

运用 ISSR分析蜂螨 对雄蜂及雄蜂蛹的选择性寄生机制

刘益波, 吴小波, 颜伟玉, 曾志将*

(江西农业大学 蜜蜂研究所, 江西 南昌 330045)

摘要: 以被大蜂螨 (*Varroa destructor*) 寄生的意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 为实验材料, 分别采集有螨雄蜂、无螨雄蜂、有螨雄蜂蛹和无螨雄蜂蛹各 40 只, 运用 ISSR (inter-simple sequence repeat) 标记对各样品进行 DNA 扩增, 通过 fine-dox 型凝胶成像系统分析各条带的片段大小, 计算各特异性条带在有螨与无螨样品中的概率。结果表明: 有些特异性条带在有螨与无螨样品中的概率差异极显著 ($P < 0.01$)。由此推测, 这些条带可能与蜂螨的选择性寄生有关。

关键词: 大蜂螨; ISSR; 特异性条带

中图分类号: S895.3+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)03-0581-04

Studies on the Selective Parasitism Mechanism of Mites to Drone and Drone Pupa by ISSR

LU Yi bo, WU Xiao bo, YAN Wei yu, ZENG Zhi jiang

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Experiments were conducted with *Apis mellifera ligustica* which was infected by *Varroa destructor*. 40 drones with varroa mites, non-mite drones, pupas with mites and non-mite pupas individually were collected. The length of the bands was analyzed by fine-dox chemidoc- it imaging system after PCR amplification and the probability of the peculiar-bands in the samples with and without mites was calculated. The results showed that the probability of some peculiar-bands in the samples with and without mites was significantly different ($P < 0.01$). It is hence concluded that these bands have something to do with the selective parasitism of mites.

Key words: *Varroa destructor*; ISSR; peculiar-band

狄斯瓦螨 (*Varroa destructor*) 俗称大蜂螨, 受大蜂螨危害的蜂群, 轻者群势迅速削弱, 生产力迅速下降, 重者蜂群全群覆灭^[1-2]。自从 1958 年在中国饲养的蜂群中发现大蜂螨, 由于蜂群转地饲养的特性, 大蜂螨迅速蔓延全国, 已经成为危害养蜂生产最为严重的疾病之一^[3]。为了及时控制和治理蜂群, 几十年来, 中国主要是用药物来防治大蜂螨。但是随着我国生活水平提高和加入 WTO 后对蜂产品质量要求越来越高, 绿色环保的蜂产品已被提上议事日程^[4]。依靠药物防治蜂螨已经很难适应时代发展需求, 利用分子技术进行抗螨蜂种培育已尤显重要。

法国 Le Conte Y 博士^[5-6]通过实验发现, 大蜂螨能利用幼虫信息素找到即将封盖的幼虫, 雄蜂幼虫

收稿日期: 2010-03-03 修回日期: 2010-03-24

基金项目: 引进国际先进农业科学技术 948 项目 (2006-G19-2) 和国家蜂产业技术体系资助项目 (ny965-43-kx15)

作者简介: 刘益波 (1984-) 男, 硕士生, 主要从事蜜蜂研究; *通讯作者: 曾志将, 教授, E-mail: bees965@sina.com

的这种信息素的含量明显高于工蜂幼虫。在蜂群中,雄蜂具有无界性,其传播蜂螨的概率远大于工蜂^[7],因此,利用雄蜂进行抗蜂螨育种显得更有意义。本研究以意大利蜜蜂为材料,运用 ISSR 标记对各样品进行 DNA 扩增,通过 fine-dox 型凝胶成像系统分析各条带的片段大小,计算比较各特异性条带在有螨与无螨样品中的概率,推测各特异性条带与蜂螨选择性寄生的相关性,为利用雄蜂培育抗螨蜂种提供理论依据,现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品的采集 从江西农业大学蜜蜂研究所饲养的意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 蜂群中,采集有螨雄蜂、无螨雄蜂、有螨雄蜂蛹、无螨雄蜂蛹各 40 只。采集雄蜂蛹时,用镊子小心挑破巢房,将蜂蛹取出。将各类样品储存于 φ(乙醇)=95% 中,置于 -20 °C 冰箱中备用。

1.1.2 主要仪器设备 AdventureTM ARR V70 电子天平 (北京星瑞华仪科技发展有限公司)、XW-80A 旋涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司)、Anke TGL-16G-A 型冷冻离心机 (北京医用离心机厂)、Anke TGL-16B 型 EPPENDORF 小型高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)、EPPENDORF 成套移液器和 EPPENDORF mastercycler PCR 仪 (德国 EPPENDORF 公司)、DYY-10C 成套电泳设备和 fine-dox 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

1.1.3 主要试剂 Taq 酶、Taq buffer、MgCl₂、1 bpDNAMark (均购于立陶宛 Fermentas 公司), ISSR 引物 (由上海生物工程合成), dNTPs (均购于北京博大泰克生物基因技术有限公司), Agarose (西班牙原装进口)。

1.2 实验方法

1.2.1 蜜蜂 DNA 的提取 采用苯酚-氯仿提取法提取雄蜂及雄蜂蛹 DNA^[8-9]。

1.2.2 DNA 浓度和纯度检测 琼脂糖凝胶电泳检测:取 2 μL 待测 DNA 和 1 μL 上样液 (loading dye) 混匀,上样于 8 g/L 加有 gold view 琼脂糖凝胶,5 V/cm 电泳,待样品跑到 4/5 处时取下凝胶,在紫外灯下观察电泳结果并拍照保存^[10]。

紫外分光光度计检测:取 6 μL 待测 DNA 溶液稀释 500 倍到 3 mL 分别在紫外分光光度计 260 nm 和 280 nm 处测定其 OD 值。

$$\text{DNA 质量浓度} (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 \quad \text{DNA 质量纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

1.2.3 PCR 反应及 ISSR 产物扩增 6 对 ISSR 引物的碱基序列见表 1,对 PCR 反应的各组分用量进行优化,建立最佳的 PCR 反应条件,优化结果见表 2。

表 1 PCR 反应引物
Tab 1 PCR primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度 /°C Annealing temperature
A1	G TGG TGG TGG TGG TGG TGA	54
A2	A GCAG CAG CAG CAG CAG CG	54
A3	A GACAG ACAG ACAG ACAG C	54
A4	G ACAG ACAG ACAG ACAG T	55
A5	A TGATG ATGATG ATGATG GA	55
A8	A CACAC ACACAC ACAC T	55

表 2 PCR 反应体系中各组分的优化结果

成分 Component	用量 Dose/μL
10× PCR Buffer	1.0
MgCl ₂ (25 mmol/L)	1.0
dNTPs (10 mmol/L)	0.3
ddH ₂ O	5.4
Taq 酶 (1 U/μL) Taq enzyme	0.5
引物 (20 μmol/L) Primer	1.0
模板 DNA (终浓度 60~80 ng/μL) Template DNA (final concentration 60~80 ng/μL)	0.8
总量 Total	10.0

PCR 循环参数如图 1 所示。ISSR 扩增产物电泳:取 4.0 μL ISSR 扩增产物和 1.0 μL 上样缓冲液混匀,上样于 15 g/L 的琼脂糖凝胶,4 V/cm 电泳 1 h 用凝胶成像系统拍照并保存。

1.2.4 数据处理 运用 fine—diox 凝胶成像系统精确分析电泳图片中各条带的片段大小, 删除各非特异性条带, 计算各特异性条带在有螨样品与无螨样品中出现的概率。

特异性条带出现概率 (%) = 特异性条带在各类样品中出现的次数 / 40 × 100%。

采用 χ^2 检验 (STATVIEW 5.0 ANOVA and t—tests one group variance test) 对各有螨雄蜂与无螨雄蜂、有螨雄蜂蛹与无螨雄蜂蛹中特异性条带出现的概率进行统计分析。

94 °C 预变性	5 min	} 循环30次
94 °C 变性	1 min	
X °C 退火	1 min	
72 °C 延伸	2 min	
72 °C 延伸	10 min	

图 1 PCR 循环参数

Fig 1 PCR Cycle Parameters

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

DNA 提取的质量往往是决定 ISSR 分析成功与否的关键, 电泳结果表明, 所提取的雄蜂及雄蜂蛹 DNA 主带清晰, 无降解 (图 2)。运用紫外分光光度计测得 DNA 的 OD 值为 1.6 ~ 1.8 符合实验要求。

2.2 ISSR 扩增结果

用以上 6 对 ISSR 引物对样品 DNA 进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果 (图 3)。

2.3 特异性条带分析

从表 3 可见, 条带 182 bp 在有螨雄蜂和无螨雄蜂之间存在差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); 条带 654 bp 和 557 bp 在有螨雄蜂和无螨雄蜂之间差异极显著 ($P < 0.01$); 从表 4 可知, 条带 1 056 bp 和 189 bp 在有螨雄蜂蛹和无螨雄蜂蛹之间差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); 条带 654 bp 和 557 bp 在有螨雄蜂蛹和无螨雄蜂蛹之间差异极显著 ($P < 0.01$)。

由以上结果推测, 条带 182 bp、1 056 bp 和 189 bp 可能与蜂螨选择性寄生有关, 条带 654 bp 和 557 bp 可能是抗螨基因条带。

3 讨论

目前, 除了使用化学杀螨剂外, 还没有更有效地控制蜂螨的办法。化学杀螨剂只能作为一种短效的抗螨措施, 国外许多学者在生物方法治螨上进行了积极的探索。早在 1994 年, Stephen^[1] 利用一个电脑软件 (ModelMaker) 模拟瓦螨的繁殖过程, 蜂农可以用这个软件监控瓦螨的繁殖, 有利于蜂农对蜂螨的控制注。Collin^等^[12] 发现不同电流强度对瓦螨有不同的吸引力, 通过改变蜜蜂身上的电流强度来诱杀瓦螨。蜜蜂选择育种是根据蜜蜂的遗传和变异的特性, 通过选择和繁育, 不断扩大、积累和加强蜜蜂群体中因基因突变或基因重组而产生的某些有益变异, 并使这种有益变异得到稳定遗传^[13]

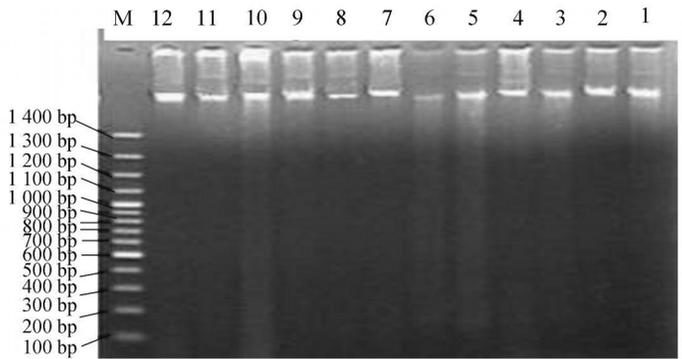


图 2 雄蜂 DNA 电泳图

Fig 2 Genomic DNA extracted from drone



图 3 引物 A1 扩增电泳图 (无螨雄蜂)

Fig 3 PCR Product of Primer A1 (non-mite drone)

表 3 有螨与无螨雄蜂中各特异性条带出现的概率

Tab 3 The Probability of the Peculiar bands between the drones with mites and non-mite drones %

体表有无蜂螨 Surface availability of bee mites	条带片段大小 / bp					
	1 156	654	557	462	306	182
有螨雄蜂 Drone with mites	62.5 ^a	42.5 ^A	75.0 ^A	72.5 ^a	67.5 ^a	60.0 ^{aA}
无螨雄蜂 Non-mite drone	50.0 ^a	82.5 ^B	22.5 ^B	65.0 ^a	82.5 ^a	45.0 ^{bA}
P值 P value	0.069	0.008	0.002	0.062	20.056	0.048

同一列比较, 相同的大写字母代表差异不显著 ($P > 0.05$), 同一大小写字母代表差异显著 ($0.01 < P < 0.05$), 不同的大写字母代表差异极显著 ($P < 0.01$).

When compared the data of the same bp in the same column, the capital and small letters indicate significant difference at the 1% and 5% level, respectively, the same as below.

表 4 有螨与无螨雄蜂蛹中各特异性条带出现的概率

Tab 4 The Probability of the Peculiar bands between the drone-pupae with mites and non-mite drone-pupae %

体表有无蜂螨 Surface availability of bee mites	条带片段大小 / bp							
	1 238	1 056	982	654	557	420	215	189
有螨雄蜂蛹 Drone-pupae with mites	67.5 ^a	75.0 ^{aA}	72.5 ^a	40.0 ^A	90.0 ^A	87.5 ^a	75.0 ^a	67.5 ^{aA}
无螨雄蜂蛹 Non-mite drone-pupae	77.5 ^a	92.5 ^{bA}	67.5 ^a	77.5 ^B	27.5 ^B	80.0 ^a	62.5 ^a	55.0 ^{bA}
P值 P value	19.258	0.036	25.246	0.007	0.001	20.059	12.562	0.042

同一列比较, 相同的大写字母代表差异不显著 ($P > 0.05$), 同一大小写字母代表差异显著 ($0.01 < P < 0.05$), 不同的大写字母代表差异极显著 ($P < 0.01$).

When compared the data of the same bp in the same column, the capital and small letters indicate significant difference at the 1% and 5% level, respectively, the same as below.

雄蜂是蜂王产生的单倍体配子, 在蜂群中, 一些优良的性状通过雄蜂遗传应该会更好效果^[14]。利用雄蜂进行抗螨蜂种的选择育种则是控制蜂螨危害的一种长期有效的根本措施, 综合比较化学防治、生物防治和基因育种防治 3种治螨途径, 无论从治螨持久性还是环保角度来讲, 基因育种防治蜂螨明显优于化学防治和生物防治。本试验利用 ISSR标记分析雄蜂及蛹特有扩增条带基因频率, 分别找出可能与抗螨相对应的特异 DNA片段。根据本实验结果, 我们认为可以利用基因工程技术, 选择可能含有抗螨基因的雄蜂作为育种素材, 给处女王进行人工授精, 来培育出抗蜂螨品种。

参考文献:

[1] 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

[2] 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

[3] 刘益波, 曾志将. 中意蜂混合饲养对意蜂蜂螨寄生率的影响[J]. 江西农业大学学报, 2009 31(5): 826-829

[4] 曾志将, 彭文君, 刘益波. 蜜蜂信息素与蜂螨防治[J]. 中国蜂业, 2007 58(11): 25-26

[5] Le Conte Y, Arnold G, Trolier J. Attraction of the Parasitic mite Varroa destructor to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters[J]. Science, 1989 35(25): 638-639

[6] Trolier J, Arnold G, Le Conte Y. Temporal Pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees[J]. Naturwissenschaften, 1991 32(78): 368-370

[7] Jr Page R E, Breed M D. Kin recognition in social bees[J]. Trends in Ecology and Evolution, 1987 2(9): 272-275

[8] 邹阳, 曾志将. 中蜂与意蜂王浆中 DNA的 RFLP分析[J]. 江西农业大学学报, 2007 29(4): 631-633

[9] 黄强, 刘志勇, 郑加兰. 运用 RAPD技术检测中华蜜蜂蜂群中亚家系数量[J]. 江西农业大学学报, 2008 30(4): 740-742

[10] 黄康, 曾志将, 颜伟玉. 中华蜜蜂 (Apis cerana cerana) 抗中囊病选育研究[J]. 江西农业大学学报, 2008 30(5): 883-887

[11] Stephen R. The bee-keepers can use a ModelMaker software to control the Varroa destructor[J]. Animal Behaviour, 1994 62(5): 57-66

[12] Colin M E, Richard D. Attraction of Varroa jacobsoni Parasite of Apis mellifera by electrical charges[J]. Journal of Insect Physiology, 2002 38(2): 111-117

[13] Winston M L. The biology of the honeybee M. Boston: Harvard University Press, 1987.

[14] 李建科, 张兰, 郭国富. 利用雄蜂选育抗蜂螨种的潜力[J]. 中国养蜂, 2005 56(9): 7-9