

中蜂与意蜂营养杂交对意蜂微卫星遗传多态性的影响

何旭江¹, 汪志平², 秦秋红¹, 吴小波¹, 陈利华²

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 江西南昌 330045; 2. 兰溪市鸿香生物科技有限公司, 浙江兰溪 321100)

摘要:通过人工添加中华蜜蜂王浆技术来培育江山2号与法国意蜂的杂交蜂王,并测定江山2号、法国意蜂、中华蜜蜂、营养杂交子1代和子4代工蜂的微卫星遗传多态性。结果表明,经过营养杂交,亲本蜜蜂与营养杂交子代的遗传距离发生明显的变化,中华蜜蜂和意大利蜜蜂的特有DNA条带发生了转移。说明通过蜂种之间的营养杂交可以改变其微卫星多态性。

关键词:江山2号; 法国意蜂; 中蜂; 营养杂交; 微卫星遗传多态性

中图分类号: S891.6

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2011)06-0107-04

蜜蜂营养杂交又称为蜜蜂无性杂交,根据曾志将等(2005)对营养杂交的定义,可将其进一步归纳为:在蜜蜂个体或群体的生长或繁殖期内,通过天然换脾或人工饲喂蜂王浆等技术,将甲蜂种(或品种)的新鲜蜂王浆饲喂给乙蜂种(或品种)的幼虫后,由

乙蜂种(或品种)幼虫发育的蜜蜂具有甲蜂种(或品种)遗传特性(张全华等,1991;曾志将等,2005)。

Ruttner等对西方蜜蜂不同品种之间的营养杂交特性进行了系统的研究(Ruttner等,1983,1988);中国养蜂工作者根据中国同时饲养中蜂和意蜂这一特点,系统研究了中蜂与意蜂营养杂交对工蜂出生重、形态指标等影响(谢宪兵等,2005,2008;何旭江等,2010)。随后,人们对蜜蜂的分子标记进行了广泛而深入的研究。目前在蜜蜂中使用较多的分子标记,主要有限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性DNA(RAPD)、微卫星标记和线粒体DNA标记。微卫星(microsatellite),又称简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、短串联重复序列长

收稿日期: 2010-11-18

作者简介: 何旭江(1985-),男,浙江人,硕士,主要从事蜜蜂生物学研究。

通信作者: 吴小波(1983-),男,江西人,讲师,博士生,主要从事养蜂教学与研究。Tel: 0791-3828176; E-mail: Wuxiaobo21@163.com

基金项目: 浙江省重大科技专项(优先主题)农业项目(2008C12013); 引进国际先进农业科学技术948项目(2006-G19-2)。

Study on Polymorphism of the Serum Proteins in Guizhou Pony

ZHAO Xing-yan¹, WANG Jia-fu^{1,2}, RAN Xue-qin¹, TIAN Song-jun³, HUANG Yong³, QIN Xin-zhong³

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratories for Agricultural Bioengineering of Guizhou Province, Guiyang 550025, China;

3. Bureau of Animal Husbandry and Veterinary of Ziyun County, Ziyun 561600, China)

Abstract Polymorphism of the serum proteins for the pony in Guizhou province was carried out by native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE). Based on the band types of three proteins on native-PAGE, the protein variant types and its gene allele frequency were compared among albumin (Alb), α^{1-B} glycoprotein (A1B) and transferring (TF) proteins. Both of the Alb and TF loci, except for A1B, showed polymorphisms. Six protein variants were found from the Alb protein of Guizhou pony and Southwest horse, which corresponded to three alleles of A, B and C. Gene frequencies of Alb loci in Guizhou pony were A (0.2097), B (0.5645) and C (0.2258), respectively. Seven variant types were found in the TF protein from Guizhou pony, which was controlled by five gene alleles (A, B, C, D and E). Gene frequencies of TF in Guizhou pony were A (0.0484), B (0.5806), C (0.1129), D (0.1452) and E (0.1129), respectively. The polymorphism information content (PIC) and heterozygosity (H) were higher at Alb and TF loci compared with other Chinese ponies and horses. Furthermore, the power of discrimination (DP) and probability of exclusion (PE) in Guizhou pony were higher than others. It suggested that the genetic diversity of Guizhou pony was higher and both of Alb and TF protein polymorphism might be used to identify parentage and individuals of Guizhou pony from each other, and lower heterozygosity of Guizhou pony implied a higher gene purity of Guizhou pony.

Key words: Guizhou pony; serum proteins; polymorphism

度多态性 (short tandem repeat polymorphisms, STRs), 由核心序列和两侧的侧翼序列所构成, 核心序列一般由 1~6 bp 的短核苷酸组成, 呈 10~60 次串联重复状随机分布于生物体整个基因组, 其重复数的差异则形成微卫星高度的多态性, 侧翼序列使微卫星特异地定位于染色体某一部位 (陈晶等, 2007)。至今关于微卫星技术在分子水平上检测中蜂与意蜂营养杂交代工蜂的遗传多样性鲜有报道, 鉴于此, 开展了本项研究, 现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验蜂群 试验蜂群为兰溪市鸿香生物科技有限公司种蜂场江山 2 号、法国意蜂和中华蜜蜂。

1.1.2 主要仪器 Eppendorf mastercycler 96 孔 PCR 仪, Adventurer™ 电子天平, Anke TGL-16B 高速离心机, Anke TGL-16G-A 低温高速离心机, Tanon Fine-do X3 凝胶图象处理系统, DYY-10C 电泳仪等。

1.1.3 主要试剂 1 kb DNA Marker, 100 bp DNA Marker, Rnase, Taq 酶均购自 MBI; Polyacrylamide、Protenase K、Bio-polyacrylamide 均为 Amresco 原装进口; dNTP、GoldView I 型核酸染料、GoldView II 型核酸染料均购自博大泰克。

1.2 方法

1.2.1 亲本蜂群的组织 选择产浆性能优越且群势很强的江山 2 号 3 群, 产蜜性能优越的法国意蜂 1 群, 群势强的健康中华蜜蜂 3 群。种蜂场周围 10 km 内无其他意蜂蜂群。整个试验过程对蜂群进行奖励饲喂。

1.2.2 王台的制备与新鲜中蜂蜂王浆采集 人工制作蜡质中蜂与意蜂王台, 用中蜂王台生产足量中蜂王浆, -20℃保存备用。

1.2.3 蜜蜂营养杂交 本试验从春繁开始, 每隔 7

d 检查割除法国意蜂雄蜂蛹, 直至试验结束。将固定有蜡质意蜂王台的育王框放入中蜂群清理 12 h。移中蜂幼虫, 产浆 3 d 后, 去除中蜂幼虫 (不破坏王浆), 移入法国意蜂 1 日龄幼虫。放入中蜂群继续哺育 10~12 h 后移出, 放入江山 2 号强群, 每天用注射器往王台中人工注射 50 μL 新鲜中蜂王浆, 直至封盖。营养杂交子 1 代蜂王出房, 并与江山 2 号雄蜂自然交尾产卵后, 取其 1 日龄幼虫按上述方法培育子 2 代、子 3 代和子 4 代营养杂交蜜蜂。并每隔 7 d 割除子 1 代、子 2 代和子 3 代雄蜂蛹, 直至试验结束。

1.2.4 工蜂样品采样 本试验选取新旧程度一样的巢脾, 分别放入江山 2 号、法国意蜂、本地中蜂、营养杂交子 1 代和子 4 代蜂群, 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, 放入电子自动控温羽化箱中自然羽化待蜂出房, 试验温度控制在 (34.5±0.2)℃, 相对湿度控制在 35%~45% (方文富等, 2002)。采集刚出房 (禁止进食 2 h) 工蜂 30 只, 投入到标本瓶中, 向瓶内缓慢注入 CO₂ 气体, 待所有蜜蜂均麻醉不动时, 再向瓶内注入 75% 的酒精溶液, 留存备鉴定 (李志勇等, 2004)。

1.2.5 工蜂 DNA 提取 采用苯酚-氯仿提取法提取工蜂 DNA (邹阳等, 2007), 参照刘益波等 (2009) 的方法对 DNA 进行浓度和纯度检测。

1.2.6 引物设计及 PCR 扩增 参照陈晶等 (2007) 设计引物, 引物序列及反应条件见表 1, 所用 4 对引物均由北京三博远志合成。PCR 反应体系为 10 μL; 10×PCR Buffers 1 μL, MgCl₂ (25 mmol/L, 见表 1), dNTP (10 mmol/L) 0.25 μL, F1、F2 (12.5 μmol/L) 各 0.25 μL, Taq 酶 0.25 μL, DNA 0.25 μL, 双蒸水补足体系。PCR 反应条件: 94℃预变性 2 min; 94℃变性 40 s, 退火 40 s (见表 1), 72℃延伸 60 s, 40 个循环; 72℃延伸 10 min。

表 1 引物序列信息

| 位点 | 引物序列(5'→3') | Mg ²⁺ 浓度(mmol/L) | 退火温度(°C) |
|------|--|-----------------------------|----------|
| A14 | F: GTGTCGCAATCGACGTAACC R: GTCGATTACCGATCGTGACC | 1.4 | 58.5 |
| A107 | F: CCGTGGGAGGTTTATTGTCC R: GGTTTCGTAACGGA TGACACC | 1.2 | 60.0 |
| A76 | F: GTCCAA TTCACATGTCGACATC R: GCCAATACTCTCGAACAATCG | 1.2 | 58.0 |
| B124 | F: GCAACAGGTCGGGTTAGAG R: GTCGTCGGACCGATGCC | 1.4 | 55.5 |

1.2.7 PCR产物电泳检测 取5 μL PCR产物和1 μL上样缓冲液(Loadingdye)混匀,上样1.0%加有GoldView II的琼脂糖凝胶,4 V/cm电泳,待样品跑到4/5处时将胶取出,在紫外灯下观察扩增结果,在凝胶成像系统上拍照。再采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和强碱银染法进行扩增产物电泳。

1.2.8 数据处理 根据每只蜜蜂SSR扩增出的带谱进行统计,用Population Genetic Analysis软件中的Co-dominant Diploid Data对数据处理,得出遗传距离和聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA提取结果 试验电泳结果表明,所提取的

基因组DNA条带清晰、无降解(图1)。同时,DNA分光光度计检测D值均在1.6~1.8范围之内。

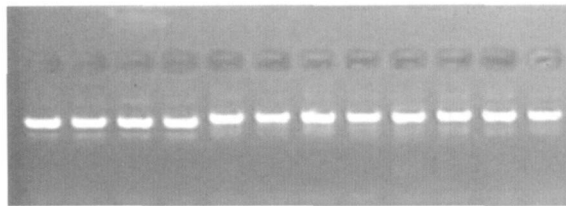


图1 蜜蜂基因组DNA

2.2 PCR扩增结果 琼脂糖凝胶电泳结果表明,SSR扩增的目的条带清晰,无其他杂带,目的片段区域被成功扩增(图2、3)。

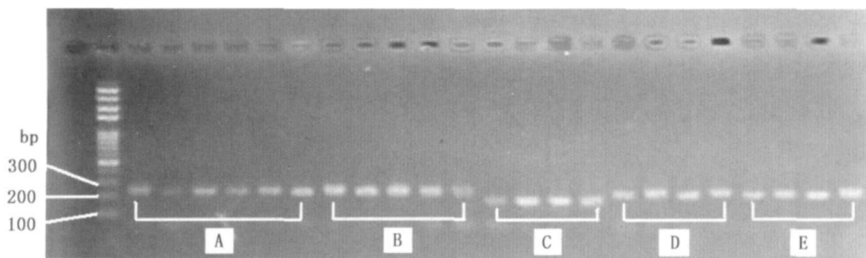


图2 引物A76 PCR扩增产物电泳图

注:A为江山2号意蜂;B为法国意蜂;C为中华蜜蜂;D为营养杂交子1代意蜂;E为营养杂交子4代意蜂。

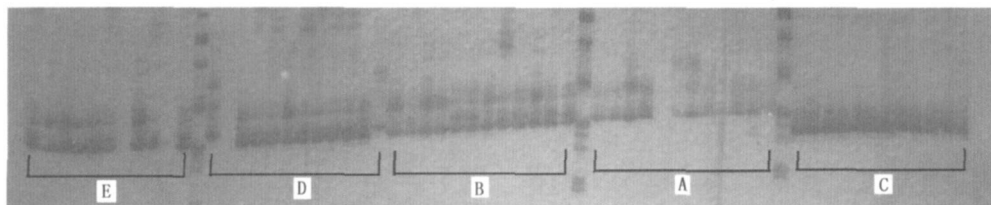


图3 引物A14 PCR扩增产物电泳图

注:A为江山2号意蜂;B为法国意蜂;C为中华蜜蜂;D为营养杂交子1代意蜂;E为营养杂交子4代意蜂。

2.3 遗传距离和聚类 由表2可知,营养杂交子1代与子4代在遗传距离上向中蜂靠拢。由图4可知,Nei's的UPGMA法聚类图表明,营养杂交子1代与子4代聚为一类,再与母本法国意蜂聚为一类,

然后与父本江山2号聚为一类,最后与中华蜜蜂聚为一类,这一结果和5个蜂种遗传进化关系上也是一致的。说明中蜂与意蜂营养杂交对意蜂的结构基因表达产生了极大的影响。

表2 Nei's(1972)遗传距离

| 品系 | 江山2号(A) | 法国意蜂(B) | 中华蜜蜂(C) | 营养杂交子1代(D) | 营养杂交子4代(E) |
|----------|---------|---------|---------|------------|------------|
| 江山2号(A) | 0.0000 | | | | |
| 法国意蜂(B) | 0.9209 | 0.0000 | | | |
| 中华蜜蜂(C) | 0.0550 | 0.0813 | 0.0000 | | |
| 杂交子1代(D) | 0.9719 | 0.9478 | 0.1362 | 0.0000 | |
| 杂交子4代(E) | 0.9229 | 0.9671 | 0.1572 | 0.9769 | 0.0000 |

3 讨论

微卫星DNA存在于所有已检测过的真核生物的基因组中,并在整个基因组中都有分布,其均一性高于其它标记,且是唯一的一个分布在着丝粒区域附近的多态性标记。微卫星主要位于基因组的非编

码区,由其得出的遗传距离更能反映分化时间的长短。本试验结果表明,中蜂与意蜂营养杂交子代意蜂在遗传距离上向中蜂靠拢,而与亲本意蜂之间的遗传距离有所增大;营养杂交子1代与子4代聚为一类,再与母本法国意蜂聚为一类,然后与父本江山

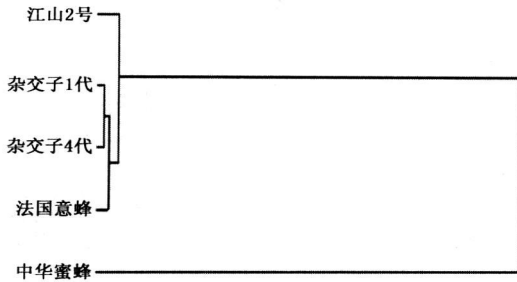


图4 Nef s 的 UPGMA 法聚类图

2号聚为一类,最后与中华蜜蜂聚为一类。黄康等(2008)利用意蜂与中蜂营养杂交并进行中蜂抗囊幼病研究,结果发现,营养杂交子代中蜂在遗传距离上向意蜂靠拢,说明营养杂交可以改变蜂种与亲代之间的遗传距离,这与本试验结果相吻合。另外,从表2中发现,子4代与父本江山2号的遗传距离小于子1代与江山2号的距离,而子4代与第一母本法国意蜂的遗传距离大于子1代与第一母本的遗传距离,这可能说明母本的遗传效应大于父本,也可能由于江山2号本身就是由纯种意蜂培育,随着本研究营养杂交代数的增加,与法国纯种意蜂的遗传距离越来越远,具体原因有待进一步研究与分析。

营养杂交也可以突出杂交优势,但其营养杂交机理至今尚未明了。目前推测可能是王浆中遗传信息的携带者——核酸起作用。曾志将等(2005)研究证实,中蜂蜂王浆和意蜂蜂王浆均富含DNA和RNA,且它们的含量与比例不同。利用营养杂交培育蜂王过程中,蜂王幼虫获取了不同蜂种的遗传物质,使其在分子水平上发生了基因偏离现象,如改变了其机体内mRNA或多肽链翻译后的加工方式,从

而改变了原来基因的表达,但其具体机理仍需进一步研究与探讨。

参 考 文 献

- 1 方文富,傅中民.人工羽化对蜜蜂的影响[J].福建农林大学学报,2002,31(4):514~516.
- 2 刘益波,颜伟玉,吴小波,等.蜂螨对蜜蜂及幼虫表面信息素的选择性研究[J].蜜蜂杂志,2009,29(7):6~8.
- 3 何旭江,吴小波,曾志将,等.中蜂与意蜂营养杂交对意蜂工蜂出生重及春季繁殖率的影响[J].中国蜂业,2010,61(7):17~18.
- 4 李志勇,王志.关于蜜蜂形态鉴定技术的探讨[J].中国养蜂,2004,55(4):13.
- 5 张全华,孙白云.华西养蜂全书[M].成都:四川科学技术出版社,1991.
- 6 陈晶,吉挺,殷玲,等.微卫星DNA技术在蜜蜂遗传育种中的应用[J].中国蜂业,2007,58(11):8~10.
- 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 黄康.中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)抗中囊病选育研究[D].南昌:江西农业大学,2008.
- 9 曾志将,谢宪兵,薛运波,等.中蜂与意蜂营养杂交对工蜂形态指标的影响[J].江西农业大学学报,2005,27(3):454~457.
- 10 谢宪兵,曾志将,邹阳,等.中蜂与意蜂营养杂交对意蜂抗螨的影响研究[J].江西农业大学学报,2005,27(4):607~610.
- 11 谢宪兵,彭文君,曾志将.应用蜜蜂营养杂交技术培育抗螨蜂种[J].中国农业科学,2008,20(5):1530~1535.
- 12 Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees[M]. Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1988, 50~51.
- 13 Ruttner F, Maul V. Experimental analysis of reproductive intraspecific isolation of *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* Fabr[J]. Apidologie, 1983, 14: 309~327.
- 14 Zeng Z J, Zou Y, Guo D S, et al. Comparison studies of DNA and RNA in royal jelly from *Apis mellifera* and *Apis cerana* [J]. Indian Bee Journal, 2006, 68(1~4): 18~21.

Effects of Microsatellite Genetic Polymorphisms of *Apis mellifera ligustica* on Nutritional Crossbreed between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*

HE Xu-jiang¹, WANG Zhi-ping², QIN Qiu-hong¹, WU Xiao-bo¹, CHEN Li-hua²

(1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Hongxiang Bio-Technology Co. Ltd., Lanxi 321100, China)

Abstract In this paper, we breed hybridizing queen of the Jiangshan honey bee No.2 and French *Apis mellifera ligustica* through the technology of artificially feeding royal jelly of *Apis cerana cerana*, and then the genetic polymorphisms of microsatellite of the workers were measured. The workers were from the Jiangshan honey bee No.2 colonies, French *Apis mellifera ligustica* colonies, local *Apis cerana cerana* colonies the 1 hybridizing offspring as well as the 4 consecutive hybridizing offspring of nutritional crossbreeding French *Apis mellifera* L queen and the Jiangshan honey bee No.2 drone colonies. The results showed that the genetic distance of parents and hybridizing offspring was varied, and the unique DNA bands of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* were shifted.

Key words: Jiangshan honey bee No.2; French *Apis mellifera ligustica*; *Apis cerana cerana*; nutritional crossbreed; genetic polymorphisms of microsatellite