

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00373

对家蚕第 18 连锁群隐性基因 *elp*、*ch-2* 和 *mln* 测交系的分子定位分析

刘先方¹, 马晓³, 侯成香², 李冰¹, 李木旺^{1,2}

1. 江苏科技大学蚕业研究所, 镇江 212018;
2. 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018;
3. 江苏科技大学生物技术与环境工程学院, 镇江 212018

摘要: 家蚕长形卵(*elp*)、第二隐性赤蚁(*ch-2*)、暗化型(*mln*)均为第 18 染色体上的隐性突变, 在经典连锁图谱上的顺序和遗传距离已经排定。文章采用正常卵、正常黑蚁及正常白蛾品种 P50 与包含此 3 个隐性突变的三隐性测交系 W18 组配正反交群体, F₁回交 W18 后获得回交群体(P50×W18)♀×W18♂ 和 W18♀×(P50×W18)♂, 分别记作 BC₁F 和 BC₁M, 利用已构建的家蚕 SSR 分子连锁图谱和根据家蚕基因组精细图设计的 STS 标记, 对这 3 个突变基因 *elp*、*ch-2*、*mln* 进行了分子定位研究, 并根据家蚕基因组精细图, 将第 18 连锁群的经典遗传图、分子连锁图和基因组物理图进行了对应。整合后的图谱遗传距离为 94.2 cM, 突变基因和分子标记的排列顺序分别与形态标记连锁图和基因组精细图相一致, 研究结果对家蚕第 18 染色体上其他突变的定位与克隆有重要的借鉴作用。

关键词: 家蚕; 第 18 连锁群; 突变; 分子标记; 基因定位

Molecular mapping of test mapping strain for 18th linkage group recessive genes *elp*, *ch-2* and *mln* in silkworm (*Bombyx mori*)

LIU Xian-Fang¹, MA Xiao³, HOU Cheng-Xiang², LI Bing¹, LI Mu-Wang^{1,2}

1. Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;
2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China;
3. College of Biotechnology and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China

Abstract: The ellipsoid egg, the second recessive gene of chocolate larvae, and melanism are controlled by three recessive genes, *elp*, *ch-2*, and *mln* in silkworm, respectively. Their order and genetic distance have been scheduled in established linkage group. Owing to lack of crossing over in females, the reciprocal backcrossed F₁(BC₁) progenies were bred for linkage analysis using the wild type silkworm strain P50(+*elp*+*ch-2*+*mln* / +*elp*+*ch-2*+*mln*) and W18 with ellipsoid egg, the second recessive gene of chocolate larvae, and melanism (*elp ch-2 mln* / *elp ch-2 mln*). In this research, we mapped three mu-

收稿日期: 2012-10-11; 修回日期: 2012-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30825007, 30972145), 江苏省自然科学基金项目(编号: BK2009220)和江苏省青蓝工程项目、江苏科技大学研究生科技创新计划资助

作者简介: 刘先方, 硕士研究生, 专业方向: 特种经济动物饲养。Tel: 0511-85616550; E-mail: liuxianfang718@163.com

通讯作者: 李木旺, 博士, 研究员, 研究方向: 家蚕分子遗传学。E-mail: muwang_li@hotmail.com

网络出版时间: 2012-12-21 13:33:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121221.1333.002.html>

tant genes, *elp*, *ch-2*, and *mln* on the chromosome 18 based on the SSR linkage map and STS markers designed based on silkworm genome sequence. The established linkage group, molecular linkage group, and the physic map of chromosome 18 had been corresponded. The genetic distance for this chromosome in this research was 94.2 cM, and the order of the mutants and molecular markers were consistent with the established silkworm linkage maps and the fine genome sequences. This research will lay important bases for map-based cloning for other mutants on chromosome 18.

Keywords: *Bombyx mori*; 18th chromosome; mutant; molecular marker; gene mapping

家蚕(*Bombyx mori*)作为重要的经济昆虫被利用已达 5 000 余年,是由仍在桑园中生存的野桑蚕(*Bombyx mandarina*)驯化而来^[1],自 20 世纪初以来一直是遗传学研究的重要对象。在家蚕性状遗传研究中,在第 18 染色体先后发现了第二隐性赤蚁(The second recessive gene of chocolate larvae, *ch-2*)^[2,3](蚁蚕全身暗赤褐色,食桑后幼虫体色逐渐正常)、显性短节油蚕(Dominant obese translucent, *Obs*)(蚕体短而肥大的显性油蚕)^[4]、长形卵(Ellipsoid egg, *elp*)^[5,6](突变体的卵长轴方向较正常卵显著增长,呈长椭圆形)、暗化型(melanism, *mln*)^[4,7](主要特征为蚕蛾身体和翅灰黑色)和白蚁(Undeveloped gonads, *gon*)(蚁蚕体白色)^[4]。典型遗传分析结果表明这 5 个突变基因均位于第 18 染色体,除 *gon* 基因尚未定位外,其余 4 个突变基因在其遗传连锁图谱上的位点分别为 0.0、6.2、16.1 和 41.5^[4]。本研究育成了家蚕第 18 连锁群包含 *ch-2*、*elp*、*mln* 三隐性突变的测交系统 W18^[8]。

随着分子生物学技术在家蚕中的应用与发展,先后建立了家蚕 AFLP、RAPD、RFLP、SSR、SNP 等分子遗传图^[9~15],为家蚕突变基因的定位与克隆奠定了基础。自序列标签位点(Sequence-tagged sites, STS)^[16]应用于人类基因组作图以来,由于其在基因组位点中的唯一性,已被广泛应用于遗传连锁图构建、功能基因定位克隆和种质资源鉴定。简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)又称微卫星(Microsatellite)序列,由于其具有在真核生物基因组中分布广、多态性丰富、呈共显性遗传、实验重复性和稳定性好以及能够高通量操作等优点,已经成为功能基因定位克隆、数量性状分析、指纹图谱构建及资源多样性、分子标记辅助选择育种等的有力工具^[17,18],Miao 等^[13]构建了家蚕 SSR 分子连锁图,并将其与家蚕突变基因连锁图进行了对应。家蚕基

因组精细图谱已于 2008 年公布^[19],测序的结果覆盖了家蚕基因组 432 Mb 的 8.5 倍,将 87% 的 scaffold 分配到家蚕的 28 条染色体,预测基因 14 623 个。这项工作为家蚕功能基因的定位和克隆提供了强有力的基础。在此基础上,2008 年,相辉等^[20]利用定位克隆的方法对 E^{Kp} 位点进行了分离。同年,日本 Ito 等^[21]研究了决定家蚕浓核病毒 2(BmDENV-2)抗性基因 *nsd-2* 的定位克隆。虽然迄今为止已经有 20 多个家蚕突变基因被定位并克隆的报道,有关研究都是进行的单个基因的定位分析。由于对基因组精细图和突变基因的连锁图的方向是否一致仍不清楚,因此,无法将家蚕突变基因的连锁图、分子遗传连锁图和基因组精细图和进行对应。本研究用家蚕 18 染色体上的 *ch-2*、*elp*、*mln* 三隐性测交系 W18 与正常品系 P50 组配了正反测交群体,利用已构建的与 *ch-2* 连锁的 SSR 标记连锁图,以及根据家蚕基因组精细图设计的 STS 标记,对家蚕这 3 个突变基因进行了连锁及定位分析,并将家蚕 18 连锁群的形态标记、分子标记和基因组精细图进行了对应。得到的连锁图为 *elp* 的精细定位克隆奠定了重要基础,并为家蚕第 18 染色体上其他突变基因如 *Obs* 的定位克隆提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验选用三隐性测交系 W18 和 P50 作为基因定位杂交组合的亲本。均保存于中国农业科学院蚕业研究所。P50 基因型为 $^{+elp+ch-2+mln} / ^{+elp+ch-2+mln}$,表现型为成虫产正常卵、黑色蚁蚕、白蛾;W18 是由 *elp*、*ch-2*、*mln* 三者杂交组配产生的三基因的三隐性测交系统,可以同时表现出 3 个隐性表现型。其基因型为 *elp ch-2 mln/elp ch-2 mln*,表现型为成虫产长形卵、暗褐色蚁蚕、黑蛾。由于家蚕雌不发生交换,

用P50和W18两个品系组配 F_1 代及 BC_1 回交群体, ($P50 \times W18$) $\text{♀} \times W18$ ♂ 和 $W18$ $\text{♀} \times (P50 \times W18)$ ♂ 分别记作 BC_1F 和 BC_1M , 用 BC_1F 筛选与突变基因连锁的标记, 用 BC_1M 用来进行重组作图。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

BC_1 代从蚁蚕时区分黑蚁和暗褐色蚁, 分开饲养, 羽化后根据其蛾体的颜色分为白色和黑色, 待蚕蛾产卵后, 调查卵形性状是否为长形卵, 记录每个雌性个体的3个表现型特征, 分别鉴别出基因型。将每个雌性个体单独抽提DNA。本实验群体中一只蚕蛾身体质量约为0.8~1.0 g, 因此取蛾约1/3(其余2/3放入-40℃冰箱冷冻备用)放入研钵中, 用液氮研磨至粉碎, 按照文献[22]中的方法抽提基因组DNA, 每个个体的基因组DNA经过浓度及纯度检测后, 取少量稀释至DNA浓度为10 ng/ μL , -20℃保存备用。

1.2.2 PCR扩增

将与*ch-2*连锁的SSR标记[23]以及根据家蚕第18连锁群基因组序列随机设计的STS引物, 以2个亲本和10个 BC_1F 个体(5个正常型, 5个突变型)的基因组DNA为模板进行PCR扩增, 由于家蚕雌性不发生交换, 如果某个标记在 BC_1F 群体中所有正常型个体的PCR扩增产物经电泳检测后, 其电泳带型均为与 F_1 一致的杂合型, 表现的2条电泳条带分别为来自2个亲本P50和W18, 而所有突变型(隐性)个体的扩增产物经电泳检测后, 其带型和隐性亲本W18一致, 为纯合型1条带, 便确定此标记与3个突变基因连锁, 从而筛选出在两个亲本间表现多态并与突变基因连锁的SSR和STS标记[23-27]。最后获得的与3个突变基因连锁的多态引物如表1所示。PCR扩增体系: 10 \times PCR Buffer 1 μL ; dNTP各0.2 mmol/L; 正反引物各0.2 mmol/L; *Taq* DNA聚合酶0.5 U; DNA模板10 ng, 加ddH₂O至终体积10 μL 。PCR扩增程序: 95℃预变性3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 45 s, 72℃ 1 min 20 s, 35个循环; 最后再72℃延伸10 min。

1.2.3 电泳检测与数据分析

PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳进行多态性检测。采用 F_1 为雄性个体与雌性亲本W18进行杂交获得 $W18$ $\text{♀} \times (P50 \times W18)$ ♂ (即 BC_1M)群体进行基因定位

分析。由于家蚕雌性不发生交换, 雄性可以发生交换, 因此, 在家蚕中经常采用雌性亲本回交雄性 F_1 的 BC_1 群体(即 BC_1M)进行遗传分析。将所有多态性标记在 BC_1M 群体中分别进行扩增, 记录各标记在 BC_1M 群体中各个体的表现型(电泳检测的带型), 进而将所有多态标记在131个 BC_1M 作图群体中进行基因型分析[22-26], 将所读取的标记数据转换成Mapmaker软件的数据格式, 采用Mapmaker 3.0 [28]软件进行定位分析。再用Kosambi[29]方法绘制连锁图。

2 结果与分析

2.1 回交后代的表现型

F_1 代全部为正常卵、黑蚁及白色蚕蛾, BC_1F 的389个个体中, 正常型个体为199个, 三隐性个体为190个, 没有发现交换个体, 这与家蚕雌不发生交换的现象相符。 BC_1M 群体中各种表现型的个体数如表1所示。

表1 BC_1M 代的不同表现型个体数

表现型	个体数
+ ^{elp} + ^{ch-2} + ^{mln}	35
elp ch-2 mln	41
+ ^{elp} ch-2 mln	1
elp + ^{ch-2} + ^{mln}	1
elp + ^{ch-2} mln	8
+ ^{elp} ch-2 + ^{mln}	16
elp ch-2 + ^{mln}	17
+ ^{elp} + ^{ch-2} mln	12
总数	131

2.2 第18连锁群上的多态性STS标记及SSR标记

将文献[23]中的9对SSR标记和在家蚕第18连锁群上随机设计38对STS引物, 以P50和W18基因组DNA为模板, 进行PCR扩增, 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测多态性, 最终从47对引物中筛选出9对有多态性的引物, 它们分别是T1801、T1805、T1806、T1809、T1811、T1813、T1814、T1818、S1814(表2)。

2.3 家蚕第18连锁群上3个标记基因的连锁图

根据各多态性标记在131个 BC_1M 个体中的基因型, 以及3个突变基因的基因型, 利用Mapmaker 3.0作图软件[28], 导入统计好的数据, 根据整个数据阵, 绘制出家蚕*elp*、*ch-2*、*mln*基因的分子连锁

表 2 筛选到的与家蚕 3 个标记基因连锁的 STS 标记及 SSR 标记

标记符号	引物序列(5'→3')	基因组精细图中的位置
T1801	CCAAGTGCGGTCAGTGAGTA TGTTACGAGGTGTTGTGAGGAA	nscaf2901 0.59 Mb
T1805	TTCACAGGCACATCTCGTAACTA GATGATTGAGAAGCCGCCATTC	nscaf2902 2.34 Mb
T1806	TCTCAATGATTCCACACCACACTA GAGTCCGAACCACGATTAGCA	nscaf2902 3.4 Mb
T1809	AACAGTCCCGAAGCCAAAA GAATCTCCCGAGGCATAGAG	nscaf2902 0.63 Mb
T1811	TACCATAAGACATCAAGCGTTAGC TTCGGTAGCACTTGGAGCATT	nscaf2902 9.37 Mb
T1813	AGCCAAGGACGCATCAAGT ACCCAGGTGTCAATGACTTTC	nscaf2902 0.86 Mb
T1814	CGTCTCTGGATAAGTGGTGTAGT TTCTGTCCTGATGCTGCGATAT	nscaf2899 0.19 Mb
T1818	TGGATACTGCACTCCTGGATG CAAAGCGTCTGCTATTGGTCTA	nscaf2902 1.67 Mb
S1814	ATTTGCGCAAGACTACGCTAT ACGGGTGTCTGAATCTTGCTAAC	nscaf2902 1.52 Mb

图, STS、SSR 标记及 *elp*、*ch-2*、*mln* 基因的排列次序为 *ch-2*、T1801、*elp*、T1809、T1813、S1814、T1818、T1805、T1806、*mln*、T1811 和 T1814。遗传连锁图的遗传距离为 94.2 cM(图 1)。标记的排列顺序与基因组精细图相一致。

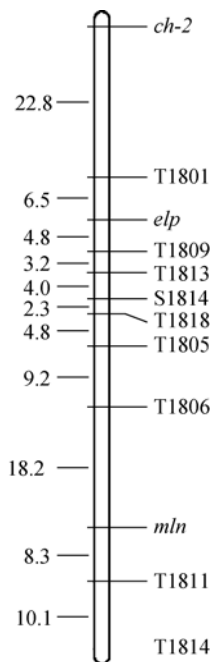


图 1 家蚕 *elp*、*ch-2*、*mln* 基因与 STS 及 SSR 标记之间的连锁图

3 讨论

由于 STS 和 SSR 标记是共显性的, BC₁ 代中表现正常型基因的个体应该表现为带型与 F₁ 一致的杂合

型, 如果其中某个体带型与隐性亲本 W18 相同, 那么该个体发生了交换。利用家蚕雌性个体没有交换发生的特点, 可以快速地利用正反交群体进行与目标性状连锁的多态性标记筛选并将其进行精确的定位。本研究在 18 号连锁群上找到 9 对与 3 个标记基因连锁的 STS 和 SSR 标记, 并利用这些多态性标记构建了家蚕第 18 连锁群测交系的分子连锁图。

张蕊等^[24, 25]用已构建的家蚕 SSR 分子标记连锁图谱对 *ch-2* 基因进行了定位, 将 *ch-2* 基因定位在 18 号连锁群上 69.6 cM 处, 对应于家蚕基因组精细图在 nscaf2901 的 734~1 082 kb 区域。Zhan 等^[30]将 *mln* 基因定位在 nscaf2902 上 8.2~8.8 Mb 区域约 650 kb 的范围内。Zhan 等^[30]、Dai 等^[31]分别克隆了该基因。Qiao 等^[32]分析了该基因与儿茶酚胺类之间的相互作用, 以及它们对家蚕色素模式的形成的影响和骨化区域的物理特性。根据本研究定位的结果, *elp* 基因在标记 T1801 和 T1809 之间, T1801 标记位于家蚕基因组精细图 nscaf2901 的 0.59 Mb 处, T1809 标记位于家蚕基因组精细图 nscaf2902 的 0.63 Mb 处。在以后的工作中, 我们将在 nscaf2901 的末端和 nscaf2902 的前端设计更多的 STS 或 SNP 标记^[14], 以期能够将 *elp* 进行精确的定位, 找出候选基因, 并进行克隆和功能分析。

本研究将家蚕经典连锁图第 18 连锁群上的标记基因与分子连锁图、基因组精细物理图相对应, 得到了与 3 个标记基因很近的 STS 标记, 这些工作将对今后家蚕 18 连锁群上其他突变标记基因的精细定位和定位克隆具有重要的借鉴作用。

参考文献(References):

- [1] 吉武成美, 蒋猷龙. 家蚕的起源和分化. 蚕业科学, 1987, 13(3): 23–25. DOI
- [2] 秦俭. 家蚕第二隐性赤蚁的遗传学研究初报. 蚕业科学, 1985, 11(2): 103–106. DOI
- [3] 鲁成, 向仲怀. 家蚕新突变型淡赤蚁的遗传学研究. 蚕业科学, 1990, 16(1): 21–24. DOI
- [4] Fujii H, Banno Y, Doira H, Kawaguchi Y. Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori*: important genetic resources, 2nd edn. Fukuoka: Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyusyu University, 1998. DOI
- [5] Kyeth WS. Studies on the inheritance of cocoon color and egg shape in *Bombyx mori*. The doctoral thesis. Fukuoka: Kyushu University, 1943: 182. DOI
- [6] 鲁成, 向仲怀, 陈家莲. 家蚕长形卵(*elp*)卵壳的特异构造. 蚕学通讯, 1991, 11(1): 17–19. DOI
- [7] Kan H, Kim CH, Kwon HM, Park JW, Roh KB, Lee H, Park BJ, Zhang R, Zhang JH, Söderhäll K, Ha NC, Lee BL. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J Biol Chem*, 2008, 283(37): 25316–25323. DOI
- [8] 代方银, 谭端, 童晓玲, 胡海, 鲁成, 向仲怀. 含有母性影响遗传基因的连锁定位系的构建. 遗传, 2007, 29(11): 1393–1398. DOI
- [9] Yasukochi Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 1998, 150(4): 1513–1525. DOI
- [10] Shi JR, Heckel DG, Goldsmith MR. A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphisms. *Genet Res*, 1995, 66(2): 109–126. DOI
- [11] Tan YD, Wan CL, Zhu YF, Lu C, Xiang ZH, Deng HW. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 2001, 157(3): 1277–1284. DOI
- [12] Promboon A, Shimada T, Fujiwara H, Kobayashi M. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet Res*, 1995, 66(1): 1–7. DOI
- [13] Miao XX, Xu SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW, Mills DR, Zeng PY, Mita K, Jia SH, Zhang Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhang XL, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang ZH, Wang SY, Goldsmith MR, Lu C, Zhao GP, Huang YP. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45): 16303–16308. DOI
- [14] Yamamoto K, Narukawa J, Kadono-Okuda K, Nohata J, Sasanuma M, Suetsugu Y, Banno Y, Fujii H, Goldsmith MR, Mita K. Construction of a single nucleotide polymorphism linkage map for the silkworm, *Bombyx mori*, based on bacterial artificial chromosome end sequences. *Genetics*, 2006, 173(1): 151–161. DOI
- [15] Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 1989, 245(4925): 1434–1435. DOI
- [16] Chandra A, Kaushal P. Identification of diploid *Stylosanthes scabra* accessions from existing germplasm of *S. scabra* utilizing genome-specific STS markers and flow cytometry, and their molecular characterization. *Mol Biotechnol*, 2009, 42(3): 282–291. DOI
- [17] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(16): 6463–6471. DOI
- [18] 侯成香, 李木旺, 张月华, 钱荷英, 孙平江, 徐安英, 苗雪霞, 郭秋红, 相辉, 黄勇平. 利用SSR标记进行家蚕部分品种资源的指纹图谱分析. 中国农业科学, 2006, 39(10): 2124–2131. DOI
- [19] The International Silkworm Genome Consortium. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38(12): 1036–1045. DOI
- [20] Xiang H, Li M, Yang F, Guo Q, Zhan S, Lin H, Miao X, Huang Y. Fine mapping of EKp-1, a locus associated with silkworm (*Bombyx mori*) proleg development. *Heredity*, 2008, 100(5): 533–540. DOI
- [21] Ito K, Kidokoro K, Sezutsu H, Nohata J, Yamamoto K, Kobayashi I, Uchino K, Kalyebi A, Eguchi R, Hara W, Tamura T, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Kadono-Okuda K. Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx* parvo-like virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(21): 7523–7527. DOI
- [22] 王修业, 李木旺, 赵云坡, 徐安英, 郭秋红, 黄勇平, 郭锡杰. 结合SSR标记和STS标记对家蚕无鳞毛翅基因的定位. 遗传, 2010, 31(1): 54–58. DOI
- [23] 张蕊, 梅兴林, 王修业, 郭秋红, 李冰, 汪生鹏, 徐安英, 黄勇平, 郭锡杰, 李木旺. 对家蚕第2隐性赤蚁基因(*ch-2*)的SSR标记定位及连锁分析. 蚕业科学, 2010, 36(5): 766–770. DOI
- [24] 张蕊. 家蚕第2隐性赤蚁基因(*ch-2*)的图位克隆[学位论文]. 镇江: 江苏科技大学, 2011. DOI
- [25] 郭秋红, 詹帅, 相辉, 赵云坡, 李卫华, 黄勇平. 家蚕 scaffold中新微卫星标记的获得与*D11*基因的遗传连锁分析. 蚕业科学, 2007, 33(2): 187–194. DOI

- [26] 李霞, 李木旺, 郭秋红, 徐安英, 黄勇平, 郭锡杰. 家蚕黄血抑制基因的 SSR 定位. *遗传*, 2008, 30(8): 1039–1042. [DOI](#)
- [27] Yan WY, Ye SH, Jin QS, Zeng LJ, Peng Y, Yan DW, Yang WB, Yang DL, He ZH, Dong YJ, Zhang XM. Characterization and mapping of a novel mutant *sms1* (*senescence and male sterility 1*) in rice. *J Genet Genomic*, 2010, 37(1): 47–55. [DOI](#)
- [28] Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1(2): 174–181. [DOI](#)
- [29] Kosambi DD. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 1943, 12(1): 172–175. [DOI](#)
- [30] Zhan S, Guo QH, Li MH, Li MW, Li JY, Miao XX, Huang YP. Disruption of an N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation. *Development*, 2010, 137(23): 4083–4090. [DOI](#)
- [31] Dai FY, Qiao L, Tong XL, Cao C, Chen P, Chen J, Lu C, Xiang ZH. Mutations of an arylalkylamine-N-acetyltransferase, *Bm-iAANAT*, are responsible for silkworm melanism mutant. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19553–19560. [DOI](#)
- [32] Qiao L, Li YH, Xiong G, Liu XF, He SZ, Tong XL, Wu SY, Hu H, Wang RX, Hu HW, Chen LS, Zhang L, Wu J, Dai FY, Lu C, Xiang ZH. Effects of altered catecholamine metabolism on pigmentation and physical properties of sclerotized regions in the silkworm melanism mutant. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42968. [DOI](#)

•封面说明•

2013 年 35 卷第 3 期封面说明

自家蚕基因组序列发布以来, 家蚕功能基因组学的研究得到了快速的发展, 采用图位克隆策略已经克隆了一批家蚕功能基因。前期的研究均是对单独的突变体分别进行定位, 并筛选定位区域中的预测基因。刘先方等尝试同时对家蚕第 18 连锁群测交系的 3 个隐性基因 *elp*、*ch-2*、*mln* 进行定位分析, 并根据家蚕基因组精细图, 将第 18 连锁群的经典遗传图、分子连锁图和基因组物理图进行了对应, 研究结果对家蚕第 18 染色体上其他突变的定位与克隆有重要的借鉴作用, 同时, 这种策略也将加快其他突变基因的图位克隆进程。详见本期第 373~378 页刘先方, 马晓, 侯成香, 李冰, 李木旺“对家蚕第 18 连锁群隐性基因 *elp*、*ch-2* 和 *mln* 测交系的分子定位分析”一文。

基因克隆后对突变体进行转基因拯救或干涉验证是功能基因组研究的重要环节。通过将外源优良基因的导入家蚕, 也在提高家蚕蚕丝产量, 改良蚕丝性能, 构建家蚕生物反应器, 增加国民经济收入方面也有广泛的应用前景。在家蚕转基因工作中的首要步骤是鉴定和筛选转基因成功的个体。转基因的成功率一般都在 10% 左右或更少, 所以需要在大量的个体中进行筛选。利用荧光蛋白作为分子标记筛选转基因个体是目前可靠而稳定的方法。同时作为追踪或演示个体发育的过程, 荧光蛋白也是很有用的工具。图示为利用全体表达的红色荧光蛋白作为分子标记的转基因家蚕幼虫(摄影: 谭安江)。

(刘先方, 李木旺)