

网络出版时间:2012-08-15 15:38

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120815.1538.021.html>

梨小食心虫滞育与非滞育幼虫抑制性 消减文库的构建与分析

陈 浩, 杨 杰, 成卫宁, 仵均祥

(西北农林科技大学 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 应用昆虫学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】分离和鉴定梨小食心虫(*Grapholita molesta* (Busck))滞育相关基因。【方法】分别以梨小食心虫滞育和非滞育幼虫为材料,通过抑制性消减杂交技术(SSH),构建梨小食心虫滞育与非滞育正、反向差减 cDNA 文库,从中筛选梨小食心虫滞育相关基因,并对其进行测序和分析。【结果】在获得的 128 个滞育特异和 132 个非滞育特异的 EST 中,有滞育差异表达 EST 42 条(17 条功能未知)、非滞育差异表达 EST 46 条(22 条功能未知)。对差异表达 EST 同源检索后推测,其功能大部分与滞育或非滞育特性相关。在滞育个体中,代谢酶和滞育关联蛋白基因表达量较高;在非滞育个体中,贮存蛋白和信号传递基因表达量较高。【结论】这些 EST 基本反映了梨小食心虫在滞育与非滞育期间的基因表达谱,为今后深入研究梨小食心虫滞育的分子机理奠定了基础。

【关键词】 梨小食心虫;滞育;抑制性消减文库

【中图分类号】 Q966

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)09-0090-06

Construction and analysis of suppression subtractive hybridization cDNA library about the diapause and non-diapause larvae of *Grapholita molesta* (Busck)

CHEN Hao, YANG Jie, CHENG Wei-ning, WU Jun-xiang

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas/Key Laboratory of Applied Entomology, Northwest A&F University,
Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This research was to obtain the diapause-related genes from *Grapholita molesta* (Busck), and then to get the genes sequenced and analyzed. 【Method】 Two suppression subtractive hybridization cDNA libraries were constructed with diapause and non-diapause *G. molesta* as positive and reverse library. 【Result】 128 fragments from the positive library and 132 fragments from the reverse library were respectively selected for sequencing. 42 ESTs with diapause difference and 46 ESTs with non-diapause difference were obtained finally, after cluster analysis and ordering repetition sequences. 【Conclusion】 Most of the genes screened from two libraries are related to diapause and basically reflect gene expression profiles of *G. molesta* in duration of diapause and non-diapause by BLASTN. The study establishes a foundation for further research of the molecular mechanism of diapauses of *G. molesta*.

Key words: *Grapholita molesta* (Busck); diapause; SSH library

【收稿日期】 2012-02-20

【基金项目】 农业部公益性行业科研专项(201103024)

【作者简介】 陈 浩(1985—),男,山东乳山人,在读博士,主要从事害虫综合治理研究。E-mail: cha.active@gmail.com

【通信作者】 仵均祥(1961—),男,陕西凤翔人,教授,博士,主要从事农业昆虫研究。E-mail: junxw@nwsuaf.edu.cn

梨小食心虫(*Grapholita molesta* (Busck))是一种世界性的果树害虫,广泛分布于亚、欧、北美、澳洲^[1-3];在国内南、北各果区普遍发生,尤其以梨、桃等果产区为害普遍而严重^[4]。自 2000 年以来,梨小食心虫在我国许多地方发生程度明显加重,如 2002—2003 年连续 2 年在安徽砀山梨果区爆发,一般果园虫果率高达 20%,严重者达 50% 以上^[5];2004—2005 年在辽宁葫芦岛市油桃产区大发生,致油桃产量损失达 300 t,造成直接经济损失 40 多万元^[6];2006 年,黄河故道地区一般梨园受害虫果率 20%~30%,严重者有 50% 甚至超过 80%,损失严重^[4]。

滞育作为昆虫生长发育过程的一个阶段,是昆虫适应不良环境的重要生理生态对策之一^[7-8]。现代生物技术的发展为昆虫滞育研究提供了新的手段,从 20 世纪 90 年代开始,应用分子生物学技术研究昆虫的滞育机理成为昆虫学研究的一个新热点。徐卫华等^[9]克隆家蚕滞育激素基因并获得了其分子结构;从建成的家蚕咽下神经节的 cDNA 文库中,分离出滞育激素基因,通过分离、纯化、测序,阐明了家蚕滞育激素基因的结构与功能^[9-12]。顾燕燕等^[13]克隆了家蚕滞育激素受体基因,并对其表达进行了测定。冯国忠等^[14]构建了葱蝇夏滞育蛹的全长 cDNA 文库,为进一步的夏滞育专化基因筛选、克隆和表达分析奠定了基础。Cheng 等^[15]应用蛋白质双向电泳和质谱分析技术,对麦红吸浆虫幼虫滞育前、越冬和越冬滞育期及滞育解除后 4 个阶段蛋白质组的表达进行了研究,揭示了蛋白质在麦红吸浆虫滞育过程中发挥的作用。目前对梨小食心虫滞育的研究仍然停留在生物学方面,研究明确了梨小食心虫是典型的兼性滞育昆虫,引起其滞育的主导因子是光照,与温度也有一定关系^[16]。但直至目前,有关梨小食心虫滞育的分子机理研究尚未见报道,而寻找其维持滞育状态的特异性表达基因,揭示梨小食心虫滞育的分子机理,不仅可加深对其滞育生物学的了解,还可为其综合治理提供新思路。

抑制性消减杂交技术(SSH)具有特异性强、假阳性率低、灵敏度高和快速简便等优点,广泛应用于生命科学和医学领域基因差异表达的研究中^[17],在其他昆虫的滞育机理研究方面也获得了满意的结果^[18-19]。鉴于此,本文应用抑制性消减杂交的方法,研究了梨小食心虫滞育和非滞育基因表达情况,以期为进一步深入开展滞育机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试 虫 本研究所用试虫为西北农林科技大学植物保护学院农业害虫综合治理研究室室内饲养的梨小食心虫。非滞育幼虫的饲养条件及方法参照杜娟等^[20]的描述,每试管 5 头,幼虫老熟即将结茧(此时试虫脱离饲料,聚集于管口的棉花团上)时收集并立即用液氮处理,−80 ℃ 保存备用。滞育幼虫的饲养温度为(22±0.5) ℃、相对湿度为(70±10)%、光周期为 13 h:11 h(L:D),其他与非滞育幼虫饲养条件相同。以老熟幼虫结茧,1 个月不化蛹,保持不活跃的幼虫状态作为滞育标准。

1.1.2 试 剂 RNAiso Plus 试剂由 Takara 公司提供;Oligotex mRNA mini Kit 由 Qiagen 公司提供;RT-PCR(MMLV)试剂盒、Taq 酶、PCR 产物回收试剂盒和 Top10 大肠杆菌菌种,均由北京庄盟生物有限公司提供;pGEM-T Easy Vector System 由 Promega 公司提供;PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 及 Advantage cDNA Polymerase,均由 Clontech 公司提供。引物由北京赛百盛公司合成,测序由北京三博远志公司完成。

1.2 总 RNA 的提取与质量检测

将冻存的滞育与非滞育供试虫体各 30 头用液氮研磨为粉末,用 RNAiso Plus 提取总 RNA,用 Nano drop 2000c(Thermo Fisher Scientific Inc.)测定其吸光度,1% 甲醛变性电泳检测其完整性。

1.3 mRNA 的提取与质量检测

用 Oligotex mRNA mini Kit(Qiagen)从总 RNA 中提取 mRNA。步骤参照 Oligotex Handbook 中“Oligotex mRNA Spin-Column Protocol”进行。用 1.2% 甲醛变性胶对所提取的 mRNA 进行检测。

1.4 抑制性消减杂交

将 1.3 中获得的滞育幼虫与非滞育幼虫 mRNA 分别反转录为 cDNA 后分为 2 组,一组以滞育幼虫 cDNA 为测试子(tester),非滞育幼虫 cDNA 为驱赶子(driver)构建正向库;另一组则相反,构建反向库。抑制性消减杂交用 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit(Clontech)完成,主要步骤有 cDNA 的合成、Rsa I 酶切,接头连接,2 次杂交和 2 次 PCR 扩增。检测步骤也严格按照试剂盒的要求进行。其中接头连接效率的检测用引物根据已知昆虫的 β -Actin 基因设计(ActinF: 5'-GGAAGGGCTGGAAGAG-3'; ActinR: 5'-AACACGCCCGCCATGTAC-3')。

1.5 文库构建

将 1.4 中第 2 次 PCR 扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒(北京庄盟)纯化后,与 T-Easy 载体(Pro-mega)连接并转化至感受态细胞 Top10 大肠杆菌(北京庄盟)中,37 ℃ 过夜培养。所有操作均按所用试剂或试剂盒说明书进行。

1.6 抑制性消减文库分析

从 1.5 中构建的 2 个文库的 10 个平板中各挑 144 个斑接于 96 孔板上,37 ℃ 培养过夜。以菌液为模板,以接头序列上的 Primer1 和 Primer2R 为引物进行 PCR 扩增,然后对产物进行电泳检测。选取阳性克隆提取质粒,送北京三博远志公司用 T7 引物测序。所有操作均按所用试剂或试剂盒说明书进行。

将测序结果除去载体和接头序列在 NCBI 上使用 Blast 工具检索,分析差异片段与已知序列的同源性、差异片段与氨基酸序列及 EST 的同源性,最后对检索到的序列进行分类比较。

2 结果与分析

2.1 滞育与非滞育梨小食心虫幼虫总 RNA 的质量检测

测定结果表明,提取的梨小食心虫滞育幼虫和非滞育幼虫总 RNA 的 OD_{260/280} 分别为 1.80 和

1.99,表明总 RNA 纯度较好。电泳检测结果(图 1)表明,提取的总 RNA 条带清晰,表明总 RNA 未发生降解,符合试验要求。

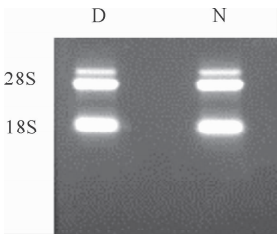


图 1 梨小食心虫幼虫总 RNA 的电泳检测
D. 滞育幼虫总 RNA;N. 非滞育幼虫总 RNA

Fig.1 Agarose gel electrophoresis for analysis of total RNA from *G. molesta* larvae
D. Total RNA of diapause larvae;
N. Total RNA of non-diapause larvae

2.2 抑制消减检测

2.2.1 接头连接效率检测 由图 2 可见,由 β-Actin 基因引物和试剂盒中所提供的 Primer1 引物扩增的片段亮度约为 2 个接头引物扩增片段的 50%,符合试剂盒要求的 25%以上的连接效率。

2.2.2 2 次 PCR 扩增产物检测 由图 3 可见,所有 PCR 产物均呈弥散状分布,无明显主带,大小为 200~1 500 bp,主要集中于 700 bp,符合试剂盒对文库扩增片段大小的要求。

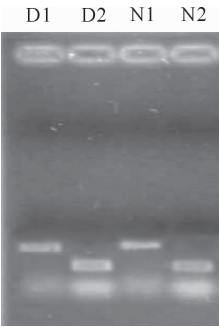


图 2 检测子 cDNA 接头连接效率的检测
D1. 滞育幼虫 ActinF 与 Primer1 为引物扩增 PCR;
D2. 滞育幼虫 ActinF 与 ActinR 为引物扩增 PCR;
N1. 非滞育幼虫 ActinF 与 Primer1 为引物扩增 PCR;
N2. 非滞育幼虫 ActinF 与 ActinR 为引物扩增 PCR

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for detection of tester cDNA adaptor ligation efficiency

D1. Products amplified with diapause larvae cDNA as template, and ActinF and Primer1 as primers;D2. Products amplified with diapause larvae cDNA as template, and ActinF and ActinR as primers;N1. Products amplified with non-diapause larvae cDNA as template, and ActinF and Primer1 as primers; N2. Products amplified with non-diapause larvae cDNA as template, and ActinF and ActinR as primers

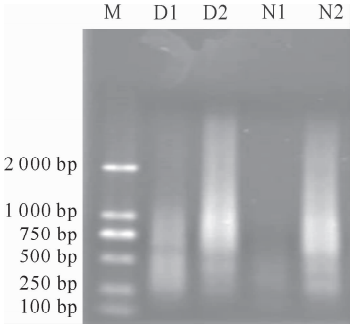


图 3 消减杂交后 2 次 PCR 反应的电泳检测
M. DNA 分子量标准 DL2000;
D1. 滞育第 1 次 PCR;D2. 滞育第 2 次 PCR;N1. 非滞育第 1 次 PCR;
N2. 非滞育第 2 次 PCR

Fig.3 Agarose gel electrophoresis for detection of the primary and secondary PCR products
M. Marker DL2000;D1. Primary PCR products from diapause larvae;D2. Secondary PCR products from diapause larvae;
N1. Primary PCR products from non-diapause larvae;
N2. Secondary PCR products from non-diapause larvae

2.2.3 消减效率检测 图 4 显示,消减 cDNA 在 35 个循环后才有条带出现,而未消减 cDNA 在 20 个循环后就有条带出现,说明消减效率较高,背景较低,符合要求,文库质量较好。

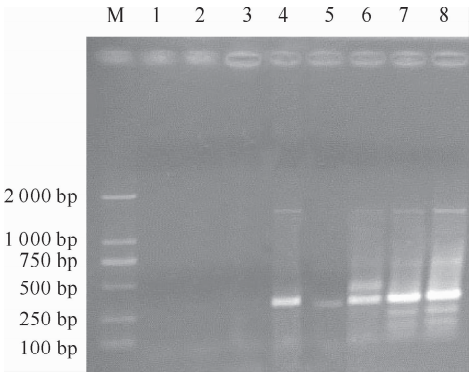


图 4 消减效率的检测

M. DNA 分子量标准 DL2000;

1~4. 消减滞育库 20,25,30,35 个循环后 PCR 产物;

5~8. 未消减滞育库 20,25,30,35 个循环后 PCR 产物

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis for detection of subtraction efficiency

M. Marker DL2000;1-4. Products of subtracted sample from diapause larvae after 20,25,30 and 35 cycles of PCR amplification;5-8. Products of unsubtracted sample from diapause larvae after 20,25,30 and 35 cycles of PCR amplification

2.3 阳性克隆的随机筛选及扩增

图 5 结果表明,抑制性消减文库中部分 EST 片

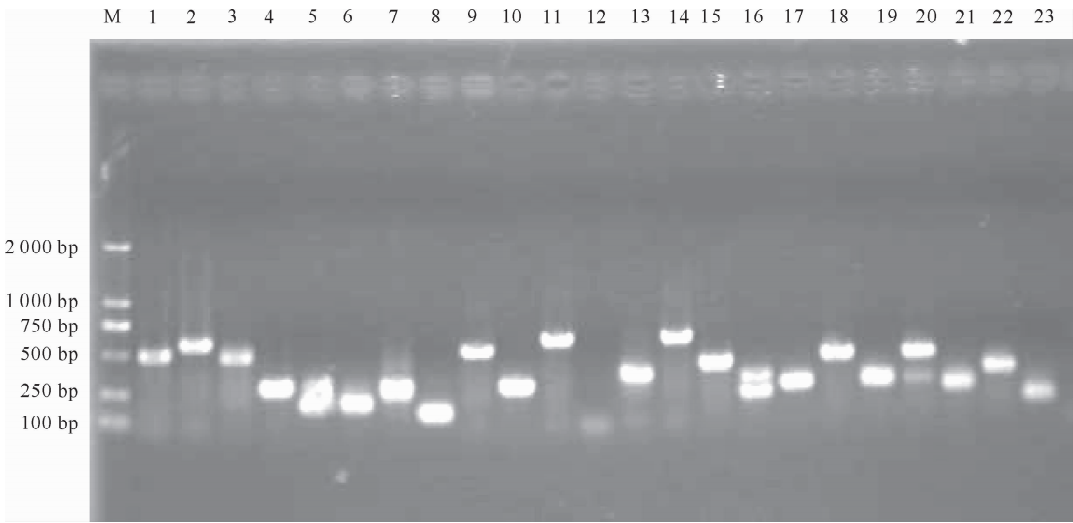


图 5 抑制性消减文库中部分 EST 片段电泳检测

M. DNA 分子量标准 DL2000;1~23. 随机挑取的 PCR 产物

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis for detection of subtract EST in SSH library

M. Marker DL2000;1-23. Subtract EST sequences

2.4.2 同源 EST 序列分析 在滞育文库和非滞育文库中,对已测序的 EST 序列进行比较,结果见图 6。由图 6 可以看出,在滞育和非滞育文库中未知功

段的差异序列长度在 600 bp 左右。

2.4 滞育与非滞育差减文库中 EST 的测序结果及其同源性分析

2.4.1 同源性检索结果 从滞育差异表达文库与非滞育差异表达文库中各挑选的 144 个测序的克隆中,分别获得 128 个和 132 个 EST 片段(其他测序信号弱或套峰)。将去除载体和接头的序列,在 NCBI 中的非冗余核酸数据库(Blastx)中检索,结果显示,在滞育差异表达文库的差异片段中有 59 个(占总滞育序列的 46%)、非滞育差异表达文库的差异片段中有 67 个(占非滞育总序列的 51%)能够找到与之同源性较高(150 分以上)的已知序列;对于在非冗余核酸数据库检索不到的同源基因和相关信息的片段,再在 Blastn 的 EST 数据库中检索,结果大部分序列都找到了与之同源性较高的 EST。但在氨基酸水平上检索这些片段的同源序列时,大部分未找到同源序列,无法初步判定其功能。

通过对检索结果进行进一步分析,将不同差异序列中同源性较高、一致或交叉的片段以及可能来自同一基因的不同区域片段的基因合并,组合为一个单一序列,最后滞育差异表达文库与非滞育差异表达文库分别得到 42 和 46 个不同基因的非重复序列,详见表 1。

能基因分别占 40.5%和 38.1%。已知功能 EST 序列主要包括代谢酶、贮存蛋白、转录相关、信号传递、滞育相关蛋白等的基因。

表 1 梨小食心虫幼虫滞育与非滞育差减文库中部分与已报道蛋白相似的 EST

Table 1 Similarity of some ESTs isolated from the SSH library of *G. molesta* larvae with proteins reported

克隆编号 Clone No.	长度/bp Length	登录号 Accession No. of similar gene	E 值 E-value	相似度/% Percent Identity	相似基因来源物种名 Organism of with similar gene	推定的蛋白种类 Putative identity	推定的蛋白功能分类 Putative functional category
D14	407	GQ865217.1	8e-100	82	珍珠蛱蝶 <i>Hamanumida daedalus</i>	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	代谢酶 Metabolic enzymes
D52	2 435	AF007768	7e-30	81	云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	滞育关联蛋白 2 Diapause associated protein 2	滞育相关 Diapause-associated
D78	750	AF395670.1	1.1	100	褐带卷蛾类 <i>Adoxophyes</i> sp.	信息素激活肽 Pheromone biosynthesis activating neuropeptide	滞育相关 Diapause-associated
D128	2 366	L03281.1	2e-48	75	粉纹夜蛾 <i>Trichoplusiani</i>	保幼激素敏感的血淋巴蛋白 Juvenile hormone sensitive hemolymph protein	滞育相关 Diapause-associated
D137	2 512	AF007767.1	6e-148	78	云杉卷叶蛾 <i>Choristoneura fumiferana</i>	滞育关联蛋白 1 Diapause associated protein 1	滞育相关 Diapause-associated
N11	2 468	AB251894.1	3e-62	89	甘蓝夜蛾 <i>Mamestra brassicae</i>	热激蛋白 90 Hsp90	滞育相关 Diapause-associated
N27	1 524	NM001043447	5e-85	75	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	过氧化氢酶 Catalase	代谢酶 Metabolic enzymes
N68	2 352	EU366905.1	2e-116	74	小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	贮存蛋白 1 Storage protein 1	贮存蛋白 Storage protein
N72	2 270	EU661547.1	2e-55	74	菜青虫 <i>Pieris rapae</i>	带芳基贮存蛋白 Arylphorin-type storage protein	贮存蛋白 Storage protein
N95	1 734	FJ550359.1	3e-103	93	烟青虫 <i>Heliothis virescens</i>	14-3-3 zeta	信号传递 Signal transduction
N105	2 361	AY422205.1	2e-55	79	棉铃虫 <i>Helicoverpa zea</i>	VHDL 受体 VHDL receptor	信号传递 Signal transduction

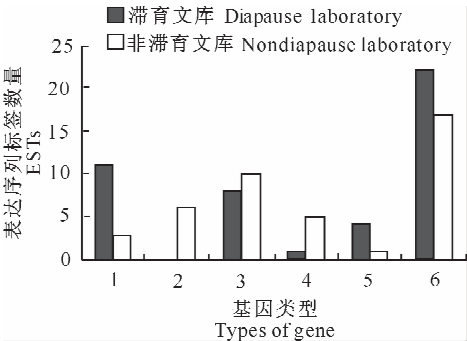


图 6 差减文库 EST 序列功能推测

1. 代谢酶;2. 贮存蛋白;3. 转录相关;
4. 信号传递;5. 滞育相关;6. 未知功能基因

Fig. 6 Putative function analysis of EST from SSH libraries

1. Metabolic enzymes;2. Storage protein;
3. Transcription-associated;4. Signal transduction;
5. Diapause-associated;6. Unknown

2.4.3 部分基因的检索结果 在 2 个差减文库中筛选出了一些同源性较高的滞育与非滞育特征基

因,主要有:在非滞育幼虫中表达量较高的带芳基贮存蛋白、贮存蛋白 1、过氧化氢酶、热激蛋白 90、VHDL 受体和 14-3-3 zeta 等的基因;而苹果酸脱氢酶、滞育关联蛋白 1、滞育关联蛋白 2、信息素激活肽和保幼激素敏感的血淋巴蛋白等的基因在滞育幼虫中表达量较高。

3 结论与讨论

对梨小食心虫幼虫 2 个差减文库的已知功能序列分析发现,滞育幼虫中代谢酶和滞育关联蛋白基因表达量较高;而在非滞育幼虫中贮存蛋白和信号传递基因表达量则较高。从文库中获得了与非滞育幼虫准备进入蛹期密切相关的带芳基贮存蛋白、14-3-3 zeta、过氧化氢酶和热激蛋白 90 等基因,以及与滞育密切相关的苹果酸脱氢酶、滞育关联蛋白 1、滞育关联蛋白 2、保幼激素敏感的血淋巴蛋白和信息素激活肽等基因。这些 EST 基本上反映了昆虫在滞育与非滞育期间的基因表达谱。梨小食心虫滞育时期其代谢酶、滞育关联蛋白和激素类物质表达较

高,说明在滞育期间物质转化代谢过程比非滞育期间相对活跃,且保幼激素等与滞育有关的激素对滞育幼虫还是很敏感的;而非滞育幼虫中有大量的信号传递、贮存蛋白和保护酶基因。信号传递蛋白种类的增加说明,在非滞育幼虫化蛹前神经系统需要收集、传导和调节环境及体内的各种信号,并对其做出反应;贮存蛋白的大量表达为化蛹合成大量的贮存蛋白以备蛹期变态之需;保护酶增加有助于清除细胞中有害的氧化物质以起到防御作用。

在梨小食心虫滞育与非滞育差减文库中,从挑选出的几个基因来看,贮存蛋白只存在于非滞育梨小食心虫中,而滞育关联蛋白只存在于滞育梨小食心虫中。贮存蛋白可为昆虫化蛹提供能量,在通常报道中贮存蛋白在滞育幼虫中含量很高^[21],梨小食心虫与之不同的结果值得进一步通过 qPCR 进行验证:究竟是滞育梨小食心虫中不含有贮存蛋白或含量极低,还是未在文库中筛选出来;另外,一般认为滞育关联蛋白也是一种贮存蛋白,但在梨小食心虫中,滞育关联蛋白只存在于滞育文库中,说明传统意义上所说的滞育关联蛋白与贮存蛋白仍是有差异的,进一步对这 2 种蛋白进行表达时期及结构的研究,可极大地丰富对滞育关联蛋白与贮存蛋白的认识,更加明确其各自功能。

[参考文献]

- [1] 邹钟琳,曹骥.中国果树害虫[M].上海:上海科学技术出版社,1958:69-72.
Zou Z L, Cao J. Chinese fruit pests [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1958: 69-72. (in Chinese)
- [2] 候宪春,王丹青,李体鹏.梨小食心虫的发生与综合防治[J].山东林业科技,2001(增1):49-50.
Hou X C, Wang D Q, Li T P. The occurrence and control of *Grapholita molesta* (Busck) [J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2001(S1): 49-50. (in Chinese)
- [3] 刘红敏,汪新娥,胡肆珍.梨小食心虫的发生与防治[J].河南农业科学,2005(1):74-75.
Liu H M, Wang X E, Hu Y Z. The occurrence and control of *Grapholita molesta* (Busck) [J]. Henan Agricultural Science, 2005(1): 74-75. (in Chinese)
- [4] 黎彦,杜华,段根昌.2006年黄河故道地区梨小食心虫大发生的原因及防治对策[J].果农之友,2007(7):34-35.
Li Y, Du H, Duan Y C. The reason of outbreaking of *Grapholita molesta* (Busck) near Yellow river and control strategy in 2006 [J]. Fruit Growers Friend, 2007(7): 34-35. (in Chinese)
- [5] 冯恒林,于存周.砀山地区梨小食心虫的发生与防治[J].北方果树,2006(4):57-58.
Feng H L, Yu C Z. The occurrence and control of *Grapholita molesta* (Busck) on Dangshan [J]. Northern Fruits, 2006(4):

- 57-58. (in Chinese)
- [6] 林云光,张宝年,年志伟,等.油桃梨小食心虫防治[J].北方果树,2007(4):29-30.
Lin Y G, Zhang B N, Nian Z W, et al. Control of *Grapholita molesta* (Busck) on nectarine [J]. Northern Fruits, 2007(4): 29-30. (in Chinese)
- [7] Yamashita O, Hasegawa K. Embryonic diapause, comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology [M]. Oxford: Pergamon Press, 1985: 407-434.
- [8] 徐卫华.昆虫滞育的研究进展[J].昆虫学报,1999,42(1):100-107.
Xu W H. Advances in insect diapause studies [J]. Acta Entomologica Sinica, 1999, 42(1): 100-107. (in Chinese)
- [9] 徐卫华,佐藤行洋,山下兴亚.家蚕滞育激素基因的克隆[J].遗传学报,1995,22(3):178-182.
Xu W H, Yukihiro Sato, Okitsugu Yamashita. Cloning of the diapause hormone gene of the silkworm (*Bombyx mori*) [J]. Acta Genetica Sinica, 1995, 22(3): 178-182. (in Chinese)
- [10] Sato Y, Oguchi M, Menjo N, et al. Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the SG of the silkworm, *Bombyx mori*: Characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of addition peptides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90: 3251-3255.
- [11] Saito H, Takeuchi Y, Yakeda R, et al. The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Peptides, 1994, 15: 1173-1178.
- [12] Xu W H, Sato Y, Ikeda M, et al. Molecular characterization of gene encoding the precursor protein of DH-PBAN of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects [J]. Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, 1995, 1261: 83-89.
- [13] 顾燕燕,华荣胜,周耐明,等.家蚕滞育激素受体基因(*Bm-DHR*)的分子克隆及定量分析[J].蚕业科学,2008,34(3):417-423.
Gu Y Y, Hua R S, Zhou N M, et al. Cloning and quantitative analysis of diapause hormone receptor gene in the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. Science of Sericulture, 2008, 34(3): 417-423. (in Chinese)
- [14] 冯国忠,黎万顺,陈斌,等.葱蝇夏滞育蛹的全长 cDNA 文库构建[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(6):89-94.
Feng G Z, Li W S, Chen B, et al. Construction of a full-length cDNA library of summer-diapause pupae of the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2010, 32(6): 89-94. (in Chinese)
- [15] Cheng W N, Li X L, Yi F, et al. Proteomic analysis of pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) [J]. European Journal of Entomology, 2009, 106(1): 29-35.