

刘志勇 曾志将 吴小波 等.人工选育浆蜂与原种意大利蜜蜂 *csd* 基因多态性比较[J].江西农业大学学报 2015 37(2): 323-327.

人工选育浆蜂与原种意大利蜜蜂 *csd* 基因多态性比较

刘志勇^{1,2}, 曾志将¹, 吴小波¹, 颜伟玉¹, 王子龙^{1*}

(1.江西农业大学 蜜蜂研究所,江西 南昌 330045; 2.江西中医药大学 实验动物科技中心,江西 南昌 330004)

摘要:以人工选育的浆蜂为材料,提取每个工蜂样品的基因组 DNA,对 *csd* 基因 3 区进行 PCR 扩增、克隆和测序,最终获得了 13 个浆蜂 *csd* 基因单倍型。对浆蜂与原种意大利蜜蜂 *csd* 基因的多态性进行比较。结果表明浆蜂和原种意大利蜜蜂的核苷酸多样性(π) 分别为 $0.057\ 85\pm 0.004\ 92$ 和 $0.043\ 80\pm 0.005\ 75$,两者之间没有显著差异。系统进化树表明来自浆蜂和原种意大利蜜蜂的单倍型混杂在一起,没有形成完全独立的 2 个分支。群体分析表明浆蜂和原种意大利蜜蜂之间的 *F_{st}* 距离是 0.036 9,两者之间的遗传分化很弱。这些结果说明人工选育对浆蜂 *csd* 基因的多态性没有产生显著影响。

关键词:蜜蜂; *csd*; 多态性; 单倍型; 遗传分化

中图分类号: S892 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2015) 02-0323-05

Comparison of *csd* gene polymorphism between artificially bred high royal jelly producing honeybee and native Italy honeybee

LIU Zhi-yong^{1,2}, ZENG Zhi-jiang¹, WU Xiao-bo¹, YAN Wei-yu¹, WANG Zi-long^{1*}

(1.Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.Science and Technology Center of Experimental Animals, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: In this study, artificially bred high jelly producing honeybees were used as the experimental material. Genome DNA was extracted from each honeybee sample for PCR amplification of the *csd* region 3. PCR products were cloned and sequenced. Finally 13 *csd* haplotypes were obtained. The difference in the polymorphism of *csd* gene between high royal jelly producing honeybee and native Italy honeybee was compared. The results showed that the nucleotide diversity (π) values of *csd* in these two strains are $0.057\ 85\pm 0.004\ 92$ and $0.043\ 80\pm 0.005\ 75$, respectively. Z test indicated that there is no significant difference between the π values of these two strains. Phylogenetic tree showed that *csd* haplotypes do not form two branches reflecting the two strains. Rather, they are well mixed among each other. The *F_{st}* distance between high royal jelly producing honeybee and native Italy honeybee is 0.036 9, indicating a weak genetic differentiation between these two strains. These results indicated that artificial selection has no effect on the polymorphism of *csd* gene in high royal jelly producing honeybees.

Key words: honeybee; *csd*; polymorphism; haplotype; genetic differentiation

收稿日期: 2014-07-20 修回日期: 2015-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260584)、国家蜂产业技术体系资助项目(CARS-45-kxj12)和江西省自然科学基金项目(20114BAB214001)

作者简介: 刘志勇(1969—),男,博士,主要从事蜜蜂分子生物学研究, E-mail: liuzhiyong0791@163.com; * 通信作者: 王子龙,副研究员, E-mail: wzlcqbb@126.com。

csd 基因是决定蜜蜂性别的主调控基因,该基因在蜂群中存在很多等位基因,当蜜蜂个体为二倍体且含有 2 个不同的 *csd* 等位基因时,发育成雌性;当个体为只含有一个 *csd* 等位基因的单倍体时,发育成雄性;而当个体为含有 2 个相同的 *csd* 等位基因的二倍体时,发育成不育的雄性^[1-3]。这一性别决定机制在自然蜂群中运作得很好,能够防止蜂群产生不育的二倍体雄蜂导致能量和资源的浪费。蜜蜂 *csd* 基因是果蝇 *tra* 基因的直系同源体,它编码 1 个 SR 蛋白^[4]。该基因含有 9 个外显子,它们被 2 个大的内含子分成 3 个区域,分别为 1、2、3 区。区域 3 含有 1 个 R(精氨酸)和 S(丝氨酸)丰富的区域和 1 个 P(脯氨酸)丰富的区域,在这 2 个结构域之间是一个高变区。Hasselmann 等^[5-7]、Cho 等^[8]、刘志勇等^[9-10]、Wang 等^[11]先后对意大利蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂和黑大蜜蜂 *csd* 基因的多态性进行了分析,结果表明蜜蜂 *csd* 基因由于受到平衡选择而导致存在很高的多态性,并且 *csd* 基因的多态性是蜜蜂基因组中性区域的 7 倍^[8]。Lechner 等^[12]通过对大量 *csd* 基因序列的分析推测在自然界中可能存在 116~145 个 *csd* 等位基因。

浆蜂是通过引进的原种意大利蜜蜂经过若干世代的定向选择培育而成的遗传稳定的蜂王浆高产品种,其蜂王浆产量显著高于原种意大利蜜蜂^[13],目前已被列入国家种畜禽资源遗产名录。由于人工定向选育使得 *csd* 等位基因发生纯合的机会增多,这有可能会降低 *csd* 基因的多态性,从而影响蜂群的性别比例,该种群就可能灭绝。因此,为了解人工选育后 *csd* 基因与原种意大利蜜蜂的差异,本文对浆蜂与原种意大利蜜蜂 *csd* 基因的多态性进行了比较,以了解育种过程中该基因的变化,为蜜蜂育种实践提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

浆蜂采自浙江江山健康种蜂场有限公司,为江山 2 号意蜂,采集 2 个蜂群,每群随机采集 50~100 只工蜂,放入无水乙醇中,置于 -70 °C 的冰箱保存至 DNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取每只蜜蜂的胸部肌肉用 Animal Genomic DNA Extraction 试剂盒(北京博凯)提取基因组 DNA,采用 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测各 DNA 有无降解;用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, -20 °C 保存备用。共提取 30 只蜜蜂个体的基因组 DNA 用于 PCR 扩增。

1.2.2 引物设计、合成 PCR 扩增引物主要参考 Cho 等^[8]的关于 *csd* 基因多态性的文章中使用的引物序列,并进行了适当修改,由上海生工生物工程有限公司合成,引物名称及其序列如下:

CSD-3FMDC: AATTGGATTTATTAATATAATTTATTATTCAGG

CSD-3RCD: RTCATCTCATWTTTCATTATTCAAT (R=A/G, W=A/T)

1.2.3 PCR 扩增、克隆及测序 以上述提取的基因组 DNA 为模板,采用保真性很高的 LA *Tag* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应条件为:94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 4 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后,取出 5 μL PCR 产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳,在凝胶成像系统中观察结果。用 DNA GEL EXTRACTION 试剂盒(北京博凯)对目的条带进行胶回收。将回收的目的片段与 pEASY-T3 载体(Transgene,北京)进行连接,连接产物转化到 DH_{5α} 感受态细胞,随后将菌液均匀地涂布于含有 Amp, IPTG, X-gal 的平板上,在 37 °C 培养过夜。挑取白色菌落于 5 mL 液体培养基培养 8 h,用 PCR 方法对克隆进行鉴定。阳性克隆进一步送到上海英俊生物技术有限公司进行正反向测序。

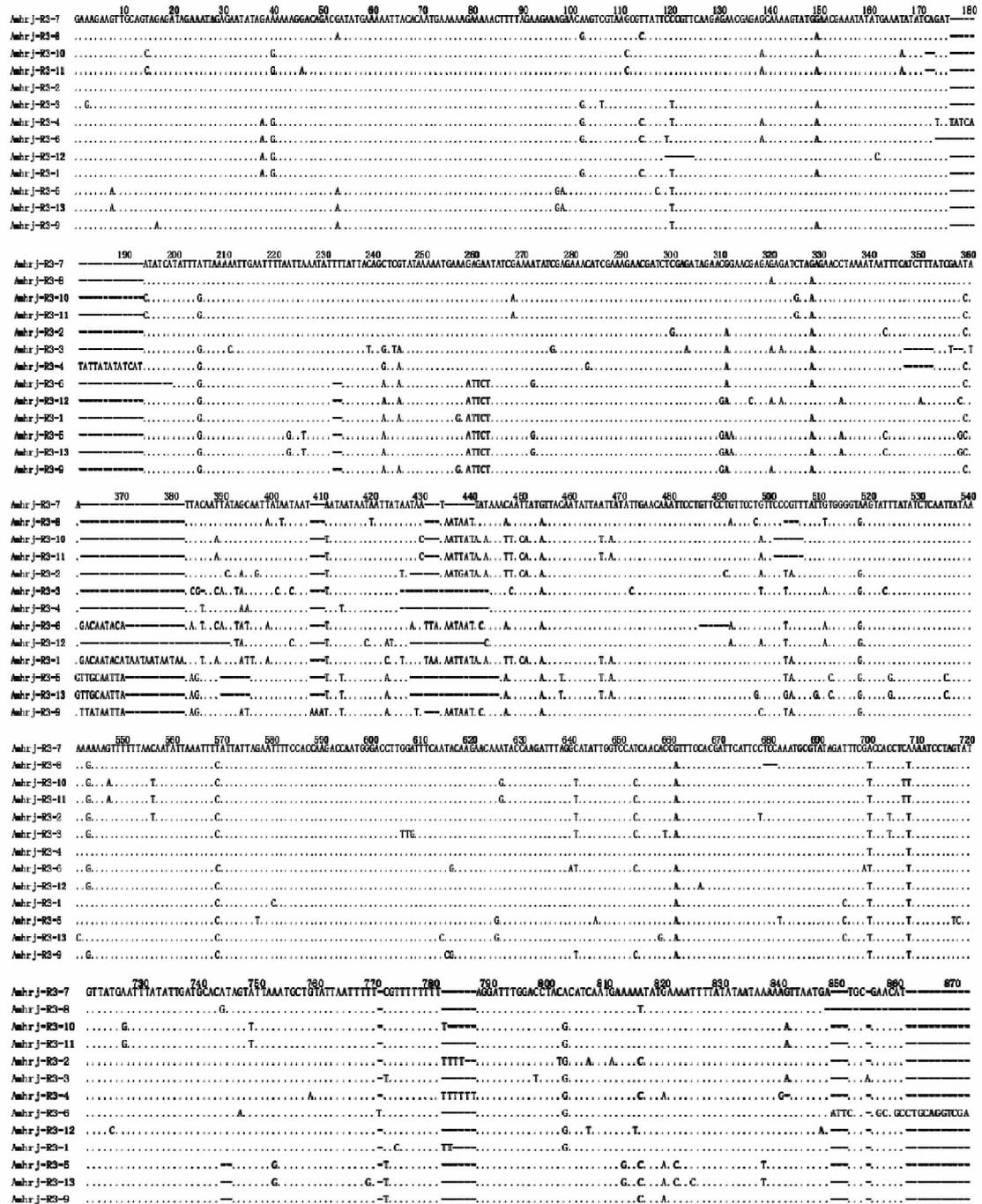
1.2.4 DNA 序列数据处理 测序结果采用 Chromas 软件读取,并经过人工仔细核对,确保 DNA 序列的正确性。将测序获得的每一个克隆的正反向序列去掉载体和引物序列,用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 程序进行拼接获得完整的一致序列;采用 DAMBE 软件分析单倍型;采用 ClustalX1.8 进行多序列比多对,对明显错误的比对进行人工校正;采用 MEGA4.0 软件构建系统进化树;在构树过程中采用最小进化法(ME),Kimura 双参数模型,2 000 次自展重抽样构建系统树;采用 DNAsp5.0 软件分析核苷酸多态性。

2 结果与分析

2.1 浆蜂 *csd* 基因 3 区的单倍型

通过克隆测序,从人工培育的浆蜂群体获得了 13 个 *csd* 基因单倍型,依次命名为 Amhrj1 至 Am-

hrj13(GenBank 登录号: KM199790 至 KM199802))。通过对这 13 个单倍型进行比较分析, 结果共发现 140 个多态位点, 多态位点的位置见图 1。其中单一多态位点为 60 个, 简约信息位点为 80 个。



• 表示碱基相同, -表示插入间隔。

Dot indicates the same bases, - indicates inserting blank.

图 1 浆蜂 *csd* 基因 3 区单倍型及其变异位点

Fig.1 Haplotypes and variable sites in the region 3 of *csd* gene from high royal jelly producing honeybee

2.2 浆蜂和原种意大利蜜蜂 *csd* 基因 3 区核苷酸多样性

由于浆蜂是由原种意大利蜜蜂选育而来的, 本文将浆蜂 *csd* 基因序列与原种意大利蜜蜂 *csd* 基因序列进行比较。原种意大利蜜蜂 *csd* 序列为本实验室在前期研究中所获得的 7 条单倍型序列^[14]。

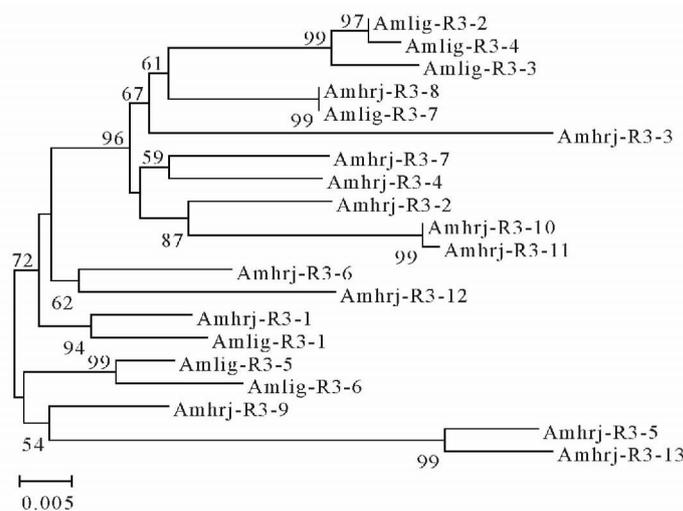
多态性分析表明浆蜂和原种意大利蜜蜂的核苷酸多样性分别为 0.05785 ± 0.00492 和 0.04380 ± 0.00575 (表 1)。Z 检验表明 2 个品种之间的核苷酸多样性没有显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 浆蜂和原种意大利蜜蜂 *csd* 基因 3 区核苷酸多样性
 Tab.1 Nucleotide diversity of haplotypes in the region 3 of *csd* from the high royal jelly producing honeybee and the native Italy honeybee

蜜蜂品种 Honeybee strain	单倍型数量 Haplotype number	核苷酸多样性(π) Nucleotide diversity
浆蜂 High royal jelly producing honeybee	13	0.057 85±0.004 92
原种意大利蜜蜂 Native Italy honeybee	7	0.043 80±0.005 75

2.3 浆蜂和原种意大利蜜蜂 *csd* 基因 3 区的系统进化树

将浆蜂和原种意大利蜜蜂的所有单倍型构建系统进化树 如图 2 所示 来自浆蜂和原种意大利蜜蜂的单倍型混杂在一起 没有形成完全独立的 2 个分支。



Amlig: 原种意大利蜜蜂; Amhrj: 浆蜂。

Amhrj: high production of royal jelly bee; Amlig: *Apis mellifera ligustica*.

图 2 浆蜂和原种意大利蜜蜂 *csd* 基因 3 区单倍型系统树

Fig.2 The gene genealogy of haplotypes in the region 3 of *csd* from the high royal jelly producing honeybees and the native Italy honeybees

2.4 浆蜂和原种意大利蜜蜂间的遗传分化

用浆蜂和原种意大利蜜蜂的所有 *csd* 基因 3 区单倍型进行群体间遗传分化分析 结果表明浆蜂和原种意大利蜜蜂之间的 *Fst* 距离为 0.036 9 ,说明浆蜂和原种意大利蜜蜂之间的遗传分化很弱。

3 结论与讨论

csd 为蜜蜂性别决定关键基因 ,该基因在蜜蜂群体中表现出很高的多态性。本研究通过克隆测序获得了 13 个浆蜂 *csd* 单倍型 ,分析表明浆蜂 *csd* 基因具有较高的多态性 ,这与前人报道 *csd* 基因在意大利蜜蜂、中蜂、大蜜蜂、小蜜蜂和黑大蜜蜂中具有很高的多态性结果一致。

本研究比较了浆蜂与原种意大利蜜蜂 *csd* 基因的多态性。尽管浆蜂 *csd* 基因的核苷酸多样性略高于原种意大利蜜蜂 ,但是 *Z* 检验表明两者差异不显著 ,说明 2 个品种 *csd* 基因核酸序列的变异没达到显著水平。基于 *csd* 单倍型的群体分析结果显示 2 个群体间的 *Fst* 值为 0.036 9 。*Fst* 值通常表示 2 个物种之间的遗传分化水平 ,*Fst*<0.05 表示低水平的遗传分化 ,0.05<*Fst*<0.15 表示中等程度的遗传分化 ,0.15<*Fst*<0.25 表明高水平的遗传分化 ,*Fst*>0.25 表明遗传分化程度非常高^[15]。这表明浆蜂和意大利蜜蜂之间的遗传分化程度很低。这些结果说明经过人工选育后对蜂群整体的遗传结构影响不大。

参考文献:

- [1] Mackensen O. Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Genetics*, 1951, 36(5): 500-509.
- [2] Woyke J. What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony [J]. *Journal of Apiculture Research*, 1963, 2(2): 73-76.
- [3] Beye M. The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee *Apis mellifera* [J]. *Bioessays*, 2004, 26(10): 1131-1139.
- [4] Beye M, Hasselmann M, Fondrk M K, et al. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein [J]. *Cell*, 2003, 114(4): 419-429.
- [5] Hasselmann M, Beye M. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(14): 4888-4893.
- [6] Hasselmann M, Vekemans X, Pflugfelder J, et al. Evidence for convergent nucleotide evolution and high allelic turnover rates at the complementary sex determiner gene of Western and Asian honeybees [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2008, 25(4): 696-708.
- [7] Hasselmann M, Beye M. Pronounced differences of recombination activity at the sex determination locus of the honeybee *a* locus under strong balancing selection [J]. *Genetics*, 2006, 174(3): 1469-1480.
- [8] Cho S, Huang Z Y, Green D R, et al. Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: balancing selection and trans-species polymorphisms [J]. *Genome Research*, 2006, 16(11): 1366-1375.
- [9] 刘志勇, 王子龙, 王欢, 等. 中华蜜蜂 *csd* 多态性分析 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(23): 4911-4917.
- [10] Liu Z Y, Wang Z L, Wu X B, et al. *Csd* alleles in the red dwarf honeybee (*Apis florea*, Hymenoptera: Apidae) show exceptionally high nucleotide diversity [J]. *Insect Science*, 2011, 18(6): 645-651.
- [11] Wang H, Wang Z L, Zeng Z J, et al. Nucleotide diversity based on *csd* gene of the black giant honey bee *Apis laboriosa* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *European Journal of Entomology*, 2013, 110(2): 215-220.
- [12] Lechner S, Ferretti L, Schöning C, et al. Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee *Apis mellifera* [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(2): 272-287.
- [13] 陈世壁, 韩胜明. “浆蜂”生产性能考察实验总结 [J]. *中国养蜂*, 1992, 44(1): 2-5.
- [14] Wang Z, Liu Z, Wu X, et al. Polymorphism analysis of *csd* gene in six *Apis mellifera* subspecies [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3): 3067-3071.
- [15] Wright S. *Evolution and the genetics of populations* [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 79-103.