

西方蜜蜂四个亚种酯酶同工酶型和苹果酸脱氢酶同工酶基因型的遗传差异*

童富淡 汪俏梅 刘艳荷

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

关键词 西方蜜蜂 EST MDH 同工酶

同工酶是一组催化功能相同, 分子组成和分子结构不同的酶, 它由染色体上不同基因座的基因或同一基因座的等位基因编码, 广泛用于昆虫种属鉴定和遗传变异研究。蜜蜂幼虫或蛹中的苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH)、苹果酸酶 (malatase, ME)、酯酶 (esterase, EST) (Shepard *et al.*, 1984)、乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) (Gartside, 1980)、外肽酶 (exopeptidase, EPEP) (Lama *et al.*, 1984) 和普通蛋白-3 (protein-3, P-3) (Mestriner *et al.*, 1972) 的基因具有多态性。蜜蜂属 (*Apis*) EST 同工酶由一对共显性等位基因编码 (Mestriner *et al.*, 1972), 不同种之间的同工酶型差异显著 (李绍文等, 1986)。西方蜜蜂 MDH 的等电点位于 pH 6.7~7.5 范围内, 由 a、b 和 c 三个基因编码, 能稳定遗传且无组织和发育特异性, 对蜜蜂种内鉴定、遗传变异和亲缘关系的确定很有价值 (Rozalski *et al.*, 1996)。本实验采用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (IEF-PAGE) 技术, 测定了喀尔巴阡蜂 (*A. mellifera carpatica*)、东北黑蜂 (*A. mellifera* ssp.)、浙农大 号意蜂 (*A. mellifera ligustica*) 和卡尼鄂拉蜂 (*A. mellifera carnica*) 的 EST 和 MDH 同工酶, 分析了 MDH 同工酶基因型频率、基因频率、纯合度和杂合度及其遗传差异, 为蜜蜂的品种选育、种属鉴定和遗传变异的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

喀尔巴阡蜂 (C)、东北黑蜂 (D)、卡尼鄂拉

蜂 (K) 来自吉林省养蜂科学研究所种蜂场; 浙农大 号意蜂 (Ea) 和中华蜜蜂来自浙江大学实验蜂场。

1.2 酯酶同工酶型测定

每种蜂分别取外勤蜂、内勤蜂和幼蜂 (工蜂) 各 20 只, 取头部, -30℃ 冻存, 以 1:2 (W/V) 加入提取液 (0.05 mol/L pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 含 0.25% Triton X100), 在 0.5 ml Eppendorf 管中研磨 (冰浴) 后离心 10 min (12 000 r/min, 4℃), 取上清在 LKB (瑞典产) 多相电泳系统中检测同工酶型, Ampholin 为 LKB 公司产品 (pH 3.5~10.0), 酶活性染色液为 0.1 mol/L, pH 6.5 的磷酸缓冲液, 含 0.33 mg/ml γ -乙酸萘酯, 0.33 mg/ml β -乙酸萘酯, 0.67 mg/ml 坚牢蓝 RR 盐 (均为 A. R 级)。

1.3 MDH 同工酶型和基因型测定

取一个工蜂头部置于 0.5 ml Eppendorf 管中, 加入 0.05 ml 提取液, 研磨离心, 上清用于测定 MDH 同工酶型 (方法同上), Ampholin 为 LKB 公司产品 (pH 6.0~8.0), 酶活性染色液为 0.01 mol/L pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液, 含 0.24 mg/ml 苹果酸, 0.24 mg/ml NAD⁺, 0.16 mg/ml PMS 和 0.12 mg/ml NBT (SIGMA 产品)。

1.4 统计分析

根据 MDH 同工酶型图谱, 确定同工酶基因型, 分别统计基因型频率、基因频率、纯合度和杂合度, 用 χ^2 分析的独立检验方法进行检验。

2 结果

2.1 酯酶同工酶和 MDH 同工酶

2001-06-04 收到, 2001-10-09 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870592)

第一作者简介 童富淡, 男, 37 岁, 副教授。研究方向: 动物生理生化。E-mail: fdtong@zju.edu.cn

酯酶同工酶电泳图谱显示,不同发育阶段的4种西方蜜蜂在pH 3.5~10.0的范围内都有酯酶活性带,分别集中在pH 4.1~6.0、pH 6.0~7.3、pH 7.3~9.1和pH 9.1~10.0四个区域,其中在pH 6.0~7.3和pH 7.3~9.1之间为强活性带区,4种西方蜜蜂的酯酶分别显示3条强活性带(pI值分别为6.7、6.9和7.1)和4条强活性带(pI值分别为7.6、7.7、7.8和7.9)及若干弱活性带;其余为弱活性带区。另外,同一种蜜蜂的不同发育阶段所表达的酯酶同工酶有差异,幼蜂期的喀尔巴阡蜂和卡尼鄂拉蜂酯酶的部分基因表达量高,而东北黑蜂和浙农大1号意蜂酯酶的部分基因表达量低(图1)。

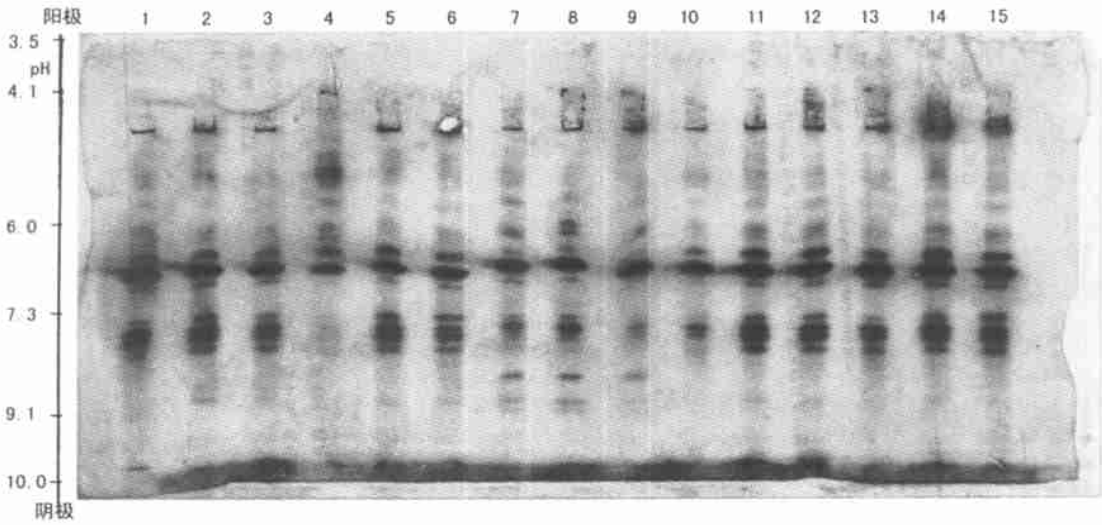


图1 蜜蜂酯酶同工酶图谱

Fig. 1 The esterase isozyme of Apis mellifera

1~3: 喀尔巴阡蜂的幼蜂、内勤蜂和外勤蜂 (Young and mature *A. mellifera carpatica* workers inside and outside the hive) 4~6: 卡尼鄂拉蜂的幼蜂、内勤蜂和外勤蜂 (Young and mature *A. mellifera carnica* workers inside and outside the hive) 7~9: 中华蜂的幼蜂、内勤蜂和外勤蜂 (Young and mature *A. cerana* workers inside and outside the hive) 10~12: 浙农大1号意蜂的幼蜂、内勤蜂和外勤蜂 (Young and mature "Zhejiang Agricultural University No. 1" *A. mellifera ligustica* (Ea) workers inside and outside the hive) 13~15: 东北黑蜂的幼蜂、内勤蜂和外勤蜂 (Young and mature *A. mellifera* ssp. workers inside and outside the hive)

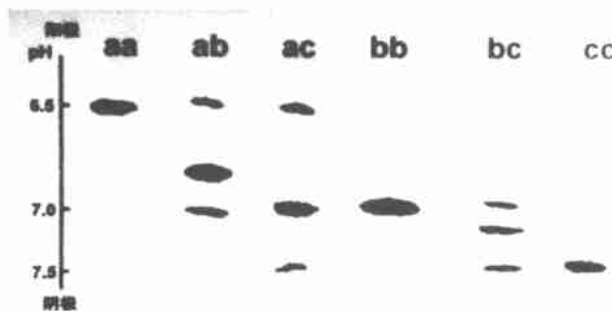


图2 蜜蜂苹果酸脱氢酶同工酶基因型 (aa、ab、ac、bb、bc和cc为MDH同工酶的基因型)

Fig. 2 The genotypes MDH isozyme of Apis mellifera (aa, ab, ac, bb, bc and cc are the genotypes of MDH isozymes)

西方蜜蜂MDH是一个二聚体蛋白,由3个基因编码,形成aa、bb、cc、ab、bc和ac等6种基因型,都出现在本实验中(图2)。

2.2 MDH同工酶的基因型频率、基因频率、纯合度、杂合度及独立性检验结果

在四个西方蜜蜂亚种中,喀尔巴阡蜂出现aa、ab、ac、bb和bc 5种基因型,其中bb基因型频率为41.30%;东北黑蜂出现ab、ac、bc和cc 4种基因型,各基因型频率接近;浙农大1号意蜂出现ac、bc和cc 3种基因型,纯合子cc频率最高(63.39%);卡尼鄂拉蜂出现aa、ab、ac和cc 4种基因型,ac基因型频率为73.12%。在4个西方蜜蜂亚种中,a、b和c 3个基因的频率各不相同,喀

表 1 西方蜜蜂四个亚种 MDH 同工酶基因型及其分布
Table 1 The genotype MDH isozyme in four subspecies of *Apis mellifera*

亚种名称 Name of subspecies	测定数目 Number of measured	基因型 Genotype					
		aa	ab	ac	bb	bc	cc
Ea	112	0	0	31	0	10	71
D	96	0	19	24	0	25	28
C	92	2	31	15	38	6	0
K	93	3	2	68	0	0	20

表 2 西方蜜蜂四个亚种 MDH 同工酶基因型频率、基因频率、纯合度和杂合度
Table 2 Genotypes frequency, allele frequency, homozygosity and heterozygosity of the MDH isozyme in four subspecies of *Apis mellifera*

亚种名称 Name of subspecies	基因型频率 (%) (Genotype frequencies)						基因频率 (%) (Allele frequencies)			纯合度 (Homozygosity) (%)	杂合度 (Heterozygosity) (%)
	aa	ab	ac	bb	bc	cc	a	b	c	(%)	(%)
Ea	0.00	0.00	27.68	0.00	8.93	63.39	13.84	4.46	81.70	63.39	36.61
D	0.00	19.79	25.00	0.00	26.04	29.17	22.40	22.92	54.69	29.17	70.83
C	2.17	33.70	16.30	41.30	6.52	0.00	27.17	61.41	11.41	43.48	56.52
K	3.23	2.15	73.12	0.00	0.00	21.51	40.86	1.08	58.06	24.73	75.27

表 3 MDH 同工酶基因型频率、基因频率、纯合度和杂合度统计检验结果
Table 3 The results of significance tests for differences in genotype frequencies, allele frequencies, homozygosity and heterozygosity of the MDH isozyme in four subspecies of *Apis mellifera*

亚种 Subspecies (两两比较) (Paired comparison)	基因型频率 Genotypes frequencies		基因频率 Allele frequencies		纯合度和杂合度 Homozygosity & heterozygosity	
	χ^2	df	χ^2	df	χ^2	df
	Ea × D	44.03**	5	21.13**	2	24.28**
Ea × C	148.03**	5	108.76**	2	8.08**	1
Ea × K	56.13**	5	20.21**	2	30.59**	1
D × C	84.56**	5	43.36**	2	4.17*	1
D × K	64.11**	5	23.73**	2	0.47	1
C × K	123.53**	5	85.59**	2	7.24**	1
C, D, Ea and K	342.65**	15	164.36**	6	39.11**	3

*和**分别达到 0.05 和 0.01 显著水平 (*, ** Significance at $P=0.05$ and $P=0.01$ level, respectively)

尔巴阡蜂中 b 基因占优势, 频率为 61.41%; 东北黑蜂和浙农大 1 号意蜂中 c 基因频率最高, 分别为 54.69% 和 81.70%; 卡尼鄂拉蜂中 a、c 基因频率较高, 分别为 40.87% 和 58.07%。喀尔巴阡蜂和浙农大 1 号意蜂的纯合度较高, 分别 43.47% 和 63.39%, 东北黑蜂和卡尼鄂拉蜂杂合度较高, 分别为 70.83% 和 75.27% (表 1, 表 2)。

独立性检验结果表明, 4 个亚种的 MDH 同工酶基因型频率、基因频率、纯合度和杂合度均显

示极显著差异 ($\chi^2 > \chi^2_{0.01}$); 两两配对检验, 基因型频率和基因频率差异极显著 ($\chi^2 > \chi^2_{0.01}$); 纯合度和杂合度 D × K 差异不显著, D × C 差异显著, 其余均达到极显著水平 (表 3, 表 4)。

3 讨论

3.1 酯酶同工酶型的遗传差异

酯酶在各种生物体内广泛存在, 酯酶同工酶由一对共显性等位基因编码 (Mestriner *et al.*,

1972), 同工酶型不同反映了基因型不同。蜜蜂属不同种之间具有特征性的酯酶同工酶, 即酯酶同工酶型在种间有显著差异, 而在种内几乎没有差别 (李绍文等, 1986)。本实验结果显示喀尔巴阡蜂、东北黑蜂、浙农大 1 号意蜂和卡尼鄂拉蜂等西方蜜蜂不同亚种间的酯酶同工酶型基本一致, 但不同于东方蜜蜂的酯酶同工酶型, 反映了西方蜜蜂与东方蜜蜂 EST 同工酶基因型的差异, 酯酶同工酶型可作为蜜蜂属不同种鉴定的生化指标。

3.2 MDH 同工酶基因的来源和遗传差异

许多研究表明西方蜜蜂各亚种在 MDH 基因座上存在着的 3 个基因, 非洲蜜蜂 (*A. mellifera scutellata*) 和非洲化蜜蜂中基因 a 的频率最高 (Nunamaker *et al.*, 1981), 欧洲黑蜂 (*A. mellifera mellifera*) 中基因 b 的频率最高 (Sheppard *et al.*, 1984), 意大利蜜蜂 (*A. mellifera ligustica*) 中基因 c 占有优势比例 (Nunamaker *et al.*, 1985), 由于蜂王的商业出口, 导致各种种群都含有不同比例的基因 a、b 和 c, 基因 a、b 和 c 频率的不同在一定程度上反映了不同蜜蜂种群血统组成的差异。本实验结果表明, 喀尔巴阡蜂属于欧洲黑

蜂型蜜蜂, 浙农大 1 号意蜂属于意大利蜜蜂型蜜蜂。东北黑蜂是 19 世纪末 20 世纪初由俄罗斯引入黑龙江和吉林山区, 经自然选择和人工培育形成的一个优良品种, 有报道认为它是中俄罗斯蜂 (欧洲黑蜂的一种) 和卡尼鄂拉蜂的过渡类型, 并在一定程度上混有意大利蜂和高加索蜂 (*A. mellifera caucasica*) 血统, 本实验 MDH 同工酶的基因型频率和基因频率的结果证实了这种观点。Rinder *et al.* (1986) 认为喀尔巴阡蜂和卡尼鄂拉蜂是一个品种, 都属于欧洲黑蜂型蜜蜂, 但本实验发现它们的 MDH 同工酶基因型频率、基因频率、杂合度和纯合度差异极显著, 其原因可能是早期欧洲黑蜂和卡尼鄂拉蜂被阿尔卑斯山严格隔离在北部和东南部, 在俄罗斯没有这样的天然屏障, 表现出北部类型向南部类型的缓慢变化; 而蜜蜂引种往往仅引入几个蜂王, 经过数个世代, 某些基因型频率增高, 而另一些基因型频率降低, 与原种群基因型频率和基因频率产生较大的差异 (关迎辉等, 1994), 基因型频率、基因频率是群体的特征参数, 决定了群体的行为特性和生产性能, 可用于种内亚种或品系的鉴定。

参 考 文 献 (References)

- Lama, D. and M. A. Mestriner 1984 Starch gel electrophoretic patterns of exopeptidase in 14 different species of bees. *Rev. Bras. Genet.* 7: 9 ~ 20.
- Cartside, D. F. 1980 Similar allozyme polymorphism in honey bees (*Apis mellifera*) from different continents. *Experientia* 36: 649 ~ 652.
- Guan, Y. H., S. W. Li, J. H. Li and S. L. Chen 1994 Genovariation in three races of *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica* 37 (2): 159 ~ 164. [关迎辉, 李绍文, 李举怀, 陈盛禄 1994 意蜂三个品系间的基因差异. *昆虫学报* 37 (2): 159 ~ 164.]
- Li, S. W., Y. P. Meng, Z. B. Zhang, J. H. Li, S. Y. He and B. Y. Kuang 1986 Comparative study of esterase isozymes in six species of *Apis*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* 24 (4): 53 ~ 57. [李绍文, 孟玉萍, 张宗炳, 李举怀, 和绍禹, 匡邦郁 1986 蜜蜂属 (*Apis*) 六个种酯酶同工酶的研究. *北京大学学报 (自然科学版)* 24 (4): 53 ~ 57.]
- Mestriner, M. A. and E. P. B. Contel 1972 The P-3 and Est loci in the honey bee *Apis mellifera*. *Genetics* 72: 733 ~ 738.
- Nunamaker, R. A. and W. T. Wilson 1981 Comparison of MDH allozyme patterns in the African honey bee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the Africanized population of Brazil. *Journal of the Kansas Entomological Society* 54: 707 ~ 710.
- Nunamaker, R. A. and W. T. Wilson 1984 Electrophoretic detection of Africanized honey bees (*Apis mellifera scutellata*) in Guatemala and Mexico based on malate dehydrogenase allozyme patterns. *Journal of the Kansas Entomological Society* 57 (4): 622 ~ 631.
- Rinderer, E. T. 1986 Bee Genetics and Breeding. Orlando: Academic Press, 92 ~ 118.
- Rozalski, R. J., H. Sakurai and K. Tsuchida 1996 Esterase and malate dehydrogenase isozyme analysis in the population of honeybees, *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Japanese Journal of Entomology* 64: 910 ~ 917.
- Sheppard, W. S. and S. H. Berlocher 1984 Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. *J. Apic. Res.* 23: 64 ~ 69.
- Sheppard, W. S. and S. H. Berlocher 1985 New allozyme variability in Italian honey bees. *J. Hered.* 76: 45 ~ 48.

外 文 摘 要 (Abstract)

**GENETIC DIFFERENCES IN PATTERNS OF EST ISOZYMES
AND GENOTYPES OF MDH ISOZYMES IN FOUR SUBSPECIES
OF APIS MELLIFERA ***

TONG Fu-Dan ** WANG Qiao-Mei LIU Yan-He

(Zhejiang University, Hangzhou 310029)

The esterase (EST) and the malate dehydrogenase (MDH) isozymes in *A. mellifera carpatica* (C), *A. mellifera* ssp. (D), "Zhejiang Agricultural University No.1" *A. mellifera ligustica* (Ea) and *A. mellifera carnica* (K), and the genotypes of MDH isozymes in four subspecies of *A. mellifera* were analysed by IEF-PAGE. The results indicate that the four subspecies of *A. mellifera* showed the same EST zymogram, while *A. cerana* showed a different EST zymogram, which suggests that the genotypes of EST isozymes in *A. mellifera* are different from those in *A. cerana*. The genotypes of the MDH isozymes in four subspecies of *A. mellifera* were aa, ab, ac, bb, bc and cc. The C and Ea subspecies exhibited high homozyosity, while D and K displayed high heterozyosity. The allele b appeared to be the highest frequency in C, while the allele c had the highest frequency in Ea. The frequencies of the alleles a, b and c in subspecies D were very similar. The alleles a and c were common, while allele b was rare in subspecies K. There were highly significant differences in genotype frequencies, allele frequencies, homozyosity and heterozyosity among these four subspecies.

Key words Western bee (*Apis mellifera*), Esterase, Malate dehydrogenase, Isozyme

* The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39870592).

** Corresponding author. tong@zju.edu.cn