

文章编号: 1000-2286(2008)05-0883-05

中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 抗中囊病选育研究

黄康^{1,2}, 曾志将^{1*}, 颜伟玉¹

(1. 江西农业大学 动物科学技术学院, 江西 南昌 330045 2. 浙江省江山市蜂业管理站, 浙江 江山 324100)

摘要:以江西省高安、上饶、靖安、遂川、南昌定地饲养的中蜂为素材,人工饲喂感染中蜂囊状幼虫病毒。从受试蜂群中选择抗病力强的蜂群,培育蜂王和雄蜂,作为中蜂子 1 代。然后用同样方法进行人工饲喂感染,培育中蜂子 2 代和子 3 代。再用中蜂与意蜂营养杂交方法来培育中蜂子 4 代、子 5 代和子 6 代,并测定了其感染发病率、产育力及 7 个工蜂形态指标;利用 14 条随机引物检测了其 DNA 多态性,并计算了遗传距离和进行聚类分析。结果表明:选育的中蜂子 3 代感染发病率显著低于普通中蜂,中蜂子 6 代感染发病率显著低于中蜂子 3 代;中蜂子 6 代蜂群的产育力比子 3 代和普通中蜂分别提高 6.56% 和 10.22%, 都达到显著差异;子 4 代、子 5 代、子 6 代工蜂的吻长、右前翅长度、右前翅宽度、第 3 腹节背板长度、初生重与亲本工蜂、子 1 代、子 2 代、子 3 代工蜂之间差异显著;所有子代工蜂的肘脉指数和右后翅的翅钩数与亲本工蜂之间差异不显著;RAPD 标记显示中蜂子 6 代与亲本中蜂之间的遗传距离有较大差异。

关键词:中华蜜蜂;囊状幼虫病;营养杂交;DNA

中图分类号: S893.2 **文献标识码:** A

A Study on Selection of *Apis cerana cerana* Resistant to Chinese Sacbrood Disease

HUANG Kang², ZENG Zhi-jiang^{1*}, YAN Wei-yu¹

(1. College of Animal Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Apicultural Management Office of Jiangshan City, Zhejiang Province, Jiangshan 324100, China)

Abstract Feeding the sacbrood virus to the sedentary colonies of *Apis cerana cerana* from different zones (Gaoan, Shangrao, Jing'an, Suichuan and Nanchang) of Jiangxi Province and the colonies with strong resistance were chosen to breed the queen bee and the drone as the first generation of *Apis cerana cerana* (F₁). In the same way F₂ and F₃ were bred. Then through nutritional crossbreeding between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* F₄, F₅ and F₆ were bred. The incidence of the disease, the fecundity and seven morphological indexes were measured, also the polymorphism was tested by using 14 RAPD primers and the genetic distance was calculated and cluster analyzed. The result indicated the infection rate of F₃ was significantly lower than that of ordinary colonies of *Apis cerana cerana*; the infection rate of F₆ was lower than that of F₃; the fecundity of F₆ was 6.56% higher than that of F₃ and 10.22% higher than that of ordinary colonies of *Apis cerana cerana*. There were significant differences in the proboscis length, the width and length of right forewing

收稿日期: 2008-05-08 修回日期: 2008-06-19

基金项目: 江西省农业重点攻关项目和国家公益性行业(农业)科研专项(2007-041)

作者简介: 黄康(1982-), 男, 硕士, 主要从事蜜蜂研究工作, *通讯作者: 曾志将, 教授, E-mail: bees1965@sina.com

the length of mid tibia, the birth weight between of F₄, F₅, F₆ and the parents F₁, F₂ and F₃, there was no significant difference between the parents and the offsprings in the brachium index and the number of wing claw. There was difference between F₆ and the parents in the genetic distance of RAPD mark.

Key words: *Apis cerana cerana*; sacbrood disease; nutritional crossbreed; DNA

中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 是我国宝贵的蜂种资源, 近几十年来, 我国有不少学者对中华蜜蜂生物学行为进行了卓有成效的研究^[1~4]。但由于西方蜜蜂的引进及竞争, 使得中蜂的数量和分布范围锐减, 加上近年来, 我国南方地区中蜂囊状幼虫病的发病率很高, 中蜂生存受到了严重的威胁。如何保护、开发和利用我国中蜂这一宝贵资源, 已成为我国蜜蜂研究重要任务。鉴于中蜂面临着饲养危机和中蜂授粉重要性, 本研究从不同地方饲养蜂群中选择抗病力强的中蜂, 运用常规抗病育种和蜜蜂营养杂交相结合的方法, 来选育抗囊状幼虫病的中蜂, 现总结报道如下。

1 材料和方法

1.1 蜂群来源

购买江西省境内几个地理位置相距较远的高安、上饶、靖安、遂川、南昌定地饲养的中蜂, 集中饲养在江西农业大学蜜蜂研究所实验蜂场, 作为育种素材的主要来源。然后在江西农业大学蜜蜂研究所, 江西省遂川县刘志中蜂场以及江西省靖安县中蜂种王养殖繁育场进行选育实验。

1.2 实验方法

1.2.1 囊状幼虫病毒的准备 由于囊状幼虫病毒不能长时间保存, 因此试验前购买了 4 群中囊病危害较严重的中蜂蜂群。需要做人工感染试验时, 从巢脾中选取完整病死的幼虫, 置于研钵中研磨 20 min 使其成乳白浆体, 再加 50%糖水稀释, 供病毒接种使用。

1.2.2 蜂群选育 (1)应用常规抗病育种方法定向选育抗囊状幼虫病品种: 观察试验蜂群的囊状幼虫病自然发病情况, 选择没有发病或自然发病率低的蜂群, 进行人工感染病毒。对蜂群饲喂囊状幼虫病毒液时, 方法是直接投喂在饲喂槽内, 让其自由采食, 12 h 内检查 1 次, 如果蜂群不食, 则将病毒液均匀地喷在蜜蜂身上, 让其相互舐食。7 d 后, 观察记录亲代抗囊状幼虫病的中蜂群的感染发病率。15 d 后再用上述方法第 2 次感染蜂群并观察记录。选择感染发病率低的蜂群为实验蜂群, 作为亲本蜂群培育处女蜂王和雄蜂 (同时定期除去其它蜂群的雄蜂蛹) 培育 10 群子 1 代抗囊状幼虫病的中蜂群。观察子 1 代抗囊状幼虫病的中蜂群的自然发病情况, 选择没有发病或发病率低的蜂群再进行感染。并用上述方法培育子 2 代、子 3 代。

(2)在以上常规抗病育种的子 3 代基础上, 结合蜜蜂营养杂交方法, 培育中蜂抗囊状幼虫病蜂种: 在意蜂群中分别加入育王框和产浆框, 等工蜂清扫 12 h 后, 在育王框和产浆框中移入意蜂的小幼虫。24 h 后, 将育王框取出, 轻轻取出王台中小幼虫, 保留王台中的蜂王浆, 马上移入中蜂 1 日龄的小幼虫于王台中, 并把育王框及时放入已组织好的中蜂育王群中。然后采用人工饲养蜜蜂幼虫的技术, 定期把意蜂产浆框中的王浆加入中蜂育王框上的王台中, 让中蜂的蜂王幼虫能吃更多的意蜂王浆。王台封盖后第 4 d 选 10 个外形大、发育好的封盖王台加入已组织好的 10 个中蜂交尾群中, 让处女王进行自然交配。蜂王产卵培育的后代即为子 4 代。用同样的方法, 可培育子 5 代和子 6 代。

1.2.3 蜂种抗病力测定 选择群势相近的普通中蜂、子 3 代和子 6 代中蜂各 3 群, 首先检查自然发病率情况, 再分别用上述病毒感染方法感染蜂群, 测定它们的中囊病发病率。方法是分别从试验蜂群中找出工蜂幼虫各 400 个, 用透明薄膜片记好标记并立即放回蜂群。7 d 后, 再用标记过的透明薄膜片贴于巢脾上, 查找出标记的幼虫发病情况, 并统计发病率。

发病率 (%) = (抽查幼虫患病总数 / 抽查幼虫总数) × 100% (1)

1.2.4 蜂群产育力的测定 产育力是蜂王产卵力与工蜂哺育力的总和。以蜂王在某段时间内有效产卵量为指标确定。在蜂群繁殖季节, 用 4.4 cm × 4.4 cm 方格网每隔 11 d 测定蜂群内的封盖子数。

1.2.5 工蜂外部形态测定 本实验选取新旧程度一样的巢脾, 分别放入实验蜂群中并对蜂王进行控制产卵。当该巢脾有幼蜂出房时, 将其抽出, 扫落巢脾上的蜜蜂, 放入生化培养箱中自然羽化待蜂出房

[温度控制在 $(34.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, 相对湿度控制在 35% ~ 45%]。将刚出房 (禁止进食) 工蜂投入到标本瓶中, 向瓶内缓慢注入 CO_2 气体, 待所有蜜蜂均麻醉不动时, 再向瓶内注入 $\varphi = 75\%$ 的酒精, 留存备鉴定。按标准的方法测量工蜂样品的吻长、右前翅长度、右前翅宽度、第 3 腹节背板长度、肘脉指数、右后翅翅钩数和初生重等 7 个指标。

1.2.6 遗传距离测定及聚类分析 参照文献 [5] 的方法, 应用上海生物工程有限公司合成的 GAAACGGGT₅, ACGGATCCT₅, TGAGCCTCA₅, CACCCGAT₅, GGTCGGAGA₅, TGGTCGCAGA₅, TGTTCCACCG₅, CCCTACCGA₅, TTTCGCCGGT₅, CGGCCCGGT₅, CCTAGTCGA₅, TCATCCGAG₅, TGTTCACCG₅, GTACCGCCCG 14 个随机引物进行随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析。根据蜜蜂 DNA 的 RAPD 电泳结果, 把有带的记为 1, 无带的记为 0。利用 Excel 参照 Nei (1972) 的方法计算各品系之间遗传距离 DN。

$$I = \sum_i x_i y_i / \sqrt{\sum_i (x_i)^2 \sum_i (y_i)^2} \tag{2}$$

$$DN = - \ln I \tag{3}$$

(2), (3) 式中, x_i, y_i 表示第 i 条带分别在群体 X, Y 中出现的频率, I 表示群体的遗传同一性。使用 NTSYS 软件进行聚类分析, 构建 UPGMA 聚类图。

1.3 数据处理

实验数据采用 Statview 5.0 的 ANOVA and T-test 进行统计分析, 各处理平均数间用 ANOVA or ANCOVA 进行差异显著性比较及相关分析。

2 实验结果

2.1 中蜂抗囊状幼虫病选育效果

从表 1 可知: 高安中蜂和遂川中蜂感染发病率显著低于其它地方定地饲养的中蜂, 因此我们选择高安中蜂和遂川中蜂蜂群分别培育蜂王和雄蜂, 来培育抗囊状幼虫病中蜂子 1 代。

表 1 江西不同地方饲养的中蜂感染发病率

Tab 1 The infection rate of *Apis cerana cerana* from different places of Jiangxi Province

饲养地	高安	上饶	靖安	遂川	南昌
感染发病率 / %	6.13 ± 3.88 ^a	20.05 ± 5.45 ^b	18.75 ± 3.00 ^b	4.50 ± 2.75 ^a	33.25 ± 9.50 ^b

注: 表中上标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

从表 2 可知: 选育的中蜂子 3 代感染发病率显著低于普通中蜂, 说明感染淘汰育种方法是一种抗病育种有效方法; 中蜂子 6 代感染发病率显著低于中蜂子 3 代, 说明蜜蜂营养杂交方法有助于提高抗囊状幼虫病特性。

表 2 选育的中蜂 (子 3 代和子 6 代) 感染发病率

Tab 2 The infection rate of *Apis cerana cerana* from offsprings

实验蜂群	普通中蜂	子 3 代	子 6 代
感染发病率 / %	22.31 ± 3.08 ^a	10.11 ± 1.47 ^b	4.90 ± 0.53 ^c

注: 表中上标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 选育抗囊状幼虫病中蜂产育力

从表 3 可知: 中蜂子 6 代蜂群的封盖子数显著高于子 3 代和普通中蜂, 分别提高 6.56% 和 10.22%, 这说明经过蜜蜂营养杂方法培育的蜂王产卵力和工蜂哺育力得到了提高。

表 3 选育的中蜂 (子 3 代和子 6 代) 产育力

Tab 3 The fecundity of *Apis cerana cerana* from offsprings

实验蜂群	普通中蜂	子 3 代	子 6 代
封盖子数 / 个	672.50 ± 41.14 ^a	695.63 ± 12.35 ^b	741.25 ± 7.07 ^c

注: 表中上标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2 3 选育抗囊状幼虫病中蜂工蜂形态指标

由表 4 可知:子 1 代、子 2 代、子 3 代工蜂的吻长 (A)、右前翅长度 (B)、右前翅宽度 (C)、第 3 腹节背板长度 (D)、初生重 (G) 与亲本工蜂之间差异不显著;子 4 代、子 5 代、子 6 代工蜂的吻长 (A)、右前翅长度 (B)、右前翅宽度 (C)、第 3 腹节背板长度 (D)、初生重 (G) 与亲本工蜂和子 1 代、子 2 代、子 3 代工蜂之间差异显著的;所有子代工蜂的肘脉指数 (E) 和右后翅的翅钩数 (F) 与亲本工蜂之间差异不显著;子 1、子 2、子 3 代工蜂以上 7 个形态指标之间差异不显著;子 4、子 5、子 6 代工蜂以上 7 个形态指标之间差异不显著,这说明外部形态指标能稳定遗传。

表 4 工蜂形态指标

Tab 4 The morphological indexes of worker bees

指标	A/mm	B/mm	C/mm	D/mm	E	F/个	G/mg
亲本	4.79±0.17 ^a	8.64±0.21 ^a	3.01±0.09 ^a	2.03±0.06 ^a	3.45±0.13 ^a	18.38±1.32 ^a	89.79±0.17 ^a
子 1 代	4.85±0.16 ^a	8.66±0.21 ^a	3.02±0.08 ^a	2.04±0.06 ^a	3.50±0.18 ^a	18.22±1.66 ^a	89.85±0.16 ^a
子 2 代	4.85±0.17 ^a	8.67±0.18 ^a	3.02±0.08 ^a	2.04±0.05 ^a	3.43±0.20 ^a	18.40±1.60 ^a	89.85±0.17 ^a
子 3 代	4.86±0.18 ^a	8.71±0.15 ^a	3.02±0.09 ^a	2.04±0.06 ^a	3.49±0.15 ^a	18.44±1.64 ^a	89.86±0.18 ^a
子 4 代	5.14±0.17 ^b	8.84±0.20 ^b	3.09±0.09 ^b	2.09±0.08 ^b	3.48±0.09 ^a	18.42±1.54 ^a	95.04±0.17 ^b
子 5 代	5.15±0.17 ^b	8.85±0.16 ^b	3.09±0.09 ^b	2.09±0.06 ^b	3.48±0.07 ^a	18.34±1.42 ^a	95.05±0.17 ^b
子 6 代	5.19±0.09 ^b	8.86±0.18 ^b	3.11±0.10 ^b	2.09±0.07 ^b	3.45±0.18 ^a	18.36±1.66 ^a	95.09±0.09 ^b

注:表中上标字母相同表示差异不显著 (P> 0.05), 不同字母表示差异显著 (P< 0.05)。

2 4 遗传距离测定及聚类分析结果

14 个随机引物对基因组 DNA 进行扩增,只有 8 个随机引物扩增出条带,共扩增条带数 44 条,其中 21 条是特异性条带。各引物扩增条带数和特异性条带数见表 5。图 1 是引物 AW14 的 RAID 扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳分离出来的条带。

RAID 扩增计算的遗传距离和聚类结果分别见表 5 和图 2。从表 5 可知:亲本中蜂与子 4 代、子 5 代和子 6 代之间的遗传距离分别为 0.060 39、0.066 42 和 0.062 38 这比亲本中蜂与子 3 之间的 (0.312 4) 增加了;以上数据表明血缘关系越近,遗传距离越小。从图 2 可以更直观的表现出各蜂种的关系,3 是 qb 选育出来的,聚为一类;5 是 4 选育出来的,聚为一类,再和子代 6 聚合;4、5、6 的聚类体和 qb、3 的聚类体聚合后,最后和 yf 聚在一起。这一结果和 6 个品系的遗传进化关系上是一致的。

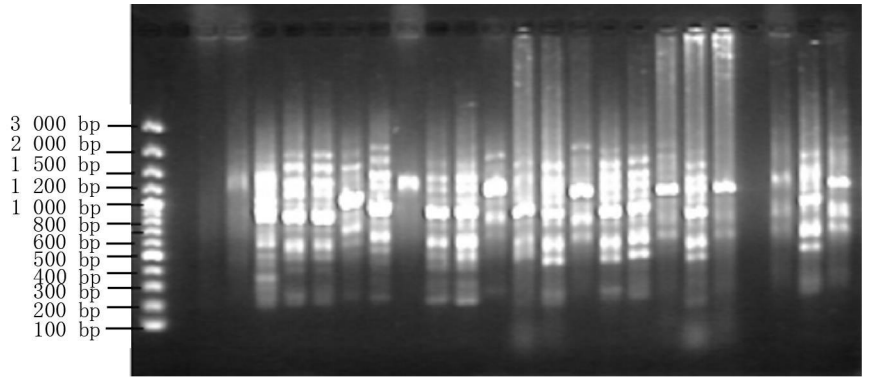


图 1 引物 AW14 扩增结果

Fig 1 PCR product of Primer AW14

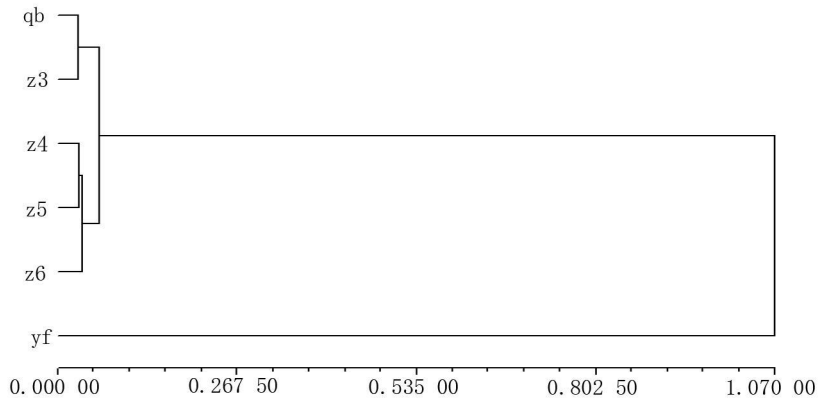


图 2 UPGMA 聚类

Fig 2 The clustering diagram of UPGMA

表 5 RAPD引物及其 PCR扩增产物分析

Tab 5 The RAPD Primers and the analysis of the amplification production

引物	碱基序列 5'→3'	扩增条带数	特异性条带数	多态频率 /%
AW1	GAAACGGGTG	5	1	20.00
AW2	ACGGATCCTG	7	3	42.86
AW3	TGAGCCTCAC	3	2	66.67
AW8	CCCTACCGAC	4	3	75.00
AW10	CGGCCCGGGT	6	2	33.33
AW12	TCATCCGAGG	2	2	100.00
AW13	CGGACGGCGG	9	4	44.44
AW14	CTACCGCCCG	8	4	50.00
总数		44	21	47.72

表 6 RAPD扩增计算的遗传距离

Tab 6 The genetic distance of RAPD

蜂种	亲本中蜂 (♀b)	子 3代 (♂)	子 4代 (♀)	子 5代 (♂)	子 6代 (♀)	意蜂 (♀f)
亲本中蜂 (♀b)	0.000.00					
子 3代 (♂)	0.031.24	0.000.00				
子 4代 (♀)	0.060.39	0.059.38	0.000.00			
子 5代 (♂)	0.066.42	0.063.42	0.032.61	0.000.00		
子 6代 (♀)	0.062.38	0.060.37	0.038.67	0.034.96	0.000.00	
意蜂 (♀f)	1.122.49	1.134.72	1.094.82	0.997.62	0.996.52	0.000.00

3 讨 论

本试验通过常规抗病育种方法定向选育, 结合营养杂交方法, 选育的中蜂子 6代感染发病率显著低于中蜂子 3代; 中蜂子 6代蜂群的产育力比子 3代和普通中蜂分别提高 6.56%和 10.22%, 都达到显著差异。因此我们推测是营养杂交对提高中蜂抗中囊病具有重要的作用, 但中蜂与意蜂营养杂交对提高后代中蜂抗病能力的具体机制还不能确定。1961年周崧等用中蜂蜂王浆培育意蜂小幼虫, 发现羽化后意蜂工蜂翅脉带有中蜂特征, 并推论王浆中可能有遗传信息携带者——核酸存在^[6]。最近研究证实了蜂王浆中含有丰富的 DNA和 RNA, 并且中蜂与意蜂蜂王浆中 DNA呈不同多态性^[7-8]。笔者推测可能是通过蜜蜂营养杂交, 有些遗传物质已经发生了转移或得到表达, 但具体机理还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 杨冠煌. 中华蜜蜂 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
 [2] 郭冬生, 孙亮先, 曾志将, 等. 中华蜜蜂精子介导的基因转移的研究 [J]. 昆虫学报, 2007 50(9): 878—882
 [3] 谢宪兵, 苏松坤, 黄康, 等. 利用 VNIR分子标记鉴定蜜蜂群内蜂王交配次数和雄蜂母系来源 [J]. 昆虫学报, 2008 51(1): 20—25
 [4] 谢宪兵, 曾志将. 中华蜜蜂群内工蜂监督研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007 29(5): 818—820
 [5] 颜伟玉, 曾志将. 蜜蜂 DNA提取纯化与 RAPD反应体系的建立 [J]. 江西农业大学学报, 2003 25(5): 783—786
 [6] 牛春艳, 申春玲, 李玉海, 等. 王浆核算含量的测定和核糖核酸的提取 [J]. 中国养蜂, 1979(6): 17—19
 [7] 邹阳, 黄康, 颜伟玉, 等. 中华蜜蜂王浆中 DNA的提取方法研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007 29(2): 279—281.
 [8] 邹阳, 黄康, 颜伟玉, 等. 中蜂与意蜂王浆中 DNA的 RAPD分析 [J]. 江西农业大学学报, 2007 29(4): 631—633