)与非滞育卵中(b)的表达量分析

3 结论与讨论

根据克隆测序, 我们鉴定了一个新的家蚕 *BmHsp19.5* 基因, 相对分子质量为 1.95×10^4 , 预测显示该蛋白在 65-157 位氨基酸为 Hsp20 功能结构域, 符合小热激蛋白家族结构特征. 同源性分析显示该序列与其他鳞翅目昆虫的小热激蛋白具有较高的保守性, 都含有一个典型的 α -晶体区域. *BmHsp19.5* 基因和大多数 *sHsp* 基因一样也只有一个内含子, 前人的研究认为由于无内含子就可以避免 mRNA 剪接过程和当

中可能出现的障碍,从时间上优先于其他基因,因此有利于应激或抗逆反应基因的及时表达^[21]。家蚕的 *sHsp* 基因 *sHsp19.9*, *sHsp20.1*, *sHsp20.4*, *sHsp20.8*, *sHsp21.4* 和 *sHsp23.7*, 仅有含有内含子的 *sHsp21.4* 在热激反应中转录物没有增加^[22]。据此我们推测本实验中 *BmHsp19.5* 基因可能在应急反应和滞育发育较早时期发挥作用。

热激蛋白的上调似乎是昆虫在不同滞育阶段的一个共同特点。红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 在蛹滞育期间,大部分 *Hsp* 基因会在滞育开始阶段上调表达,并将持续整个越冬期,如 *Hsp70A*, *Hsp70B*, *Hsp60*, *Hsp25*, *Hsp23*, *Hsp18*, *SmHsp*; 利用 RNAi 抑制热激蛋白的表达,发现对蛹的低温存活能力有重要影响^[23]。云杉芽虫中有 14 种 *sHsps* 基因在幼虫进入滞育前、滞育中、滞育后这 3 个阶段上调表达,如 *Hsp19.6* 和 *Hsp22.1* 基因在滞育中显著上调表达; *Hsp19.2*, *Hsp19.7*, *Hsp21.5a* 和 *Hsp24.3* 基因在滞育前和滞育中上调表达; *Hsp20.0* 和 *Hsp21.3* 基因则在整个期间持续表达^[24]。*sHsps* 常作为细胞防御的第一道防线,在细胞受到胁迫时,作为分子伴侣防止底物蛋白的不可逆变性,反映生物体对环境中的某些极端应力的响应^[25-26]。葱蝇 *Delia antiqua* 的 *Hsp23* 基因在蛹滞育开始时表达量逐渐升高,到滞育维持的中后期达到峰值,在滞育终止时降到较低水平^[27]。在卤虫中由于缺失小热激蛋白 p26 的胚胎更容易终止滞育,因此认为该蛋白是维持滞育所必需的^[28]。

家蚕滞育卵室温条件下产后 48~72 h 开始进入滞育,卵色由淡黄色逐渐变成赤豆色,胚胎形态不再变化,这个时期被称之为前滞育期^[29]。本研究的 *BmHsp19.5* 基因在这一时期上调表达,该结果与之前转录组数据一致;根据基因表达模式推测该基因可能参与了滞育这一生理过程,可能在蚕卵进入滞育的准备阶段发挥了重要作用,同时也符合越冬昆虫滞育期间热激蛋白上调以抗寒这个主要特征。家蚕 *Hsp20.8A*, *Hsp70*, *DnaJ* 和 *Hsc71* 基因也是在滞育蚕卵中上调表达^[30]。也有报道指出家蚕中 *Hsp20.4*, *Hsp20.8*, *Hsp40*, *Hsp70* 和 *Hsp90* 的 mRNA 在滞育期间没有变化^[31],在家蚕滞育卵和非滞育卵中的含量大致相同^[15]。这可能是由于研究者取材时间的差异所致,同时说明滞育引起的热激蛋白表现和普通应急反应不同,并不是所有热激蛋白都同时参与其中,可能通过滞育相关机制调控 *Hsp* 基因及其产物,在不同时间增加、减少或保持不变,从而促进昆虫在逆境中生存^[13,32]。因此,接下来工作的重点是获得 *BmHsp19.5* 较纯蛋白,进一步明确蛋白的功能,并探究其作用机理。

参考文献:

- [1] FIELENBACH N, ANTEBI A C. *Elegans* Dauer Formation and the Molecular Basis of Plasticity [J]. *Genes & Development*, 2008, 22(16): 2149-2165.
- [2] ZHANG X S, WANG T, LIN X W, et al. Reactive Oxygen Species Extend Insect Life Span Using Components of the Insulin-Signaling Pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(37): 7832-7840.
- [3] PODRABSKY J E, HAND S C. Physiological Strategies During Animal Diapause: Lessons from Brine Shrimp and Annual Killifish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2015, 218(12): 1897-1906.
- [4] LAIRD M K, HEARN C M, SHAW G, et al. Uterine Morphology During Diapause and Early Pregnancy in the Tamar Wallaby (*Macropus Eugenii*) [J]. *Journal of Anatomy*, 2016, 229(3): 459-472.
- [5] 许瑾,邵云华,黄静怡,等.家蚕己糖激酶基因进化分析及其多转录本在胚胎早期发育过程中的表达特性 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(6): 1701-1708.
- [6] MORITA A, NIIMI T, YAMASHITA O. Physiological Differentiation of Dh-PBAN-Producing Neurosecretory Cells in the Silkworm Embryo [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49(10): 1093-1102.
- [7] 孟刚,司马杨虎,赵林川.二化性家蚕滞育过程中谷胱甘肽 s-转移酶活性的变化 [J]. *蚕业科学*, 2010, 36(1): 170-174.
- [8] XU Y, ZHENG G, DONG S, et al. Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of *Hsp60*, *Hsp70* and *Hsp90* in the Golden Apple Snail, *Pomacea Canaliculata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 643-653.
- [9] KIM K K, KIM R, KIM S H. Crystal Structure of a Small Heat-Shock Protein [J]. *Nature*, 1998, 394: 595-599.
- [10] RITOSSA F. A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and Dnp in *Drosophila* [J]. *Experientia*, 1962, 18(12): 571-573.
- [11] KING A M, MACRAE T H. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause [J]. *Annual Review of Entomology*, 2015, 60(1): 59-75.

- [12] CHENG W, LI D, WANG Y, et al. Cloning of Heat Shock Protein Genes (Hsp70, Hsc70 and Hsp90) and Their Expression in Response to Larval Diapause and Thermal Stress in the Wheat Blossom Midge, *Sitodiplosis Mosellana* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016, 62(1): 66-77.
- [13] GKOUVITSAS T, KONTOGIANNATOS D, KOURTI A. Cognate Hsp70 Gene is Induced During Deep Larval Diapause in the Moth *Sesamia Nonagrioides* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2009, 18(2): 253-264.
- [14] SHIN-ICHIRO T, HIDEHARU N, G G S. Gene Expression of Heat-Shock Proteins (Hsp23, Hsp70 and Hsp90) During and after Larval Diapause in the Blow Fly *Lucilia Sericata* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(6): 641-647.
- [15] FAN L, LIN J, ZHONG Y, et al. Shotgun Proteomic Analysis on the Diapause and Non-Diapause Eggs of Domesticated Silkworm *Bombyx Mori* [J]. *Plos One*, 2013, 8(4): e60386.
- [16] LI Z W, XUE L, YU Q Y, et al. The Small Heat Shock Protein (Shsp) Genes in the Silkworm, *Bombyx Mori*, and Comparative Analysis with Other Insect Shsp Genes [J/OL]. *BMC Evolutionary Biology*, (2009-08-28) [2021-04-18]. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-215>.
- [17] GONG J, TIAN S, ZHOU X, et al. Transcriptional Response of Silkworm (*Bombyx Mori*) Eggs to O₂ or Hcl Treatment [J/OL]. *Int J Mol Sci*, (2016-12-07) [2021-05-21]. <https://doi.org/10.3390/ijms17121838>.
- [18] MIYA K. The Early Embryonic Development of *Bombyx Mori*: An Ultrastructural Point of View [M]. Kanagawa: Gendaitosho, 2003.
- [19] YAGINUMA T, YAMASHITA O. Oxygen Consumption in Relation to Sorbitol Utilization at the Termination of Diapause in Eggs of the Silkworm, *Bombyx Mori* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1999, 45(6): 621-627.
- [20] GONG J, ZHANG Y, YAN J, et al. Effect of Hypoxia on Embryo Development in Silkworm Eggs [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2020, 113: 55-61.
- [21] LU M X, HUA J, CUI Y D, et al. Five Small Heat Shock Protein Genes from *Chiol Suppressalis*: Characteristics of Gene, Genomic Organization, Structural Analysis, and Transcription Profiles [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2014, 19(1): 91-104.
- [22] SAKANO D, LI B, XIA Q, et al. Genes Encoding Small Heat Shock Proteins of the Silkworm, *Bombyx Mori* [J]. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(10): 2443-2450.
- [23] RINEHART J P, LI A, YOCUM G D, et al. Up-Regulation of Heat Shock Proteins is Essential for Cold Survival During Insect Diapause [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(27): 11130-11137.
- [24] QUAN G, DUAN J, FICK W, et al. Expression Profiles of 14 Small Heat Shock Protein (Shsp) Transcripts During Larval Diapause and Under Thermal Stress in the Spruce Budworm, *Choristoneura Fumiferana* (L.) [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2018, 23: 1247-1256.
- [25] ARRIGO A P. Human Small Heat Shock Proteins: Protein Interactomes of Homo- and Hetero-Oligomeric Complexes: An Update [J]. *FEBS Letters*, 2013, 587(13): 1959-1969.
- [26] EMAN, BASHA, AND, et al. Small Heat Shock Proteins and A-Crystallins: Dynamic Proteins with Flexible Functions [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2012, 37(3): 106-117.
- [27] FENGLING S I, ZHENGBO H E, CHEN B. Cloning and Expression Profiling of Heat Shock Protein Dahsp23 Gene in the Winter and Summer Diapausepupae of the Onion Maggot, (Diptera: Anthomyiidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59(4): 402-410.
- [28] KING A M, MACRAE T H. The Small Heat Shock Protein P26 Aids Development of Encysting *Artemia* Embryos, Prevents Spontaneous Diapause Termination and Protects Against Stress [J]. *Plos One*, 2012, 7(8): e43723.
- [29] 黄君霆, 朱万民, 夏建国, 等. 中国蚕丝大全 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996.
- [30] HWANG J S, GO H J, GOO T W, et al. The Analysis of Differentially Expressed Novel Transcripts in Diapausing and Diapause-Activated Eggs of *Bombyx Mori* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, 59(4): 197-201.
- [31] SARAVANAKUMAR R, PONNUVEL K, QADRI S. Expression of Metabolic Enzyme Genes and Heat-Shock Protein Genes During Embryonic Development in Diapause and Non-Diapause Egg of Multivoltine Silkworm *Bombyx Mori* [J]. *Biologia*, 2008, 63(5): 737-744.
- [32] GKOUVITSAS T, KONTOGIANNATOS D, KOURTI A. Expression of the Hsp83 Gene in Response to Diapause and Thermal Stress in the Moth *Sesamia Nonagrioides* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 18(6): 759-768.