

中蜂与意蜂营养杂交后代随机扩增多态 DNA 研究

谢宪兵^{1,3} 苏松坤² 颜伟玉¹ 郭冬生¹ 曾志将¹

1. 江西农业大学 动物科学技术学院 江西 南昌 330045; 2. 浙江大学 动物科学学院 浙江 杭州 310029; 3. 泉州师范学院 福建 泉州 362000

摘要以中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 为实验材料进行中华蜜蜂与意大利蜜蜂营养杂交, 然后运用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术检测亲本和营养杂交后代的 DNA 多态性。结果表明, 经过营养杂交, 亲本蜜蜂与营养杂交子代的遗传相似系数变小, 中华蜜蜂和意大利蜜蜂的特有 DNA 条带发生了转移, 说明通过营养杂交, 基因可能发生了转移。

关键词 中华蜜蜂; 意大利蜜蜂; 营养杂交; RAPD

中图分类号: S895.3 文献标识码: A

XIE Xian bing^{1,3} SU Song kun² YAN Wei yu¹ GUO Dong sheng¹ ZENG Zhi jiang¹ (1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 3. College of Quanzhou Normal University, Quanzhou Fujian 362000, China)

Studies on the genetic diversity detected by RAPD in the offspring of the nutritional crossbreed between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.) 2005, 3(6): 741-744

Abstract The experiments were conducted with *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. In this study, nutritional hybridizations were carried out between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to detect genetic diversity of the workers, which were the offspring of parent colonies and hybridization colonies. The results showed that the genetic similarity coefficient between the parent and the nutritional crossbreeding offspring tended to diminish. And some special bands were transferred mutually between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. All of these indicate the occurrence of probable gene transfer in honeybees after nutritional hybridization.

Key words *Apis cerana cerana*; *Apis mellifera ligustica*; nutritional crossbreed; RAPD

随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术是由 Williams 和 Welsh 两个研究小组同时发展起来的一项在 DNA 分子水平上进行大分子多态性检测的技术。RAPD 技术已成功应用在蜜蜂研究中。

人们对同一蜂种不同蜜蜂品种之间的营养杂交研究较早。Ruttner、Smaragdova、Rinderer 等系统研究了西方蜜蜂不同品种之间营养杂交特性, 并发现当甲蜜蜂品种的工蜂哺育乙蜜蜂品种的幼虫后, 这些幼虫发育成的工蜂则不同程

收稿日期: 2005-05-09

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (33005) (江西省农业科技攻关项目)

作者简介: 谢宪兵, 1980-年生, 男, 博士研究生, 主要从事蜜蜂科学研究工作。

通讯作者: 曾志将, 男, 教授, 主要从事蜜蜂科学研究工作。Tel: 791-3813044; E-mail: zcs1965@sina.com

度具有甲蜜蜂品种的形态和体色特性^[1]。

国内许多养蜂工作者利用我国同时具有大量饲养东方蜜蜂和西方蜜蜂的优势先后进行过中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius^[2] 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinol^[3] 之间的营养杂交实验^[4]。发现把中蜂的幼虫放入意蜂群中饲喂后中蜂腹部出现了意蜂特有的 2~3 条浅黄环^[5]。同理当把意蜂的幼虫放入中蜂群中饲喂后结果意蜂也具有中蜂的某些体色特性^[6]。王^[7]等也研究了东方蜜蜂和西方蜜蜂互相交换子脾进行哺育的行为^[8]。至今还没有人运用 RAPD 技术在分子水平上检测中蜂与意蜂营养杂交工蜂的特性^[9]。于此我们开展了本项研究。结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验蜂群来源 实验蜂群为江西农业大学动物科技学院饲养的中蜂与意蜂。

1.1.2 主要试剂 蛋白酶 K、RNA 酶 A、平衡酚、Taq 酶、dNTP 物、DL2000 + 15000 的 DNA Mark 物、Ringer buffer、Wilson buffer、蛋白酶 K、RNA 酶 A、乙酸钠、TE 缓冲液等物。

1.2 实验方法

1.2.1 蜜蜂营养杂交 ① 亲本蜂群的组织 选择颜色较纯的中蜂与意蜂各 3 群。分别将它们合并成群势很强的中蜂群 A 和意蜂群 B。整个实验过程对蜂群进行奖励饲喂。^② 中蜂与意蜂营养杂交 在蜂群 A 中加入育王框。将工蜂清理 12 h 后。在王台中移入 A 群中的小幼虫。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。移入蜂群 B 中。1 日龄小幼虫。把育王框插入蜂群 A 中哺育 12~24 h。抽出育王框。轻轻抖落育王框上的蜜蜂。并将育王框插入蜂群 B 中继续哺育。然后定期人工饲喂中蜂的新鲜王浆。王台封盖后第 4 d。选择外形大的王台。安装在框式贮王笼中。并把框式贮王笼放入蜂群 B 中。待处女蜂王成熟时。取意蜂雄蜂的精液。对处女蜂王进行人工受精。放入已经组织好的小群中。在巢门口安上隔王栅。防止蜂王出巢。自然交尾。蜂王产卵。培育后

代即为营养杂交意蜂子 1 代。用同样方法。物培育营养杂交意蜂子 2 代和子 3 代。物理在蜂群 B 中加入育王框。将工蜂清理 12 h 后。在王台中移入 B 群中的小幼虫。4 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。移入蜂群 A 中。1 日龄幼虫。把育王框插入蜂群 B 中哺育 12~24 h。抽出育王框。轻轻抖落育王框上的蜜蜂。并将育王框插入蜂群 A 继续哺育。然后定期人工饲喂意蜂的新鲜王浆。王台封盖后第 4 d。选择外形大王台。分别诱入已组织好的中蜂交尾群中。处女蜂进行自然交尾。蜂王产卵。培育的后代即为营养杂交中蜂子 1 代。用同样的方法。物培育营养杂交中蜂子 2 代。③ 蜜蜂样品的准备 在以上各蜂群中。随机采集活体幼龄工蜂。并立即浸入 75% 的酒精中。密闭待用。

1.2.2 蜜蜂基因组 DNA 的提取 取工蜂胸部肌肉。置于 1.5 mL 离心管中。用眼科手术剪将其剪碎。加入 560 μ L DNA 抽提液。再加入 RNA 酶 A 10 mg/mL。4 μ L。置于恒温箱中 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h。取出。加入蛋白酶 K 10 mg/mL。充分混匀。用封口膜将离心管盖封好。55 $^{\circ}$ C 消化 12~24 h。加入等体积的苯酚。缓慢颠倒离心管 10 min。使溶液的两相充分混匀。以 12000 μ min 离心 12 min。将上清液移至另一干净离心管。加入等体积的苯酚。氯仿。戊醇。5:24:1。充分混匀。离心。取上清液。加入等体积氯仿。戊醇。4:1。重复上述抽提步骤。最后获得的上清液中加入无水乙醇 800 μ L 和 3 mol/L NaAc 45 μ L。以 12000 μ min 离心 10 min。小心倒去液体。用 75% 乙醇洗涤 2 次。用琼脂糖凝胶和紫外分光光度计检测提取的 DNA 浓度和纯度。将 DNA 自然晾干后。溶于适量 TE 中。-20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.3 DNA 浓度和纯度的检测 琼脂糖凝胶电泳检测。取 10 μ L 待测 DNA 溶液和 2 μ L 加样缓冲液。Loading Buffer。混匀。上样于 1% 的琼脂糖凝胶。00 V 电泳 1 h。待样品跑到 4 \times 5 处时。把胶取下。放于 10% 的 EB 中染色 10 min。紫外灯下观察电泳结果。并拍照保存。结果见图 1。

分光光度法检测。取 6 μ L 待测 DNA 溶液。稀释 500 倍至 3 mL。分别在紫外分光光度计

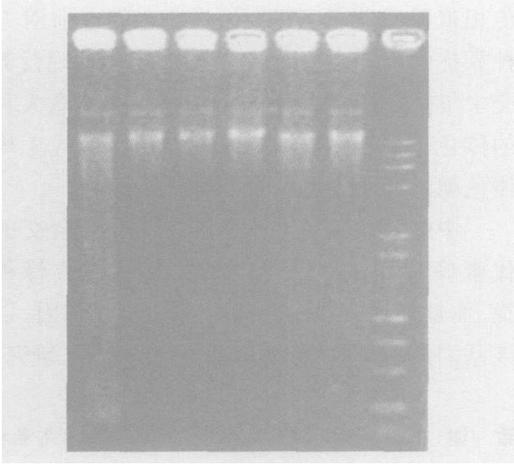


图 1 蜜蜂基因组 DNA

Fig 1 Genomic DNA extracted from honeybee

260 nm 和 280 nm 处测定其 OD 值物

DNA 浓度 $g/mL = OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50$

DNA 纯度 = OD_{260} / OD_{280}

1.2.4 PCR 反应及 RAPD 产物分离 所用的 10 对 RAPD 随机引物由上海生物工程有限公司合成物序列如下举

- AW₂₀₄₂₄ 举 AAACGGG TG 物 W₂₀₄₂₅ 举 CCGGAT CCTG 物
- AW₂₀₄₂₆ 举 GAGCCTCAC 物 W₂₀₄₂₇ 举 ACCCGGATG 物
- AW₂₀₄₂₈ 举 GTCGGAGAA 物 W₂₀₄₂₉ 举 GGTGCAGA 物
- AW₂₀₄₃₀ 举 GTTCCACGG 物 W₂₀₄₃₁ 举 CCTACCGAC 物
- AW₂₀₄₃₂ 举 TTGCCCGG T 物 W₁₆₇₅₄ 举 GGCCCGG GT 物

最佳 PCR 反应条件的建立举各组成份的优化结果见表 1 物

表 1 PCR 反应体系中各组成份的优化结果

Table 1 The optimal PCR components composition

成 分	量
10× PCR Buffer 物 00 mmol/L KCl 物 80 mmol/L NH ₄ SO ₄ 物 00 mmol/L Tris HCl 物 9.0 mmol/L NP 40 物	2.0 μL
MgCl ₂ 物 25 mmol/L 物	2.4 μL
dNTPs 物 0 mmol/L 物	0.4 μL
ddH ₂ O	12.3 μL
Taq 酶 物 5~5 U 物 物	0.3 μL
H303 引物 物 0 μmol/L 物	1.0 μL
DNA 模板 物 终浓度 20~100 ng 物 物	1.6 μL
总量	20 μL

注举 1、2、6 组的模板 DNA 浓度为 1.6 μL 物、4、5 组的模板 DNA 浓度为 0.8 μL + 0.8 μL 水 物 DNA 模板浓度为终浓度 物 其余为初始浓度 物

PCR 循环参数如下举 4 °C 预变性 5 min 物 94 °C 变性 60 s 物 6 °C 退火 60 s 物 2 °C 延伸 120 s 物 2 °C 延伸 10 min 物 循环 40 次 .

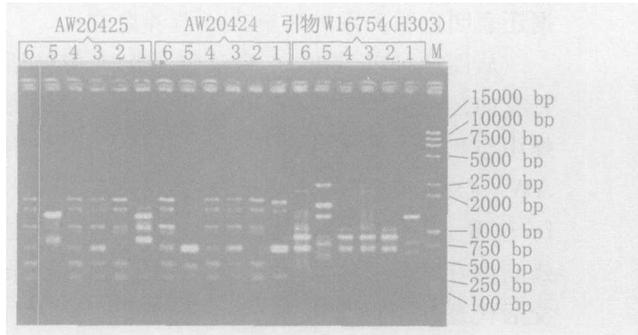
PCR 产物电泳举 10 μL PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液 物 Loading Buffer 物 混匀 物 上样于 1% 的琼脂糖凝胶 物 00 V 电泳 2 h 物 特样品跑到 4ct5 处 物 将胶取下 物 放于 10% 的 EB 中染色 10 min 物 紫外透射台上观察扩增结果 物 在全自动数码成像及分析系统上拍照 物

1.2.5 数据处理 根据蜜蜂 DNA 的 RAPD 标记检测结果 物 选取清晰可辨的多态谱带用于数据统计分析 物 有带的记为 1 物 无带的记为 0 物 建立数据库 物 利用 Excel 物 按公式 $GS = 2a / (a + b)$ 物 其中 a 为 2 个个体都有的多态条带数目 物 为 X 个体特有带条数 物 为 Y 个体特有带条数 物 计算蜜蜂个体间的遗传相似系数 物

2 实验结果

2.1 DNA 提取

DNA 的提取质量往往是决定 RAPD 分析成功与否的关键 物 电泳结果表明 物 所提取的基因组 DNA 主带清晰、无降解 物 电泳图 物



1~6 对应电泳图分别是亲本意蜂、亲本中蜂、杂交意蜂子 1 代、杂交意蜂子 2 代、杂交中蜂子 1 代和杂交意蜂子 3 代 物

图 2 引物 W₁₆₇₅₄ 物 H303 物 AW₂₀₄₂₄ 和 AW₂₀₄₂₅ 对 6 群蜜蜂的扩增图谱

Fig 物 PCR products of primer W₁₆₇₅₄ 物 H303 物 AW₂₀₄₂₄ and AW₂₀₄₂₅

2.2 RAPD 扩增结果

用以上 10 对随机引物对基因组 DNA 进行扩增 物 然后从中筛选出了 3 对能把所有蜂群都扩增出清晰条带的引物 物 电泳图 物 根据图 2 计

算出各蜂群之间的遗传相似系数

表2 各蜂群之间的遗传相似系数

Table 2 The genetic similarity coefficient among the 6 colonies

蜂群代号	1	2	3	4	5	6
1	1.000					
2	0.3723	1.000				
3	0.5278	0.4141	1.000			
4	0.5397	0.4141	0.9630	1.000		
5	0.3833	0.6667	0.4175	0.4296	1.000	
6	0.5278	0.4141	0.7778	1.000	0.4175	1.000

注: 1~6 对应蜂群代号分别是亲本意蜂、亲本中蜂、杂交意蜂子1代、杂交意蜂子2代、杂交中蜂子1代和杂交意蜂子3代

从表2可以看出, 亲本中蜂与亲本意蜂之间的遗传相似系数为0.3723, 亲本意蜂与营养杂交意蜂子1代、子2代和子3代之间的遗传相似系数分别为0.5278、0.5397和0.5278, 亲本中蜂与营养杂交意蜂子1代、子2代和子3代之间的遗传相似系数都是0.4141, 这比亲本中蜂与亲本意蜂之间的0.3723增加了0.0418, 亲本中蜂、亲本意蜂与杂交中蜂子1代之间的遗传相似系数分别为0.6667和0.3833, 这一现象也符合以上规律, 另外以上数据还表明血缘关系的影响大于营养杂交。

从图2可以看出, 有些条带是亲本中蜂所特有的, 经过营养杂交之后, 在营养杂交子代意蜂中也出现了亲本中蜂特有的条带, 例如引物AW₂₀₄₂₅对亲本中蜂进行扩增, 在分子量2000 bp位置上有明显的特殊条带, 亲本意蜂则没有, 但经过营养杂交之后, 在杂交后代意蜂中也出现了该条带, 3、4、6泳道, 同样有些亲本意蜂所特有, 条带经过营养杂交之后, 在营养杂交子代中蜂中也出现了, 例如W₁₆₇₅₄对亲本意蜂进行扩增, 在分子量2000 bp与1000 bp之间有条明显的条带, 亲本中蜂则没有, 但经过杂交后, 在杂交后代中蜂上也出现了该条带, 这些说明通过营养杂交后, 基因可能发生了转移。

3 讨论

经过营养杂交之后, 子代与亲本之间的遗传

相似系数降低了不少, 并且有朝着向对方蜂种靠拢的趋势, 在实验过程中, 我们发现营养杂交中华蜜蜂后代工蜂的体色朝着亲本意大利蜂的体色变黄, 营养杂交意大利蜜蜂后代工蜂的体色朝着亲本中华蜜蜂的体色变黑。

中蜂与意蜂通过营养杂交, 营养杂交的后代蜜蜂在分子水平上有基因向着对方蜂种靠拢, 但具体是哪一种基因, 以及该基因起何作用, 还需要进一步的深入研究。

致谢: 在蜂王人工授精过程中, 得到了吉林省养蜂科学研究所薛运波研究员的支持和帮助, 此表示感谢。

References

- Hunt G, Page Jr R E. Patterns of inheritance of RAPD molecular markers in the honey bee reveal novel types of polymorphism. *Theor Appl Genet* 1992; 85: 15-20.
- Greg J, Hunt R, Robert E, Page Jr. Linkage map of the honey bee *Apis mellifera* based on RAPD markers. *Genetics* 1995; 139: 371-378.
- Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer Verlag Berlin Heidelberg 1988; 50-51.
- Smaraglova N. Study on the brood food of worker of the bees *Apis mellifera* L. and *Apis mellifera caucasica* Gorb. and of their crossbred. SSR 1963; 09: 110.
- Rinderer T, Hellmich R, Danka R G. *et al*. Male reproductive parasitism: a factor in the africanization of european honey bee populations. *Science* 1985; 228: 1119-1121.
- Li Miao sheng, Li Sheng. Discuss on breeding of cross feeding between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apicultural Science and Technology* 1982; 2: 44. (in Chinese)
- WU Weng Uan, Wu Wen Guang. Study on asexuality crossbreed between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera Ligustica*. *Apicultural Science and Technology* 1985; 3: 14. (in Chinese)
- ZHUANG Ming, Zhu Ming. Study on cross feeding between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Journal of Beekeeping* 1983; 4: 4. (in Chinese)
- ZHANG Quan hua, SUN Bai Yun, Zhang Qian hua, Li Bai yun. *Apiculture in HuaXi*. Chengdu Sichuan Science and Technology Publishing House 1991; 79-281. (in Chinese)
- TAN Ke, U Yu Sheng, HOU Dan Yin, Tan Ke, Yu Sheng. Trophallactic interaction between *A. cerana* and *A. mellifera*. *Journal of Beekeeping* 2003; 9. (in Chinese)