

家蚕 *BmRpt4* 基因在翅膀发育中的功能研究*

孙霞^{1,2**} 张静¹ 印锦¹ 秦笙^{1,2} 张国政^{1,2} 李木旺^{1,2***}

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 镇江 212018; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018)

摘要 【目的】 研究分析编码蛋白酶体调控复合物亚基因 *BmRpt4* (*Regulatory particle triple-A ATPase4*, *BGIBMGA010794*) 在家蚕翅膀发育过程中的功能。【方法】 利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术, 将 *BmRpt4* 的 gRNAs 和 *Cas9* mRNA 直接注射到家蚕胚胎中, 观察 G₀ 代家蚕个体翅率, 并分析雏翅个体中 *BmRpt4* 基因突变情况。【结果】 经统计, 对照组 G₀ 代家蚕个体均表现为正常翅, 而实验组注射 *BmRpt4* 的 gRNAs 和 *Cas9* mRNA 后, G₀ 代约 66.7% 家蚕个体表现出小翅表型。在分子水平上对小翅表型个体进行检测, 发现 *BmRpt4* 基因在两个 gRNA 及其之间位置均有不同长度片段的缺失或者插入, 说明在这些突变个体中 *BmRpt4* 基因被不同程度的敲除, 从而其功能缺失, 导致出现小翅表型。【结论】 该研究结果表明编码蛋白酶体调控亚基的 *BmRpt4* 基因在家蚕翅膀发育中具有重要作用, 为蛋白酶体在生物组织器官发育中调控作用研究提供重要实验依据。

关键词 雏翅; 蛋白酶体; CRISPR/Cas9 技术; 基因组编辑; 家蚕

Functional analysis of the *BmRpt4* gene during wing development in the silkworm, *Bombyx mori*

SUN Xia^{1,2**} ZHANG Jing¹ YIN Jin¹ QIN Sheng^{1,2}
ZHANG Guo-Zheng^{1,2} LI Mu-Wang^{1,2***}

(1. College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;

2. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract [Objectives] To study and analyze the function of the *BmRpt4* gene (*Regulatory particle triple-A ATPase 4*, *BGIBMGA010794*) during wing development in the silkworm *Bombyx mori*. [Methods] *BmRpt4* gRNAs and *Cas9* mRNA were directly injected into silkworm embryos using the CRISPR/Cas9 genome editing technique. Phenotypes of G₀ adults were observed and the proportion of adults with minute wings was statistically analyzed. Mutation of *BmRpt4* was detected in adults with minute wings. [Results] All G₀ adults in the control group had normal wings whereas 66.67% of G₀ adults in the experimental group had minute wings. The *BmRpt4* gene was deleted, or inserted, in different length fragments at the two gRNAs loci in G₀ individuals with minute wings. These results indicate that individuals developed minute wings due to knock-down of the *BmRpt4* gene. [Conclusion] The *BmRpt4* gene plays an important role in wing development in the silkworm, and in regulating proteasome in the development of biological tissues and organs.

Key words minute wing, proteasome, CRISPR/Cas9, genomic editing, silkworm

家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目的模式生物代表, 一生经历卵、幼虫、蛹和成虫四个阶段, 属于完全变态昆虫。在变态时期, 幼虫的某些组织发生特异性退化, 如丝腺、上颚、腹足等, 而某

些组织发生重组重建或者由成虫盘 (Imaginal disc) 进一步分化, 如脂肪体、气管、翅原基 (Wing disc) 等 (Belles, 2011)。家蚕翅原基形成于胚胎期, 幼虫期时位于第 2、第 3 环节, 为未分化

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (31572320); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-18)

**第一作者 First author, E-mail: sunxia8428@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: mwli@just.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-09-07; 接受日期 Accepted: 2018-10-18

的胚胎细胞群,在幼虫早期发育缓慢,直到化蛹前发育加快,蛹期分化完成,最终在成虫期形成翅。家蚕翅膀在经历数千年人工驯化的选择压力下,已丧失飞行功能,但在交配行为中仍具有一定的作用。目前,与家蚕翅发育相关基因的研究并不多,2004 年研究发现了 300 个家蚕中与翅发育相关的基因,约占果蝇翅发育基因的 90% 以上 (Xia *et al.*, 2004)。在对家蚕幼虫、蛹和成虫翅原基的蛋白质组表达谱的研究分别鉴定了 241、218 和 223 个蛋白,其中三个时期共表达的蛋白有 139 个,而三个时期特异表达蛋白分别有 55、37、43 个 (Zhang *et al.*, 2013)。家蚕幼虫-蛹变态发生期翅原基的转录组测序分析发现 5 287 个基因表达具有差异 (Ou *et al.*, 2014)。

家蚕中存在多种自然发生的翅突变体,其中与翅型相关的突变性状较多,如无翅 (Wingless, fl)、痕迹翅 (Vestigial, Vg)、雏翅 (Minute wing, mw)、小翅 (Micropterous, mp)、螯虾蛹 (Crayfish, cf)、卷翅蛹 (Cw)、皱翅 (Wrinkled wing, wri)、不全翅 (Tiny wing, tyw)、伴性无翅 (Rudimentary wing, rw) 等,这些突变体均为家蚕翅发育的研究提供了宝贵资源,但是这些翅突变体发生机制并未得到完全解析。其中对无翅突变体 (fl) 研究发现, *fng* (*fringe*) 基因在突变体中发生了大片段序列缺失,该基因编码 Fng 糖基转移酶,参与 Notch 信号通路的调控 (Sato *et al.*, 2008)。痕迹翅突变体 (Vg) 形成是由于 *apterous* 基因和推测的蛋白磷酸酶基因发生了缺失 (Fujii *et al.*, 2011)。家蚕雏翅 (mw) 突变体由位于第 22 连锁群的隐性基因 *mw* 控制,该基因经 STS 标记技术被精确定位 (马晓等, 2013)。近期研究发现编码棕榈酰转移酶基因 *Bm-app* 的启动子区域在 *mw* 突变体中存在 10 bp 插入,对雏翅的形成具有重要的作用 (Yu *et al.*, 2018)。本课题组前期对 *mw* 突变体 u11 和正常翅 p50 的翅原基进行了转录组测序分析,结果发现 628 个差异表达基因,且这些基因经 KEGG 分析富集在蛋白酶体、Hippo、氨基糖和核酸糖代谢信号通路中 (Zhang *et al.*, 2017)。

蛋白酶体是一分子量约为 2 000-3 000 ku,沉降系数为 26S 的多亚基复合物,主要由 20S 的桶形蛋白水解核心复合物 (20S 蛋白酶体) 和 19S 调控复合物 (Regulatory complexes, RCs) 组成 (Hölzl *et al.*, 2000),广泛分布在细胞质和细胞核中,利用 ATP 水解和泛素化引导降解错误折叠、不需要的蛋白质,主要涉及参与多种生物学过程,如细胞周期、细胞凋亡、基因转录、信号转导、神经退行性疾病的发生等 (Rousseau and Bertolotti, 2018)。其中 19S RCs 主要识别蛋白降解信号—泛素化蛋白,进而结合并将其去泛素化和展开,最终将该蛋白定位到 20S 核心复合物 (Hölzl *et al.*, 2000)。本课题组在 u11 突变体翅原基的转录组测序分析中发现,编码 19S RCs 的一个亚基基因 *BmRpt4* (*Regulatory particle triple-A ATPase 4*, BGIBMGA010794) 表达量在 u11 突变体中相对于 p50 明显下调 (Zhang *et al.*, 2017)。该基因在果蝇中主要参与基因转录、ATP 酶活性等 (Hölzl *et al.*, 2000),而在家蚕中功能不清楚。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,将体外合成的 *BmRpt4* gRNA 和 *Cas9* mRNA 注射到家蚕胚胎中,通过 G_0 代家蚕个体表型观察及分子水平上相关基因表达检测,进一步分析 *BmRpt4* 基因在家蚕翅膀发育中的功能,为蛋白酶体通路在家蚕组织器官发育中的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕品种为 Nistari (Tan *et al.*, 2005),家蚕幼虫在常规条件下桑叶饲养。显微注射后表现为雏翅的家蚕成虫个体置于 -80℃ 保存。

sgRNA 和 *Cas9* mRNA 分别由 MAXIscript® T7 kit 和 mMESSAGE mMACHINE T7 kit (Thermo fisher) 体外转录合成。质粒 pTD1-Cas9 和 pJET1.2 由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所黄勇平研究员课题组提供。感受态细胞 DH5 α 由本实验室保存。

T4 DNA 连接酶、Taq 酶、PCR 扩增试剂盒

等购自 TaKaRa 生物技术有限公司；高保真酶 KOD-Plus 酶购自 Toyobo 生物公司；引物由上海生工生物工程有限公司合成；胶回收试剂盒购自 Axygen 生物科技有限公司；实验所用其他试剂均为国产分析纯。

1.2 *BmRpt4* sgRNA 位点选择及其序列检测

根据 CRISPR/Cas9 靶点的设计原则 5'-GGNN18NGG-3'，利用在线软件 CRISPR direct(<http://crispr.dbcls.jp/>)对 *BmRpt4* 基因 ORF 区进行特异靶点的设计(Wang *et al.* 2013 ;Zhang *et al.* , 2013)。共设计两个 sgRNA 位点序列，并在位点上下游约 100 bp 位置各设计一对引物，将其克隆测序，检测 sgRNA 位点序列在基因组水平上是否有突变。所用引物序列见表 1，引物合成和 DNA 序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 *BmRpt4* sgRNA 与 Cas9 mRNA 合成与纯化

利用 KOD 酶合成 sgRNA 模板，胶回收模板连接到 pJET1.2 载体上，进行克隆测序，检测模板序列是否发生突变；以测序正确的质粒为模板，用 KOD 酶扩增，胶回收后用酚/氯仿/异戊醇纯化；利用 MAXIscript® T7 kit (Ambion) 试剂盒体外转录合成 sgRNA，经纯化后 -80 保

存。利用限制性内切酶 NotI 线性化质粒 pTD1-Cas9，经 mMESSAGE mMACHINE T7 kit 体外转录合成 Cas mRNA。Cas mRNA 经纯化后 -80 保存。

1.4 家蚕胚胎显微注射

产下 8 h 内的蚕卵清洗处理备用。将 3 μ g *BmRpt4* sgRNA1、3 μ g *BmRpt4* sgRNA2 与 4.5 μ g 的 Cas9 mRNA 混合后 (15 μ L 体系) 通过显微注射仪(Narishige, Tokyo, Japan)注射到蚕卵中。显微注射平台由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所黄勇平研究员课题组提供。注射后的蚕卵 (G_0 代) 置于密封保湿的盒子中，25 恒温保护至孵化，之后在正常条件下饲养。

1.5 表型观察与突变分析

对 G_0 代家蚕进行孵化率、成虫中雏翅与正常翅个体统计。在成虫期选取雏翅表型明显的个体，以对照组正常翅个体为对照，利用异丙醇沉淀法提取基因组。使用 *BmRpt4* gRNA 位点上下游 300 bp 处设计的引物，以雏翅和正常翅个体基因组为模板分别进行 PCR 扩增，后经克隆测序确定雏翅个体中 *BmRpt4* 基因序列的突变情况。

表 1 *BmRpt4* sgRNA 位点合成及检测引物

Table 1 List of primer names and their sequences for the synthesis and detection of *BmRpt4* sgRNA

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	目的 The purpose
<i>BmRpt4</i> -sgF1	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGTTCAACTACGCGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC	合成 sgRNA 转录模板
<i>BmRpt4</i> -sgF2	TAATACGACTCACTATAGGGACAGGTGAAGATCATCAGTTTLAGAGCTA GAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCC	合成 sgRNA 转录模板
sgRNA-R	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCT TATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAA	合成 sgRNA 转录模板
pJET1.2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	菌落 PCR
pJET1.2-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	菌落 PCR
<i>BmRpt4</i> -F1	CATTACAGGTGGTGTTCATCGGC	靶点基因组序列检测
<i>BmRpt4</i> -R1	TTAGCTACTGGCACTACCGAT	靶点基因组序列检测
<i>BmRpt4</i> -F2	AGGTGGGAGACGTTTTTCCGAA	靶点基因组序列检测
<i>BmRpt4</i> -R2	TCACCTAGCCTGTTCATTGGGC	靶点基因组序列检测

2 结果与分析

2.1 *BmRpt4* 转基因家蚕获得

BmRpt4 (*BGIBMGA010794*) 基因全长约为 58 kb, 包含 7 个外显子和 6 个内含子 (图 1)。根据 CRISPR/Cas9 靶点的设计原则 5'-GGNN18NGG-3', *BmRpt4* 的两个 sgRNA 分别位于第 5 和 6 外显子上 (图 1), 两者之间相隔 1 076 bp。

将体外转录合成的 *BmRpt4* sgRNAs 和 *Cas9*

RNA 混合后注射 480 粒蚕卵 (G_0), 约 20% 蚕卵孵化, 在正常条件下用进行桑叶饲养, 约 70% 正常发育到成虫 (表 2)。经对 G_0 成虫个体的表型观察分析, 发现与对照组相比, 实验组约 66.7% 个体表现为雏翅, 对照组个体翅膀均正常 (图 2)。 G_0 代成虫自交后代 (G_1) 在 1 龄幼虫期 (蚁蚕期) 通过体视荧光显微镜进行筛选。得到的阳性转基因家蚕在正常条件下用进行桑叶饲养, 在 5 龄第 3 天和上簇结茧后, 分别获取幼虫丝腺和蚕茧茧层样品进行检测。

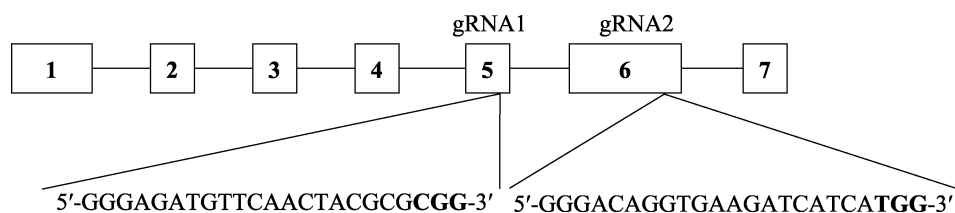


图 1 *BmRpt4* 基因结构及其 sgRNA 1/2 的位点

Fig. 1 Schematic diagram of *BmRpt4* gene and positions of sgRNA 1/2

BmRpt4 基因含有 7 个外显子和 6 个内含子。*BmRpt4* 的两个 sgRNA 分别位于第 5 和 6 外显子上。黑色方框表示外显子, 其之间连接黑线表示内含子; 黑色序列为两个 sgRNA 位点序列, 黑色且粗体序列为 PAM 序列。

BmRpt4 gene contains seven exons and six introns. Two sgRNAs designed are localized on exon 5 and 6 respectively.

Black boxes are exons and black lines linked are introns. sgRNAs sequences (in black) and PAM sequences are shown (in black and bold).

表 2 注射 *BmRpt4* sgRNAs 和 *Cas9* RNA 后蚕卵孵化和 G_0 成虫表型观察
Table 2 The hatching percent of eggs injected with *BmRpt4* sgRNAs and *Cas9* RNA, and phenotype observation of G_0 adults

	实验组 Experimental group	对照组 Control group
注射胚胎 (个数) Injected embryos (number)	480	480
孵化胚胎 (个数) Hatched embryos (no.)	98	182
成虫 (个数) Adults (no.)	69	164
雏翅 (个数) Adults with minute wings (number)	46	0
突变率 Percent of mutation	66.7%	0

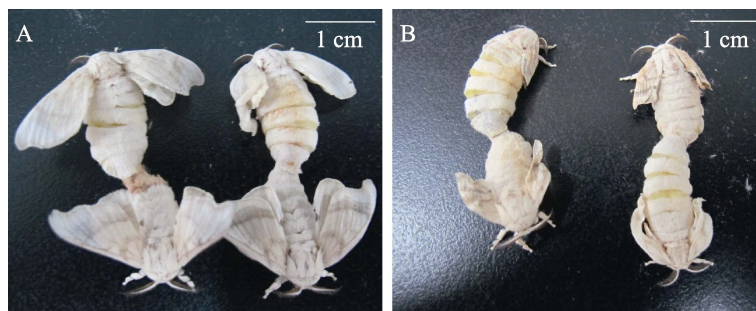


图 2 G_0 代正常翅个体 (A) 和雏翅个体 (B)

Fig. 2 G_0 adults with normal wings (A) and minute wings (B)

2.2 雏翅个体 *BmRpt4* 基因突变检测

将 *BmRpt4* sgRNAs 和 *Cas9* mRNA 注射到蚕卵 (G_0), 发育至成虫后, 实验组约有 66.7% 个体表现为雏翅。以未被注射的对照组家蚕 (Wild type, W) 为对照, 分别提取正常翅和雏翅个体基

因组 DNA。在雏翅个体中 *BmRpt4* 基因在两个 gRNA 位点处以及之间位置处均有不同长度片段的缺失或者插入 (图 3), 因此该基因的序列发生突变, 可能造成其功能缺失, 从而导致家蚕雏翅表型的出现。

```

GGGAGATGTTCAACTACGCGCGG(683)------(392)GGGACAGGTGAAGATCATCATGG(W)
GGGAGATGTTCAACTACGCGCGG(683)CGTTTCGGTTTAAGGGT(392)GGGACAGGTGAAGATCATCATGG(1) (+17 bp)
GGGAGATG-----CGCGCGG(683)CGTTTCGGTTTAAGGGT(392)GGGACAGGTGAAGATCATCATGG(2) (+9 bp)
GGGAGATGTTCAAC-----G(683)------(392)GGGACAGGTGAAGATCATCATGG(3) (-8 bp)
GGGAGATGTTCAACTACGCGCGG(683)------(392)GGGA-----CATCATGG(4) (-11 bp)

```

图 3 CRISPR/Cas9 介导的 *BmRpt4* 基因不同的突变类型
Fig. 3 Different mutations of *BmRpt4* gene by CRISPR/Cas9

与野生型家蚕 (W) 相比, 4 个雏翅个体 (1、2、3、4) 中 *BmRpt4* 基因在两个 sgRNA 位点 (下划线标识) 间均发生了不同长度片段的插入或者缺失。

Compared with wild type silkworm, *BmRpt4* has different mutations between the two sgRNAs (under line) in four (1, 2, 3 and 4) silkworms with minute wings.

3 讨论

本课题组前期对雏翅突变体 u11 和正常翅个体 p50 的翅原基进行了转录组分析, KEGG 富集分析发现二者间的差异表达基因主要富集在蛋白酶体、Hippo、氨基糖和核酸糖代谢信号通路 (Zhang *et al.*, 2017)。基因 *BmRpt4* (*BGIBMGA010794*) 编码蛋白酶体调控复合物的一个亚基, 其表达在 u11 突变体中明显低于 p50 正常个体 (Zhang *et al.*, 2017)。利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术, *BmRpt4* 被敲除后导致 G_0 代约 66.7% 的雏翅表型。

将 *BmRpt4* 的 gRNAs 和 *Cas9* mRNA 混合注射到家蚕胚胎后, G_0 代胚胎孵化率仅有 20%, 约为对照组的一半, 可能是由于该基因 gRNAs 和 *Cas9* mRNA 同时注射胚胎后, *BmRpt4* 基因即刻被敲除, 从而导致该基因功能缺失, 进而可能对胚胎孵化造成一定影响; 果蝇中同源基因 *Rpt4* 在胚胎 0-6 h 内表达水平较高, 可能该基因在胚胎发育阶段具有重要的功能。另外, G_0 代个体雏翅表型率为 66.7%, 并不是 100%, 可能与 *BmRpt4* 基因设计的 gRNAs 的效率有关 (Ran *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013), 研究过程中虽设计并使用了目的基因的两个 gRNA, 但仍不能保证及量化该两个 gRNA 在生物体内实际均发

挥作用。

在真核生物中, 蛋白酶体主要负责将错误折叠、不需要的蛋白质降解, 以减少细胞内的压力, 进而调控细胞凋亡及分裂周期等生物学过程 (Rousseau and Bertolotti, 2018)。Hippo 信号通路是一高度保守的信号通路, 对细胞增殖、凋亡和组织器官发育具有重要的调控作用 (Hayashi *et al.*, 2015)。蛋白酶体和 Hippo 通路调控共同的生物学过程, 且某些基因均参与这两个信号通路, 如 p53 (Aylon and Oren, 2016; Chai *et al.*, 2018), 由此表明二者间具有重要的相互联系。本研究中 *BmRpt4* 编码蛋白酶体调控复合物的一个亚基, 将该基因功能缺失后, 家蚕个体表现出较高的雏翅表型, 说明蛋白酶体在组织器官发育中具有重要的调控作用, 也进一步为蛋白酶体和 Hippo 通路间的相互关联提供了一定的实验证据。

参考文献 (References)

- Aylon Y, Oren M, 2016. The Hippo pathway, p53 and cholesterol. *Cell Cycle*, 15(17): 2248–2255.
- Belles X, 2011. Origin and Evolution of Insect Metamorphosis, *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Barcelona, Spain. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1–11.
- Chai K, Ning X, Nguyễn TTT, Zhong B, Morinaga T, Li Z, Shingyoji M, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K,

- Yamaguchi N, Tagawa M, 2018. Heat shock protein 90 inhibitors augment endogenous wild-type p53 expression but down-regulate the adenovirally-induced expression by inhibiting a proteasome activity. *Oncotarget*, 9(40): 26130–26143.
- Fujii T, Abe H, Katsuma S, Shimada T, 2011. Identification and characterization of the fusion transcript, composed of the apterous homolog and a putative protein phosphatase gene, generated by 1. 5-Mb interstitial deletion in the vestigial (Vg) mutant of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5): 306–312.
- Hölzl H, Kapelari B, Kellermann J, Seemüller E, Sümegi M, Udvardy A, Medalia O, Sperling J, Müller SA, Engel A, Baumeister W, 2000. The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26s proteasomes: Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *The Journal of Cell Biology*, 150(1): 119–30.
- Hayashi S, Yokoyama H, Tamura K, 2015. Roles of Hippo signaling pathway in size control of organ regeneration. *Development, Growth & Differentiation*, 57(4): 341–351.
- Ma X, Liu XF, Yi XL, Hou CX, Li B, Li MW, 2013. Mapping analysis of *minute wing* gene (*mw*) in silkworm, *Bombyx mori* by using STS markers. *Science of Sericulture*, 39(6): 1104–1107. [马晓, 刘先方, 易晓莉, 侯成香, 李冰, 李木旺, 2013. 利用 STS 标记对家蚕雏翅基因 *mw* 的定位分析. 蚕业科学, 39(6): 1104–1107.]
- Ou J, Deng HM, Zheng SC, Huang LH, Feng QL, Liu L, 2014. Transcriptomic analysis of developmental features of *Bombyx mori* wing disc during metamorphosis. *BMC Genomics*, 15(1): 820.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F, 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6): 1380–1389.
- Rousseau A, Bertolotti A, 2018. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11): 697–712.
- Sato K, Matsunaga TM, Futahashi R, Kojima T, Mita K, Banno Y, Fujiwara H, 2008. Positional cloning of a *Bombyx* wingless locus *flügello* (*fl*) reveals a crucial role for fringe that is specific for wing morphogenesis. *Genetics*, 179(2): 875–885.
- Tan A, Tanaka H, Tamura T, Shiotsuki T, 2005. Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33): 11751–11756.
- Wang Y, Li Z, Xu J, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, Huang Y, Tan A, 2013. The CRISPR/Cas System mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Research*, 23(12): 1414–1416.
- Xia Q, Zhou Z, Lu C, Cheng D, Dai F, Li B, Zhao P, Zha X, Cheng T, Chai C, Pan G, Xu J, Liu C, Lin Y, Qian J, Hou Y, Wu Z, Li G, Pan M, Li C, Shen Y, Lan X, Yuan L, Li T, Xu H, Yang G, Wan Y, Zhu Y, Yu M, Shen W, Wu D, Xiang Z, Yu J, Wang J, Li R, Shi J, Li H, Li G, Su J, Wang X, Li G, Zhang Z, Wu Q, Li J, Zhang Q, Wei N, Xu J, Sun H, Dong L, Liu D, Zhao S, Zhao X, Meng Q, Lan F, Huang X, Li Y, Fang L, Li C, Li D, Sun Y, Zhang Z, Yang Z, Huang Y, Xi Y, Qi Q, He D, Huang H, Zhang X, Wang Z, Li W, Cao Y, Yu Y, Yu H, Li J, Ye J, Chen H, Zhou Y, Liu B, Wang J, Ye J, Ji H, Li S, Ni P, Zhang J, Zhang Y, Zheng H, Mao B, Wang W, Ye C, Li S, Wang J, Wong GK, Yang H, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5730): 1937–1940.
- Yu Y, Liu XJ, Ma X, Zhang ZJ, Wang TC, Sun F, Hou CX, Li MW, 2018. A palmitoyltransferase approximated gene *Bm-app* regulates wing development in *Bombyx mori*. *Insect Science*, 27(1): 2–13.
- Zhang J, Blessing D, Wu C, Liu N, Li J, Qin S, Li M, 2017. Comparative transcriptomes analysis of the wing disc between two silkworm strains with different size of wings. *PLoS ONE*, 12(6): e0179560.
- Zhang YL, Xue RY, Cao GL, Zhu YX, Pan ZH, Gong CL, 2013. Shotgun proteomic analysis of wing discs from the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) during metamorphosis. *Amino Acids*, 45(5): 1231–1241.