

Secret Grade_____

No._____

**Thesis for the degree of Master of Management
of the Chinese Academy of Agricultural Sciences**

**Studies on Artificial Diet Eating Habit of Silkworm and
Construction of the Silkworm Fingerprints**

Student: Yuehua Zhang

Advisor: Prof. Anying Xu Guozheng Zhang

Degree: Master of Agronomy

Major: Breeding of Special Industrial Animals

Field: Silkworm Genetics and Breeding

Department: Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences

Submitted in December. 2005

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：2005年12月11日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

时间：2005年12月11日

导师签名：

时间：2005年12月11日

论文评阅人和答辩委员会成员名单

论文评阅人：徐景耀 研究员 中国农科院蜜蜂研究所
徐兴耀 教授 华南农业大学动物科学学院
李光玉 副研究员 中国农科院特产研究所
答辩委员会主席：沈卫德 教授 苏州大学生命科学学院
答辩委员会成员：朱良均 教授 浙江大学动物科学学院
赵巧玲 研究员 中国农科院蚕业研究所
黄君霆 研究员 中国农科院蚕业研究所
林昌麒 研究员 中国农科院蚕业研究所

论文答辩日期：2005年12月11日

摘要

人工饲料的摄食性遗传研究是为了探明不同家蚕品种以及个体间对人工饲料摄食性的差异,研究发生摄食性差异的生理原因,并对影响摄食性因素和遗传方式进行分析,为人工饲料适应性蚕品种的选育奠定基础。人工饲料的摄食性遗传研究,将为改进人工饲料配方和饲养技术,提高发育整齐度,特别是为人工饲料适应性蚕品种的培育提供理论依据和有效方法。

家蚕是重要的经济动物,在长期不同生态条件下逐渐形成了不同的地理品种。家蚕传统的分类方法主要以经济性状和形态性状为依据,但经济性状受环境影响较大,而形态性状因现行品种间大致相同而难以准确分辨。利用微卫星标记,建立我国家蚕种质资源 DNA 指纹图谱,将为家蚕的鉴定、遗传评价和开发利用提供科学依据。

1 家蚕不含桑叶粉人工饲料摄食性调查

为了选育适合低成本人工饲料广食性品种,采用不含桑叶粉的人工饲料对中国农业科学院蚕业研究所保存的 386 个家蚕品种,进行家蚕对无桑人工饲料的摄食性调查,明确了不同品种间摄食性的差异。各品种的摄食性以中系一化为最好,多化最差。通过调查发现我国保存的蚕品种资源中,含有大量具有广食性特征的遗传资源,特别是中国系统品种,具有重要的研究和利用价值。

2 人工饲料摄食性优良品种选拔及遗传分析

为获得纯合的对不含桑叶粉人工饲料食性优良的广食性系统,对筛选出的摄食率较高的两个品种选01和选02进行累代选择,蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率分别达到99.0%以上。将高摄食性品种中01与低摄食性品种1015进行杂交,用不含桑叶粉人工饲料饲养F₁、F₂及BC₁世代,并进行摄食性调查,遗传分析结果为中01对不含桑叶粉人工饲料摄食性为隐性遗传,受常染色体1个隐性主基因控制,同时还有修饰基因的存在。

3 用微卫星标记 (SSR) 构建家蚕指纹图谱

应用微卫星标记 (SSR),构建了 96 个家蚕中国系统二化品种的指纹图谱。实验中除两对引物无多态性条带外,其余 SSR 引物在本实验中扩增效果较好,表现出了丰富的 SSR 多态性和良好的指纹特征。有数种引物组合可以区分 96 个家蚕品种,并且 SSR 指纹图谱条带稳定、清晰。家蚕基因组丰富的 SSR 多态性和不同家蚕品种之间的 SSR 多态性差异,表明了 SSR 标记在遗传多样性分析中的优势,展示了 SSR 分析在家蚕品种分子标记技术中的良好应用前景。

4 微卫星标记 (SSR) 多态性分析

采用 57 对 SSR 引物对 96 个中国系统二化品种的基因组 DNA 进行扩增,共扩增出 507 条有效带,最多的一对引物扩增出了 24 个片段,最少的仅有 1 个,平均 8.9 个/引物,各品种的扩增带数值从 90bp 到 370bp 不等,表明各品种之间存在丰富的微卫星多态性。利用 UPGMA 聚类法进行了聚类 and 亲缘关系分析,构建了供试蚕种质材料的分子系统树。

关键词: 家蚕, 人工饲料, 摄食性, 微卫星标记, 指纹图谱

Abstract

The purpose of the study on the heredity about silkworm feeding habit on artificial diet is to find out the differences of the feeding habits among silkworm varieties or individuals, and the physiological causes, and then, analyze the factors influence the feeding habits and the genetic mode. This will pave the path for the breeding of silkworm varieties that suitable for artificial diet. The study will also provide the theory for improving artificial diet, breeding technology, and the uniform of silkworm development and especially for the breeding of omnivorous silkworm varieties that adapt to artificial diet.

The silkworm (*Bombyx mori* L.), which gradually formed differently in long term ecological conditions, is one of the most important economic insects. The classic categorization relies mainly on economic and morphological traits. However, economic traits fluctuates due to environmental change and morphological traits have little difference among silkworm varieties. The construction of the silkworm DNA fingerprints applying SSR(Simple Sequence Repeats) will provide us with scientific bases for silkworm identification, heredity appraisal and exploitation.

1. Studies of silkworm(*Bombyx mori* L) feeding habits on mulberry free artificial diet

386 silkworm varieties were fed with mulberry free artificial diet to breed the omnivorous races and invest the ingestion. The ingestion differences are clear-cut among different varieties. The monovoltinist varieties of Chinese system have the highest ingestion rate while the multivoltinist have the lowest. It is found that there are many euryphagy varieties preserved in China, especially Chinese system. They have great value in research.

2. Selection of the silkworm varieties that ingest artificial diets and analysis of feeding habit heredity

In order to obtain a pure line omnivorous system of silkworm variety which is suitable for artificial diet, two varieties, Selected 01 and Selected 02, were chosen for further selection in continuous generations. The average feeding ratio on mulberry free artificial diet of newly hatched larvae reached 99.0% after the selection. Chinese 10, which has high ingestion ratio, is intercrossed with 1015 that has low ingestion ratio. The F1, F2 and BC1 generations are fed with mulberry free artificial diets and the ingestion are examined. The result shows that the ingestion of the diet is recessive inheritance and controlled by a major gene located at autosome. And modifier genes also contribute to this.

3. The construction of silkworm fingerprints applying SSR molecular markers

The fingerprints of 96 Chinese bivoltinist silkworm varieties were constructed applying microsatellite markers (Simple Sequence Repeat, SSR). The results of PCR products showed perfect polymorphism and fingerprint characteristic except two pairs of the markers. The 96 silkworm varieties

could be distinguished by several groups of markers and the bands were clear and stable. The plentifulness of SSR polymorphism in silkworm genome and the differences of the polymorphism among different silkworm races indicate the advantage of SSR in the construction of silkworm DNA fingerprints and analysis of inheritance diversity, and show the foreground of application of SSR in silkworm molecular marker technology.

4. Analysis of SSR phylogenetic

The genome of 96 Chinese bivoltinism silkworm varieties were amplified applying 57 pairs microsatellite (SSR) markers. There are 507 valid bands amplified altogether. The number of the bands amplified by single pair of markers varies from 1 to 24, and the average is 8.9/primers. The length of the bands varies from 90bp to 370bp and shows microsatellite (SSR) markers can reflect the polymorphism among silkworm races. A phylogenetic tree was constructed applying UPGMA clustering method.

Key words: Bombyx mori L, Artificial Diet, Feeding Habit, SSR, Fingerprint

目 录

第一章 绪论	1
1.1 家蚕人工饲料研究的目的与意义	1
1.2 国内外家蚕人工饲料研究进展	1
1.2.1 国外家蚕人工饲料研究进展	1
1.2.1.1 家蚕人工饲料育技术	2
1.2.1.2 摄食性的遗传研究	2
1.2.2 国内家蚕人工饲料研究进展	3
1.2.2.1 家蚕对人工饲料的摄食性调查	3
1.2.2.2 人工饲料配方的改进	3
1.2.2.3 家蚕食性遗传方式的研究	5
1.2.2.4 生理生化的研究	6
1.2.2.5 人工饲料育适应性蚕品种的选育	6
1.2.2.6 稚蚕人工饲料育关键饲育技术研究	6
1.2.3 展望	7
1.3 家蚕指纹图谱研究的目的与意义	7
1.4 指纹图谱研究内容与方法	8
1.4.1 蛋白质电泳技术	8
1.4.2 同工酶技术	9
1.4.3 DNA 分子标记技术	10
1.4.3.1 RFLP 技术	10
1.4.3.2 AFLP 技术	11
1.4.3.3 RAPD 技术	12
1.4.3.4 微卫星技术	14
第二章 家蚕人工饲料摄食性遗传研究	15
2.1 前言	15
2.1.1 研究的目的与意义	15
2.1.2 国内外研究进展	15
2.1.3 研究的目的	16
2.1.4 研究的预期结果	16
2.2 材料	16
2.2.1 供试蚕品种	16
2.2.2 主要仪器	17
2.2.3 人工饲料组成及加工	17

2.2.4 主要试剂及药品	17
2.3 方法	17
2.3.1 饲养方法	17
2.3.2 家蚕人工饲料摄食性调查	17
2.3.3 广食性资源系统的建立	18
2.3.4 不同含水率和蚕卵处理家蚕摄食性差异	18
2.3.5 家蚕人工饲料摄食性遗传模式分析	18
2.3.6 家蚕人工饲料种质创建	18
2.4 结果与分析	19
2.4.1 家蚕品种摄食率和疏毛率调查	19
2.4.1.1 不同家蚕品种摄食率和疏毛率分布	19
2.4.1.2 全部调查蚕品种间疏毛率和摄食率分布	20
2.4.1.3 不同品种对无桑饲料和有桑饲料摄食性的相关分析	20
2.4.2 广食性资源的建立	21
2.4.2.1 家蚕广食性资源的建立	21
2.4.2.2 家蚕人工饲料适应性品系选拔结果	21
2.4.3 不同含水率和蚕卵处理家蚕摄食性的差异	25
2.4.3.1 不同含水率家蚕摄食性的差异	25
2.4.3.2 不同蚕卵处理家蚕摄食性差异	25
2.4.4 家蚕人工饲料食性遗传模式的研究	26
2.4.4.1 食性遗传模式的研究	26
2.4.4.2 摄食性遗传实验卡平方测定	27
2.4.5 家蚕不含桑叶粉人工饲料种质创建	29
2.5 讨论	29
第三章 家蚕种质资源指纹图谱的构建	31
3.1 引言	31
3.2 材料与amp;方法	32
3.2.1 供试材料	32
3.2.2 取材方法	32
3.2.3 主要试剂	32
3.2.4 主要仪器与amp;设备	32
3.2.5 数据分析软件	32
3.3 实验方法	32
3.3.1 基因组 DNA 的制备	32

3.3.2 DNA 浓度的测定·····	35
3.3.3 PCR 反应所用的引物·····	35
3.3.4 PCR 体系及扩增程序·····	36
3.3.5 PCR 扩增产物初步检测·····	37
3.3.6 377自动测序仪电泳检测·····	37
3.3.7 数据分析·····	37
3.4 结果与分析·····	38
3.4.1 SSR 扩增产物的多态性·····	38
3.4.2 家蚕 96 个品种的指纹图谱·····	39
3.4.3 遗传距离及聚类分析·····	41
3.4.4 DNA指纹图谱在品种鉴定方面的应用·····	41
3.5 讨论·····	44
第四章 结论	
4.1 家蚕不含桑叶粉人工饲料摄食性调查·····	46
4.2 人工饲料摄食性优良品种的选拔·····	46
4.3 家蚕不含桑叶粉人工饲料摄食性遗传分析·····	46
4.4 用微卫星标记 (SSR) 构建家蚕指纹图谱·····	47
4.5 微卫星标记 (SSR) 的多态性分析·····	47
4.6 微卫星标记在品种鉴定方面的应用·····	47
参考文献·····	48
附录 1 人工饲料摄食性调查表·····	53
附录 2 指纹图谱表·····	59
致谢·····	69
作者简介·····	70

第一章 绪 论

1.1 家蚕人工饲料研究的目的与意义

家蚕是寡食性昆虫，自从养蚕生产发展以来，都是靠栽培桑树来获取饲料的。关于家蚕人工饲料的研究早在1953年就开始进行，1960年日本福田等首次报道全龄人工饲料育获得成功。人工饲料是与天然饲料相对的一种通称，家蚕人工饲料育就是根据家蚕的食性特点和营养的要求，用适当原料配制成饲料以代替桑叶的饲育法。

人工饲料的研究，首先是为了阐明桑蚕的营养要求，其次是为了实现全年养蚕，不受桑树生长长期的影响。自六十年代桑蚕人工饲料研究成功以来，有关人工饲料的组成、饲育方法等研究颇为广泛，并取得了不少成果；同时，由于人工饲料可任意改变营养组成，打破了桑叶饲料的限制，大大推动了家蚕营养生理学的发展，并为蚕的生理生化、蚕病防治、遗传学及蚕品种选育等方面的研究提供了良好的实验条件。

用人工饲料养蚕与桑叶育相比具有许多优势，主要是养蚕不受季节、气候和桑树对生长的限制，可任意调整养蚕时间和全年连续养蚕，从而打破了传统的蚕桑生产模式。其次是人工饲料可使家蚕获得同样的营养条件，饲料消毒无菌，有利于防止蚕病发生和环境污染。更重要的是，人工饲料养蚕能够实现饲料生产和养蚕生产的机械化、工厂化，简化了生产环节，可大幅度提高劳动生产率，是蚕业史上一项重要的技术进步。此外，人工饲料还是开展家蚕营养学、病理学等基础研究的重要手段，在家蚕的基因工程产业化等蚕业高新技术领域也有着广阔的应用前景。

1.2 国内外家蚕人工饲料研究进展

1.2.1 国外人工饲料研究进展

日本有关家蚕人工饲料的探索，早在30年代就有报道，但直到1960年，日本的福田和伊藤才首次用人工饲料养蚕完成了一个世代。家蚕人工饲料自其诞生以来，受到许多国家特别是发达国家的高度重视，已经取得了较大的发展。日本在推进工业化的历史背景下，其人工饲料的研究远远走在世界其他国家的前列，到1975年，日本已完成了稚蚕人工饲料育的实用化研究，1977年开始在生产上推广，普及率逐年提高，成为其蚕业生产的三大技术支柱之一。20世纪90年代以来，日本学者通过许多研究，进行了有关摄食性机制、遗传及和饲料中所含有成分的关系等多方面的研究，培育成功了广食性蚕品种，并开发出相应的低成本LP饲料、颗粒饲料及相应的饲育机械，可实现1—4龄用人工饲料工厂化饲育、5龄分户桑叶育的“蚕农一周养蚕”的蚕桑生产新模式。近来，日本由于高度工业化，传统农业包括养蚕业出现了极度萎缩的局面，为挽救其养蚕业，稳定蚕茧生产，日本蚕业界结合家蚕新用途和新型蚕丝的开发，又进行了全龄一次给饵、一年饲养多批蚕的超省力全年连续无菌养蚕技术的研究，并进行了生产中试，这将是养蚕由劳动密集型产业向技术密集型产业转变的一个重要标志，是今后养蚕业发展的一个重要方向，也是蚕业界多年来追求的目标。

1.2.1.1 家蚕人工饲料育技术

家蚕人工饲料育技术是现存多种养蚕技术中划时代的革新技术（苦米地贞夫，1992）。早在1935年，日本昆虫农业技术研究所就开始了有关人工饲料育蚕的营养生理和病虫害防治研究。1955年前后，从提高养蚕业的生产效益出发，用人工饲料进行了营养生理和改进饲料配方的研究。1960年蚕丝试验场成功地进行了家蚕全龄人工饲料育，当时由于蚕的龄期经过较桑叶育长，茧质和茧量极差，因此饲养效果较差。此后，进行了改进饲料配方、改善饲养环境和蚕病防治等多方面的研究，并为确立1—3龄人工饲料育技术进行了多次试验，结果使家蚕对人工饲料的摄食性、生产稳定性、发育经过、蚕茧的数量性状等都得到了提高。1969年，蚕丝试验场开展了人工饲料大批量饲养家蚕试验。1972年又开展了稚蚕人工饲料育实用化的基础研究，从而确立了稚蚕人工饲料育技术体系的基础。日本农林水产省在1973年以稚蚕人工饲料育为前提，在7个都县进行了稚蚕人工饲料共育试验，同时进行了人工饲料给饵机的开发研究。1974年，在23都县的蚕丝试验场进行了稚蚕人工饲料育技术的鉴定，同时，对现行指定蚕品种进行了人工饲料适合性的调查。终于，在1977年日本稚蚕人工饲料育技术开始得到推广。

随着日本对广食性蚕品种的选育与低成本人工饲料的开发方面，以线性规划法设计的广食性蚕用饲料，稚蚕用饲料桑叶粉含量可减少到4%，桑叶粉含量的减少，对饲料价格的降低具有很大意义。过去的蚕品种大幅度降低桑叶粉含量是极困难的，而广食性蚕品种可以解决这一问题。添加桑叶粉的目的几乎仅是为了提供摄食促进物质，蚕所需要的氨基酸、无机物等营养成分由价格比较便宜的脱脂大豆粉、脱脂米糠、玉米粉等提供。

日本人工饲料育试验获得成功以后，主要研究改善以桑叶粉和脱脂大豆粉为主要原料的人工饲料配方，通过不断的调制改善，养蚕成绩得到提高。与此同时，不断追求政策支持与设备配套。饲料的调制方法、饲养环境、稚蚕人工饲料后的条桑育等技术相继研究出台，形成了一整套以人工饲料为中心的配套技术，全国丝茧育普及率达到33.1%，种茧育普及率38.4%。随着低成本人工饲料及广食性蚕品种的育成，由原来的人工饲料育至3龄变成为人工饲料育至4龄，并由此而建立了“一星期养蚕法”的技术体系，农民只需在5龄期的一星期内用桑叶养蚕。

1.2.1.2 摄食性的遗传研究

日本对广食性蚕品种的选育与低成本人工饲料的开发方面，横山（1970）调查了蚕丝试验场保存品种中29个日本种、37个中国种、10个欧洲种的4龄起蚕对甘蓝的摄食性。其中，日本种有15个、中国种5个、欧洲种1个品种存在能摄食甘蓝的个体，经过多代选择育成了广食性系统“泽J”。神田俊男（1992）进行了家蚕对线性规划人工饲料摄食性的遗传育种学研究。从F₁、F₂和BC₁摄食个体分离情况看，蚕对LP—1人工饲料摄食性，无论摄食性高系统和低系统之间的F₁正反交均未见摄食性个体，说明蚕对LP—1人工饲料的摄食性是由1、2个隐性主基因支配，同时从F₁、F₂及BC₁的体重分布可以看出除了隐性主基因外还推定有多个修饰基因存在。藤森胡友（1982）进行了异常蚕对人工饲料摄食性遗传模式的研究，根据试验结果判断对人工饲料摄食性高的性状（泽“J”）与对人工饲料摄食性低的性状（汉川、第二白卵）之间呈完全显性遗传。山本（1983）用人工饲料摄食性异常的NO.903为材料，结果摄食性异常性状对摄食性高的

性状为隐性遗传，判断受常染色体上的单一隐性基因控制。

1.2.2 国内家蚕人工饲料研究进展

我国在 70 年代初期开展人工饲料的研究工作，中国农业科学院蚕业研究所及浙江农业大学蚕学系分别于 1974 年和 1976 年用人工饲料饲养家蚕获得成功。80 年代以来，国内许多蚕业研究机构和大专院校根据我国的国情，相继开展了这方面的研究试验，尽管目前还没有在生产上正式推广应用，但在许多方面已取得较大进展，现将我国家蚕人工饲料的研究现状及应用前景综述如下。

1.2.2.1 家蚕对人工饲料的摄食性调查

家蚕对人工饲料的适应性，不同的蚕品种间有一定的差异，并受多种内外因素的影响，我国学者对此进行了多方面的研究。

首先，家蚕对人工饲料的摄食性和适应性与蚕品种有关。中国农业科学院蚕业研究所（1981）进行了家蚕不同原蚕种对人工饲料的适应性调查，结果说明日系品种蚁蚕对人工饲料的摄食性好者居多，中系次之，而欧系品种对人工饲料的摄食良好者较少。徐俊良等（1993）进行了不同蚕品种对桑叶粉含量不同的人工饲料摄食性研究，结果表明杂交种人工饲料的摄食性随着饲料中桑叶粉含量的增加，各品种疏毛率逐渐提高。袁金辉等（2005）对华南地区保存的 167 个家蚕资源品种和组配的 19 个杂交种进行人工饲料摄食性调查，发现摄食率高于 91% 的品种占调查品种的 44%，表明华南地区选育适合人工饲料饲养的家蚕品种有丰富的基础材料；对同品种不同蛾区家蚕对人工饲料的摄食性调查发现，摄食率高于 97% 的品种蛾区间差异不明显，摄食性遗传稳定；摄食率低于 90% 的品种蛾区间的差异较大，表明可有效选拔提高品系的人工饲料摄食性。王冰等（2004）比较了 30 个家蚕品种对人工饲料育的适应性，通过调查各品种的疏毛率、眠蚕体重、起蚕率和存活率等指标，得出了各品种对人工饲料育的综合适应性指数；与疏毛率等单项指标相比，利用综合适应性指数能够更全面、准确地反映出品种间对人工饲料育的适应性差异。张亚平等（2003）对不同家蚕品种对低成本人工饲料适应性调查，结果表明杂交种及日系原种总体上对低成本人工饲料有良好的摄食性。庞岗（2003）对野桑蚕和家蚕的环境适应性比较研究表明，野桑蚕不取食无桑叶粉的人工饲料，48 h 不出现疏毛现象，其食性较家蚕单一。

其次，家蚕对人工饲料的摄食性，不仅品种之间存在差异，即使是同一品种，正反交之间也有差异；在同一品种同一蛾区的个体之间，摄食性变化也很大。徐俊良等（2000）通过同一蚕品种对人工饲料摄食性的个体差异研究表明，同一蚕品种个体间对人工饲料的摄食性存在差异，对桑叶粉及蔗糖等摄食促进物质的感受性，高食性蚕比低食性蚕敏感；而对豆粕粉中摄食阻碍物质的感受性，低食性蚕比高食性蚕敏感。崔为正（1998）通过家蚕摄食反映的个体差异研究，结果表明无论是对摄食刺激物质还是抑制物质，低食性蚕均比高食性蚕敏感，对无机盐、酸和水的感受性以及环境因子对摄食性的影响，也存在显著影响。

1.2.2.2 人工饲料配方的改进

桑蚕人工饲料育在我国实现实用化，必须通过降低饲料成本、提高蚕的摄食性以及解决在养

蚕过程中饲料腐败变质的技术问题，为此我国许多学者进行了人工饲料配方的改进研究。

在降低人工饲料成本方面，邵宁文等（1995）进行了稚蚕人工饲料中菜籽粕添加效果的研究，菜籽粕适当的添加范围为5%~10%，可作为人工饲料的蛋白源，降低饲料成本。张传溪等（1992）用含豆腐渣粉末的小蚕人工饲料饲养1~3龄小蚕，认为小蚕对于饲料中含15%豆腐渣粉末的低成本人工饲料，比对普通人工饲料的取食量大，生长速度快，3龄蚕的蚕体重，且豆腐渣粉末可明显改善不含琼脂和纤维素的饲料的物理性状。缪云根（1996）等进行了桑蚕人工饲料配方的改进研究，在人工饲料配方中，目前使用的琼脂含量可大幅度降低，卡拉胶作为成型剂效果好，成本较低，玉米粉与卡拉胶合用其成型效果也很好。

在人工饲料维生素、无机盐及生长促进剂研究方面，张国政等（1996）对稚蚕人工饲料中几种微量元素的添加效果进行了研究，在基础饲料中添加柠檬酸钛，对1—2龄蚕的生长发育未见有促进作用；以柠檬酸混合稀土形式向基础饲料加入，其生长发育没有促进而略受抑制；饲料中添加1%磷酸高铁，对稚蚕期的生长发育有明显促进。韦亚东等（1997）研究了人工饲料中几种钙盐及丙酸适宜添加量对稚蚕生长发育的影响，丙酸钙的适宜添加量在1.0%左右；碳酸钙的适宜添加量为1.0%和4.0%，添加量达8%时，对稚蚕的生长发育仍有促进作用；氯化钙的适宜添加量为0.5%~2%；丙酸的适宜添加量为0.25%左右。韦亚东等（1997）又进行了稚蚕人工饲料中铁的适宜添加量的研究，试验的结果进一步证明了在含有较高含量铁的基础饲料中进一步加铁化合物，对家蚕生长发育的促进作用，而且无论铁的价态是三价还是二价，以及阴离子是磷酸根还是硫酸根和氯离子，均有明显的生长发育促进作用。程安玮等（2002）进行了颗粒人工饲料中VB的添加量对家蚕生长发育的影响，结果表明期添加一定量的VB对生长发育无明显影响，超过一定浓度后，表现出一定的抑制作用。

在饲料成型剂研究方面，张亚平等（2003）以淀粉和卡拉胶为成型剂，研究了人工饲料不同成型剂对稚蚕饲育的影响，在含桑绿枝粉稚蚕人工饲料配方中，进行稚蚕饲育对照试验，除2龄眠蚕体重外，各项饲育成绩无显著差异，3龄改喂桑叶后，淀粉区饲育成绩迅速提高；含淀粉饲料价格低廉，在加水量适宜时，可以采取切条给饵方法。黄健辉等（1995）对桑蚕人工饲料成型剂的研究表明，卡拉胶的溶解温度、固化温度、凝胶融化温度和持水性等各项指标都接近或优于琼脂，以之配制的人工饲料对桑蚕的生长发育无不良影响，因此，卡拉胶是取代琼脂作为桑蚕人工饲料的理想成型剂。崔为正等（1998）以玉米粉为成型剂的稚蚕人工饲料的研究表明，玉米粉作为家蚕人工饲料成型剂，具有良好的成型性能和保水性能，并具有促进蚕儿摄食和生长发育的作用；稚蚕人工饲料中添加40%左右的玉米粉，取代琼脂、淀粉等传统成型剂。

在桑叶粉及糖类添加效果研究方面，徐俊良等（1993）进行了人工饲料桑叶粉含量的研究，结果为桑叶粉含量高，摄食性好，发育快而齐。张传溪等（1993）研究了人工饲料含糖量对蚕生长发育的影响，用含糖不同百分比的饲料饲育1—3龄蚕，疏毛率、发育速度和体重等指标均以4%为最好，其次为8%处理，5龄蚕以5%处理最好。王超云等（2001）对稚蚕人工饲料中桑绿枝粉的添加效果及加工特点进行了研究，结果以添加桑绿枝粉的稚蚕人工饲料各项成绩最为理想，稚蚕对其有良好的摄食性，从而为研制稚蚕低成本人工饲料开辟了新的原料来源。崔为正等（2002）研究了促食物质和阻食物质相互作用对家蚕摄食性的影响，结果表明，将桑叶粉、蔗糖、

肌醇等促食物质同时添加到饲料中,对家蚕的取食有协同促进作用;脱脂大豆粉、柠檬酸等摄食抑制物质的阻食作用也具有累加性;而将促食物质和阻食物质混合添加时,二者表现为相互抑制效应。王安皆等(2000)对稚蚕低成本人工饲料配方中蔗糖删除的效果试验表明,对添加蔗糖和不添加蔗糖的人工饲料配方进行对比试验,得出不加蔗糖用淀粉补充,同样有较好的饲养成绩,在一定程度上降低了饲料成本。

在人工饲料防腐剂的研究方面,金振玉等(1999)对家蚕人工饲料防腐剂进行了研究,试验表明:在家蚕人工饲料中采用山梨酸与丙酸按一定比例复合添加,防腐效果明显,家蚕生长良好。何勇等(1991)对家蚕人工饲料防腐剂DF效果进行了试验,结果表明DF在高温多湿的养蚕环境中对家蚕人工饲料中的霉菌具有强烈抑制作用,防腐效果明显优于山梨酸和丙酸等防腐剂,添加2000ppm剂量,即可使饲料30天不生霉菌。张传溪等(1994)对人工饲料防腐剂进行了研究,结果表明山梨酸的防腐效果最好,其次是丙酸,再次是苯甲酸钠。黄健辉等(1996)研制了新型的人工饲料防腐剂ADA,将新型防腐剂ADA加入家蚕人工饲料中,对在高温多湿养蚕环境下,容易引起人工饲料霉变的酵母菌群、格兰氏阴性菌群和霉菌群有明显的抑制作用,可延长人工饲料的存放和使用时间,而不影响其适口性、颜色、香味与成份,防腐效果明显优于苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸和丙酸等。崔为政(1999)以小蚕生长发育及人工饲料保质期为指标,筛选出由山梨酸、BCM及强力霉素组成的复合型防腐抗菌剂,不仅明显提高了人工饲料的防腐能力,而且对蚕的败血症和僵病的治疗效果均达到90%以上,具有防腐和防病的双重作用。

在人工饲料酸碱度及含水率研究方面,黄健辉等(1996)研究了人工饲料 pH 值和缓冲性能对家蚕生长发育的影响,表明饲料的缓冲力 pH 值以及缓冲液浓度对家蚕的生长发育有显著影响,饲料缓冲液浓度和缓冲力的增加,饲料 pH 值的降低,都会引起蚕体重增量、相对生长率和净生长效率的降低,龄期经过的延长、消化后用于能量代谢的食物量的增加,在检验的 pH 值范围内(4.0~5.5),饲料 pH 值对家蚕生长发育和适口性的影响要小于饲料缓冲力,而略大于缓冲液浓度。黄健辉等(1997)研究了家蚕不同发育阶段饲料适宜的 pH 值,结果表明:蚁蚕摄食和稚蚕饲育的最低人工饲料 pH 值分别为4.3和4.5,壮蚕人工饲料的适宜 pH 位范围是4.4~4.7,但当3龄采用桑叶育时,1~2龄中所用人工饲料的 pH 值以4.2~4.4为最佳。

1.2.2.3 家蚕食性遗传方式的研究

关于家蚕食性遗传方式的研究,国内学者尽管对此进行了较为广泛的研究,提出了多种摄食性遗传模式。代方银等(2004)通过家蚕广食性系统GS01对甘蓝摄食性的遗传研究,结果为GS01对甘蓝的摄食性由显性主效基因控制,推测同时存在修饰基因的作用;在其它系统中发现了GS01对甘蓝摄食性的显性抑制基因。李卫国等(2000)对家蚕人工饲料摄食性遗传模式进行了研究,在前人研究的基础上,应用直观分析、方差分析和生物统计遗传学的方法,对摄食性较高的日系品种54A和摄食性低的中系品种丰1及其杂交组合等共10个世代进行遗传模式研究,得出家蚕对人工饲料摄食性遗传符合加性—显性—母性影响遗传模式。何勇等(1990)对桑蚕人工饲料摄食性的遗传研究表明,摄食性主要由微效多基因控制,基因效应中加性效应大,伴有母性基因效应,无显性效应。

1.2.2.4 生理生化研究

蚕的食性主要取决于饲料中的诱食因子、咬食因子和吞咽因子,以及这些摄食促进物质与忌避物质的相互作用。为查明桑蚕对人工饲料摄食性差异的生理原因,开展了对人工饲料食性影响因素的研究。崔为正(1999)进行了桑蚕摘除部分感觉器对人工饲料摄食性影响的研究,发现桑蚕摘除了触角、下额须或下额瘤状体后,对人工饲料的摄食性均显著提高,摄食性个体差异减小,对桑叶或人工饲料趋性强的个体,其摄食性较高;人工饲料中不仅存在对蚕的味觉有抑制作用的物质,也存在对嗅觉有忌避作用的成分,嗅觉在决定对人工饲料摄食性方面具有重要作用。李春峰(2000)对人工饲料育家蚕中肠和血液中几种消化酶活性变化进行了研究,结果表明人工饲料育蚕与桑叶育蚕中肠消化液淀粉酶、磷酸酶活性变化有明显差异,海藻糖酶以及蛋白酶等活性变化差异不大。崔为正等(2002)对家蚕味觉电生理反应的个体差异进行了研究,结果表明,栓锥感器 $S_s \sim 1$ 对蔗糖等促食物质的反应以及栓锥感器 $S_s \sim II$ 对大豆粉提取物等阻食物质的反应,均存在明显的个体差异;在临界浓度下,低摄食性个体的放电脉冲频率显著高于高摄食性个体,说明低摄食性蚕的味觉反应比高摄食性蚕敏感。崔为正等(2002)研究了促食物质和阻食物质相互作用对家蚕摄食性的影响,结果表明将桑叶粉、蔗糖、肌醇等促食物质同时添加到饲料中,对家蚕的取食有协同促进作用,脱脂大豆粉、柠檬酸等摄食抑制物质的阻食作用也具有累加性。将促食物质和阻食物质混合添加时,二者表现为相互抑制效应;添加促食剂是减弱或消除阻食性物质的摄食抑制作用的有效途径。胡增娟(2002)对线性规划人工饲料中粗蛋白含量对家蚕若干生理性状的影响进行了研究,随着LP饲料中豆粕粉和粗蛋白含量的增加,蚕的饲料效率提高,但超过一定限度,蚕的摄食性和消化吸收机能被抑制,生长发育不良。

1.2.2.5 人工饲料育适应性蚕品种的选育

为提高传统养蚕业的劳动生产率,家蚕人工饲料育技术的研究逐步受到人们的重视。为此,许多学者进行了对人工饲料摄食性好的育种材料选拔研究。陶鸣等(1994)进行了家蚕原种人工饲料适应性品系的选拔,研究了家蚕中、日系原种与杂交种对人工饲料适应性的差异,经累代定向选择,建立了苏5、菁松人工饲料适应性品系,该品系对人工饲料适应性比非选拔系有明显提高,配以优良的原种饲料,进行原种稚蚕人工饲料育,综合成绩基本达到桑叶育水平。徐孟奎等(1996)进行了人工饲料摄食性好的家蚕基础品种GSC5、GSJ1的选育,通过选拔生长良好的个体继代,连续数代,得到了对人工饲料食性好的系统。代方银等(2003)进行了家蚕保存系统广食性种质的检出与培育,不同系统对检测食物的摄食反应差异很大,分别采集摄食个体自交继代,经过筛选,从中建立了10个广食性资源品系,优先对表现优良的CS01进行连续多代复选,获得了摄食率达到或接近100%的蛾区。

1.2.2.6 稚蚕人工饲料育关键饲育技术研究

为了研究和解决我国目前缺乏人工饲料育实用蚕品种以及现行多丝量原种对人工饲料适应性差的问题,国内许多学者开展了适合于我国现行蚕品种的原种稚蚕饲料的研究。吴小峰等(1996)家蚕豆腐渣人工饲料及五龄期饲育研究表明,蚕体发育正常,豆腐渣35%饲料区各项茧丝质成绩与对照区相仿,生产的茧丝色泽好,丝色白,抗黄化能力强,研究认为豆腐渣是一

种理想的人工饲料素材,在以现行蚕品种为对象的人工饲料中加35%左右为宜。张国政等(1994)进行了家蚕原种人工饲料适应性及稚蚕饲料实用化研究,比较了现行蚕品种原种的人工饲料适应性,从脱脂豆粕粉的添加、脱脂菜籽粕粉的利用、生长促进物质和成型剂的改进等方面进行了研究,设计了现行蚕品种原种稚蚕实用化饲料配方,稚蚕人工饲料育的各项成绩达到或接近桑叶育水平,饲育成本接近,基本达到实用化要求。王伟东等(1998)进行了蚕人工饲料育生产实用化研究,通过比较稚蚕人工饲料育饲育型式与小蚕生长发育的关系,研究结果为人工饲料育蚕的疏毛率、全龄发育经过及生命率等与全龄桑叶育无明显差异,生产上应用该技术,小蚕饲养总费用可减少50%以上,养蚕综合经济效益提高15%以上。缪云根(2000)研究了家蚕人工饲料育的小蚕饲育技术,结果表明不带卵壳收蚁其疏毛率、起蚕率、生长发育进度优于带壳卵收蚁;收蚁用饲料以平板状为好,有利于蚕的取食和疏毛,2龄以后用片状饲料饲育较适宜。王洪利等(2000)探讨了稚蚕人工饲料育的关键饲育技术,结果为稚蚕人工饲料育尽量避免蚁蚕饥饿和冷藏,以黑暗封闭饲育为宜,普通蚕种可以进行条状给饵每龄一次育,高摄食性蚕种可进行平板给饵1—2龄一次育。陈端豪等(2002)用山东省蚕研所研制的人工饲料,对湖州市现行的6对蚕品种进行了稚蚕1—2龄人工饲料育试验,结果全龄眠起齐一,生长发育良好,其中5对品种能获得全龄桑叶育95%以上的产茧量。

1.2.3 展望

人工饲料养蚕是养蚕技术上的一项重大革新,其意义在于养蚕可以不受季节与自然条件的限制,可有效防止蚕期蚕病感染,提高共育质量,对调整养蚕布局、增加养蚕批次、减轻劳动强度、增产桑叶等方面都有重要意义。我国对家蚕人工饲料养蚕技术的研究,有近三十年历史,在基础研究方面取得很大进展,预计在今后五至十年,人工饲料养蚕技术将在我国得到逐步推广,并将成为二十一世纪现代蚕业技术的重要组成。我国家蚕人工饲料的开发研究,今后应从实验室研究转向实用生产技术的开发研究,使家蚕人工饲料尽快走上产业化之路,使技术转化为生产力。应先期开发小蚕人工饲料育,使小蚕人工饲料育尽快实用化;开发研究适合目前多丝量品种的小蚕人工饲料,在现行生产用品种中,筛选出比较适应人工饲料育的品种;研究开发适合这些蚕品种的小蚕人工饲料;优化人工饲料配方、加工工艺,对收蚁、养蚕、消毒和防病等技术体系进行规范化,解决人工饲料育蚕的发育整齐度、遗失蚕问题和眠起处理技术;建立适合我国国情的人工饲料饲育体系,使人工饲料共育在生产中实用化。其次是面向人工饲料工厂化养蚕,开发研究全龄人工饲料育技术;培育适合人工饲料育的广食性多丝量蚕品种,重视提高育成蚕品种的消化率,使蚕的饲料利用效率得到提高;最后是通过培育适合人工饲料的广食性蚕品种,改进人工饲料的配方,寻找人工饲料中各种成份的廉价替代品,使人工饲料成本大幅度降低,为全龄人工饲料工厂化养蚕提供必要条件。

1.3 家蚕指纹图谱研究的目的是与意义

近几年来,随着生化分析和分子生物学技术的迅速发展,作物种子及动物品种的品种鉴别和纯度检验方法已由外观形态发展到生理生化水平和分子水平上的鉴定。传统的品种的纯度和真伪鉴定是以形态学标记为依据的,从遗传学角度来看,用形态学标记鉴定品种的基因型显然是不够准确的,因为用形态学方法不能反应品种的基因型。由于形态学方法的诸多不足,用一种快速、

简便、准确、实用的室内检测方法来代替形态法已成必然。蛋白质电泳技术、同工酶技术和DNA分子标记技术可以在分子水平上反应出品种间DNA的多态性和组成上的差异，能够在生长发育的任何阶段取材鉴定，不受环境因素的制约。将电泳技术和DNA指纹分析应用到遗传育种、品种鉴定、种子纯度检验以及遗传疾病的诊断等领域，恰恰顺应了这一要求。

指纹图谱是一种以电泳图或杂交图对蛋白质或DNA的结构特征进行分析的方法。在DNA指纹图谱分析中，大分子DNA经合适的限制性内切酶酶解，然后在凝胶介质中电泳，将酶解片段分离，所得分离图谱即为DNA指纹图谱。由于DNA指纹图谱具有多位点性、高变异性、简单而稳定的遗传性，因而自其诞生就引起了人们的重视，表现出巨大的实用价值。DNA指纹图谱成为研究动植物群体遗传结构、生态与进化、分类等很有价值的遗传标记。它主要应用于动植物品种的鉴定、品种纯度的检验、品种亲缘关系和分类研究。自1966年Harris、Johnson和Hubby等采用蛋白电泳技术首次研究了同工酶和蛋白质的多态性以来，各种新的技术不断涌现，并逐渐从蛋白质水平深入到DNA水平，如DNA指纹图谱、DNA限制性片段长度多态性分析、随机扩增多态DNA分析、DNA序列分析、微卫星DNA分析、单链构象多态DNA分析等。

1.4 指纹图谱研究内容与方法

1.4.1 蛋白质电泳技术

蛋白质是动植物基因表达的产物，不同品种或杂交种的基因有一定差异，在蛋白质表达上有一定差别。被提取出的蛋白质经合适的蛋白酶分解成不同的多态片段，而不同的多态片段在大小、带电荷状态、等电点、在特定溶剂中分配系数等存在差异，可采用双向分离方法将他们彼此分离开来。利用电泳技术对各检样品的蛋白质进行分离、染色，形成蛋白质电泳谱带的差异，并与标准品种相比较，从而鉴定品种的真实性和纯度。在蛋白质指纹图谱分析中，不同动植物品种基因不同，基因的直接表达产物——蛋白质在种类、数量、结构等方面亦不同，因此不同的品种和杂交种具有不同的蛋白质分子谱带模式，可以将品种区分开来。该法快速、可靠，不受环境影响，可利用蛋白质的多态性来反映不同品种DNA组成上的差异，进行品种鉴定。

蛋白质电泳在品种鉴定和纯度分析中主要有等电聚焦电泳法（IEF）和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDA-PAGE）两种方法（吴敏生等，1998）。等电聚焦电泳法（IEF）的原理是在电解槽中放入载体两性电解质，当通以直流电时，即形成一个由阳极到阴极逐渐增加的PH梯度。由于蛋白质是两性电解质，在一定的PH溶液中，蛋白质具有特定的等电点，当把蛋白质分子放入上述体系时，不同蛋白质移动到相当于其等电点pH的位置，这样不同的蛋白质由于其等电点PH不同即可分开，不同品种具有的蛋白质种类、含量不同，在等电聚焦时，就可以形成不同谱带，这样就可以将品种分开以及进行纯度鉴定。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDA-PAGE）是先由聚丙烯酰胺单体聚合成链，并通过双功能化合物N,N-亚基双丙烯酰胺与长链末端游离的功能基反应形成聚丙烯酰胺，聚合时，形成不同孔径，当改变丙烯酰胺浓度时，则有效孔径改变。当加入变性剂SDS时，则蛋白质发生变性，形成不同多肽亚基，在电泳时，多肽按照分子量大小移动。不同蛋白质变性后，分子量不同，就可以区分品种及进行纯度检验。

在品种鉴别方面，Cross（1983）利用PAGE法分析玉米种子胚蛋白，成功地将自交系和杂交

种分开。方玉春等(2001)利用盐溶蛋白PAGE对38份玉米杂交种和37份亲本自交系进行了纯度检验,鉴定有效率达89%,对同一母本或同一父本的不同单交种,虽然在形态上很难区分,但用该方法检验表现出很好的多态性。李拥军等(1999)利用种子贮藏蛋白SDS-PAGE方法,研究分析我国18个紫花苜蓿地方品种间的亲缘关系。靳远祥等(2005)进行了家蚕雌性附腺及其分泌物的蛋白质双向电泳分析,用裂解缓冲液可以得到丰度较高的蛋白质混合物,利用双向电泳技术可以获得高分辨率、高重复性的蛋白质图谱。殷工等(2003)应用蛋白质电泳技术对新疆家蚕品种资源遗传距离的研究表明,供试10个蚕品种均有8—11条蛋白质带,并有29条不同的RF值蛋白带,蛋白质谱较为相似,相似系数在0.65~1.00之间,10个家蚕品种聚为一类,亲缘关系较近,但品种间有差距。李文楚等(2003)用感染了败血病的家蚕血液在SDS-PAGE上电泳,比较分析蛋白带及各蛋白带的蛋白质含量,与对照比较感染了败血病的家蚕血液中有两条新的蛋白带,败血病感染的家蚕血液少一条蛋白带。由此可见败血病的感染引起了家蚕血液复杂的生理生化反应。靳远祥等(2005)对雌性附腺分泌部及胶状粘液的蛋白质进行提取,并用双向电泳进行分离和分析,结果表明:用裂解缓冲液可以得到丰度较高的蛋白质混合物,利用双向电泳技术可以获得高分辨率、高重复性的蛋白质图谱。

1.4.2 同工酶技术

同工酶是基因的产物,具有物种、组织器官和发育阶段的特异性。作为基因存在和表达的一种生化指标,已成为分子水平上研究生物现象的一项有效手段,在遗传学、育种学、分类学、生理学、病理学中得到广泛的应用。1959年 Markert 首次用电泳法发现乳酸脱氢酶具有多种分子形式,并将其称为同工酶。所谓同工酶是指来源相同,催化相同反应而结构不同的酶分子类型,具有组织、发育和品种间特异性。同工酶电泳法是指利用电泳技术来分离各种酶的同工酶,通过比较同工酶谱,来确定作物种子的纯度。同工酶的测定与分析是研究分子遗传学、生物进化的手段和工具之一。与其他方法相比,该法还存在着一些不足,主要为不同组织、不同发育时期,同工酶的数量和组成不同;利用同工酶鉴定种子纯度,因为种子在萌发进程上的不一致而导致检验结果偏差较大;谱带位点与凝胶浓度、提取液配方、电泳程序等有关;因酶易失活,故技术上有一定难度。同工酶主要包括淀粉同工酶、酯酶同工酶和磷酸酶同工酶。淀粉酶(Amylase)是指能够催化淀粉水解作用的一种酶。根据合成物和分解产物的旋光性可分为 α -淀粉酶和 β -淀粉酶;根据合成、分解糖的分子量,分为糊精化淀粉酶和糖化淀粉酶。酯酶(Lipase)是能够催化脂类合成或分解为脂肪酸和醇。酯酶有许多同工酶,广泛存在于各种组织器官中。磷酸酶(Phosphatase)可分为两种,一种只能催化特定的磷酸化合物反应,称特异底物磷酸酶;另一种是能对一般的磷酸化合物发生催化作用,称非特异底物磷酸酶。

家蚕同工酶的研究是从60年代开始的,国内外学者从遗传、发生及实用角度,对同工酶进行了广泛深入的研究。罗英等(2002)采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和酶活性染色,分析了115个家蚕品种及遗传系统的血液SOD同工酶的酶谱。结果:不同品种及遗传系统间的酶谱存在着显著差异。家蚕血液SOD在大部分供试品种及遗传系统中都能看到5条酶带,少数只能见到2条弱带,酶带最多者达8条。何家禄等(1983)用聚丙烯酰胺凝胶电泳调查了338个家蚕品种的血酶谱同工酶酶谱,发现家蚕血液酶谱同工酶酶谱可分为A、B、C3个染色区,其中主要染色区A有A₁、A₂、A₁A₂、

A₀4种表型, 分别由A₁、A₂和A₀3个共显性复等位基因控制。钟伯雄(1998)用中系品种为母本, 日系品种为父本, 测定杂交种转青卵碱性磷酸酶活力, 结果为卵碱性磷酸酶活力与经济性状有着某种程度的相关性, 其中以热敏性碱性磷酸酶活力与经济性状表型相关尤其密切。家蚕血液中的多酚氧化酶是蚕体内一种重要成分, 与蚕生长发育有密切关系, 李东升等(1976)对家蚕血液多酚氧化酶同工酶及其活性进行了研究, 电泳结果表明家蚕存在多酚氧化酶同工酶可被染棕黄色谱带, 根据电泳谱带扫描结果和各谱带迁移率, 可以看出家蚕血液存在9条多酚氧化酶同工酶, 其中主带有2条, 次弱带有3条, 弱带有4条。蔡宏玉等(2000)采用垂直不连续聚丙烯酰胺凝胶薄层电泳(PAGE), 对家蚕血液酯酶同工酶进行了大量的调查, 结果表明. 双亲酶谱的差异越大, 其杂种出现互补酶带和杂种酶带的机会越多, 此类杂种具有较强杂种优势的可能性也较大。因此, 应用PAGE进行家蚕血液酯酶同工酶谱的分析, 作为筛选家蚕杂交优势较强的组合亲本和早期预测杂种优势, 对缩短家蚕育种周期起着重要的作用。庄淑芳(2004)进行了同工酶电泳技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用探析, 通过对酯酶同工酶电泳技术与田间种植法鉴定杂交水稻种子纯度的结果进行比较, 证明两种鉴定结果无显著差异, 酯酶同工酶电泳技术鉴定种子纯度可作为辅助手段应用于生产实践。沈镛等(2004)用的5种同工酶分析了云南芋种质资源的遗传多样性, 结果表明: 48份材料的5种同工酶的酶带数分别在11~19条之间, 除超氧化物歧化酶仅有3种酶谱类型外, 其余4种同工酶的酶谱数均超过检测试材的半数。从同工酶分析结果来看, 云南省的芋种质资源呈现丰富的遗传多样性。何士敏等对(2005)蜜蜂酯酶同工酶的比较研究表明: 蜜蜂总科内各属间酶谱明显不同, 每个属都有各自固定的谱型, 彼此容易区分, 同一属内不同种蜜蜂的同工酶谱相似。

1.4.3 DNA分子标记技术

生物的不同个体或不同种群在DNA结构上存在着差异, 即DNA的多态性。个体的DNA用内切酶切断后, 片段的数目和长度具有高度的个体特异性, 经过凝胶电泳, 或以特定的探针作Southern杂交, 都会产生具有高度个体特异性的谱带, 称为DNA指纹图谱。此概念的基础是限制性内切酶酶切片段长度多态性(RFLP)。1985年Jefferys及其合作者首次将分离的人源小卫星用作基因探针, 同人体核DNA的酶切片段杂交, 获得了由多个位点上的等位基因组成的DNA指纹图谱, 从而开创了检测DNA多态性的多种多样的手段, 如RFLP分析、串联重复序列分析、RADP分析等等。各种分析方法均以DNA的多态性为基础, 产生具有高度个体特异性的DNA指纹图谱, 由于DNA指纹图谱具有高度的变异性和稳定的遗传性, 且仍按简单的孟德尔方式遗传, 成为目前最具吸引力的遗传标记。自1985年以来, 人们从各个环节对DNA指纹技术加以完善, 使其在短短的几年中得以迅速发展。DNA指纹图谱法的应用十分广泛。它在人类医学中被用于个体鉴别、确定亲缘关系, 医学诊断及寻找与疾病连锁的遗传标记; 在动物进化学中可用于探明动物种群的起源及进化过程; 在动物分类中, DNA指纹图谱可用于区分不同物种, 也有区分同一物种不同品系的潜力。DNA指纹图谱法在畜牧业及特种动物上的应用也做了不少研究。目前, 在动植物品种鉴定中应用的有RFLP技术、AFLP技术、RAPD技术和微卫星技术等。

1.4.3.1 RFLP技术

限制性片段长度多态性, 即RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)是由

Grodzicker(1974)最早创立的,是分析不同生物个体间基因细微差异的可靠方法。它的基本原理是:当用限制性内切酶切割不同品种的DNA时,会产生相当多的数目和大小不等的DNA片段。对其进行电泳,并利用放射性同位素标记的DNA作探针进行分子杂交,来显示与探针同源的酶切片段在长度上的多态性,从而将不同品种的种子区别开来。由于同种作物不同品种间能找到较多RFLP标记,利用某一品种特定的RFLP可以准确地标记该品种,因而该项技术是进行品种真实性及纯度鉴定的可靠方法。RFLP多态性稳定、容易重复,结果准确。但该技术也存在一些不足之处:多态有限、成本昂贵、费时,同时放射性同位素的使用会影响人体安全,从而限制了该技术在实践中的应用。

在谷子品种的指纹分析与品种鉴定方面,王志民等(1996年)用高度多态性探针gFM31对59个谷子品种进行DNA指纹分析,共鉴定出58种类型,而黑谷和黑粒1516给出了完全相同的带型,二者可能是同一材料,同时,他们还发现其中有小卫星和微卫星DNA序列,而且该探针在谷子中有很高的多态性,但与禾谷类的其他物种的DNA杂交信号微弱,表现出较强的谷子基因组特异性。相金英等(1999年)用高度多态性探针PSF31做了同样的试验,结果59个品种共鉴定出57种类型,发现黑谷与黑粒1516带型相同,与王志民的结果一致。Goldsmith等(1994)首先采用RFLP法,筛选得到60个家蚕的DNA标记,其中13个标记分布在已知的10个基因座位上,且已被克隆,另有9个标记是反转录转座子。Goldsmith M. R.等(1994)利用6种限制性内切酶21个克隆基因和100个随机克隆片段,对家蚕13个已知位点基因进行RFLP分析,得到了与16个已知连锁群连锁、8个无连锁的RFLP标记。鲁成等(1995)等利用丝胶基因(PSr100)探针,对东34、秋白、裸蛹的10个品种与HindIII、EcoRI、Bgl II等9种限制性内切酶计90种基因组DNA/酶组合进行了多态性分析。Kikuchi等(1992)用RFLP技术分析了家蚕丝素基因的上游调控区,发现丝素重链基因与丝素轻链基因的上游调控区有很大的相似性。Pinyara等(1995)用RFLP技术将家蚕滞育激素DH基因定位于第22染色体连锁群上。廖顺尧等(2001)用29种限制性内切酶对35个不同品种家蚕卵线粒体DNA进行酶切分析,发现一化、二化品种与多化品种的HaeIII酶切图谱有差异,另外,一些家蚕品种的受精卵和非受精卵mtDNA在Bgl I和Pst I酶切下,也呈现不同的酶切带型,绘制了较精确的家蚕mtDNA限制性内切酶酶切图谱。

1.4.3.2 AFLP技术

扩增片段长度多态性,即AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)是荷兰科学家Zabeen等人(1992)发明的一项专利技术,实质是RFLP和PCR两项技术的结合,具有RFLP的稳定性和PCR技术的高效性。其原理如下:当基因组DNA经酶切后,会形成大小不等的随机限制性DNA片段,在这些限制性片段的两端连接上与酶切位点配对的特定接头,然后用与接头互补的专用引物进行PCR扩增、电泳、放射自显影显示DNA指纹。为有选择地扩增某些限制性片段,专用引物在酶切位点序列的3'端还添加1-10个长度不等的随机脱氧核苷酸,由此可调节AFLP产物条带的特异性和数量。该技术避免了分子杂交的复杂程序,灵敏度高、快速、多态性强、DNA的用量少、具较好的重复性,AFLP现在已被广泛应用于拟南芥(翁跃进,1996)、水稻(Mackill D等,1996)、大麦(Pakniyat H等,1997)、马铃薯(Meksem K等,1995)、番茄(Thomas C M等,1995)等植物的高密度遗传图谱的构建、分子标记的筛选以及遗传多样性的研究。不足之处是操作时间长,

步骤多,对实验技能及仪器设备的精密度要求很高,加之是专利技术,受专利法保护,所以该法不宜大面积普及推广。

鲁成等(2001)用AFLP技术,对我国现有代表性的10个不同地区野桑蚕和33个家蚕品种以及5个作为外群对照的柞蚕品种进行了研究,结果表明不同地区野桑蚕之间的遗传距离与家蚕品种之间的遗传距离相似,而家蚕与野桑蚕之间的遗传距离明显小于家蚕与柞蚕、野桑蚕与柞蚕之间的遗传距离,进一步证明了家蚕起源于中国野桑蚕。万春玲(1999)用AFLP标记对家蚕品种782和 od100 的回交子代48个个体基因组 DNA 的限制性酶切片进行选择性扩增,获得 DNA 指纹图谱清晰可见。每个个体扩增带的数目在100条左右,扩增片段大小在50—600bp间,其中有约50个多态位点,表明家蚕中与植物一样也存在大量的AFLP标记多态性。为探讨家蚕的起源分化和其系统发育,为家蚕遗传育种提供科学依据,周泽扬(2004)利用AFLP技术和统计学分析对具有代表性的9个不同的地区家蚕品种进行了分子系统学研究,家蚕DNA多态性分析及其聚类分析结果证实家蚕可能起源于不同地方,由多种生态类型混杂的野蚕驯化而来。司马杨虎等(2003)为研究家蚕遗传的多样性,以家蚕品种湘晖×872杂交的91个F₂个体为材料,采用AFLP分子标记技术,对杂交后代的分离规律进行了研究,结果采用的44对引物共扩增出5134条带,其中1002条带呈多态性;经检测有537条带符合3:1分离比。朱玉芳(2001)利用改进的AFLP分子标记方法,对家蚕回交一代 BC₁ 群体进行连锁图谱的构建,经17组AFLP引物的选择性扩增,共得到430个多态位点,卡方检验后有253个为有效位点,利用Mapmaker软件作连锁分析,其中163个标记分属28个连锁群。张金卫等(2004)利用AFLP分子标记技术,对浙江省生产上应用的6个家蚕品种(包括正反交)进行了DNA指纹分析,筛选出的5对引物在6个家蚕品种中共扩增出157条带(平均每对引物扩增31.4条带),其中有多态性带54条(平均每对引物扩增多态性带10.8条),多态性比例为34.4%。通过这些多态性条带的不同组合,可明确将供试的6个家蚕品种加以区分,并作为6个家蚕品种鉴定的依据。宋顺华等(2005)采用AFLP技术,研究了90份来自7个不同栽培地区的大白菜品种材料,共筛选了20对引物,不同引物组合检测多态性谱带的能力有很大的差异,多态性谱带的数量从9条到32条不等。其中E—ACA / M—CTG是大白菜品种十分高效的引物组合,共产生71条清晰的扩增带,其中有32条多态性谱带。通过该引物组合,能将90个品种全部区分开来,表明AFLP标记用于研究品种指纹图谱,并鉴别品种是完全可行的。任军等(2003)对猪基因组AFLP指纹图谱构建的各项条件进行了优化,包括双酶切消化、接头连接、预扩增和选择性扩增、凝胶电泳银染技术及荧光标记检测法等,建立了稳定的猪基因组DNA的AFLP指纹图谱构建方法,采用E32 / T32引物组合在45个猪种基因组混合DNA中检测到28个多态标记。刘杰等(2002)从杂交油菜AI 5 及其亲本的1/2 粒干种子中提取基因组DNA,选用17对引物组合进行AFLP分析,构建了他们的指纹图谱,在1125条扩增产物中144条带表现出多态性,用引物组合E—ACG/M—CTG对AI 5、双亲及其他油菜杂交种进行AFLP分析,不仅表现出良好的多态性,并能够清楚地将它们加以区分。

1.4.3.3 RAPD技术

随机扩增的DNA多态性,即RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)是由美国杜邦公司Williams等人(1990)和加利福尼亚生物研究所Welsh等(1990)领导的两个小组同时发展起来的一种新的DNA指纹技术。此技术利用随机合成的寡聚核苷酸序列(9—10个bp)作为引物,对所研究的

基因组DNA进行PCR扩增, 扩增产物在琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离, 并经溴化乙锭染色或银染色得到多态性的DNA图谱。在基因组上, 每个引物可以连续直接扩增特定的DNA片段, 对一个特定的基因型来讲, 这些扩增的片段或片段的类型是唯一的, 因此用来鉴定品种纯度是很有用的。RAPD指纹能及其灵敏地揭示两个亲缘关系十分相近的个体之间的遗传变异, 适合检测种下水平的多样性。用RAPD技术评估种质资源、鉴定品种并探明与其近缘野生种的遗传关系, 以及在遗传育种的实践中和在物种起源的理论研究中都有重要的意义。RAPD技术反应灵敏、多态性强, 操作简便, 速度快, 费用低, 既有大量的随机引物可供筛选之用, 又不受种属的限制, 被广泛用于多种作物的种子鉴定。RAPD技术不足之处是, 提供的信息不够全; 结果重复性不好; RAPD一般为显性标记, 不能鉴定杂合子, 该项技术在种子纯度鉴定中存在有一定的局限性。

梁明山等(2001)进行了烟草品种的DNA指纹图谱和品种鉴定的研究, 在RAPD标准条件下, 检测到了烟草10个品种材料基因组的多态性, 多态性达81.1%, 其中P7的扩增图谱, 各品种间可以互相区别, 可用作烟草10个品种鉴定的DNA指纹图谱。谭和平等(2004)用RAPD技术对茶树品种鉴别的研究表明, 使用OPI14一个引物扩增的DNA指纹图谱能区别开绿茶的15个品种, 使用OPI13能区别开绿茶、红茶的12个品种(其中绿茶5个、红茶7个), 使用OPA10能区别开绿茶、红茶、乌龙茶共计12个品种。耿红等(2005)对黄瓜育成品种“春玉”RAPD指纹图谱分析结果表明, 从300条随机引物中筛选出能稳定扩增的26个引物, 对黄瓜育成品种“春玉”等21个实验材料进行扩增, 在扩增的173条谱带中, 多态带有80条, 比例为46.24%, “春玉”在用引物E13扩增时有特异缺失条带, 大小为400 bp, 可作为特征性指纹图谱, 为其产权保护提供分子依据。Mamufis Z等(2002)通过RAPD技术分析了瑞典褐色兔基因结构, 结果相当稳定, 为这些品种的快速鉴定提供了可靠的依据。Vandewoestijne等(2002)用RAPD和同功酶方法, 对比利时2种蝶类的种群遗传结构进行了研究。结果表明, RAPD方法能更精确和及时地揭示出遗传结构。

应用RAPD技术在家蚕研究方面, 夏庆友等(1998)对59个家蚕*Bombyx mori*品种及野蚕*B. mandarina*之间的遗传变异性的研究表明, 在34个随机引物中12个(35.29%)引物出现稳定的扩增带, 扩增带总条带为103条, 其中86条具有多态性(83.5%), 分析发现RAPD标记不但具有品种特异性, 而且具有系统特异性。Amornrat Promboom等(1995)用P50、C108原种及F1、F2个体为材料, 采用RAPD方法, 利用Mapmaker程序对家蚕分子标记连锁图谱构建取得了大的突破, 现已构建169个位点, 29个RAPD分子标记连锁群。Promboom A等(1995)构建的167个RAPD连锁图谱, 29个连锁群, 其中在a组连锁群中, 最大的连锁群为23连锁群, 7个位点, 长度为96.4 cM, 具有1个位点的连锁群有4个, 2个位点的连锁群有5个, 总长度为897.4 cM; b组连锁群中, 图距最大的为13 b连锁群, 长度达98.0 cM, 只有3个位点, 具有1个位点的连锁群有4个。夏庆友等(1998)利用RAPD标记对不同系统、化性和眠性的共6类69个家蚕品种及野蚕之间的遗传差异进行了研究, 证明中国一化性四眠种为最早从野蚕分化出来的系统, 中国一化性三眠种与中国一化性四眠种在进化上属有显著差异的两个类群。鲁成等(2000)利用RAPD分子标记对11个地区的野桑蚕和25个代表性家蚕进行了DNA多态性研究, 进一步证实了家蚕起源于中国野桑蚕。陈道军等(2000)利用RFLP标记技术, 构建了四川省现行家蚕品种夏芳、秋白、781等9个品种的标准指纹图谱, 证明了该方法在家蚕现行品种相互区别鉴定方面的可行性。

1.4.3.4 微卫星技术

Skinner等(1974)于寄居蟹中识别了卫星DNA的重复序列, Ali等(1986)首次将合成的寡聚核苷酸用于人的指纹研究, Jeffreys等(1988)进一步将其发展成为一种新的遗传标记系统, Tautz等(1989)报道微卫星具有丰富的多态性。微卫星是短的、串联的简单重复序列(Simple Sequence Repeats, 简称SSR), 它的组成基元是1~6个核苷酸, 例如(CA) n 、(GAG) n 、(GACA) n 等。微卫星位点由微卫星的核心序列与其两侧的侧翼序列构成, 侧翼序列使某一微卫星特异地定位于染色体的某一部位, 而微卫星DNA由于核心序列重复次数的不同, 以及重复程度的不同而造成了每个基因座的多态性。微卫星DNA的两侧是相对保守和专一的单拷贝序列。利用侧翼序列设计引物可以特异性扩增微卫星位点, 使微卫星DNA以PCR的形式从基因组中被选择性地扩增出来。这就是微卫星标记。在真核基因组中广泛存在且均匀分布的微卫星, 这些微卫星除重复数不同, 其碱基组成和结构是相似的。用微卫星的核心序列如(AC) n 或(TG) n , 制作的多位点探针, 可以同时检测多个位点(一般多于10个位点), 从而获得更多的信息量。由于不同个体品种(品系)或群体在被检位点上存在一定的差异, 通过电泳和杂交可将这些差异用条带的有或无表现出来, 即产生微卫星DNA指纹图谱。微卫星DNA指纹图可进行个体、品种(系)鉴定及群体遗传变异分析等。微卫星具有数量多、广泛而随机分布于整个基因组中、多态性丰富、呈孟德尔共显性遗传方式、检测快速等特点, 是各类遗传标记中最有价值的一种。

王风格等(2003)进行了玉米品种纯度及真伪鉴定中SSR技术标准实验体系的建立的研究, 仅用少量引物就筛选到适于玉米杂交种农大108纯度鉴定的引物, 并探讨了SSR技术在玉米杂交鉴定中实际应用的可行性。RONGWEN等(1995)用7个SSR标记对96个大豆品种进行种质鉴定, 绝大多数材料各自都有独特的SSR指纹图谱。Burnham等(2002)利用52对SSR引物对110份抗大豆疫霉病的国外引进品种进行了遗传多样性分析, 结果发现韩国的抗源含有不同于美国抗源的新的等位变异, 韩国品种组成了不同于美国种质的另一种质库。吴信生(2004)利用微卫星技术分析了我国部分地方鸡种的遗传结构, 根据群体亲缘关系远近将12个地方鸡种分为3大类。马轩等(2003)18个彩色棉品系的SSR指纹分析利用SSR技术建立了18个彩色棉品系的DNA指纹图谱, 在110对SSR引物中筛选到10对扩增效果较好的引物, 应用其中的4对构建了18个彩色棉的分子检索模式图。同时用这10对引物对18个彩色棉进行了聚类分析, 对它们的亲缘关系作了初步探讨。刘杰等(2000)探讨了两种应用合成微卫星序列对羊草进行分子标记研究的方法, 用短微卫星重复序列作为探针对羊草基因组DNA进行RFLP分析, 并构建了羊草遗传图谱。彭锁堂等(2003)选用分布于水稻12条染色体上的26对SSR引物, 对我国9个主要的杂交水稻组合及其亲本进行了SSR标记分析, 21对多态性引物共扩增出62条条带, 平均2.95条, 能够有效地区分所有恢复系和大部分不育系, 杂交种条带均为父母本的互补型, 很适合做杂交种纯度鉴定, 显示出SSR技术在品种认证和纯度鉴定中有广阔的前景。Reddy(1999)做了家蚕基因组SSR标记的相关研究, 分离出28个微卫星位点, 其中用13个家蚕的品系对15个SSR标记进行了多态性分析。沈利(2003)等以P50为材料构建了一个家蚕长插入片段基因质粒文库, 筛选了8个SSR标记, 与Reddy等报道的微卫星位点不同, 属新的位点。钱荷英等(2005)选育SSR分子标记对96个家蚕品种进行了DNA指纹图谱的构建, 聚类分析表明多数品种能够按所属系统聚为相对集中的一群。

第二章 家蚕人工饲料摄食性遗传研究

2.1 前言

2.1.1 研究的目的与意义

人工饲料的摄食性遗传研究,是家蚕生物学、生理学和遗传学的重要组成部分,主要包括对非桑植物的摄食性遗传及对人工饲料的摄食性遗传两个方面。开展家蚕摄食性遗传的研究的实验意义主要有以下方面:1、揭示昆虫的食性机理。通过对家蚕食性及其行为的生理研究,可以了解植食性昆虫对寄主植物的选择反应过程,为从深层次上揭示昆虫的食性机理提供理论依据。2、人工饲料的摄食性遗传研究,将为改进人工饲料配方和饲养技术,提高发育整齐度,特别是为人工饲料适应性蚕品种和广食性蚕品种的培育提供理论依据和有效方法,还将极大地扩大蚕的饲料资源,革新现有的养蚕技术,为实现蚕业生产的机械化、工厂化,简便化起到积极的推动作用。3、人工饲料的摄食性遗传研究是开展家蚕营养学、病理学等基础研究的重要手段,在家蚕的基因工程产业化等蚕业高新技术领域也有着广阔的应用前景。

人工饲料的摄食性遗传研究的目的,是为了探明不同家蚕品种以及个体间对人工饲料摄食性的差异,以及研究发生摄食性差异的生理原因,并对影响摄食性因素和遗传方式进行分析,为人工饲料适应性蚕品种的选育奠定基础。由于家蚕对人工饲料的摄食性和适应性与蚕品种有关,因此通过人工饲料的摄食性遗传研究,可以了解不同品种间食性差异的程度和基本趋势,阐明决定摄食性的内在因素。通过研究产生摄食性差异的原因,可以了解品种或个体之间感觉生理上的不同,包括中枢神经对各种内外信号的分析 and 综合作用,以及对取食过程的调节控制的差异。

日本从60年代中期就开始进行家蚕广食性研究,用甘蓝型白菜作检测物,从日本系统家蚕中发现了广食性品种,并将广食性蚕品种选育作为日本现代化养蚕体系的基础,但几十年来一直没能从中国系统中发现广食性品种,使广食性品种选育进展不快。我国是家蚕的发源地,拥有丰富的蚕种质资源,利用中国农业科学院蚕业研究所蚕种质资源保存中心现有的700份蚕种质资源,进行家蚕对人工饲料摄食性的调查,能够从中发掘出摄食性优良的广食性蚕品种,特别是摄食性优良的中国系统广食性蚕品种。以降低人工饲料成本和提高家蚕对人工饲料的摄食性为目的,采用不含桑叶粉的人工饲料,进行家蚕人工饲料摄食调查、选拔和摄食性遗传研究,将为今后培育家蚕人工饲料实用性品种,开展人工饲料的实用化研究,促进我国的蚕业技术进步有十分重要的意义。利用传统的形态标记和已经获得的家蚕SSR标记,进行家蚕人工饲料食性遗传机理分析和分子标记筛选,能够为研究家蚕食性基因,获得与食性基因紧密连锁的分子标记及食性基因序列,探明食性基因的机理奠定基础以及开展家蚕分子标记辅助育种提供理论依据。

2.1.2 国内外研究进展

有关家蚕人工饲料的探索,日本起步较早,30年代就有报道,但直到1960年,日本的福田和伊藤才首次用人工饲料养蚕完成了一个世代。而对家蚕对人工饲料摄食性的遗传规律的研究,日本学者神田(1988)以家畜饲料为主要原料(不含桑叶粉)LP-1饲料,进行家蚕人工饲料摄食性调查,摄食性优劣是以收蚁后48小时的疏毛率为指标,结果发现家蚕对LP-1饲料的摄食性在

品种间存在差异,在现行品种中,摄食 LP-1 饲料的主要是日本种,而中国种几乎没有摄食性,并且通过进一步研究比较亲本、F₁、F₂、BC₁ 不同体重级别所含个体数的频率及分布,认为家蚕对不含桑叶粉的人工饲料 LP-1 摄食性的遗传方式,由 1-2 个隐性主基因和数个修饰基因控制。藤森胡有(1982)等从蚕丝试验场保存的蚕品种中,选择 8 个系统进行对含有桑叶粉的人工饲料和准合成饲料进行摄食性调查,发现品种间对两种人工饲料的摄食性差异是相同的,并且根据试验结果判断对人工饲料摄食性高的性状与对人工饲料摄食性低的性状之间呈完全显性遗传。田岛等(1953, 1986, 1989)研究认为“泽 J”广食性品种与食性有关的基因位于第三连锁群。李卫国等(2000)指出,摄食性符合加性-显性-母性遗传模式。何勇等(1990)报道家蚕摄食性由微效多基因控制,基因效应中加性效应大,伴有母体基因型效应,无显性效应。代方银等(2004)分析了家蚕广食性品种对甘蓝摄食性的遗传规律,认为摄食性由显性主效基因控制,推测同时存在修饰基因的作用。

2.1.3 研究的目的

建立适应专业化、规模化、现代化的蚕茧生产技术,一条重要的途径就是推广人工饲料养蚕。由于在人工饲料育实用化技术推广过程中,主要存在着饲料成本过高,现行蚕品种对人工饲料的摄食性和适应性较低,因此阻碍了该技术在蚕业生产上的应用推广。在摄食性的遗传研究方面,国内外尽管对此进行了较为广泛的研究,提出了多种摄食性遗传模式。为了开发低成本人工饲料,选育人工饲料育专用蚕品种,建立符合人工饲料育的技术体系,通过用不含桑叶粉的人工饲料,对中国农业科学院蚕业研究所近 400 份保存品种的调查,从中发现对无桑人工饲料摄食性较好的家蚕品种,尤其是中国系统的品种。在家蚕对不含桑叶粉的人工饲料摄食性调查的基础上,对其部分品种进行累代选拔,以建立的家蚕种质资源广食性资源系统,并通过组配各种不同型式的杂交、回交群体,分析无桑人工饲料摄食性的遗传规律,采用杂交、回交等技术进行广食性基础品种的培育。并进一步利用传统的形态标记和已经获得的家蚕 SSR 标记,对家蚕人工饲料食性进行遗传机理分析及分子标记筛选,研究家蚕食性基因,获得与食性基因紧密连锁的分子标记及食性基因序列。本研究不仅对家蚕分子标记辅助育种、培育家蚕人工饲料实用性品种有着十分重要的意义,而且将对开展人工饲料的实用化研究,对于促进我国的蚕业技术进步有十分重要的意义。

2.1.4 研究的预期结果

用不含桑叶粉的人工饲料对 400 个左右的家蚕保存品种进行摄食性调查,计算出各品种的疏毛率和摄食率。对筛选出摄食率较高的品种用不含桑叶粉的人工饲料进行累代选拔,选拔出 1-2 个摄食性优良的品种,摄食率达到 97-99%。用筛选出摄食性优良品种与摄食性较差品种组配 F₁、F₂和 BC₁等材料,对人工饲料摄食性进行遗传分析。实验过程如下:

饲料准备→品种饲养→摄食性调查→品种选拔→材料组配→遗传模式分析→基础品种选育

2.2 材料

2.2.1 供试蚕品种

人工饲料摄食性调查品种:中国农业科学院蚕业研究所保存的 386 个品种,其中中系一化品

种88个、中系二化品种135个、日系一化品种15个、日系二化品种86个、多化品种14个、欧系一化品种48个。

遗传分析材料：1、广食性系统中01：中国系统，地方品种，一化，三眠。经过多代选择，蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率为99.0%以上。2、广食性系统中02：中国系统，地方品种，一化，四眠。经过多代选择，蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率达到99.0%以上。3、普通品种1015：中国系统，地方品种，一化，三眠。蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率为0。4、普通品种5031：中国系统，选育品种，二化，四眠。蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率为0。

2.2.2 主要仪器

电子秤、人工饲料给料机、塑料饲育箱、冰箱、无菌室、光照培养箱、电子分析天平、玻璃仪器、饲料粉碎机、高压灭菌锅、烘箱、补湿器、计数器

2.2.3 人工饲料组成及加工

豆粕粉30%，菜籽粕粉15%，麦麸粉15%，玉米粉21.5%，米糠粉10%，其他成份(柠檬酸、无机盐、防腐剂和维生素等)8.5%。粉体饲料加水1.8-2.0倍后，100℃隔水蒸煮灭菌40-45分钟，置10℃冰箱保存备用。

2.2.4 主要试剂及药品

无水酒精、蒸馏水、VC、柠檬酸、山梨酸钾、丙酸钙、磷酸二氢钾、碳酸钙、硫酸锰、硫酸镁、VB6、VB1、VB2、烟酸、泛酸钙、氯霉素、庆大霉素、淀粉。

2.3 方法

2.3.1 饲育方法

每个品种取6个蛾区，25℃、RH 75%催青。用人工饲料给料机将饲料挤压成6 mm条状，均匀散布于470 mm×310 mm×60 mm塑料饲育箱，将蚁蚕扫落于饲料上。在29℃、RH 85%、黑暗条件下饲育。

2.3.2 家蚕人工饲料摄食性调查

收蚁时将每蛾区的蚁蚕混匀，取少许蚁蚕进行称重和个体数统计，计算出克蚁头数，然后称量所收全部蚁蚕，计算收蚁的总头数。48 h后调查摄食蚕头数及疏毛蚕头数，计算摄食率及疏毛率。不同家蚕品种48 h摄食率分布按品种系统和化性归类，将各供试蚕品种，按蚁蚕摄食率的高低分4档进行整理统计，即0、0.01%—0.50%、0.51%—1.00%、1.00%以上，统计各档品种个数，计算48 h摄食率和疏毛率平均值、最高值、最低值。

2.3.3 广食性资源系统的建立

材料选拔：对检出的具有优良摄食性的广食性蚕品种，采用混合蛾区育，单蛾育，同蛾区交配，进行蛾区选择和个体选择，重复多代，从而纯化广食性品系。

人工饲料摄食性检测：经过提纯的优良广食性品系，用人工饲料收蚁，48 h 后挑出疏毛蚕，调查蚁蚕疏毛率及生长情况。

2.3.4 不同处理条件家蚕摄食性差异

对优良的广食性蚕品系，在不同蚕卵处理（即时浸酸种、冷藏浸酸种和越年种）和不同人工饲料含水率处理（61.53%、64.28%、65.51%、66.67%和 68.75%）情况下，调查 48 h 后蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的摄食率及疏毛率。

2.3.5 家蚕人工饲料摄食性遗传模式分析

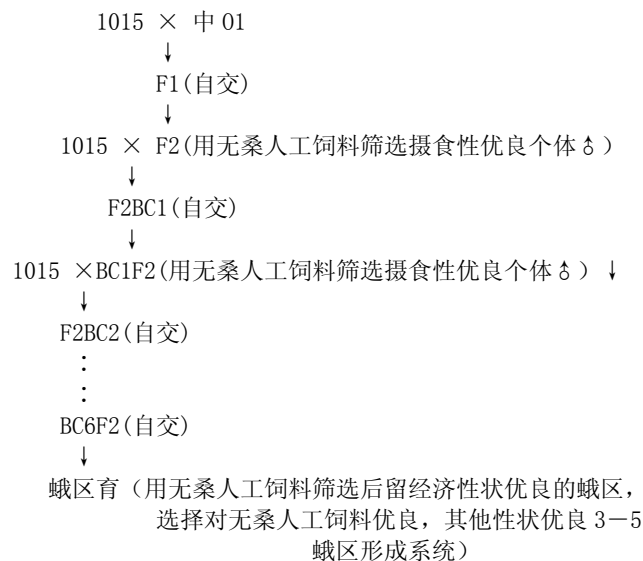
对广食性系统中 O1 进行家蚕人工饲料摄食性遗传模式的研究。广食性系统中 O1 与正常性系统 1015 系统进行杂交、回交，组配成 F1、F2 及 BC1，调查蚁蚕 48 h 后对不含桑叶粉人工饲料的摄食性，分析其遗传规律。

2.3.6 家蚕人工饲料种质创建

选择茧丝质性状优良的 1015 系统作为轮回亲本，对无桑人工饲料摄食性优良的广食性系统中 O1 为供体。当供体所带目的基因为隐性时，待 F2 分离后，选择隐性目的性状与轮回亲本回交。通过筛选 F2 代对无桑人工饲料摄食性优良的个体作为雄亲，以轮回亲本作为雌亲回交至 BC6F2 代，进入蛾区育。在无桑人工饲料筛选摄食性优良个体的同时结合筛选个体的经济性状，选留对无桑人工饲料摄食性优良且经济性状好的个体继代。框架图如图 1

图 1 家蚕不含桑叶粉人工饲料品种选育框架图

Fig 1 The breeding frame of Silkworm using artificial diet without mulberry



2.4 结果与分析

2.4.1 家蚕品种摄食率和疏毛率调查

2.4.1.1 不同家蚕品种摄食率和疏毛率分布

386个家蚕品种调查表明,不同家蚕品种蚁蚕对无桑人工饲料的摄食性有显著差异(表1, 2)。其中,完全不食的品种有94个,占调查品种的24.35%,蚁蚕48 h摄食率最小为0,最大为83.98%,平均为1.74%。不同系统家蚕品种蚁蚕对无桑人工饲料的摄食性存在较大差异,不同系统的排序次序是:中一化>日二化>欧一化>中二化>日一化>多化。

表1 家蚕品种对无桑人工饲料48h摄食率的差异

Table 1 The feeding ratio of newly hatched silkworm for artificial diet without Mulberry after 48 hours

蚕品种类型	中一化	中二化	日一化	日二化	多化	欧一化
Type of	Chinese	Chinese	Japanese	Japanese		European
Silkworm race	monovoltine	bivoltine	monovoltine	bivoltine	Multivoltion	monovoltine
摄食率最低值 Lowest (%)	0	0	0	0	0	0
摄食率最高值 Highest (%)	83.98	10.16	5.47	32.03	0.43	15.22
摄食率平均值 Aaverage (%)	3.25	0.38	0.73	2.37	0.10	2.17

表2 家蚕品种对无桑人工饲料摄食蚕率的品种数分布

Table 2 Distribution of the feeding ratio of newly hatched silkworm for artificial diet without Mulberry

摄食蚕率	中一化	中二化	日一化	日二化	多化	欧一化
Feeding	Chinese	Chinese	Japanese	Japanese		European
ratio(%)	monovoltine	bivoltine	monovoltine	bivoltine	Multivoltion	monovoltine
0	10	60	1	12	7	4
0.01-0.50	21	51	10	27	7	13
0.51-1.00	16	10	2	12	0	9
>1.00	41	14	2	35	0	22
合计(Total)	88	135	15	86	14	48

不同品种蚁蚕用无桑人工饲料饲养的疏毛率存在显著差异(表3, 4)。供试的386个蚕品种中,未疏毛的蚕品种有220个,占调查品种的56.99%,蚁蚕48 h疏毛率最小为0%,最大为66.48%,平均为0.57%。家蚕不同系统蚁蚕对无桑人工饲料的48 h疏毛率也存在较大差异,其排序为:中一化>欧一化>日二化>中二化>日一化>多化。

表 3 不同家蚕品种用无桑人工饲料饲养 48h 疏毛率的差异

Table 3 The setae dispersion ratio of newly hatched silkworm after 48 hours

蚕品种类型	中一化	中二化	日一化	日二化	多化	欧一化
Type of Silkworm race	Chinese monovoltine	Chinese bivoltine	Japanese monovoltine	Japanese bivoltine	Multivoltion	European monovoltine
疏毛率最低值 Lowest (%)	0	0	0	0	0	0
疏毛率最高值 Highest (%)	66.48	5.08	0.14	19.60	0.12	7.05
疏毛率平均值 Average (%)	1.33	0.08	0.02	0.65	0.02	0.70

表 4 不同家蚕品种用无桑人工饲料饲养的 48h 疏毛率的品种数分布

Table 4 Distribution of the setae dispersion ratio of newly hatched silkworm

疏毛率	中一化	中二化	日一化	日二化	多化	欧一化
Setae dispersion Ratio (%)	Chinese monovoltine	Chinese bivoltine	Japanese monovoltine	Japanese bivoltine	Multivoltion	European monovoltine
0	39	98	12	39	11	21
0.01-0.50	33	34	3	29	3	16
0.51-1.00	5	2	0	7	0	5
>1.00	11	1	0	11	0	6
合计 Total	88	135	15	86	14	48

2.4.1.2 386 个蚕品种间疏毛率和摄食率分布

对 386 个资源品种对无桑人工饲料的摄食率和疏毛率调查结果显示：在蚕品种间差异明显，其频率分布呈现非正态分布。对 48h 疏毛率大于 0.01% 的 170 个品种的疏毛率与摄食率进行比较分析，发现所调查的品种对无桑人工饲料的疏毛率与摄食率表现基本一致，摄食率高的品种疏毛率也高。经相关分析表明，48h 疏毛率与 48h 摄食率之间呈极显著相关 ($r=0.8590^{**}$)。

2.4.1.3 不同品种对无桑饲料和有桑饲料摄食性的相关分析

中国农业科学院蚕业研究所 1982 年用含桑叶粉 50% 的人工饲料对中国农业科学院蚕业研究所保存的 342 个家蚕品种进行了人工饲料的摄食性调查，其结果为不同品种对人工饲料的摄食性表现有显著差异，完全拒食品种有 2 个，摄食率达 100% 的有 23 个。在本次调查的 386 个品种中，有 272 个品种与上述调查的品种相重复。我们对这 272 个品种的两次摄食率调查结果进行了相关分析，结果列于表 5。

供试的全部 272 个品种对两种饲料的摄食率之间只有微弱的相关 ($r=0.11$)，t 测验结果未达到显著水平。进一步按品种系统化性归类分别进行分析发现，中系、日一化、欧系品种两种饲料的摄食率之间均未表现出明显的相关性。日系二化蚕品种表现出中等强度的相关性。多化性品种相关系数达到 -0.8372，但 t 测验表明未达到显著水平，分析可能是因为供试品种和进行相关分

析的样本数太少所致。进一步对各个地理系统品种中对无桑人工饲料摄食性较好（摄食率 0.01—0.99%）和摄食性好（摄食率 $\geq 1.00\%$ ）的品种进行相关分析，也仅存在微弱的相关性。

表 5 蚕品种对无桑饲料和有桑饲料摄食率的相关系数

Table 5 The correlation coefficient between the feeding ratio and the setae dispersion ratio of newly hatched larvae with artificial diet without Mulberry and with Mulberry for silkworm

摄食率 Feeding ratio (%)	中一化 Chinese monovoltine	中二化 Chinese bivoltine	日一化 Japanese monovoltine	日二化 Japanese bivoltine	多化 Multivoltion	欧一化 European monovoltine	总体 Total
0.01-1.00	0.0638 (30)	-0.1028 (40)	0.5388 (10)	0.4369* (32)	-0.8372 (5)	-0.1388 (16)	-0.0288 (132)
>1.00	0.0279 (25)	0.3524 (12)	—	0.0518 (26)	—	0.0869 (20)	0.0858 (87)
0—100	0.1021 (64)	0.0456 (81)	0.0456 (12)	0.3012* (66)	-0.2680 (10)	-0.078 (39)	0.0869 (272)

注：括号内为蚕品种数

Note: The datums in the parentheses is silkworm race number.

2.4.2 广食性资源系统的建立

2.4.2.1 家蚕广食性资源的筛选

以不含桑叶粉人工饲料为检测物，对中国农业科学院蚕业研究所近400个品种的摄食性调查，发现了许多对不含桑叶粉人工饲料食性优良的种质，通过对选留16个品系进一步筛选（部分为多品种混合筛选），建立了家蚕广食性系统，其中中国系统10个，日本系统6个品种进行了两次筛选，筛选结果见表6。

从表6可以看出，中国系统10个品种中的地方一化品种和多化性热带品种，经过两次筛选后摄食率得到很大提高，而中国系统二化品种和日本系统二化品种的摄食率提高较小。筛选结果表明在选拔对人工饲料摄食性优良的品种时，不同的品种选拔所需经过的世代差异较大，对今后进行人工饲料摄食性基础研究、选育人工饲料专用蚕品种、缩短选育时间具有积极的指导作用。

2.4.2.2 家蚕人工饲料适应性品系累代选拔

为尽快获得纯合的对不含桑叶粉人工饲料食性优良的广食性系统，优先对筛选出的摄食率较高的两个品种选01和选02进行加代选择，其中1—3代为混合蛾区饲育，4—7代为单蛾区饲育。对这两个品种中摄食率高的个体以及产卵量多的蛾区进行选留，建立了两个广食性系统中01和中02，其中广食性系统中01为中国系统，地方品种，一化，三眠；广食性系统中02为中国系统，地方品种，一化，四眠。表7和表8为广食性系统中01和中02第1次选拔和经过7代选拔后的饲育成绩，表9和表10为广食性系统中01和中02各蛾区自交选择结果。从表9和表10中可以看出，经过7代选择以后，广食性系统中01和中02蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率均达到99%以上。蚁蚕摄食率在1—3代提高较快，4—7代已经达到98—99%的水平。

表 6 家蚕广食性资源系统

Table 6 The euryphage system for silkworm resource

系统 system	品种编号 number	品种名 races	第一次筛选结果		第二次筛选结果	
			The first result of filtration		The second result of filtration	
			摄食蚕率 (%) feeding ratio	疏毛率 (%) setae dispersion ratio	摄食蚕率 (%) feeding ratio	疏毛率 (%) setae dispersion ratio
中国种	1018	连云一号	17.19	6.44	92.55	68.74
	1001	甘肃种	15.08	10.85	79.91	58.10
	2016	铜山 24	22.09	9.09	75.07	37.76
	2007、2030、2033、	金黄、中 11、诸暨	1.19	0.2	48.21	21.63
	2040、2005	四川普黄	83.98	66.48	98.11	86.79
	5094	新九	1.72	0.69	45.61	4.39
	5060	14	2.35	0.88	19.96	4.66
	5078	7911	10.16	5.08	20.71	2.73
	5097、5098、5082	中 122、中 124、791	0.81	0.18	37.65	14.94
	7004、7006	三四、352 白	0.33	0.12	80.38	16.54
日本种	6023、6027、	日 120A、18、	3.26	1.44	62.13	36.28
	6079、6052	72 秋选、734				
	6077	8212	4.74	1.7	85.00	31.92
	6063	782	5.2	2.14	32.19	15.76
	6034	JA (二)	9.69	1.26	78.82	53.53
	6063	782	5.2	2.14	27.02	12.80

表 7 广食性系统中 O1 饲育饲育成绩

Table 7 The breeding result of euryphagy system Chinese O1

年份 year	饲育形式 Breeding form	疏毛率 (%) Setae dispersionRatio	摄食率 (%) Feeding ratio	5龄经过(d:h) Duration of 5th instar	全龄经过 (d:h) Larval Duration	虫蛹率 (%) Larva-Pupa rate	死笼率 (%) Rate of dead worm cocoons	全茧量 (g) Cocoon shell ratio	茧层量 (g) Cocoon shell weight	茧层率 (%) Cocoon shell ratio
2001(春)	全龄桑叶育	—	—	6:11	19:18	96.33	3.21	1.113	0.125	11.23
2001(春)	1龄人工饲料育	10.85	15.08	6:18	19:23	91.17	4.42	1.098	0.102	9.29
2003(秋)	全龄桑叶育	—	—	6:00	19:14	98.39	0.84	1.102	0.118	10.75
2003(秋)	1龄人工饲料育	98.50	99.00	6:04	19:20	97.17	1.02	1.046	0.118	11.29

表 8 广食性系统中 O2 饲育成绩

Table 8 The breeding result of euryphagy system Chinese O2

年份 year	饲育形式 Breeding form	疏毛率 (%) Setae dispersionRatio	摄食率 (%) Feeding ratio	5龄经 (d:h) Durationof 5th instar	全龄经过 (d:h) LarvalDuration	虫蛹率 (%) Larva-Pupa rate	死笼率 (%) Rate of dead wormcocoons	全茧量 (g) Cocoonshell ratio	茧层量 (g) Cocoonshell weight	茧层率 (%) Cocoonshell ratio
2001(春)	全龄桑育	—	—	6: 21	24: 18	97.45	1.15	1.115	0.142	12.74
2001(春)	1龄人工饲育	66.48	83.98	7: 02	25: 00	92.38	3.78	1.023	0.104	10.17
2003(秋)	全龄桑叶育	—	—	6:18	23:08	96.37	2.30	0.996	0.126	12.66
2003(秋)	1龄人工饲育	99.00	100.00	7: 00	24:12	92.45	4.23	0.930	0.116	12.53

表 9 广食性系统中 O1 的自交选择结果

Table 9 The choice result of euryphagy system Chinese O1 by selfed amphimixis

连续世代 Generation	蛾区摄食百分率 (%) Ingestion percentage of each batch										平均 (%) Average
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	15.4	16.8	16.1	13.2	15.7	13.3	11.2	15.6	16.8	16.3	15.0
2	70.5	75.1	73.1	-	71.4	-	-	74.8	74.2	75.3	73.5
3	-	97.3	96.7	-	-	-	-	98.1	98.2	98.4	97.7
4	-	98.5	98.7	-	-	-	-	99.0	99.0	97.2	98.5
5	-	100	99.0	-	-	-	-	99.0	98.5	99.0	99.1
6	-	99.0	99.0	-	-	-	-	99.0	98.8	99.0	99.0
7	-	99.0	100	-	-	-	-	100	99.0	99.0	99.4

表 10 广食性系统中 O2 的自交选择结果

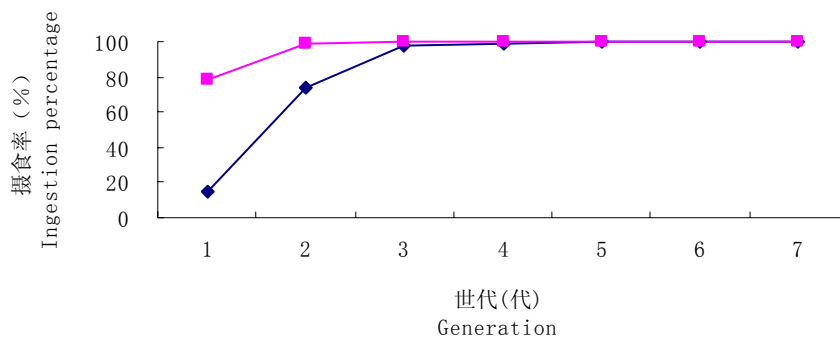
Table 10 The choice result of euryphagy system Chinese O2 by selfed amphimixis

连续世代 Generation	蛾区摄食百分率 (%) Ingestion percentage of each batch										平均 (%) Average
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	83.9	78.5	80.2	67.9	71.4	81.6	77.5	83.4	83.8	73.1	78.1
2	98.5	-	98.4	-	-	99.0	-	99.0	98.7	-	98.7
3	99.0	-	99.0	-	-	99.0	-	99.0	99.0	-	99.0
4	99.0	-	100	-	-	99.0	-	100	99.0	-	99.4
5	99.0	-	99.0	-	-	99.0	-	99.0	99.0	-	99.0
6	99.0	-	99.0	-	-	100	-	100	99.0	-	99.4
7	100	-	99.0	-	-	99.0	-	99.0	100	-	99.4

从图2可以看出，尽管广食性系统中O1和中O2蚕对不含桑叶粉人工饲料的平均摄食率在选拔初期存在一定的差异，但选择效果都特别明显，摄食率提高很快，经过几个世代后摄食率稳定在一定的水平。

图 2 中 O1 和中 O2 平均摄食率选拔结果

Fig3 The choosing result of feeding ratio for Chinese O1and Chinese O2



在选拔过程中,除了以蚁蚕摄食性作为主要指标以外,对家蚕的其他性状同时进行选择。收蚁时选择卵量多,良卵率高,产附好,孵化齐的蛾区进行单蛾育。在饲育过程中重点选择发育整齐,虫蛹统一生命率在品种平均数以上,死笼率比平均数低的蛾区。在茧质方面选留茧层量、茧层率均在该品种平均数以上和茧形匀正的蚕茧制种。此外,还要注意卵色、斑纹和茧色等综合性状的选择。

2.4.3 不同处理条件下家蚕对人工饲料摄食性差异

2.3.3.1 对不同含水率人工饲料摄食性差异

中01系统在人工饲料不同饲料含水率62.96%、64.28%、64.91%、65.51%和66.67%(饲料含水率中不包括粉体饲料本身的含水率)的条件下,摄食蚕率和疏毛率都表现出极大的差异(表11),其中在饲料含水率65.51%的饲育条件下,摄食率和疏毛率最高,高于和低于65.51%的饲料含水率范围,中01系统的摄食蚕率和疏毛率呈现一定的快速下降趋势,直到绝食。

表11 不同饲料含水率摄食蚕率和疏毛率的差异

Table 11 Diversity of feeding ratio and Setae dispersion Ratio in differ moisture ratio of fodder

系统 system	项目 item	饲料含水率(%) The moisture ratio of fodder				
		61.53	64.28	65.51	66.67	68.75
中01 Chinese 01	摄食蚕率(%) Feeding ratio	5.4	70.3	99.0	88.6	7.2
	疏毛率(%) Setae dispersion Ratio	2.4	67.2	98.6	80.7	1.3
	摄食蚕率(%) Feeding ratio	6.4	82.1	99.0	91.0	8.2
中02 Chinese 02	疏毛率(%) Setae dispersion Ratio	3.2	73.4	99.0	85.4	2.6

2.4.3.2 同一品种不同制种形式对人工饲料摄食性差异

家蚕同一品种不同制种形式对人工饲料的摄食率和疏毛率有一定的差异(表12)。其中,越年种的摄食率最高,即时浸酸种和冷藏浸酸种略有下降。说明同一品种不同制种形式对人工饲料摄食性有一定的影响。因此,人工饲料育以饲养越年种为宜。

表12 家蚕不同蚕卵处理的摄食率和疏毛率

Table 12 The Feeding ratio and setae dispersion ratio of silkworm in differ disposal

系统 system	项目 item	即时浸酸卵	冷藏浸酸卵	越年卵
		Instant acid treatmeggs	eggs by acid treatment after refrigeration	Hibernating eggs

中 01	摄食蚕率 (%)	97.7	98.3	99.0
	Feeding ratio			
	疏毛率 (%)	96.2	97.4	99.0
	Setae dispersion Ratio			
中 01	摄食蚕率 (%)	97.8	99.2	100.0
	Feeding ratio			
	疏毛率 (%)	97.0	98.7	99.0
	Setae dispersion Ratio			

2.4.4 家蚕人工饲料摄食性遗传模式的研究

2.4.4.1 中 01 系统对不含桑叶粉人工饲料摄食性的遗传模式

用无桑人工饲料对中 01 系统 5 个蛾区进行检测, 48 小时后调查蚁蚕摄食率, 确认中 01 系统各蛾区的摄食率在 99.0% 以上。用无桑人工饲料对 1015 系统 5 个蛾区进行检测, 48 小时后调查蚁蚕摄食率, 确认 1015 系统各蛾区的摄食率为 0, 同时用桑叶饲养 1015 系统 5 个蛾区, 供杂交分析使用。中 01 系统与 1015 系统进行杂交, 亲本及 F1 代摄食率, 结果见表 13。

用桑叶饲养亲本中 01 系统 5 蛾区, F1 代中 01×1015 和 1015×中 01 各 5 蛾区, 同时取 3 个中 01 系统的蛾区进行不含桑叶粉人工饲料进行检测, 确认中 01 系统各蛾区的摄食率在 99.0% 以上。羽化后交配, F1 代中 01×1015 和 1015×中 01 单蛾区自交后配制 F2 代, 用 F1 代与中 01 配制 BC1 代 (1015×中 01)F1×中 0 和中 01×(1015×中 01)F1, 用无桑人工饲料饲养检测, 调查 48h 摄食率。结果见表 13。

表 13 调查结果表明, 亲本中 01 系统的 5 蛾区的摄食率平均值为 99.72%, 1015 系统摄食率平均值为 0; F1 代正、反交间的摄食率均为 0, 正、反交间的摄食性没有差异, 与 1015 亲本的摄食性相同。据此认为, 中 01 对 1015 的摄食性表现为隐性遗传, 并且由常染色体基因支配。杂交使用的中 01 系统, 已经 4 代以上同蛾区交配选择, 并且在其选拔的后几个世代都出现了部分接近全部取食的单蛾区, 表明中 01 系统的食性基因应该处于或十分接近纯合状态。

表 13 调查结果表明, F2 代中(中 01×1015) 和 (1015×中 01) F2 平均摄食率分别为 23.33% 和 23.82%, 差异较小, 但各蛾区间摄食率有一定的差异, 变化范围在 20.20%—24.93% 之间, 差值为 4.73%。BC1 代中(1015×中 01)F1×中 01 和中 01×(1015×中 01)F1 的摄食率分别为 46.78% 和 46.03%, 但各蛾区间摄食率的差异大于 F2 代中各蛾区间摄食率, 变化范围在 40.12%—49.42% 之间, 差值为 9.30%。

表 13 调查结果表明, F2 代和 BC1 代的实际调查值均比较接近理论值又低于理论值。在 1 对隐性主基因的假设条件下, F2 代摄食率理论值应该为 25%, BC1 应该为 50%, 而实际调查结果, F2 代摄食率平均为 23.58%, BC1 代摄食率平均为 45.52, 均比较接近理论值又低于理论值。同一杂交组合的不同蛾区间有差异, 部分差异较大。据此推断广食性系统中 01 对不含桑叶粉人工饲料摄食性遗传除了受 1 个隐性主基因控制, 同时还有修饰基因的存在。

表 13 中 01 系统与 1015 系统杂交 F1、F2 和 BC1 摄食性的摄食性

Table 13 the ingestion of F1 F2 and BC1 of Chinese 01 crossing with 1015

交配方式 mating mode	各蛾区摄食率 (%) Ingestion percentage of each batch					平均值 average
	1	2	3	4	5	
中 01 Chinese 01	99.5	99.6	99.8	99.7	100	99.7
1015	0	0	0	0	0	0
中 01×1015 Chinese 01×1015	0	0	0	0	0	0
1015×中 01 1015×Chinese 01	0	0	0	0	0	0
(中 01×1015) F2 (Chinese 01×1015) F2	22.0	21.4	20.9	24.649	22.729	22.4
(1015×中 01) F2 (1015×Chinese 01) F2	21.6	24.9	23.4	20.2	23.3	22.7
(1015×中 01)F1×中 01 (1015×Chinese 01) F1×Chinese 01	40.8	45.2	50.0	41.5	47.3	45.0
中 01×(1015×中 01)F1 Chinese 01×(1015×Chinese 01) F1	49.6	45.6	48.3	40.0	46.6	46.0
(1015×中 01)F1×1015 (1015×Chinese 01) F1×1015	0	0	0	0	0	0
1015×(1015×中 01)F1 1015×(1015×Chinese 01) F1	0	0	0	0	0	0

2.4.4.2 摄食性遗传实验卡平方 (X^2 , chi-square) 测定

对 F2 代和 BC1 代的摄食性调查结果进行卡平方 (X^2 , chi-square) 测定。表 14 为 F2 和 BC1 各个蛾区摄食性调查结果。根据公式 $X^2 = \sum (d^2/e)$ 进行计算，公式中 d 是实得数和理论计算出来的预计数 (e) 的差数， \sum 是积加符号。计算出的 X^2 见表 15 和 16，依它查 X^2 表。

在 (中 01×1015) F2 分离类型中， $X^2=3.64$ ，查的 3.64 的概率在 10-5% 之间，接近概率在 5% 时 X^2 的值 3.84，一般认为这样的差异是显著的；在 (1015×中 01) F2 分离类型中， $X^2=4.35$ ，查的 X^2 的值 5.09 的概率在 5-2% 之间，一般认为这样的差异是显著的。正交 F2 分离比 1:3.45 和反交 F2 分离比 1:3.41，与理论分离比 1:3 有显著差异。

在 (1015×中 01)F1×中 01 分离类型中， $X^2=12.02$ ，在中 01×(1015×中 01)F1 分离类型中， $X^2=9.58$ ，查的 $d=0.01$ 时， $X^2=6.64$ ，回交分离类型的 X^2 值大于概率在 1% 时的 X^2 值，说明回交分离类型的理论值 1:1 与回交分离类型的实际值有极显著差异，不能接受 1:1 的比例，差异由遗传引起的可能性教大大。这就进一步证实了对实验结果的推断，即广食性系统中 01 对不含桑叶粉人

工饲料摄食性遗传除了受 1 个隐性主基因控制，同时还有修饰基因的存在。

表 14 卡平方测定
table14 Test of χ^2 , chi-square

交配方式 mating mode	摄食性	蛾区摄食率 (%) Ingestion percentage of each batch					平均值 average
		1	2	3	4	5	
(中 01×1015) F2	摄食(头) Feeding	35	41	48	73	43	48
	蚁蚕总头数(头) the number of eggs	159	193	231	296	188	213
(1015×中 01) F2	摄食(头) Feeding	79	84	88	71	77	80
	蚁蚕总头数(头) the number of eggs	367	337	376	352	329	352
(1015×中 01)F1×中 01	摄食(头) Feeding	113	159	172	81	62	117
	蚁蚕总头数(头) the number of eggs	277	352	344	195	131	260
中 01×(1015×中 01)F1	摄食(头) Feeding	111	83	165	144	41	109
	蚁蚕总头数(头) the number of eggs	224	182	342	360	88	239

表 15 中 01 和 1015 的摄食性遗传实验
Table15 The heredity experiment of Chinese 01 and 1015 feeding

项目 Item	(中 01×1015) F2 分离类型 The type of F2 separation			(1015×中 01) F2 分离类型 The type of F2 separation		
	摄食 Feeding	不摄食 No Feeding	总数 Total	摄食 Feeding	不摄食 No Feeding	总数 Total
实得数 Actual number	240	827	1067	399	1362	1761
实得比数 Actual ratio	1	3.45		1	3.41	
理论比数 Theoretic ratio	1	3		1	3	
预期数(e) Expect number	267	800	1067	440	1321	1761
差数(d) Margin	27	27		41	41	
差数 ² /预期数 Margin ² / Expect number	2.73	0.91		3.82	1.27	
$\chi^2 = \sum (d^2/e)$		3.64			5.09	
	自由度=1, P 在 10-5%之间 Freedom degree=1			自由度=1 P 在 5-2%之间 Freedom degree=1		

表 16 中 01 和 F1 的摄食性遗传实验

Table 16 The heredity experiment of Chinese 01 and F1 feeding

项目 Item	中 01×(1015×中 01)F1 分离类型 The type of BC1 separation			中 01×(1015×中 01)F1 分离类型 The type of BC1 separation		
	摄食 Feeding	不摄食 No Feeding	总数 Total	摄食 Feeding	不摄食 No Feeding	总数 Total
实得数 Actual number	587	712	1299	544	652	1196
实得比数 Actual ratio	1	1.21		1	1.99	
理论比数 Theoretic ratio	1	1		1	1	
预期数(e) Expect number	649.5	649.5	1299	598	598	1196
差数(d) Margin	62.5	62.5		53.5	53.5	
差数 ² /预期数 Margin ² / Expect number	6.01	6.01		4.79	4.79	
$\chi^2 = \sum (d^2/e)$		12.02			9.58	
	自由度=1, P 在 10-5%之间 Freedom degree=1			自由度=1 P 在 5-2%之间 Freedom degree=1		

2.4.5 家蚕不含桑叶粉人工饲料种质创建

以对无桑人工饲料摄食性优良的广食性系统中 01 为供体，以实用品种 1015 为轮回亲本，从 2003 年开始家蚕不含桑叶粉人工饲料种质创建，到 2005 年秋已经完成 3 次 F2 世代的自交分离，其摄食性略低于中 01 系统，生命率低于中 01 系统和 1015，并且龄期经过比较长（表 17）。

表 17 广食性系统中 01 饲育选拔成绩

Table 17 The choosing result of euryphagy system Chinese 01

品种名 races	摄食率 (%) Feeding ratio	5龄经 (d:h) Duration of 5th instar	全龄经过 (d:h) Larval Duration	虫蛹率 (%) Larva-Pupa rate	全茧量 (g) Cocoon shell ratio	茧层量 (g) Cocoon shell weight	茧层率 (%) Cocoon shell ratio
1015	0	6: 12	20: 12	99.8	0.987	0.176	18.00
中 01	99.0	5: 06	18: 06	97.5	1.040	0.116	11.18
BC ₃ F ₂	97.6	6: 18	21: 00	96.23	0.946	0.170	17.92

2.5 讨论

随着人工饲料养蚕技术的成功开发和推广应用，20 世纪 80 年代日本开发出了无桑低成本人工饲料，迫切要求选育出能够用这种饲料饲养的广食性蚕品种。日本上个世纪 70、80 年代选育出的“泽 J”和“朝雾”是代表性的广食性蚕品种。我国学者也对部分保存品种进行了广食性检验，选拔出来少数能取食无桑低成本饲料的系统，并进行了广食性实用蚕品种的选育，育成了多

个能用含 5% 桑叶粉的低成本人工饲料饲养的育种素材, 经济性已经接近实用品种水平, 取得了一定的进展。为了选育出具有更加优异的摄食性特征的广食性蚕品种, 必须充分利用我国的品种资源, 进一步开展广食性种质资源研究创新, 为实用化广食性蚕品种选育提供素材。

通过调查发现, 我国保存的蚕品种资源中, 含有大量具有广食性特征的遗传资源, 其中对无桑人工饲料的最高摄食率和疏毛率达到 83.98% 和 66.48%, 具有重要的研究和利用价值。神田等首先对现行蚕品种的原种用 LP-1 饲料进行了检索, 发现日本种多数品种中存在摄食性个体, 而在所调查的中国系统品种中, 几乎没有发现能取食 LP-1 饲料人工饲料的品种, 由此认为要育成这样的广食性中系品种, 用常规的选拔育种法从现行品种中育成取食 LP-1 饲料人工饲料的品种中国种是困难的, 只有从其他摄食性高的品种中导入有关广食性基因。而本研究发现, 所调查的中系品种中有 73.6% 的品种出现摄食无桑饲料的个体, 其中表现最高摄食率和疏毛率的品种即为中系品种, 这一重要发现将大大缩短广食性中系品种的选育过程。本试验中系品种的结果与上述报道的结果差异较大, 作者认为主要是由于日本保存的中系品种的来源相对单一、遗传基础狭窄之故。在保存的中系地方品种中, 来源于华南、西南和北方蚕区的品种, 其摄食蚕的出现频率要远高于江浙蚕区的品种, 也说明我国保存的中系品种的遗传多样性比日本的中系品种丰富得多。

不同品种对无桑饲料和有桑饲料摄食性的相关分析结果表明, 供试蚕品种对无桑饲料的摄食性和含多量桑叶粉饲料的摄食性之间没有明显的相关性, 它们分别具有不同的遗传背景, 受不同的基因控制。不同蚕品种对无桑人工饲料的摄食蚕率与疏毛率变化趋势基本一致, 相关分析表明, 48h 疏毛率与摄食蚕率之间呈高度正相关。关于家蚕食性遗传的研究, 已知蚕对桑叶粉人工饲料摄食性的遗传是受显性基因控制的。藤森等 (1982) 分析了食性异常蚕“泽 J”对人工饲料摄食性的遗传方式, 使“泽 J”与摄食性差的“汉川”杂交, F₁ 代和 BC₁ 都表现了与“泽 J”一样高度的摄食性, F₂ 代接近两亲的平均值, 由此推测“泽 J”高摄食性性状对于“汉川”低摄食性性状为完全显性遗传, 并受常染色体上的显性主基因控制。神田等 (1988) 探讨了家蚕对于不含桑叶粉低成本人工饲料 LP-1 的遗传方式。通过把对 LP-1 摄食性高的品种“泽 J”与摄食性低的品种和“中 01 号”杂交, F₁ 代完全不出现摄食个体, 摄食个体只出现在 F₂ 及 F₁ 与“泽 J”回交的 BC₁ 代中, 通过进一步比较亲本、F₂、BC₁ 不同体重级别所含个体数的频率及分布, 推断出对 LP-1 饲料的摄食性由一个隐性主基因和数个影响较小的修饰基因所控制。日本已经发现多个与广食性有关的基因, 初步分析认为, 选拔出的广食性基因与所用的饲料配方有关。本试验所采用的饲料, 大量采用了家蚕不喜食的豆粕、菜籽粕、米糠等原料, 适口性极差, 与 LP-1 饲料十分接近。本试验使用不含桑叶粉人工饲料, 通过对广食性系统中 01 进行家蚕人工饲料摄食性遗传模式的研究表明, 中国系统的品种与日本系统的品种, 对不含桑叶粉人工饲料的遗传方式相近, 表明利用本试验选拔出的中国系统的家蚕品种直接进行广食性种质创新和实用品种选育是有理论依据的。

本实验用不含桑叶粉人工饲料对部分品种进行了累代选拔, 尽管它们的摄食经过选拔后得到了极大的提高, 但同时也出现了一些问题。首先是这些品种经过用不含桑叶粉人工饲料多代选拔后, 产附变差, 卵粒数减少, 从而造成继代困难。其次是生命力下降, 主要表现为眠起许多蚕不能正常蜕皮, 蛾区内蚕儿之间发育开差较大, 熟蚕上簇后营茧时死蚕率和死笼率有所上升。再次是相对全龄桑叶饲养, 用不含桑叶粉人工饲料饲养龄期有增加的趋势。

第三章 家蚕指纹图谱的构建

3.1 引言

家蚕 *Bombyx mori*(L.) 是重要的经济动物。以家蚕为主体的丝绸业一直是我国的优势产业, 目前, 我国蚕茧产量占世界总产量的四分之三, 工业产值约 700 亿元, 茧丝产量和出口占世界总产量的 70% 和 80% 以上, 年出口创汇额达 37 亿美元。

我国是世界蚕业生产发源地, 自然生态环境复杂, 经长期的自然选择和人为选择, 蚕种质资源极为丰富。蚕种质资源既是生物多样性的重要组成部分, 更是开展蚕新品种选育、昆虫分子生物学研究的重要物质基础, 是 21 世纪保证我国蚕丝生产、出口继续维持在国际上主导地位的最根本的物质基础和战略资源。同时, 由于家蚕遗传背景清楚, 发育世代短, 发育环境易于人工控制, 家蚕已经成为理想的实验生物模型, 是鳞翅目基因组计划使用的代表型生物。许多鳞翅目昆虫是严重的农林害虫, 螟虫、松毛虫等每年造成直接损失达数十亿美元。全球每年的杀虫剂消耗量达 120 亿美元, 对人类食物、健康和环境的威胁日益增加。对家蚕进行深入基因组水平的研究对害虫防治、新一代农药开发和有益昆虫的利用等有极其重要的作用, 有可能将鳞翅目昆虫的综合治理提高到一个新的水平。

中国农业科学院蚕业研究所蚕种质资源保存中心, 一直从事蚕种质资源的收集、保存、评价和利用, 现已建成世界上最大、保存类型最多的蚕种质资源库, 现保存蚕种质资源近 700 份, 其中地方品种 96 份、国外引进品种 152 份、改良种 177 份、多化性品种 19 份、突变基因 226 份、种质创新材料 10 份、蓖麻蚕 20 份, 这些丰富的基因资源是我国的巨大财富, 也是我国蚕业持续发展的基础与巨大潜在优势。然而面对数量庞大的种质资源, 提高蚕种质资源的收集、保存、评价及鉴定技术, 是我们当前面临的重要课题。开展家蚕种质资源的指纹图谱研究, 建立我国家蚕种质资源 DNA 指纹图谱, 将为家蚕的鉴定、遗传评价和开发利用提供科学依据, 将促进我国家蚕核心种质资源库的建立, 并为家蚕分子系统学及分子育种研究奠定基础, 对提高我国家蚕育种水平和保护家蚕育种者的知识产权有着重要的意义。

DNA 分子标记技术是通过品种 DNA 的多态性即 DNA 碱基序列的差异进行分析, 从而鉴别不同品种, 其检测对象是种子(或幼虫、或蛹、或成虫)的 DNA 片段(基因), 没有器官和时空的特异性, 不受环境的影响, 有较高的准确性、稳定性和重复性。而在分子标记中, 微卫星(microsatellite)DNA 标记是目前使用最广泛的第二代共显性分子遗传标记。SSR 标记以其快速稳定、多态性强和共显性遗传而被广泛用于基因定位、图谱构建、遗传差异、亲缘关系和进化等研究领域。因此, 利用微卫星 DNA 标记, 开展家蚕指纹图谱的构建, 对家蚕起源演化、亲缘关系和多样性等研究, 对蚕种质资源的鉴别、保护、核心种质的构建具有重要的实用价值和理论意义, 也将为高效发掘家蚕优异种质、促进家蚕遗传改良, 推动我国蚕业科学的进步作出积极贡献。

3.2 材料与方法

3.2.1 供试材料

供试家蚕品种为中国农科院蚕业研究所品种资源组保存的 96 个中系二化性品种,各品种于 2004 年早春饲养,各品种主要性状见表 18。

3.2.2 取材方法

所有品种蚕卵出库后进行催青。每个品种选两个蛾区进行收蚁,各品种分开饲养,置于温箱中,设置小蚕所需最适宜条件(温度 27℃-28℃,湿度 85%-90%)。一日两回育,多数蚕眠时撒焦糠止桑,二龄起蚕时取材料。各品种数起蚕 100 头,置于-20℃保存待用。

3.2.3 主要试剂

蛋白酶K、Rnase、TaqDNA聚合酶(鼎国生物)、dNTPs (10mM P^H=7.5) (BioAsia)、琼脂糖 (Agrose) (英国)、聚丙烯酰胺(promega公司)、尿素 (promega公司)、十二烷基硫酸钠 (SDS) (进口分装)、己二胺四乙酸二钠 (EDTA) (分析纯)、溴酚兰 (进口)、溴化乙锭 (EB) (进口)、异戊醇 (分析纯)、TEMED(promega公司)、TBE、三氯甲烷(CHCl₃) (上海化学试剂有限公司-上海试剂一厂)、无水乙醇 (上海振兴化工一厂)、Tris饱和酚 (P^H>7.5) (鼎国生物)、10×PCR buffer (含 20mM Mg²⁺) (鼎国生物)。

3.2.4 主要仪器与设备

SZ-93 自动双重水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂)、6511 型电动搅拌机、HAR-ZKVA高精度全自动交流稳压器 (重庆国营渝稳压器厂)、Smart SpeeTM 3000 分光光度计(Bio-Rad)、离心机(Centrifuge 5415D), GILSON枪(France), PCR仪(Techno flexigene Cyler)、电泳仪(Hoefler Eps 2A200 型)、Tanon GIS-2008 照相机、DG-2 暗箱式紫外透射仪 (北京鼎国生物)、变性仪 (AMPLITRON)、377 DNA sequencer(ABI PRISM)、Apple Computer(M9425H/A)。

3.2.5 数据分析软件

遗传距离采用 Nei 氏标准遗传距离和绝对距离 (Nei, 1979), 计算 Nei 氏标准遗传距离采用 Genepop Version 3.4, June2003; 计算绝对距离采用 Microsat v.1.5 (E. Minch, Stansord University, U.S.A)。分析软件用 PHYLIP 软件包(v.3.57c, Joe Felsenstein, University of Washington, U.S.A.)中的子程序 NEIGHBOR 和 DRAWGRAM 以算术平均的不加权对群法 (UPGMA), 分别对所有品种和不同地理系统间及化性间的绝对距离进行聚类。

3.3 实验方法

3.3.1 基因组 DNA 提取

每品种取 20 头蚕,迅速用电动搅拌机磨碎;加抽提缓冲液 (10mmol/L Tris-HCL PH8.0;0.5% SDS),混匀后转入离心管中,加蛋白酶 K 至终浓度 100ug/mL,56℃水浴保温 3-5 小时后用平衡酚:酚:氯仿:异戊醇 (25: 24: 1)、氯仿各抽提一次,上清用 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA,

表 18 表 1 品种名称及来源

Table18 The name and the producing areas of the materials

编号 Number	品种名称 Races	来源地 source	编号 Number	品种名称 Races	来源地 source	编号 Number	品种名称 Races	来源地 source	编号 Number	品种名称 Races	来源地 source
1	华新 huaxin	南京 nanjin	25	602	四川 sichuan	49	苏卵伴 suluan	镇江 zhenjiang	73	7911	四川 s
2	华一 huayi	无锡 wuxi	26	镇 8 zhen8	镇江 zhenjiang	50	镇 4 改 zhen4gai	镇江 zhenjiang	74	7913	日本 japan
3	华五 huawu	南京 nanjin	27	镇 8 粗 zhen8chu	镇江 zhenjiang	51	镇 16 新 zhen16xin	镇江 zhenjiang	75	247 广 247guang	广东 guangdong
4	华六形 hualiuxing	苏州 suzhou	28	镇 10 zhen10	镇江 zhenjiang	52	镇 18 改 zhen18gai	镇江 zhenjiang	76	791	无锡 wuxi
5	华七浙吴 huatizhewu	吴江 wujiang	29	镇 2A zhen2A	镇江 zhenjiang	53	镇 12 zhen12	镇江 zhenjiang	77	795	镇江 zhenjiang
6	华八(旧苏吴) huaba(jiusuwu)	镇江 zhenjiang	30	6304	镇江 zhenjiang	54	宝中长 baozhongchang	镇江 zhenjiang	78	799	日本 japan
7	华八(新镇) huaba(xinzhen)	镇江 zhenjiang	31	HC311	镇江 zhenjiang	55	中华(672) zhonghua	镇江 zhenjiang	79	821	四川 sichuan
8	华八大 huabada	镇江 zhenjiang	32	HC571	镇江 zhenjiang	56	镇 22 zhen22	镇江 zhenjiang	80	823	四川 sicuan
9	中 109 zhong109	无锡 wuxi	33	HC581	镇江 zhenjiang	57	141	镇江 zhenjiang	81	539B	广西 guangxi
10	华九专 huajiuzhuang	镇江 zhenjiang	34	苏 2 su2	镇江 zhenjiang	58	751	镇江 zhenjiang	82	东 34 dong34	广东 guangdong
11	华十沪 huashihu	上海 shanghai	35	苏 4 su4	镇江 zhenjiang	59	783	四川 sichuan	83	825	中国 china
12	中 112 新 zhong112xin	镇江 zhenjiang	36	苏 8 su8	日本 japan	60	733	镇江 zhenjiang	84	8211	日本 japan

编号 Number	品种名称 Races	来源地 source	编号 Number	品种名称 Races	来源地 source	编号 Number	品种名称 Races	来源地 source	编号 Number	品种名称 Races	来源地 source
13	中 113 zhong113	南京 nanjin	37	苏 9 su9	日本 japan	61	引 4 Yin4	镇江 zhenjiang	85	8213	日本 japan
14	中 114 zhong114	无锡 wuxi	38	苏 11 su11	日本 japan	62	研白 yanbai	镇江 zhenjiang	86	797	日本 japan
15	中 115 沪 zong115hu	上海 shanghai	39	苏 13 su13	四川 sichuan	63	龙白 longbai	镇江 zhenjiang	87	新九 xinjiu	广西 guangxi
16	中 116 浙 zhong116zhe	杭州 hangzhou	40	苏 15 su15	日本 japan	64	秀月 xiuyue	镇江 zhenjiang	88	C8-1-2	日本 japan
17	中 122 吴 zhong122wu	无锡 wuxi	41	苏 17 su17	镇江 zhenjiang	65	新合 xinhe	合肥 hefei	89	锦 9 jin9	四川 sichuan
18	中 122 育 zhong122yu	镇江 zhenjiang	42	苏 33 su33	日本 japan	66	秋合 qiuhe	合肥 hefei	90	中 122 zhong	日本 japan
19	1223 甲 1223jia	扬州 yanzhou	43	苏 35 su35	日本 japan	67	306	镇江 zhenjiang	91	中 124 zhong	日本 japan
20	6101	镇江 zhenjiang	44	苏 39 su39	日本 japan	68	731	镇江 zhenjiang	92	东 731 dong731	镇江 zhenjiang
21	73	镇江 zhenjiang	45	苏 42 su42	四川 sichuan	69	731 新 731xin	镇江 zhenjiang	93	537	镇江 zhenjiang
22	浙 22 zhe22	杭州 hangzhou	46	南一 nanyi	镇江 zhenjiang	70	753A	镇江 zhenjiang	94	新龙 xinlong	镇江 zhenjiang
23	574	镇江 zhenjiang	47	镇 13 zhen13	镇江 zhenjiang	71	755	镇江 zhenjiang	95	831	日本 japan
24	227	镇江 zhenjiang	48	镇 14 zhen14	镇江 zhenjiang	72	757	镇江 zhenjiang	96	871 (钟月) zhongyue	日本 japan

沉淀用 70%乙醇洗涤两次，加 TE 溶解；加 RNA 酶 H 至终浓度 50ug/ml, 37°C 保温 2 小时以消化 RNA，在用平衡酚、酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）、氯仿各抽提一次，用 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA，沉淀用 70%乙醇洗涤两次，加 TE 溶解，-20°C 保存备用。

3.3.2 DNA 浓度测定

家蚕各品种基因组 DNA 用 BIO—RADSmart specTM3000 分光光度计测定浓度，保证模板 DNA 浓度在 10 ng/μL，纯度 A260/A280 为 1.8 左右，-20°C 保存备用。

3.3.3 PCR 反应所用的引物

实验所用 57 对 SSR 引物见表 19，各引物在 5' 端有荧光标记，共有三种颜色。FLxx1~24 为蓝色荧光，FLxx25~48 为绿色荧光，FLxx49 之后为黄色荧光。

表 19 实验用引物序列

Table 19 Primers used in the experiment

引物 编号 Number	重复 类型 Type	正向引物序列(5' ---- 3') Primer sequence	反向引物序列(3' ---- 5') Primer sequence
FL0308	CT	GCGACGCACTCCATCAAGC	TGCTTTCGTCCTTTCTTATCCCT
FL0317	CT	CCCACCAGGTAAGGTTGGTACA	GGAAATGGTAGTGCAAGGTAGAGG
FL0364	CT	AGGACTTAGAAGCTACGATGGAATA	CCTGCCTGTTATCTGTTTTGAATG
FL0407	CT	AACATTTGCTTAGGACTGAATTTACAC	AATAATAACTTTTACACGCACCTACACTT
FL0536	CA	TGCCCCACCCTTCAAACC	GCGTAGCCACTGAAGGTTTACTT
FL0538	CT	CGCTGTCCTTTTGATAATGCC	CCCTGCTTGTATGAAAATTCTGGA
FL0539	CA	GCCGCAAAACAATCAAGTGG	CGTATTTTAGTGTATGACTCGGATGA
FL0540	CT	AATCATGGATATGTCAGTTAAGAGGG	TGCGGTATCATTTTCAGAATTTATTT
FL0541	CA	CACAATAAAAAATAATAACAAAGACAAACA	TTGCGAGGACGGAGGAGTG
FL0542	CT	TGAAATCAGTTGAGGCGGAAAA	CTTGCTAATCGAATTCATGATTGTAA
FL0545	CT	TGTTTGCTGTGGCGGTAGTG	CTGTAAATTAACACGGTTGTCTGGA
FL0546	CT	GGAGGGCGGAGGTTCAAA	AGCGATATGACCGCCTATTGTAC
FL0547	CT	CACAGGATGACTTGGTAAAACGG	GCTTTCAGTAAAATTATTTTGAATTTGA
FL0554	CA	CAGTGTATCTATGATTTCCATTGTTTCT	CGGAGTACGGATCACAACGC
FL0555	CA	TCCAGGCTCCCTCCTTCTTTA	GAAGGCTACAGGAAACGGGG
FL0560	CT	CAAAACCCACTTAATACCAAACGG	AGAAGAATCGGCGAAAGAAGC
FL0562	CT	GCCGAGCTGTCGCTGTCCT	AATTTATGTACCTACAATCAATCGAGTTC
FL0563	CT	CCTAAGCTAAAGGAGTCTAATCACA	GATGGTGAGTGGTTAGGGACGT
FL0564	CA	CCGATTGAATGATGTCGTTTGCATT	ACACTCCGACTTTGGACCATT
FL0566	CT	TTAGCGATAAGACCGCCTATTGTA	TCAAAACCTTCCAAGTGAATCCTC
FL0601	CA	CGCCGCCTGTGACGC	AAGCTCATATTCAAAACGCATTCA
FL0610	CT	ATAGCGGAGGAACTGGGGAT	GGACTTTCACAAATAATTTAAGACCAA

FL0612	CA	CAGATTTCCGCCAGGACTACACTTT	GAGAAGTGCAGAGTGCCCATATT
FL0657	CT	GAGATTAGTCAGAAATAGTGGCAAAGA	GTAAATCAAACGGTTGTCTGGAAG
FL0908	CT	GCGGACGGTTAGCGTGGTAT	GCTATCAGCCGTCAGCTCAAC
FL0910	CT	ACAGACTTAACTTAAAACGGATTGAAA	CGTTGTAGATGTCTATGGGCTCC
FL0915	CT	TGCTGAAGGACAAAAGGGAATG	CATTGTGGATGTCTACGGGCTC
FL0931	CA	GCAAGAACCGTGCCTCGC	AAAAGGTTAAGTCGTGAACAGATGC
FL0932	CT	CAGTCCTTGTCAGTTGCCATTGT	AACCGTTAAATGAGACGTGCG
FL0933	CT	CGCCTTATTGGTGAATTGCCTA	AGTACACCGCAACATACCTGCTAT
FL0934	CT	GAGCGGATGATTAGCGTGGT	ACATTCAGTATTCACGACGAGCC
FL1001	CT	GGGGTCCGCACCGCTAAT	CGACCGAAGATGACATGGATG
FL1010	CA	CAGTGCGCCAGGTATGTGC	CGTAGTTCGGTGCTCAACAGACATA
FL1027	CT	ACTCACCAACAAACCGCAAGA	CACCGCAACATGCCTGCTATA
FL1031	CT	GGCAAGCCCAGAACAACGG	ACACGCTACATTTCACTTTGTTACG
FL1110	CA	CATATTCTAACACTTTAAGCACGGC	CACAAGACGCTCCACTACCATTC
FL1113	CA	GCCACCAGTGACTTCTCAAACCT	GCGGGCATGTTGACAAGATC
FL1114	CA	CAGAATCAAATACGTGCCTCAGTT	GGAGGAGCGTTTGCCTGTTA
FL1115	CA	CGTGGGCGGATGAGTATGAAA	TTCTCAATTTGACCACAGACTATAAGC
FL1116	CA	GTCCCAAATGTTGTTGTTCCG	CGTTAGGGTGAAGCTGAAATAGG
FL1118	CA	ATGCGGCTGGTAGATAGATGAAC	TGCGCTCCAACCATCTTTAAT
FL1119	CT	CGACGATAGAAACGAAACCAATA	GGCTGGGTCCGTACAACATATT
FL1120	CA	GCACTTTATCTCCTCAGCTACCG	TTGGAATAGAGTGGCAGGTTT
FL1125	CA	CCGACATCGTGGTGCTGG	AACACTGAGGACATGACTTTCTGGT
FL1127	CA	TGACATTTCAATTGAGTTATTATTTTAGGT	CGACGGCTGTCTGAGTACAAGTTC
FL1141	CA	CGGTTGAGTAGGTTAGGTGCCAT	CACATGTCGCAGCGAACGTC
FL1150	CA	GCATGTTGTCGGGGTAATTGTG	TGTGAAGTAAGATAATCCAGCCTGC
FL1152	CA	GCAAAGGGAACAATGGTGGGT	TTAGTTTGTATTAAACGGATGTCCG
FL1157	CA	GCTGGAAGGAAAGTCGTGGGT	TCCTTTAGACCAAGAAGACGACAATA

3.3.4 PCR 体系及扩增程序

采用Touchdown程序,用Techne flexigene Cycloer PCR仪进行PCR扩增,即:94 °C预变性3 min,94 °C变性40 s,63 °C退火40 s,72 °C延伸1 min,之后的15轮每轮的退火温度降低0.44 °C,至56 °C止;最后24轮的扩增条件是94 °C变性40 s,56 °C退火40 s,72 °C延伸1 min。PCR反应体系15 μL,含1× PCR buffer (10 mmol/μL Tris-HCl, 1.5 mmol/μL MgCl₂, 50 mmol/μL KCl, pH 8.3), 10 mmol/μL dNTPs, 5'端引物和3'端引物各10 pmol/μL, 0.15 μL Taq酶(鼎国生物)和10 ng/μL的模板DNA1.5 μL。

3.3.5 PCR 扩增产物初步检测

为保证 377 测序仪电泳有好的效果,本实验先对 PCR 产物进行了 1% Agrose 检测。检测步骤如下:配 1%的 Agrose 胶(冷却时加入 EB 液,按 50ml 加 5 滴比例);取 3 μ L 样品,加入 3 μ L (2 \times) loading dye,点样(注意,每块胶都要点上 2 μ L、1 μ L、0.5 μ L 3 个不同体积的标准 Markers);电泳,100V,0.5mA,20min;电泳结果在紫外透射仪上观察记录、拍照。照相机配橙红色滤光片。调节焦距,根据条带以及本实验紫外透射仪亮度,曝光时间通常为 25~30S。比较扩增产物与标准 Markers 的亮度,根据标准 Markers 的浓度确定 PCR 扩增产物稀释的倍数,使样品浓度最终为 0.4ng/ μ L,上 377 自动测序仪电泳。检测结果如下图 3。

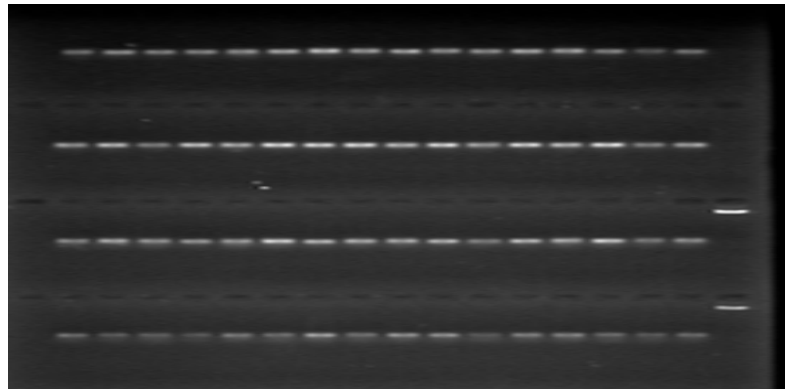


图 3 PCR 产物检测图 (1%葡聚糖)

Fig3 The inspecting chart of PCR production(1% Argose)

3.3.6 377自动测序仪电泳检测

PCR产物用377自动测序仪进行检测。变性胶浓度为5%,长度36cm。PCR产物稀释到0.4 ng / μ L DNA后,再取1 μ L加3 μ L加样缓冲液(含5 mg/mL蓝色葡聚糖和5 %去离子甲酰胺),经95 $^{\circ}$ C 变性3 min放置冰上备用。加样时,先加荧光标记内标0.2 μ L (ABI公司,rox400,含80、100、150、180、200、250、300、320、350、400 bp荧光标记DNA片段),再加已经变性的样品(浓度为0.5 ng/ μ L)0.5 μ L。电泳缓冲液为1 \times TBE,电压3000 V,电流50 mA和胶温度51 $^{\circ}$ C条件下电泳2h。

3.3.7 数据分析

对每一对引物而言,经 377 测序仪电泳后将在特定位置出现可读出分子量大小的扩增带。每对 SSR 引物检测 1 个位点,每一条多态性带为一个等位片段;将所观测到的每一条多态性带视为 1 个性状,赋值为“1”,无此带时赋值为“0”。计算 Nei 氏标准遗传距离采用 Genepop Version 3.4, June2003; 计算绝对距离采用 Microsat v.1.5(E.Minch,Stansord University,U.S.A)。分析软件用 PHYLIP 软件包(v.3.57c,Joe Felsenstein,University of Washington,U.S.A.)中的子程序 NEIGHBOR 和 DRAWGRAM,以算术平均的不加权对群法(UPGMA),分别对所有品种和不同地理系统间及化性间的绝对距离进行聚类,得到树形图。

3.4 结果与分析

3.4.1 SSR 扩增产物的多态性

采用 57 对引物对表 15 所列品种的基因组 DNA 进行扩增, 共获得 507 个多态性片段, 平均每对引物扩增出等位基因 8.9 个。等位位点数最多的为 FL0610 和 FL1125, 扩增带数分别 24 个和 22 条; 等位位点数最少的为 FL0554、FL0565 和 FL1141, 均为 2 条; FL 1115、FL0562 和 FL0546 的扩增带无多态性, 均为 1 条。各品种的扩增带数值从 90bp 到 370bp 不等。由此可见不同引物、不同品种之间的多态性各不相同。57 对引物信息及各引物扩增的条带数见表 20。

表 20 引物信息和扩增带数

Table 20 Information of Primer and amplified bands of *Bombyx mori*.

引物名称	条带大小 (bp)	多态性条带数	引物名称	条带大小 (bp)	多态性条带数
Locus symbol	Size	Numbers of	Locus symbol	Size	Numbers of
FL0308	136-162	11	FL0910	236-272	6
FL0317	166-188	6	FL0915	128-282	18
FL0333	168-192	11	FL0925	200-226	9
FL0359	242-250	4	FL0931	178-264	8
FL0364	178-314	18	FL0932	224-288	4
FL0407	206-246	9	FL0932	298-304	4
FL0517	300-328	7	FL0933	250-304	14
FL0536	248-302	9	FL1001	90-144	12
FL0538	248-286	14	FL1007	152-174	12
FL0539	270-290	6	FL1010	222-262	13
FL0540	264-290	14	FL1027	206-276	6
FL0541	326-380	8	FL1031	254-270	7
FL0542	228-278	11	FL1110	154-212	12
FL0545	272-300	12	FL1113	178-300	12
FL0546	268	1	FL1114	142-154	6
FL0547	288-324	8	FL1115	216	1
FL0554	326-330	2	FL1116	110-262	17
FL0555	300-306	4	FL1118	212-296	10
FL0560	320-350	7	FL1119	206-228	8
FL0562	258	1	FL1120	188-300	16
FL0563	320-334	4	FL1125	150-250	22
FL0564	334-367	6	FL1127	244-258	6
FL0565	332-334	2	FL1141	300-302	2
FL0566	324-340	6	FL1150	298-320	9

FL0601	224-268	12	FL1152	240-320	10
FL0610	200-272	24	FL1160	300-334	6
FL0612	220-262	12	FL1162	310-326	7
FL0657	334-370	6	FL0354	170-186	9
FL0908	180-236	4			

3.4.2 家蚕 96 个品种的指纹图谱

SSR扩增技术具有简便快捷、重复性好和准确度高等优点，该方法可以有效地对家蚕品种资源进行指纹鉴定。采用57对引物对表15所列品种的基因组DNA进行扩增，除两对引物无多态性条带外，其余SSR引物在本实验中扩增效果较好，每个条带清晰(图4 引物 FL1119、FL0931、FL0564 在品种30-52的扩增结果；图5 引物 FL1119、FL0931、FL0564 在品种60-83的扩增结果)，表现出了丰富的SSR多态性和良好的指纹特征（家蚕指纹图谱见附表2）。有数种引物组合可以区分96个家蚕品种。SSR指纹图谱条带稳定、清晰的一个重要因素是聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率高。家蚕基因组丰富的SSR多态性和不同家蚕品种(系)之间的SSR多态性差异，表明了SSR标记在家蚕DNA指纹图谱构建和遗传多样性分析中的优势，展示了SSR分析在家蚕品种分子标记技术中的良好应用前景。表21为12个品种7对引物扩增的DNA 指纹图谱。

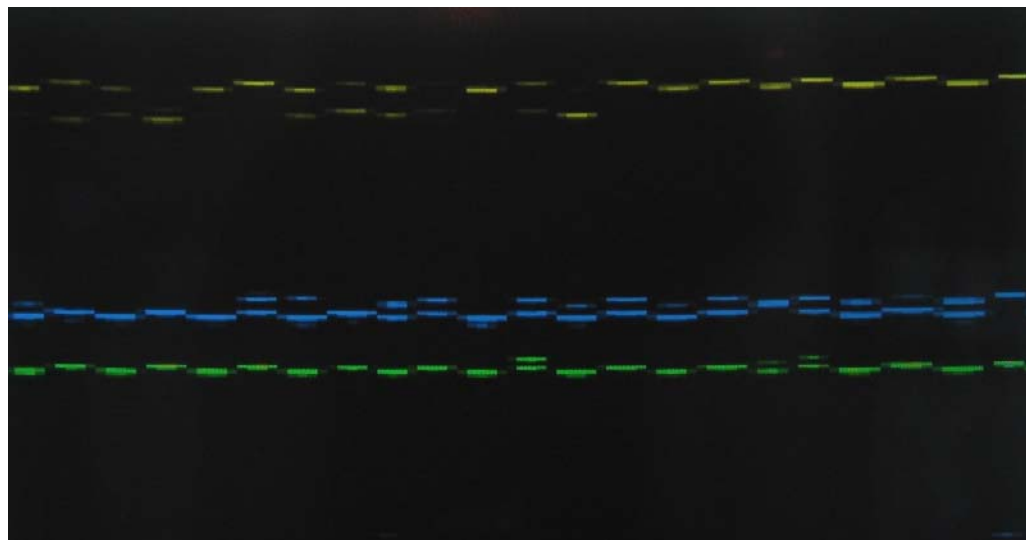


图4 引物 FL1119、FL0931、FL0564 在家蚕品种30-52中的扩增结果

30-52 分别对应表 15 中的家蚕品种

Fing4 The amplified result by primer FL1119、FL0931、FL0564 in 15 silkworm races

1-20 represent the silkworm races in table 15

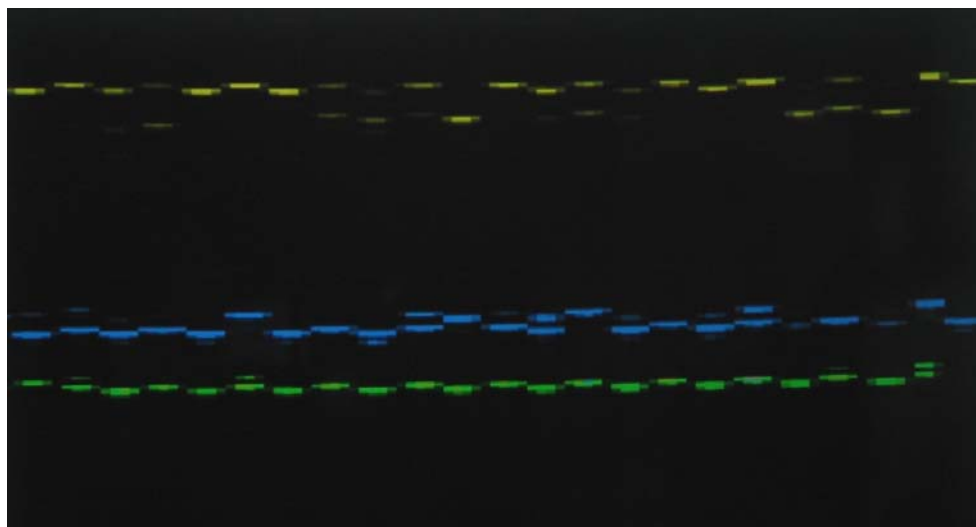


图5 引物 FL1119、FL0931、FL0564 在家蚕品种30—52中的扩增结果

60—83 分别对应表 15 中的家蚕品种

Fig5 The amplified result by primer FL1119、FL0931、FL0564 in 15 silkworm races

60—83 represent the silkworm races in table 15

表 21 家蚕品种资源指纹图谱

Table 21 The fingerprinting of silkworm race

标记名 markers	品种编号 numbers of silkworm race											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
FL1010	236	225	224	222	222	224	225	230	226	224	224	224
	166	238	242	234	238				235			
FL0915	250	166	250	128	166	250	250	166	250	164	176	170
		236	282	166	250			250		250	250	250
	210			250				282		282		282
FL0536	278	206	200	210	210	210	210	210	200	200	210	200
		260	280	262	264	262	264	264	278	264	282	278
	200	278		280	282	280	282	280		282		
FL0610	250	208	210	200	200	100	200	200	200	200	208	200
		240	250	250	222	222	250	238		250	242	
	300				238	250						
FL1141	274	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
FL0542		270	238	238	238	238	260	228	238	260	260	238
	222				260							
FL0612	234	220	232	222	222	220	220	220	220	220	220	220
	252	228	240	230	230	230	230	230	232	232	228	232

3.4.3 遗传距离及聚类分析

遗传距离 (genetic distance) 是衡量品种间若干性状综合差异大小的指标。通过扩增结果, 并计算出各品种间的遗传距离 (表 22 为品种 1—18 家蚕品种间的遗传距离矩阵)。家蚕 96 个中系二化品种材料中, 品种 825 和华六形遗传距离最大, 数值为 0.2572; 品种 823 和 751 的遗传距离最小, 数值为 0.0951。用 UPGMA 方法对品种间的遗传距离进行聚类, 得到如图 6 的聚类图。从该聚类图发现, 所研究的 96 个中系二化品种材料中, 部分品种按育种亲本、产地相聚较近, 如华字号品种华一和华六形; 苏字号品种的苏 8、苏 9、苏 11、苏 33、苏 35 和苏 39; 7 字号品种 733、757、791。从该聚类图还可看出, 所研究的 96 个材料中原本亲缘关系较近的部分品种, 经过几十年的品种保存, 由于人工选择及饲养环境等因素的影响, 虽然其传统形态性状未发生变化, 但其在分子水平上已产生一定的差异, 如镇字号品种镇 8 和镇 8 粗 (为镇 8 的一个品系), 育成年代分别为 1955 年和 1958 年, 它们之间的遗传距离为 0.2124。华八的三个品系华八 (旧苏吴)、华八 (新镇) 和华八 (大), 征集年代分别为 1952 年、1958 年和 1965 年。其中华八 (旧苏吴) 和华八 (新镇) 之间遗传距离为 0.1835, 八 (旧苏吴) 和华八 (大) 之间的遗传距离为 0.1741, 华八 (新镇) 和华八 (大) 之间的遗传距离 0.1486。

3.4.4 DNA 指纹图谱在品种鉴定方面的应用

家蚕品种的鉴定, 主要鉴定其遗传特性、一致性和遗传稳定性, 找到该品种区别于其他已有品种的特征。目前对家蚕品种的鉴定主要是以形态学标记为依据, 由于多数家蚕品种在形态上如卵色、茧色、斑纹、茧形上非常相近 (表 23), 因此无法加以区别。用同工酶和蛋白质标记鉴定只能间接反应很少一个品种的一部分 DNA 分子的多态性, 如何家禄 (1983) 调查的家蚕品种 34—45 (表 19) 的血液酯酶同工酶酶谱分别为 A1A2、A1、A1、A1、A1、A1、A1A2、A1、A1A2、A1A2、A1、A1, 不能将家蚕品种 34—45 完全区分开来。DNA 指纹图谱相对以上方法, 具有简便、迅速等优点, 应是家蚕品种评价鉴定中较为理想的方法。而微卫星 DNA 指纹由于具有高度的专一性和丰富的多态性, 利用微卫星 DNA 多态性, 即以多个微卫星座位在该群体中的等位基因频率为基础, 通过排除概率进行亲子鉴定和亲缘关系的确认, 势必成为一种有效的分析工具。如用 FL1125 引物的扩增条带 (图 7) 便可以将苏字号 12 个品种中的 11 个品种苏 2 (186)、苏 4 (232、236)、苏 8 (200、236)、苏 9 (186)、苏 11 (188、232)、苏 13 (232)、苏 15 (188、232、236)、苏 17 (150、186、190)、苏 33 (156)、苏 35 (200)、苏 39 (250) 和苏 42 (150、200、250) 等 11 个品种区别开来 (注: 括号内为多态性条带大小, 单位为 bp; 品种苏 2 和苏 4 多态性条带大小相同)。用数种引物组合, 可以将全部 96 个中国系统二化品种区分开来。随着我国蚕业经济的不断发展, 建立家蚕品种的 DNA 指纹图谱档案, 利用家蚕 (品系、品种) 的微卫星 DNA 特征指纹, 将该 DNA 指纹分析结果和各品种形态学标记结合, 可以为家蚕品种的亲缘关系鉴定, 保护新品种的知识产权提供科学依据, 并有利于解决新品种在生产中的产权纠纷, 防止伪劣蚕种仿冒优质蚕种。

表22 18个家蚕品种的遗传距离矩阵

Table 22 The genetic distance of 18 silkworm races

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	****																	
2	0.2296	****																
3	0.2172	0.2124	****															
4	0.2222	0.1741	0.2296	****														
5	0.2075	0.1788	0.1906	0.1717	****													
6	0.1883	0.2471	0.1717	0.2246	0.2002	****												
7	0.2051	0.1954	0.1930	0.1601	0.1509	0.1835	****											
8	0.1811	0.2345	0.1741	0.2075	0.1694	0.1741	0.1486	****										
9	0.1811	0.2002	0.1647	0.1835	0.1788	0.1601	0.1671	0.1578	****									
10	0.1978	0.2172	0.1578	0.2246	0.1578	0.1671	0.1509	0.1372	0.1327	****								
11	0.2124	0.1930	0.1764	0.2148	0.1811	0.1717	0.1282	0.1601	0.1555	0.1578	****							
12	0.1930	0.2172	0.1440	0.2051	0.2002	0.1395	0.1601	0.1647	0.1237	0.1304	0.1671	****						
13	0.1954	0.2296	0.1741	0.2124	0.2172	0.1694	0.1532	0.1764	0.1578	0.1694	0.1555	0.1601	****					
14	0.2002	0.1859	0.1788	0.1741	0.1883	0.1883	0.1304	0.1717	0.1671	0.1601	0.1694	0.1555	0.1486	****				
15	0.1883	0.2026	0.1859	0.1906	0.1906	0.1764	0.1193	0.1835	0.1647	0.1811	0.1859	0.1532	0.1555	0.1193	****			
16	0.2099	0.2395	0.1694	0.2124	0.2370	0.1555	0.1859	0.1811	0.1671	0.1647	0.1835	0.1788	0.1440	0.1578	0.1930	****		
17	0.1811	0.2051	0.1647	0.1883	0.1741	0.1601	0.1440	0.1440	0.1304	0.1788	0.1741	0.1327	0.1624	0.1440	0.1555	0.1954	****	
18	0.1978	0.2124	0.1260	0.2148	0.2051	0.1578	0.1741	0.1601	0.1372	0.1532	0.1624	0.1038	0.1509	0.1601	0.1764	0.1417	0.1237	****

图 6 家蚕品种的聚类图

Fig6 Cluster result of silkworm races

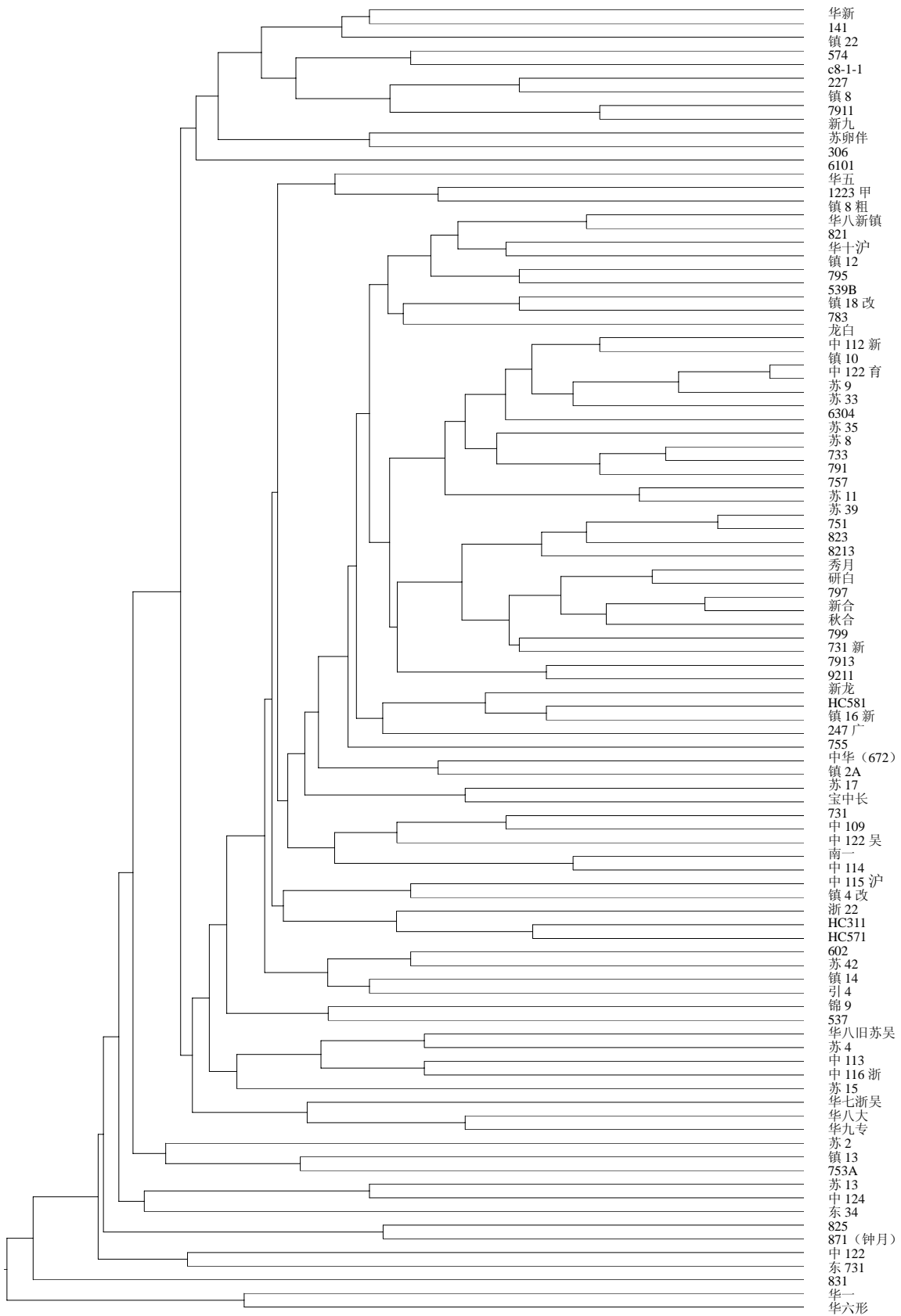


表 23 家蚕品种 34—45 各个品种的形态性状

Table 23 The shape character of 12 silkworm races

品种编号	品种名	卵色	斑纹	茧形	茧色
Number	Races	Egg color	Dapple	Cocoon shape	Cocoon color
34	苏 2	深灰、少数淡绿	素斑	椭圆、纺锤	白色
35	苏 4	深灰	素斑	椭圆	白色
36	苏 8	灰	素斑	椭圆	白色
37	苏 9	深灰	素斑	椭圆	白色
38	苏 11	灰绿	素斑	椭圆	白色
39	苏 13	深灰、灰紫	素斑	椭圆	白色
40	苏 15	灰、灰绿、灰紫	素斑	椭圆	白色
41	苏 17	灰、灰紫	素斑	椭圆、球形	白色
42	苏 33	深灰	素斑	椭圆、球形	白色
43	苏 35	深灰、灰绿	素斑	椭圆、短椭圆	白色
44	苏 39	灰绿、灰	素斑	椭圆	白色
45	苏 42	灰绿、深灰	素斑	椭圆	白色

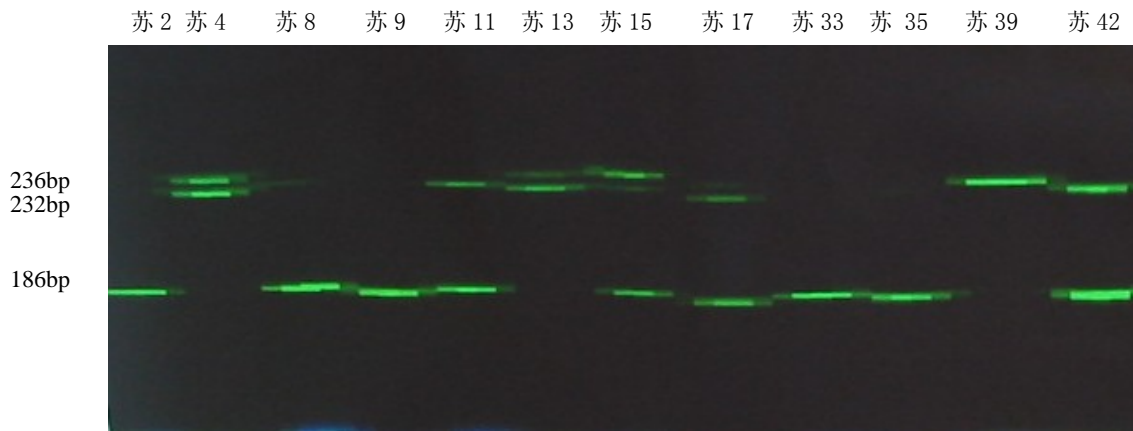


图 7 SSR 标记 FL1125 对 12 个家蚕品种的 377 测序仪电泳图

Fig 7 Polyacrylamide-gel image of PCR production on 377 DNA sequencer

3.5 讨论

家蚕传统的形态鉴定虽较为直观,但要等到收蚁饲养后才能进行观察,存在费工费时准确性不高的缺点。同工酶标记的多态性少,因此无法鉴定出由一些酶谱相近或相同的家蚕品种,并且酶的活性受发育时期及环境条件的影响很大,难以准确掌握,这就降低了纯度分析的准确性和可靠性。微卫星因能揭示家蚕基因组DNA序列之间的丰富多态性,在实际操作中可以从家蚕的幼虫、

蛹及蛾中提取DNA作模板,具有快速方便的特点,并且能够将亲本及杂合体的遗传信息在电泳谱带中准确直观地表现出来。在家蚕种质资源保存过程中,每个品种具有多样的性状,有些性状可以通过饲养过程中的观察和调查进行人工取舍,有的性状则必须通过特殊的方法进行研究和鉴定。应用SSR构建的家蚕种质资源指纹图谱,可为品种性状的选留提供便捷的方法,特别对于携带隐性基因家蚕新品种选育和具有特殊性状蚕品种创建,可提高人工选择过程中的准确性,缩短新品种选育的周期。尽管家蚕种质资源指纹图谱的构建,对家蚕品种鉴别以及选育优质高产家蚕品种具有重要的意义,

本研究建立了 96 个中国系统二化品种 DNA 指纹图谱,为家蚕品种鉴定提供便的方法,同时也为今后家蚕种质资源 DNA 指纹图谱数据库的建立和家蚕核心种质资源数据库的建立奠定基础。由于 SSR 标记属共显性标记,在家蚕 F1 代杂交种及其亲本的鉴定方面具有明显优势。由于所使用的 57 对引物能将亲缘关系较远或亲缘关系相近的家蚕品种都能进行鉴定,因此所构建的指纹图谱可以作为各品种的固性状加以利用。SSR 标记是一种有效的基因型鉴定手段,该方法可为保护家蚕育种产权、保护新品种(组合)的知识产权、登录新品种、以及鉴定和检测其蚕种的真实性和纯度仲裁蚕种纠纷等提供客观、科学的技术依据。由于 SSR 能够产生足够的等位多样性,它可以成为家蚕育种系谱分析的有利工具。将各种特异的微卫星标记组合所产生的遗传图谱和系谱与生物学性状联系在一起,可用于鉴定种、特异自交系、品种和杂种。

家蚕种质资源指纹图谱可用于标记辅助选择,通过一些与重要经济性状连锁的微卫星标记,可以在育种初期对该性状进行选择,这样可以使世代间隔得以缩短,选择强度得以提高。标记辅助导入,是指在 DNA 标记的辅助下,将一个或多个优良生产性状基因(主基因或 QTL)从一个品种导入另一个品种,并通过反复回交,使主基因或 QTL 基因达到一定的频率。利用微卫星标记可以清楚了解导入基因的频率,并防止有害基因渗入。此外,微卫星标记还可用于家蚕品种资源的保护,利用与目标基因有紧密连锁关系的微卫星标记,通过有意识的选留与保护,从而达到家蚕种质资源保种的目的。

虽然利用分子标记技术,可以从 DNA 水平将 96 个中国系统家蚕种质资源区分开来,但在聚类分析中发现,家蚕种质资源的原来征集地的地理分布、种质的亲缘关系,与分子标记所揭示的 96 个中国系统家蚕种质资源遗传距离之间没有必然的相关性,或相关性不显著,推测原因认为实验选用的 SSR 检测的位点可能大多数为基因组中的重复序列,而非功能区。使用 377DNA 全自动测序仪检测荧光标记后的微卫星 PCR 产物时,由于每一泳道均有内标的存在,从而避免了传统聚丙烯酰胺凝胶电泳中因各泳道共用一个标记而造成的误差。但在实际读带过程中,由于 DNA 指纹图谱中的杂带较多,而且扩增带的强弱不一,不易判读,对等位基因的判断较为困难,这就需要在今后的研究过程中不断加以完善。

第四章 结 论

本论文从事两个方面研究，并得出以下结论：

4.1 家蚕不含桑叶粉人工饲料摄食性调查

对 386 个家蚕保存品种进行无桑人工饲料的摄食性调查，蚁蚕 48h 摄食率平均为 1.74%，最高为 83.98%。蚁蚕 48 小时疏毛率平均为 0.57%，最高为 66.48%。家蚕种质资源的不同品种对无桑人工饲料的摄食性，以中系一化为最好，多化最差。48 小时疏毛率与摄食率呈高度正相关 ($r=0.859$)。不同品种对无桑饲料和有桑饲料摄食性的相关系数为 0.1148，未达到显著水平。通过调查发现，我国保存的蚕品种资源中，含有大量具有多食性特征的遗传资源，具有重要的研究和利用价值。本试验中有多个中国系统的品种对无桑人工饲料的摄食性优异，这个结果与日本学者的研究结果的报道差异较大，其原因主要是由于日本保存的中系品种的来源相对单一、遗传基础狭窄之故。在保存的中系地方品种中，来源于华南、西南和北方蚕区的品种，其摄食蚕的出现频率要远高于江浙蚕区的品种，也说明我国保存的中系品种的遗传多样性比日本的中系品种丰富得多。

4.2 家蚕广食性系统的建立及摄食性优良品种的选拔

通过对摄食性优良品种的进一步筛选（部分为多品种混合筛选），建立了家蚕广食性系统，包括中国系统 10 个，日本系统 6 个品种。为尽快获得纯合的对不含桑叶粉人工饲料食性优良的广食性系统，对筛选出的摄食率较高的两个品种选 01 和选 02 进行累代选择。通过混合蛾区饲育，单蛾区饲育，建立了两个广食性系统中 01 和中 02，其中中 01 为中国系统，一化三眠；中 02 为中国系统，一化四眠。经过 7 代选择以后，广食性系统中 01 和中 02 蚁蚕对不含桑叶粉人工饲料的摄食率均达到 99% 以上。在连续世代的选择过程中，尽管出现部分摄食率达到 100% 摄食蛾区，但它们的下代并不能稳定在 100% 的摄食率。相同世代蛾区之间的蚁蚕摄食率在选拔初期有一定的差异，经过几个世代筛选以后差异明显缩小，说明家蚕对无桑人工饲料的摄食性基因已经达到较高的纯合度。在对人工饲料摄食性优良的不同品种进行选拔时，选拔所需经过的世代差异较大。

4.3 家蚕不含桑叶粉人工饲料摄食性遗传分析

将高摄食性品种中01（摄食率在 99.0% 以上）与低摄食性品种 1015（摄食率为 0）进行杂交，用无桑人工饲料饲养 F1、F2 及 BC1 世代，蚁蚕 48 h 后对不含桑叶粉人工饲料的摄食性，分析其遗传特性。调查结果为，F1 代摄食性为零，正、反交间的摄食性没有差异，与 1015 亲本的摄食性相同，据此认为，中01 对 1015 的摄食性表现为隐性遗传，并且由常染色体基因支配。杂交使用的中01 系统，已经 8 代以上同蛾区交配选择，并且在其选拔的后几个世代都出现了部分接近全部取食的单蛾区，表明中01 系统的食性基因应该处于或十分接近纯合状态。F2 的摄食率在 22% 左右，BC1 的摄食率在 45% 左右，用卡平方 (X^2 , chi-square) 测定好适度，正交 F2 分离比 1:3.45 和反交 F2 分离比 1:3.41，与理论分离比 1:3 有显著差异，表明中 01 摄食不含桑叶粉人工饲料的性状在遗传上具有复杂的一面，除了 1 对主基因隐性遗传的总体趋势之外，还有其他因素的影响作用，一定程度上具有数量性状的特征，据此推断广食性系统中01 对不含桑叶粉人工饲料摄食性遗传除

了受 1 个隐性主基因控制，同时还有修饰基因的存在。

4.4 用微卫星标记 (SSR) 构建家蚕指纹图谱

SSR 扩增技术具有简便快捷、重复性好和准确度高优点，该方法可以有效地对家蚕品种资源进行指纹鉴定。采用 57 对引物对 96 个中国系统的家蚕二化品种的基因组 DNA 进行扩增，除两对引物无多态性条带外，其余 SSR 引物在本实验中扩增效果较好，每个条带清晰，表现出了丰富的 SSR 多态性和良好的指纹特征。有数种引物组合可以区分 96 个家蚕品种。SSR 指纹图谱条带稳定、清晰的一个重要因素是聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率高。家蚕基因组丰富的 SSR 多态性和不同家蚕品种 (系) 之间的 SSR 多态性差异，表明了 SSR 标记在家蚕 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析中的优势，展示了 SSR 分析在家蚕品种分子标记技术中的良好应用前景。

4.5 微卫星标记 (SSR) 的多态性分析

采用 57 对 SSR 引物对 96 个中国系统二化品种的基因组 DNA 进行扩增，共扩增出 507 条有效带，最多的一对引物扩增出了 24 个片段，最少的仅有 1 个，平均 8.9 个/引物，各品种的扩增带数值从 90bp 到 370bp 不等，表明各品种之间存在丰富的微卫星多态性。家蚕品种间遗传距离最大值为 0.2572，最小值为 0.0951，根据每个品种间的遗传距离，利用 UPGMA 聚类法进行了聚类分析，发现 SSR 扩增片段具有品种特异性，能准确地对各品种进行分类和鉴别。用 SSR 构建的家蚕 DNA 指纹图谱具有简便、迅速等优点，是家蚕品种评价鉴定中较为理想的方法，将该 DNA 指纹分析结果和各品种形态学标记结合，可以为家蚕品种的亲缘关系鉴定，保护新品种的知识产权提供科学依据，并有利于解决新品种在生产中的产权纠纷，防止伪劣蚕种仿冒优质蚕种。

4.6 微卫星标记在品种鉴定方面的应用

家蚕品种的鉴定，主要鉴定其遗传特性、一致性和遗传稳定性，找到该品种区别于其他已有品种的特征。目前对家蚕品种的鉴定主要是以形态学标记为依据，由于多数家蚕品种在形态上如卵色、茧色、斑纹、茧形上非常相近，因此无法加以区别。用同工酶和蛋白质标记鉴定只能间接反应很少一个品种的一部分 DNA 分子的多态性。DNA 指纹图谱相对以上方法，具有简便、迅速等优点，应是家蚕品种评价鉴定中较为理想的方法。而微卫星 DNA 指纹由于具有高度的专一性和丰富的多态性，利用微卫星 DNA 多态性，即以多个微卫星座位在该群体中的等位基因频率为基础，通过排除概率进行亲子鉴定和亲缘关系的确认，势必成为一种有效的分析工具。如用 FL1125 引物的扩增条 (图 8) 带便可以将苏字号 12 个品种中的 11 个品种区别开来。随着我国蚕业经济的不断发展，建立家蚕品种的 DNA 指纹图谱档案，利用家蚕 (品系、品种) 的微卫星 DNA 特征指纹，将该 DNA 指纹分析结果和各品种形态学标记结合，可以为家蚕品种的亲缘关系鉴定，保护新品种的知识产权提供科学依据，并有利于解决新品种在生产中的产权纠纷，防止伪劣蚕种仿冒优质蚕种。

参考文献

- 1 蔡宏玉, 张晓义, 杨大字. 家蚕杂种优势与血液酯酶同工酶谱的分析(J). 华北农学报, 2000, 15 (1): 139~141
- 2 程安纬, 崔为正. 颗粒人工饲料中VB的添加量对家蚕生长发育的影响(J). 山东农业科学, 2002, 4, 46~47
- 3 陈道军, 周泽扬, 鲁成, 等. RFLP技术构建家蚕现行DNA指纹图谱的研究[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22 (6): 29-32
- 4 陈克平, 鲁成, 向仲怀. 家蚕耐氟性RAPD分子标记研究(J). 农业生物技术学报, 2001, 9 (2): 136~ 138
- 6 陈瑞豪 冯建琴 张苗琴, 桑蚕低成本人工饲料蚕品种的适应性试验(J). 蚕桑通报, 2002, 33 (1): 10~12
- 7 崔为正. 家蚕摄食反映的个体差异研究(J). 蚕业科学, 1998, 24 (2): 75~80
- 8 崔为正, 张国基, 等. 以玉米粉为成型剂的稚蚕人工饲料的研究(J). 蚕业科学, 1998, 24 (4): 210~214
- 9 崔为正, 尚金燕, 刘训理, 等. 促食物质和阻食物质相互作用对家蚕摄食性的影响(J). 蚕业科学, 2002, 28 (1): 35~37
- 10 崔为政, 王彦文, 张国基, 等, 家蚕人工饲料防腐剂和抗菌素的筛选研究(J), 山东农业大学学报, 1999, 30 (3): 119~225
- 11 崔为正, 李卫国, 胡增娟等, 桑蚕摘除部分感觉器对人工饲料摄食性的影响(J), 蚕桑通报, 1999, 30 (3): 15 ~17
- 12 崔为正, 牟志美, 王彦文等, 家蚕味觉电生理反应的个体差异(J). 昆虫学报, 2002, 45 (1): 41~46
- 13 崔为正, 尚金燕 刘训理, 等, 促食物质和阻食物质相互作用对家蚕摄食性的影响(J). 蚕业科学, 2002, 28 (1): 35~38
- 14 崔为正. 家蚕人工饲料摄食性的生理遗传学研究展望(J). 蚕业科学, 2003, 29 (2): 107~113
- 15 大沼昭夫, 田岛弥太郎. 关于家蚕食性变异的研究(II-3)(J). 蚕丝科学研究所汇报, 1986, (34): 17-25
- 16 大沼昭夫, 田岛弥太郎. 关于家蚕食性变异的研究(IX)(J). 蚕丝科学研究所汇报, 1989, (37): 13-19
- 17 代方银, 童晓玲, 罗英, 等. 家蚕广食性系统GS01对甘蓝摄食性的遗传(J). 蚕业科学, 2004, 30 (4) 339~342
- 18 代方银, 鲁成, 向仲怀, 等. 家蚕保存系统广食性种质的检出与培育(J). 蚕学通讯, 2003, 23 (4): 3~8
- 19 方玉春, 张兴和, 冯德举, 等. 应用盐蛋白电泳图谱鉴定玉米种子纯度(J). 吉林农业大学学报, 2001, 23 (4): 6~10
- 20 耿红, 娄群峰, 余纪柱, 等. 黄瓜育成品种“春玉”RAPD指纹图谱分析(J). 西北植物学报, 2005, 25(5): 876~880
- 21 何家禄, 易文仲. 家蚕不同品种血液酯酶酶谱的初步研究(J). 蚕业科学, 1983, 9 (2): 103~106
- 22 何士敏, 肖静, 白士博. 蜜蜂酯酶同工酶的比较研究(J). 生物技术, 2005, 15 (1): 22~23
- 23 何勇, 严欲民. 家蚕人工饲料防腐剂DF效果试验(J). 蚕业科学, 1991, 17 (1): 5~8
- 24 何勇, 杨明观, 陆星垣. 桑蚕人工饲料摄食性的遗传研究(J). 蚕桑通报, 1990, 23 (3): 27~29
- 25 何勇, 杨明观, 陆星垣. 桑蚕对人工饲料摄食性的选择效果试验(J). 蚕桑通报, 1992, 21, 23 (3): 40~42
- 26 横山忠雄. 关于蚕的食性的研究(XI) 食性异常蚕泽J的由来与性质(J). 蚕研汇报, 1975, (24): 27-30
- 27 黄健辉. 新型的人工饲料防腐剂ADA(J). 浙江农业大学学报, 1996, 22 (5): 515~518
- 28 黄健辉, 徐俊良. 桑蚕人工饲料成型剂的研究(J). 蚕桑通报, 1995, 26 (4): 38~40
- 29 黄健辉, 徐俊良. 人工饲料PH值和缓冲性能对家蚕生长发育的影响(J). 科技通报, 1996, 12 (6) 324~328
- 30 黄健辉, 徐俊良, 吕顺林, 等. 家蚕不同发育阶段饲料适宜的 pH 值的研究(J). 浙江农业大学学报, 1997, 23 (2): 179~183
- 31 靳远祥, 徐孟奎, 陈玉银, 等. 家蚕雌性附腺及其分泌物的蛋白质双向电泳分析(J). 蚕业科学, 2005, 31 (1)
- 32 金振玉, 朱金娥. 家蚕人工饲料防腐剂的研究. 粮食与饲料工业, 1999, 197~99
- 33 李春峰, 吴大洋, 人工饲料育家蚕中肠和血液中几种消化酶活性变化(J). 蚕学通讯, 2000, 20 (1): 5~8
- 34 李东升, 凌尔军, 汪爱民. 家蚕血液的多酚氧化酶同工酶及其活性与经济性状相关分析(J). 中国蚕业, 2003, 37~39
- 35 李丰倩, 黄君霆. 辐射诱发家蚕食性变异. 国外农学~蚕业, 1999, (1): 12~17
- 36 李卫国, 胡增娟, 王彦文. 家蚕人工饲料摄食性遗传模式研究(J). 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31: 276-280

- 37 李卫国, 王彦文 胡增娟, 家蚕人工饲料摄食性遗传模式研究(J), 山东农业大学学报, 2000, 31 (3): 276~280
- 38 李拥军, 苏加楷. 中国苜蓿地方品种亲缘关系的研究种子 I 贮藏蛋白标记(J). 草业学报, 1999, 8(1): 34~41
- 39 李文楚, 邱国祥, 宋家清. 软化病菌感染的家蚕血淋巴蛋白质电泳图谱比较(J). 广东蚕业, 2003, 37(4): 13
- 40 廖顺尧, 刘运强, 鲁成, 等. 家蚕卵线粒体DNA限制性内切酶长度多态性研究[J]. 西南农业大学学报2001, 23(1): 29~32.
- 41 刘杰, 刘公社, 齐冬梅, 等. 向日葵品种鉴定和纯度分析的 AFLP 研究(J). 植物学通报, 2002, 19 (4): 444~451
- 42 刘杰, 刘公社, 齐冬梅, 等. 用微卫星构建羊草遗传指纹图谱(J). 植物学报, 2000, 42 (9): 985~987
- 43 梁明山, 刘煜, 侯留记, 等. 烟草品种的 DNA 指纹图谱和品种鉴定. 烟草科技, 2001, 152 (1): 37~37
- 44 鲁成, 冯丽春, 刘连碧, 等. 家蚕丝蛋白基因分子标记的建立(J). 西南农业大学学报, 1995, 18(2): 100~102
- 45 鲁成, 赵爱春, 周泽扬. 中国野桑蚕和家蚕的AFIP分析(J). 蚕业科学, 2001, 27 (4): 243~252
- 46 鲁成, 余红仕, 向仲怀, 等. 中国野桑蚕和家蚕的分子系统学研究(J). 中国农业科学, 2002, 35(1): 94-101
- 47 罗英, 刘春, 陈萍, 等. 家蚕SOD的品种间差异研究(J). 蚕学通讯, 2002, 22 (2): 1~7
- 48 马轩, 杜雄明, 孙君灵, 等. 18个彩色棉品系的SSR指纹分析(J). 植物遗传资源学报, 2003, 4(4): 305~310
- 49 缪云根, 家蚕人工饲料育的小蚕饲养技术研究(J), 蚕业科学, 2000, 26 (2): 91~93
- 50 庞岗, 陈玉华, 卫正国, 等. 野桑蚕和家蚕的环境适应性比较研究(J). 蚕业科学, 2003, 29 (4): 375~379
- 51 彭锁堂, 庄杰云, 颜启传, 等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定(J). 中国水稻科学, 2003, 17(1): 1~5
- 52 钱荷英. 蚕品种选育及用微卫星标记 (SSR) 构建家蚕指纹图谱. 中国农业科学院学位论文, 2005
- 53 任军, 黄路生, Gary Evens, 等. 猪基因组AFLP指纹图谱的构建(J). 农业生物技术学报 2003, 11(2): 179~18
- 54 神田俊男. 关于家蚕对线性规划人工饲料摄食性的遗传育种学研究 (J). 蚕丝昆虫研报, 1992, (5): 1~89
- 55 神田俊男. 家蚕的摄食性与广食性品种的育成 (J). 蚕丝技术, 1987, (5): 28~35
- 56 神田俊男, 田村俊树, 井上元. 蚕对线性规划人工饲料LP-1的摄食性及其遗传 (J). 日蚕杂, 1988, 57 (6): 489~494
- 57 沈镛, 朱德蔚, 李锡香, 等. 用5种同工酶分析云南芋种质资源的遗传多样性(J). 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 239~24
- 58 沈利, 李木旺, 李明辉, 等. 家蚕微卫星标记的筛选及其在遗传多样性分析中的应用(J). 蚕业科学, 2004, 30 (3): 230~236
- 59 沈利. 微卫星标记技术及其在蚕学研究中的应用前景(J). 蚕业科学, 2004, 30(4): 230~236
- 62 司马杨虎, 陈大霞, 赵爱春, 等. 家蚕AFLP分子标记分离规律的研究(J). 蚕业科学, 2003; 29(2): 131~135
- 60 宋顺华, 郑晓鹰. AFLP分子标记鉴别大白菜品种(J). 分子植物育种, 2005年, 3 (3): 381—387
- 61 宋淑环, 谭智达, 郑淑梅. 桑蚕稚蚕人工饲料网育蚕技术(J), 山东农业科学, 1994, 6: 39~40
- 62 邵宁文, 张国政, 扬仁政, 等. 稚蚕人工饲料中菜籽相的添加效果(J). 蚕业科学, 1995, 21 (3): 195~197
- 63 谭和平, 徐利远, 余桂容, 等. RAPD技术对茶树品种鉴别的研究(J). 中国测试技术, 2004, 30 (6): 3~6
- 64 陶鸣, 祁力言, 陈丙由, 家香原种人工饲料适应性品系的选拔(J). 蚕业科学, 1994, 20 (4): 201~205
- 65 藤森胡有, 山本俊雄, 田中教夫. 食性异常蚕泽J对人工饲料摄食性的遗传模式. 日本蚕丝学杂志, 1982, 51 (3): 235~236
- 66 田岛弥太郎, 小林义彦. 关于家蚕食性变异的研究 (II) (要旨) (J). 日蚕杂, 1953, (22): 121
- 67 王安皆, 宋洪燕, 张亚平等, 稚蚕低成本人工饲料的改进(J). 北方蚕业, 2000, 21 (2): 13~14
- 68 王冰, 宋莲花 陈利华, 等. 若干蚕品种对人工饲料育的适应性研究(J). 蚕桑通报, 2004, 35 (2): 15~19
- 69 王超云, 王安皆, 姜齐年, 等. 稚蚕人工饲料中桑绿枝粉的添加效果及加工特点(J). 蚕业科学, 2001, 27 (4): 326~328
- 70 王洪利, 崔为正, 王彦文. 稚蚕人工饲料育饲养技术研究(J). 山东农业大学学报, 2000, 31 (1): 45~50
- 71 王洪利, 楼程富, 崔为正, 稚蚕人工饲料有关键饲养技术研究(J). 广西蚕业, 200138 (4), 8~12
- 72 王伟东, 周文东 张文东, 蚕人工饲料育生产实用化研究(J). 江苏蚕业, 1998, 2: 12~15

- 73 万春玲, 朱玉芳, 谭远德, 等. AFLP标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用(J). 生物技术, 1999, 9(5): 4~9
- 74 韦亚东, 张国政, 梁培生. 人工饲料中几种钙盐及丙酸适宜添加量对稚蚕生长发育的影响(J). 特产研究, 2004, (1): 11~13
- 75 韦亚东, 张国政, 杨仁政, 等. 进行了稚蚕人工饲料中铁的适宜添加量的研究(J). 蚕业科学, 1997, 23(3):
- 76 吴小峰, 徐俊良, 马秀康等, 小蚕人工饲料育研究(J). 蚕桑通报, 1992, 23(3): 42~43
- 77 吴信生, 陈国宏, 王德前, 等. 利用微卫星技术分析中国部分地方鸡种的遗传结构(J). 遗传学报, 2004, 31(1): 43~50
- 78 熊华斌, 吴渝生, 程在全. 云南省3种作物品种RAPD指纹图谱的构建(J). 种子, 2004, 23(2): 10~13
- 79 新村正纯. 关于家蚕人工饲料的硬度(J). 日蚕杂, 1973, 42(2): 173~177
- 80 徐孟奎 姜永煌 吴小锋等, 人工饲料摄食性好的家蚕基础品种GSC5、GSJ1的选育(J). 蚕业科学, 1996, 22(3): 194~196
- 81 徐俊良, 缪云根, 袁碧华, 等. 不同蚕品种对桑叶粉含量不同的人工饲料摄食性(J). 蚕业科学, 1993, 19(1): 44~46
- 82 徐俊良, 沈群芳, 黄健辉, 等. 关于桑蚕(*Bombyx mori* L.)对人工饲料摄食性的研究(J). 科技通报, 2000, 161
- 83 徐俊良, 洪国延等, 桑蚕人工饲料配方的改进研究(J). 浙江农业大学学报 1996, 22(5): 511~514
- 84 向仲怀. 家蚕遗传育种学(M). 农业出版社, 1994, 73~85
- 85 向仲怀, 夏建国, 黄君霆, 等. 中国蚕种学, 四川成都: 四川科学技术出版社, 1995
- 86 夏庆友, 周泽扬, 鲁成, 等. 家蚕不同地理品种分子系统学研究. 昆虫学报(J). 1998, 41(1): 32~40
- 87 王风格, 赵久然, 郭景伦, 等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究(J). 玉米科学, 2003, 11(1): 3~6
- 88 汪琳, 周泽扬, 代方银. 家蚕龙角突变基因 RAPD 分子标记筛选及其克隆(J). 蚕业科学, 2000, 26(1): 16~19
- 89 王韵, 周泽扬, 朱勇, 等. 蚕学通讯, 1998, 18(1): 6~8 .
- 90 王志民, 刘春吉, 王润奇, 等. 用gFM31探针进行谷子品种的指纹分析. 遗传学报, 1996, 23(3): 228~233
- 91 翁跃进. AFLP—一种DNA分子标记新技术(J). 遗传, 1996, 18(6): 29~31
- 92 吴敏生, 王守才, 戴景瑞. 指纹图谱技术在品种鉴定和纯度分析上的应用(综述)(J). 农业生物技术学报. 1998, 6(1): 51~56
- 93 吴小峰, 徐俊良. 桑蚕人工饲料综述(J). 蚕桑通报, 1991, 22(4): 5~8
- 94 袁金辉 吴福泉, 杨琼, 等. 华南地区家蚕资源品种的人工饲料摄食性调查(J). 蚕业科学, 2005, 31(1):
- 95 袁力行, 傅骏骅, Warburton, 等. 利用RFLP、SSR、AFLP和RAPD标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究(J). 遗传学报, 2000, 27(8): 725-733
- 96 殷工, 李京华. 应用蛋白质电泳技术对新疆蚕品种资源遗传距离的研究(J). 蚕学通讯, 2003, 23(4): 9~11
- 97 张亚平, 李化秀, 娄齐年, 等. 不同家蚕品种对低成本人工饲料适应性调查(J). 山东农业科学, 2003, 2
- 98 张亚平, 娄齐年, 李化秀, 等. 人工饲料不同成型剂对稚蚕饲育的影响(J). 广西蚕业, 2003, 40(1)
- 99 张月华, 徐安英, 韦亚东, 等. 家蚕种质资源对无桑人工饲料的摄食性调查(J). 蚕业科学, 2002, 28(4) 333-336。
- 100 张月华, 徐安英, 李木旺, 等. 家蚕品种资源数据库的构建. 蚕业科学, 2004, 30(3): 296~299)
- 101 张月华, 姚勤, 侯成香. 家蚕保存品种主要性状的统计分析. 蚕学通讯, 2001, 21(3) 5-9。
- 102 张传溪, 徐俊良, 陈瑞英, 等. 含豆腐渣粉末的小蚕人工饲料(J). 蚕桑通报1992, 23(3): 44
- 103 张传溪, 徐俊良, 缪云根等, 人工饲料含糖量对蚕生长发育的影响(J). 1993, 24(4): 23~25
- 104 张传溪, 徐俊良, 杨远晶等, 人工饲料防腐剂进行了研究(J), 蚕桑通报, 1994, 25(4) 29-30
119~225
- 105 苦米地贞夫. 日本家蚕人工饲料育的普及状况(J), 江苏蚕业, 1992, 2: 57
- 106 张国政, 韦亚东, 杨仁政, 等. 稚蚕人工饲料中几种微量元素添加效果(J), 蚕业科学, 1996, 22(3): 145~149
- 107 张国政, 邵宁文, 杨仁政, 等. 家蚕原种人工饲料适应性及稚蚕饲料实用化研究(J), 蚕业科学, 1994, 20(2): 80~85
- 108 张国政, 韦亚东等. 家蚕人工饲料育适应性品种选育初报(J) 中国蚕学会家蚕生理病理与养蚕学术交流会

- 论文集 2000, 18—24
- 109 张金卫, 钟伯雄, 丁农, 等. 应用AFLP分子标记对6个家蚕品种的鉴定(J). 蚕业科学, 2004, 30(2): 137-142
- 110 赵巧玲, 季平, 何家禄. 家蚕茧丝纤度基因的RAPD标记蚕业科学, 2000, 26(3): 188~189.
- 111 真野保久, 朝冈洁, 井原音重等. 多食性多丝量蚕品种“朝雾”的育成(J). 蚕丝昆虫研报, 1991, (3): 31-56
- 112 钟伯雄. 家蚕卵碱性磷酸酶活力与数量性状相关研究(J). 蚕业科学, 1998, 14(1): 17~19
- 113 中国农业科学院蚕业研究所. 家蚕不同原蚕品种对人工饲料的适应性调查—蚁蚕摄食试验(J). 蚕业科学, 1982, 8(3): 167
- 114 周泽扬, 李斌, G. Ravikumar 等. 家蚕 AFLP 分子进化研究(J). 西南农业学报, 2004, 17(2): 240~243
- 115 庄淑芳. 同工酶电泳技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用探析(J). 福建农业学报, 2004, 19(4): 247~249
- 116 朱玉芳, 谭远德, 万春玲, 等. 家蚕AFLP连锁框架图谱的构建(J). 昆虫学报, 2001, 44(4): 484~493
- 117 Ali S, Muller C R, Epplen J T. DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats(J). Hum Genet. 1986, 74(3): 239~243
- 118 Amornrat Promboon, et al. Linkage map of RAPDs in the silkworm. *Bombyx mori* (J). Genet Res Camb, 1995, 66: 1~7
- 119 oemaker R C, Specht J E, et al. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map (J). Crop Sci. 1995, 35: 1439-1445
- 120 b C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites(J). Nature, 1996, 380: 152-154
- 121 Burnham K D, Francis D M, Dorrance A E, et al. Genetic diversity patterns among phytophthora soybean plant introduction based on SSR markers(J). Crop Sci. , 2002, 42(2): 338~343.
- 122 Crooijmans R P M A, Vanoers P A M, Strijk J A, et al. Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers—77 new markers mapped(J). Poul. Sci. 1996, 75: 746-754
- 123 Cross J W, Adams W R. Differences in the Embryo-specific Globulins among maize inbred lines and their hybrids(J). Crop Science, 1983, 23: 1160-1162
- 124 dy K D, Abraham E G, Nagaraju J. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: Abundance, polymorphism, and strain characterization (J). Genome, 1999, 42: 1057-1065.
- 125 Goldsmith M R, et al. A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on RFLPs(J). Genet Res Camb, 1995, 66: 109~126
- 126 Goldsmith M R, Shi J. A Molecular Map for the silkworm: constricting new links between basic and applied research(J). American Chemical Society Symposium Series, 1994, 544: 45—48
- 127 J. Abe · D. H. Xu · Y. Suzuki · A. Kanazawa Y. Shimamoto, Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs (J), Theor Appl Genet (2003) 106:445-453
- 128 Jetrich W F, Miller J, Steen R, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome(J). Nature. 1996, 380: 149-152
- 129 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. 1985a. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA (J). Nature(london), 314:67-73
- 130 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. 1985b. Individual-specific “fingerprint” of human DNA (J). Nature(london), 316:76-79
- 131 Jeffreys A J, Royle N J, Wilson V. et al. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. Nature (J). 1988, 332(6161): 278~281
- 132 K. Damoder Reddy, E.G. Abraham, and J. Nagaraju. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: Abundance, polymorphism, and strain characterization(J). Gemome 1999, 42: 1057-1065
- 133 K.DAMODAR REDDY, J.NAGARAJU, E.G.ABRAHAM. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR(J), Heredity 1999, 83:681-687

- 134 KIKUCHI Y, MORI K, SUZUKI S, et al. Structure of the *Bombyx mori* fibroin light—chain—encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain (J). *Gene*, 1992, 110(2): 151~158.
- 135 Mamuris Z., Sfougaris A. I., Stamatis C. et al. Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) (J). *Biochem Genet*, 2002, 40(9—10): 323-338.
- 136 Mackill D. J., et al. *Genome*, 1996, 39: 969-977
- 137 Meksem K., Leister D., Peleman J., et al. A high—resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFIP and AFLP markers (J). *Mol. Gen. Genet.* 1995, 249: 74~81
- 138 Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases (J). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979, 76: 5269-5273
- 139 Ogoyi DO, Kadono-Okuda K, Eguchi R, et al.. Linkage and mapping analysis of a non-susceptibility gene to densovirus (*nsd-2*) in the silkworm, *Bombyx mori* (J). *Insect Mol Biol*. 2003 Apr;12(2):117-24.
- 140 Ostrander E A, Sprague J F, Rine J. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog (J). *Genomics*, 1993, 16: 207-213
- 141 Pakniyat H., et al. *Genome*, 1997, 40: 332-341
- 142 PHILLIP A. MORIN, SREETHARAN KANTHASWAMY, AND DAVID GLENN SMITH, Simple Sequence Repeat (SSR) Polymorphisms for Colony Management and Population Genetics in Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) (J), *American Journal of Primatology* 42:199-213 (1997)
- 143 PINYARAT W, SHIMADA T, XU W H, et al. Linkage analysis of the gene encoding precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori* (J). *Genet Res*, 1995, 65(2): 105-111.
- 144 Promboon A., et al. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori* (J). *Genet Res Camb*, 1995, 66: 1-7
- 145 Reddy KD, Nagaraju J, Abraham EG. Genetic characterization of the silkworm, *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR) anchored PCR (J). *Heredity*, 1999, 83(6): 681~687
- 146 RONGWEN J. AKKAYA M S, LAVI U, ET AL. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification (J). *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 43-48
- 147 Skinner D M, et al. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system (J). *Biochem*, 1974, 13: 3930.
- 148 Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers (J). *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 6463-6471
- 149 Thomas C M., et al. *The Plant Journal*, 1995, 8(5): 785-794
- 150 T. N. Zhebentyayeva · G. L. Reighard · V. M. Gorina A. G. Abbott. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm (J). *Theor Appl Genet* (2003) 106:435-444
- 151 Wall J S. Improved two-dimensional electrophoretic separation of zein proteins: application to study of zein inheritance in corn genotypes (J). *Cereal chemistry*, 1984, 61(2): 141-146
- 152 Vandewoestijne S, Baguette M (2002) The genetic structure of endangered populations in the Cranberry Fritillary *Boloria aquilonaris* (Lepidoptera, Nymphalidae): RAPD vs allozymes (J). *Heredity*, 89(6): 439-445
- 153 Welsh J, Peterson C, McClelland M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers (J). *Nucl Acids Res.*, 18: 7213-7218
- 154 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers (J). *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6235.
- 155 Zebeu M. Vos P. Selective Restriction Fragment Amplification: a General method for DNA Fingerprint (J). *European Patent Application*, 1992

附录 1-家蚕对不含桑叶粉人工饲料摄食率和疏毛率调查结果

Appendix 1-The investigation result of feeding ratio and setae dispersion ratio of newly hatched larvae with artificial diet without Mulberry

区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率	区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率
1001	甘肃种	1658	180	10.85	280	16.89	2012	临海 39	3258	0	0	20	0.61
1002	安康 4	811	2	0.25	12	1.48	2013	宁海 20	1512	1	0.07	21	1.39
1003	汾水一	1828	9	0.49	19	1.04	2014	奉化 7	2248	1	0.04	31	1.38
1004	修水 2	1466	17	1.16	67	4.57	2015	邳县 3	2486	10	0.40	40	1.61
1005	宿迁一	1590	5	0.31	15	0.94	2016	铜山 24	770	70	9.09	170	22.09
1006	临澧园形	688	25	3.63	45	6.54	2017	新沂 19	2339	0	0	10	0.43
1007	黔三眠	1947	12	0.62	42	2.16	2018	盱眙 1	2040	1	0.05	6	0.29
1008	二毛	405	0	0	10	2.47	2019	泗洪 15	1780	90	5.06	190	10.68
1009	珠桂	881	0	0	0	0	2020	沛县 1	2225	2	0.09	12	0.54
1010	塘栖三眠	1310	10	0.76	30	2.29	2021	丰县 8	2058	5	0.24	155	7.53
1011	遵义 1	924	10	1.08	40	4.33	2022	盐城 2	2142	0	0	15	0.70
1012	遵义 2	950	6	0.63	26	2.74	2023	太和 1	1883	1	0.05	31	1.65
1013	正安 1 号	1392	1	0.07	11	0.79	2024	沔阳红	530	0	0	10	1.89
1014	沿河 1 号	1662	5	0.30	25	1.50	2025	叙浦种	2328	25	1.07	225	9.67
1015	三眠 A	649	0	0	0	0	2026	常德金黄	1537	0	0	0	0
1016	三眠 B	345	1	0.29	11	3.19	2027	攸县种	1696	7	0.41	27	1.59
1017	三光	2200	0	0	10	0.45	2028	邯郸种	2314	40	1.73	140	6.05
1018	连云一号	931	60	6.44	160	17.19	2029	大团圆	1264	0	0	10	0.79
1019	商丘一号	1047	2	0.19	52	4.97	2030	金黄	2070	8	0.39	38	1.84
1020	蒙自一号	1105	1	0.09	11	1.00	2031	金光	1135	1	0.09	6	0.53
2001	43 新	1857	0	0	1	0.05	2032	碧莲	1264	0	0	5	0.40
2002	47 新	2057	0	0	1	0.05	2033	中 11	1424	1	0.07	5	0.35
2003	47 桥	2116	0	0	0	0	2034	中 14	1586	1	0.06	31	1.95
2004	朝鲜种	3368	0	0	2	0.06	2035	巴陵黄	1558	0	0	0	0
2005	四川普黄	572	380	66.43	480	83.92	2036	嘉兴油蚕	643	0	0	0	0
2006	孝丰 17	1644	0	0	5	0.30	2037	余杭白皮	609	0	0	5	0.82
2007	安吉 7	3732	0	0	10	0.27	2038	辑里丝	1714	1	0.06	31	1.81
2008	余杭 11	2493	0	0	20	0.80	2039	龙黄棠	2394	0	0	10	0.42
2009	余杭 24	2610	1	0.04	11	0.42	2040	诸暨	2370	3	0.13	33	1.39
2010	义乌 10	1071	10	0.93	40	3.73	2041	小白圆	1230	1	0.08	11	0.89
2011	新昌 12	1803	1	0.06	31	1.72	2042	浔八	1923	0	0	0	0

区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率	区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率
2043	太湖玉蚕	2899	0	0	30	1.03	3012	绵蚕	1865	2	0.11	102	5.47
2044	松花蚕姬	1394	0	0	10	0.72	3013	黑子	708	1	0.14	3	0.42
2045	华圆	1536	3	0.20	103	6.70	3014	姬蚕	2143	0	0	50	2.33
2046	乌龙 3030	1881	0	0	5	0.27	3015	天龙青白	1383	0	0	10	0.72
2047	三五七	2078	0	0	5	0.24	4001	玉种	1030	1	0.10	3	0.29
2048	C ₁₇ (诸吴)	2372	0	0	0	0	4002	欧洲	1873	0	0	10	0.53
2049	九 00 八	2392	5	0.21	55	2.30	4003	欧 16 吴	1443	14	0.97	64	4.44
2050	3042-18	1985	0	0	0	0	4004	欧 17 吴	1671	30	1.80	80	4.79
2051	拱二	2311	4	0.17	34	1.47	4005	欧 18	2180	0	0	0	0
2052	川三十五	2314	1	0.04	31	1.34	4006	欧 19 吴	1377	10	0.73	30	2.18
2053	临城种	1912	0	0	10	0.52	4007	AN525	1726	0	0	5	0.29
2054	柘蚕	2831	1	0.04	21	0.74	4008	意 16	1182	10	0.85	60	5.07
2055	震泽	3234	0	0	10	0.31	4009	テグス 1 号	1530	0	0	20	1.31
2056	鲁 108	2360	0	0	20	0.85	4010	テグス 2 号	1384	0	0	20	1.45
2057	中 20 锡	1913	0	0	10	0.52	4011	法 50B	405	2	0.49	7	1.73
2058	中 21 育	2018	0	0	5	0.25	4012	法 403	986	0	0	0	0
2059	延吉种	2836	0	0	10	0.35	4013	法 408 油	1303	0	0	5	0.38
2060	翰桂(吴)	1492	0	0	5	0.34	4014	N31 世红吴	1353	80	5.91	180	13.30
2061	CA(浙)	1720	0	0	5	0.29	4015	信农欧白吴	935	1	0.11	6	0.64
2062	浒桂(吴)	2999	2	0.07	12	0.40	4016	爱子一号	1921	5	0.26	15	0.78
2063	兴山 1	1410	22	1.56	52	3.69	4017	爱子二号	3558	0	0	10	0.28
2064	兴山 2	2954	1	0.03	81	2.74	4018	乌斯一号	1929	1	0.05	6	0.31
3001	日 7	2561	0	0	1	0.04	4021	W11	2339	0	0	2	0.09
3002	日 8	2307	1	0.04	3	0.13	4022	W15	2453	5	0.20	25	1.02
3003	日 9	2517	0	0	2	0.08	4023	W22	2117	0	0	10	0.47
3004	日 10	2973	0	0	2	0.07	4024	W24	2314	5	0.22	15	0.65
3005	日 11 锡	3282	0	0	10	0.30	4025	东德 201	1445	100	6.92	220	15.22
3006	日 12 锡	1626	0	0	2	0.12	4026	东德 907	709	50	7.05	100	14.11
3007	日 13 锡	215	0	0	2	0.93	4027	罗尼 3 号	1206	30	2.49	80	6.63
3008	日 13 吴	1434	0	0	2	0.14	4028	罗尼 6 号	1543	5	0.32	55	3.56
3009	日 13 桥	2047	0	0	1	0.05	4029	罗尼 7 号	1978	5	0.25	10	0.51
3010	J11 吴	3177	0	0	0	0	4030	罗尼 9 号	1676	30	1.79	60	3.58
3011	JA 一吴	1227	0	0	2	0.16	4031	三一七	1283	3	0.23	13	1.01

区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率	区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率
4032	四二零	1063	10	0.94	30	2.82	5015	中 114	1621	0	0	0	0
4033	Ayag	2087	1	0.05	30	1.44	5016	中 115	1513	0	0	0	0
4034	保黄	1201	0	0	50	4.16	5017	中 116 浙	2514	0	0	0	0
4035	匈牙利	1709	2	0.12	7	0.41	5018	中 122 吴	1510	0	0	20	1.32
4036	伟罗 A	1316	2	0.15	12	0.91	5019	中 122 育	1368	0	0	0	0
4037	苏罗 42	2232	0	0	20	0.90	5020	1223 甲	1932	0	0	0	0
4038	日本白罗	3377	0	0	30	0.89	5021	6101	2002	0	0	5	0.25
4039	罗本地红	694	5	0.72	10	1.44	5022	73	2380	5	0.21	10	0.42
4040	罗束腰黄	2150	0	0	50	2.33	5023	浙 22	3627	2	0.06	7	0.19
4041	苏 S8	2252	0	0	0	0	5024	574	1381	0	0	10	0.72
4042	西班牙	1149	0	0	5	0.44	5025	227	1340	1	0.07	6	0.45
4043	银桃	259	0	0	0	0	5026	602	2754	0	0	2	0.07
4044	土耳其黄茧	1368	0	0	5	0.37	5027	镇 8	2795	10	0.36	30	1.07
4045	维玛拉	1775	0	0	5	0.28	5028	镇 8 粗	4113	0	0	5	0.12
4046	罗萨	1525	0	0	1	0.07	5029	镇 10	2988	2	0.07	7	0.23
4047	马依拉虎斑	437	1	0.23	6	1.37	5030	镇 2A	2124	0	0	5	0.24
4048	玉无非白	2595	0	0	1	0.04	5031	6304	3615	0	0	0	0
4049	阿斯可利黄	1342	2	0.15	7	0.52	5032	HC311	2810	0	0	0	0
4050	摩洛哥	1226	5	0.41	15	1.22	5033	HC571	2430	0	0	50	2.06
5001	华新	929	0	0	0	0	5034	HC581	1272	0	0	0	0
5002	华一	1485	1	0.07	31	2.09	5035	苏 2	2013	0	0	1	0.05
5003	华五	2120	2	0.09	7	0.33	5036	苏 4	2178	0	0	3	0.14
5004	华六形	1777	1	0.06	6	0.34	5037	苏 8	1843	5	0.27	10	0.54
5005	华七浙吴	1568	0	0	0	0	5038	苏 9	2252	0	0	5	0.22
5006	华八旧苏吴	3199	0	0	0	0	5039	苏 11	1401	0	0	2	0.14
5007	华八新镇	4754	5	0.11	15	0.32	5040	苏 13	2363	0	0	30	1.27
5008	华八大	772	0	0	5	0.65	5041	苏 15	1506	5	0.33	25	1.66
5009	华八三五	2245	0	0	0	0	5042	苏 17	1943	0	0	0	0
5010	中 109	2130	0	0	5	0.23	5043	苏 33	2134	0	0	5	0.23
5011	华九专	4483	2	0.04	52	1.16	5044	苏 35	2267	0	0	5	0.22
5012	华十沪	1156	0	0	0	0	5045	苏 39	1128	0	0	0	0
5013	中 112 新	2928	0	0	1	0.03	5046	苏 42	2903	0	0	10	0.34
5014	中 113	2256	1	0.04	6	0.27	5047	南一	1280	5	0.39	15	1.17

区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率	区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率
5048	镇 13	379	0	0	0	0	5083	795	3020	0	0	5	0.17
5049	镇 14	456	0	0	0	0	5084	799	2109	0	0	2	0.09
5050	苏卵伴	1294	0	0	0	0	5085	821	1904	0	0	0	0
5051	苏卵 6	556	0	0	0	0	5086	823	1497	0	0	0	0
5052	镇 6 改白	98	0	0	0	0	5087	539B	3692	2	0.05	22	0.60
5053	镇 4 改	2046	0	0	1	0.05	5088	东 34	956	1	0.10	3	0.31
5054	镇 16 新	1060	0	0	0	0	5089	825	2075	2	0.10	7	0.34
5055	镇 18 改	2415	2	0.08	7	0.29	5090	8211	1819	1	0.05	2	0.11
5056	镇 12	3102	0	0	0	0	5091	8213	3240	0	0	0	0
5057	宝中长	730	0	0	0	0	5092	797	1079	0	0	0	0
5058	中华 (672)	1699	0	0	0	0	5093	新九	2895	0	0	1	0.03
5059	镇 22	2421	2	0.08	5	0.21	5094	C 8-1-2	2912	20	0.69	50	1.72
5060	14	3405	30	0.88	80	2.35	5096	锦 9	2609	2	0.08	12	0.46
5061	751	1685	1	0.06	1	0.06	5097	中 122	3138	4	0.13	24	0.76
5062	783	882	0	0	0	0	5098	中 124	2193	5	0.23	25	1.14
5063	733	2129	0	0	0	0	5099	东 731	2561	0	0	0	0
5064	引 4	1710	2	0.12	7	0.41	5100	537	1244	0	0	0	0
5065	研白	2211	0	0	5	0.23	5101	新龙	1042	0	0	0	0
5066	龙白	538	0	0	0	0	5102	831	1405	6	0.43	16	1.14
5067	秀月	577	0	0	2	0.35	5103	871 (钟月)	1102	0	0	5	0.45
5068	新合	965	0	0	0	0	5104	793 (苏春)	151	0	0	0	0
5069	秋合	2089	0	0	0	0	5105	827	1773	2	0.11	5	0.28
5071	731	3243	0	0	0	0	5106	829	1473	0	0	1	0.07
5072	731 新	1399	1	0.07	6	0.43	5107	华合	448	0	0	0	0
5073	733 新	1698	0	0	0	0	5108	532.71	1891	5	0.26	25	1.32
5074	735A	1389	0	0	0	0	5109	T 5	767	0	0	2	0.26
5075	755	2091	0	0	0	0	5112	T 19	1876	0	0	0	0
5076	757	1815	0	0	0	0	5113	T 20	2465	0	0	15	0.61
5078	7911	5903	300	5.08	600	10.16	5114	浙农 1 号	1404	0	0	1	0.07
5079	7913	2435	0	0	5	0.21	5115	蚕毛 1	1827	1	0.05	11	0.60
5080	247 广	2607	1	0.04	6	0.23	5116	余杭二化甲	2831	0	0	30	1.06
5081	テグス 3 号	1827	0	0	5	0.27	5117	中 51	3020	0	0	20	0.66
5082	791	2831	5	0.18	15	0.53	5118	中 54	2109	0	0	5	0.24

区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率	区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率
5119	中 64	1904	1	0.05	21	1.10	6009	苏 38	2192	2	0.09	102	4.65
5120	中 66	1497	8	0.53	88	5.88	6010	苏 40	2364	0	0	5	0.21
5121	德清 1	3692	2	0.05	42	1.14	6011	苏 41	2887	1	0.03	6	0.21
5122	德清 2	956	0	0	10	1.05	6012	苏 43	1420	1	0.07	6	0.42
5123	余杭 7	2075	0	0	5	0.24	6013	苏 20.21	1664	0	0	5	0.30
5124	大造	1819	0	0	10	0.55	6014	苏 37.36	124	0	0	0	0
5125	新沂 20	3240	9	0.28	19	0.59	6015	镇 1A	1759	2	0.11	52	2.96
5126	大草	1079	0	0	1	0.09	6016	镇 5	1337	1	0.07	21	1.57
5127	中农廿九	2895	0	0	0	0	6017	镇 11	2264	0	0	20	0.88
5128	平(平和)	2912	0	0	0	0	6018	日 110	2145	0	0	5	0.23
5129	泰	2609	0	0	20	0.77	6019	日 112A	1122	0	0	0	0
5130	202	3138	0	0	20	0.64	6020	赢文浙原	2655	0	0	5	0.19
5131	CB(二)	1851	0	0	0	0	6021	赢号浙	1515	0	0	5	0.33
5132	特大形吴	2561	0	0	5	0.20	6022	日 120A	2494	0	0	0	0
5133	吴原 11	1244	0	0	20	1.61	6023	日 120A	1867	40	2.14	90	4.82
5134	CB1	1042	1	0.10	11	1.06	6024	湘青	2523	0	0	0	0
5135	苏洽	1405	0	0	0	0	6025	春四	1387	0	0	10	0.72
5136	247	1102	0	0	5	0.45	6026	67	1615	0	0	1	0.06
5139	楚雄	151	12	7.95	32	21.19	6027	18	1603	7	0.44	17	1.06
5140	苏 17(黄)	1773	0	0	0	0	6028	赢文形	2413	0	0	10	0.41
5141	8212(灰)	1473	0	0	0	0	6029	日 114	2760	0	0	10	0.36
5142	神农 1	1473	0	0	1	0.07	6030	日 114 永吴	1280	5	0.39	35	2.73
5143	神农 2	448	1	0.22	2	0.45	6031	赢翰新镇	1100	1	0.09	11	1.00
5144	神农 3	1364	10	0.73	210	15.40	6032	日 117 育	1174	2	0.17	7	0.60
5145	神农 5	627	0	0	1	0.16	6033	6711	1162	0	0	0	0
6001	苏 1	1829	2	0.11	22	1.20	6034	JA(二)	1187	15	1.26	115	9.69
6002	苏 3	1416	0	0	5	0.35	6035	JB 浙	1187	0	0	5	0.42
6003	苏 7	1548	0	0	5	0.32	6036	东珠	1480	0	0	5	0.34
6004	苏 10	2428	2	0.08	12	0.49	6037	春珠肥	2153	0	0	50	2.32
6005	苏 14	1617	1	0.06	6	0.37	6038	日 124	2268	5	0.22	20	0.88
6006	苏 16	1689	1	0.06	11	0.65	6039	HJ521	765	150	19.60	200	26.13
6007	苏 32	1417	0	0	0	0	6040	1005B	2642	0	0	1	0.04
6008	苏 34	293	3	1.02	13	4.43	6041	1011A	2577	5	0.19	105	4.07

区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率	区号	品种名	收蚁头数	疏毛蚕数	疏毛率	摄食蚕数	摄食蚕率
6042	501	1234	0	0	10	0.81	6073	603	1844	10	0.54	210	11.39
6043	镇 3 改	1227	0	0	20	1.63	6074	7532A	1267	0	0	0	0
6044	镇 7 改白	941	0	0	1	0.11	6075	828	950	5	0.53	15	1.58
6045	镇 9	815	0	0	5	0.61	6076	8210	773	7	0.91	17	2.20
6046	镇 17 新	1754	0	0	5	0.29	6077	8212	1644	28	1.70	78	4.74
6047	苏卵 7	1303	1	0.08	6	0.46	6078	日 115	1666	2	0.12	22	1.32
6048	春日长	767	8	1.04	28	3.65	6079	72 秋选	2304	40	1.74	90	3.91
6049	春日	2391	7	0.29	57	2.38	6082	绫 7	1459	0	0	0	0
6050	752	717	10	1.39	60	8.37	6083	武 7 苏	1152	0	0	1	0.09
6051	784	624	2	0.32	32	5.13	6084	872 春岭	759	0	0	0	0
6052	734	1725	30	1.74	130	7.54	6085	东肥	751	0	0	5	0.67
6053	丰年	1698	6	0.35	16	0.94	6087	826	871	1	0.11	3	0.34
6054	秋光	692	1	0.14	6	0.87	6089	832	1228	5	0.41	25	2.04
6055	新肥	1272	2	0.16	3	0.24	6091	T8	1361	10	0.73	110	8.08
6056	秋肥	999	120	12.01	320	32.03	6092	明珠	845	0	0	0	0
6057	苏 12	437	0	0	0	0	7001	琼十	2735	0	0	0	0
6058	732	702	5	0.71	35	4.98	7002	四海	1281	0	0	0	0
6059	732 新	1480	1	0.07	21	1.42	7003	武林 1 号	874	0	0	0	0
6060	734 新	1558	7	0.45	27	1.73	7004	三四	2842	0	0	10	0.35
6061	756	965	7	0.73	27	2.80	7005	演金黄白	4826	5	0.10	10	0.21
6063	782	1634	35	2.14	85	5.20	7006	352 白	3225	4	0.12	14	0.43
6064	7912	2423	0	0	1	0.04	7007	兰白	336	0	0	0	0
6065	7914	1662	1	0.06	6	0.36	7008	T2	1226	0	0	0	0
6066	794	2249	2	0.09	32	1.42	7009	T3	795	0	0	0	0
6067	796	1397	13	0.93	53	3.79	7010	兰溪 5	215	0	0	0	0
6068	798	742	0	0	0	0	7011	兰溪 10	2853	0	0	1	0.04
6069	7910	2281	0	0	5	0.22	7012	兰溪 20	2422	0	0	1	0.04
6070	日本 671	112	0	0	1	0.89	7013	迈索尔	6652	1	0.02	6	0.09
6071	822	1077	0	0	1	0.09	7014	海南绵茧	2780	0	0	5	0.18
6072	824	1291	2	0.15	52	4.03							

附录 2-家蚕品种资源指纹图谱
Appendix 2-The fingerprint of silkworm race

标记名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
FL1118	218	224	224	224	224	224	226	224	218	224	294	294	224	232	226	224	228	294	226	228	224	224	218	224
	224	228	294	228	228	296	232	294	224	296			232		232	232	232		232		294	228	224	
FL1152	278	278	314	278	278	272	278	240	314	242	278	316	278	278	278	314	314	314	314	314	278	278	278	278
						316				278				316							314			
FL0554	326	330	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	330
	330																					330		
FL0910	326	244	246	244	244	236	244	246	0	236	236	236	246	236	236	246	236	246	246	236	0	236	246	244
	244									244									258					
FL1010	224	224	224	222	222	224	224	230	226	224	224	224	224	224	224	224	228	224	224	230	226	226	236	236
	236	238	242	234	238				234							234				238	234	236		
FL0547	292	290	300	300	300	300	300	300	292	290	300	300	300	300	288	300	300	300	300	288	300	290	322	288
FL0407	244	224	220	224	220	222	224	224	220	220	224	222	246	230	248	244	300	222	248	244	222	220	220	246
				246																	246			
FL0546	266	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268
FL0566	330	332	326	332	334	326	326	332	332	334	326	326	326	332	332	326	326	326	332	326	326	326	332	326
	338					332					332	334												
FL0908	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182
FL0562	260	260	260	260	258	260	260	260	260	260	260	258	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260
FL0541	346	382	0	328	382	332	0	0	382	0	0	0	0	0	0	0	0	0	326	326	354	344	346	344
FL0364	192	184	190	186	206	210	202	186	202	210	210	202	190	210	212	210	202	204	192	184	184	184	188	288
	210		210	206				210					208						210	202	204	204	204	304
FL0540	266	270	264	270	264	264	272	266	270	264	270	288	270	270	268	270	270	270	264	270	268	272	270	358
	280	286	278	286	278	276	290	282	288	276	284	272	286	286	284	286	288	288	278	290	286	288	286	372
FL1115	216	218	218	216	218	218	218	218	216	218	218	218	216	218	216	218	218	218	218	218	218	218	218	218
FL0539	286	272	272	272	286	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272
		290	286	286		286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286
				290																				
FL0560	324	338	348	338	338	350	350	0	0	350	350	350	324	0	350	340	0	348	350	0	350	324	0	340
FL0317	180	180	180	180	180	180	166	180	180	180	180	180	166	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
				188			180						180	188				188						
FL0308	144	144	140	142	142	140	158	140	138	138	140	138	138	138	138	138	136	138	138	138	138	156	138	158
	160	162		162	154	160					158		158	158			158			156			156	

FL0354	178	176	176	178	178	178	174	172	178	172	172	176	172	176	174	176	178	176	178	176	174	176	178	178	
	184					184	182		184		180		180								178	182	184		
FL0359	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	246	250	
																							250		
FL1001	118	118	118	116	116	116	116	116	116	128	118	118	118	116	116	132	116	120	118	120	120	120	118	118	
FL1125	190	188	188	188	188	188	187	188	188	200	250	188	188	188	188	200	188	200	200	200	194	200	200	200	
	238	232	232	232		232	188					232	232	232	232	236	232		250	250		250	250	250	
													238												
FL1007	156	158	162	158	154	154	156	0	160	156	154	156	154	152	152	152	164	156	162	154	154	154	162	154	
		164		166	161	162					162		160			158				162	160	162	170	160	
FL0925	208	210	208	210	206	206	204	208	204	208	204	208	204	202	204	202	224	210	224	208	204	208	224	206	
FL1150	0	306	306	0	308	308	0	308	300	310	312	0	310	308	308	0	0	306	0	300	310	318	0	310	
													312												
FL1031	256	254	262	254	254	262	254	264	270	262	262	268	254	254	268	254	256	262	262	254	262	262	262	255	
	264				262								262	262		262	264								
FL1110	208	208	204	206	208	202	200	202	208	208	208	208	208	208	200	202	208	206	200	206	200	202	208	0	
						208	208	208							208	208			206		206	206			
FL1114	142	142	142	142	142	144	142	142	142	142	142	142	146	142	142	144	142	148	148	142	142	142	142	148	
	148	148	148	148	148	150	148	148	148	148	148	148	154	148	148	150	148			148	148	148	148		
FL0538	266	256	256	254	256	256	254	256	254	256	254	256	266	256	256	256	268	266	266	256	256	256	254	256	
	272	280	266	280	268	266	266	266	266	266	266	266	272	266	266	266	272	272	272	266	268	266	266	266	
				286	272	272	272	272	272	272	272	272		272	272	272				272		272		272	
FL1113	210	206	200	210	210	210	210	210	201	200	210	200	210	210	256	258	200	256	256	120	200	200	210	210	
		210	256					258	256			256	256	256						258	210	208			
FL0536	278	260	280	262	264	262	264	264	278	264	282	278	276	276	278	282	278	278	282	282	262	280	280	280	
		278		280	282	280	282	280		282											280				
FL1162	300	300	300	304	306	300	306	306	0	306	306	300	300	300	300	306	300	300	306	306	300	304	300	302	
		302				304						304					304	304			304				
FL1157	316	320	316	318	314	316	318	316	316	0	318	320	316	320	314	0	316	320	314	320	314	318	316	316	
												326													
FL1127	250	246	246	250	254	252	246	246	252	252	252	252	252	255	250	252	246	252	250	246	252	246	246	254	
	254	254	254				254	254							254		256		254	254		254	254		
FL0601	226	232	250	232	250	226	250	234	250	250	250	236	224	234	224	226	234	234	234	238	250	234	226	234	
	238	250		236		238		250							236	250		238	250	250	250		250	238	250
						268															252				

FL1120	274	284	188	300	284	192	200	190	272	272	272	200	272	200	200	272	272	0	200	200	0	300	300	300
	288	300	288			284	300	272			284			300	300				300					
FL0545	274	300	274	288	300	274	288	272	278	278	276	274	278	286	288	274	272	274	288	274	274	288	290	290
				294																				
FL0565	334	332	332	332	332	334	332	334	334	334	0	334	334	332	332	334	334	334	332	334	334	332	332	332
FL1119	216	206	210	224	210	216	216	216	214	216	210	216	216	216	216	214	216	214	210	216	214	216	216	214
	224	216	216		216	224		222	222		216		224		222		224		214			222	224	
FL0931	178	178	178	188	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178
				200	184																			
FL0564	342	358	358	342	340	342	242	356	358	358	358	358	358	350	340	350	342	358	358	340	334	342	340	334
	358			358	358	358	358								356		358			356	358	356	358	358
FL1116	226	120	120	120	120	120	120	120	120	120	118	120	120	120	120	226	120	120	120	226	120	120	118	226
	252	226	228	228	228	230	228	228	228	228	228	228	226	228	226	250	228	228	228	252	226	226	226	252
		252	250	250	252	252	250	252	252	252	252	252	250	250	250		252	252	252		252	252	252	

标记名	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
FL1118	224	224	222	220	224	212	218	224	218	224	224	224	294	294	222	228	228	224	224	224	294	224	224	224
	294		228	294	294	224	224	294	224	228		228			228	232	232	294	294	294			294	294
						294											294							
FL1152	314	278	314	314	314	314	278	314	242	314	314	314	314	314	278	316	278	314	314	314	278	274	278	314
																	314				314	314		
FL0554	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	330	326	326	326	326	325	330	326	326	330
		330																						330
FL0910	246	236	236	326	0	246	0	0	246	236	244	236	244	244	244	244	236	246	0	246	236	236	244	246
		244										244				256								
FL1010	250	234	224	226	226	244	226	224	224	224	228	224	224	226	226	224	224	226	226	224	264	224	262	226
	260						234	234		234	238			242	234	236			236	234	274	244		
FL0547	320	290	300	292	292	290	292	292	300	300	300	300	292	290	292	290	290	290	290	290	320	290	320	286
																						324		
FL0407	224	224	220	222	248	220	220	220	244	244	326	220	220	220	226	224	220	220	220	246	220	0	220	224
	248	248		246			224									246		244						
							244																	
FL0546	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268
FL0566	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	332	326	326	326	342	326	326	326	326
FL0908	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182

										220						220						220		
FL0562	258	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	258	260	260	260	258	260	0	260	260
FL0541	354	344	0	0	0	0	0	0	0	256	354	0	0	354	254	354	326	354	354	354	356	354	356	256
FL0364	210	190	212	228	204	314	210	210	210	190	212	190	210	206	200	192	210	210	210	208	190	210	208	192
		208								210		208				210					210			
FL0540	272	270	266	300	272	274	266	266	270	268	268	272	272	270	270	270	272	270	272	270	272	270	268	270
	280	288	280	318	290	290	280	278	286	286	258	290	290	286	284	286	288	286	286	288	288	288	286	286
FL1115	216	216	216	218	216	218	218	218	218	218	216	218	216	216	218	218	218	216	218	216	216	218	218	
FL0539	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272
	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	290	290	286	286	286	286	286	286	286	286
FL0560	338	338	350	348	350	324	324	340	0	324	348	350	0	0	338	338	0	350	350	350	0	324	350	324
FL0317	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	166	180
FL0308	158	138	138	138	136	138	140	140	142	140	140	140	140	140	138	140	136	140	140	154	140	138	140	138
		158	158		158	156	158	158		158	158	158			158	158	154		158		158	156		158
					278																			
FL0354	184	174	178	176	178	176	178	176	178	174	178	174	172	172	178	176	170	174	170	174	172	178	180	176
			184			184	184	184	184	180	184	180		174	184		176	180	176		180	184	184	182
																	182							
FL0359	250	250	250	250	250	250	250	250	0	242	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	244	244
										250													250	250
FL1001	118	92	118	120	120	118	120	120	118	116	116	130	116	116	116	118	90	92	140	144	92	116	92	94
FL1125	192	150	200	200	200	200	200	250	250	186	232	200	186	188	232	188	150	156	200	250	150	188	200	156
			250	250	250	250	250							232	238	232	186				200	232		
																238	190					246		
FL1007	172	154	162	156	154	154	164	152	154	166	152	156	156	164	162	156	160	162	154	156	156	158	164	162
		160	170		160	160	172			174			162			163	168					164		
FL0925	224	206	224	210	200	202	224	200	206	226	206	208	206	208	206	208	200	202	200	208	206	208	204	208
FL1150	0	0	0	0	300	310	300	300	0	0	0	312	314	316	314	312	0	0	0	0	306	310	300	316
																					312			
FL1031	255	254	262	262	254	262	254	254	254	254	0	254	262	262	254	254	254	254	254	254	264	254	268	254
					262	268	262	262		270		262				262	262				270			262
FL1110	206	202	200	208	200	202	200	208	200	206	200	206	206	196	300	202	200	208	206	208	208	208	200	208
		208	208		208	206	208		208		206			202	208	208	208						208	
FL1114	142	142	142	144	142	142	142	144	142	142	142	144	142	142	144	142	142	142	142	142	142	142	142	142

	148	148	148	150	148	148	148	150	148	148	148	150	148	148	150	148	148	148	148	148	148	148	148	
FL0538	256	256	250	256	256	256	254	266	256	252	254	256	256	256	256	266	256	268	256	256	268	268	254	256
	268	268	266	266	268	266	266	272	268	266	268	266	268	266	268	272	268	272	268	266	272	272	268	266
	272	272	272	272	272		270		272	272	272	272	272			272		272				272	272	
FL1113	256	200	200	200	210	210	210	210	214	200	210	200	210	256	200	210	200	256	256	256	256	210	210	256
		210				256		256		210	256	210			210		210						256	
												256												
FL0536	278	280	280	280	278	280	282	278	278	278	276	280	280	278	282	278	280	278	280	280	280	280	278	264
																								282
FL1162	300	302	300	300	300	300	304	302	300	300	300	300	300	300	304	300	300	300	300	300	300	304	300	304
			304	304		304			302	302			304	304			302	304						
FL1157	318	0	316	320	314	312	316	318	318	318	318	0	318	320	318	316	314	314	320	320	310	320	214	318
						318															316			
FL1127	244	250	246	252	252	246	246	246	246	252	246	252	252	250	246	254	254	0	258	250	252	252	254	252
	254	254	254			254	254	254	254		254			254										
FL0601	226	226	234	234	224	234	234	250	250	224	226	226	234	226	226	226	234	250	234	226	226	236	250	250
			250	250	238	250	246			238	238	238	250	238	238	238	250		250	238				
							250																	
FL1120	300	300	0	300	200	284	272	0	272	200	200	300	0	272	200	200	200	300	284	0	200	200	0	200
					272	300									284		300		300		300	300		300
FL0545	288	288	276	288	276	0	272	276	278	278	274	288	274	280	276	276	286	288	292	278	286	288	280	290
FL0565	332	332	334	332	334	332	334	334	334	334	334	332	334	334	334	334	332	333	332	334	332	332	334	332
FL1119	214	350	216	216	216	216	216	214	210	224	216	214	216	214	222	216	216	215	214	222	216	216	230	222
				222	226		224	222	216	230	222	222	224	224		222	224	223	222		222	222		
FL0931	178	178	178	178	178	178	180	178	178	192	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	200	178
										200					184	184								
FL0564	342	214	358	356	340	340	342	340	358	340	350	356	358	356	356	356	358	358	358	356	340	240	336	356
	358				358	356	358	356		356											356	358		
FL1116	120	226	118	120	228	228	120	120	228	118	118	228	228	120	120	236	110	228	120	120	228	228	120	120
	226	252	224	226	250	252	226	228	252	228	226	252	252	238	226	262	228	251	228	236	252	250	250	232
	252		250	252			252	252			250				262	252		252		250	262			252

标记名	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
FL1118	228	228	212	228	224	228	224	228	218	294	224	294	224	294	294	228	294	224	228	232	222	232	0	224

			294	294	294		232		224		294					294		294				228			232
							294		232													294			294
FL1152	278	278	314	316	278	242	278	314	278	314	242	278	314	315	256	316	242	314	278	240	242	316	314	242	
	322	314			314				316		278				314		278					278			
FL0554	330	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	330	325	326	326	326	326	326	326	326	326	326	326	
																							330		
FL0910	244	236	244	244	244	246	0	236	236	244	244	246	246	245	244	236	244	246	244	246	246	244	272	246	
		244														244									
FL1010	224	226	224	228	224	224	228	234	242	224	228	226	226	225	226	226	228	226	224	224	226	224	226	226	
		236	242																						
FL0547	300	292	290	302	300	292	300	292	320	290	300	290	288	289	290	288	300	300	300	292	288	292	300	292	
FL0407	244	246	244	220	244	230	220	0	246	220	220	0	224	221	222	230	222	220	230	224	222	224	0	230	
										230	236								230	244	230				
FL0546	268	268	268	268	268	268	268	0	268	268	268	268	268	268	268	268	268	266	268	268	268	268	268	268	
FL0566	0	326	342	326	326	324	326	0	342	326	326	326	326	326	326	0	326	326	324	326	326	332	326	326	
																				330	332				
FL0908	182	182	182	182	182	180	182	182	182	182	182	182	182	180	182	182	182	182	182	180	180	182	182	180	
					236	236	236			236															
FL0562	260	260	258	258	260	258	258	260	260	258	260	0	258	259	258	258	260	258	258	258	260	260	260	258	
FL0541	328	340	0	354	0	354	354	344	354	354	354	354	354	355	354	0	354	354	344	354	356	356	370	354	
	382																								
FL0364	190	204	210	184	210	178	210	210	192	210	210	208	192	210	210	210	210	210	210	210	208	212	206	204	
				204						210															
FL0540	288	272	272	272	266	270	268	264	272	264	272	272	266	269	268	270	270	268	270	264	270	264	272	270	
	298	290	288	288	280	288	284	278	288	278	288	288	280	286	286	286	286	286	286	278	284	278	288	286	
FL1115	218	216	216	216	216	216	216	218	218	218	216	216	216	217	216	216	216	216	218	216	216	216	216	218	
FL0539	286	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	286	272	270	270	272	272	272	272	272	272	272	272	
	290	286	290	286	286	286	288	286	286	286	286	290		286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	286	
																								288	
FL0560	324	350	350	338	350	350	350	338	324	324	350	350	324	325	250	324	324	324	0	350	324	338	324	350	
				348						340															
FL0317	180	180	180	180	180	180	178	168	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	
																								188	
FL0308	158	140	136	138	140	140	136	140	140	140	138	140	142	141	140	136	140	140	140	140	140	136	140	140	

		146							158	158			160		160			158	146	158				158
FL0354	172	178	172	178	170	184	172	176	176	178	176	176	176	178	224	178	184	175	170	178	172	178	176	176
					176		178		184	184	184		184		230	182		184	176		178		182	182
																			182		184			
FL0359	250	246	250	244	250	250	250	250	250	250	250	244	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
		250		250							250													
FL1001	92	116	114	92	90	92	90	118	116	116	92	94	92	94	114	116	92	92	92	94	138	92	92	92
FL1125	200	188	0	156	158	150	154	200	200	182	150	156	158	153	186	184	150	150	158	200	200	156	150	200
		132		200	200		200	250	250			200	200	200	230	232		186	200			200		
		244																						
FL1007	154	160	0	158	160	162	154	156	154	156	160	154	154	154	0	162	154	156	154	154	152	154	162	162
					166		160	164	160	162		162	160	161			160	162	160	162	160			
FL0925	206	204	200	204	212	208	206	206	206	208	204	208	204	202	204	208	204	208	204	208	204	202	206	208
FL1150	0	0	0	0	314	314	320	300	0	0	314	0	314	300	314	312	0	314	0	310	312	300	314	312
FL1031	254	262	254	254	262	264	262	254	256	262	254	262	254	255	262	262	262	262	254	254	262	262	262	254
				262					264		262		260	262	268						270			262
FL1110	208	206	200	208	208	208	206	208	208	208	155	206	206	207	206	202	208	208	206	208	208	208	208	208
			208																					
FL1114	142	142	142	142	142	144	144	144	142	142	142	144	142	143	142	142	142	144	142	144	142	144	142	144
	148	148	148	148	148	150	150	150	148	148	150	150	148	150	148	148	150	150	148	150	148	150	148	150
FL0538	268	266	268	266	256	256	256	256	256	254	254	256	268	256	256	266	256	254	254	254	254	268	268	256
	272	272	272	272	268	268	268	268	268	268	268	266		267		272	268	268	268	268	268	268	272	272
					272	272		272	272	272		272		273			272	272			272			272
FL1113	210	210	210	210	256	256	200	210	210	210	256	256	210	256	202	212	202	200	210	200	200	200	200	200
		256	256				210	256		256			256		256	256	256	210		210	256	256	210	256
							256										256		256				256	
FL0536	278	278	280	280	276	276	280	278	278	278	278	278	278	279	280	280	280	280	280	280	278	280	280	280
																					304			
FL1162	300	300	300	300	300	300	304	300	300	300	300	300	302	300	300	304	300	300	300	300	300	300	300	300
		304	304									304						302	302					304
FL1157	320	316	314	314	320	320	318	314	314	320	320	318	318	320	318	318	318	320	0	320	318	0	0	318
FL1127	0	252	0	252	252	252	252	0	254	0	252	252	246	250	252	252	252	254	254	246	252	252	258	250
													254							252				
FL0601	250	250	250	234	250	250	250	234	238	250	238	250	226	250	226	250	250	250	238	234	250	226	250	250
				250				250	250				238		238					250				

FL1120	288	200	284	200	272	300	284	284	284	284	300	272	300	300	300	284	284	300	200	192	300	200	286	300
		272	300	300	284		300		300	300		284				300	300			300		284		
FL0545	272	274	292	288	276	290	288	276	286	284	288	272	292	293	290	292	284	284	278	290	288	274	0	288
																	292				292			
FL0565	334	334	332	332	334	332	332	0	332	332	0	332	332	333	332	332	332	332	332	332	332	334	0	0
FL1119	216	216	216	216	210	222	216	216	208	216	222	216	214	223	214	216	216	214	216	216	214	230	214	216
	226	226		222	216					214	224		222	222		222		224	222	224		222		222
FL0931	184	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	178	192	0	178
		184				184															184		200	
FL0564	356	358	336	336	358	356	356	340	340	240	350	358	356	341	342	358	358	358	350	350	350	358	358	358
			358	356				358	358	358				358	358				368	368				
FL1116	226	120	228	228	228	144	228	160	112	228	228	228	228	120	118	228	238	226	120	120	118	120	236	226
	252	228	252	234	234	228	250	226	226	252	252	234	252	238	228	250	262	250	226	228	238	230	262	252
		250		252	252	250		252	250			252		262	252				252	252	262	252		

标记名	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
FL1118	294	294	294	224	294	224	224	228	212	228	222	224	228	228	224	224	232	0	224	212	218	222	228	224
				228		294	294	294	294	294	228	294	294		294	294	294		294	224	224	294	294	294
				294							294									294	294		300	
FL1152	278	278	314	278	314	314	314	242	314	278	314	0	242	314	314	278	314	278	314	242	278	272	278	240
				314							314			314			322					314	320	
FL0554	326	326	326	326	326	326	326	326	326	330	326	326	326	326	326	326	326	330	326	326	330	326	326	326
FL0910	246	246	244	236	236	246	244	244	236	244	244	244	244	246	236	244	236	236	244	0	244	246	236	236
					244							258					244							
FL1010	224	226	225	226	224	224	224	226	224	226	224	224	226	224	224	224	224	226	224	230	224	224	222	224
	234			234	234						230		242			234	234	236	234		234			
											234													
FL0547	288	290	290	290	300	292	300	288	300	290	300	290	288	292	288	288	292	288	288	290	290	290	300	290
FL0407	220	224	224	0	220	220	220	220	222	244	220	230	220	222	222	246	220	220	220	220	206	220	224	222
	246		236		236								230		246			246	224		220	230	244	230
					244																236	244		
FL0546	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268	268
FL0566	326	324	324	0	326	326	326	326	326	324	326	324	326	324	326	332	326	326	324	324	326	324	326	326
										332					330						330			
FL0908	182	182	182	180	182	180	182	182	182	180	180	182	182	180	182	182	180	182	182	182	180	182	182	182

FL0562	260	260	260	260	258	260	0	258	260	260	258	260	260	260	260	258	260	260	258	260	260	258	258	258
FL0541	344	0	354	354	338	354	0	0	338	344	338	354	354	0	344	344	358	0	354	344	354	354	354	0
FL0364	192	208	210	184	192	210	208	210	186	184	188	210	210	210	190	190	190	190	192	210	206	210	208	210
	210			204	210				210	204	210				208	210	208	210				210	222	
FL0540	272	272	286	270	268	264	272	268	270	270	270	270	264	270	270	270	270	268	264	270	288	270	266	286
	288	288		288	286	280	290	286	272	272	286	288	278	288	286	286	288	286	276	288		288	282	
FL1115	216	216	218	218	216	216	218	218	216	216	218	218	216	218	216	218	218	218	216	216	216	216	216	216
FL0539	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	272	270
	286	286	286	286	286	286	286	286	286	290	286	286	286	286	286	286	286	286	290	288	286	286	286	284
FL0560	0	324	324	338	338	324	350	0	0	340	350	324	348	324	324	0	0	350	338	348	324	324	324	320
															342									350
FL0317	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	0	180	180	180	180	180	180	180	180
FL0308	140	140	140	140	142	140	140	140	142	142	136	140	142	142	142	142	142	142	142	142	144	136	136	136
	158	158	160	158						160	154					160		154					152	
FL0354	182	178	176	0	170	170	170	178	176	176	170	178	176	178	170	178	180	178	172	174	176	178	176	178
		184	184		176	176	176	184			176		184	184	176	184	186	184	176	178			182	184
					182	182				182					182				183	184				
FL0359	250	144	250	250	250	244	250	250	250	250	244	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
		250				250					250													
FL1001	90	116	116	116	116	116	116	114	116	116	118	118	116	116	114	118	116	116	116	116	116	118	120	132
FL1125	158	186	186	186	182	184	188	180	180	190	200	200	186	182	200	200	188	188	190	188	190	200	200	200
	200	228		232	224				224	236	250		232		250	244	238	232	238			250	250	
					236					250						250		238						
FL1007	0	0	162	154	154	0	160	162	154	0	160	164	162	156	0	156	156	154	154	162	160	156	154	156
				162	162				160					164		162	162		162			164	162	164
FL0925	206	210	0	208	204	208	0	208	206	208	204	210	206	208	206	208	206	208	206	208	206	208	206	210
FL1150	0	0	0	0	312	312	312	312	0	312	312	308	312	312	0	308	0	0	0	308	300	0	0	308
FL1031	254	254	262	254	262	262	254	262	254	254	264	254	254	262	254	254	262	262	254	254	254	254	262	262
	262	262		262	268		262		262	262		262	162						262				268	
		268																						
FL1110	202	206	206	208	206	208	206	168	172	208	172	206	206	206	202	0	208	204	206	208	206	206	200	194
	206							206	208		214				206								206	
FL1114	148	142	142	144	142	144	142	142	142	144	144	142	142	144	142	144	144	142	144	142	144	144	148	144
		148	148	150	148	150	148	148	148	150	150	148	148	150	148	150	150	148	150	148	150	150		150
FL0538	256	256	256	256	254	254	256	254	256	256	250	256	254	256	268	282	256	282	254	254	254	254	250	252

	268	266	268	266	268	268	268	268	268	266	254	282	268	282	272	288	266	286	276	282	266	264		286
	272	272	272		272				272	272		286		288						286		282		
FL1113	212	200	210	200	200	200	200	256	210	200	202	202	200	256	200	202	202	210	210	200	200	200	178	254
		256	256	210	210		256		256	256		212	256		210	210	212			210		208		
				256	256										256									
FL0536	276	278	280	278	278	280	278	276	276	276	276	276	278	278	276	276	278	276	278	278	280	280	250	278
													302		300									
FL1162	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	302	300	300	300	300	300	300	300	300	300	280	300
		304	304	304		304																304		
FL1157	0	314	318	318	318	320	318	318	314	318	318	320	318	320	314	316	320	316	318	320	314	318	318	318
									318															
FL1127	0	246	246	252	252	252	252	0	252	250	252	252	252	252	254	256	0	246	246	250	252	252	252	252
		254	254							256								254	254					
FL0601	226	250	250	238	224	250	250	250	226	226	250	250	250	250	226	234	234	226	226	226	234	250	250	250
	238			250	236				238	238					238	244	250	234		232	250	254	254	
				254												250		250		268				
FL1120	300	200	272	272	300	284	300	282	272	300	200	200	284	284	300	280	192	200	272	200	194	284	192	300
		284		284		300		300	284		300	284	300	300			294	282		272	278	300	284	
		300															300	300			290		300	
FL0545	288	290	272	276	288	292	294	292	278	292	292	278	294	284	288	274	294	292	272	280	278	300	292	292
	300		276												300		300	300					300	300
FL0565	332	332	334	334	332	332	332	332	334	332	332	334	332	332	332	334	332	332	334	334	334	332	332	0
FL1119	214	216	214	214	216	222	222	224	216	214	216	222	214	214	214	216	216	216	224	224	216	216	214	214
		224		222	224						224		222	222	222	224	222				222		222	222
FL0931	178	178	178	178	178	178	176	178	178	178	178	266	178	178	178	178	178	180	190	178	178	178	178	178
											184									200				
FL0564	356	358	358	340	342	358	340	350	340	342	342	358	358	340	358	342	358	358	358	358	358	358	336	340
				358	358		358		358	350	358			358		358							358	356
FL1116	120	120	118	118	228	238	120	120	118	226	120	228	228	238	118	120	120	120	226	120	120	226	118	120
	226	238	228	226	252	262	228	228	228		238	252	252	262	226	226	228	226	252	226	228	252	228	238
	252	262		252			252	252	252		262				252	252	252	252		252	252		250	262

致 谢

本文是在导师徐安英研究员和张国政研究员的悉心指导下完成的。从论文的选题设计、材料选取、结果分析到文稿撰写、修改等都得到了老师的指导和帮助，倾注了老师巨大的心血和汗水，特此致谢。四年来，老师在工作上对我严格要求，及时帮我解决实验中出现的困难和问题，并提供了宽松的学习环境，使我能够顺利完成论文中的实验内容。老师严谨的治学态度，坦诚的待人原则，求实创新的精神深深地影响着我，使我受益匪浅。我将努力工作，多出成绩，以谢恩师。

本所李木旺博士、孙平江副研究员、钱荷英硕士、韦亚东博士、侯成香硕士对本文的实验设计、材料选配等方面给予了极大的帮助，并且共同完成了部分实验内容，使本文能够顺利完成，在此表示衷心的感谢。在我学习和实验期间同时得到了赵卫国博士、窦永群助理研究员和任永利助理研究员的帮助，在此一并表示感谢。

本所人工饲料组王福琴、资源组陈兰萍和张福英、激素组赵小萱在我做实验期间分担了部分工作任务，在此一并感谢。

中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所黄勇平研究员和苗雪霞副研究员对本文的指纹图谱构建实验给予了大力支持和无私帮助；另外该所昆虫功能基因组研究组的郭秋红、相辉博士、司科老师在实验过程中大力相助，在此特向各位表示衷心的感谢。

感谢我的爱人吴志英和我的儿子对我生活的关心，以及对我工作的支持和帮助，使我顺利完成学业。最后，再次向所有指导、关心、帮助、和支持我的老师、同学、亲友致以最真诚的感谢！

张月华

2005年11月1日

作者简历

姓名	张月华	性别	男	籍贯	山西忻州
出生年月	1967年6月	身份证号	330106670609005	民族	汉
政治面貌		专业技术职称	助理研究员	工作年限	15年
学历	大学本科	工作单位	中国农科院蚕业研究所		
工作单位通讯地址	江苏镇江四摆渡蚕研所 212018				

个人简历:

张月华, 男, 1989年毕业于浙江丝绸工学院丝绸工程专业, 获工学学士学位, 同年分配到中国农业科学院蚕业研究所茧丝研究室工作, 先后从事家蚕品种选育的茧丝质鉴定和家蚕品种资源保存与评价利用工作。1995年11月被聘任为助理研究员。2001年9月至2002年7月在中国农业科学院研究生院进行同等学历攻读硕士学位研究生基础课学校, 并取得应修学分。2004年在中国科学院上海植物所从事家蚕种质资源指纹图谱的实验研究工作。在工作期间, 主持中国农业科学院科技产业发展基金项目等1项; 先后参加了国家茧丝绸发展风险基金项目蚕种质资源库的研究1项; 参加了2000—2005年度科技部基础性工作专项基金项目; 参加了国家“863”高技术研究发展计划项目蚕桑高效育种技术及优质、高产、特用蚕品种培育1项; 参加了中国农业科学院“九五”重点课题家蚕种质的创新与特色品种的选育1项; 参加了国家“863”高技术研究发展计划项目蚕桑高效育种技术及优质、高产、特用蚕品种培育1项。

在攻读研究生学位期间, 共发表论文19篇, 其中第一作者10篇。

1. 张月华, 姚勤, 侯成香. 家蚕保存品种主要性状的统计分析. 蚕学通讯, 2001, 21(3): 5-9.
2. 张月华, 徐安英, 韦亚东, 等. 家蚕种质资源对无桑人工饲料的摄食性调查, 蚕业科学, 2002, 28(4): 333-336.
3. 张月华. 簇中环境及收烘茧对蚕茧质量的影响, 蚕丝科技, 2002, 9-10.
4. 张月华, 冯乃军. 蓖麻蚕的饲养及利用开发. 北方蚕业, 2003, 24(3): 51-52
5. 张月华. 家蚕有色茧品种茧丝性状调查. 蚕桑茶叶通讯, 2003, 114(4): 1-2
6. 张月华, 徐安英. 蚕丝纤维超微结构的研究. 国外丝绸, 2003, 6: 1-2
7. 张月华, 徐安英. 蓖麻蚕品种饲育成绩的调查. 云南蚕桑通讯, 2003, 99(3): 6-9
8. 张月华, 徐安英, 李木旺, 等. 家蚕品种资源数据库的构建. 蚕业科学, 2004, 30(3): 296-299
9. 张月华, 徐安英, 李木旺, 等. 家蚕品种茧丝强伸力差异及相关分析. 中国蚕学会第七届二次理事会暨学术年会. 2005, 131-135
10. 张月华, 李木旺, 钱荷英, 等. 用微卫星序列构建家蚕品种资源指纹图谱. 中国蚕学会第七届二次理事会暨学术年会. 2005, 143-147