

论转基因技术与家蚕新品种的选育

邓永进, 徐家萍, 张磊, 刘震 (1. 安徽省农业科学院蚕桑研究所, 安徽合肥 230031; 2. 安徽农业大学, 安徽合肥 230036)

摘要 介绍了家蚕转基因方法、国内家蚕品种选育的现状及国内外转基因家蚕品种选育进展, 并指出转基因技术是家蚕品种选育的重要途径。

关键词 转基因技术; 家蚕品种; 选育

中图分类号 S882.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10800-03

Discussion on Transgenic Technology and the Breeding of New Silkworm Variety

DENG Yongjin et al (Sericulture Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract The transgenic methods of silkworm, the current breeding status of silkworm varieties in China and the research progress on transgenic silkworm varieties at home and abroad were introduced. And it was pointed out that transgenic technology was the important approach of breeding silkworm varieties.

Key words Transgenic technology; Silkworm varieties; Breeding

转基因技术是指采用基因工程技术中的各种方法将外源目的基因(或特定的DNA片段)人为地导入目的细胞或生物个体, 并使其在细胞或生物体内稳定地表达或遗传^[1]。它是细胞生物学、分子生物学、遗传学、基因工程学、胚胎学等多学科、多技术的综合研究领域, 已成为当今生命科学中十分活跃的研究课题。利用转基因技术进行的动物育种, 直接将外源目的基因引入个体, 可克服物种遗传壁垒和有限育种资源的局限, 对改进育种方法, 获得品质优良、抗逆或抗病品种有着深远的意义。

随着现代蚕业的发展, 蚕业生产对家蚕新品种的需求呈现多元化的趋势, 传统的以杂交育种方法为主的育种技术已不能完全满足蚕业生产全方位、多层次发展的需要, 探索和发展新的家蚕育种手段是蚕业生产的迫切要求。现代生物科技的发展促使转基因技术成为家蚕育种的重要方式。由转基因技术获得的家蚕新品种或育种素材称之为转基因家蚕。转基因技术具有短时间内获得拥有目的性状的家蚕纯合体的特性, 因此国内外蚕业科技人员在该领域开展了卓有成效的研究, 创造了不少家蚕新品种和育种素材。蚕业生产上现已开始使用转基因家蚕新品种。转基因家蚕品种的应用可以说是常规育种技术的重大突破。

1 家蚕转基因技术方法

家蚕是一种完全变态昆虫, 一生经历卵、幼虫、蛹、成虫(蛾)4个时期, 为获得稳定表达的纯合转基因后代, 一般以尚处于单细胞状态的初产2~8h内的卵作为外源基因转入对象(人工授精法除外), 也有以幼虫、蛹及家蚕细胞BmN作为基因转入受体。由于家蚕是一种真核生物, 其基因组结构和功能比较复杂, 使得家蚕转基因技术面临着诸多问题, 但通过大量研究找到了多种对家蚕转基因的相对有效模式, 从而使外源基因能有效地转入、整合并获得高效表达的新品种和育种素材成为可能。

1.1 显微注射方法 动物转基因中使用最多、效果最好的一种方法。缺点是设备昂贵、技术性强, 不能批量处理蚕卵。该技术的要点是: 3h家蚕受精卵, 硅胶干燥, 电解钨丝, 旋转

钻孔, 显微注射。如李振刚等1989年将天蚕TCA显微注射入家蚕卵, 出现卵色变异^[2]。

1.2 病毒介导方法 利用逆转录病毒外源DNA整合进宿主染色体。该病毒能感染细胞并高效地整合到基因组, 且往往是单拷贝的, 是转基因的良好工具。Mori等利用AcNPV(核形多角体病毒)成功地把果蝇的热休克蛋白基因启动子与萤光素酶基因导入家蚕基因组^[3]。经PCR、Southern blotting检测, 萤光素酶已传至F2代。

1.3 电激法(电击法、电穿孔法) 张峰等采用此法将带有绿色荧光蛋白基因(GFP)的同源重组质粒导入早期受精蚕卵, 浸酸后约有50%的受精卵孵化, 蚕到5龄时在约5000条蚕中用紫外灯检测到3条蚕身上带有绿色荧光斑点^[4]。利用电穿孔法对细菌、酵母、细胞株进行外源基因的转移已是成功的技术。因为细菌、酵母都有细胞壁, 因此, 该项技术可能对植物或家蚕卵也是可行的。据张峰等报道, 他们能成功地把外源DNA导入蚕卵。

1.4 基因枪轰击方法 先以氯化钙、亚精胺等沉淀剂促进DNA与金属微粒的结合, 然后用基因枪把高速运动的带有外源DNA的金属微粒(钨粉、金粉)射入受体的细胞中。基因枪分为火药式、电动式和气动式。对于家蚕来说, 以500~600m/s的速度, 可以穿透卵壳, 每一卵内可检测到10粒左右金属微粒。蚕卵发育正常。DNA浓度越高, 转化效率越高。但浓度过高会造成与金属微粒形成凝结, 一般采用1μg/μl。钨粉毒性较大, 最好采用金粉^[5]。

1.5 精子载体方法 精子载体法是将外源目的基因DNA与精子一起孵育, 期望精子能携带外源DNA, 通过受精过程将外源DNA导入受精卵。一般分为直接注射法、人工授精法和精液孵化法等。精子就像一枚极准确的击向雌原核的导弹, 如果把外源DNA与精子一起培育, 希望精子能携带DNA, 通过受精过程, 把DNA送进卵核。现在还不知精子携带DNA的确切机制, 但有试验证明DNA可以与精子头部结合, 也可能进入精子头部。有试验报告指出, 兔、小鼠、猪、牛、羊、鸡、人等的精子具有吸取外源DNA的能力。吸收的速度在20min到1h不等。把外源DNA用同位素或荧光素标记DNA探针后, 可以探出DNA已进入精子头部。厦门大学的陈元霖对家蚕的精子介导有比较深入的研究。方法是

将雄蚕蛾的精液与外源 DNA 混合后,注射进处女蛾的交配囊(储精囊)中,使携带 DNA 的精子与卵逐个地受精^[6]。Shanila 等将5龄蚕(吐丝前48 h)的背部切开,用一自制的显微注射器把含有报告基因 CAT(氯霉素乙酰转移酶)的 DNA (25~30 ng)注入精巢。该蚕蛾与正常雌蛾交配,在卵及蚁蚕中都能测到 CAT。说明精子已将含有 CAT 的 DNA 带入子代细胞中,但检测证明,DNA 主要以染色体外的形式存在^[7]。

1.6 脉冲场电泳方法 脉冲场电泳法介导的基因转移,最早见于转基因鱼的研究。方法是将胰酶消化后的裸卵与外源 DNA 溶液同放入特制的电脉冲处理槽中,然后施加一定强度的电脉冲。从而使外源 DNA 在电脉冲处理下进入受精卵。蚕卵表面有许多气孔(5 000~10 000 个/粒),开口直径约 4 μm 的气孔道多呈弯曲漏斗状通往卵内。戎锐等利用脉冲电场,使长达 9.5 kb 的外源基因穿过曲折孔道进入蚕卵质中从而达到转基因的目的,转基因卵成活率可达 40%,分子杂交检测到卵内外源 DNA 的存在^[8]。

1.7 交变脉冲电泳方法 李振刚等对脉冲场电泳法进行改进,变直流脉冲场为交变脉冲场开展了转基因蚕的研究。他将重组质粒 pFb-Ay(含有家蚕 Fibron 基因片断约 1.1 kb 和天蚕 Fibron 基因片断约 6.8 kb)和产后 2 h 的蚕卵包埋在低熔点胶(浓度为 1.0%)中或将蚕卵包埋在低熔点胶中,而 DNA 置于样品槽内电泳(缓冲液 0.5 × TBE、电压 5 V/cm、脉冲时间 1 s 和 2 s,4) 3~4 h,通过遍布卵壳的气孔将外源 DNA 导入卵内。结果以 pAy 探针 Southern dot blotting 检测显示,该方法可将外源 DNA 导入卵内^[9]。

1.8 压力渗透法 即将蚕卵浸泡于一定浓度的外源 DNA 溶液中,而后抽真空使卵孔在内压作用下开放,外源基因在大气压作用下可由卵孔进入蚕卵。赵昀等采用此法将绿色荧光蛋白(GFP)基因导入家蚕卵,在处理后的 3 700 粒卵中到 5 龄幼虫时发现 10 条蚕在紫外灯下有绿色荧光斑点,PCR 检测到 GFP 基因^[10]。

2 国内家蚕品种选育的现状

2.1 国内家蚕品种选育的成就 家蚕品种是蚕业生产中最基本的生产资料,也是决定蚕茧产量、质量的最基本因素。在 20 世纪,我国蚕业的增长主要靠新品种,可以说优良品种的选育和家蚕品种经济性状的改良对促进蚕业发展有巨大的作用。我国真正意义上的蚕品种选育工作起步于 20 世纪 80 年代,经过 20 余年努力,已育成了第 4 次更新换代和承担第 5 次更新换代重任的一大批蚕品种,如 80 年代初期的菁松 × 皓月、春蕾 × 明珠、浙蕾 × 春晓等和 90 年代育成的皖 5 × 皖 6、(苏·镇 × (春·光)等^[11]。我国自主选育的一大批春用和夏秋用优良品种的推广应用,极大地促进了国内蚕丝业的大发展,为奠定世界蚕丝第一大国的地位做出了重要贡献。除了选育实用蚕品种外,国内也开展了特殊用途蚕品种的培育,并取得了一定的进展,如育成了耐氟蚕品种秋丰 × 白玉、粗纤度蚕品种 C 华 × JD、抗 NPV 和多食性品种、平面丝实用蚕品种 ZAU2 等。

2.2 国内家蚕新品种选育存在的问题 尽管国内家蚕新品种选育水平有了明显提高,但自选的家蚕品种综合经济性状与同期的日本蚕品种水平相比仍有一定差距,且生产用品种

单一。造成这种状况的原因,除科学技术积累方面的因素和拥有种质资源的多少以及对基础品种选育工作的重视程度外,采用的育种方法是主要原因。我国经典的家蚕品种选育的方法主要有 3 种:系统选育、杂交育种和诱变育种,其中杂交育种起了主导作用^[12]。家蚕是利用杂交优势最早生物。经过近百百年的人工选择,目前可利用的自然突变已经越来越少,新培育的品种基本上大同小异,优势已不明显。换言之,经典的育种手段,其遗传操纵仅限于该品种所属生物种的范围内。通过整基因组杂交、独立分配和重组获得有利的重组体,再通过大量多世代的选择才有可能实现。但当有利基因和不利基因连锁时,这种情况给育种者带来的困难就更大。此外,对家蚕育种中的全茧量、茧层量、丝长、抗性以及一些重要测定性状的选择,一般只能凭经验、称量或添食试验来选择,但这些性状常常是由多基因决定的或主基因和修饰基因协同作用的结果。每个座位的基因对最后的表型只起较小的正向或负向的贡献。加之遗传和环境因素是以相同的方式对性状的表型值起增效和减效作用。仅仅依据性状的表型值无法区分遗传和环境因子的变异作用。实际上,家蚕育种到 20 世纪末,从经典的育种水平上来说,几乎达到了“顶峰”,一些育种专家要想在现有基础上创造一个新种质,已处于困难重重的地步^[13]。若在育种材料及育种方法上没有新的突破,新品种对生产的贡献率将会越来越低。

2.3 国内家蚕新品种选育的发展方向 现代生物科技和基因工程技术的发展,为我国家蚕新品种的选育开辟了新途径。家蚕转基因技术、分子标记、QTL 等方法的诞生,填补了经典家蚕育种进入分子育种之间的鸿沟,起到一份瓶颈效应的作用。自美国 Rhode Island 大学 Gold Smith 首先提出了“国际蚕分子育种计划”(International Silkworm Project)以来,国内外蚕业科技工作者已对家蚕基因组展开全面的研究,获得了令人惊喜的成果,育成了一批综合性状较好的基础品种,并从种质资源中整理发掘出了一批极有经济价值的基因,如抗病、广食性、粗细纤度等。近年来,基因工程技术尤其是转基因技术的飞速发展,为家蚕品种改造和创新提供了一种崭新的方法。转基因家蚕育种打破常规育种方法遗传信息只能在近亲或同种间进行交换和自然突变频率低,选择效果差的限制,可以大大提高品种选育的效率,培育出人们所希望的新品种。应用转基因技术选育家蚕品种已成为国内外蚕业科研工作的新趋势,也促使当前国内生产用家蚕品种的单一局面得以改变,向多元化方向发展:强健、抗病、抗逆,适合规模化、省力化或粗放饲养的蚕品种选育;粗纤度、细纤度蚕品种、荧光茧色判性品种、耐氟品种、生丝高强力品种、多产卵品种选育;适合人工饲料养育的多食性蚕品种选育;作为生物反应器用的具有高效表达能力的蚕品种选育等^[14],特殊用途蚕品种的培育方兴未艾。

3 国内外转基因技术在家蚕新品种选育上的研究和应用

家蚕转基因技术自 20 世纪 70 年代诞生以来,取得了重大进展,特别是近几年来,随着细胞生物学、分子生物学、分子遗传学、发育生物学以及其他相关生物技术的发展,这一技术在不断完善,日臻成熟,现已成为家蚕新品种选育和品种改良的重要手段。

3.1 天蚕丝质基因转基因家蚕新品种培育 中国科技大学的李振刚等通过交变脉冲电泳转基因技术将天蚕丝质基因转移到家蚕基因中,经过10多年培育出具有天蚕优良丝质性状的家蚕新品种^[15]。天蚕丝的天然绿色十分悦目,被誉为“钻石纤维”,国际市场价格昂贵。这种转基因家蚕丝呈浅黄绿色,抗酸碱性强,有闪烁光泽,手感柔软,富于强伸力,故织物坚牢,不皱,具有良好的市场前景和经济效益。

3.2 “蜘蛛丝”蚕品种的选育 中国科学院上海生命科学院生化与细胞所的陆长德研究员领导的课题组在中国农科院蚕业研究所黄君霆研究员的协助下,历经数年攻关,利用转基因技术中“电穿孔”的方法,将蜘蛛牵引丝部分的基因注入只有半粒芝麻大的蚕卵中,使培育出来的家蚕分泌出含有牵引丝蛋白的蜘蛛丝。从而解决了转基因蚕基因导入、活性基因鉴定及传代育种难题^[16]。

3.3 彩色茧品种的育成 利用生物工程转基因技术转育新型家蚕天然彩色茧丝品种,已成为现实。浙江大学动物科学学院陈玉银教授将原始蚕种优良彩色茧基因转移到高产优质的白色茧品种,选育出高产天然彩茧品种有黄、红、绿和肉色4种^[17]。浙江大学钟伯雄教授利用显微注射法进行了转基因彩色茧丝家蚕品种的研究,并且取得了阶段性的成果^[18]。日本东京大学研究人员利用转基因技术将原始的黄血基因引入到突变的家蚕体内,转基因家蚕就会产生有功能的类胡萝卜素捆绑蛋白,吐出黄色蚕丝。经多次杂交后,蚕丝黄色会变得更鲜艳^[19]。日本京都技术学院1999年利用向桑蚕体内注入一种用基因工程技术处理后的昆虫病毒,使丝蛋白的基因发生变化。当病毒感染了桑蚕害虫细胞后,病毒嵌入蚕体DNA中,改变了其中的基因,使转基因家蚕吐出绿色荧光纤维^[20]。四川成都华神集团资源昆虫生物技术中心,利用生物基因技术生产出新蚕种,使家蚕能吐出五颜六色的彩色丝。据专家介绍,这主要是靠家蚕的突变基因,基因定位后,利用染色体技术把需要的基因组合输入到家蚕体内,从而培育出能吐彩色丝的新蚕种。这种由转基因蚕结出的天然彩色茧,主要分红、黄、绿3个色系,颜色多达10几种^[18]。西南农业大学的夏庆友教授已培育出天然绿色蚕茧品种^[21],这种蚕生产的天然彩色丝市场价格是白色丝的2倍以上,市场前景十分看好。确信在科技工作者的不断努力下,不久的将来一定会创造出更理想的新型的天然彩色茧丝品种。

3.4 丝胶蚕品种的选育 日本已经有报道,转基因育成了“丝胶星”的创新品种素材,用于高纯度丝胶的生产;浙江大学家蚕育种研究组李军等采用杂交育种、系统选育、目的基因定向导入法等育种手段选育丝胶蚕品种^[22]。

3.5 抗菌肽蚕品种的选育 云南农业科学院蚕蜂研究所与厦门大学合作,利用家蚕转基因育种的精子载体法将抗菌肽基因转入家蚕,经检测在1代幼虫、茧中得到了表达,获得新品种^[23]。

3.6 绿色荧光蛋白基因蚕品种的选育 赵昀等用基因枪将绿色荧光蛋白基因(GFP)导入蚕卵,PCR检测到蚕染色体DNA中含有GFP基因;张峰等采用电激法和压力渗透法将带有绿色荧光蛋白基因(GFP)的同源重组质粒导入早期受精蚕

卵,获得有绿色荧光蛋白基因蚕品种的育种素材。

3.7 生物反应器表达系统蚕品种的选育 Meda等利用家蚕NPV作载体,在培养细胞和蚕体中表达人的干扰素(IFN)获得成功。Marumoto等报道了利用BmNPV作载体在蚕幼虫体内大量制造胰岛素生长因子(IGF)。Myajima等报道利用BmNPV载体在蚕幼虫体内表达IL-3。储瑞银等利用BmNPV作载体在蚕体内成功表达了HbsAg及preS2-s及天花粉蛋白基因。利用BmNPV作载体也可制成病毒农药制剂,如东京大学与日本国立卫生防疫研究所进行的蜘蛛毒蛋白基因与家蚕NPV-DNA的体外重组;美国Suneva则采用酯酶的蛋白基因与NPV-DNA进行体外重组等^[24]。利用BmNPV作载体的外源蛋白在家蚕的生物反应器表达系统是迄今为止唯一能在个体水平大量表达外源基因的系统。其表达产物分泌到胞外,且生物活性高。

3.8 其他转基因家蚕新品种 钱惠田等用家蚕()和蓖麻蚕()人工授精的方法(精子载体法),从获得杂交的后代中发现了幼虫斑纹变异和表现出抗高温特性的育种素材;Deodkar等用蓖麻蚕精液浸泡家蚕处女蛾的卵,由此孵化出的个体中,出现性状的广泛变异,并育出了具有优良性状的家蚕新品系;陈元霖等从家蚕()和蓖麻蚕()经人工授精杂交的后代中,根据卵色、滞育性状和壮蚕皮斑的差异,经过20代以上的选育,获得了3个稳定的家蚕新品系^[25];陈秀等用基因枪法获得新霉素抗性转基因蚕和抗NPV核酶转基因蚕^[25]。

4 转基因技术在家蚕新品种选育上应用前景

2003年11月,中国工程院向仲怀院士领导完成了“中国家蚕基因组计划”并绘制了世界上第一个高质量的鳞翅目昆虫(家蚕)基因组框架图,确立了我国在家蚕基因组研究领域的领先地位^[26]。目前,家蚕功能基因组研究在应用研究领域也取得了关键技术突破:成功构建了转基因家蚕技术体系和基因功能特异干涉技术体系,转基因家蚕取得成功;通过性别调控基因的克隆和应用,已经在杂交代种中成功实现家蚕性别的人为调节,所培育成功的品种已开始在生产上示范推广,将带来巨大的经济效益;已鉴定出对细菌和真菌这两大蚕病病原菌具抗性的功能基因,将通过转基因系统改造这些基因的调控序列,以期达到控制蚕病的目的^[27]。可以预期,有了这些成果,一批划时代的转基因家蚕新品种将会展示在世人的面前,蚕丝产业的明天将更加美好,从中国出发的“21世纪新丝绸之路”一定会风光旖旎。

参考文献

- [1] 钟伯雄.转基因家蚕的研究现状和展望[C]//徐俊良.蚕业发展与蚕丝研究1927~1997.成都:成都科技大学出版社,1999:1-13.
- [2] 范久戈.转天蚕丝素基因家蚕的茧丝变异研究[J].安徽农业科学,1998,26(2):166-167.
- [3] ZHANG F,ZHAO Y,CHEN X,et al.Fluorescent transgenic silkworm[J].Acta Biochimica et Biophysica Sinica,1999,31(2):119-123.
- [4] 陈秀,张峰,赵昀,等.荧光素酶报告基因在转基因蚕中的应用[J].高技术通信,2000(1):19-22.
- [5] 陈秀,赵昀,张峰,等.新霉素抗性基因在家蚕中的插入和表达[J].生物化学与生物物理学报,1999,31(1):90-92.
- [6] 王国基,王加连.转基因动物制作方法的研究进展及其在蚕学研究中的应用[J].中国蚕业,2004,25(2):90-94.
- [7] 陈元霖,桂慕燕,廖岚,等.蓖麻蚕DNA对家蚕的诱变作用[J].厦门大学学报:自然科学版,1993,32(1):20-27.

- mutations and polymorphisms in large genomic regions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29:111.
- [7] AHMAD A, HOLLOWAN WK, HOLLIDAY R. Nuclease that preferentially inactivates DNA containing mismatched bases[J]. *Nature*, 1975, 258:54-56.
- [8] SILBER J R, LOEB L A. S1 nuclease does not cleave DNA at single-base mismatches[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 656:256-264.
- [9] HOWARD J T, WARD J, WATSON J N, et al. Heteroduplex cleavage analysis using S1 nuclease[J]. *Biotechniques*, 1999, 27:18-19.
- [10] COLBERT T, TILL B J, TOMPA R, et al. High-throughput screening for induced point mutations[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126:480-484.
- [11] HENKOFF S, COMAI L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54:375-401.
- [12] WENHOLDS E, VAN EEDEN F J, KOSTERS M, et al. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish[J]. *Genome Res*, 2003, 13:2700-2707.
- [13] COMAI L, HENKOFF S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery[J]. *Plant J*, 2006, 45:684-694.
- [14] JUNE P A, BORRAS A M, KUANG Y, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:751-758.
- [15] 吴海滨, 朱汝财, 赵德刚. TILLING 技术的原理与方法述评[J]. *分子植物育种*, 2004, 2(4):574-580.
- [16] 张宁, 杨泽. Tilling 技术及其在遗传学中的应用[J]. *生命的化学*, 2004, 24(6):516-517.
- [17] 韩微波, 刘录祥, 郭会君, 等. 小麦诱变育种新技术研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(6):125-129.
- [18] 韩锁义, 杨玛丽, 盖钧镒, 等. CEL I 酶的粗提取及其活性检测[J]. *遗传*, 2006, 28(9):1112-1116.
- [19] 林英, 陈冬妹, 赵萍, 等. CEL I 酶的粗纯化及活性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(6):1006-1011.
- [20] RSCH N, MERKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases[J]. *Science*, 1996, 273:1516-1517.
- [21] SHIM M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies[J]. *Clin Chem*, 2001, 47:164-172.
- [22] ZHOU W, GOODMAN S N, GALLIZIA G, et al. Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers[J]. *Lancet*, 2002, 359(9302):219-225.
- [23] MOHREWEISER H W, JONES I M. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: A paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation[J]. *Mutat Res*, 1998, 400(1/2):15-24.
- [24] HE X M, ZHANG Z X, ZHANG J W, et al. Gln92Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population[J]. *Chin Med J*, 2006, 119(14):1204-1209.
- [25] MACHIDA H, TSUKAMOTO K, WEN C Y, et al. Gohn's disease in Japanese is associated with a SNP haplotype of N-acetyltransferase 2 gene[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(31):4833-4837.
- [26] ABBOTT A. Special section on human genetics: With your genes Take one of these three times a day[J]. *Nature*, 2003, 425:760-762.
- [27] SHIN H K, KIM T J, LEE H S, et al. The Correlation between genetic polymorphism of CYP2D6 (A118G) and MDR1 (C3435T) with analgesia and the adverse effects by epidural morphine[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2007, 52(1):16-22.
- [28] YAMANAKA S, NAKAMURAI, WATANABE K N, et al. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108:1200-1204.
- [29] WILSON L M, WHITT S R, IBANEZ A M, et al. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association[J]. *Plant Cell*, 2004, 16:2719-2733.
- [30] PALAISA K A, MORGANTE M, WILLIAMS M, et al. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci[J]. *Plant Cell*, 2003, 15:1795-1806.
- [31] SCHWARZ G, SIFT A, WENZEL G, et al. DHPLC scoring of a SNP between promoter sequences of HMW glutenin x-type alleles at the Glu-D1 locus in wheat[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:4263-4267.
- [32] ABE F, SATO K, MIURA K, et al. A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance[J]. *FEBS Letters*, 2002, 527:181-185.
- [33] POTOKINA E, PRASAD M, MALYSHEVA L, et al. Expression genetics and haplotype analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase I (Cxp I), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Funct Integr Genomics*, 2006, 6:25-35.
- [34] GARCIA CLAVER A, FELLMANS M, GIL ORIEGA R, et al. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115(7):907-916.
- [35] GRIMES E A, NOAKE P J, DIXON L, et al. Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype[J]. *Forensic Sci Int*, 2001, 122(2/3):124-129.
- [36] CHAKRABORTY R, SMOUSE P E. Recombination of haplotypes leads to biased estimates of admixture proportion in human population[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:3071-3074.
- [37] BRISCOE D, STEPHENS J C, O'BRIENS J. Linkage disequilibrium in admixed population: Application in gene mapping[J]. *The Journal of Heredity*, 1994, 85(1):59-63.
- [38] NASU S, SUZUKI J, OHIA R, et al. Search for and Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and Establishment of SNP Markers[J]. *DNA Research*, 2002, 9(5):163-171.
- [39] GUO P, BAUM M, GRANDO S, et al. QTLs for Chlorophyll and fluorescence parameters in barley under post-flowering drought[J]. *Euphytica*, 2008, 163:203-204.
- [40] VARSHNEY R K, THEL T, SREIENOM C RAJIC T, et al. Identification and validation of a core set of informative genetic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 22(1):1-13.
- [17] 佚名. 浙江开发天然彩色蚕丝技术[J]. *纺织信息周刊*, 2005(18):18.
- [18] 罗玉功. 国内外彩色茧研究现状[J]. *北方蚕业*, 2004, 25(3):14-15.
- [19] DEODIKAR G B, KAMATE I A, KSHRSAGAR K K. New strains of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) by induced asexual parthenogenesis[J]. *Ind J Sci*, 1977, 16(1):43-48.
- [20] 张峰, 陈秀, 赵昀, 等. 抗NPV-核酶转基因蚕的研究[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(3):331-333.
- [21] 佚名. 千秋蚕变——访西南农业大学蚕桑重点实验室夏庆友教授[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(1):32-33.
- [22] 李军, 费建明, 李玉峰, 等. 丝胶茧蚕品种选育初报[J]. *蚕桑通报*, 2006, 37(3):20-22.
- [23] 董占鹏. 蚕类抗菌肽及其研究进展[J]. *蚕学通讯*, 2003, 23(3):14-20.
- [24] 董占鹏, 陈松, 罗坤, 等. 家蚕分子育种研究进展[J]. *广西蚕业*, 2002, 39(3):4-8.
- [25] 戎锐, 李振刚. 家蚕转基因研究进展[J]. *昆虫知识*, 1998, 35(3):189-191.
- [26] 代方银, 程龙. 为了21世纪“丝绸之路”[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(1):55-61.
- [27] 夏庆友. 家蚕突变基因及重要性状功能基因组研究[J]. *蚕学通讯*, 2004, 24(2):2-3.

(上接第10802页)

- [8] 马志明, 石晓燕, 查新民, 等. 转基因家蚕的研究进展[J]. *江苏蚕业*, 2001(2):6-10.
- [9] NAGARAJU J, KANDA T, YUKUHIRO K, et al. Attempt at transgenesis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) by egg injection of foreign DNA[J]. *Applied Entomology and Zoology*, 1996, 31(4):587-596.
- [10] 赵昀, 张峰, 陈秀, 等. 用绿色荧光蛋白进行转基因蚕的研究[J]. *高技术通信*, 1996(6):16-19.
- [11] 陈萍. 家蚕品种研究进展[J]. *蚕学通讯*, 2000, 20(1):16-22.
- [12] 吴大洋. 现代生物技术与蚕业[J]. *四川蚕业*, 2002(2):4-8.
- [13] 古巧珍. 家蚕基础品种选育研究进展[J]. *陕西农业科学*, 1999(3):27-29.
- [14] 宋新华, 潘学燕, 李慧兵, 等. 我国家蚕品种的变迁及现行品种种质基础分析[J]. *西北农业学报*, 2001, 10(3):112-115.
- [15] 李振刚, 周丛照, 唐恒立, 等. YAC介导的天蚕丝素基因向家蚕的转移——天蚕丝素基因 YAC 克隆在家蚕的表达[J]. *昆虫学报*, 1997, 40(1):3-6.
- [16] 张慧勤, 王志新. 蜘蛛丝的研究与应用[J]. *中原工学院学报*, 2005, 16(4):47-50, 69.