

## 云南省东方蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因的扩增及序列分析\*

谭宏伟, 董霞\*\* 和绍禹

(云南农业大学 东方蜜蜂研究所, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 扩增、测定和分析了云南省东方蜜蜂 16 个地理居群线粒体 16S rRNA 基因部分序列, 并结合从 GenBank 获得的蜜蜂科 3 个其它种的 16S rRNA 序列, 以离颚细蜂科的 *Vanhornia eucnemidarum* 为外群, 利用邻接法、最大简约法和最大似然法重构了它们的种系发生关系。结果显示, 云南省东方蜜蜂 16S rRNA 基因部分序列很保守, 不同地理居群均得到 435 bp 完全一致的基因序列; 通过对蜜蜂科 4 个种的种系发生关系分析发现, 东方蜜蜂与西方蜜蜂位于一个姊妹枝, 而熊蜂与无刺蜂位于一个进化枝, 4 个种得到了有效的区分。因此, 16S rRNA 可以作为一个理想的分子遗传标记用于蜜蜂科种间鉴定和种系发生关系分析。

**关键词:** 东方蜜蜂; 线粒体 DNA; 16S rRNA 基因; 序列分析

**中图分类号:** S 892    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-390X (2009) 03-0403-05

## Amplification and Sequence Analysis of the Mitochondrial 16S rRNA Gene of *Apis cerana* from Yunnan Province

TAN Hong-wei, DONG Xia, HE Shao-yu

(Eastem Bee Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** The fragments of the mitochondrial 16S rRNA gene of the 16 *Apis cerana* populations in Yunnan Province were amplified, sequenced and analyzed. Combining the homologous sequences of other 3 Apidae species from GenBank and using *Vanhornia eucnemidarum* as outgroup, phylogenetic trees were reconstructed with neighbor joining, maximum parsimony, and maximum likelihood methods. The results showed that the partial sequence of the 16S rRNA gene was very conservative among the *Apis cerana* in Yunnan Province. And the phylogenetic trees indicated that *Apis cerana* and *Apis mellifera* clustered together as a sister clade, *Bombus ignitus* and *Melipona bicolor* clustered together as a sister clade, which suggested that 16S rRNA gene of the bee was a good genetic marker for the identification of different species in Apidae.

**Key words:** *Apis cerana*; mtDNA; 16S rRNA gene; sequence analysis

东方蜜蜂 (*Apis cerana* Fabricius, 1793) 隶属于昆虫纲 (Insecta) 膜翅目 (Hymenoptera) 蜜蜂科 (Apidae) 蜜蜂属 (*Apis*), 广泛分布于亚洲大陆, 在我国境内除新疆和内蒙古北部尚未被

发现外, 各省市均有报道。位于我国西南地区的云南省, 具有丰富的植物资源和天然适宜东方蜜蜂生存繁衍的自然条件, 使得东方蜜蜂的数量居全国之冠 (约 80 多万群), 是云南省宝贵的经济

收稿日期: 2008-11-03    修回日期: 2008-11-24

\* 基金项目: 云南省自然科学基金项目 (2006C0035M)

作者简介: 谭宏伟 (1983-), 男, 重庆万州人, 硕士生, 研究方向为蜜蜂分子生物学。

E-mail: tanhongwei530@yahoo.com.cn

\*\* 通讯作者 Corresponding author: 董霞, 女, 博士, 教授, E-mail: dxia0709@126.com

昆虫资源。鉴于此,众多学者对云南地区东方蜜蜂的种群遗传结构进行了研究,以期达到对蜜蜂种质资源的保护。在早期的研究中,国内学者通过形态学指标将云南省东方蜜蜂分为 3 个亚种,即分布于云贵高原的中华亚种 (*Apis cerana cerana*),云南南部边境地带的印度亚种 (*Apis cerana indica*)及云南西北部的西藏亚种 (*Apis cerana skorikovi*)<sup>[1~4]</sup>。

随着分子生物学及分子遗传学的发展,分子标记在用于研究种群遗传结构的优势渐趋凸显。线粒体 DNA 具有结构简单、序列组成较保守、母系遗传及平均进化速率比核 DNA 高等特点,是昆虫分子系统学常被选择的研究对象。对于蜜蜂而言,由于其特殊的生殖机制(一个蜂群所有工蜂都拥有与蜂王相同的线粒体 DNA,一只工蜂可以代表整个蜂群),使得蜜蜂线粒体 DNA 成为研究蜜蜂分子系统学的一种重要遗传标记<sup>[5~10]</sup>。目前,用于蜜蜂种群遗传结构的线粒体基因主要有 16S rRNA, Cytochrome oxidase subunit I (*cox I*), Cytochrome oxidase subunit II (*cox II*), NADH dehydrogenase subunit II (*nad 2*) 等<sup>[11~14]</sup>。本研究旨在通过 PCR 技术扩增云南省不同地理居群东方蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因,从分子水平上来验证形态学上的分类,并与 GeneBank 中收录的蜜蜂

科 (Apidae) 其它种同源的 16S rRNA 序列进行比较分析,从而明确东方蜜蜂 16S rRNA 部分序列能否成为理想的种内及种间遗传标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用东方蜜蜂样本来自云南省 16 个地理区域(表 1),每个地区选择 1 群,每群随机采 50 只蜜蜂,置 75% 无水乙醇保存备用。

### 1.2 主要试剂及仪器

蛋白酶 K 购自 Merck 公司;PCR 及电泳相关试剂为大连宝生物公司产品;PCR 仪为德国 Biometra 循环反应仪。

### 1.3 样品 DNA 的制备

从 75% 酒精保存液中取出单只蜜蜂,用蒸馏水反复吹打冲洗 2~3 次,置于一新的 1.5 mL Eppendorf 管中,用灭菌眼科剪剪取蜜蜂头部和胸部,置于 1.5 mL 离心管中,将其充分剪碎;加入 450  $\mu$ L STE 缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)、10% 的 SDS 80  $\mu$ L 和 50  $\mu$ g/ $\mu$ L 的蛋白酶 K 40  $\mu$ L,充分混匀后置 56  $^{\circ}$ C 温箱中消化 8~12 h 至澄清;然后用酚-氯仿法进行抽提<sup>[15]</sup>,提取的 DNA 样品分装后于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

表 1 研究所用样品信息表

Tab. 1 Data of sample collected

2007 年

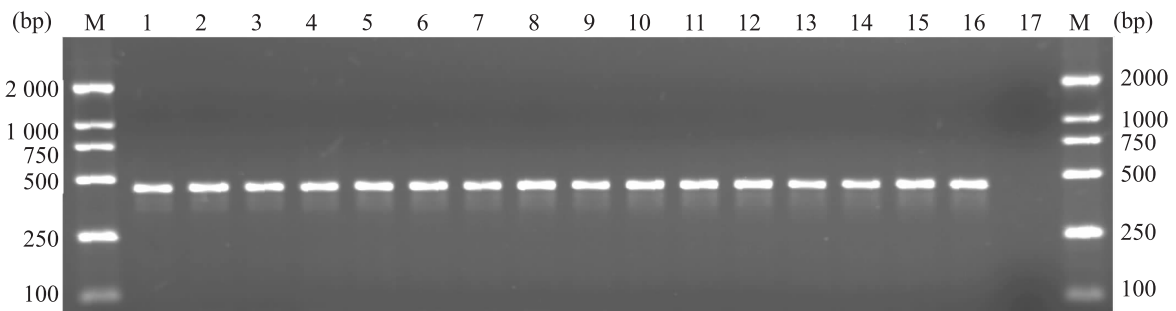
采集地点 collection site	时间/月 time	采集地点 collection site	时间/日 time
昭通市水富县 Shuifu County, Zhaotong City (ZTSF)	06	怒江州贡山县 Gongshan County, Nujiang prefecture (LSGS)	09
昆明市富民县 Fuming County, Kunming City (KMFM)	06	怒江州福贡县 Fugong County, Nujiang prefecture (LSFG)	09
昆明市禄劝县 Luquan County, Kunming City (KMLQ)	07	红河州蒙自县 Mengzi County, Honghe prefecture (HHMZ)	10
楚雄州姚安县 Yaoan County, Chuxiong prefecture (CXYA)	08	红河州元阳县 Yuanyang County, Honghe prefecture (HHYY)	10
大理州宾川县 Binchuan County, Dali prefecture (DLBC)	08	临沧市临翔区 Linxiang District, Lincang City (LCLX)	10
西双版纳州勐腊县 Mengla County, Xishuangbanna prefecture (XSBNMN)	11	临沧市镇康县 Zhenkang County, Lincang City (LCZK)	10
丽江市玉龙县 Yulong County, Lijiang City (LJYL)	09	文山州广南县 Guangnan County, Wenshang prefecture (WSGN)	10
丽江市永胜县 Yongsheng County, Lijiang City (LJYS)	09	文山州麻栗坡县 Malipo County, Wenshang prefecture (WSMLP)	11

#### 1.4 PCR 扩增

根据 Genbank 中西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 和熊蜂 (*Bombus ignitus*) 16S rRNA 基因序列, 用 primer premier 5.0 软件设计了用于扩增东方蜜蜂 16S rRNA 基因部分序列的引物: 16S - F (上游引物) 5' - TGAAGTCAAATCATGTAAGAT - 3'; 16S - R (下游引物) 5' - ACTGTACAAAGGTAGCATAAT - 3', 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。扩增体系为 25  $\mu$ L, 其中双蒸水 14.25  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L (25 mmol/L), dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, Primer (50 pmol/L) 0.5  $\mu$ L, Taq polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L (40 ng/ $\mu$ L); 扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 3  $\mu$ L PCR 产物在 1% TBE 琼脂糖凝胶电泳, 用溴化乙锭染色, 紫外投射仪下观察结果, 凝胶成像系统摄像。

#### 1.5 16S rRNA 基因序列测定及分析

将 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公



注Note: M: DL-2000标准分子量DL-2000 marker; 1: ZTSF; 2: KMFM; 3: KMLQ; 4: CXYA; 5: DLBC; 6: LJYL; 7: LJYS; 8: LJGS; 9: LJFG; 10: HHMZ; 11: HHYY; 12: LCLX; 13: LCZK; 14: WSGN; 15: WSMLP; 16: XSBNMN; 17: 阴性对照Negative control;

图1 东方蜜蜂线粒体16S rRNA基因PCR扩增产物的琼脂糖电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products for 16S rRNA mtDNA gene of *Apis cerana*

#### 2.2 16S rRNA 基因序列的测定及序列分析

##### 2.2.1 东方蜜蜂种内序列比较分析

16 个东方蜜蜂样品的 PCR 产物经双向引物测序, 均获得 435 bp (不含引物) 16S rRNA 基因的部分序列, 并且序列完全一致, 其中 A, T, C, G 所占比例分别为: 39.3%, 39.1%, 14.0% 及 7.6%。A + T 含量为 78.4%, G + C 含量为 21.6%, 符合一般生物体的线粒体 DNA AT 含量比较高的特点<sup>[16]</sup>。该基因片段的序列已获 GenBank 登记 (登录号: FJ416891)。

司直接测序, 为保证测序结果的准确性, 所有序列均进行双向测序。获得的序列在 NCBI 中的 BLAST 中进行同源性搜索, 下载蜜蜂科相关种 16S rRNA 基因序列; 然后用 ClustalX 1.8 软件进行多重比对分析; 利用 PAUP \* 4.0b10 软件中的邻接法 (Neighbor-joining method, NJ)、最大简约法 (Maximum parsimony, MP) 和最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统发育树, 三种分析方法均在默认设置下进行, 均采用自展检验 (bootstrap test) 估计所构建系统树的可靠性, 复制数为 1000。

#### 2 结果与分析

##### 2.1 PCR 扩增及电泳分析

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在约 450 bp 处呈现出 1 条特异性条带, 与预期的大小基本吻合, 说明本研究设计的 PCR 引物及反应条件具有较好的特异性 (见图 1)。

##### 2.2.2 蜜蜂科种间序列比较分析

为了验证所测东方蜜蜂 16S rRNA 基因部分序列能否作为蜜蜂科 (Apidae) 种间的一个遗传标记, 笔者从 GenBank 中下载了蜜蜂科的 3 种蜜蜂, 即西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) (登陆号 NC\_001566)、熊蜂 (*Bombus ignitus*) (登陆号 NC\_010967), 无刺蜂 (*Melipona bicolor*) (登陆号 NC\_004529) 16S rRNA 基因序列。通过比对分析发现 (图 2), 东方蜜蜂与西方蜜蜂的序列相似性为 88.3%, 而与熊蜂和无刺蜂的序列相似性分别为 83.3% 和 79.9%。

以离颚细蜂科的 *Vanhornia eucnemidarum* (登录号为 NC\_008323) 作为外群, 通过对蜜蜂科 4 个种的 16S rRNA 基因部分序列种系发育关系分析显示, 无论是 NJ 法、MP 法还是 ML 法, 所构建系统发育

树的拓扑结构均一致 (图 3)。东方蜜蜂和西方蜜蜂形成一个姊妹枝, 其 bootstrap 值均为 100%。无刺蜂和熊蜂形成一个姊妹枝, 其 bootstrap 值均大于 60%。

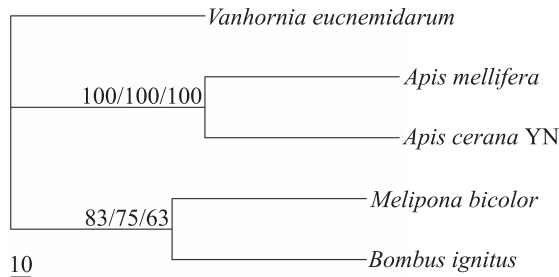
Ac	ATGTAAGATTTTAAAAAGTCGAACAGACTTAAAATTTTAAACTCCTGCGTTTAACTTTTCTCTTAATTCAA	70
Am	.....AC.....A.....CC...T...CA.....	70
Mb	.....T...A.....T...A.A.....AA...A.....	69
Bi	.....T...A.....T...T...C.A.....AA...A.....	69
Ve	.....A.....T...A.A.....T...A.CCCATTAA...AA.....	69
Ac	CATCGAGGTCGCAAACATCTTTATCAATGTGGTCTATCAAAAAGATATTACGCTGTTATCCCTAAGGTAAT	140
Am	.....T...A.A.....TT.....AT.....CC...T...CA.....	140
Mb	.....T...T...T...T...AA.A.....A.....A.....A.....	139
Bi	.....T...T...T...A.A.....T.A.....	139
Ve	.....AT...T.T.T...T...AA.AA...T...A.A...TT.....	139
Ac	TTATTCCTTTAATCATAAATTATAAGTCAAAAAA-ATCTTTTCATCAAAATTAATTTTTAGATAAAAGTT	209
Am	.....T.C.T...T...A.A.....TT.....AT.....A.C...A.....	210
Mb	.....TT...T...A.GA.....TTT...T...AAT...T...GTAA.TA--AA.AT...A...	206
Bi	.....TT.T.T.A.A.GA.....TTAT...AAT.A...GT...TA.A.A.....	208
Ve	.....C...T...T.A...A.A.TGCTT.AT...CAA...A.TTG...TTAAA...A.A.....	205
Ac	ATTTTTATTTACCAATCCTCCCAATCAAATT-TAAATTAATTATATATTCACAAATAATTTAAATAAATA	278
Am	TA..AA.....AT...T.....T...A.....TC.T.A.....T.TT..A.T.A.....T	278
Mb	TA..AA.....AT...T.....T...A.....T.AAT.T.....TT..AT.CCC.....	272
Bi	AA.AA.....T.T.....CA...A...T...ATTAA...A...A.TTAT.A...T...T...	273
Ve	CAA-AA...TT...TC.....CT...AA.T.CC.T.A...TA...A...TAT..CA...CC...A...	272
Ac	ATTATATTAATAAAATTTCTATAGGGTCTTATCGTCCCAT-AATTAATTTT CAGAATTTTACTAAAAAT	347
Am	TAA.A.....T.....T.....T.....A.....	347
Mb	.....T.....T.....T.AA.....T.AC.....T.....T.....	336
Bi	.....A.T.....A.....A.....C.....	336
Ve	T----AA.T.....C.....TA.....A.AC.....T.C.....	336
Ac	TTAAATTCATTAATAAAATAGAGACAGTTGTTATTTTCATCAATTCATTCATTCAATTCCTTCAATTAATA	417
Am	.....T.....TT.....A.....T.....A.....	417
Mb	.....A.....T.TAT.....ATA.....T...C.T.....C.GAT...T.....	406
Bi	.....A.....T.TAT.....ATA.....C.....T.C.T.....C.G.T...T.....	406
Ve	.....A...T...A...T...T...AA.....T...A...T...A...G.TC.....	405
Ac	GACAATTTATTATGCTAC	435
Am	.....	435
Mb	A.....G.....	423
Bi	A.....G.....	424
Ve	A...G.A.....	423

注 Ac: 东方蜜蜂; Am: 西方蜜蜂; Mb: 无刺蜂; Bi: 熊蜂; Ve: 离颚细蜂

Note Ac: *Apis cerana*; Am: *Apis mellifera*; Mb: *Melipona bicolor*; Bi: *Bombus ignitus*; Ve: *Vanhornia eucnemidarum*

图 2 5种蜂16S rRNA基因部分序列比对结果

Fig. 2 Alignment results of partial sequence of 16S rRNA gene of 5 different bees



注: 节点处数据由左到右依次为NJ, MP和ML的 Bootstrap值(%)

Note: Numbers at nodes indicate bootstrap values of NJ, MP and ML analysis

图 3 基于16S rRNA基因部分序列以最大简约法所构建的自展一致树

Fig. 3 The Bootstrap consensus phylogram of the stationary tree reconstructed by maximum parsimony (MP) using the 16S rRNA gene partical sequences

### 3 讨论

昆虫的线粒体 DNA 大小一般为 15.4 ~ 16.3 kb, 以高拷贝数存在于生物体内, 是一闭环环状双

链 DNA。线粒体 DNA 的碱基替换率比核 DNA 高 5 ~ 10 倍, 不含内含子, 很少发生不等交换, 在遗传过程中不易发生基因重组、倒位、易位等突变。鉴于以上特点, 线粒体 DNA 已成为研究生物遗传进化的重要材料<sup>[16]</sup>。随着分子系统学的发展, 越来越多的线粒体基因片段, 被用于昆虫种系发育关系分析。对于线粒体 16S rRNA 基因, 近年在蜜蜂上研究也是比较多。SITTIPRANEED 等利用东方蜜蜂 16S rRNA 基因序列, 对泰国不同地理居群的东方蜜蜂进行了遗传变异研究, 结果发现不同地理居群东方蜜蜂的平均遗传变异为 1.13%<sup>[11]</sup>。TANAKA 等基于 16S rRNA 基因序列, 对马来西亚婆罗州的东方蜜蜂和绿努蜂进行了遗传变异研究, 发现 16S rRNA 基因在两种蜜蜂种内种间均有变异<sup>[12]</sup>。RAFFIUDIN 等运用 3 个线粒体基因和一个核基因对蜜蜂属已知的 9 种蜜蜂进行了系统发育分析, 其中一个线粒体基因就是 16S rRNA<sup>[13]</sup>。

本研究对云南省 16 个地理居群东方蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因部分序列进行了比较, 所采集样品包含了云南省东方蜜蜂 3 个亚种所分布的区域, 旨在通过分子水平来验证形态学上的分类。结果显示所研究的 16S rRNA 基因部分序列在云南省东方蜜蜂种内很保守, 所测序样品均得到了完全一致的序列, 不能将 3 个亚种区分开来。为了验证 16S rRNA 基因序列是否适合更高级阶元的分类, 笔者从 GenBank 获得了蜜蜂科 (Apidae) 其它 3 个种的同源序列, 根据所重构的系统发育树得出了与 CHA 等基于西方蜜蜂、熊蜂和无刺蜂线粒体基因组的 13 个蛋白质基因所构建的系统发育树一致的结果<sup>[17]</sup>, 即熊蜂和无刺蜂聚在了一起, 西方蜜蜂单独形成一枝。添加东方蜜蜂 16S rRNA 基因部分序列后, 同属于蜜蜂属 (*Apis*) 的东方蜜蜂和西方蜜蜂聚在了一起, 可见 16S rRNA 基因在高级阶元的分类上, 是一个很好的遗传标记。为了在分子水平上明确云南省东方蜜蜂的亚种地位, 笔者认为可以不断尝试新基因或者多基因联合的方式<sup>[13,14]</sup>, 甚至基于线粒体全基因组来重构系统发育树<sup>[17]</sup>, 最终得到适合云南省东方蜜蜂亚种分类的“标准标记”。

#### [参考文献]

- [1] 董霞, 张炫, 史宪伟, 等. 东方蜜蜂 DNA 随机扩增多态及其遗传分化研究 [J]. 中国蜂业, 2001, 53 (2): 9-10.
- [2] 谭昱, 张炫, 和绍禹, 等. 云南东方蜜蜂的形态特征数值分类研究 [J]. 中国蜂业, 2003, 54 (3): 4-6.
- [3] 杨冠煌, 许少玉, 匡邦郁, 等. 东方蜜蜂 *Apis cerana* Fab. 在我国的分布及亚种分化 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 1986, 1 (1): 89-92.
- [4] 匡邦郁, 李有泉. 云南东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 的研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 1990, 5 (4): 224-229.
- [5] CHAPMAN N C, LIM J, OLDROYD B P. Population genetics of commercial and feral honey bees in Western Australia [J]. Journal of Economic Entomology, 2008, 101: 272-277.
- [6] SMITH D R, WARRIT N, RANDALL HEPBURN H. *Apis cerana* from Myanmar (Burma) unusual distribution of mitochondrial lineages [J]. Apidologie, 2004, 35: 637-644.
- [7] KOULIANOS S, CROZIER R H. Mitochondrial Sequence Characterisation of Australian Commercial and Feral Honeybee Strains *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), in the Context of the Species Worldwide [J]. Australian Journal of Entomology, 1997, 36: 359-364.
- [8] SMITH D R, VILLAFUERTE L, OTIS G, et al. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith insights from mtDNA studies [J]. Apidologie, 2000, 31: 265-279.
- [9] TAN K, WARRIT N, SMITH D R. Mitochondrial DNA diversity of Chinese *Apis cerana* [J]. Apidologie, 2007, 38: 1-9.
- [10] DELARUA P, SIMON U E, TILDE A C, et al. MtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines [J]. Heredity, 2000, 84: 124-130.
- [11] SITTIPRANEED S, SIHANUNTAVONG D, KINBUNGA S. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand revealed by polymorphism of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA [J]. Insectes soc, 2001, 48: 266-272.
- [12] TANAKA H, ROUBLK D W, KATO M, et al. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. Insectes Soc, 2001, 48: 44-51.
- [13] RAFFIUDIN R, CROZIER R H. Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 43: 543-552.
- [14] ARIAS M C, SHEPPARD W S. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 37: 25-35.
- [15] 和志娇, 谭宏伟, 徐中志, 等. 蜜蜂基因组 DNA 提取方法的改良 [J]. 西南农业学报, 2008, 21 (2): 491-493.
- [16] CORZIER RH, CROZIER Y C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization [J]. Genetics, 1993, 133: 97-117.
- [17] CHA S Y, YOON H J, LEE E M, et al. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Gene, 2007, 392: 206-220.