Vol. 47 No. 5

DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2025. 05. 007

廖睿,张柱林,童晓玲.家蚕腹肢表型修饰基因的筛选[J].西南大学学报(自然科学版),2025,47(5):74-89.

家蚕腹肢表型修饰基因的筛选

廖睿, 张柱林, 童晓玲

西南大学 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室,重庆 400715

摘要:昆虫的足在物种间显著分化,且完全变态昆虫幼虫和成虫的足往往存在形态和功能的差异。足的分化及 发育机制是进化发育生物学长期关注的热点问题,Hox 基因在调控昆虫体节及附肢发育方面具有重要作用,但 其调控附肢发育及特化的具体分子机制仍不清楚。家蚕 E 群是一个拟复等位基因群,由 Hox 突变引起,该群成 员超 30 个,其表型主要涉及足发育异常。以家蚕 E 群突变体 E^N、E^{Nk}、E^{Ca} 和 E^{Mc} 为研究对象,通过表型观察、 比较转录组分析、GO 富集分析、KEGG 通路分析、荧光定量 PCR 分析等筛查家蚕足发育及特化相关的重要基 因。结果发现:E^N 和 E^{Nk} 突变体在胚胎期均表现为腹节长有类似胸足的腹足;E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体在胚胎期均表 现为腹节不长足,且纯合体胚胎致死。比较 E^N、E^{Nk}、E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体胚胎转录组分析显示,其差异基因可划 分4 类。通过对4 组差异基因的筛选,可了解胸足和腹足分化的机制。

关 键 词:家蚕; Hox 基因;转录组测序; E 群突变体; 腹肢
 中图分类号: S881.2
 文献标志码: A
 文 章 编 号: 1673 - 9868(2025)05 - 0074 - 16



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening of Phenotypic Modifying Genes of Ventral Appendage of Silkworms, *Bombyx mori*

LIAO Rui, ZHANG Zhulin, TONG Xiaoling

State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Insect limbs are significantly differentiated among species, and morphology and function of limbs between larvae and adult in completely metamorphosed insects are generally different. The mechanisms of limb differentiation and development have been a hot issue in evolutionary developmental biology for a long time. Hox genes are crucial in governing the development of body segments and appendages in insects. However, the specific molecular mechanisms of how Hox, as a transcriptional regulator, regulates

收稿日期: 2023-04-06

基金项目:国家重点研发计划项目(2023 YFF1103801);国家自然科学基金重点项目(32330102,U20A2058);国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-18-ZJ0102,CARS-18-ZJ0103)。

作者简介:廖睿,硕士研究生,主要从事发育生物学研究。

通信作者: 童晓玲, 博士, 教授。

appendage development and specialization are still unclear. Cluster E of the silkworm, *Bombyx mori*, is a proposed complex allele cluster caused by Hox mutations, with more than 30 members, and its phenotype mainly involves limb developmental abnormalities. In this study, we used *B. mori* group E mutants, E^N , E^{Nk} , E^{Ca} , and E^{Mc} , to screen important genes related to limb development and specialization in *B. mori* by phenotypic observation, comparative transcriptome analysis, GO analysis, KEGG analysis, and fluorescence quantitative PCR analysis. The results showed that both E^N and E^{Nk} pure haplotypes showed ventral nodes with long ventral feet similar to thoracic feet at the embryonic stage, both E^{Ca} and E^{Mc} pure haplotypes were embryonic lethal. Comparative transcriptome analysis of E^N , E^{Nk} , E^{Ca} , and E^{Mc} mutant embryos showed that the differential genes could be classified into four groups, which were screened to understand the mechanism of thoracic and ventral Legs differentiation.

Key words: silkworm; Hox gene; transcriptome sequencing; E mutants; ventral appendage

昆虫在适应生存环境的过程中,进化出了多种不同类型的附肢^[1],这些附肢的多样性最显著地体现 在数量、形态和位置上,如头部体节分化成的口器、胸部体节分化成的翅膀和足以及腹部体节分化成的 外生殖器等。对于完全变态的昆虫而言,其幼虫阶段的足可分为3种基本类型:① 多足型,特点在于其 胸部有3对胸足,同时腹部可以附着1至多对腹足;② 寡足型,仅具有3对胸足,腹部不具备任何足; ③ 无足型,幼虫的每个体节均没有足的结构。

从分子发育生物学的视角分析,昆虫附肢在数量、形态及位置上的差异所受的遗传调控机制主要源于 进化过程中基因调控网络动态变化及功能分化。附肢的演化涉及多个基因表达网络通过层级调控的相互作 用。Hox 基因家族是一个重要的发育调控基因群,最早在果蝇中被发现^[2],负责控制昆虫躯体的模式发 育,其排列顺序决定了躯体不同体节的特征^[3-4]。Hox 基因对昆虫附肢的发育起着关键的调控作用,尤其 是在附肢的发育部位和形态特征方面^[5-7]。在不同昆虫物种中,Hox 基因功能的分化被认为是导致各种附 肢类型产生的重要原因^[3-9]。作为转录调控因子,Hox 基因需通过精确控制不同下游靶基因的表达来调节 各类附肢的发育,因此鉴定和解析附肢发育中 Hox 基因的下游靶基因,对于理解昆虫附肢的分化具有重 要的学术价值。家蚕作为鳞翅目昆虫,拥有丰富的遗传突变资源^[10-12]。在西南大学家蚕遗传资源基因库中, 有一类 E 群突变体,其特征是附肢的数量异常,表现为过多或缺失^[13-15],其中 E^N 和 E^{Ne} 突变体胚胎的腹 足与胸足类似,而 E^{Ca} 和 E^{Me} 突变体胚胎在腹部节段为腹足,相比之下野生型 Dazao 胚胎在腹部节段有 4 对正常腹足,同时这 4 种突变体胚胎均有 3 对正常的胸足位于胸部节段,而在腹部相同体节表现出不同 的附肢形态:①腹部有正常的 4 对腹足;②腹部有类似胸足的足;③腹部无足。利用 E 群突变体的形态学 表型差异及差异基因表达谱,分析 Hox 基因及其下游靶基因调控家蚕附肢发育和特化的机制^[16-20],可以解 析家蚕附肢发育与形态特化的分子调控网络。

本研究以野生型 Dazao 的 *E^N、E^{Nk}、E^{Ca}*和*E^{Mc}*发育腹肢突起出现期的胚胎为实验材料进行转录组测 序,通过比较转录组数据,筛选出参与家蚕附肢发育及负责胸足和腹足特化的重要相关基因。本研究不仅 在分子水平上揭示了家蚕胸足与腹足表型的发育分化机制,更为解析昆虫附肢形态多样性的 *Hox* 基因调 控网络提供了关键的实验依据,为阐明昆虫附肢发育可塑性及其演化发育机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 家蚕胚胎解剖取材、RNA 提取和 qRT-PCR

家蚕 E^N、E^{Nk}、E^{Ca}、E^{Mc}突变体及野生型 Dazao 均来自于西南大学家蚕遗传资源基因库,在温度

25 °C、相对湿度 75%、12 h 光照 12 h 黑暗条件下饲养。

将手术刀片、解剖针、玻璃培养皿用 0.1% DEPC 水完全浸泡 12 h 去除 RNA 酶,锡箔纸包裹后于 160 ℃烘箱中高温灭菌 4~6 h。准备一次性无 RNA 酶的研磨棒、1.5 mL 离心管及均浆器备用。将发育至 腹肢突起期的家蚕野生型 Dazao 的 E^N、E^{Nt}、E^{Ca}、E^{Mc} 突变体胚胎自 25 ℃培养箱中转移至操作台,使用 灭菌刀片在蚕卵侧面切开小口,将其浸入盛有 1×PBS 缓冲液的玻璃培养皿中,于显微镜下用解剖针从开 口卵壳中轻柔分离出胚胎,清除附着浆膜及卵黄残留物,用刀片切取胚胎腹部环节,使用 1 mL 移液枪将 所取组织移到 1.5 mL RNase-Free 管中,每管包含 20~30 个胚胎的组织样,取 3 管做生物学重复,用液氮 速冻,保存在-80 ℃冰箱中备用。

材料准备结束后立即用 Omega 公司的 MicroElute[®] Total RNA Kit 进行 RNA 提取。液氮研钵研磨, 粉末混合 TRK lysis Buffer 裂解液和 β-巯基乙醇,静置,离心,上清混合等体积 75%乙醇,转移至离心柱, 静置,离心,弃废液;依次用 HiBind Buffer 洗脱 1 遍,离心,RNA washing Buffer 洗脱离心 2 遍,空离, 晾干,加水静置离心。检测浓度后用 Takara 公司生产的 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)进行反转录得到 cDNA,检测浓度后稀释 5 倍于-80 ℃冰箱中保存备用。

根据基因的 cDNA 序列在 NCBI 上设计定量引物, BLAST 对比其特异性。根据选择的定量引物,送擎 科生物公司进行合成。进行实时荧光定量检测,检测体系: 10 μ L 2×NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix, 0.2 μ L 正向引物, 0.2 μ L 反向引物, 1~2 μ L Template,用 RNase Free H₂O 补足至 20 μ L。将上述混合液 按每个样品 3 个技术重复,分装至 96 孔 PCR 板中。离心后于荧光定量 PCR 仪中进行检测,步骤如下: 95 ℃ 1 min; 95 ℃ 20 s, 60 ℃ 1 min 采集荧光, 40 个循环。

1.2 RNA-seq 文库构建及测序

RNA-seq 文库在北京诺禾致源完成, 通过磁珠富集 mRNA, 使用 fragmentation buffer 断裂 mRNA, 采用随机六碱基引物合成一链 cDNA, 再通过 dNTPs 和 DNA 聚合酶合成双链 cDNA。纯化后进行末端 修复、加 A 尾、连接测序接头,并选择特定大小的片段。使用 PCR 扩增构建 cDNA 文库, 经过 Qubit 2.0 定量、Agilent 2100 评估片段大小, Q-PCR 精确量化,确保浓度大于 2 nmol/L。Illumina 测序后,使用 Trinity 拼接数据,采用 Corset 和 BUSCO 评估质量。基于 nr、KOG/COG、Swiss Prot、KO、GO 数据库 进行注释, E 值小于 10^{-5} 。计算基因表达水平,利用 DESeq 或 TMM 标准化 readcount 数据,使用 Benjamini-hochberg 方法调整 p 值。当 p < 0.05 且 log2 FC 大于 1 时,认定为差异表达基因,进行 GO 和 KEGG 功能富集分析,筛选与附肢发育和腹肢特化相关的基因。

1.3 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑

1.3.1 sgRNA 合成

① 针对特异 SV 利用网站 CRISPRdirect(http://crispr.dbcls.jp/)设计特异性较高的 gRNA 靶点。 ② 引物合成在擎科生物公司进行。③ PCR 反应使用高保真 PCR 酶(GXL 酶),反应体系: 10 μ L 5×GXL buffer, 4 μ L dNTP, 3 μ L 上游引物, 3 μ L 下游引物, 1 μ L GXL 酶, 29 μ L ddH₂O。④ DNA 纯化回收并检 测。⑤ sgRNA 的体外转录使用 T7 体外转录试剂盒。反应体系: 10 μ L T7 buffer, 0.75 μ L dNTP, 4 μ L DNA 模板, 1 μ L T7 酶。加好上述试剂并在涡旋仪上混匀后离心,在 PCR 仪中设置 37 ℃、12 h 的程序 进行反应。⑥ 去除 DNA 模板:按照反应产物与 DNase 比例为 20:1 加入,在 37 ℃条件下孵育 1 h。 ⑦ 纯化体外转录产物:按照 30:1 配制无水乙醇和醋酸钠混合液 1 mL,将回收产物加入混合液中, 颠倒混匀后,在-20 ℃条件下沉淀 1 h; 4 ℃条件下 14 500 r/min 离心 10 min,弃掉上清;用 75%酒 精洗涤,14 500 r/min 离心 10 min,弃掉上清;14 000 r/min 空离 2 min,吸去液体,倒置离心管,以 晾干酒精;待酒精挥发干净后,加入 20 μ L DEPC 水放入 4 ℃冰箱中过夜溶解,待溶解完全后取 1 μ L 进行浓度测定,标记好浓度后放置-80 ℃冰箱中保存。 1.3.2 显微注射

① 将合成的 sgRNA 和 Cas9 蛋白混匀成 10 µL 的混合液, 1 µL sgRNA1, 1 µL sgRNA2, 1 µL Cas9, 用 RNase-free H₂O 补足至 10 µL,将混合液放置在 PCR 仪上, 37 ℃孵育 15 min。② 蚕卵制备:将已经交 配 6 h 的 15 ℃催青的野生型 Dazao 蛾子拆对,将雌蛾放置在蚕卵纸上产卵,把握好产卵时间,在 3 h 内显 微注射完成。③ 蚕卵消毒:把载玻片放在无水乙醇中浸泡,在火焰上灼烧消毒,之后用浆糊将刚产下的蚕 卵粘在载玻片上。④ 蚕卵显微注射:用拉针器拉毛细玻璃针,将在 PCR 仪中孵育好的混合液转移到玻璃 针中,使用显微注射仪将其注射到蚕卵中。⑤ 蚕卵封口:取适量的胶水封住注射后蚕卵上的针孔。⑥ 蚕卵 的催青:将注射后的蚕卵置于恒温恒湿培养箱内(温度 25 ℃、湿度 70%~80%)进行催青,期间维持湿度条 件以避免胚胎脱水并定期通风,确保卵壳表面干燥,抑制霉菌滋生。

1.3.3 编辑效果检测及表型观察

① 用流水清洗配制胶专用玻璃板,并用无水乙醇擦拭玻璃板(防止有杂质存在),清洗好后按照 特定顺序组装玻璃板,待组装好后下层用琼脂糖胶封住,30 min 后待琼脂糖凝固。② Surveror 丙烯酰 胺胶的配制,按配方配制胶浓度为 8%的胶块:4.55 mL 5×TBE,2.67 mL Acr Bis(30%),625 µL 80%甘油,150 µL 10% APS(现配),10 µL TEMED,4.55 mL ddH₂O。③ 待配制胶凝固后,对 PCR 的目的产物进行上样,对有缺失的目的片段对应的 PCR 产物进行测序,筛选被编辑后该基因功能丧 失的蛾子(G₀代)进行交配,并对其进行表型观察,继续饲养几代筛选纯合体。

2 结果与分析

2.1 家蚕野生型 Dazao 及 E^N、E^{Nk}、E^{Ca}、E^{Mc} 突变体表型观察及取材

由图 1 可知,在野生型 Dazao 胚胎中,胸部 T1-T3 体节稳定发育有 3 对胸足,腹部 A3-A6 体节则形成 4 对形态特化的腹足,两类附肢在结构上呈现出显著差异。 E^{N} 、 E^{Nk} 、 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体的纯合胚胎均表现 出致死表型,且腹部附肢发育异常,其中 E^{N} 和 E^{Nk} 突变体在腹节异位产生与胸足同源的附肢,而 E^{Ca} 与 E^{Mc} 突变体则完全丧失腹足分化的能力。值得注意的是,所有突变体的胸节均维持正常胸足发育模式,3 对 胸足的形成未受明显影响。





b. E^N突变体

c. E™突变体

d. E^{ca}突变体

e. E^{Mc}突变体

图 1 家蚕野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 、 E^{Ca} 、 E^{Mc} 突变体发育 7 d 的胚胎表型

在家蚕胚胎发育的早期阶段,附肢原基已启动形态建成。对野生型 Dazao 和 *E^N、E^{Nk}、E^{Ca}、E^{Mc}*突变体的胚胎进行解剖观察,发现在胚胎催青至腹肢突起出现的这一重要时刻,野生型 Dazao 与突变体胚胎在腹足的发育上存在明显差异。这一时期被认为是腹足发育的关键阶段,因此该时期的家蚕胚胎可用于筛选 附肢的表型修饰基因(图 2)。

2.2 转录组数据统计与评估

利用突变体在腹肢突起出现期的胚胎腹部区域进行 RNA-seq 分析,成功获得了多个转录组数据(表 1)。 5 个样品获得的原始序列经质控后获得的有效序列,过滤后碱基数量为 0.58~0.75 GB,容错率为 0.01%, Q20 和 Q30 的值分别在 98%和 95%以上,GC 碱基量均超过 41.00%,对 Clean reads 进行基因组比对分 析,其中 89.1%~92.9% reads 被比对到家蚕参考基因组上,共获得 14 622 个 Unigenes,表明测序结果良



a. 野生型Dazao

b. E^N突变体

c. E[™]突变体

d. E^{Ca}突变体

e. E^{Mc}突变体

红色虚线代表从腹部 A1 环节截断。

图 2 家蚕野生型 Dazao 与 E^{N} 、 E^{Nk} 、 E^{Ca} 、 E^{Mc} 突变体发育腹肢突起出现期的胚胎表型

			武甘粉旱 /	家雄萝/	020/	020/	CC 碱甘旱 /
品系	Raw reads	Clean reads	岘	谷阳平/	Q207	Q 30/	GC 顺埜里/
			Gb	⁰∕₀	0⁄0	%	%
<i>E</i> ^{Nk} 突变体	151 198 16	150 823 07	0.75	0.01	98.75	95.94	41.73
E^N 突变体	117 228 99	116 928 39	0.58	0.01	98.78	96.06	41.88
E ^{Ca} 突变体	120 303 08	119 893 20	0.60	0.01	98.74	95.95	42.37
<i>E^{Mc}</i> 突变体	122 267 69	122 070 78	0.61	0.01	98.72	95.93	42.98
野生型 Dazao	125 074 30	124 561 72	0.62	0.01	98.79	96.10	42.98

表1 样品测序数据质量分析

注: Q20 和 Q30 分别代表 Phred 值大于 20 和 30 的碱基占总体碱基的百分比。

为了分析每个样本的基因表达水平(RPKM,以 R_{PKM}表示),我们统计了 5 个品系不同表达水平的基因数量(表 2)以及单个基因的表达水平(图 3a)。定量分析显示,5 个品系中约 70%的基因呈现出正常表达水平(R_{PKM}>1),其中约 15%的基因达到高表达水平(R_{PKM}>60),揭示这些基因在 5 个品系间存在保守的高表达特征。

RPKM	E [№] 突变体	E^N 突变体	E ^{Ca} 突变体	E ^{Mc} 突变体	野生型 Dazao
$0 \leq R_{PKM} \leq 1$	3 888(26.59%)	3 938(26.93%)	3 739(25.57%)	3 551(24.29%)	4 099(28.03%)
$1 \leq R_{\rm PKM} \leq 3$	1 136(7.77%)	1 169(7.99%)	1 224(8.37%)	1 095(7.49%)	1 184(8.10%)
$3 \leq R_{\text{PKM}} \leq 15$	3 121(21.34%)	3 222(22.04%)	3 402(23.27%)	3 464(23.69%)	2 925(20.00%)
$15 < R_{\rm PKM} \le 60$	3 980(27.22%)	3 880(26.54%)	4 042(27.64%)	4 325(29.58%)	3 778(25.84%)
$R_{\rm PKM} > 60$	2 497(17.08%)	2 413(16.50%)	2 215(15.15%)	2 187(14.96%)	2 636(18.03%)

表 2 5 个品系转录水平的分布

注: RPKM 表示每百万 reads 中来自某一基因每千碱基长度的 reads 数目; 括号内是基因数目与总基因数目的比率。

为了验证该转录组测序数据筛选到的差异表达基因,随机选取 5 个差异表达基因进行荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析(图 3b),结果表明这些基因的相对表达量与 RPKM 值变化趋势基本一致,表明该转录组 测序结果可靠。

2.3 差异表达基因分析

基于各样本的差异基因 RPKM 值进行层次聚类分析,不同颜色区域代表不同的基因聚类组,显示了同 组基因表达模式的相似性,暗示这些基因可能具有相似的功能或参与了相同的生物学过程。根据层次聚类 图中差异表达基因的分布模式(图 4)显示,这些基因可被归为 4 类:第1类基因在长腹足的野生型 Dazao 和 *E^N、E^{Nk}* 突变体中呈现上调表达,而在不长腹足的 *E^{Ca}* 和 *E^{Mc}* 突变体中下调,推测这些基因可能与家蚕





红色代表野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体相对于 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体上调;绿色代表野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体相对于 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体下调;橙色代表野生型 Dazao 相对于 E^N 、 E^{Nk} 、 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体上调;蓝色代表 E^N 、 E^{Nk} 突变体相对于野生型 Dazao 和 E^{Ca} 、 E^{Mc} 突变体上调。

图 4 野生型 Dazao 和 E^{N} 、 E^{Nk} 、 E^{Ca} 、 E^{Mc} 突变体差异表达基因的层次聚类图

腹足的形成与发育相关。第2类基因在野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nk} 突变体中下调,而在 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体中 上调,表明它们可能参与了家蚕足发育过程中的负调控机制。这两类基因的表达差异在两个不长足的突变 体中尤其明显。第3类基因在 E^N 和 E^{Nk} 中相比于野生型 Dazao 和 E^{Ca}、E^{Mc} 突变体显著上调,提示它们可 能在胸足的特化过程中发挥着重要作用。第4类基因在野生型 Dazao 中的表达量相对于其他品系明显上 调, 推测其可能是家蚕腹足发育调控的特异性基因。聚类分析不仅揭示了这些基因的表达特征与家蚕足发育的潜在关联, 还为进一步研究基因功能及其在家蚕足分化中的具体作用提供了线索。

2.3.1 家蚕足发育相关基因的筛查

聚类分析结果显示,野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nk} 突变体与 E^{Ca}、E^{Mc} 突变体的差异基因分别在不同组别 聚集。韦恩图分析进一步表明,与 E^{Ca}和E^{Mc} 突变体相比,野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nk} 突变体中分别有 289、 133 和 137 个基因呈上调表达,其中有 32 个基因在这 3 个品系中共同上调,推测这 32 个基因可能与家蚕 腹足的发育过程相关(图 5a)。此外,与 E^{Ca}和E^{Mc} 突变体相比,野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nk} 突变体中分别有 765、573 和 585 个基因呈下调表达,共有 360 个基因在 3 个品系中均下调,推测这些基因可能与家蚕腹部 长足的形成和功能相关(图 5b)。综合表明,这些差异基因的表达特征提示它们可能在家蚕特定足部结构的 发育过程中发挥着重要作用。



a. 野生型Dazao和E^W、E^{NA}突变体上调表达的差异基因 相比于E^{Ca}和E^{Ma}突变体,1代表野生型Dazao、2代表 E^N突变体、3代表E^{NA}突变体中上调的基因数.



b. 野生型Dazao和E^N、E^{NA}突变体下调表达的差异基因

相比于*E^{Ca}和E^{Ma}*突变体,1代表野生型Dazao、2代表 *E^{Ni}*突变体、3代表*E^{Ma}*突变体中下调的基因数.

图 5 野生型 Dazao 和 E^{N} 、 E^{Nk} 突变体相比于 E^{Ca} 、 E^{Mc} 突变体的差异基因韦恩图

通过对差异表达基因进行 GO 富集分析(图 6),结果表明,在生物过程类别中,无论是上调基因还 是下调基因,都明显富集于代谢过程这一类。值得注意的是,生物黏附(biological adhesion)、细胞成分的 组织或生物发生(cellular component organization or biogenesis)、多生物过程(multi-organism process)、信 号传导(signaling)、多细胞生物过程(multicellular organismal process)、运动(locomotion)、发育过程 (developmental process)、繁殖(reproduction)这些类别仅在上调基因中得到富集,暗示这些生物过程在家 蚕足发育的正向调控中可能具有重要的作用。相对而言,免疫系统过程(immune system process)和节律 过程(rhythmic process)只在下调基因中富集,表明这些生物过程可能与家蚕足发育的负向调控或其他生 物学功能相关。在细胞组成类别中,上调基因主要集中在膜外区域(extracallular region part),下调基因 主要富集在膜(membrane part)。在分子功能类别中,可以观察到催化活性(catalytic activity)、蛋白质结 合(binding)是上调与下调基因所主要富集的功能类型。这些功能富集结果进一步揭示了家蚕足发育的 复杂调控机制,即上调基因富集在多个与发育和细胞组织相关的生物过程中,强调这些基因在家蚕足发 育中潜在的关键角色,而下调基因则更多涉及免疫和节律过程,代表不同的生理调节机制。此外,这些 差异基因在膜外和膜中的富集分布,提示它们可能参与了细胞间信号传递、细胞外基质重塑及膜受体功 能的调控等^[21]。

利用 KEGG 数据库进行差异表达基因的通路富集分析,共得到 103 条通路,选取富集最显著的 33 条 通路进行分析(图 7)。在生物学过程类别中,我们观察到野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nk} 突变体在细胞分裂和细



图 6 野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体相比于 E^{Ca} 、 E^{Mc} 突变体的差异基因 GO 富集分析

胞周期调控方面有一系列基因呈现出显著上调,暗示这些过程在发育早期阶段可能特别活跃。此外,信号 传导和细胞应答等过程也表现出基因表达的显著上调,反映了发育过程中细胞对内外环境变化的敏感性和 响应性。在细胞组成方面,细胞核和细胞膜相关基因的表达模式显著变化,表明了细胞在发育过程中可能 会重塑其结构以适应不断变化的功能需求。对于分子功能而言,观察到转录调控因子和酶活性相关基因的 表达变化,这些变化可能对调控发育过程的基因表达网络至关重要。

结果表明,寿命调节途径、内质网中的蛋白处理、泛酸和辅酶A生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、 β-丙氨酸代谢、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号途径和蛋白激酶AMP活化的蛋白激酶 (AMPK)信号途径都显示出显著的富集。这暗示了在特定条件下,这些代谢途径可能起着重要的调控作 用,如 PPAR信号途径的富集可能与脂质代谢和能量平衡有关,而AMPK信号途径的富集通常与细胞能 量应答相关。值得注意的是,代谢途径富集分析常常可以指出疾病状态或生物应答的关键调节点,如咖啡 因代谢的富集可能与摄入咖啡因后的生物效应有关,Circadian rhythm-fly途径的富集则可能揭示了生物钟 对生物代谢的影响。

将筛选出的差异基因进行功能注释,我们发现在 32 个上调基因中,有 3 个热激蛋白、5 个酶类、 6 个激素生长类蛋白、2 个疾病相关蛋白,剩下的是未知功能蛋白,其中有 3 个与附肢发育相关的基因: BGIBMGA012898、BGIBMGA008257、BGIBMGA011483,可作为我们后续研究的目标基因。 2.3.2 家蚕胸足特化相关基因筛查

通过分析韦恩图,在 E^N 和 E^{Nk} 突变体中,相较于野生型 Dazao 和 E^{Ca}、E^{Mc} 突变体,分别有 102、91 和 236 个基因上调,有 8 个共同上调的基因(图 8)。对这 8 个共同上调表达的基因进行功能注释后,发现除



b. 在野生型Dazao和E^N、E^{NA}突变体中下调的基因富集通路



基因 BGIBMGA001605 和 BGIBMGA003836 被注释为"No hits"外,其余与组织发育、表皮蛋白和转录 因子有关,如 Meis1 同源盒蛋白基因(BGIBMGA004885)、转录因子 Sp9 基因(BGIBMGA006943)、水 通道蛋白基因(BGIBMGA007757)、TFIID 转录起始复合体基因(BGIBMGA009793)、类黏蛋白基因 (BGIBMGA011453)等。

视动盲蛋白样(Optomotor-blind protein-like)基因(Omb 基因)表达广泛用于果蝇(Drosophila)以及其 他模式生物的研究中,Omb 基因与成体和胚胎的发育相关,尤其是在神经系统和翅膀的形成中发挥着重要 作用。在家蚕的翅膀或腹足等结构发育过程中,该基因的表达调控可能对特定组织的形成和分化显著相 关。该基因属于 T-box 转录因子家族,能够调控下游基因的表达,参与发育、形态形成和细胞分化等生物 过程。紊乱型形态发生相关激活因子(Disheveled-associated activator of morphogenesis, DAAM1)是一种

第5期

与形态发生相关的蛋白质,参与细胞骨架调控、细胞形态和 运动等关键发育过程。DAAM1 是 Wnt/PCP(平面细胞极 性)信号通路中的重要成员,特别是在非典型 Wnt 信号通路 中,调节细胞骨架的重塑和细胞迁移。同源框蛋白 (Homeobox protein) Meis1 是一类包含同源盒的转录因子, 在胚胎发育、细胞分化和调控多个基因表达中发挥着重要 作用。Meis1 基因在人类和其他动物的许多发育过程中均具 有关键作用,特别是在造血、神经发育和肢体形成方面。转 录因子(Transcription factor) Sp9-like 是锌指蛋白家族的一 员,通常与细胞分化、器官发育和细胞周期调控等过程相 关。Sp9-like 蛋白属于 Sp 家族转录因子的一员, 与该家族 ^{1为相比于野生型 Dazao、2为相比于 E^{Ca} 突变体、3为相} 的其他成员一样,它能够特异性地识别并结合 DNA 上的特 定序列,进而调节与之相关的下游基因的转录活性。在家蚕 的肢体形成过程中, Sp9-like 转录因子调控肢芽区域细胞的 增殖和分化,帮助组织正确形成并维持肢体形态(表 3)。



http://xbbjb. swu. edu. cn

比于 E^{Mc} 突变体, 在 E^N 和 E^{Nk} 突变体中上调的基因数。

图 8 E^{N} 和 E^{Nk} 突变体相比野生型 Dazao 和 E^{Ca}、E^{Mc} 突变体上调表达的差异基因韦恩图

基因 ID	预测功能	基因表达情况
BGIBMGA 012898	视动盲蛋白样(结构域)	在野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 011483	Notum 蛋白	在野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 011701	紊乱型形态发生相关激活因子	在野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体中低表达
BGIBMGA 004885	同源框蛋白 Meis1	在 E ^N 和 E ^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 006943	转录因子 Sp9-like	在 E ^N 和 E ^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 007757	水通道蛋白	在 E ^N 和 E ^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 009793	转录起始因子(TFIID-12)	在 E ^N 和 E ^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 011453	mucin-5AC-like	在 E ^N 和 E ^{Nk} 突变体中高表达
BGIBMGA 006388	Abdominal-A 同源蛋白	在野生型 Dazao 中高表达

表 3 差异基因功能注释

2.3.3 家蚕腹足发育相关基因筛查

与 E^N、 E^{Nk}、 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体进行比较后, 野生型 Dazao 共筛选出 81 个共同上调的差异基因(图 9a)。 通过基因 GO 富集分析,这些差异基因被归类为生物过程、细胞组成和分子功能 3 个类别。结果显示,代 谢过程、膜结构及结合相关基因显著富集,提示其可能在家蚕腹足发育中具有关键作用(图 9b)。基于 KEGG 通路富集分析, 筛选到 4 条显著富集通路: 脂肪酸代谢、脂肪酸生物合成、AMPK 信号通路和胰岛 素信号通路,上述通路均与能量代谢调控密切相关,进一步证实其在腹足发育中的核心作用(图 9c)。

对这些差异基因进行进一步的功能注释,发现基因 BGIBMGA006388 被注释为 Abdominal-A 同源 蛋白(abdominal A isoform 3 homeobox protein),该基因在家蚕腹部发育中发挥着关键作用,揭示了其在 形态形成中的潜在影响。结果表明,代谢相关基因和信号通路在家蚕腹足的发育过程中可能具有重要的 调控作用,代谢过程的显著富集提示了代谢活动在足部形成中的重要性,而 AMPK 和胰岛素信号通路 的富集进一步支持了能量代谢在该过程中的关键地位。未来的研究应关注这些差异基因的具体调控机 制及其与已知发育通路的交互作用, 尤其是 BGIBMGA006388 的功能验证, 以揭示其在家蚕形态发育 中的精确角色。



¹为相比于E[™]突变体、2为相比于E[™]突中变体、3为相比于E[™]突变体, 在野生型Dazao中上调的基因数。



a. 差异基因韦恩图

图 9 野生型 Dazao 中相比 E^N、E^{Nk}、E^{Ca}和 E^{Mc}突变体中上调表达的差异基因

c. 差异基因KEGG通路分析

2.4 差异表达基因的功能验证

2.4.1 Bm-Sp9 的生物信息学分析

通过同源序列比对分析, Bm-Sp9 与果蝇 Dm-Sp1 的氨基酸序列相似性达 61%。从蛋白结构来看, 两个蛋白 N 末端存在由 13 个氨基酸组成的 Sp-box 基序, 而锌指结构域上游则包含 10 个氨基酸构成的 Btd-box 基序(图 10)。尽管这些基序的功能尚未完全明确, 但推测 Sp-box 可能作为抑制因子结合位点, 而 Btd-box 或参与了反激活。值得注意的是, 除锌指结构域外, Sp-box 与 Btd-box 在果蝇和家蚕 Sp 蛋白 中均表现出高度序列保守性。基于上述保守特征与序列相似性, 我们提出 Bm-Sp9 与 Dm-Sp1 可能为功 能同源基因。



图 10 家蚕 Bm-Sp9 基因和果蝇 Dm-Sp1 基因蛋白序列同源性比对

为了进一步了解 Bm-Sp9 基因的序列信息,我们从 NCBI 上调取该基因的 mRNA 序列进行分析。通过 分析发现,该基因的 mRNA 全长为 2 766 bp,其中编码功能域的 CDS 序列长度为 1 218 bp(图 11)。 2.4.2 Bm-Sp9 基因表达模式分析

为了进一步探究这些腹肢发育突变体与 Bm-Sp9 基因表达之间的关系,我们通过荧光定量 PCR 技术 检测了 Bm-Sp9 基因在野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nk}、E^{Ca}、E^{Me} 突变体胚胎发育第 5 d 时的表达量。结果显 示,在胚胎附肢发育的关键时期, Bm-Sp9 在 E^{Nk} 突变体中表现出显著的上调(图 12)。这表明 Bm-Sp9 基 因的表达可能在家蚕胸足的发育过程中起着重要作用,我们推测其参与了胸足形态的形成或功能的调节。 2.4.3 Bm-Sp9 基因的功能验证

为了进一步确认该基因对突变体 E^{Nk} 胸足发育的影响,利用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术在 E^{Nk} 突变体中对 Bm-Sp9 基因进行敲除。

首先,利用突变体 E[№] 的基因组序列设计 2 个敲除靶位点 sgRNA1、sgRNA2(图 13a);随后,将体外转录的 2 个 sgRNA 产物与 Cas9 蛋白均匀混合后,37 ℃孵育获得 Cas9 RNP,注射于刚产下的 E[№] 突变体 蚕卵中。由于突变体 E[№] 纯合致死现象,在注射的蚕卵中一共孵化了 64 头,G₀ 代幼虫未发现附肢异常的 个体,饲养至出蛾,剪取蛾子的部分翅膀进行基因组提取,并根据 sgRNA 位点设计出合适的检测引物检测 基因的编辑效果。结果显示:存在 1 种不同形式的序列突变类型,为缺失 37 bp(*Bm-Sp9*^{Δ37 bp}),将其自交 至纯合,观察其表型变化(图 13b)。纯合体表型回复为 T1-T3 有 3 对胸足、A4-A6 有 3 对腹足,与野生型





红色表示 Bm-Sp9 的 CDS 区域

图 11 家蚕 Sp9 基因 mRNA 序列结构

Dazao 表型一致。图 13c 为 E^{Nk} 突变体和自交至纯 合后的蛾圈。值得注意的是,纯合体 $Bm-Sp9^{\Delta 37}$ bp 的 A3 环节处缺失 1 只腹足(图 13d)。

3 讨论

昆虫作为自然界中进化最为成功的生物类群 之一,其适应性优势与附肢的多样化演变密不可 分。尤为关键的是,胸部与腹部附肢通过形态和功 能的特化,形成了显著的空间分工,如在完全变态 昆虫的幼虫阶段,不仅胸足负责运动与抓握,其腹 部还发育出特化的腹足结构。这种形态与功能的 协同分化(如胸足呈现节段性关节,而腹足多具吸 盘或钩状末端)使昆虫能够针对取食、攀附、感知 等不同需求进行精准适应。本研究利用高通量转 录组测序技术^[22-24],揭示了 Hox 基因在家蚕腹足 表型修饰中的下游调控网络。研究选取了家蚕品 种野生型 Dazao 和 E^N、E^{Nt}、E^{Ca}、E^{Mc} 突变体, 在腹足突起发育阶段的胚胎腹部组织作为样本,



表达水平以 $x \pm s$ 表示,n=9; * * *表示 p < 0.001,差异有统计学意义; ns表示差异无统计学意义。

图 12 家蚕 Bm-Sp9 基因在 E^N 、 E^{Nk} 、 E^{Ca} 及 E^{Mc} 突变体中的表达水平

成功获取了 126.70 Gb 的高质量序列数据。基于获得的转录组数据,通过差异基因的聚类分析,将差异表达的基因分为 4 个主要类别:第1 类基因在野生型 Dazao 和 E^N 、 E^{Nk} 突变体中表现为上调(相较于 E^{Ca} 和



c. E™突变体和自交至纯合后的蛾圈

d. Bm-Sp9基因敲除纯合体表型

图 13 家蚕 Bm-Sp9 基因在突变体 E^{Nk} 中的敲除

 E^{Mc} 突变体)。第2类基因在野生型 Dazao 和 E^{N} 、 E^{Nk} 突变体中表现为下调(相较于 E^{Ca} 和 E^{Mc} 突变体), 这两类基因的表达模式可能与家蚕足的形成和发育过程紧密相关。第3类基因仅在 E^N 和 E^{Nk} 突变体中表 达上调, 推测与胸足特化功能相关。第4类基因在野生型 Dazao 中表达量高于其他4个品种, 可能参与了 腹足的发育过程。这一分析方法有效地展示了不同基因类别之间的交集和独特性,为后续的功能验证和分 子机制研究提供了重要线索。

通过 GO 富集、KEGG 通路分析及基因功能注释,初步筛选了可能参与调控家蚕腹足表型的关键基 因(表 3)。特别注意到, Omb 基因在野生型 Dazao 和 E^{N} 、 E^{Nt} 突变体中表现出显著上调, 其在果蝇中作 为 Dpp 基因的下游因子在肢体发育中起作用,推测家蚕的同源基因 BGIBMGA012898 可能参与了腿部 形态的形成^[25]。Hox 基因家族,作为编码含有同源结构域转录因子的一组基因,在动物胚胎的体轴建 立中发挥着核心作用^[26-27],与之相辅的 Meisl 基因,属于 TALE 超家族,是已知的多种发育过程中的关键 转录因子,在鸡和小鼠的肢体近端至远端轴(P-D)的发育中扮演着重要角色^[28]。Meis1的异位表达可引起 远端肢体结构向近端结构转化。在家蚕的附肢发育中, Meis 基因通过与其他基因相互作用调控附肢特异的 细胞分化和发育,如 Meis 基因与 Pbx 基因协同作用,共同参与调控下游目标基因的表达。在肢体生长过 程中不可或缺的 Sp 转录因子家族,在进化上表现出功能的保守性。研究证实,果蝇 Sp 家族成员 btd 与 Sp1 编码锌指转录因子,通过激活 hdc 及 Dll 基因,驱动腹侧成虫盘的形成与生长调控^[29]。RNA 干扰实 验显示,当 btd 与 Sp1 基因功能失活时,果蝇腿与触角尺寸显著缩小^[30],表明二者对附肢发育具有剂量依 赖性调控作用。值得注意的是, btd 在背侧成虫盘(如眼、翅及平衡棒)中的异位表达可诱导腹侧结构(触 角、腿)的异常生成,提示其具有组织特异性形态建成的指导能力。进一步比较分析发现,家蚕同源基因 BGIBMGA004885 与 BGIBMGA006943 在 E^{N} 、 E^{Nk} 突变体中呈现出显著上调的表达特征,暗示其可能通 过保守的调控机制参与了附肢的发育过程。Sp家族基因通过影响细胞的增殖和分化过程参与调控附肢的

形态建成。此外, Sp9 可能与 Hox 基因以及其他信号传导通路交互,共同决定附肢的最终形态,推测它们 在家蚕胸足发育和特化中起到了重要作用。研究显示, Hox 基因家族成员 abd-A 在节肢动物腹部附肢发 育中具有调控多样性^[31],在果蝇中,该基因通过下调 Dll 基因的转录活性,最终导致幼虫阶段腹足结构的 发育停滞^[32-33]。Dll 基因是调控附肢发育的另一个重要基因,它在许多动物的附肢形成中发挥着核心作用。 在家蚕中, Dll 表达在发育早期附肢的远端部分,对于确定附肢的远端结构特别是足部的形成至关重要, 而 abd-A 则促进了家蚕腹足的发育^[33]。abd-A 在野生型 Dazao 中相比于 E^{Ca}、E^{Me}、E^N、E^{Ne} 突变体上调 表达,证明了其在正常腹足发育中的功能。dac 基因在昆虫的附肢发育中也非常关键,它在家蚕中主要表 达于附肢的中部,与附肢的长度和身体比例调控相关。dac 与 Dll、hox 基因之间存在互作,共同细化附肢 的形态和功能。exd 和 hth 两个基因编码的蛋白质在昆虫中与 Hox 蛋白互作,帮助执行 Hox 基因的发育 指令。在家蚕中,exd 和 hth 的表达模式影响了附肢的基部至远端的形态发展。通过转录组分析鉴定出的 这些附肢(胸足和腹足)发育相关基因仍需要深入研究,以确定其具体功能和调控方式。

家蚕的附肢发育调控网络包括多个信号途径,如 Wnt、Hedgehog (Hh)、Decapentaplegic (Dpp)和 Epidermal growth factor (EGF)信号途径。这些信号途径通过激活或抑制特定的转录因子和基因,协同工 作以精确控制附肢各部分的形态和大小。例如,Wnt 信号途径在促进附肢远端结构的形成中尤为重要,而 Hh和 Dpp 信号途径则在整个附肢的轴向增长和分化中发挥作用。本研究对野生型 Dazao 和 E^{Ca} 、 E^{Mc} 、 E^{N} 、 E^{Nt} 突变体胚胎进行了转录组分析,获得了一大批差异表达基因,可为深入阐明这些基因的功能、了 解鳞翅目昆虫附肢多样性打下基础。

参考文献:

- [1] ANGELINI D R, KAUFMAN T C. Insect Appendages and Comparative Ontogenetics [J]. Developmental Biology, 2005, 286(1): 57-77.
- [2] LEWIS E B. A Gene Complex Controlling Segmentation in Drosophila [J]. Nature, 1978, 276(5688): 565-570.
- [3] SÁNCHEZ-HERRERO E, VERNÓS I, MARCO R, et al. Genetic Organization of Drosophila Bithorax Complex [J]. Nature, 1985, 313(5998): 108-113.
- [4] MCGINNIS W, KRUMLAUF R. Homeobox Genes and Axial Patterning [J]. Cell, 1992, 68(2): 283-302.
- [5] PAUL R, GIRAUDG, DOMSCH K, et al. Hox Dosage Contributes to Flight Appendage Morphology in Drosophila[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2892.
- [6] DIAZ-DE-LA-LOZA M D C, LOKER R, MANN R S, et al. Control of Tissue Morphogenesis by the Hox Gene Ultrabithorax [J]. Development, 2020, 147(5): dev184564.
- [7] SLATTERY M, RILEY T, LIU P, et al. Cofactor Binding Evokes Latent Differences in DNA Binding Specificity between Hox Proteins [J]. Cell, 2011, 147(6): 1270-1282.
- [8] LEPPEK K, FUJII K, QUADE N, et al. Gene- and Species-specific Hox mRNA Translation by Ribosome Expansion Segments [J]. Molecular Cell, 2020, 80(6): 980-995.
- [9] WANG Y, LI J, WAN Q X, et al. Spliceosomal Protein Gene BmSPX Regulates Reproductive Organ Development in Bombyx mori [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2579.
- [10] 代方银,童晓玲,董占鹏,等. 家蚕突变型第2煤色(so2)的遗传学研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版),2009, 31(3):77-79.
- [11] 鲁成,代方银,向仲怀.家蚕体节畸形自然突变型的研究 [J]. 西南农业大学学报,2000,22(1):1-5.
- [12] 唐芬芬,杨伟克,张祖芸,等.家蚕 Gloverin 2 克隆,高效表达及其抗核型多角体病毒感染作用研究 [J].河南农业科学,2023,52(8):135-141.
- [13] XIANG H, LI M, YANG F, et al. Fine Mapping of Ekp-1, A Locus Associated with Silkworm (Bombyx mori) Proleg Development [J]. Heredity, 2008, 100(5): 533-540.
- [14] TOMITA S, KIKUCHI A. Abd-B Suppresses Lepidopteran Proleg Development in Posterior Abdomen [J]. Developmental Biology, 2009, 328(2): 403-409.
- [15] CHEN P, TONGX L, LI D D, et al. Fine Mapping of a Supernumerary Proleg Mutant (E^{Cs}-L) and Comparative

Expression Analysis of the abdominal—A Gene in Silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect Molecular Biology, 2013, 22 (5): 497-504.

- [16] TONG X L, FUM Y, CHEN P, et al. Ultrabithorax and Abdominal—A Specify the Abdominal Appendage in a Dosage-Dependent Manner in Silkworm, Bombyx mori [J]. Heredity, 2017, 118(6): 578-584.
- [17] DHAWAN S, GOPINATHAN K P. Expression Profiling of Homeobox Genes in Silk Gland Development in the Mulberry Silkworm Bombyx mori [J]. Development Genes and Evolution, 2003, 213(11): 523-533.
- [18] CHEN P, TONG X L, LI D D, et al. Antennapedia Is Involved in the Development of Thoracic Legs and Segmentation in the Silkworm, Bombyx mori [J]. Heredity, 2013, 111(3): 182-188.
- [19] KIMOTO M, TSUBOTAT, UCHINO K, et al. Hox Transcription Factor Antp Regulates Sericin-1 Gene Expression in the Terminal Differentiated Silk Gland of *Bombyx mori* [J]. Developmental Biology, 2014, 386(1): 64-71.
- [20] WANG HL, HU H, XIANG Z H, et al. Identification and Characterization of a New Long Noncoding RNA Iab-1 in the Hox Cluster of Silkworm, *Bombyx mori* Identification of Iab-1 [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(10): 17283-17292.
- [21] 张柱林. 家蚕腹肢发育和特化的分子机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [22] 唐亮,蒋满贵,唐名艳,等. 基于 BSA-Seq 的家蚕 NC99R 抗 BmNPV 分子标记鉴定 [J]. 南方农业学报,2023,54(8): 2406-2414.
- [23] 李英利,何超. 饥饿胁迫对井上蛀果斑螟幼虫体内生化物质含量的影响 [J]. 中国南方果树, 2025, 54(2): 204-207.
- [24] 杨晓平,陈启亮,张靖国,等. 性信息素防控梨小食心虫的田间防效及效益评估 [J]. 中国南方果树, 2023, 52(4): 175-179.
- [25] JAIN D, NEMEC S, LUXEY M, et al. Regulatory Integration of Hox Factor Activity with T-Box Factors in Limb Development [J]. Development, 2018, 145(6): dev159830.
- [26] TÖGEL M, PASS G, PAULULAT A. Wing Hearts in Four-Winged Ultrabithorax-mutant Flies-the Role of *Hox* Genes in Wing Heart Specification [J]. Genetics, 2022, 220(1): iyab191.
- [27] YASUKOCHI Y, ASHAKUMARY L A, WU C C, et al. Organization of the Hox Gene Cluster of the Silkworm, Bombyx mori: A Split of the Hox Cluster in a Non-drosophila Insect [J]. Development Genes and Evolution, 2004, 214(12): 606-614.
- [28] PAUL S, ZHANG X N, HE J Q. Homeobox Gene Meis1 Modulates Cardiovascular Regeneration [J]. Seminars in Cell
 & Developmental Biology, 2020, 100: 52-61.
- [29] ESTELLA C, RIECKHOF G, CALLEJA M, et al. The Role of Buttonhead and Sp1 in the Development of the Ventral Imaginal Discs of Drosophila [J]. Development, 2003, 130(24): 5929-5941.
- [30] ESTELLA C, MANN R S. Non-redundant Selector and Growth-promoting Functions of Two Sister Genes, Buttonhead and Sp1, in Drosophila Leg Development [J]. PLoS Genetics, 2010, 6(6): e1001001.
- [31] XIANG H, LI M W, GUO J H, et al. Influence of RNAi Knockdown for E-complex Genes on the Silkworm Proleg Development [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2011, 76(1): 1-11.
- [32] CONNAHS H, TLILI S, VAN CREIJ J, et al. Activation of Butterfly Eyespots by Distal-less Is Consistent with a Reaction-diffusion Process [J]. Development, 2019, 146(9): dev169367.
- [33] PECHMANN M, KHADJEHS, TURETZEK N, et al. Novel Function of Distal-less as a Gap Gene during Spider Segmentation [J]. PLoS Genetics, 2011, 7(10): e1002342.

责任编辑 周仁惠