

武夷山自然保护区中华蜜蜂微卫星 DNA 遗传分析

朱翔杰, 徐新建, 周姝婧, 吴显达, 周冰峰

(福建农林大学蜂学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 采用 5 个微卫星 DNA 分子标记, 测定武夷山自然保护区 6 个样点的中华蜜蜂的遗传多样性及遗传分化。结果共检测到 23 个等位基因, 平均多态信息含量 (PIC) 在 0.402 9~0.497 8, 处于中等多态水平; 平均杂合度 (H_e) 在 0.452 5~0.561 3, 处于中等水平。经 Fisher 精确检验, 武夷山自然保护区 6 个样点, 5 个微卫星位点的遗传结构存在显著差异 ($P<0.01$)。各样点中华蜜蜂均存在一定遗传分化, F_{ST} 在 0.020 0~0.143 5, 特别是麻粟中华蜜蜂与其他所有样点、最高峰黄岗山与西坡山脚西坑的中华蜜蜂存在明显的遗传分化, 各自形成独立种群, 说明较高海拔山峰能够阻碍中华蜜蜂基因流。

关键词: 中华蜜蜂; 微卫星标记; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: S 891

文献标识码: A

Genetic Analysis of *Apis cerana cerana* in Wuyi Mountain Nature Reserve Based on Microsatellite DNA

ZHU Xiang-jie, XU Xin-jian, ZHOU Shu-jing, WU Xian-da, ZHOU Bing-feng

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The genetic diversity and genetic differentiation of honeybees (*Apis cerana cerana*) from 6 samplings in Wuyi Mountain nature reserve were studied with five microsatellite markers. The results were as follows: total 23 alleles were detected, mean polymorphic information content (PIC) was from 0.402 9 to 0.497 8 and mean heterozygosity (H_e) was from 0.452 5 to 0.561 3. Through Fisher's exact test, there were significantly difference genetic structures among honeybees from the six sampling points ($P<0.01$) and the genetic differentiation was occurred. Genetic differentiation coefficients (F_{ST}) were from 0.020 0 to 0.143 5. Especially there was significant honeybee population genetic differentiation between honeybees from Masu and others, and between the peak and the west foot of mountain, forming independence populations. The gene flow interrupted by surrounding high mountains.

Key words: *Apis cerana cerana*; microsatellite marker; genetic diversity; genetic differentiation

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国土生土长的蜂种资源, 是东方蜜蜂的一个亚种。随着分子生物学的发展, 微卫星标记因具有多态性高、共显性、重复性好等优点^[1], 已应用于我国华东地区江西南昌、安徽黄山、浙江桐庐、山东费县和宜兴以及福建的中华蜜蜂遗传多样性分析, 期望杂合度分别为 0.632 9、0.609 9、0.620 3、0.573 2、0.490 0、0.504 0~0.554 0, 武夷山中华蜜蜂的遗传多样性相对较低, 杂合度为 0.452 5^[2~5]。尽管前人对武夷山中华蜜蜂已进行了一些探索性研究, 但武夷山自然保护区复杂的地理条件, 采样点数量的不足, 直接影响结果的代表性。

武夷山自然保护区地处东经 117°27'~117°51',

北纬 27°33'~27°54', 总面积 56 527 hm², 为典型的亚热带季风型气候。区内气候多样, 环境多样, 动植物资源丰富, 海拔 1 800 m 以上的山峰有 34 座, 地势高低悬殊^[6~7], 中华蜜蜂种群分化形成天然屏障, 为研究中华蜜蜂生态隔离机制提供了典型条件。因此, 本研究在武夷山自然保护区不同生态区采集大量样本, 采用微卫星 DNA 技术进行遗传分析, 以期研究武夷山自然保护区内中华蜜蜂遗传分化和遗传多样性, 探索中华蜜蜂种群生态隔离机制, 这对进一步揭示中华蜜蜂生态隔离规律具有重要价值, 同时也为中华蜜蜂种质资源保护与利用提供理论基础。

收稿日期: 2011-06-30 初稿; 2011-08-18 修改稿

作者简介: 朱翔杰 (1982-), 女, 博士, 讲师, 主要从事蜜蜂生态学和蜜蜂种群遗传学研究 (E-mail: xiangjie_zhu@126.com)

通讯作者: 周冰峰 (1958-), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事蜜蜂生态学和蜜蜂种群遗传学研究 (E-mail: bingfengfz@126.com)

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-45-KXJ11); 福建省自然科学基金 (2010J05043)

1 材料与方法

1.1 材料

中华蜜蜂样本采自武夷山自然保护区内武夷山脉最高峰黄岗山、黄岗山西坡山下江西境内的西坑、被高山环绕山坳内的麻粟、光泽的干坑和寨里镇大洲以及武夷山低地共 5 个样点。武夷山低地(海拔低于 1 000 m)的样点包括桐木、江墩、关坪,保护区南部建阳的桂林、华侨,东坡洋庄的大安、葛仙,以及中部的高桥、嵒上,共 31 群(表 1)。

1.2 微卫星检测及数据分析

取蜜蜂胸部研磨匀浆,用消化液、蛋白酶 K 消化,采用 UNIQ-10 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工有限公司)提取基因组 DNA。

引物序列参考 NCBI 网站微卫星信息,选择中等多态且片段大小适中的 20 对西方蜜蜂微卫星引物,筛选出 5 对微卫星引物用于中华蜜蜂遗传分析(表 2)。基因分型采用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,Marker 为 pBR322 DNA/*Msp*I。硝酸银染色拍照。根据电泳结果判断每一个体的基因型。

用 Ms tools 软件计算各微卫星位点的等位基因频率、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、观察杂合度 Observed heterozygosity, *Ho*、期望杂合度 (Expected heterozygosity, *He*)。GENEPOP VERSION 3.4 软件进行 Fisher 精确检验和遗传分化系数 (*F_{ST}*) 的计算。DPS 软件根据样点间遗传分化系数进行聚类分析。

表 1 武夷山自然保护区中华蜜蜂样本信息

Table 1 List of sample localities with geographic coordinates of Wuyi Mountain nature reserve

地区	采样点	样本量 (只)	海拔 (m)	经度	纬度
武夷山主峰	黄岗山	26	1770	E117°47'	N27°52'
江西	西坑	30	700	E117°46'	N27°59'
	麻粟	30	1250	E117°44'	N27°46'
光泽	干坑	38	520~720	E117°32'	N27°55'
	大洲	46	305	E117°10'	N27°43'
武夷山低地	桐木	4	720	E117°40'	N27°45'
	江墩	5	840	E117°41'	N27°47'
	关坪	3	940	E117°42'	N27°48'
	桂林	3	380	E117°42'	N27°38'
	武夷华侨农场	3	270	E117°50'	N27°32'
	大安	6	500	E117°52'	N27°54'
	葛仙	3	270	E117°58'	N27°47'
	高桥	1	820	E117°43'	N27°44'
	嵒上	3	490	E117°50'	N27°41'

表 2 微卫星 DNA 引物信息

Table 2 Primer information of microsatellite markers

位点	染色体	引物序列	退火温度 (℃)
Ap085	Chr LG 12	5'-GATCAAACACACAAACGAAAGC-3' 3'-ACCGGAAGCTTAATCAAGG-5'	63.5
A107	Chr LG 7	5'-CCGTGGGAGGTTATTGTCG-3' 3'-CCTCGTAACGGATGACACC-5'	57.9
Ap313	Chr LG 4	5'-TAGGCCCTAACGTCCAAC-3' 3'-CCCTTCTACCACCGACGC-5'	58.1
AT101	Chr LG 12	5'-GCGTTCCAAGTGAATGAACA-3' 3'-GTTGGCTATTTCGTATCGC-5'	57.2
Ap043	Chr LG 3	5'-GGCGTGACAGCTTATTCC-3' 3'-CGAAGGTGGTTTCAGGCC-5'	60.0

2 结果与分析

2.1 武夷山中华蜜蜂遗传多样性

2.1.1 微卫星5个位点等位基因多态性 武夷山自然保护区中华蜜蜂在5个微卫星位点共检测到23个等位基因, 平均每个位点4.6个等位基因。Ap085、A107、A313、Ap043、AT101分别检测到8、5、4、3、3个等位基因, 等位基因片段大小范围分别为187~217 bp, 160~180 bp, 342~356 bp, 130~140 bp, 245~249 bp(表3)。其中稀有等位基因有5个, A107位点的180、A313的345和356、Ap085的217和187, 前2个等位基因仅在1个样点出现, 它们出现的频率分别为0.37%、0.57%、4.60%、2.02%、0.76%。

2.1.2 多态信息含量 Ap085和A107位点多态

信息含量在各样点样本中平均为0.755 1和0.574 5, 为高度多态位点。其次为A313和Ap043位点, PIC在0.3以上, AT101多态性最低, 这3个位点为中度多态位点(表4)。Ap085和A107位点各样点均处于平均水平。A313位点在武夷山低地和西坑样本中, 表现出较低的多态性, PIC低于0.3。Ap043位点在麻粟样本中多态性最低, PIC为0.176 0, 其次为黄岗山、武夷山低地也较低, PIC低于平均水平, 而西坑超过平均水平, 达0.5以上。AT101位点除在麻粟和大洲样本中表现出一定多态性, 在其他样点样本中多样性均较低(表4)。武夷山自然保护区中华蜜蜂在5个微卫星位点上, 平均PIC在0.402 9~0.497 8, 处于中等多态水平。

表3 武夷山自然保护区中华蜜蜂5个微卫星位点的等位基因频率

Table 3 Allele frequencies of honeybee (*Apis cerana cerana*) for five microsatellite sites in Wuyi mountain nature reserve

位点	等位基因	等位基因频率(%)					
		武夷山低地	黄岗山	麻粟	西坑	大洲	干坑
Ap085	187	4.84	0	3.57	5.00	0	0
	193	1.61	0	14.29	6.67	8.70	3.95
	195	29.03	17.31	30.36	20.00	20.65	11.84
	201	19.35	11.54	16.07	31.67	28.26	22.37
	203	6.45	13.46	5.36	1.67	8.70	10.53
	205	9.68	38.46	14.29	8.33	17.39	34.21
	211	29.03	17.31	16.07	26.67	16.30	14.47
	217	0	1.92	0	0	0	2.63
A107	160	0	25.00	14.29	1.79	0	0
	165	31.25	31.25	30.95	42.86	31.08	16.67
	170	50.00	43.75	45.24	16.07	33.78	33.33
	172	12.50	0	9.52	39.29	35.14	50.00
	180	6.25	0	0	0	0	0
A313	342	84.00	61.54	81.03	81.48	64.10	75.86
	345	0	0	3.45	0	0	0
	348	12.00	30.77	10.34	14.81	32.05	20.69
	356	4.00	7.69	5.17	3.70	3.85	3.45
Ap043	130	20.00	18.00	8.62	15.52	5.95	15.15
	135	80.00	82.00	89.66	56.90	78.57	74.24
	140	0	0	1.72	27.59	15.48	10.61
AT101	245	6.67	16.67	0	6.90	6.67	14.29
	247	90.00	83.33	43.33	91.38	68.89	85.71
	249	3.33	0	56.67	1.72	24.44	0

表 4 武夷山自然保护区中华蜜蜂 5 个微卫星位点多态信息含量(PIC)
Table 4 PIC values of honeybee for microsatellite sites in Wuyi Mountain nature reserve

位点	多态信息含量(PIC)					
	武夷山	黄岗山	麻粟	西坑	大洲	干坑
Ap043	0.2688	0.2516	0.1760	0.5076	0.3210	0.3764
Ap085	0.7442	0.7271	0.7863	0.7404	0.7776	0.7552
AT101	0.1754	0.2392	0.3705	0.1515	0.3998	0.2149
A107	0.5703	0.5749	0.6128	0.5615	0.5917	0.5355
A313	0.2558	0.4434	0.3096	0.2817	0.3989	0.3298
Average	0.4029	0.4473	0.4510	0.4485	0.4978	0.4423

2.1.3 杂合度 武夷山自然保护区大部分样点中华蜜蜂 5 个微卫星位点平均期望杂合度处于中等水平, 平均杂合度在 0.452 5~0.561 3。武夷山低地中华蜜蜂在 A313 和 AT101 位点, 黄岗山中华蜜蜂在 AT101 位点, 麻粟中华蜜蜂在 Ap043 位点, 西坑中华蜜蜂在 AT101 位点, 杂合度较低, 均低于 0.3, 杂合子缺乏。西坑在 Ap043 位点, 麻粟在

AT101 位点, 黄岗山在 A313 位点的杂合度较高, 均超过平均水平(表 5)。

各样点中华蜜蜂在 Ap085 位点杂合度最高, 平均在 0.775 3~0.826 0, 其次是 A107 位点, 也具有较高的杂合度, 平均在 0.622 6~0.686 4, Ap043、A313 和 AT101 位点杂合度总体平均分别为 0.364 2、0.391 1、0.308 0(表 5)。

表 5 武夷山自然保护区中华蜜蜂 5 个微卫星位点观察杂合度和期望杂合度
Table 5 Observed heterozygosities and expected heterozygosities of honeybee for five microsatellite sites in Wuyi Mountain nature reserve

位点	观察杂合度(H_o)					
	武夷山低地	黄岗山	麻粟	西坑	大洲	干坑
Ap043	0.2667	0.3600	0.2069	0.6207	0.1429	0.3939
Ap085	0.5806	0.6923	0.8571	0.8000	0.5652	0.6316
AT101	0.0667	0	0	0.0345	0	0.0571
A107	0.2500	0	0.2381	0.1071	0.2973	0.1111
A313	0.0800	0.3077	0.0345	0.2593	0.3333	0.2759
Average	0.2488	0.2720	0.2673	0.3643	0.2677	0.2939
SD	0.0388	0.0411	0.0378	0.0402	0.0306	0.0358

位点	期望杂合度(H_e)					
	武夷山低地	黄岗山	麻粟	西坑	大洲	干坑
Ap043	0.3254	0.3012	0.1918	0.5862	0.3594	0.4210
Ap085	0.7906	0.7753	0.8260	0.7876	0.8144	0.7951
AT101	0.1876	0.2837	0.4994	0.1627	0.4664	0.2484
A107	0.6750	0.6694	0.6864	0.6474	0.6749	0.6226
A313	0.2841	0.5309	0.3345	0.3187	0.4912	0.3872
Average	0.4525	0.5121	0.5076	0.5005	0.5613	0.4949
SD	0.1180	0.0977	0.1147	0.1137	0.0811	0.0960

2.2 武夷山自然保护区中华蜜蜂遗传分化

经 Fisher 精确检验, 武夷山自然保护区 6 个样点, 5 个微卫星位点的遗传结构存在显著差异 ($P<0.01$) (表 6)。两两样点间的分化系数 F_{ST} 值显示, 麻粟样点的中华蜜蜂与各样点的遗传分化最

大, F_{ST} 值在 0.0499~0.1435。其次黄岗山与西坑 2 个样点的中华蜜蜂存在明显遗传分化, F_{ST} 值为 0.0955。另外, 黄岗山与大洲和干坑的中华蜜蜂也存在一定的遗传分化, F_{ST} 值分别为 0.0465、0.0508 (表 6)。

表6 武夷山自然保护区中华蜜蜂遗传分化和遗传结构差异分析

Table 6 The F_{ST} value and test of the significance of genetic structure difference of honeybee from Wuyi mountain nature reserve in all sites

样点	大洲	干坑	武夷山低地	黄岗山	麻粟	西坑
大洲	—	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00001
干坑	0.0200	—	0.00005	0.00000	0.00000	0.00011
武夷山低地	0.0326	0.0372	—	0.00015	0.00021	0.00000
黄岗山	0.0465	0.0508	0.0209	—	0.00000	0.00000
麻粟	0.0499	0.1304	0.0780	0.0992	—	0.00000
西坑	0.0345	0.0348	0.0398	0.0955	0.1435	—

注：左下数据为 F_{ST} 值，右上数据为差异显著性 P 值。

武夷山自然保护区内麻粟与武夷山所有样点存在明显的遗传分化，为一个独立种群。武夷山最高峰黄岗山山顶与黄岗山西侧山下西坑间存在明显的微卫星遗传分化。光泽的大洲和干坑样点与武夷山存在明显的微卫星遗传分化（图1）。

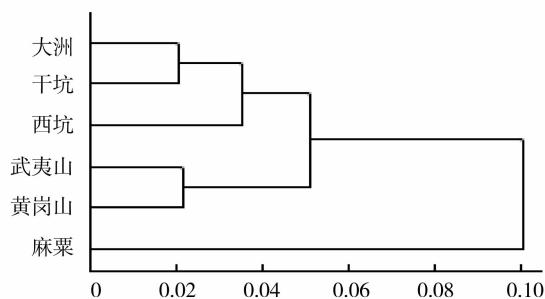


图1 武夷山自然保护区样本遗传分化

Fig. 1 Heredity differentiation of Wuyi mountain nature reserve

3 讨论

3.1 本研究结果表明武夷山低地中华蜜蜂具有比其他样点相对较少的遗传多样性，多态信息含量和杂合度分别为0.4029和0.4525。与吉挺等测定的武夷山中华蜜蜂杂合度0.4280相似^[3]。

3.2 对武夷山自然保护区中华蜜蜂的形态遗传分析表明，最高峰黄岗山与黄岗山下西坑表现出明显的形态遗传差异，黄岗山中华蜜蜂具有较大个体，较深的体色^[8]。本研究发现这2个样点在检测的5个微卫星位点上，存在较大的遗传分化。遗传分化的原因可能是黄岗山西坡陡峭，垂直的生态差异造成基因交流受阻。

3.3 麻粟样点的中华蜜蜂在小盾片Sc区的颜色多数为白色，与其他各样点存在显著差异^[8]，本研究

发现麻粟中华蜜蜂具有明显不同的遗传结构，进一步证实了麻粟中华蜜蜂为一个独立种群。说明较高海拔山峰环绕有可能阻碍中华蜜蜂基因流。

3.4 在研究中华蜜蜂遗传多样性，种群分化等问题时，微卫星位点的选择与结果具有很大关系。目前还不清楚选择什么位点，选择几个位点才能充分体现遗传多样性和种群遗传结构。理想情况是少数具有代表性的位点即可获得准确结果，但还没有对中华蜜蜂众多微卫星位点的评价，需更多数据的积累。

3.5 多少样本量能准确反映中华蜜蜂种群的遗传多样性和遗传结构，还没人研究。在其他生命科学领域从理论上认为微卫星样本量应在20~50个个体。根据重叠论（coalescent theory），样本量在20~50之间能检测到种群内单倍型的95%以上^[9]。根据种群遗传学和概率论理论，理想二倍体种群，等位基因频率为0.03时，需采样量为50，频率为0.05时，30样本量即可^[10]。在遗传学研究中多数采用30以上的样本量，40~50^[11~13]，个别研究样本量高达90~100^[13~14]。蜜蜂科学领域蜜蜂样本量在25~40群，1只/群水平^[2~4]。值得提出的是多态性不同的位点对样本量的要求也不同。多态性低的微卫星位点，可能较少的样本量即可反映种群的遗传结构，多态性丰富的位点，则需较大的样本量才能减少实验误差，较好反映种群遗传结构。

参考文献：

- [1] HUBER K, LOAN LL, HOANG TH, et al. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho ChiMinh City, Vietnam) using microsatellite markers [J]. Molecular Ecology, 2002, 11 (9): 1629~1635.
- [2] 陈晶, 吉挺, 殷玲, 等. 利用微卫星标记分析南昌地区中华蜜蜂遗传多样性 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (18): 7600~

- 7601, 7729.
- [3] 吉挺, 殷玲, 刘敏, 等. 华东地区中华蜜蜂六地理种群的遗传多样性及遗传分化 [J]. 昆虫学报, 2009, 52 (4): 413—419.
- [4] 陈晶, 陈国宏, 吉挺, 等. 沂蒙山中华蜜蜂微卫星 DNA 遗传多样性分析 [J]. 中国蜂业, 2008, 59 (4): 11—13.
- [5] 朱翔杰, 周冰峰, 吴显达, 等. 福建中华蜜蜂微卫星标记的遗传多样性分析 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40 (4): 407—411.
- [6] 杨艳容. 武夷山自然保护区野生观赏植物资源及园林应用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (6): 1754—1755.
- [7] 兰思仁. 武夷山国家级自然保护区植物物种多样性研究 [J]. 林业科学, 2003, 39 (1): 36—43.
- [8] 朱翔杰, 周冰峰, 吴显达, 等. 武夷山中华蜜蜂种群形态遗传分析 [C] //第四届中国畜牧科技论坛论文集, 重庆: 中国农业出版社, 2009: 454—459.
- [9] 阮成江. 植物分子生态学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 113.
- [10] 闫路娜, 张德兴. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响 [J]. 动物学报, 2004, 50 (2): 279—290.
- [11] 张爱玲, 马月辉, 陈秀梅, 等. 不等微卫星座位数目对 Nei 氏标准遗传距离估测精度的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (5): 431—433.
- [12] 束婧婷, 包文斌, 陈国宏, 等. 微卫星座位数目对家禽遗传距离估测精确度的影响 [J]. 中国农学通报, 2006, 22 (8): 18—21.
- [13] 陈红菊, 岳永生, 樊新忠, 等. 山东地方鸡种遗传距离与聚类分析方法比较研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1):33—36.
- [14] 毛永江, 常洪, 杨章平, 等. 遗传距离与利用微卫星进行系统树构建初探 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39 (2): 129—135.

(责任编辑: 翁志辉)