

应用微卫星标记分析野生红光熊蜂蜂王的一妻多夫水平^{*}

彭文君^{1**} 罗其花^{2***} 安建东¹ 李长春² 刘晓东² 马玉珍²

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 北京市密云县园林绿化局 北京 101500)

摘 要 为了摸清自然条件下红光熊蜂 *Bombus ignitus* Smith 的一妻多夫水平, 本实验采用 B118、B11、B96、B124 和 B126 微卫星位点, 对来自 5 群野生红光熊蜂 (A、B、C、D 和 E) 的工蜂和雄蜂样本进行了分析。结果推导出: 在 A、B、C、D 和 E 群体的工蜂基因型中, 来自父本的基因型分别有 3、2、3、4 和 3 种, 即与母本蜂王交配的雄蜂数量分别是 3、2、3、4 和 3 只。表明在自然条件下, 红光熊蜂同其他蜜蜂科的蜂种一样, 也存在一妻多夫现象, 且与蜂王交配的雄蜂数量平均为 3 只。

关键词 微卫星, 红光熊蜂, 一妻多夫水平

Levels of polyandry of wild *Bombus ignitus* queens base on microsatellite DNA markers

PENG Wen-Jun^{1**} LUO Qi-Hua^{2***} AN Jian-Dong¹ LI Chang-Chun² LIU Xiao-Dong² MA Yu-Zhen²

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. Miyun County Bureau of Landscape and Forestry, Beijing 101500, China)

Abstract Samples of queens, workers and drones from five colonies of wild *Bombus ignitus* Smith were assessed at the B118, B11, B96, B124 and B126 microsatellite loci to analyse levels of polyandry. 3, 2, 3, 4 and 3 father genotypes, respectively, were found in workers from the five colonies, indicating that the respective queens had each mated with 3, 2, 3, 4 and 3 males. These results suggest that polyandry is common in *B. ignitus* colonies as with other species of Apidae, and that the average number of males with which each queen had mated was 3.

Key words microsatellite, *Bombus ignitus*, levels of polyandry

熊蜂隶属于膜翅目 (Hymenoptera) 蜜蜂科 (Apidae) 熊蜂属 (*Bombus*), 是一类重要的传粉昆虫。其在保持生物多样性及维持生态系统平衡方面起着极为重要的作用 (彭文君与安建东, 1999; 孙海芹等, 2003; 蒙艳华等, 2007)。由于熊蜂吻长、采集能力强, 对低温、弱光、高湿环境的适应能力显著优于蜜蜂, 因此熊蜂还是温室作物尤其是茄科植物的理想授粉者 (彭文君与安建东, 1999; 安建东等, 2010)。利用熊蜂为温室果蔬传粉, 不仅能够促进座果, 提高产量, 更为重要的是熊蜂传粉避免了传统生产中应用植物生长调节剂等处理

花朵而带来的激素污染, 能够显著改善果实籽粒品质 (安建东等, 2010)。

中国是全世界熊蜂资源最丰富的国家, 已知熊蜂 115 种, 占世界熊蜂种类总数的 46% (Williams *et al.*, 2010)。近年来, 红光熊蜂 *Bombus ignitus* Smith、密林熊蜂 *Bombus patagiatus* Nylander 和小峰熊蜂 *Bombus hypocrite* Pérez 等本土蜂种被相继繁育成功, 并在设施果蔬传粉应用方面取得了初步成效 (吴杰等, 2005, 2009; 刘新宇等, 2007)。红光熊蜂是我国分布较广的一个种类, 在人工养殖条件下其平均群势为 547 只, 其中

* 资助项目: 农业部引进国际先进农业科学技术“948”滚动项目 (2006 - G19) 和国家自然科学基金项目 (30972149)。

**E-mail: pengwenjun@vip.sina.com

***通讯作者, E-mail: luoqihua0825@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-20, 接受日期: 2012-06-18

工蜂 139 只,雄蜂 376 只,子代蜂王 32 只(安建东等,2010)。相对于密林熊蜂和小峰熊蜂,红光熊蜂在人工繁育条件下子代蜂王成群率较低、死亡率偏高,分析其原因可能是人工选育过程有效的繁殖亲本过少引起子代工蜂遗传多样性偏低,生活力下降等。为了增加人工养殖群体的遗传多样性,建立科学可靠的遗传谱系,需要鉴定自然条件下红光熊蜂家系内个体的父本来源情况,即蜂王的一妻多夫水平。

目前,生物亲权鉴定常用的分子技术主要有 DNA 指纹、线粒体 DNA 和微卫星 DNA 等。与其他 DNA 分子标记相比较,微卫星 DNA 具有数量多、分布广、多态性丰富、呈孟德尔共显性遗传、易于检测、分析速度快等众多优点,使其在动植物的遗传多样性研究、遗传图谱的构建、个体鉴定等分子辅助育种领域得到了广泛的应用(晏鹏等,2003)。Moritz 等(1995)应用微卫星标记技术分析大蜜蜂 *Apis dorsata* 蜂王的一妻多夫水平,表明与大蜜蜂蜂王交配的熊蜂数量平均高达 30 只。谢宪兵等(2008)用相似的方法研究了 2 群中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*,表明在自然交尾的条件下,与中华蜜蜂蜂王交配的雄蜂数量分别为 4 只和 8 只。Payne 等(2003)利用微卫星位点 B10 对美国北部 11 个熊蜂品种的 30 个群体进行一妻多夫水平分析,结果表明其中 22 个群体的蜂王分别仅与一只雄蜂交配过,而另 8 个群体的蜂王分别与 2 只以上的雄蜂交配过。Schmid-Hempel 和 Schmid-Hempel(2000)也对欧洲地区的 8 个熊蜂品种进行调查,发现大部分蜂王也仅与一只熊蜂交配过,只有 *Bombus hypnorum* 蜂王存在一妻多夫现象。因此,本实验采用相同的方法对中国红光熊蜂蜂王的一妻多夫水平进行分析,推断野生中国红光熊蜂的交配模式,为熊蜂的人工繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

试验蜂王系 2008 年 5 月份采自河北省兴隆县山区(样本编号 A 和 B)和山西省忻州市五台山(样本编号 C、D 和 E)的野外越冬蜂王。将刚出蛰的越冬蜂王带回熊蜂繁育室后,参照吴杰等(2005)的繁育方法进行人工驯养:即在温度为 29 ~ 30℃,相对湿度为 50% ~ 60% 的条件下饲养,

以 50% 糖液和新鲜杏花粉为饲料进行饲喂。待蜂群成群且蜂群内出现大量雄蜂和子代蜂王时(约蜂王开始产卵 3 个月后),对每个实验群随机抓取子代工蜂和雄蜂各 22 只,分别投入盛有 75% 酒精溶液的取样管, - 20℃ 保存待用。DNA 的提取方法参照 Garnery 等(1993)。

1.2 一妻多夫水平的确定

由于子代工蜂微卫星标记位点的等位基因 1 个来自母本,1 个来自父本,本实验根据子代工蜂基因型和子代雄蜂基因型来推测出每个家系的母本基因型和父本基因型。如 A 家系,通过实验得到了各个子代工蜂基因型和子代雄蜂基因型,由子代工蜂和子代雄蜂的基因型即可得到母本的基因型(雄蜂是单倍体,其遗传物质全部来自于母本);再根据子代工蜂的基因型和母本的基因型即可推测出来自于父本的基因型(Estoup *et al.*, 1994, 1996; Moritz *et al.*, 1995; Oldroyd *et al.*, 1996; Schmid-Hempel and Schmid-Hempel, 2000; Payne *et al.*, 2003; 谢宪兵等, 2008),进而推算出与蜂王交配的雄蜂数量。

1.3 微卫星位点扩增和片段分析

根据文献报道(Estoup *et al.*, 1994, 1996; Moritz *et al.*, 1995; Schmid-Hempel and Schmid-Hempel, 2000; Payne *et al.*, 2003),NCBI 数据库检索和实验前的预实验,我们共筛选到多态性稳定的微卫星引物位点 5 对,分别是 B118, B11、B96、B124、B126,各引物序列见表 1。PCR 反应总体积为 15 μ L,其中 DNA 模板 15 ~ 50 ng,荧光标记的正反向引物各 1.5 μ mol, dNTP Mixture 1.2 mmol, MgCl₂ (25 mmol $\cdot$ L⁻¹) 1.5 ~ 2 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.075 U(表 1)。扩增采用 Mastercycler 5330 自动循环仪(德国 Eppendorf 公司)。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 48 ~ 56℃ 退火 30 s(表 1), 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 4℃ 保存。扩增片段先通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测和凝胶成像系统(UVItc 公司)观察,结果理想后再利用 ABI 377 测序仪(美国应用生物系统公司)进行电泳分离,并采用 GENESCAN 软件(Version 3.1)和 GENOTYPER DNA 片段分析软件(Version 2.5)进行分析。

表 1 微卫星引物序列及部分 PCR 反应条件

Table 1 Sequence of primers and parts of PCR condition for 5 used microsatellites

位点 Locus	引物序列 Sequence of primers	荧光染料 Fluorescent label	退火温度 Ta (℃)	25 mmol·L ⁻¹ 氯化镁 25 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ (μL)
B118	5′- CCTAAGTCGCTATATCTTCG -3′ 5′- GAAACACGTATCTACATCTACAG -3′	Tet	54	1.5
B11	5′- GCAACGAAACTCGAAATCG -3′ 5′- GTTCATCCAAGTTTCATCCG -3′	Hex	52	1.8
B96	5′- GGGAGAGAAAGACCAAG -3′ 5′- GATCGTAATGACTCGATATG -3′	Tamra	48	2
B124	5′- GCAACAGGTCGGGTTAGAG -3′ 5′- CAGGATAGGCTAGGTAAGCAG -3′	Fam	55	1.5
B126	5′- GCTTGCTGCTGAATTGTGC -3′ 5′- CGATTCTCTCGTCTACTCC -3′	Fam	56	1.7

2 结果与分析

2.1 样品的基因分型结果

经过电泳分离和片段分析,部分代表性结果见图 1~5。从图 1~5 中可以看出 E05 工蜂个体在 B96 位点是纯合子,只有一种类型的等位基

因,片段长度为 245 bp,因此该样品在此位点上的基因型为 245/245。同理,A12 个体在 B118 位点上的基因型为 216/228;A12 个体在 B126 位点上的基因型为 151/157;E06 个体在 B11 位点上的基因型为 194/210;E13 个体在 B124 位点上的基因型为 253/257。

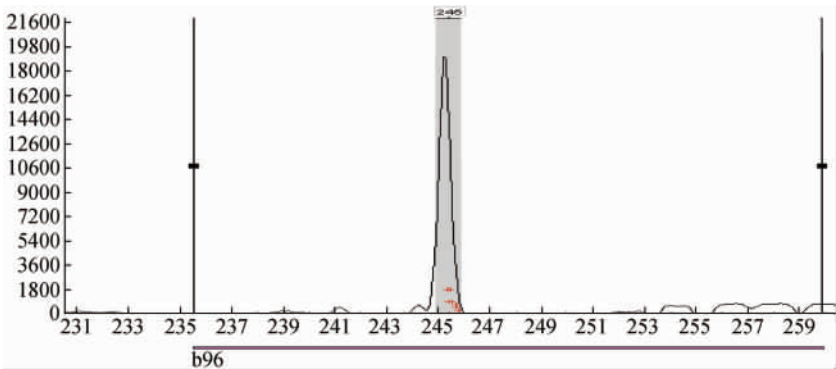


图 1 E05 个体在 B96 位点上的基因扫描

Fig. 1 Gene scanning file of E05 on microsatellite loci B96

2.2 位点和等位基因分析

由每群子代工蜂和子代雄蜂的基因型推导出各自蜂王的基因型,从表 2 可以看出各蜂群在不同位点上的基因分布情况。在位点 B96 上,部分群体的工蜂是纯合子,如群体 C,所有工蜂个体在该位点上均是纯合子(246/246),因此利用该位点很难将父本和母本的基因型进行分离(表 2),即很难推测与蜂王交配的雄蜂数量。群体 A 工蜂在

B124 位点上、群体 B 和 D 工蜂在 B96 位点上、群体 C 工蜂在 B118 位点上,都有父本等位基因与母本等位基因重叠的现象(表 2)。在这些位点中,分离效果最好的是 B124 位点,大部分工蜂在该位点上均是杂合状态,因此能有效将来自父本和母本的基因型进行分离。

2.3 一妻多夫水平推断

由每群工蜂和雄蜂的基因型推导出各自母本蜂王和父系雄蜂的基因型(表 2),如在 D 群体中,

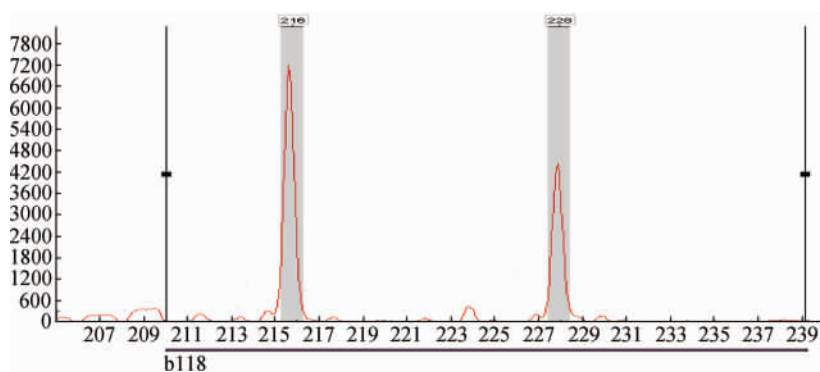


图 2 A12 个体在 B118 位点上的基因扫描

Fig. 2 Gene scanning file of A12 on microsatellite loci B118

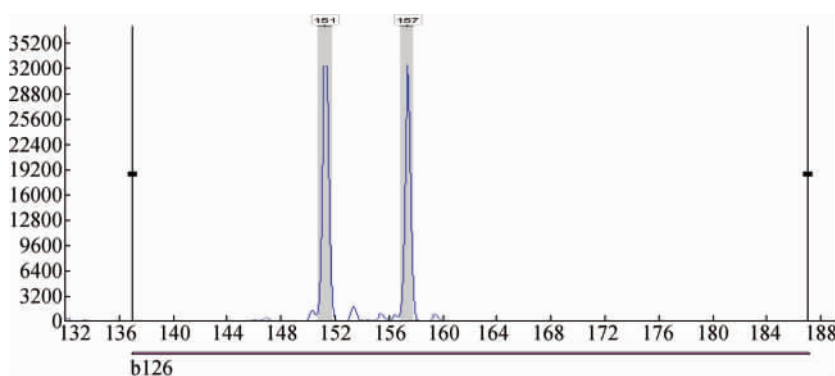


图 3 A12 个体在 B126 位点上的基因扫描

Fig. 3 Gene scanning file of A12 on microsatellite loci B126

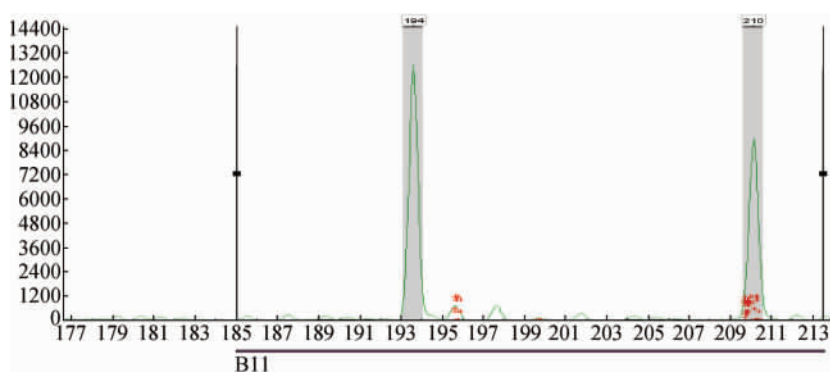


图 4 E06 个体在 B11 位点上的基因扫描

Fig. 4 Gene scanning file of E06 on microsatellite loci B11

对于 B124 位点, 22 只子代工蜂共有 5 种等位基因, 其片段长度大小分别为 250、254、255、256 和 263 bp, 其中等位基因 254 bp 在所有工蜂中均出现, 且 22 只子代雄蜂只有一种等位基因, 长度也为 254 bp, 由此可以推断其母本蜂王的在该位点的基因型为 254/254, 因此子代工蜂的其他 4 个等

位基因 (250、255、256 和 263 bp) 均来自父系雄蜂, 即与该蜂王交配的熊蜂数量为 4 只, 其等位基因分别为 250、255、256 和 263 bp。依此类推, 可以计算出在熊蜂群 A、B、C 和 E 群中, 与蜂王交配的熊蜂数量分别是 3、2、3 和 3 只 (表 2)。

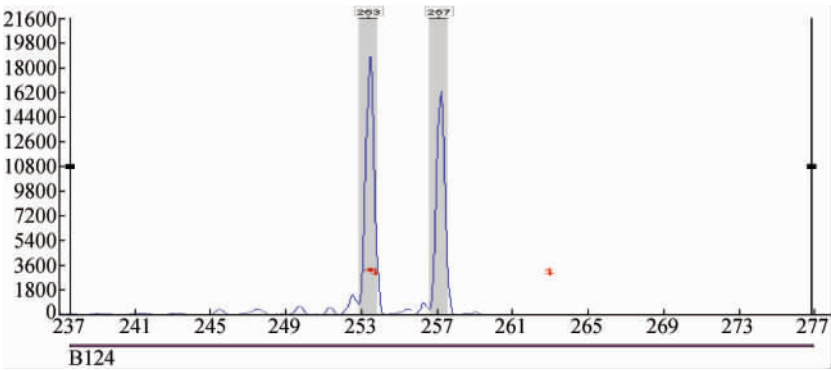


图 5 E13 个体在 B124 位点上的基因扫描
Fig. 5 Gene scanning file of E13 on microsatellite loci B124

表 2 等位基因的分析和一妻多夫水平的推断

Table 2 Analysis of alleles and inference of levels of polyandry

蜂群	位点	工蜂等位基因 (等位基因频率%) Alleles of workers (Frequency of the alleles%)	雄蜂等 位基因 Alleles of males	蜂王等位 基因推断 Alleles of queens	父系等位 基因推断 Alleles of patriline	与蜂王交配 的雄蜂数 量推断 No. of males mated with queen
A	B124	253 (19), 254 (14), 261 (167)	261	261/261	253, 254, 261	3
	B118	222 (27), 230 (95), 232 (73), 228 (5)	222, 232	222/232	230, 228	
	B11	206 (100), 208 (36), 212 (64)	206	206/206	208, 212	
	B96	245 (100), 248 (100)	245	245/245	248	
	B126	151 (68), 157 (132)	157	157/157	151, 157	
B	B124	254 (82), 261 (100), 253 (18)	261	261/261	254, 253	2
	B118	222 (100), 236 (43), 230 (57)	222	222/222	236, 230	
	B11	202 (100), 208 (100)	202	202/202	208	
	B96	245 (45), 248 (155)	248	248/248	245, 248	
	B126	163 (100), 157 (50), 171 (50)	163	163/163	157, 171	
C	B124	252 (41), 261 (55), 257 (95), 251 (9)	257, 261	257/261	251, 252, 261	3
	B118	230 (135), 232 (65)	230	230/230	230, 232	
	B11	208 (100), 216 (57), 194 (43)	208	208/208	216, 194	
	B96	246 (200)	246	246/246	246	
	B126	163 (100), 157 (50), 171 (50)	163	163/163	157, 171	
D	B124	254 (100), 255 (27), 263 (59), 250 (5), 256 (9)	254	254/254	255, 263, 250, 256	4
	B118	228 (95), 236 (50), 216 (50), 232 (5)	228, 232	228/232	216, 236	
	B11	196 (100), 210 (50), 216 (45), 198 (5)	196	196/196	210, 216, 198	
	B96	246 (195), 248 (5)	246	246/246	246, 248	
	B126	158 (36), 170 (59), 174 (100), 172 (5)	174	174/174	158, 170, 172	
E	B124	250 (45), 257 (100), 253 (50), 255 (5)	257	257/257	250, 253, 255	3
	B118	218 (41), 232 (100), 220 (55), 224 (5)	232	232/232	218, 220, 224	
	B11	194 (100), 200 (45), 210 (55)	194	194/194	200, 210	
	B96	245 (100), 247 (100)	245	245/245	247	
	B126	164 (50), 176 (100), 168 (45), 158 (5)	176	176/176	164, 168, 158	

3 讨论

本实验结果表明,与中国红光熊蜂蜂王交配的雄蜂数量平均为 3 只,该结果与前人的研究结果有一定出入。Payne 等(2003)对美国北部 11 个熊蜂品种的 30 个群体进行一妻多夫水平分析,结果表明其中 22 个群体的蜂王分别仅与一只雄蜂交配过,而另 8 个群体的蜂王分别与 2 只以上的雄蜂交配过。Schmid-Hempel 和 Schmid-Hempel (2000)也对欧洲地区的 8 个熊蜂品种进行调查,发现大部分蜂王也仅与一只熊蜂交配过,只有 *B. hypnorum* 蜂王存在一妻多夫现象。Huth-Schwarz 等(2011)的研究结果表明与墨西哥 *B. wilmatiae* 蜂王交配的雄蜂数量平均为 1.34 ~ 1.70 只。Paxton 等(2001)的研究结果表明,与 *B. hypnorum* 蜂王交配的雄蜂数量平均为 2.5。但是由于所研究的蜂种和地域不同,其交配模式必然存在差别,因此不具有可比性。对于红光熊蜂一妻多夫水平的研究,目前报道相对较少,可能原因是红光熊蜂分布范围较窄(主要分布于中国、朝鲜半岛和日本),目前仅有 Takahashi 等(2008)对日本地区的 6 群红光熊蜂进行过研究,结果表明与红光熊蜂蜂王交配的雄蜂数量仅为 1 只,与本文结果也存在一定差距。分析其原因,主要有两个方面:第一,所用微卫星位点不同,本实验主要利用工蜂和雄蜂 B124 位点的等位基因信息来推断父本和母本的基因型,从而获得与蜂王交配的雄蜂数量,其他位点仅作为补充或验证;而 Takahashi 等(2008)主要利用的微卫星位点不明确,因此结果可能存在差异。第二,2 个实验计算方法不同,本实验是参照 Estoup 等(1994,1996)的计算方法,即通过子代雄蜂和工蜂的基因型推断出父本和母本的基因型,从而得出与蜂王交配的雄蜂数量;而 Takahashi 等(2008)得到的是有效交配频率,由于计算方法不一致,因此所反应的结果也不一致。

本实验结果还充分显示,并非所有的基因座都能有效将父本和母本的基因型进行正确分离,即并非所有的基因座都能用于红光熊蜂的一妻多夫水平分析。只有那些多态信息含量足够丰富,稳定性强、独立分离的微卫星座位才能用于野生红光熊蜂的一妻多夫水平分析。本实验所使用的 5 对微卫星座位中,只有位点 B124 是比较理想的,因为所有实验工蜂在该位点上多态性较高,且都

是以杂合子形式存在,因此根据子代工蜂在该位点的等位基因信息,再结合子代雄蜂的等位基因信息,就能较准确地将来自母本蜂王和父系熊蜂的等位基因分离开来,从而推算出与蜂王交配的雄蜂数量。

参考文献 (References)

- Estoup A, Solignac M, Cournuet JM, 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honey bee colonies. *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 258 (1351): 1—7.
- Estoup A, Solignac M, Cournuet JM, Goudet J, Scholl A, 1996. Genetic differentiation of continental and island population of *Bombus terrestris* (Hymenoptera Apidae) in Europe. *Mol. Ecol.*, 5: 19—31.
- Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM, 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49 (11): 1016—1021.
- Huth-Schwarz A, León A, Vandame R, Moritz RFA, Kraus FB, 2011. Mating frequency and genetic colony structure of the neotropical bumblebee *Bombus wilmatiae* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 42 (4): 519—525.
- Moritz RFA, Kryger P, Koeniger G, Koeniger K, Estoup A, Tingek S, 1995. High degree of polyandry in *Apis dorsata* queens detected by microsatellite variability. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 37 (5): 357—363.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM, Wongsiri S, Estoup A, Rinderer TE, Crozier RH, 1996. Levels of polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis dorsata* (Hymenoptera Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 89 (2): 276—283.
- Paxton RJ, Thoren PA, Estoup A, Tengo J, 2001. Queen-worker conflict over male production and the sex ratio in a facultatively polyandrous bumblebee, *Bombus hypnorum*: the consequences of nest usurpation. *Mol. Ecol.*, 10 (10): 2489—2498.
- Payne CM, Lavery TM, Lachance MA, 2003. The frequency of multiple paternity in bumble bee (*Bombus*) colonies based on microsatellite DNA at the B10 locus. *Insectes Soc.*, 50 (4): 375—378.
- Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P, 2000. Female mating frequencies in *Bombus* spp. from central Europe. *Insectes Soc.*, 47 (1): 36—41.
- Takahashi J, Itoh M, Shimizu I, Ono M, 2008. Male parentage and queen mating frequency in the bumblebee

- Bombus ignitus* (Hymenoptera: Bombinae). *Ecol. Res.*, 23 (6): 937—942.
- Williams P, An JD, Huang JX, Yao J, 2010. BBCI: A new initiative to document Chinese bumble bees for pollination research. *J. Apicult. Res.*, 49 (2): 221—222.
- 刘新宇, 高崇东, 安建东, 2007. 陕西榆林地区密林熊蜂的生物学观察. *中国蜂业*, 58 (8): 5—7.
- 吴杰, 彭文君, 安建东, 国占宝, 童越敏, 李继莲, 2005. 授粉用明亮熊蜂的人工饲养技术. *昆虫知识*, 42 (6): 717—720.
- 吴杰, 黄家兴, 安建东, 胡福良, 2009. 不同饲料对小峰熊蜂工蜂群发育的影响. *昆虫学报*, 52 (10): 1115—1121.
- 孙海芹, 罗毅波, 葛颂, 2003. 濒危植物独花兰的传粉生物学初步观察. *植物学报*, 45 (9): 1019—1023.
- 安建东, 黄家兴, Williams PH, 吴杰, 周冰峰, 2010. 河北地区物种熊蜂多样性及其蜂群繁育特性. *应用生态学报*, 21 (6): 1542—1550.
- 彭文君, 安建东, 1999. 一种优良的温室授粉蜂——熊蜂. *养蜂科技*, (5): 20 转 23.
- 晏鹏, 吴孝兵, 史燕, 张方, 2003. 微卫星多态性检测技术及其在保护遗传学中的应用. *应用生态学报*, 14 (3): 461—464.
- 蒙艳华, 徐环李, 陈轩, 蔡青年, 2007. 塔落岩黄芪主要传粉蜂的传粉效率研究. *生物多样性*, 15 (6): 633—638.
- 谢宪兵, 苏松坤, 郑云林, 吴小波, 曾志将, 2008. 应用微卫星 DNA 技术研究中华蜜蜂群内工蜂监督效果. *中国农业科学*, 41 (6): 1816—1821.