

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.04.006

基于微卫星标记的西方蜜蜂 抗螨蜂种群遗传多态性分析^①

张祖芸¹, 杨若鹏², 陈玲³,
余玉生¹, 宋文菲¹, 王艳辉¹, 张学文¹

1. 云南省农业科学院 蚕桑蜜蜂研究所, 云南 蒙自 661101; 2. 红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661100;
3. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 昆明 650201

摘要: 为了分析西方蜜蜂抗螨蜂种的群体遗传多态性情况, 采用 18 对微卫星(SSR)引物对抗螨蜂种子一代和子二代, 并与同场饲养不抗螨的本地意蜂和浙大蜜浆高产蜂种进行比对, 共计 22 个群体进行遗传多样性检测. 结果表明: 遗传一致度在 0.2 时, 抗螨蜂种子代发生一定的分化, 其他两个品系基本一致. 抗螨蜂种子代之间的亲缘关系较近(遗传距离在 0.043 9 以内), 与本地意蜂和浙大蜜浆高产蜂种各自相互分开. 从而对抗螨蜂种的选育和保护具有重要的指导意义.

关键词: 西方蜜蜂; 抗螨蜂种; 遗传多样性; 微卫星标记

中图分类号: S892

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)04-0031-07

西方蜜蜂抗螨蜂种(*A. mellifera*, varroa-resistant honeybees)是由法国引进, 通过集团选育而成, 对大蜂螨(*Varroa Destructo*)有很强的抵抗力^[1]. Danka 等, Rinderer 等, De Guzman 等研究得出该蜂种具有抗螨能力较强、不易盗蜂、能耐受低温天气、易分蜂性等生物学特性^[2-4]. Büchler 等对抗螨蜂种也进行了广泛研究, 通过大量的选育措施和雄蜂选择筛选出抗螨力强的蜂种^[5]. 在国内, 谢宪兵等应用中华蜜蜂的蜂王浆饲喂意蜂工蜂小幼虫等技术培育出抗螨力高于亲本的营养杂交蜂种^[6]. 卢焕仙等对抗螨蜂种(由法国引进)进行饲养观察, 对其种性和适应性、抗螨性进行了观察研究^[7]. 另外, 笔者对抗螨蜂种第一代蜂王适应性和繁殖能力进行了研究, 得出该蜂种秋繁和春繁能力较强, 较浙大蜜浆高产蜂种第一代王繁殖略好^[8]. 并对抗螨蜂种子代形态特征进行测定分析, 得出抗螨蜂种子代颜色较深, 与浙大蜜浆高产蜂种和本地意蜂差异显著^[9].

近年来, 随着蜂螨危害的加重, 加之化学杀虫剂的频繁使用, 对蜂产品存在潜在的污染等问题, 如何提高我国蜂产品质量, 如何采取科学的选育措施培育出抗螨能力强的蜂种, 已成为我们饲养西方蜜蜂生产实践和品种保存中首要解决的突出问题. 因此, 需要弄清抗螨蜂种群体的遗传多样性和遗传背景. 因为对抗螨蜂种群进行遗传多态性检测, 可为抗螨蜂种的种群进化、品种保存、抗螨机理研究等方面提供理论依据. 目前, 蜜蜂群体遗传多样性研究常用的分子技术主要有微卫星 DNA 标记技术, 有方便快捷检测等优点, 因此, 能广泛应用于动植物的遗传多样性研究、遗传图谱的构建、亲缘关系鉴定等分子辅助育种领域^[10]. Al-Otaibi 通过 ISSR 标记技术构建 UPGMA 系统发生树, 分析表明抗螨蜂种群间和种群内存在明显的遗传变异^[11]. 本研究采用微卫星标记技术分析抗螨蜂种群遗传多样性, 结合当地饲养的两个生产性

① 收稿日期: 2016-06-17

基金项目: 国家蜂产业技术体系专项(CARS-45-SY2 17).

作者简介: 张祖芸(1984-), 女, 云南新平人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事蜜蜂生物学及分子育种的研究.

通信作者: 张学文, 副研究员.

能比较优良的蜂种作对照, 以期为其品种资源的评估和利用提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

在云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所西方蜜蜂试验蜂场和个旧蛮耗交尾场采集抗螨蜂种一代(以品系名首字母命名, 即 Km-F1)6 群, 抗螨蜂种二代(Km-F2)6 群, 浙大蜜浆高产蜂种(mj)4 群, 本地意蜂(Be)6 群, 共计 22 群, 每群采集 100 只, 放入无水乙醇浸泡保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱.

1.2 方 法

DNA 基因组提取、检测等试验方法参照赵亚周等^[12-13]和杨洁等^[14]的实验操作, 本研究引物采用 Soli-gnac 等相关文献报道^[15-18]或 NCBI 检索, 最终选择 18 对多态性较好的 SSR 引物(表 1), 所用引物先后由生工生物工程(上海)有限公司提供.

表 1 18 对微卫星座位信息及其 PCR 扩增条件

微卫星座位	登录号	引物序列(5'-3')	染色体	镁离子浓度 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$
AP189	AJ509433	F: TCCCACCTTCACCCTATCG R: GCTTCTTTCCTTCTCGAGTCTC	Chr LG10	2.0	55
AP274	AJ509486	F: ATATCCCGGTGGCCACGT R: TGTCGCCACGCATAACTCG	Chr LG3	1.2	55
A48	AJ509259	F: GAACAACGTTGTGCGGTG R: CTTGCTCCCACACGCTCT	Chr LG9	2.0	58
A35	AJ509251	F: GTACACGGTTGCACGGTTG R: CTTGATGGTCGTTGTACCC	Chr LG14	1.2	57
A24	AJ509241	F: CACAAGTTCCAACAATGC R: CACATTGAGGATGAGCG	Chr LG7	2.0	55
AP297	AJ509499	F: GGGTTGAGATGCTAGAAACGA R: CGTCTATTGGAAGAAACGCTG	Chr LG12	1.2	50
AP92	AJ509364	F: CTGTTATTGCTCCCATCGC R: ACCTGAGGTCATACGCGAC	Chr LG15	1.2	50
A113	AJ509290	F: CTCGAATCGTGGCGTCC R: CCTGTATTTTGCAACCTCGC	Chr LG6	1.5	60
AP43	AJ509329	F: GCGTGCACAGCTTATTCC R: CGAAGGTGGTTTCAGGCC	Chr LG3	2.0	60
A14	AJ509239	F: GTGTCGCAATCGACGTAACC R: GTCGATTACCGATCGTGACG	Chr LG8	1.7	58
AP313	AJ509504	F: TAGCGCCCTAACGTCCAAC R: CCCTTCTACCACCGACGC	Chr LG4	1.5	56
AP63	AJ509348	F: CGTCCTTCTCGGTCCACT R: GACAGCTACGTGGAACGGA	Chr LG2	1.2	60
A28	AJ509244	F: GAAGAGCGTTGGTTGCAGG R: GCCGTTTCATGGTTACCACG	Chr LG14	1.7	54
AP243	AJ509466	F: AATGTCCGCGAGCATCTG R: TGTTTACGAGAATTCGACGGG	Chr LG1	2.0	56
A107	AJ509287	F: CCGTGGGAGGTTTATTGTCG R: GGTTCGTAACGGATGACACC	Chr LG7	2.0	58
AT101	AJ509549	F: GCGTTCCAAGTGAATGAACA R: GTTGGCTATTTTCGTATCGC	Chr LG12	1.5	50
AC181	AJ509699	F: CGACGATTGTTAAGTTCAATAAC R: GTCGGATTCGAGACGAGG	Chr LG11	2.0	50
AC124	AJ509673	F: CCTGTTCGTGAATTACTGTAAAG R: TTGCCCTGTAAAATTCTAACC	Chr LG13	1.5	50

PCR反应总体积为10 μL ,其中10 \times PCR Buffer(Mg^{2+} 浓度15 mmol/L)1.0 μL ,dNTPs(2.5 mmol/L)1.0 μL ,引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL ,rTaq酶(5 U/ μL)0.1 μL ,模板1 μL ,ddH₂O 6.4 μL .其反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min,15 $^{\circ}\text{C}$ 冷却5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

取PCR产物5 μL 以2.0%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,得到较纯的DNA,条带清晰,稳定性好.再进行8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析,然后银染显色,最后照相保存.

1.3 数据分析

对图谱(图1和图2)上的扩增条带进行读数,在相同的迁移率位置上,有带为1,无带为0,形成0,1数据矩阵.再利用NTSYS-2.10e,popGene32软件和ANOVA等软件进行遗传多态性评价.

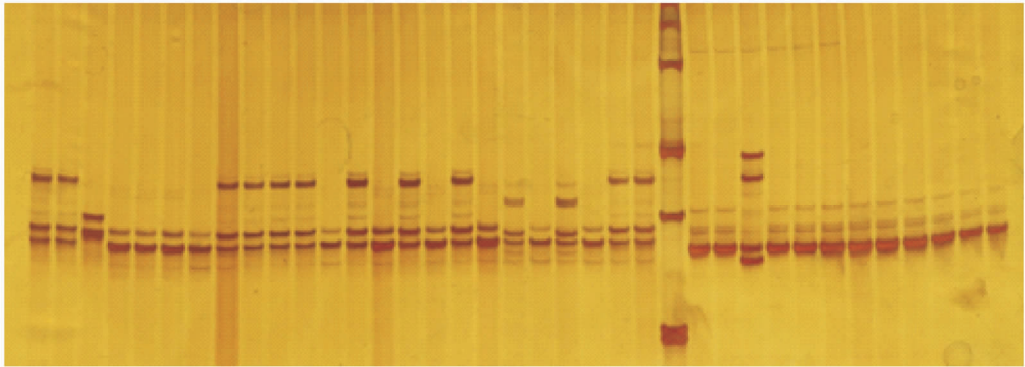


图1 SSR产物聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果(一)

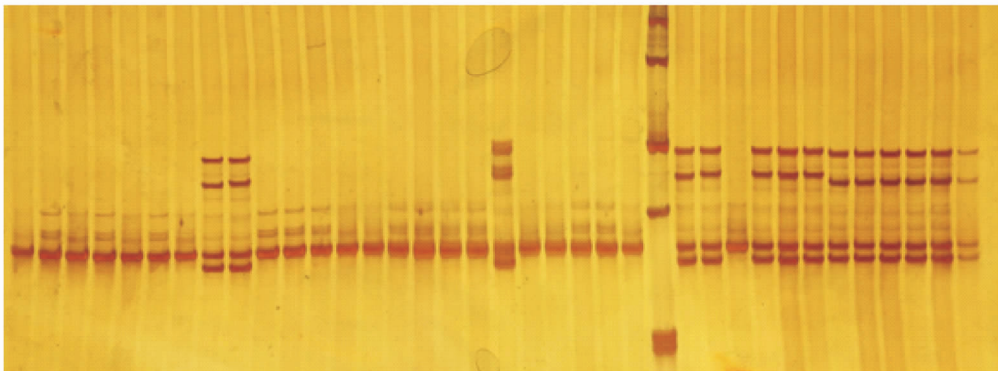


图2 SSR产物聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果(二)

2 结果与分析

2.1 群体聚类分析

经过读带发现,样品共有22个群体.首先利用NTSYS-2.10e软件对22个群体进行了初步分析,得到一个聚类图(图3).可以看出所有群体的遗传一致度在0.2时,具有相似的遗传背景.结合两个采集地点进行分析,发现抗螨蜂种子代之间出现一定程度的分化,且抗螨蜂种子代与同场饲养的浙大蜜浆高产蜂种亲缘关系较近,与不同采集地点的本地意蜂相对较远.

2.2 群体间遗传一致度和遗传距离

对22个群体进行遗传一致度和遗传距离计算,得出Nei氏遗传一致度为0.9354~0.9587(表2),都在0.9以上,遗传相似性较高.本地意蜂与抗螨蜂种二代遗传一致度最低,为0.9354,本地意蜂与蜜浆高产蜂种遗传一致度最高,为0.9587.遗传距离为0.0422~0.0668(表2),说明抗螨蜂种F1代和本地意蜂、浙大蜜浆高产蜂种遗传距离较小(0.04以上),F2代与浙大蜜浆高产蜂种遗传距离较大(0.06以上).

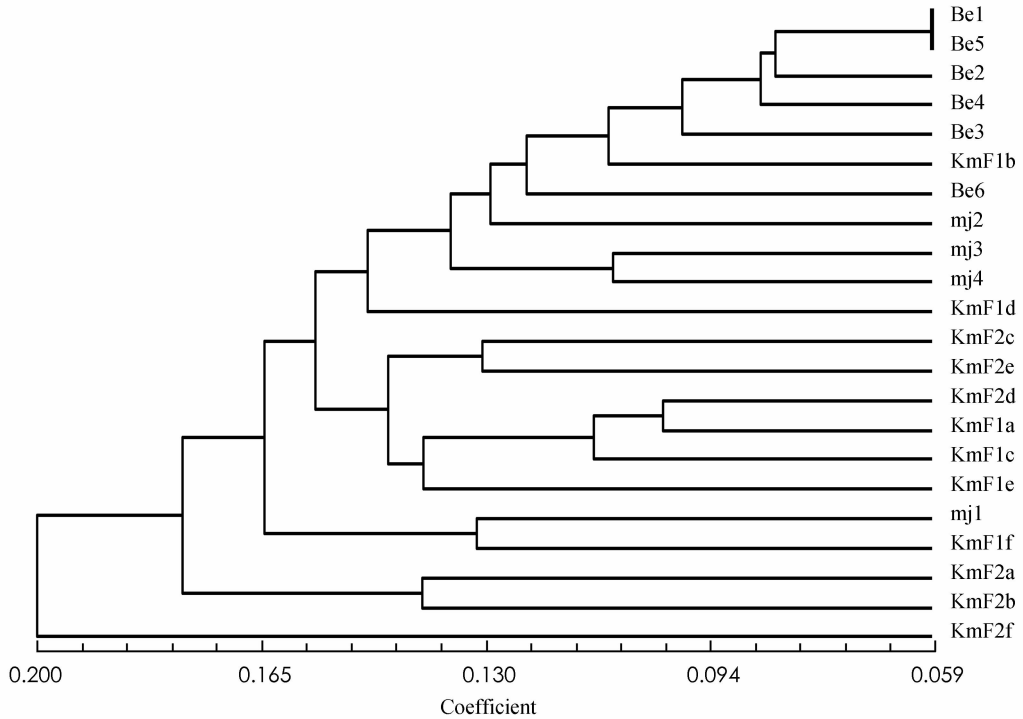


图 3 22 个群体基于 SSR 多态性的初步聚类分析树状图

表 2 4 个品系样品的 Nei 氏遗传一致度和遗传距离

	Km-F1	Km-F2	Be	mj
Km-F1	* * * *	0.957 0	0.958 1	0.951 7
Km-F2	0.043 9	* * * *	0.935 4	0.938 1
Be	0.042 8	0.066 8	* * * *	0.958 7
mj	0.045 9	0.063 9	0.042 2	* * * *

2.3 品种间群体的聚类分析

利用表 2 所列各群体的遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 得出遗传多态性聚类图(图 4), 4 个类型共聚为 2 个大的类群, 抗螨蜂种子代之间聚为一个分支, 本地意蜂和蜜浆高产蜂种聚为另一个分支。

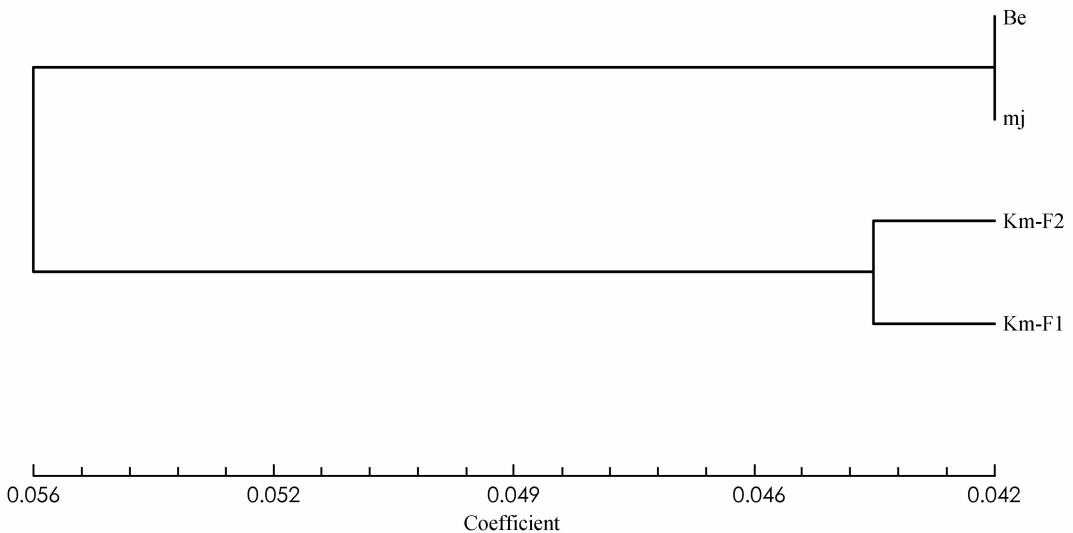


图 4 4 个品系蜜蜂样品遗传多态性聚类图

2.4 品种间遗传多样性统计

对实验样品的数据进行多样性统计, 可见抗螨蜂种子一代和子二代比较接近, 它们的遗传多样性水平明显要比其他两个群体遗传多样性高一些, 本地意蜂和蜜浆高产蜂种的各项多样性指标比较接近(表 3)。

表 3 西方蜜蜂各品系种群的遗传多样性统计

品种	样本量	观测等位基因数 N_a	有效等位基因 N_e	Nei 氏基因多样性 H	Shannon's 指数 I
Km-F1	72	1.964 3±0.186 4	1.602 9±0.341 0	0.342 3±0.162 9	0.505 9±0.210 4
Km-F2	72	1.964 3±0.186 4	1.607 7±0.315 7	0.350 4±0.144 5	0.519 9±0.184 3
Be	72	1.955 4±0.207 4	1.539 3±0.330 9	0.317 4±0.157 3	0.478 0±0.203 6
mj	48	1.946 4±0.226 2	1.596 9±0.352 1	0.338 5±0.163 8	0.501 5±0.210 3
整体水平	264	2	1.638 4±0.312 9	0.363 6±0.132 9	0.537 5±0.170 9

2.5 品系间的 Nei 氏遗传变异分析

4 个品系之间出现了一定程度的遗传分化(表 4), 遗传分化系数 G_{st} 为 0.073 8, 即遗传变异有 7.38% 存在居群间, 有 92.62% 遗传变异存在居群内. 再由 G_{st} 值推导出的 3 个群体间的基因流 N_m 较高, 为 6.274 7>1.

表 4 4 个品系群体 SSR 多样性 Nei 氏分析

	总基因多样性 H_t	品系内基因多样性 H_s	遗传分化系数 G_{st}	基因流 N_m
平均值	0.364 0	0.337 1	0.073 8	6.274 7
标准差	0.019 7	0.016 8		

2.6 品系间的主成分分析

根据表 2 中 4 个类型群体的遗传一致度数据进行主成分分析, 第一主成分所占的总变异度为 63.49%, 第一主成分占 24.99%, 累积高达 88.48%, 因此, 可以作为主成分反映品系群体间的遗传多态性信息. 以此作图, 可将 4 个品系分为 2 个类群(图 5), 与聚类分析结果(图 4)基本一致, 且各品系间的遗传多态性信息更加细化, 相互之间的分化状况更加直观. 抗螨蜂种一代和二代与本地意蜂和蜜浆高产蜂种相互分开.

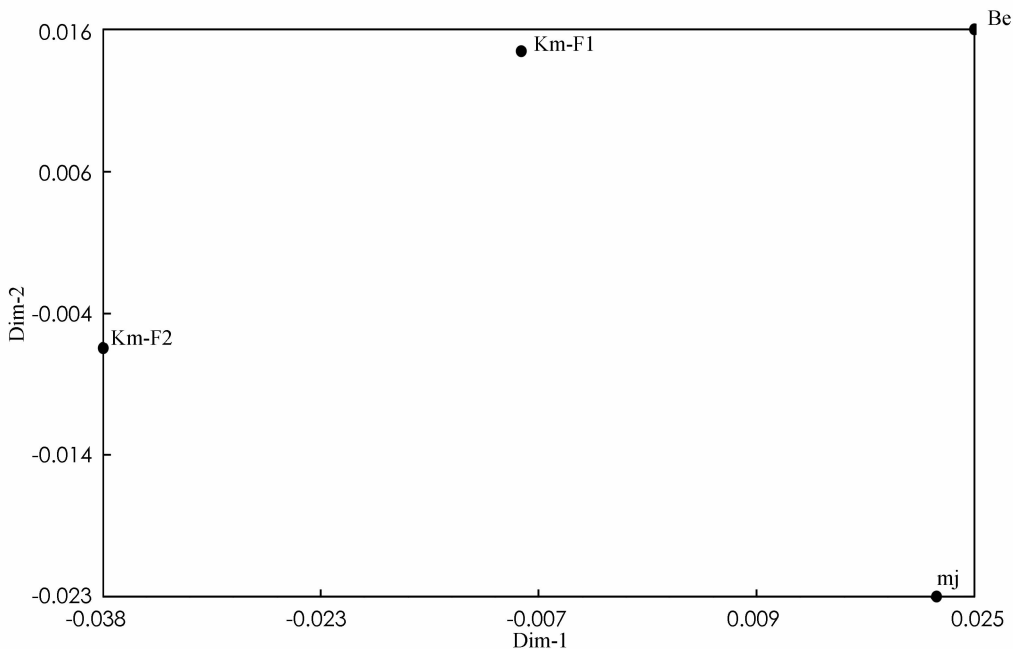


图 5 基于 SSR 的西方蜜蜂各品系样品的主成分分析

2.7 群体方差分析

从表 5 中得出群体间的遗传变异占 16.15% ($P < 0.001$), 而群体内的遗传变异占 83.85% ($P < 0.001$). 说明 4 个品系蜂种的遗传变异主要来自蜂群内部.

表 5 AMOVA 分析

变异来源	自由度	平方和	均方	方差分量	贡献率/%
品系间	3	0.416 7	0.139	0.013 0	16.15
品系内	18	1.219 3	0.068	0.066 7	83.85

3 讨 论

本研究中的抗螨蜂种子代之间的血统亲缘关系最近(遗传一致度为 0.957 0, 遗传距离为 0.043 9), 可能是由于母本来源于同一个祖先, 而与本地意蜂和蜜浆高产蜂种较远. 4 个品系间种群的聚类树状图(图 4)和主成分分析(图 5)显示, 所有样品共聚为 2 个大的分支, 抗螨蜂种子代之间聚为一支, 本地意蜂和蜜浆高产蜂种聚为一支. 这与 4 个品系蜂种的生物学特性、外部形态特征分析的结果相符^[9]. 据实际观察和前期形态测定结果, 抗螨蜂种子代的体色较深, 本地意蜂次之, 蜜浆高产蜂种较浅^[9]. 因此, 该结果表明 SSR 标记可以用于抗螨蜂种遗传多态性的研究, 还可以进一步研究种内不同品系间的系统起源和发育.

根据 Nei 氏基因多样性 H 和 Shannon's 指数 I 可以得知: 抗螨蜂种的遗传多样性水平要比其他两个群体遗传多样性水平高一些, 说明抗螨蜂种的遗传多样性较高, 能够为选育优良的抗螨蜂种提供丰富的基因资源. 4 个品系总群体的遗传多样性水平不高, 有一定的遗传分化, 遗传分化系数 Gst 为 0.073 8, 表明居群内遗传分化大于居群间的遗传分化, 群体分子方差分析也表明了 4 个品系蜂种的遗传变异主要来自蜂群内部. 本试验结果表明, 4 个品系蜜蜂群体的总基因流 $Nm(6.274 7) > 1$, 即说明由于群体间的基因交流程度比较频繁, 防止了品系间遗传分化的进一步发生. 此外, 这与本蜂场生产实践相符, 因为是常年定地饲养的蜂场, 蜂群小转地追花夺蜜, 所以群体之间基因交流现象非常频繁^[19-20]. 另外, 抗螨蜂种子代与同场饲养的浙大蜜浆高产蜂种亲缘关系较近, 与不同采集地点的本地意蜂相对较远.

致谢: 本研究实验过程在云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所完成, 受到程在全教授及该课题组全体老师不倦的教诲和热情帮助, 在此表示诚挚的感谢!

参考文献:

- [1] 胥保华. 蜜蜂属内蜂种的分类、地理分布、形态特征和生物学特性 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(3): 265-268.
- [2] DANKA R G, RINDERER T E, KUZNETSOV V N, et al. A USDA-ARS Project to Evaluate Resistance to *V. Jacobsoni* by Honey Bees of Far-Eastern Russian [J]. American Bee Journal, 1995, 135(11): 746-748.
- [3] RINDERER T E, DE GUZMAN L I, DELATTE G T, et al. Resistance to the Parasitic Mite *Varroa Destructor* in Honeybees From Far-Eastern Russia [J]. Apidologie, 2001, 32(4): 381-394.
- [4] DE GUZMAN L I, RINDERER T E, BIGALK M, et al. Russian Honey Bee Colonies; Acarapis Wood; Infestations and Over-Wintering Survival [J]. Apiculture and social Insects, 2005, 98(6): 1796-1801.
- [5] BÜCHLER R, BERG S, LE CONTE Y. Breeding for Resistance to *Varroa Destructor* in Europe [J]. Apidologie, 2010, 41(2): 393-408.
- [6] 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, 41(5): 1530-1535.
- [7] 卢焕仙, 张学文, 张祖芸, 等. 法国抗螨蜂种在云南的适应性·抗螨性试验 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2766, 2769.
- [8] 张祖芸, 卢焕仙, 王艳辉, 等. 抗螨蜂种第一代蜂王适应性和繁殖能力研究 [J]. 南方农业学报, 2013, 44(3): 507-510.
- [9] 张祖芸, 罗凌娟, 宋文菲, 等. 西方蜜蜂抗螨蜂种子代形态测定分析 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 2240-2245.
- [10] SOLIGNAC M, VAUTRIN D, BAUDRY E, et al. A Microsatellite-Based Linkage Map of the Honeybee, *Apis Mellifera L* [J]. Genetics, 2004, 167(1): 253-262.
- [11] AL-OTAIBI S A. Genetic Variability in Mite-Resistant Honey Bee Using ISSR Molecular Markers [J]. Arab J Biotech, 2008, 11(7): 241-252.
- [12] 赵亚周, 彭文君, 安建东, 等. 中国意大利蜜蜂微卫星遗传多态性 [J]. 昆虫学报, 2010, 53(3): 248-256.
- [13] 赵亚周. 意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 遗传多态性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [14] 杨 洁, 周丹银, 黎仁军, 等. 云南野生大蜜蜂(*Apis dorsata*)群体遗传多样性的微卫星分析 [J]. 华北农学报, 2012,

27(4): 130–134.

- [15] SOLIGNAC M, VAUTRIN D, BAUDRY E, et al. A Microsatellite-Based Linkage Map of the Honeybee, *Apis mellifera* L [J]. *Genetics*, 2004, 167(1): 253–262.
- [16] SOLIGNAC M, VAUTRIN D, LOISEAU A, et al. Five Hundred and Fifty Microsatellite Markers for the Study of the Honeybee (*Apis mellifera* L.) Genome [J]. *Mol. Ecol. Notes*, 2003, 3(2): 307–311.
- [17] OALL’OLIO R, MARINO A, LODESANI M, et al. Genetic Characterization of Italian Honeybees, *Apis Mellifera Ligustica*, Based on Microsatellite DNA Polymorphisms [J]. *Apidologie*, 2007, 38(2): 207–217.
- [18] 宋文菲, 沈登荣, 杨爽, 等. 蜜蜂囊状幼虫病毒多聚蛋白基因遗传结构分析 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 40(7): 102–107.
- [19] 彭文君, 罗其花, 李长春, 等. 基于微卫星标记的东北黑蜂群体遗传多态性分析 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(21): 4484–4491.
- [20] 曹联飞, 姬聪慧, 任勤, 等. 重庆金佛山地区东方蜜蜂遗传多样性研究 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 35(5): 162–166.

Genetic Diversity Analysis of Mite-Resistance Honeybees (*Apis mellifera*) Based on Microsatellite Markers

ZHANG Zu-yun¹, YANG Ruo-peng², CHEN Ling³, YU Yu-sheng¹,
SONG Wen-fei¹, WANG Yan-hui¹, ZHANG Xue-wen¹

1. Sericultural and Apicultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi Yunnan 661101, China;

2. College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi Yunnan 661100, China;

3. Research Institute of Biotechnology & Genetic Germplasm, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: *Varroa*-resistant honeybees of *A. mellifera* L. has a strong resistance to *Varroa destructo*, which were named as F1 and F2. Firstly the genetic diversity of F1 and F2 was investigated with 18 microsatellite markers. Secondly, the mite-resistance bees of the local *A. mellifera* (Yunnan, Southwest China) and the high yield bees of royal jelly breed from Zhejiang University (East China) were chosen for comparison analysis. The results show, in 22 sample colonies, when Nei’s genetic identity index exceeded 0.2, distinct genetic divergence was found filial generation of mite-resistance bees, while other breeds were the same nearly. The F1 and F2 of mite-resistance bees had a close descent relationship (the genetic distances between them were 0.0439), with the local *A. mellifera* and the high yield bees of royal jelly breed from Zhejiang University separated from each other.

Key words: *A. mellifera* L.; mite-resistance bees; genetic diversity; SSR makers

责任编辑 周仁惠