家蚕 FoxG 转录因子的鉴定及其在精巢发育中的功能初探*

胡启豪** 裴梦圆** 赵丹珲 戴玉玲 肖妍虹
莫东君 程心海 余小强 卢玉珍***

（广东省昆虫发育调控与应用研究重点实验室，华南师范大学生命科学学院，广州 510631）

摘 要 **【目的】**Fox 家族蛋白是调控动物发育的关键转录因子。本文分析了鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 的 BmFoxG 亚家族蛋白在精巢发育中的作用，为基于生殖系统的家蚕性状优化或害虫不育技术的开发提供理论依据。**【方法】**利用 PCR 克隆家蚕 *BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 基因；通过生物信息学工具对 BmFoxG 蛋白的结构及理化性质进行分析；采用 qPCR 技术检测 *BmFoxG* 基因在家蚕不同发育阶段的精巢中的表达变化；在家蚕 Bm12 细胞株中过表达 BmFoxG-1，并通过 qRT-PCR 分析 BmFoxG-1 调控的靶基因。**【结果】**本文克隆获得了 *BmFoxG-1*（933 bp）和 *BmFoxG-2*（702 bp）两个基因。BmFoxG-1 和 BmFoxG-2 蛋白均包含保守的 Forkhead 结构域，但 BmFoxG-1 蛋白在 C 端多出约 60 个氨基酸。*BmFoxG-2* 基因在家蚕不同发育时期的精巢中的表达量均较低；*BmFoxG-1* 的表达均显着高于 *BmFoxG-2*，且随着发育时期而变化，暗示 *BmFoxG-1* 参与精巢的发育。生殖细胞发育基因 *BmVasa*、*BmCyclinA* 等多个细胞周期基因以及精子鞭毛发育相关基因 *BMSK0009828* 在不同发育阶段的精巢中的表达趋势与 *BmFoxG-1* 类似，且 *BmFoxG-1* 在家蚕细胞中的过表达可以显著上调 *BmVasa*、*BmCyclinA* 和 *BMSK0009828* 等精巢发育相关基因的表达。**【结论】**我们推测 BmFoxG-1 蛋白可能通过调节精巢细胞周期或生殖细胞的功能来调节家蚕精巢的发育。

关键词 家蚕；精巢；发育；转录因子；Fox 家族蛋白

Identification and functional analysis of FoxG transcription factors in the silkworm, *Bombyx mori*

HU Qi-Hao** PEI Meng-Yuan** ZHAO Dan-Hui DAI Yu-Ling XIAO Yan-Hong
MO Dong-Jun CHENG Xin-Hai YU Xiao-Qiang LU Yu-Zhen***

(Guangdong Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract **[Objectives]** The Fox transcription factor family has been shown to play a critical role in the development of insects. In this study, we investigate the function of *Bombyx mori* FoxG (BmFoxG) in the development of the testis, which may facilitate developing a strategy to increase the production of silkworms, or the control of pests by targeting their reproductive system. **[Methods]** The full-length cDNAs of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2* ORFs were cloned from testis RNA samples by PCR and bioinformatics tools used to analyze the characteristics of the two deduced amino acid sequences. The expression levels of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2* in the testis of different developmental stages was determined by real-time quantitative PCR (QRT-PCR). BmFoxG-1 was then overexpressed in *B. mori* Bm12 cells and the potential genes that might be regulated by BmFoxG-1 detected by QRT-PCR. **[Results]** The full length ORFs of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2* were 933 bp and 702 bp,

*资助项目 Supported projects：广东省自然科学基金（2018A030313768）；国家重点研发计划（2019YFD1002100）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：huqihx@163.com；2794202755@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：luyuzhen2015@outlook.com

收稿日期 Received：2020-04-23；接受日期 Accepted：2020-07-16

respectively, and both proteins contain the conserved Forkhead domain with BmFoxG-1 having a longer C-terminal region. The mRNA expression level of *BmFoxG-2* remained low in the testis of different developmental stages, but the transcript level of *BmFoxG-1* changed during development and was always significantly higher than that of *BmFoxG-2*, suggesting that *BmFoxG-1* may play a major role in testis development. Several cell cycle related genes, including *BmVasa* and *BmCyclinA*, were up-regulated in Bm12 cells overexpressing BmFoxG-1. **[Conclusion]** BmFoxG-1 may participate in testis development in *B. mori* by regulating the function, or cell cycle processes, of germline cells.

Key words *Bombyx mori*; testis; development; transcription factor; Fox protein family

家蚕是重要的经济益虫，蚕丝制品具有重要的经济和文化价值。家蚕强大的繁殖力是蚕丝制品能够商业化和产业化的重要原因之一。精巢是雄性家蚕的繁殖器官，位于雄蚕第 5 腹节下方，左右各一个，呈肾型，是精子发生和成熟的场所。对精巢发育调控的研究有助于后代优良性状的筛选以及害虫不育技术的开发。目前认为精巢的发育受到激素、营养和环境等信号因子的调节（Kawamura *et al.*，2003；Hamada and Fugo，2007；Yuan *et al.*，2016）。在分子水平上，已报道表明转录因子 *BmTgif*、*BmDnmt1* 和 GTP 酶 *BmRabX6* 等，可能参与家蚕精巢发育的调控（Zhang *et al.*，2012；Li *et al.*，2019；Uno *et al.*，2019）。有趣的是，先天免疫相关基因 *BmNPC-1* 也可能在家蚕精巢发育中发挥重要作用（Ke *et al.*，2020）。这些研究表明家蚕精巢发育受不同信号通路影响，是一个多基因共同精细调控的过程。

Fox 超家族蛋白广泛存在于除植物之外的多种生物体中，家族成员含有一个约 100 个氨基酸的高度保守的 DNA 结合结构域，外型呈“翼状”螺旋，称为“Forkhead”结构域，在昆虫发育和先天免疫等生物学过程中均发挥重要作用（Liu and Lehmann，2008；Zhong *et al.*，2017；Hu *et al.*，2019）。FoxG 亚家族属于 Fox 超家族蛋白的一员，在脊椎动物中主要参与脑的发育。*FoxG1* 的突变或过表达均能引起小鼠或鸡大脑皮质的异常发育，因此 FoxG1 也被称为脑因子 1（Brain factor 1，BF-1）（Ahlgren *et al.*，2003；Shen *et al.*，2006）。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中，*FoxG* 的表达受到 Wingless 信号通路的调节，参与不同组织的发育（Lee and Frasch，2005）。家蚕 *BmFoxG-1* 的表达受到大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的诱导，可能参与先天免疫反应（Tanaka *et al.*，2010）。我们之前的研究发现，*BmFoxG* 基因的表达可能受 BmKr-h1 调控，与雌性家蚕卵母细胞及胚胎的发育相关（Zhu *et al.*，2020）。DNA 微阵列（Microarray）数据显示，*BmFoxG* 亚家族基因在家蚕精巢中也有表达（Song *et al.*，2015）。

本研究在家蚕中鉴定了 FoxG 亚家族的 *BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 基因，并利用生物信息学方法对两个基因及蛋白结构进行了分析。另外，我们利用 qRT-PCR 的方法测定了两个 *BmFoxG* 基因在家蚕不同发育阶段精巢中的表达情况。最后，我们在家蚕 Bm12 细胞中过表达 BmFoxG-1 蛋白，并分析了 *BmVasa* 等生殖和细胞周期相关基因的表达变化。我们的结果初步说明 BmFoxG-1 蛋白参与了家蚕精巢的发育。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

供试家蚕品种大造的 5 龄幼虫由广东省蚕业技术推广中心提供。蚕卵在（26 ± 1）℃和相对湿度 80%的条件下催青，采用桑叶饲养幼虫，并置于温度（26 ± 1）℃、相对湿度 65%-75%、L：D = 12：12 的培养箱中饲养。家蚕 Bm12 细胞、大肠杆菌 DH5α 和细胞过表达载体 IE1-pEGFP-N1 等皆为本实验室保存材料。

Taq DNA 酶、PCR 扩增试剂盒、Trizol 总 RNA 提取试剂、反转录试剂盒等购自 TaKaRa 生物技术有限公司；细胞转染试剂购自 Promega

公司；DNA marker，qRT-PCR 试剂购自上海翊圣生物科技有限公司；引物及 DNA 测序服务由北京擎科新业生物技术有限公司提供；质粒小量抽提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司；实验所用其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2　生物信息学分析

从家蚕基因组数据库 SilkDB（https://silkdb.bioinfotoolkits.net/）中获得 *BmFoxG-1*（BGIBMGA010297）和 *BmFoxG-2*（BGIBMGA010490）基因及蛋白质序列。蛋白质理化性质预测通过 ExPASy（http://www.expasy.org）进行，磷酸化位点及糖基化位点利用 Cbs 网站（http://www.cbs.dtu.dk）进行分析，蛋白结构域和三维结构分别利用 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）和 Swiss model（https://swissmodel.expasy.org/）分析。

1.3　cDNA 制备、基因组 DNA 提取及 *BmFoxG* 基因的克隆

收集 5 龄第 3 天雄性家蚕，在 PBS 缓冲液中进行解剖并取出精巢。按 TRI Isolate 总 RNA 抽提试剂盒步骤，提取幼虫精巢总 RNA，利用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒将所提取的 RNA 反转录成 cDNA。

精巢基因组提取方法如下：收集 5 龄第 3 天家蚕精巢，加入适量消化液后进行匀浆，并在 50 ℃下消化过夜。加入等体积的 Tris 饱和酚，温和颠倒至混匀，12 000 g 离心 10 min。取上清，加入等体积氯仿：异戊醇（24：1），温和颠倒至混匀，12 000 g 离心 10 min。取上清，加入 2.5 倍体积的无水乙醇，混匀后置于 - 20 ℃环境下静止 1 h，12 000 g 离心 10 min，弃上清。加入 75%乙醇洗涤沉淀，12 000 g 离心 10 min，弃上清。待沉淀干燥后加入适量水溶解，并加入适量 RNase，于 37 ℃处理 1 h，去除 RNA，即得精巢基因组 DNA。

根据 *BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 的 cDNA 序列，设计上下游引物（表 1），分别以家蚕幼虫精巢 cDNA 及基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，扩增产物以 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，并进行凝胶回收。将回收片段与 pMD-19T 载体进行连接，经菌落 PCR 与双酶切验证后，送擎科公司测序。

1.4　*BmFoxG* 基因在家蚕不同发育阶段精巢中的表达

按上述方法收集从 5 龄第 3 天至成虫雄性家蚕的精巢，提取 RNA，并将其反转录成 cDNA，加入适量 ddH_2O 将其稀释至合适的浓度。

以稀释后的 cDNA 为模板，采用 qRT-PCR 方法分析目标基因的表达情况，以家蚕 *rp49* 作为内参基因。qRT-PCR 循环条件如下：95 ℃ 5 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s。

1.5　BmFoxG-1 在 Bm12 细胞株中的过表达

将 Bm12 细胞用新鲜培养基悬浮，分装至 12 孔板中，并补足培养基至每孔 1 mL，当每孔细胞密度达到 80%以上时，进行转染。将质粒和转染试剂按照 1∶2 进行混合，并加入适量无血清培养基，混匀后于室温静置 15 min 后，加入细胞中。培养 48 h 后，收集细胞，按上述方法提取 RNA 并反转录成 cDNA，利用 qRT-PCR 检测相应基因的表达变化。

2　结果与分析

2.1　*BmFoxG* 基因克隆与序列特征分析

从家蚕基因组数据库 SilkDB 中获得 *BmFoxG*-1（BGIBMGA010297）和 *BmFoxG*-2（BGIBMGA010490）基因序列，它们的 ORFs 全长分别为 933 bp 和 702 bp，分别编码 310 和 233 个氨基酸。

通过该序列设计引物，以家蚕 5 龄第 3 天幼虫精巢基因组 DNA（图 1：A）及 cDNA（图 1：B）为模板，PCR 扩增两个目的基因。电泳结果显示，在 1 000 bp 及 750 bp 附近均出现单一条带。通过测序比对，并结合 SilkDB 的数据，我们认为 *BmFoxG-1* 及 *BmFoxG-2* 均只含一个外显子（图 1：C）。

表 1 实验所用引物的序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′−3′） Primer sequences (5′−3′)
克隆 *BmFoxG* 开放阅读框引物 Primers for cloning ORF of *BmFoxG*	
BmFoxG-1-F	ATGAATCATGCAGCCTCCAAG
BmFoxG-1-R	TCACTGCCTCGTGAGAACCG
BmFoxG-2-F	ATGAGTCCTCCGCACAGCTT
BmFoxG-2-R	TCAACTGTGCTTGACGAGGTG
实时定量 PCR 引物 Primers for qRT-PCR	
BmFoxG1-q-F	ACCATCGCTACACTCTCCGC
BmFoxG1-q-R	CTGCCTCGTGAGAACCGTCA
BmFoxG2-q-F	GGCGGCACATAAAGCGATGA
BmFoxG2-q-R	GAAGCTGTGCGGAGGACTCA
BmNanos-q-F	AAGCTCTTCGCCAGAAGCGA
BmNanos-q-R	GGCAGCGGAACCCTCTAAGT
BmVasa-q-F	ACTGGTCGCGTAGGAAACAG
BmVasa-q-R	AATGTAGCAGTGCCACCTCC
BmCyclinA-q-F	CTCTCAACACCCACCTCAC
BmCyclinA-q-R	CGCTGCTATTACTGAGGGT
BmCyclinB-q-F	TTGCGAGACCGATACCTTTG
BmCyclinB-q-R	AGATTGCTGCCGCTGCTA
BmCyclinB3-q-F	CATAAAACTCCTTCTGGTGT
BmCyclinB3-q-R	TAATCGTCAATAGGGAAAAG
BmCyclinL1-q-F	TACAAAGGTTTTACTACTCG
BmCyclinL1-q-R	GATTACATCTCTTATTCTGC
BMSK0009828-q-F	ATGCACGCAGGTTCAGCCAT
BMSK0009828-q-R	TGACTTCCGCGTCCGTTTCC
BMSK0011587-q-F	GCGCAACTCTGGCTTTGTCT
BMSK0011587-q-R	TCTCGGTCAGCTTGGCTTGT
BmRp-49-q-F	CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC
BmRp-49-q-R	TACGGAATCCATTTGGGAGCAT

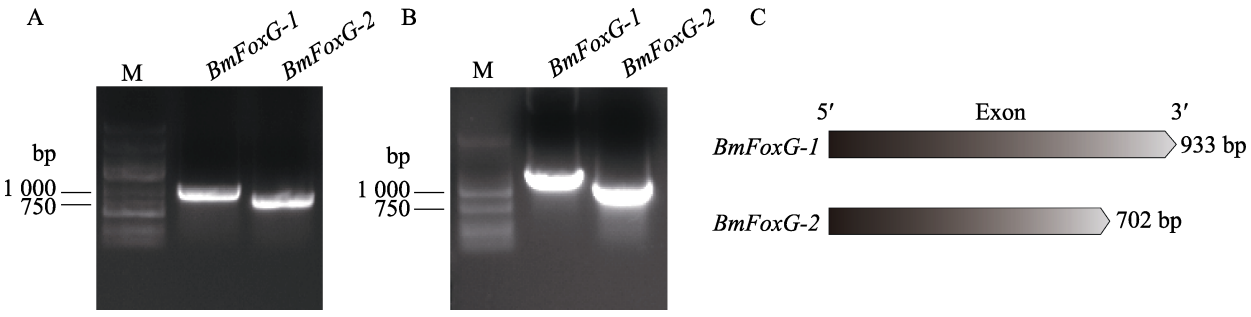

图 1 *BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 基因克隆及基因结构示意图

Fig. 1 Cloning and schematic diagram of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2*

A，B. 以精巢基因组和 cDNA 为模板克隆 *BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 基因；C. 基因结构示意图。

A, B. Cloning of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2* using genomic DNA and cDNA as templates; C. Schematic diagram of the two genes.

2.2　BmFoxG 蛋白的结构及理化性质分析

通过 ExPASy 网站对 BmFoxG 蛋白的理化性质分析显示 BmFoxG-1 和 BmFoxG-2 蛋白预测分子量分别为 32.6 ku 和 26.1 ku，等电点（pI）为 9.08 和 9.65，均为碱性蛋白质（表 2）。

通过 SMART 和 Swiss model 数据库对两个 BmFoxG 蛋白结构域及三维结构进行预测。结果显示，BmFoxG-1 和 BmFoxG-2 蛋白均包含一个 Forkhead 结构域，即由螺旋-环-螺旋组成的“翼”状螺旋结构，分别位于 BmFoxG-1 和 BmFoxG-2 的 53-143 及 49-139 氨基酸处。另外，BmFoxG-1 蛋白的 N 端和 C 端均可能形成低复杂结构（Low complexity），而 BmFoxG-2 可能仅在 C 端形成低复杂结构（图 2：A，B）。两个蛋白的序列比对结果显示，BmFoxG-1 的 C 端比 BmFoxG-2 的 C 端多出约 60 个氨基酸的肽段（图 2：C）。

通过 NetGlycate 和 NetPhos 分别对两个 BmFoxG 蛋白进行糖基化及磷酸化位点预测，结果显示两个 BmFoxG 蛋白均含若干个糖基化及磷酸化位点（表 2），说明 BmFoxG 的活性可能受到磷酸化和去磷酸化等翻译后修饰的影响。

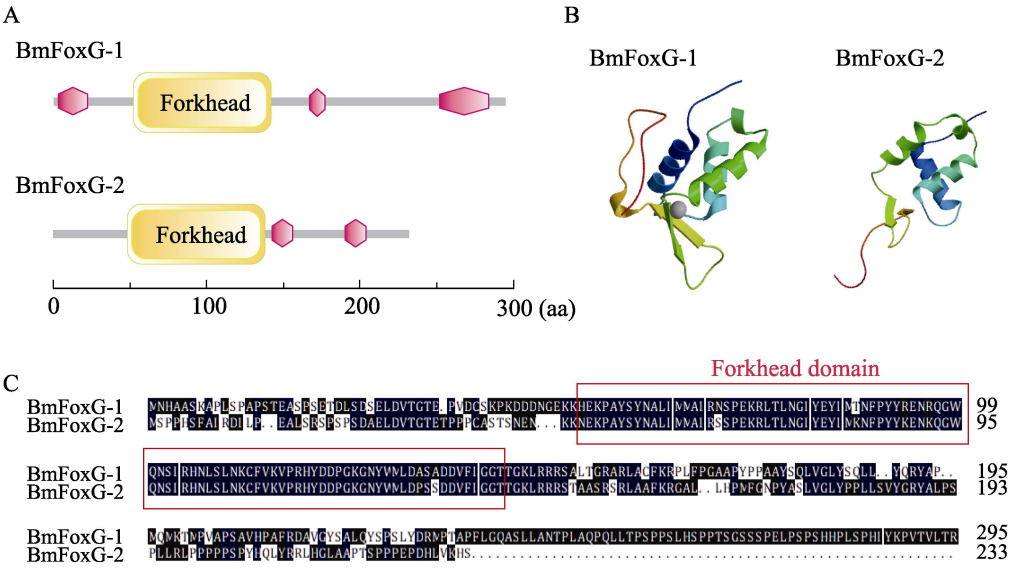

图 2　BmFoxG-1 和 BmFoxG-2 蛋白结构分析（A，B）及氨基酸序列比对（C）

Fig. 2　Structural analysis (A, B) and sequence aglinment (C) of BmFoxG-1 and BmFoxG-2

表 2　BmFoxG-1 和 BmFoxG-2 蛋白理化性质分析

Table 2　Physical and chemical characteristics of BmFoxG-1 and BmFoxG-2

基因名称 Gene name	家蚕基因组数据库编号 SilkDB ID	氨基酸数 Size (aa)	蛋白质分子量 Protein molecular weight (ku)	等电点 pI	磷酸化位点 Phosphorylation site	糖基化位点 Glycosylation site
BmFoxG-1	BGIBMGA010297	310	32.6	9.08	37	8
BmFoxG-2	BGIBMGA010490	233	26.1	9.65	29	7

2.3　*BmFoxG* 基因在精巢中的表达

为了分析 *BmFoxG* 基因在精巢中的表达模式，本文收集了家蚕 5 龄第 3 天幼虫到成虫的精巢。荧光定量分析显示 *BmFoxG-2* 在不同发育阶段的精巢中的表达水平没有显着变化，均保持在较低的水平；而 *BmFoxG-1* 的表达随着发育时期而变化，且表达水平均显着高于 *BmFoxG-2*。在 5 龄幼虫末期，*BmFoxG-1* 的表达最低，从游走期开始上升，在蛹期第一天到达最高峰，随后逐渐下降（图 3：A）。

随后，我们检测 *BmFoxG-1* 基因在游走期第 2 天家蚕精巢内容物及精巢膜中的表达情况。结果显示，*BmFoxG-1* 在精巢内容物中的表达均显

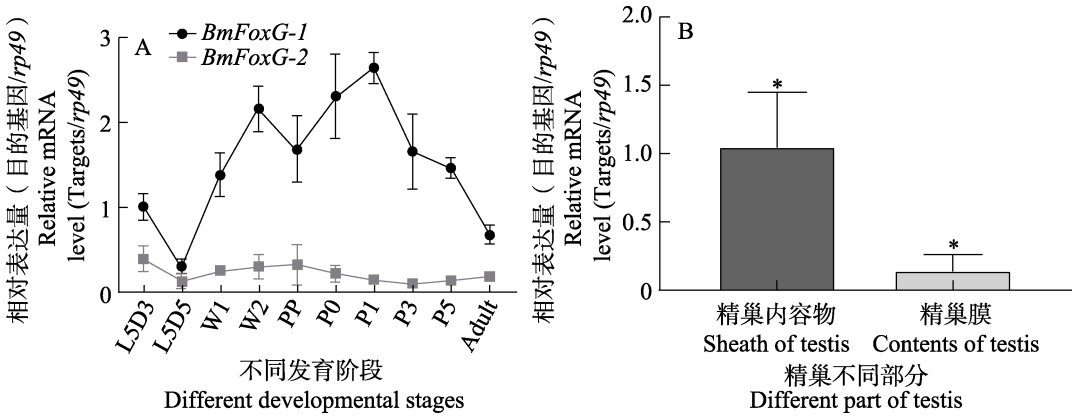

图 3　*BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 基因在家蚕精巢中的表达

Fig. 3　Expression of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2* transcripts in the testis of silkworm

A. *BmFoxG-1* 和 *BmFoxG-2* 基因在不同发育阶段的精巢中的表达变化；B. *BmFoxG-1* 基因在精巢内容物与精巢膜中的表达。柱上标有星号表示精巢内容物与精巢膜的表达差异显着（$P < 0.05$，*t*-检验）。

A. Expression of *BmFoxG-1* and *BmFoxG-2* transcripts in the testis of silkworm at different developmental stages; B. Expression of *BmFoxG-1* mRNA in different parts of the testis at day 2 of wandering stage larvae. The asterisk above the column indicates significant difference between expression in the sheath of testis and the contents of testis ($P < 0.05$, *t*-test).

L5D3：5 龄第 3 天；L5D5：5 龄第 5 天；W1：游走期第 1 天；W2：游走期第 2 天；PP：预蛹期；P0：蛹期第 0 天；P1：蛹期第 1 天；P3：蛹期第 3 天；P5：蛹期第 5 天；Adult：成虫。下图同。

L5D3: Day 3 of the 5th instar; L5D5: Day 5 of the 5th instar; W1: Day 1 of wandering stage; W2: Day 2 of wandering stage; PP: Prepupa; P0: Day 0 after pupation; P1: Day 1 after pupation; P3: Day 3 after pupation; P5: Day 5 after pupation. The same below.

著高于精巢膜（图 3：B）。因此推测 *BmFoxG-1* 可能参与家蚕精巢，尤其是精子的发育。

2.4　BmFoxG-1 对精巢生殖细胞发育的影响

雄性生殖干细胞经过一系列分化和增殖，最终发育为成熟的精子。在上述实验中，我们发现 *BmFoxG-1* 可能参与家蚕精子发育。为进一步分析其作用机制，我们构建了 BmFoxG-1-EGFP 细胞过表达载体，并将其转染 Bm12 细胞株，利用 qRT-PCR 分析相关基因的表达变化。

我们首先分析了 BmFoxG-1 对生殖细胞发育中两个关键基因 *BmVasa* 和 *BmNanos* 的表达影响。结果显示，过表达 BmFoxG-1 后，*BmVasa* 的表达显著上调，*BmNanos* 的表达也上调了但与对照相比不显著（图 4）。

此外，细胞周期蛋白的功能与生殖细胞有丝分裂和减数分裂等过程有着密不可分的关系。为此，我们分析了 4 个细胞周期蛋白基因（*BmCyclinA*、*BmCyclinB*、*BmCyclinB3* 和 *BmCyclinL1*）在 BmFoxG-1 过表达细胞株中的表达情况。结果显示，过表达 BmFoxG-1 后，*BmCyclinA*、*BmCyclinB* 和 *BmCyclinB3* 的表达均显著上调（图 4）。

此外，*BmCyclinA*，*BmCyclinB* 和 *BmCyclinB* 细胞周期基因在家蚕不同发育阶段精巢中的表达变化趋势与 BmFoxG-1 相似，*BmVasa* 基因在蛹期和成虫中的表达趋势也与 *BmFoxG-1* 类似（图 5）。因此，我们推测 BmFoxG-1 可以通过调节生殖细胞的发育过程，影响精子的发生。

2.5　BmFoxG-1 对精子成熟相关基因表达的影响

鞭毛主要负责精子的运动，其形成也是精子成熟过程中的重要事件。果蝇的 *HEATR2*（*CG31320*）和 *Zmynd10*（*CG11253*）基因编码育性相关的鞭毛蛋白，其在家蚕中的同源基因分别为 *BMSK0009828* 和 *BMSK0011587*。我们在 BmFoxG-1 过表达细胞株中测定了这两个家蚕鞭毛蛋白基因的表达情况。结果显示，过表达 BmFoxG-1 可以显着促进 *BMSK0009828* 的表达，但对 *BMSK0011587* 的表达没有显着影响（图 6：A），且 *BMSK0009828* 在精巢发育中的表达变化与 *BmFoxG-1* 相近（图 6：B）。因此，我们推测

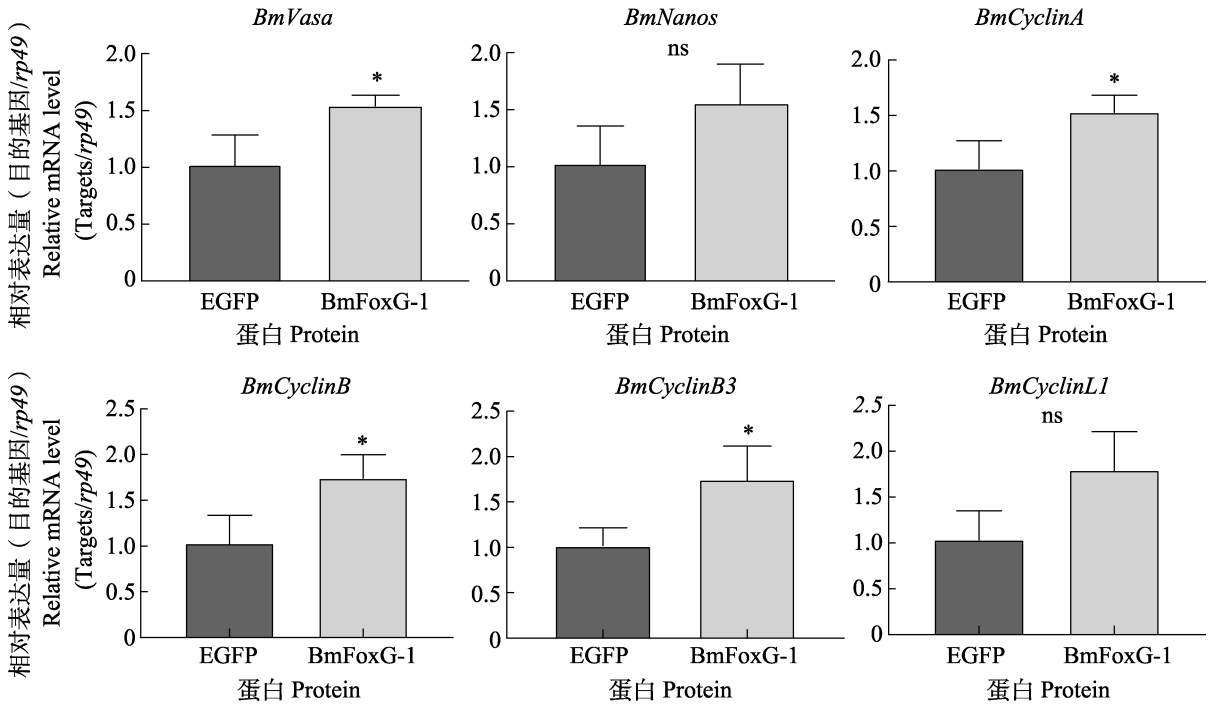

图 4　BmFoxG-1 对精子发生相关基因表达的影响

Fig. 4　Effect of BmFoxG-1 overexpression on the expression of genes related to spermatogenesis

柱上标有星号表示该处理组与对照组差异显着（$P < 0.05$，*t*-检验）；
ns 表示该处理组与对照组差异不显着（$P > 0.05$，*t*-检验）。图 6 同。

Asterisks above the columns indicate significant difference between the treatments and control groups ($P < 0.05$, *t*-test), and "ns" indicates no significant difference between the treatments and control groups ($P > 0.05$, *t*-test). The same as Fig. 6.

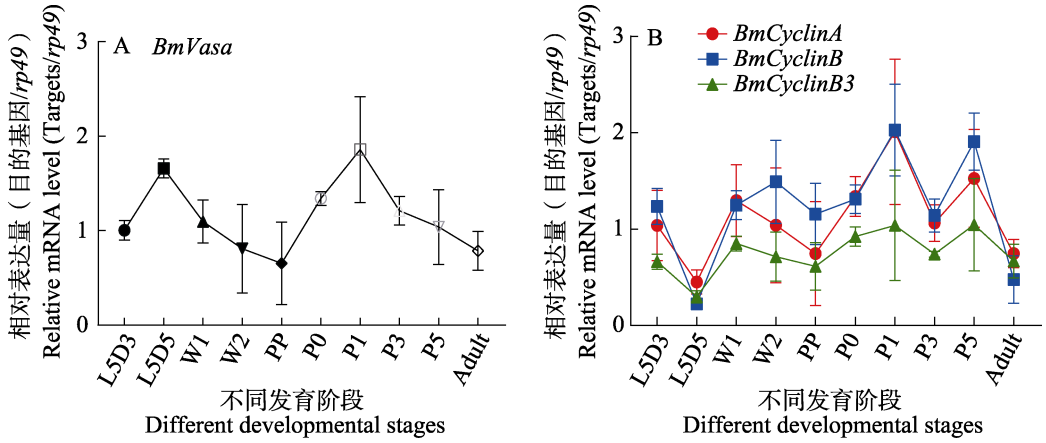

图 5　*BmVasa*（A）及细胞周期相关基因（B）在不同发育阶段精巢中的表达变化

Fig. 5　Expression of *BmVasa* (A) and cell cycle (B) related genes in the testis of silkworm at different developmental stages

BmFoxG-1 不仅可以影响精子的发生，还可能参与精子成熟的过程。

3　讨论

本研究中鉴定了家蚕精巢中 FoxG 亚家族的两个基因，并根据 SilkDB 的编号命名为 BmFoxG-1 和 BmFoxG-2。通过生物信息学对两个 BmFoxG 蛋白的结构进行分析，发现两个蛋白都含有保守的 Forkhead 结构域，但 BmFoxG-1 在 C 端比 BmFoxG-2 多了一段约 60 个氨基酸的

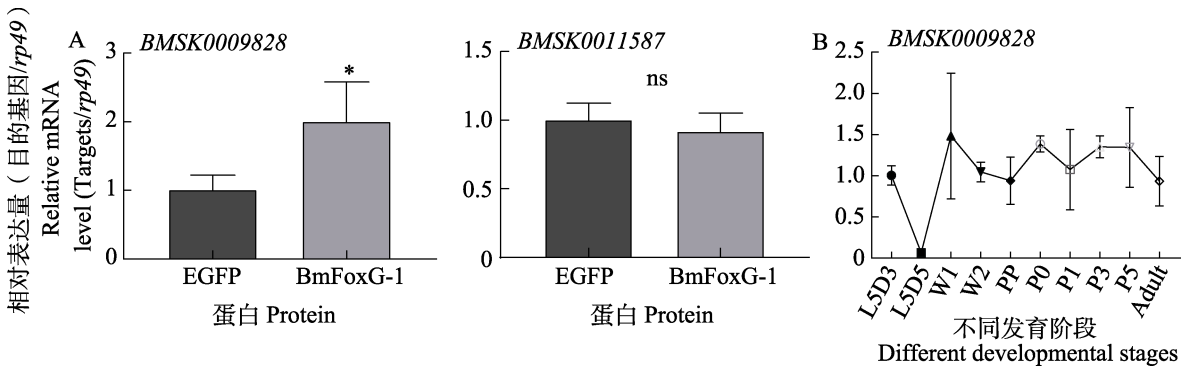

图 6　BmFoxG-1 对动力蛋白臂相关基因表达的影响

Fig. 6　Effect of BmFoxG-1 overexpression on the expression of genes related to dynein arms

A. 过表达 BmFoxG-1 后动力蛋白臂相关基因表达变化；B. *BMSK009828* 在不同发育阶段精巢中的表达变化。

A. Expression of genes related to dynein arms after overexpressing BmFoxG-1 in Bm12 cell; B. Expression of *BMSK009828* in the testis of silkworm at different developmental stages.

肽段，很可能导致两个蛋白在功能上存在差异。qRT-PCR 结果显示，*BmFoxG-2* 在不同发育阶段的精巢中的表达没有显着变化且维持在较低水平，但 *BmFoxG-1* 的表达随着发育时期而变化，且表达水平都显着高于 *BmFoxG-2*，暗示 *BmFoxG-1* 主要负责调节精巢的发育。在之前的研究中发现 BmKr-h1 可能通过调节 *BmFoxG-2* 的表达影响家蚕卵母细胞的发育（Zhu *et al.*，2020）。结合本文的研究结果，我们推测 BmFoxG-1 蛋白主要参与精巢和精子的发育，而 BmFoxG-2 可能参与卵母细胞的发育。

与大多数鳞翅目昆虫类似，家蚕具有二型精子，即有核精子和无核精子（Pereira and Santos，2015）。两种精子均由精原细胞发育而来，其中有核精子可以与卵细胞结合形成受精卵，无核精子则主要起辅助作用（Sahara and Kawamura，2002）。除了功能差异外，两种精子的形成时间也存在差异。目前研究认为，有核精子主要在幼虫阶段形成，无核精子则主要发生于吐丝期（Polanska *et al.*，2005；文靓等，2019）。我们的研究结果显示，*BmFoxG-1* 在 5 龄末期幼虫精巢中的表达最低，但在吐丝期迅速上升并维持在相对较高的状态，表明 *BmFoxG-1* 可能与精子的二型分化有关。

精子发生是从生殖细胞开始，经过有丝分裂和减数分裂后形成精细胞，精细胞再经历核变型等过程，最终发育为成熟的精细胞（文靓等，2019；贺真等，2020）。精子发生是一个复杂且精细的过程，这些过程需要生殖细胞特异性表达的 Vasa 蛋白、细胞周期蛋白、精子鞭毛相关蛋白等不同蛋白的参与（Styhler *et al.*，1998；Kadyrova *et al.*，2007；Moore *et al.*，2013）。通过在 Bm12 细胞中过表达 BmFoxG-1 和 qRT-PCR 实验，我们发现 BmFoxG-1 可以上调 *BmCyclinA* 等细胞周期蛋白基因和 *BmVasa* 基因，以及鞭毛蛋白基因的表达。因此，我们推测在家蚕精巢中，BmFoxG-1 可能通过影响细胞周期和精子鞭毛形成，调节精子发生的过程。

综上，本研究结果说明 BmFoxG-1 蛋白可能参与家蚕精巢，特别是精子的发育过程。这些结果进一步完善了 Fox 家族基因在昆虫发育中的功能，为通过提高精子质量优化家蚕性状或以生殖系统为靶标的害虫防治提供理论依据。

参考文献 (References)

Ahlgren S, Vogt P, Bronner-Fraser M, 2003. Excess FoxG1 causes overgrowth of the neural tube. *Journal of Neurobiology*, 57(3): 337–349.

Hamada H, Fugo H, 2007. Effect of fetal bovine serum on the enhancement of In-vitro cultivation of spermatocysts of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Zoological Science*, 24(12): 1251–1258.

He Z, Li DC, Wu F, 2020. From fruit fly to silkworm: An overview on insect spermatogenesis. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 32(12): 1322–1330. [贺真, 李德臣, 吴凡, 2020. 从果蝇到家蚕: 精子发生过程及调控机制概述. 生命科学, 32(12):

1322–1330.]

Hu QH, Zhu ZD, Zhao DH, Zeng BJ, Zheng SC, Song QS, Deng HM, Feng QL, 2019. *Bombyx mori* transcription factors FoxA and SAGE divergently regulate the expression of wing cuticle protein gene 4 during metamorphosis. *Journal of Biological Chemistry*, 294(2): 632–643.

Kadyrova LY, Habara Y, Lee TH, Wharton RP, 2007. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development*, 134(8): 1519–1527.

Kawamura N, Sahara K, Fugo H, 2003. Glucose and ecdysteroid increase apyrene sperm production in in vitro cultivation of spermatocysts of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 49(1): 25–30.

Ke XX, Chao H, Abbas MN, Kausar S, Gul I, Ji H, Yang L, Cui H, 2020. Niemann-Pick type C1 regulates cholesterol transport and metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* (Dazao). *International Journal of Biological Macromolecules*, 152: 525–534.

Li B, Hu P, Zhang S, Toufeeq S, Wang J, Zhao K, Xu X, Xu JP, Huang S, 2019. DNA methyltransferase BmDnmt1 and BmDnmt2 in silkworm (*Bombyx mori*) and the regulation of silkworm embryonic development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100(3): e21529.

Liu Y, Lehmann M, 2008. Genes and biological processes controlled by the *Drosophila* FOXA orthologue Fork head. *Insect Molecular Biology*, 17(2): 91–101.

Lee H, Frasch M, 2005. Nuclear integration of positive Dpp signals, antagonistic Wg inputs and mesodermal competence factors during *Drosophila* visceral mesoderm induction. *Development*, 132(6): 1429–1442.

Moore DJ, Onoufriadis A, Shoemark A, Simpson MA, zur Lage PI, de Castro SC, Bartoloni L, Gallone G, Petridi S, Woollard WJ, Antony D, Schmidts M, Didonna T, Makrythanasis P, Bevillard J, Mongan NP, Djakow J, Pals G, Lucas JS, Marthin JK, Nielsen KG, Santoni F, Guipponi M, Hogg C, Antonarakis SE, Emes RD, Chung EM, Greene ND, Blouin JL, Jarman AP, Mitchison HM, 2013. Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in humans and flies, cause primary ciliary dyskinesia. *American Journal of Human Genetics*, 93(2): 346–356.

Pereira MC, Santos DC, 2015. Testis morphology and dichotomic spermatogenesis in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). *Neotropical Entomology*, 44(5): 481–488.

Polanska MA, Ciuk MA, Cymborowski B, Bebas P, 2005. Germ cell death in the testis and its relation to spermatogenesis in the wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), effects of facultative diapause. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology*, 303(11): 1013–1029.

Sahara K, Kawamura N, 2002. Double copulation of a female with sterile diploid and polyploid males recovers fertility in *Bombyx mori*. *Zygote*, 10(1): 23–29.

Shen L, Nam HS, Song P, 2006. FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus*, 16(10): 875–890.

Styhler S, Nakamura A, Swan A, Suter B, Lasko P, 1998. vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development*, 125(9): 1569–1578.

Song J, Li Z, Tong X, Chen C, Chen M, Meng G, Chen P, Li C, Xin Y, Gai T, Dai F, Lu C, 2015. Genome-wide identification and characterization of Fox genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Functional & Integrative Genomics*, 15(5): 511–522.

Tanaka H, Suzuki N, Nakajima Y, Sato M, Sagisaka A, Fujita K, Ishibashi J, Imanishi S, Mita K, Yamakawa M, 2010. Expression profiling of novel bacteria-induced genes from the silkworm, *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 73(3): 148–162.

Uno T, Ozakiya Y, Furutani M, Sakamoto K, Uno Y, Kajiwara H, Kanamaru K, Mizoguchi A, 2019. Functional characterization of insect-specific RabX6 of *Bombyx mori*. *Histochemistry and Cell Biology*, 151(2): 187–198.

Wen L, Chen F, Chen YQ, Zhou LD, Liu YC, Feng QL, Liu L, 2019. The testis development and spermatogenesis in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of South China Normal University* (*Natural Science Edition*), 51(4): 47–56. [文靓, 陈丰, 陈亚青, 周来娣, 刘玉成, 冯启理, 刘琳, 2019. 斜纹夜蛾精巢的发育和精子的发生. 华南师范大学学报(自然科学版), 51(4): 47–56.]

Yuan H, Qin F, Guo W, Gu H, Shao A, 2016. Oxidative stress and spermatogenesis suppression in the testis of cadmium-treated *Bombyx mori larvae*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6): 5763–5770.

Zhang P, Cao G, Sheng J, Xue R, Gong C, 2012. BmTGIF, a *Bombyx mori* homolog of *Drosophila* DmTGIF, regulates progression of spermatogenesis. *PLoS ONE*, 7(11): e47861.

Zhong X, Chowdhury M, Li CF, Yu XQ, 2017. Transcription factor forkhead regulates expression of antimicrobial peptides in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Scientific Reports*, 7(1): 2688.

Zhu ZD, Hu QH, Tong CM, Yang HG, Zheng SC, Feng QL, Deng HM, 2020. Transcriptomic analysis reveals the regulation network of BmKruppel homolog 1 in the oocyte development of *Bombyx mori*. *Insect Science*, doi: 10.1111/1744-7917.12747.