

熊蜂 ISSR-PCR 体系的建立与优化及其在亲缘关系分析中的应用

耿金虎^{1,*}, 黄 强^{1,2}, 徐希莲¹, 曾志将^{2,*}

(1. 北京市农林科学院农业科技信息研究所, 北京 100097; 2. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 以小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* Pérez 为实验材料, 建立并优化简单序列重复区间 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 扩增多态反应体系, 并运用 ISSR 标记和 NTSYS 聚类软件分析群内亲缘关系和亚家系组成。结果表明: 在 10 μL 的 PCR 反应体系中各组分的适宜终浓度为 1 × PCR 缓冲液、0.3 mmol/L 反应底物、1.25 μmol/L 引物、3 mmol/L 镁离子、2.5 U Taq 酶和 8.18 ~ 23.76 μg/mL DNA 模板。用此优化后的反应体系对小峰熊蜂基因组 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增, 能有效分析群内亲缘关系和亚家系组成。

关键词: 熊蜂; 小峰熊蜂; ISSR-PCR; 聚类分析; 亲缘关系; 交配

中图分类号: Q961 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)03-223-227

Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system and its application in the genetic coefficient analysis of *Bombus hypocrita* Pérez (Hymenoptera: Apidae)

GENG Jin-Hu^{1,*}, HUANG Qiang^{1,2}, XU Xi-Lian, ZENG Zhi-Jiang^{2,*} (1. Institute of Information on Science and Technology of Agriculture, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this study, the ISSR-PCR reaction system was established, optimized and then used to analyze the genetic coefficient and the subfamily composition of *Bombus hypocrita* Pérez. The optimized reaction system was established as follows: 1 × PCR buffer, 0.3 mmol/L dNTP, 1.25 μmol/L primer, 3 mmol/L Mg²⁺, 2.5U Taq polymerase and 8.18 – 23.76 μg/mL DNA. Our results indicated that ISSR markers obtained with this optimized system could be effectively used to analyze the genetic coefficient and subfamily composition.

Key words: Bumble bee; *Bombus hypocrita*; ISSR-PCR; clustering analysis; genetic coefficient; copulation

熊蜂 *Bombus* spp. 为膜翅目 (Hymenoptera) 蜜蜂科 (Apidae) 熊蜂属 *Bombus* 昆虫的总称, 是多食性的社会性昆虫, 进化上处于从独居到营社会性生活的中间阶段。虽然熊蜂的社会性程度低于蜜蜂和膜翅目其他一些社会昆虫, 但是熊蜂群内仍有着明确的社会分工。大部分熊蜂种都是单雄交配, 只有少数熊蜂种为双雄或多雄交配 (Goulson, 2003; Payne *et al.*, 2003)。熊蜂既是研究昆虫社会行为机制的理想模式昆虫, 也是野生植物和温室作物最重要的授粉昆虫之一 (Sommeijer and De Ruijter, 1999; Mommaerts *et al.*, 2006)。

亲缘关系对昆虫社会行为的影响是昆虫学家研究的焦点问题 (Bourke and Ratnieks, 2000; Alaux *et*

al., 2004)。蜜蜂属昆虫多为多雄交配, 通常由几个或十几个亚家系组成, 全同胞姐妹之间的亲缘关系指数为 0.75, 半同胞姐妹之间亲缘关系指数为 0.25 + 0.5/n (n 为与蜂王交配的雄蜂数量) (Hamilton, 1964a, 1964b)。由于其群内工蜂与其他工蜂所产雄蜂卵之间的亲缘关系指数小于工蜂与蜂王所产雄蜂卵的亲缘关系指数, 工蜂一般选择培育蜂王所产的雄蜂卵, 而清除其他工蜂所产的雄蜂卵, 从而形成工蜂监督 (worker policing) 机制 (Ratnieks and Visscher, 1989; Foster and Ratnieks, 2001; Martin *et al.*, 2004; Pirk *et al.*, 2004; Beekman and Oldroyd, 2005)。但是在熊蜂中, 由于多数蜂种的蜂群一般由一个亚家系组成, 工蜂之间

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30600453); 北京市自然科学基金项目 (6072008)

* 通讯作者 Authors for correspondence, E-mail: gengjh@agri.ac.cn; E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2008-11-24; 接受日期 Accepted: 2009-01-18

亲缘关系为 0.75, 所以工蜂与其他工蜂所产雄蜂卵之间的亲缘关系指数大于工蜂与蜂王所产雄蜂卵间的亲缘指数。按照工蜂监督与亲缘选择理论, 熊蜂工蜂应该选择培育自己或其他工蜂所产雄蜂卵, 清除蜂王所产雄蜂卵。然而, 熊蜂工蜂实际仍然选择培育蜂王所产雄蜂 (Cnaani *et al.*, 1997; Alaux *et al.*, 2004)。目前, 对此现象产生的可能原因与其机制仍存较大争议 (Ayasse *et al.*, 1999), 尚需要借助简便且经济的手段与方法进一步系统开展熊蜂行为生态学研究, 以明确熊蜂社会行为机制。

相对于形态标记、细胞标记以及生化标记等传统标记而言, 分子标记技术已经在亲缘关系分析 (Estoup *et al.*, 1994; Takahashi and Nakamura, 2003; Lopez-Vaamonde *et al.*, 2004)、生物品种鉴别、系统发育、遗传多样性等方面显示出重要作用 (Huang and Sun, 2000)。其中, ISSR 标记是一项基于微卫星序列, 兼具 SSR 和 RAPD 的优点, 具有模板用量少、操作简单, 并且符合孟德尔遗传、遗传稳定性强、多态性丰富等特点 (Ziethiewicz *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2007), 并作为研究手段已应用于蜜蜂亲缘关系分析中 (Paplauskienė *et al.*, 2006)。本研究旨在建立熊蜂 ISSR-PCR 反应体系, 为熊蜂群内亲缘关系及亚家系组成的研究提供研究手段与实验方法, 从而有助于从遗传角度研究和解

释熊蜂的社会行为及遗传多样性等问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2008 年 5 月上旬在河北省兴隆县雾灵山地区采集小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* Pérez 蜂王 98 头, 带回室内, 分置于小盒 (6.5 cm × 10 cm × 7 cm) 中, 并加入 4~5 头意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 工蜂刺激小峰熊蜂蜂王产卵 (Roseler, 1985; Duchateau and Velthuis, 1988; Duchateau, 1989; Sladen, 1989)。于 29℃, RH 60% 的黑暗环境下, 以足量 60% 糖液及其与新鲜花粉配制成的花粉团饲喂蜂群。选取同一日龄产卵的 5 群小峰熊蜂为实验蜂群, 记为 colony3, colony5, colony6, colony7 和 colony8, 分别有工蜂 44, 33, 10, 66 和 47 头。

1.2 实验方法

1.2.1 熊蜂基因组 DNA 的提取: 采用 chelex-100 DNA 提取法 (Walsh, 1991)。用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 ISSR-PCR 反应和扩增产物电泳检测: 通过对模板 DNA 含量、Mg²⁺ 用量、dNTP 用量、10 对不同引物序列 (A1 ~ A10) 及其用量和对退火温度设置不同梯度 (表 1), 依次对反应体系进行筛选优化。

表 1 用于 ISSR-PCR 反应体系筛选优化的反应参数

Table 1 Parameters used to optimize ISSR-PCR reaction system

因素 Factors	反应参数 Reaction parameters
退火温度 Annealing temperature (°C)	49, 50, 51, 52, 53, 54
DNA (102.3 - 297 μg/mL) (μL)	0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8
引物 Primer (12.5 μmol/L) (μL)	0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1
dNTP (10 mmol/L) (μL)	0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0
Mg ²⁺ (25 mmol/L) (μL)	0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5

PCR 循环参数如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 退火 1 min (退火温度视引物不同而不同), 72℃ 延伸 2 min, 循环 40 次, 72℃ 延伸加时 10 min。

PCR 产物电泳: 取 5 μL PCR 产物和 1 μL 上样缓冲液 (6 × loading buffer) 混匀, 上样于 1.5% 的琼脂糖凝胶, 4 V/cm 电泳, 于凝胶成像系统上拍照。

1.3 数据处理

每头熊蜂 ISSR-PCR 扩增出条带的记为 1, 没有条带的记为 0, 据此建立 Excel 表格。用 NTSYS 软件

计算个体间 Nei's 相似系数, 作 UPGMA 聚类图, 得到群内熊蜂个体间的遗传相似系数和各亚家系组成。

2 结果与讨论

2.1 ISSR-PCR 反应体系建立

对反应各组分进行筛选优化, 最后确定 5 对有效多态引物和 ISSR-PCR 最佳反应体系, 优化后体系见表 2。不同引物的退火温度也不完全相同, 各引物序列和退火温度见表 3。

表 2 PCR 反应体系中各组分的优化结果

Table 2 The optimal PCR composition

成分 Components	用量 Amount (μL)	适宜终浓度 Optimal final concentration
10 \times PCR Buffer	1.0	1 \times
Mg^{2+} (25 mmol/L)	1.2	3 mmol/L
dNTP (10 mmol/L)	0.3	0.3 mmol/L
引物 Primer (12.5 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	1.25 $\mu\text{mol/L}$
Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (5 U/ μL)	0.5	2.5 U
DNA (102.3 - 297 $\mu\text{g/mL}$)	0.8	8.18 - 23.76 $\mu\text{g/mL}$
H_2O	5.2	-
总计 Total	10.0	-

表 3 引物序列及退火温度

Table 3 Sequence and annealing temperature of primers

引物 Primers	序列 Sequences (5' - 3')	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
A1	CTGCTGGTGGTGGTGGTGA	53
A2	AGCAGCAGCAGCAGCAGCG	53
A3	AGACAGACAGACAGACCG	53
A5	ATGATGATGATGATGGA	54
A8	ACACACACACACACT	54

2.2 ISSR 扩增结果

用以上 5 对引物进行基因组 DNA 扩增(如图 1), 个体扩增出的条带多态性较强, 通常为 2 ~ 15 条, 并且重复性较好。根据扩增结果运用 NTSYS 软件计算出遗传相似系数(如图 2)。

2.3 亲缘关系分析

根据熊蜂蜂王和工蜂为二倍体, 雄蜂为单倍体, 同一亚家系成员亲缘关系指数为 0.75 的标准而划分, 3 号, 5 号, 6 号, 7 号和 8 号这 5 个实验蜂群分别由 2, 1, 2, 1 和 1 个亚家系组成, 也就是说蜂王分别与 1 头, 1 头, 2 头和 1 头雄蜂进行了有效

交配, 这也与小峰熊蜂自然交配情况相吻合 (Payne *et al.*, 2003), 同时说明 ISSR 标记体系能够有效分析小峰蜂群内亲缘关系和亚家系组成。

用微卫星测定遗传结构比较费时, 操作也比较繁琐, 而 RAPD 的遗传稳定性也不是非常理想 (Jiang C *et al.*, 2007; Jiang F *et al.*, 2007)。ISSR 标记不但简单经济, 条带容易分析, 而且遗传稳定, 重复性好。结合上述研究结果分析, 本研究所确立的 ISSR 反应体系是可行的, 将为熊蜂亲缘关系及遗传结构的分析提供一种有效方法与手段。



图 1 A1 引物在 colony8 扩增图

Fig. 1 PCR amplification of colony8 with primer A1

1 - 24: colony8 中 24 个不同个体 Different individuals in colony8.

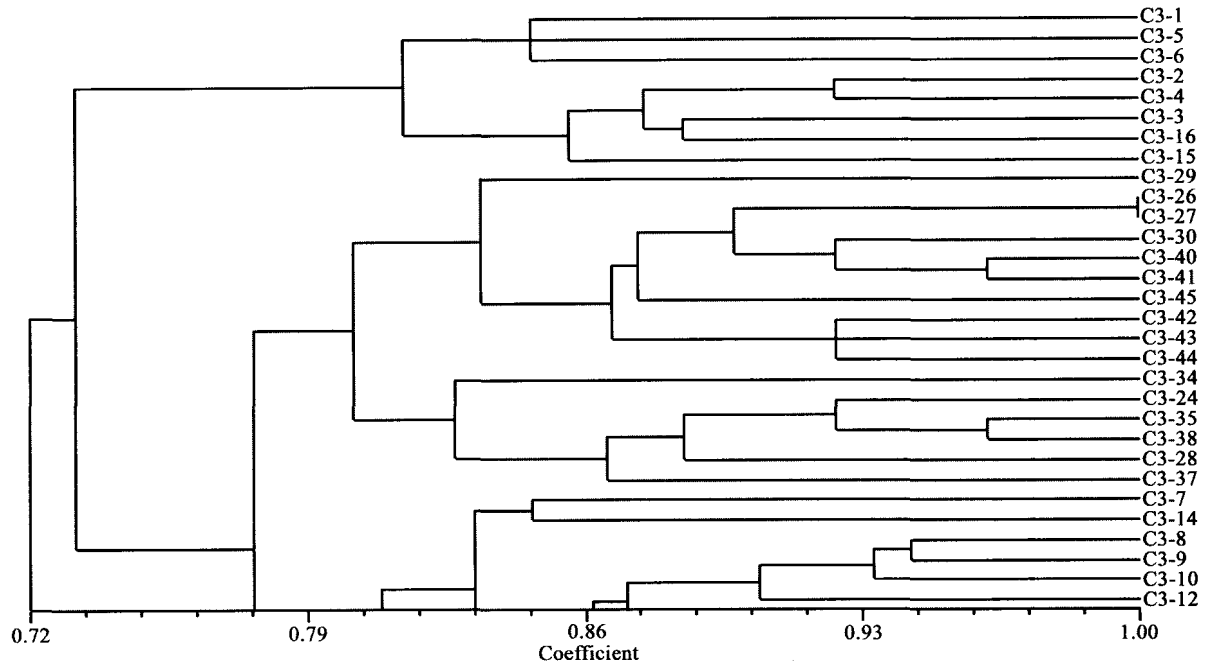


图2 三号蜂群间的亲缘关系系数

Fig. 2 The genetic coefficient of colony3

参考文献 (References)

- Alaux C, Savarit F, Jaisson P, Hefetz A, 2004. Does the queen win it all? Queen-worker conflict over male production in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Naturwissenschaften*, 91: 400-403.
- Ayasse M, Birnbaum J, Tengö J, Doorn AV, Taghizadeh T, Francke W, 1999. Caste- and colony-specific chemical signals on eggs of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Chemoecology*, 9: 119-126.
- Beekman M, Oldroyd BP, 2005. Honeybee workers use cues other than egg viability for policing. *Biol. Lett.*, 1(2): 129-132.
- Bourke AFG, Ratnieks FLW, 2000. Kin-selected conflict in the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 347-355.
- Cnaani J, Borst DW, Huang ZY, Robinson GE, Hefetz A, 1997. Cast determination in *Bombus terrestris*: Difference in development and rates of JH biosynthesis between queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.*, 4: 373-381.
- Duchateau MJ, 1989. The Regulation of Colony Development in the Bumble Bee, *Bombus terrestris*. Ph. D. Dissertation, University of Utrecht, Utrecht.
- Duchateau MJ, Velthuis HHW, 1988. Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. *Behaviour*, 107: 186-207.
- Estou PA, Solignac M, Cornuet JM, 1994. Precise assessment of the number of patrines and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 258: 1-7.
- Foster KR, Ratnieks FLW, 2001. Convergent evolution of worker policing by egg eating in the honeybee and common wasp. *Proc. Biol. Sci.*, 268 (1 463): 169-174.
- Goulson D, 2003. *Bumbles Bees: Their Behaviour and Ecology*. Oxford University Press, Oxford, UK. 41-51.
- Hamilton WD, 1964a. The genetical evolution of social behaviour. I. *J. Theor. Biol.*, 7: 1-16.
- Hamilton WD, 1964b. The genetical evolution of social behaviour. II. *J. Theor. Biol.*, 7: 17-52.
- Jiang CH, Wang YY, Sun YH, 2007. Application advance of molecular marker techniques of SSR and ISSR. *Chinese Tobacco Science*, 28 (2): 1-5. [蒋彩虹, 王元英, 孙玉合, 2007. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展. *中国烟草科学*, 28 (2): 1-5]
- Jiang F, Gao HY, Chen XP, Li T, Yang L, Zheng SQ, 2007. Inter simple sequence repeats system optimization and fingerprinting for Longan. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 22 (3): 256-260. [姜帆, 高慧颖, 陈秀萍, 李韬, 杨凌, 郑少泉, 2007. 龙眼 ISSR-PCR 反应体系的优化及指纹图谱初探. 22 (3): 256-260]
- Lopez-Vaamonde C, Koning JW, Jordan CJ, Bourke AFG, 2004. A test of information use by reproductive bumblebee workers. *Anim. Behav.*, 68: 811-818.
- Martin SJ, Chaline N, Oldroyd BP, Jones GR, Ratnieks FLW, 2004. Egg marking pheromone of anarchistic worker honeybees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol.*, 15(5): 839-844.
- Mommaerts V, Sterk G, Smaghe G, 2006. Hazards and uptake of chitin synthesis inhibitors in bumblebees *Bombus terrestris*. *Pest Manag. Sci.*, 62: 752-758.
- Paplauskienė V, Čeksterytė V, Pašakinskienė I, Tamašauskienė D, Račys J, 2006. The use of ISSR method for the assessment of bee

- genetic diversity. *Biologija*, 3: 16 – 20.
- Payne CM, Lavery TM, Lachance MA, 2003. The frequency of multiple paternity in bumble bee (*Bombus*) colonies based on microsatellite DNA at the B10 locus. *Insect. Soc.*, 50: 375 – 378.
- Pirk CWW, Neumann P, Hepburn R, Moritz RFA, Tautz J, 2004. Egg viability and worker policing in honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(23): 8 649 – 8 651.
- Ratnieks FLW, Visscher PK, 1989. Worker policing in the honeybee. *Nature*, 342: 796 – 797.
- Roseler PF, 1985. A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (Apidae, Bombini) colonies in captivity. *Apidologie*, 16(2): 165 – 170.
- Sladen FWL, 1989. *The Humble-bee: Its Life History and How to Domesticate It*. 2nd ed. Logaston Press, London, UK. 273 pp.
- Sommeijer MJ, De Ruijter A, 1999. Insect Pollination in Greenhouses. Proceedings of the specialists' meeting in Soesterberg, The Netherlands, 30 September to 2 October 1999, Universiteit Utrecht, Utrecht. 220 pp.
- Takahashi J, Nakamura J, 2003. A scientific note on levels of polyandry of 2 queens of the Himalayan giant honeybee, *Apis laboriosa*. *Apidologie*, 34: 191 – 192.
- Walsh PS, 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 507.
- Zhao Q, Zhuang DH, Du H, Xie QX, 2007. Preliminary application of ISSR molecular marker in the genetic relationship analysis of *Phalaenopsis* cultivar/strains. *Journal of Shantou University*, 22(4): 66 – 70. [赵谦, 庄东红, 杜虹, 谢启鑫, 2007. ISSR 在蝴蝶兰亲缘关系分析中的初步应用. 汕头大学学报, 22(4): 66 – 70]
- Ziethiewicz DE, Rafłski A, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176 – 183.

(责任编辑: 袁德成)