

文章编号: 1000-2286(2008)04-0739-04

运用 RAPD 技术检测中华蜜蜂
蜂群中亚家庭数量黄强¹, 刘志勇², 郑加兰¹, 曾志将^{1*}

(1. 江西农业大学 动物科技学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省劳动卫生职业病防治研究所, 江西 南昌 330006)

摘要: 以中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 为实验材料, 运用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术和 NTSYS 聚类软件分析蜂群亲缘关系指数和亚家庭数组成。结果表明: RAPD 技术是检测中华蜜蜂亚家庭数量的一种有效方法。

关键词: 中华蜜蜂; RAPD; 亲缘关系; 亚家庭

中图分类号: S93.2 文献标识码: A

Detecting of Subfamilies of Honeybee (*Apis cerana cerana*)
with RAPD Technique

HUANG Qiang, LIU Zhi-yong, ZHENG Jia-lan, ZENG Zhi-jiang*

(1. College of Animal Science and Technology JAU Nanchang 330045 China; 2. Jiangxi Institute of Labor Hygiene and Occupational Medicine Nanchang 330006 China)

Abstract: The experiments were conducted with *Apis cerana cerana* and then analyze the relatedness and subfamily composition of the colony were analyzed with RAPD technique and NTAYS software. The results showed that RAPD technique is an effective way to identify the subfamilies of the colony.

Key words: *Apis cerana cerana*; RAPD; genetic relatedness; subfamily

蜜蜂社会行为学特性一直受到广大生物学家关注,其原因一方面是人们意识到蜜蜂给农作物授粉的重要性,另一方面是蜜蜂社会行为学研究结果对整个社会生物学及行为生态学领域都有深远影响^[1]。由于蜂王属于多雄交配方式,因此造成了蜂群由许多“同母异父”亚家庭组成,这样必然造成了蜂群中蜜蜂个体之间的亲缘关系指数不同^[2~4]。正是由于蜜蜂个体之间的亲缘关系指数差异,工蜂表现出了亲属的辨认、优惠及监督行为^[5~11]。研究处女蜂王与雄蜂交配数量的方法很多,最早的方法是研究者观察蜂群巢门口处女蜂王交配后带交配标志进行计数,显然这种方法不够科学和准确,因为处女蜂王交配标志有可能在归巢前丢失,另外观察者也很可能漏计算蜂王交配后归巢的次数,后来有人利用蜂群内工蜂体色来估算处女蜂王与雄蜂交配数量以及雄蜂精液的利用情况,这种方法要求工蜂体色必须存在明显差异。Page 和 Metcal 用同功酶标记技术研究处女蜂王与雄蜂交配数量以及雄蜂精液的使用情况,但是,同工酶在膜翅目中缺乏多态性,这就大大限制了它们的用途。Sasaki 认为这种方法因分辨率低而不能有效判断工蜂的父系来源,便运用 DNA 指纹技术分析确认出蜂王是高度多雄性交配,但由于采集许多 DNA 样品的指纹,很耗时间且受个体提取的 DNA 数量的限制,必需的每个反应和产生复合带模型也都很困难分析,Fontik 等应用随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA 简称

收稿日期: 2007-11-20 收稿日期: 2008-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560114) 和江西省自然科学基金资助项目 (2007GZ0202)

作者简介: 黄强 (1983-) 男, 硕士生, 主要从事蜜蜂研究工作; * 通信作者: 曾志将, E-mail: bees1965@sina.com

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

RAPD)标记和同功酶标记技术,正确地测定了西方蜜蜂 (*Apis mellifera*)工蜂的父系来源。VNIR在蜜蜂亲缘关系鉴定上的应用也非常广泛,它们是具有高度多态性的遗传标记,多位于基因非编码区以及染色体的近端粒区。本文应用 RAPD技术检测了中华蜜蜂蜂群中亚家庭数目,现总结报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

以三群中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*)为实验蜂群,分别为 39号蜂群,43号蜂群和 58号蜂群。蜂群饲养于江西农业大学蜜蜂研究所。Taq酶、DNA marker RNA酶、蛋白酶和 loading dye均购自 MBI dNTP购自美灵宝,西班牙原装进口琼脂糖,Gold view购自博大泰克,其它产品为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 取样 工蜂个体用 φ (乙醇)=95%浸泡保存。

1.2.2 蜜蜂基因组 DNA的提取 用苯酚-氯仿提取法^[12 13]。

1.2.3 DNA浓度和纯度检测 琼脂糖凝胶电泳检测:取 2 μ L待测 DNA和 1 μ L上样液 (loading dye)混匀,上样于 8 g/L加有 gold view的琼脂糖凝胶,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。

紫外分光光度计检测:取 6 μ L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。

$$\text{DNA质量浓度} (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 \tag{1}$$

$$\text{DNA质量纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} \tag{2}$$

1.2.4 PCR反应和 RAPD产物电泳检测 所用 14对 RAPD引物由上海生工合成,AW₁: GAAACGGGTG AW₂: ACGGATCCTG AW₃: TGAGCCTCAÇ AW₄: CACCCGGATG AW₅: GGTCGGAGAA AW₆: TGGTGCAGA AW₇: TGTTCACGG AW₈: CCCTACCGAÇ AW₉: TTIGCCCGGT AW₁₀: CGGC-CCGGGT AW₁₁: CCTAGTCGAÇ AW₁₂: TCATCCGAGG AW₁₃: CGGACGGCGG AW₁₄: GTACCGCCCC

最佳 PCR反应条件的建立:对各组分用量进行优化^[12 14],优化结果见表 1。

表 1 PCR反应体系中各组分的优化结果

Tab 1 The optimal PCR components composition

成分	用量 / μ L
10 * PCR Buffer	2
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.4
dNTP (10 mmol/L)	0.3
F(引物) (12.5 μ mol/L)	1
Taq酶	0.5
DNA	0.5
H ₂ O	13.3
总计	20

PCR循环参数如下:94 $^{\circ}$ C预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C变性 1 min;36 $^{\circ}$ C退火 1 min以 0.5 $^{\circ}$ C/S速度到达延伸温度;72 $^{\circ}$ C延伸 2 min;72 $^{\circ}$ C后延伸 10 min;循环 40次。

PCR产物电泳:取 5 μ L PCR产物和 1 μ L上样液 (Loading dye)混匀,上样于 15 g/L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。

1.2.5 数据处理 根据每只蜜蜂 RAPD

扩增出的带谱进行统计分析,有条带的记为 1,没有条带的记为 0,建立 Excel表格。用 NTSYS软件对表格进行聚类分析,得到蜜蜂个体间的遗传相似系数和各亚家庭组成。

2 实验结果

2.1 DNA提取结果

DNA提取的质量往往是决定 RAPD分析成功与否的关键,电泳结果表明,所提取的基因组 DNA主带清晰,无降解(图 1)。

2.2 RAPD扩增结果

用以上 14对随机引物对基因组 DNA扩增(图 2),根据扩增结果用 NTSYS软件计算出个体间的遗传相似系数表(图 3)。

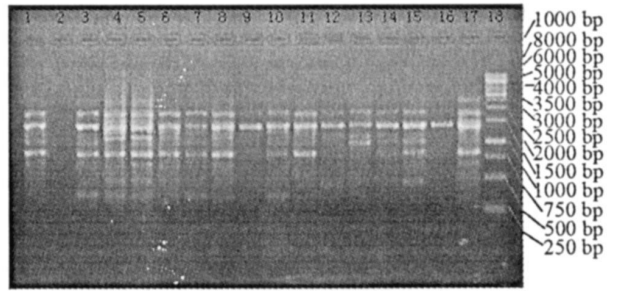
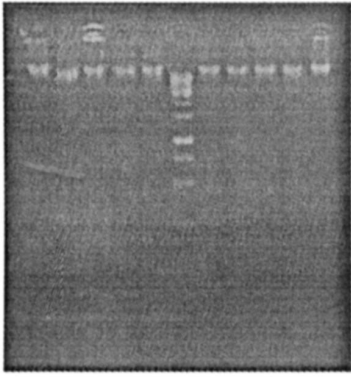


图 1 蜜蜂基因组 DNA

Fig 1 Genomic DNA extracted from honeybee

图 2 引物 AW14 扩增

Fig 2 PCR Product of Primer AW1

2.3 亚家庭成员分析

根据全同胞姐妹亲缘关系指数为 0.75 39号蜂群可以聚类出 13个亚家庭, 43号蜂群可以聚类出 9

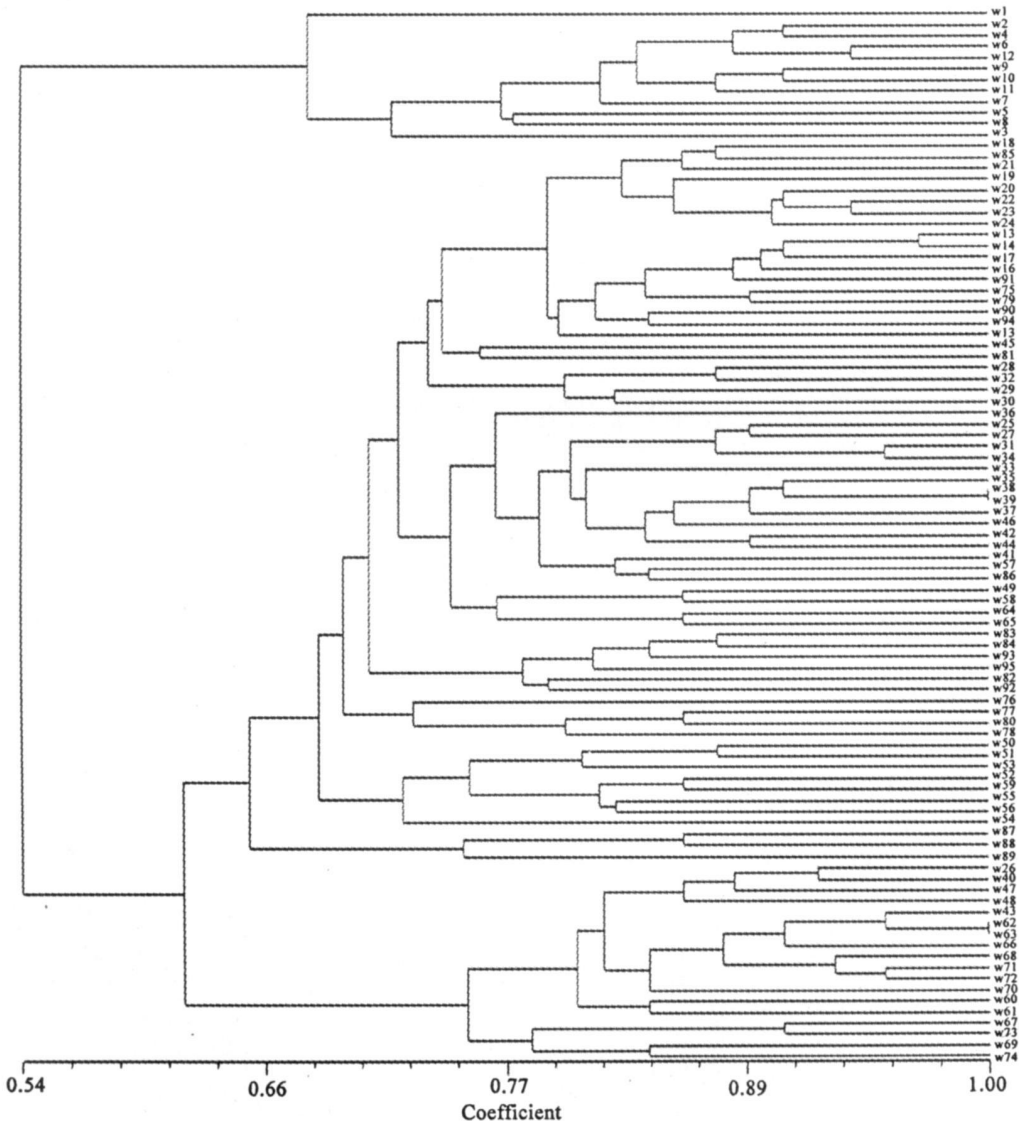


图 3 39号蜂群个体之间的遗传相似系数

Fig 3 The genetic coefficient among the workers of colony 39

个亚家庭, 58号蜂群可以聚类出 12个亚家庭, 即蜂王分别与 13只雄蜂, 9只雄蜂和 12只雄蜂进行了交配。这与中华蜜蜂蜂王自然交配次数相吻合^[15], 同时说明了 RAPD技术能有效鉴定中华蜜蜂蜂群中的亚家庭数目。

3 讨 论

蜜蜂是多雄性交配社会昆虫, 蜂群由全同胞姐妹和半同胞姐妹组成, 全同胞姐妹的亲缘关系指数 $r = 0.75$ 半同胞姐妹的亲缘关系指数 $r = 0.25 + 0.5/n$ (n 为与蜂王交配的雄峰数量), 亚家庭成员间的社会行为关系一直是各国昆虫学家关注的焦点。用 RAPD技术鉴别雄蜂来源比较简单经济, 条带的分析也比较容易, 显然 RAPD技术是分析中华蜜蜂亚家庭数量的一种简单有效的方法。

致谢: 在实验过程中得到了江西省动物生物重点开放实验室任军研究员的帮助, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 黄智勇. 蜜蜂生态学进展 [M] // 刘建国. 当代生态学博论. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 1 987—2 005
- [2] Zeng Z J, Huang Z Y, Qin Y C, et al. Hemolymph juvenile hormone titers in worker honey bees under normal and pre-swarming conditions [J]. Journal of Economic Entomology 2005 (2): 274—278
- [3] Seeley TD. Honeybee ecology: A study of adaptation in social life [M]. Princeton: Princeton Univ Press, 1985
- [4] Winston M L. The biology of the honeybee [M]. Boston: Harvard University Press, 1987.
- [5] Gezw W M, Smith K B. Genetic kin recognition: Honey bees discriminate between full and half sisters [J]. Nature, 1983, 302: 147—148
- [6] Page R E Jr, Breed M D. Kin recognition in social bees [J]. Trends in Ecology and Evolution, 1987, 2(9): 272—275
- [7] Page R E Jr, Robinson G E, Fondrik M K. Genetic specialists: kin recognition and nepotism in honeybee colonies [J]. Nature, 1989, 338(6216): 576—579
- [8] Ramirez F L W, Kvesscher P. Worker policing in the honeybee [J]. Nature, 1989, 342: 796—797.
- [9] Stephen J M, Madeleine B, Theresa C W. Parasitic cape honeybee workers, *Apis mellifera capensis*, evade policing [J]. Nature, 2002, 415: 163—165
- [10] 谢宪兵, 曾志将. 中华蜜蜂群内工蜂监督研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(5): 818—820
- [11] Christian W W P, Peter N, Randall H. Egg viability and worker policing in honey bees [J]. PNAS, 2004, 101(23): 8 649—8 651.
- [12] 颜伟玉, 曾志将. 蜜蜂 DNA提取纯化与 RAPD反应体系的建立 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 783—786
- [13] 邹阳, 曾志将. 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.
- [14] 邹阳, 曾志将. 中蜂与意蜂王浆中 DNA的 RAPD分析 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(4): 631—633
- [15] 陈盛禄. 中国蜜蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 154—155