

# 中蜂与意蜂营养杂交对工蜂苹果酸脱氢酶 的影响

曾志将, 谢宪兵, 颜伟玉, 郭冬生

(江西农业大学 动物科学技术学院, 南昌 330045)

**摘要:** 本研究以中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)为实验材料,进行中华蜜蜂与意大利蜜蜂营养杂交,然后应用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳(IEF-PAGE)技术检测亲本和营养杂交后代的工蜂苹果酸脱氢酶的基因型、基因型频率、等位基因频率、杂合度和纯合度,结果表明:经过营养杂交后,杂交后代工蜂的苹果酸脱氢酶基因型发生了变化,并且苹果酸脱氢酶条带位置朝着对方蜂种偏移。

**关键词:** 中华蜜蜂;意大利蜜蜂;营养杂交;苹果酸脱氢酶 (MDH)

中图分类号 :S892.6;Q321.2

文献标识码 :A

## Effects of Malate Dehydrogenase of Worker Bees on Nutritional Crossbreed between *Apis cerana Cerana* and *Apis mellifera Ligustica*

ZENG Zhi-Jiang, XIE Xian-bing, YAN Wei-Yu, GUO Dong-sheng

(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The experiments were conducted with *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera Ligustica*. In this paper, the genotype, genotype frequency, allele frequency, heterozygosity and homozygous degrees of workers' malate dehydrogenase (MDH) were detected by IEF-PAGE, the workers were the offspring of parent colonies and the offspring of hybridization colonies which took place between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera Ligustica*. The result showed that the genotype of workers' malate dehydrogenase (MDH) has changed, and the places of electrophoretic band of MDH are slightly shifted in direction the other honeybees races.

**Key words:** *Apis cerana cerana*; *Apis mellifera ligustica*; nutritional crossbreed; Malate dehydrogenase (MDH)

蜜蜂营养杂交又称为蜜蜂无性杂交,是指当把甲蜂种(或品种)的幼虫提给乙蜂种(或品种)饲喂后,甲蜂种(或品种)幼虫发育的蜜蜂具有乙蜂种(或品种)遗传特性。人们对同一蜂种不同蜜蜂品种之间的营养杂交研究较早,比如 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度具有甲蜜蜂品种的形态和体色特性<sup>[1-3]</sup>。

东方蜜蜂和西方蜜蜂是蜜蜂属里形态特征、生物学习性最为接近的两个种<sup>[1]</sup>,由于它们存在生殖隔离,因此东方蜜蜂和西方蜜蜂之间不能进行正常生殖杂交。Sperlin 等进行东方蜜蜂和西方蜜蜂 DNA 杂交实验表明:两个蜂种的 DNA 杂交重组率约 60%<sup>[4]</sup>。我国许多养蜂工作者利用我国同时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, 简称中蜂)与意大利蜜蜂(*Apis*

收稿日期 2005-06-02

基金项目 江西省自然科学基金资助项目(0330050)和江西省农业科技攻关资助项目

作者简介:曾志将(1965-),男,教授,博士,博导,研究方向:蜜蜂学, E-mail: bees1965@sina.com

mellifera ligustica Spinola, 简称意蜂)之间的营养杂交实验, 并且也发现: 当把中蜂的卵或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; 同理当把意蜂的卵或幼虫放入中蜂群中饲喂后, 结果意蜂也具有中蜂某些体色特性<sup>[5-8]</sup>。谭垦等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<sup>[9]</sup>, 曾志将等研究了中蜂与意蜂营养杂交对工蜂形态指标的影响<sup>[10]</sup>。至今还没有人研究过中蜂与意蜂营养杂交对工蜂苹果酸脱氢酶 (MDH) 的影响研究。正是鉴于此, 本文对中蜂与意蜂营养杂交的亲本中蜂、亲本意蜂以及杂交意蜂子 1 代、子 2 代、子 3 代和杂交中蜂子 1 代 6 群蜂的工蜂苹果酸脱氢酶 的基因型、基因型频率、等位基因频率、杂合度和纯合度进行了研究, 现将结果报道如下。

## 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 主要仪器设备 LKB 电泳系统: LKB2197 型电泳仪, LKB2117 型电泳槽, LKB2219 型冷却水循环仪以及成套滤纸桥、上样纸; 5417R 型 Eppendorf 小型高速冷冻离心机; Eppendorf 移液器。

### 1.2 主要实验试剂

安福林(pH4-6、pH6-9); 辅酶 (NAD); 氯化硝基四氮唑蓝(NBT); 硫酸酚嗪二甲酯(PMS); 苹果酸; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris); 丙烯酰胺 (Acr); N,N - 甲叉双丙烯酰胺 (Bis); N,N,N',N' - 四甲基乙二胺 (TEMED)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 蜜蜂营养杂交

1.3.1.1 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。

1.3.1.2 中蜂与意蜂营养杂交 在亲本中蜂群 A 中加入育王框, 等工蜂清理 12 h 后, 在王台中移入 A 群中的 1 日龄小幼虫。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, 马上移入亲本意大利蜜蜂蜂群中的 1 日龄的小幼虫, 把育王框插入亲本中华蜜蜂蜂群中哺育 12~24 h, 抽出发育王框, 轻轻抖落育王框上的蜜蜂, 并将育王框插入亲本意大利蜜蜂蜂群中继续哺育。然后为使幼虫尽可能多食对方蜂种的王浆, 本文参照陈裕文等人工饲养蜜蜂幼虫的技术<sup>[11]</sup>, 每隔 8 h 用移虫针将亲本中蜂蜂群的新鲜王浆轻轻地沿着王台壁转移到王台中进行人工辅助饲喂, 饲喂王浆时要注意王浆不能太多, 以幼虫能漂浮在食物上不被淹死为准。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亲本意蜂群中。待处女蜂王成熟时, 参照文献<sup>[12]</sup>方法, 取意蜂雄蜂的精液, 对营养杂交意蜂处女蜂王进行人工受精。处女蜂王人工受精后, 放入已经组织好的小群中。蜂群巢门口安上隔王栅, 防止蜂王出巢自然交尾, 蜂王产卵培育的后代即为营养杂交意蜂子 1 代。用同样的方法, 用中蜂王浆继续培育营养杂交意蜂子 2 代和子 3 代。

同理, 在亲本意蜂群 B 中加入育王框, 等工蜂清理 12 h 后, 在王台中移入 B 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, 马上移入亲本中华蜜蜂蜂群中的 1 日龄的小幼虫, 把育王框插入亲本意大利蜜蜂蜂群中哺育 12~24 h, 抽出发育王框, 轻轻抖落育王框上的蜜蜂, 并将育王框插入亲本中华蜜蜂蜂群中继续哺育。然后参照陈裕文等<sup>[11]</sup>的人工饲养蜜蜂幼虫的技术, 定期人工饲喂亲本意蜂蜂群的新鲜王浆(方法同上)。在王台封盖后第 4 d, 选择外形大的营养杂交中蜂王台分别诱入已组织好中蜂交尾群中, 待处女蜂王成熟后, 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。

为了识别工蜂日龄, 将每群中刚羽化的 1 日龄工蜂用不同颜料作好标记。

1.3.2 样品采集与准备 从亲本中蜂、亲本意蜂以及杂交意蜂子 1 代、子 2 代、子 3 代和杂交中蜂子 1 代 6 蜂群中各取 30 只 8 日龄工蜂将其及时放入冰箱中冷冻致死, 然后再用密封袋装好, 贴好标签并放入 -20 冰箱中冷冻保存。取 1 只冷冻工蜂的头部, 置于 0.5 mL eppendorf 管中, 加入 40  $\mu\text{L}$  提取液 (0.5 mol·L<sup>-1</sup> pH8.3 的 Tris-HCl 4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 34.4  $\mu\text{L}$ , 浓盐酸调至 pH 为 6.5~7.5, Triton X-100 0.1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 定容至 40  $\mu\text{L}$ ),

用玻璃棒研磨 1 min。然后在 4~10℃, 12000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 2 min, 取上清液用于点样。

1.3.3 电泳 参照文献[13]和[14]中的方法。采用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术(IEF- PAGE), 在 LKB (瑞典生产) 多相电泳系统中检测 MDH 同工酶基因型。电泳参数为 700 V 恒压 9 h, 电流 3~4 A。

主要操作步骤有: 模具的准备、凝胶的配制、灌胶、铺胶片、加电极条和加样纸、加样、电泳、取胶、染色和烘干保存。

1.3.4 数据的收集与统计分析 根据 MDH 的六种基因型图谱(见图 1), 确定每个样品电泳图谱的基因型, 然后统计同一蜂群 6 种基因型的样本数目。

基因型频率=(某基因型数目/测定的样本总数) ×100%

基因频率由基因型频率求得:

$$a\% = \frac{aa\% + ab\%}{2} + \frac{ac\%}{2}; \quad b\% = \frac{bb\% + ab\%}{2} + \frac{bc\%}{2};$$

$$c\% = \frac{cc\% + bc\%}{2} + \frac{ac\%}{2}$$

杂合度、纯合度同样由基因型频率求得:

$$\text{杂合度} = \frac{ab\% + bc\% + ac\%}{2}; \quad \text{纯合度} = 1 - \text{杂合度} = \frac{aa\% + bb\% + cc\%}{2}$$

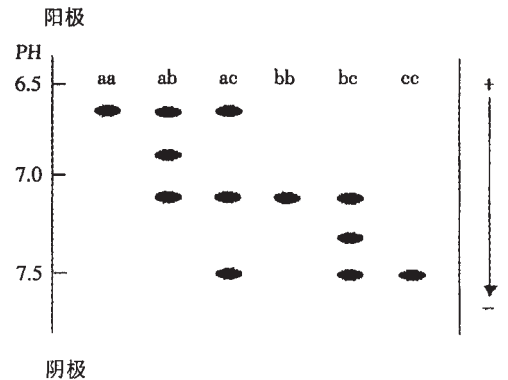


图 1 意大利蜜蜂 MDH 6 种基因型电泳图谱  
Fig.1 The electrophoretic band of six genotypes of MDH in *Apis mellifera Ligustica*

## 2 实验结果

实验结果见表 1 和表 2、图 2 和图 3。

表 1 实验蜂群工蜂 MDH 基因型数量

Table 1 The MDH genotype numbers in test colony

实验蜂群 Test colony	测定数目 Test No.	基因型数量 Genotype No.					
		aa	ab	ac	bb	bc	cc
亲本意蜂	32	0	3	5	0	8	16
杂交意蜂子 1 代	32	0	4	4	0	7	17
杂交意蜂子 2 代	32	0	6	6	0	3	17
杂交意蜂子 3 代	32	2	2	7	0	5	16
亲本中蜂	32	0	0	0	0	0	0
杂交中蜂子 1 代	32	0	0	0	0	0	0

表 2 实验蜂群工蜂 MDH 基因型频率、基因频率、杂合度和纯合度

Table 2 List of genotype frequency, allele frequency, heterozygosity and homozygosity of MDH in test colony

实验蜂群 Test colony	基因型数量 Genotype No.						基因频率 Allele frequency/%			杂合度 Heterozygosity/%	纯合度 Homozygosity/%
	aa	ab	ac	bb	bc	cc	a	b	c		
亲本意蜂	0	9.4	15.6	0	25.0	50.0	12.5	17.5	70.3	50	50
杂交意蜂子 1 代	0	12.5	12.5	0	21.9	53.1	12.5	17.2	70.3	46.9	53.1
杂交意蜂子 2 代	0	18.8	18.8	0	9.4	53.1	18.8	14.1	67.2	46.9	53.1
杂交意蜂子 3 代	6.3	6.3	21.9	0	15.5	50.0	20.4	10.9	68.7	43.7	56.3
亲本中蜂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
杂交中蜂子 1 代	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

从表 2 可知: 亲本意蜂、营养杂交意蜂子 1 代、子 2 代、和子 3 代的苹果酸脱氢酶 的基因型频率都是以 cc 为主, 分别为 50.0 %、53.1 %、53.1 %和 50.0 %; 基因频率都以 c 为主, 分别是 70.3 %、70.3 %、67.2 %和 68.7 %; 亲本意蜂杂合度为 50 %, 而营养杂交意蜂子 1 代、子 2 代、子 3 代分别为 46.9 %、46.9 %和 43.7 %; 杂交意蜂子 3 代中出现了 aa 基因型, 这是亲本意蜂所没有的基因型。

从图 2 可见, 在 MDH 的位置处, 亲本中蜂和营养杂交中蜂都没有被发现苹果酸脱氢酶 , 只是在

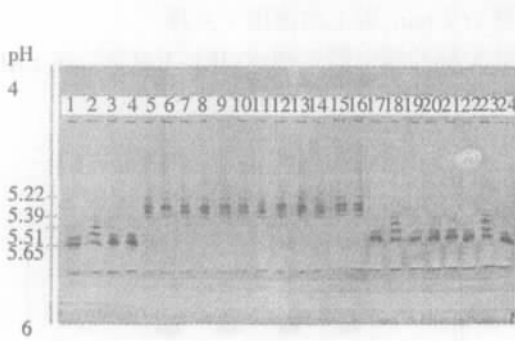


图 2 中蜂 MDH 电泳图谱之一

注:泳道 5~16 为亲本中蜂样品,泳道 1~4, 17~24 为营养杂交后代中蜂子 1 代样品

Fig.2 One picture of the electrophoresis MDH in *Apis cerana cerana*

Notice: Lane 5~16 are samples of the parental colony *Apis cerana cerana*, Lane 1~4 and 17~24 are samples of the first offspring of cross-fed of *Apis cerana cerana*

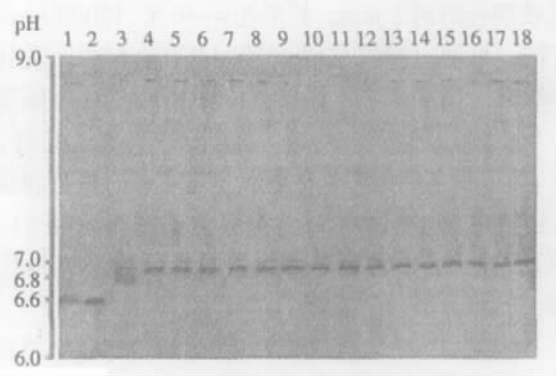


图 3 意蜂 MDH 电泳图谱之一

注:泳道 1 和 2 为杂交意蜂子 3 代样品,泳道 3~10 为杂交意蜂子 2 代样品,泳道 11~18 为杂交意蜂子 1 代样品

Fig.3 One picture of the electrophoresis MDH in *Apis mellifera ligustica*

Notice: Lane 1 and 2 are samples of the third offspring of cross-fed of *Apis mellifera ligustica*, Lane 3~10 are samples of the second offspring of cross-fed of *Apis mellifera ligustica*, Lane 11~18 are samples of the first offspring of cross-fed of *Apis mellifera ligustica*

pH 值为 5.22~5.65 之间,也就是在 MDH 处,亲本中蜂和营养杂交中蜂才有其特殊的条带,并且营养杂交后代中蜂的 MDH 条带明显向着 MDH 位置(pH 为 6.5~7.5 之间)偏移。另外从图 3 的 MDH 条带 pH 位置(都在 7.0 以下)可以看出,营养杂交意蜂子代的也会朝着 MDH (pH 在 5.1~5.6)方向偏移。

以上结果说明经过营养杂交后,杂交后代工蜂的 MDH 基因型发生了变化,并且 MDH 条带位置朝着对方蜂种偏移。

### 3 讨论

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase,MDH)作为一种同工酶是糖代谢途径中的一个关键酶,在线粒体中,MDH 催化苹果酸氧化成草酰乙酸;在细胞质中,MDH 又将草酰乙酸还原成苹果酸。由于 MDH 同工酶在蜂种中是按照孟德尔遗传方式分离的,并且遗传性很稳定,在蜜蜂遗传变异的研究及品系鉴定中都有很大意义<sup>[13,14]</sup>。

与以往相比,本文首次应用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳技术研究了中蜂与意蜂营养杂交工蜂苹果酸脱氢酶的基因型、基因型频率、基因频率、杂合度和纯合度规律,在同工酶蛋白质水平上检测中意蜂营养杂交机理,为蜜蜂营养杂交品种提供了新理论基础。并发现经过营养杂交后,杂交后代工蜂的 MDH 基因型发生了变化,而且 MDH 条带位置朝着对方蜂种偏移。此现象很可能就是由于通过杂交,有些遗传物质已经发生了转移或得到表达。另外在研究过程中,我们发现中蜂工蜂 MDH 同工酶具有多态性,这与 Lee 等报道的东方蜜蜂的 MDH 也呈现多态性一致<sup>[15]</sup>,但与有些学者研究结果不同<sup>[16,17]</sup>,其根本的原因,目前尚不清楚,有待于进一步探讨。

致谢:在实验过程中,得到了吉林省养蜂科学研究所薛运波研究员和浙江大学童富淡教授的支持和帮助,在此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees[M]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988. 50-51.
- [2] Smaragdova N I. Study on the brood food of worker of the bees *Apis mellifera* L., *Apis mellifera caucasica* Gorb., and of their crossbreds[A]. Proc Inter. Beekeeping Congress 19[C]. USSR,1963. 109-110.

(下转第 89 页)



段的出生率低,其一是 p53 基因据研究表明具有胚胎致死性<sup>[10-12]</sup>;其二是由 GFP 的毒副作用引起的<sup>[13,14]</sup>。

#### 参考文献 :

- [1] Palmiter R D. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes [J]. *Nature*, 1982, 300: 611-615.
- [2] Anthony W S, Evans P W, T Wheeler. Expression of green fluorescence protein in mammalian embryos: A novel reporter gene for the study of transgenesis and embryo development [J]. *Theriogenology*, 1997, 47: 222.
- [3] Bondioli K R. Positive selection of transgenic bovine embryos in culture [J]. *Theriogenology*, 1996, 46:333-342.
- [4] Bishop J O. Chromosomal insertion of foreign DNA [J]. *Reprod Nutr Dev*, 1996, 36: 607-618.
- [5] Alberts A S, Frost J A, Thorburn A M. Rapid transcriptional assay for the expression of two distinct reporter genes by microinjection [J]. *DNA Cell Biol*, 1993, 12 (10): 935-943.
- [6] Joseph Sambrook, David W Russell. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* [M]. The Third Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [7] M Ikawa, K Kominami, Y Yoshimura. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice [J]. *Develop Growth Differ*, 1995, 37: 455-459.
- [8] Ikawa M, M Ikawa, K Kominami, et al. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP) [J]. *FEBS Letters*, 1995, 375: 125-128.
- [9] Chan AWS. Transgenic Animals: Current and Alternative Strategies [J]. *Cloning*, 1999, 1 (1): 25-45.
- [10] H Oda. p53 transgenic and knockout mice [J]. *Nippon Rinsho*, 2000, 58(6): 1250-1254.
- [11] R A Lubet, Z Zhang, R W Wiseman, et al. Use of p53 transgenic mice in the development of cancer models for multiple purposes [J]. *Exp Lung Res*, 2000, 26(8): 581-593.
- [12] R Lubet, Y Wang, Z Zhang, et al. Mouse models incorporating alterations in the major tumor suppressor genes P53 and P16: their use in screening for potential carcinogens, developing further relevant mouse models and screening for potential chemopreventive and chemotherapeutic agents [J]. *Exp Lung Res*, 2005, 31(1): 117-133.
- [13] D J Spergel, U Kruth, D R Shimshek, et al. Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 63(6): 673-686.
- [14] S Risteovski. Making better transgenic models: conditional, temporal, and spatial approaches [J]. *Mol Biotechnol*, 2005, 29 (2): 153-163.

(上接第 78 页)

- [3] Rinderer T E, Hellmich R L, Danka R G, et al. Male reproductive parasitism: a factor in the africanization of european honey- bee populations [J]. *Science*, 1985, (228): 1119-1121.
- [4] Sperlin A, Campbell R, Brosemer R W. The hybridization of DNA from two species of honeybee [J]. *J. Insect Physiol.*, 1976, (22): 373-376.
- [5] 李森生. 中意蜂营养杂交育种的探讨 [J]. *养蜂科技*, 1982, (1): 42-44.
- [6] 吴文光. 中意蜂无性杂交试探 [J]. *养蜂科技*, 1985, (1): 13-14.
- [7] 庄 明. 中意蜂的营养杂交初试报告 [J]. *蜜蜂杂志*, 1985, (3): 14.
- [8] 张全华, 孙白云. *华西养蜂大全* [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991. 279-281.
- [9] 谭 垦, 余玉生, 周丹银. 东方蜜蜂和西方蜜蜂交哺行为的研究 [J]. *蜜蜂杂志*, 2003, 8: 8-9.
- [10] 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 (3): 454-457.
- [11] 陈裕文, 江敬皓, 何锐光. 人工饲养蜜蜂幼虫的技术与应用 [A]. 海峡两岸蜜蜂生物学研讨会 [C], 2000. 16-33
- [12] 颜伟玉. 蜜蜂性比的生理生化与分子调控机制研究 [D]. 江西农业大学, 2004.
- [13] 陈盛祿, 鲍秀良, 苏松坤, 等. 不同类型意大利蜜蜂 MDH 同工酶的研究 [J]. *中国工程科学*, 2000, (1): 57-61.
- [14] 刘艳荷. 西方蜜蜂苹果酸脱氢酶 基因及配合力和杂种优势的研究 [D]. 浙江大学, 2001.
- [15] Lee M L, Woo K S. Enzyme polymorphism of *Apis cerana* Fab. in Korea [J]. *Honeybee Science*, 1991, 12(2): 58-60.
- [16] 李绍文, 孟玉萍, 张宗炳, 等. 意蜂和中蜂四种同工酶的研究 [J]. *昆虫学报*, 1988, 31(1): 15-19.
- [17] Rozalski R J, Sakurai H, Tsuchida K. Esterase and malate dehydrogenase isozyme analysis in the population of honeybees, *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera* [J]. *Japanese Journal of Entomology*, 1996, 64: 910-917.