

家蚕化学诱变剂及诱导突变体的筛选

林 英, 陈冬妹, 代方银, 杨 瑜, 向仲怀, 夏庆友*

(西南大学蚕学与生物技术学院, 农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400716)

摘要: 在家蚕 *Bombyx mori* 基因组计划完成之后, 其功能基因组研究成为该领域的最重要课题。突变体是功能基因组学研究的重要材料, 因此, 通过人为诱导获取大量的突变系统是及其重要的手段。本研究用化学诱变剂 ENU、MNU、DES、5-BU、EMS 诱导处理家蚕标准品种 C108, 筛选获得了非滞育红卵、长圆筒茧、小茧、丝胶茧及绵茧突变体, 致死突变体及无鳞毛蛾翅突变体。结果还表明: MNU、DES 诱变家蚕的突变效率高, 注射翅原基比腹部更方便且效果好, 化学诱导雄体比雌体的效果好; 在时期上, 注射蛹和蛾都有诱导效果。上述突变体大多为致死性突变, 推测其可能与致死性基因突变有关。同时, 本研究为应用 TILLING 技术鉴定家蚕更多目的基因突变体提供了有效的材料。

关键词: 家蚕; 化学诱变剂; 突变体; 筛选; TILLING 技术

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)05-0435-06

Screening chemical mutagens and their induced mutants in silkworm, *Bombyx mori*

LIN Ying, CHEN Dong-Mei, DAI Fang-Yin, YANG Yu, XIANG Zhong-Huai, XIA Qing-You* (The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, College of Sericulture and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The functional genomics of silkworm, *Bombyx mori* has become the research hotspot after the genomic project of the silkworm was successfully completed. Since mutants may play important roles in functional genomics research, obtaining a large of mutant strains with manually induced mutations is a very important strategy. Some mutants such as non-diapausing red eggs, long tube-shaped cocoons, small cocoons, sericin cocoons, flossy cocoons, lethal mutants and no adult wing hairs mutants were screened and obtained in this study via inducing standard strain of silkworm C108 with chemical mutagens including ENU, MNU, DES, 5-BU and EMS. We found that MNU and DES were more efficient than other mutagens. Injecting wing disc of silkworm was more convenient and effective method than injecting abdomen. Mutations could be more efficiently induced by chemical mutagens in male than in female. Injecting pupa and adult were both feasible. Most of the mutants mentioned above were lethal mutations, which may be associated with lethal genes. This study also provided effective materials for screening more mutants of the target genes in silkworm by TILLING technology.

Key words: *Bombyx mori*; chemical mutagen; mutant; screening; TILLING technology

随着果蝇、小鼠、斑马鱼等模式动物全基因组测序的相继完成, 功能基因组研究成为基因组发展的趋势和热点, 而功能基因组研究需要大量的突变资源作为支撑。在果蝇、斑马鱼、拟南芥等主要模式生物中, 通过人为诱导获取大量的突变系统受到了高

度重视。到目前为止, 人们已经获得果蝇、斑马鱼等模式动物的突变资源数千种 (Winkler *et al.*, 2005; Dahm and Geisler, 2006), 其中甲基磺酸乙酯 (EMS) 化学诱导获得的果蝇突变基因就多达 3 323 份 (Winkler *et al.*, 2005)。家蚕作为鳞翅目的模式昆

基金项目: 国家“973”计划(2005CB121000); 国际科技合作重点项目(2005DFA30180); 国家教育部博士点基金(20040625011)

作者简介: 林英, 女, 1972年生, 重庆人, 博士研究生, 研究方向为家蚕生化与分子生物学, E-mail: ylin@swu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 023-68250099; E-mail: xiaqy@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-09-25; 接受日期 Accepted: 2007-04-17

虫,其全基因组测序已成功完成(Xia *et al.*, 2004),其功能基因组研究工作也已启动,建立足够规模的突变体资源也将成为家蚕功能基因组研究中最重要的工作之一。

目前全世界保存的家蚕突变体约 600 多个系统数(鲁成 2003),这些突变资源中的大多数是收集的自然突变资源,很少部分是通过人工诱导突变筛选所获得。例如通过物理方法获得突变系统,如用 X 射线、 γ 射线诱导出斑纹限性系统、卵色限性系统、黄茧限性系统、性连锁平衡致死系统、蚁蚕色限性系统、无选择食性突变蚕(*Np*)和广食性蚕(*Bt*)等。而广部和村地等人通过化学诱变剂诱导得到的突变体有多倍体、缺失型突变蚕;1962 年田岛和小林用 0.018~0.84 μg 的 5-溴去氧尿核苷和 0.2~0.76 μg 的 5-溴-尿嘧啶(5-BU)给蚕添食,得到了多数 *od* 斑油突变;以甲基磺酸甲酯(MMS)、EMS 和丝裂霉素 C 等诱变剂注射蛹体,诱发了显性致死突变(向仲怀,1994);用硫酸二乙酯(DES)和甲基亚硝基脲(MNU)处理后分别获得了 *vit*(白妙卵)(Fujikawa *et al.*, 1996)、*re*¹(红色死卵)(Kerimova, 1977)、*Set*(长胴蚕)(Kawaguchi *et al.*, 1995)、*w-2'*(红眼第 2 白卵)、*oy*(丰油蚕)、*nm-b*(不眠蚕)和 *Nd-S^D*(丝胶茧 D)(Takei *et al.*, 1984)、*so*(软体蚕)、*str*(链蚕)突变品种(向仲怀 2005)。

我国拥有世界上最多的家蚕突变资源,但对大规模的功能基因组研究来说还远远不够,因此,通过不同途径获得更多的突变体,为功能基因研究提供丰富的材料,是当前的重要工作之一。本研究以可产生点突变的化学试剂乙基亚硝基脲(ENU)、MNU、DES、5-BU、EMS 作为诱变剂,对家蚕标准品系 C108 进行处理,以探索这些试剂的化学诱变效应,寻求适合家蚕点突变的化学诱变剂、最佳的处理方式及处理时期。另一方面,最近反向遗传学研究手段日益受到重视,特别是 TILLING(Targeting Induced Local Lesions in Genomes)技术,因其规模化和高效的优点,在模式生物的功能基因组研究中起到了积极的推动作用。该技术为定向诱导基因组局部突变技术,可以从同一遗传背景中筛选和鉴定出形态性状突变体,并在短时间内构建大量点突变群体。而 TILLING 技术的关键在于利用化学诱变方法来产生一系列的点突变,然后用可以识别并切割错配碱基的 CEL I 酶消化基因扩增产物,并迅速鉴定突变位

点(McCallum *et al.*, 2000a, 2000b)。为此,本研究的另一个主要目的就是建立家蚕人工诱导突变系,为应用 TILLING 技术鉴定家蚕众多突变体奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕标准品种 C108,由西南大学家蚕基因库提供。

1.2 方法

1.2.1 实验用蚕的准备:将家蚕化蛹后削茧取出鉴别雌雄,选出化蛹 2~3 天(精母细胞形成)的雄蛹和化蛹 5~6 天或化蛹 7~8 天(卵壳未充分形成前)的雌蛹,以及羽化后的雌、雄蚕蛾作为诱导对象。

1.2.2 家蚕的诱导处理:化学诱变剂诱导家蚕突变的方法和选择诱变剂量都参考 Tazima 和 Murota 等人诱导家蚕使用的方案进行(Murota and Murakami, 1977; Ito and Kobayashi, 1978; Tazima, 1980; 向仲怀, 1994)。所有的诱变剂均为现配现用,需诱导的蚕蛹和蛾按照表 1 注射方案进行处理,并对处理后的蚕蛹和蛾置于通风无人处,待交配制种后,再按蚕种保存要求处理(冯家新, 1993)。

1.2.3 交配制种:分别按照正常雌蛾与注射了诱变剂的雄蛾(♀正常 × ♂诱变);注射了诱变剂的雌蛾与正常雄蛾(♀诱变 × ♂正常)交配制种,再单蛾区饲养。并将诱导的当代记为 M_0 , 杂交后代记为 M_1 代, M_1 代同蛾区交配的后代记为 M_2 代。

1.2.4 化学诱变剂的无毒害处理:实验剩余的诱变剂用含有 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的 250 mmol/L NaOH 溶液中和,放置过夜;沾有诱变剂的器具用含有 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的 250 mmol/L NaOH 溶液浸泡过夜处理;实验操作台用 10 mmol/L 的 NaOH 溶液擦洗或喷雾处理。

1.2.5 筛选化学诱变体:单蛾区饲养诱导后的蚕种,进行细致的性状调查和比较鉴定。根据遗传系统的分类方法,记录卵、幼虫、蛹、茧、蛾的各阶段形态和生理特征等,包括卵形、卵色、卵壳色、蚁色、幼虫体形、体色、斑纹、体壁、腹肢、茧形、茧色、蛹形、蛹体色、蛾体色、蛾体形、蛾斑纹、复眼等形态性状,化性、眠性、食性、产卵等生理性状,从中筛选出突变体,并分析显隐性。

表 1 注射方案
Table 1 Scheme of the injection

| 注射时期 Date of injection | 注射部位 Position of injection | 注射剂量 Dose of injection (μL) | | | | | | | | | | 每种方式注射的数量(头) Number of individuals for every injection | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|---|----|---------------------------------------|----|---|----|---------------------------------------|----|---------------------------------------|----|---|----|----|----|----|
| | | EMS (1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | | 5-BU (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | | DES (1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | | MNU (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | | ENU (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | | | |
| 雄 Male | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 化蛹 2~3 天 2-3 day pupa | 翅原基/ 腹部 Wing disc/ abdomen | 10 | 25 | 50 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 20 |
| 刚化蛾 Fresh moth | 翅原基/ 腹部 Wing disc/ abdomen | 10 | 25 | 50 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 20 |
| 雌 Female | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 化蛹 5~6 天 5-6 day pupa | 翅原基/ 腹部 Wing disc/ abdomen | 10 | 25 | 50 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 20 |
| 化蛹 7~8 天 7-8 day pupa | 翅原基/ 腹部 Wing disc/ abdomen | 10 | 25 | 50 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 20 |
| 刚化蛾 Fresh moth | 翅原基/ 腹部 Wing disc/ abdomen | 10 | 25 | 50 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 10 | 25 | 50 | 20 |

注:以注射诱变剂相应体积的 0.85% NaCl 和未经注射的家蚕品种 C108 作为诱导对照。

Notes: Injecting the corresponding volume of 0.85% NaCl in place of mutagens and the unjected normal C108 strain as the controls of induced silkworm.

2 结果与分析

2.1 筛选家蚕化学诱导突变体

本研究通过正向遗传筛选获得了一些可视性家蚕突变体如表 2, MNU 诱导获得了 1 个突变体, DES 诱导获得了 5 个突变体, 5-BU 诱导获得了 1 个不稳定的突变体。而目前已报道的产生点突变的诱变剂 MNU 和 DES 处理家蚕后, 分别获得了 *vit*(白妙卵)

(Fujikawa *et al.*, 1996) *re*¹(红色死卵) (Kerimova, 1977) *Set*(长胴蚕) (Kawaguchi *et al.*, 1995) *w-2*^r(红眼第 2 白卵) *oy*(丰油) *nm-b*(b 不眠蚕) 和 *Nd-S*^D(丝胶茧 D) (Takei *et al.*, 1984) *sol*(软体蚕) *str*(链蚕) 突变品种(向仲怀, 2005)。综合分析发现, 到目前为止, 用烷化诱变剂 MNU 和 DES 诱导家蚕获得的突变体是人工诱导家蚕获得突变体数量中最多的, 从正向遗传筛选来看, MNU 和 DES 对家蚕诱导效果是目前最好的。

表 2 化学诱导可视突变家蚕统计

Table 2 Statistics of chemical-induced visible mutations in silkworm

| 化学诱变剂 Chemical mutagen | 突变体数量 Number of mutants | 表现型 Phenotype |
|-----------------------------------|----------------------------|--|
| 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MNU | 1 | 非滞育红卵突变体 Non-diapausing red eggs mutant |
| 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DES | 5 | 幼蚕致死性突变体, 长圆筒茧突变体, 绵蚕突变体, 丝胶茧突变体, 小蚕突变体 Lethal larva mutant, long tube-shaped cocoon mutant, flossy cocoon mutant, sericin cocoon mutant, and small cocoon mutant |
| 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-BU | 1 | 无或少鳞毛蛾翅突变体 No or little adult wing hairs mutant |
| 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ENU | 0 | |
| 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMS | 0 | |
| 0.85% NaCl | 0 | |

2.2 化学诱导突变体的分析

通过观察和筛选经 ENU、MNU、DES、5-BU、EMS 诱导处理后的后代各时期的形态特征和生理特点, 本研究在卵、幼虫、茧及成虫(蚕蛾)等不同时期获得了不同的突变体, 具体分述如下。



图 1 MNU 诱导家蚕后的 M_2 代的非滞育红卵与正常卵比较

Fig. 1 Comparison of non-diapausing red eggs of M_2 generation silkworm by MNU-induced mutation with normal eggs

对蚕卵突变体在发育过程中的性状调查显示(图 2)经 MNU 诱导后产生的非滞育红卵, 在产卵一周后, 都有明显的颜色差异; 当发育到点青期时, 红色卵的胚子仍具有红色, 而正常的胚子成黑色; 转青期后, 突变的胚子与正常的胚子的颜色达到基本一致; 孵化后的蚁蚕、二眠蚕和卵壳均无明显差异表现; 突变蚕在 3 龄和之后各发育时期的表型与正常蚕也没有明显变化(结果未显示)。MNU 诱导后产生的非滞育红卵突变体与正常标准品种大造杂

2.2.1 卵: 在蚕卵性状特征调查中, 我们发现用 $1 \mu\text{g}/\text{头}$ MNU 诱导雄蛾的 M_2 代中有非滞育红卵突变体(图 1)。即在同一蛾圈中既有非滞育红卵, 也有同非滞育卵一样的未转色的卵, 其中红色卵与未转色卵粒数的比例约为 1:1。

交, 其 F_2 代同蛾区交配制种 37 个蛾圈, 仅有 5 蛾圈蚕卵是非滞育卵, 且红色和正常卵混杂; 其余的卵全部转为正常褐色滞育卵, 其过渡卵色也同正常的一样。对 5 蛾圈非滞育卵的卵粒数进行统计, 结果正常卵与红色卵粒的比例为 2 338:790, χ^2 检验结果为 $\chi^2 = 0.096 < \chi_{0.05, 1} = 3.14$ 符合 3:1, 即基本符合经典的孟德尔遗传规律, 即红色非滞育卵突变体是隐性非致死性突变, 这与已报道的由 MNU 诱导产生的 *re'*(红色死卵)向仲怀(2005)有明显的不同。

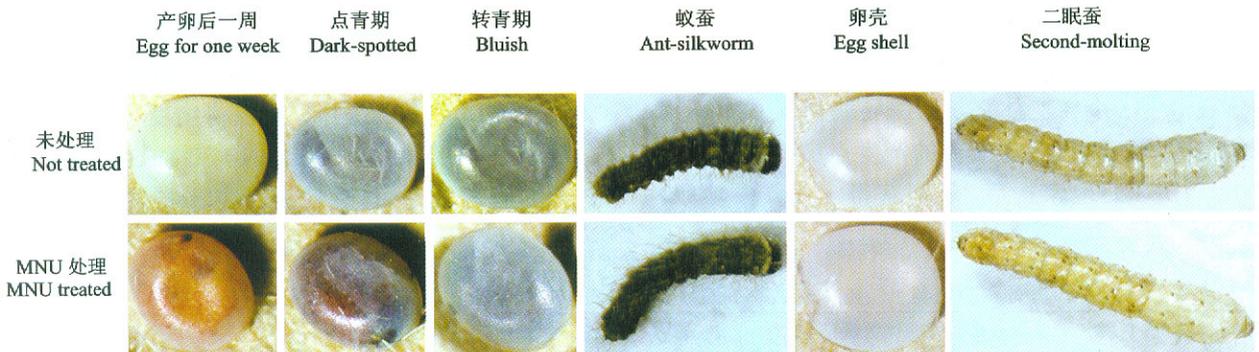


图 2 非滞育红卵突变体与正常非滞育家蚕在不同发育时期的比较

Fig. 2 Comparison of non-diapausing red mutants with normal non-diapausing eggs in different developmental stages of silkworm

2.2.2 幼虫: 在注射 $25 \mu\text{g}/\text{头}$ DES 诱导雄蛾的 M_2 代中, 其 2 龄起蚕存在致死性突变体现象如图 3。调查发现, 有 1 蛾圈的幼蚕有 1/3 在 2 龄起蚕时开始个体干死, 身体略发软, 表皮与正常蚕的肤色一致。其症状类似微孢子感染, 但经检测未发现微

孢子感染。这与早年日本学者用诱变剂注射蛹体诱发的致死突变体结果一致(Murota and Murakami, 1977), 推测其可能是化学诱变引起的致死突变体。由于在 M_2 代中有 1/3 的蚕表现致死, 遗传分析该突变体可能是隐性同质型致死突变。

突变活蚕 Mutational live-silkworm 突变死蚕 Mutational dead-silkworm



图 3 DES 诱导的 M_2 代家蚕致死突变体
Fig. 3 Lethal mutants in DES-induced mutation of M_2 generation silkworm



图 4 DES 诱导的家蚕 M_2 代茧突变体
Fig. 4 Different cocoon mutants of M_2 generation silkworm by DES-induced mutation



图 5 小茧突变体与正常家蚕的比较
Fig. 5 Comparison of small cocoon mutant with normal silkworm

2.2.4 成虫:对化蛹第 2~3 天的雄蛹注射 0.375 $\mu\text{g}/\text{头}$ 5-BU 的 M_1 代进行观察,筛选出了无鳞毛蛾翅突变体(图 6)。该突变体的翅无鳞毛或鳞毛很少,且略呈油状,其交配能力较差,所产卵有较多的死卵。该突变体在诱变处理后的杂交 M_1 代发现,故推测可能是显性突变。将 M_1 代进行同蛾区交配,

2.2.3 茧:对注射 25 $\mu\text{g}/\text{头}$ DES 诱导化蛹 2~3 天的雄蛹的 M_2 代筛选,结果获得了不同茧形状的突变体(图 4),如突变长圆筒茧、小茧、丝胶茧及绵茧,但除了小茧突变体可以化蛾制种外,其他 4 个突变体均不能化蛹而死亡。将小茧突变体剖茧取蛹观察(图 5),发现其大小比正常的小很多。化蛾后同蛾区交配,其所产的蚕卵数量很少,而且卵粒小,一个卵圈仅有 63 粒蚕卵,且其中有 22 粒死卵,约占总卵数的 1/3。由传统的遗传分析发现,这些性状可能都是隐性突变,且同质型致死,其突变与致死基因可能存在有相关性。本研究获得的长圆筒茧是隐性突变,与已有关于圆筒茧相对于椭圆形茧是隐性的报道一致。另外,也有研究者用 DES 诱导获得了 $Nd-S^D$ (丝胶茧 D)突变品种(向仲怀,2005),与本研究诱导获得的丝胶茧突变相似。绵茧突变在现有的基因库中也有保存,但非化学诱导突变产生。

结果无鳞毛突变体性状渐渐减弱,且逐步趋于正常化,这可能是后代得到了修复,或者因多基因性状后代选择未能固定所致。

3 讨论

通过观察经化学诱变剂 ENU、MNU、DES、5-BU、EMS 处理后的家蚕标准品种 C108 的后代各生长期的形态特征和生理特点,筛选获得了非滞育红卵突变体、长圆筒茧、小茧、丝胶茧及绵茧突变体、致死突变体及无鳞毛蛾翅突变体。这些突变体大部分可能都为隐性和致死性突变,并可能与致死性基因突变有关,具体引起这些突变现象的分子生物机理有待进一步研究。丝胶茧、绵茧、长圆筒茧、小茧、无鳞毛蛾翅突变体、致死性突变体过去已有报道,在现有突变库中也有保存,但未见化学诱导获得绵茧、长圆筒茧、小茧和无鳞毛蛾翅的报道,非滞育红卵突变是首次报道。

对本研究所用诱变剂诱导进行了正向遗传筛选

图 6 5-BU 诱导的 M_1 代家蚕蛾突变体Fig. 6 Adult mutant in 5-BU-induced mutation of M_1 generation silkworm

突变体,并结合已报道的结果分析了各诱变剂的效果,发现经过 MNU、DES 诱导后的突变效率较高。这只是从表现型去筛选分析,还应在核酸分子水平上分析比较突变效率,即可通过反向遗传研究方法如 TILLING 技术进一步分析研究,以最终确定可有效应用于家蚕化学诱导的化学诱变剂。对化学诱导的注射部位即翅原基和腹部进行比较,发现在注射翅原基时比注射腹部方便且损伤小些。通过本次研究发现,获得的突变体都是诱导雄体产生的,所以初步认为注射雄体比雌体效果好;在时期上,注射蚕蛹和蛾都有诱导效果。

传统的家蚕突变体筛选都是通过与正常个体的形态特征及生理特点进行比较,从中获得表现异常的突变体。其工作繁琐费时,且对于发生突变较细微的点突变体以及不可视的突变体的筛选就更困难。由于 MNU 和 DES 为常规点突变烷化剂,诱导家蚕随机产生点突变,如用常规方法是不能确认这些突变体性状到底发生了哪些基因或序列的特异点突变,所以随着家蚕基因组序列的测序完成(Xia *et al.*, 2004),可借助高通量的反向遗传筛选的检测手段,快速有效地从化学诱导的突变群体中筛选出兴趣基因的突变体,其中新兴的 TILLING 技术也正是解决这一难题的有效手段。TILLING 技术可以快速确认这些序列的突变位点,为基因功能鉴定提供了点突变的序列位点与性状突变之间的联系,所以本研究获得的这些家蚕人工诱导突变群体,可以为应用 TILLING 技术筛选家蚕重要功能基因突变体和鉴定基因功能奠定了基础;同时,可极大的丰富家蚕基因库的遗传资源,为家蚕育种提供原料。

参 考 文 献 (References)

Dahm R, Geisler R, 2006. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine biotechnology*, 8(4): 329 - 345.
Feng JX, 1993. *Silkworm Egg Production*. Beijing: China Agriculture Press.

96 - 106.[冯家新,1993. 蚕种学. 北京:中国农业出版社. 96 - 106]
Fujikawa K, Kawaguchi Y, Doira H, Banno Y, Koga K, 1996. Linkage studies on the "scanty vitellin" egg mutant of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 65(2): 145 - 146.
Kawaguchi Y, Kawakami K, Doira H, Banno Y, Koga K, 1995. Genetic analysis of the soft and elongated trunk mutant in *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 64(1): 31 - 34.
Kerimova IO, 1977. Obtaining autosomal recessive mutations in the silkworm by exposure to nitrosomethylurea. *Genetika*, 13(12): 2141 - 2148.
Lu C, Dai FY, Xiang ZH, 2003. Research of mutational system in silkworm stock center. *Scientia Agricultura Sinica*, 36(8): 968 - 975.[鲁成, 代方银, 向仲怀, 2003. 家蚕基因库突变系统的研究. 中国农业科学, 36(8): 968 - 975]
McCallum CM, Comai L, Greene E A, Henikoff S, 2000a. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology*, 18: 455 - 457.
McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S, 2000b. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.*, 123: 439 - 442.
Murota T, Murakami A, 1977. Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in germ-cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 46(3): 205 - 212.
Ito T, Kobayashi M, 1978. *The Silkworm: An Important Laboratory Tool*. In: Tazima Y ed. Kodansha, Tokyo, Japan. 218 - 268.
Takei F, Kimura K, Mizuno S, Yamamoto T, Shimura K, 1984. Genetic analysis of the Nd-s mutation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.*, 59: 307 - 313.
Tazima Y, 1980. Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. In: Frederick de Serres, Alexander eds. 6: 203 - 238.
Winkler S, Schwabedissen A, Backesch D, Bökel C, Seidel C, Bönisch S, Fürthauer M, Kuhrs A, Cobreros L, Brand M, González-Gaitán M, 2005. Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genome Res.*, 15: 718 - 723.
Xia Q, Zhou Z, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703): 1937 - 1940.
Xiang ZH, 2005. *Biology of Sericulture*. Beijing: China Forestry Press. 374 - 393.[向仲怀, 2005. 蚕丝生物学. 北京: 中国林业出版社. 374 - 393]
Xiang ZH, 1994. *Silkworm Genetics of Threnmatology*. Beijing: China Agriculture Press. 211 - 213.[向仲怀, 1994. 家蚕遗传育种学. 北京: 农业出版社. 211 - 213]