

孟祥金, 吉 挺, 沈 芳. 采用微卫星 DNA 标记分析皖南中蜂小群保种效果[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 62–65.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.016

采用微卫星 DNA 标记分析皖南中蜂小群保种效果

孟祥金¹, 吉 挺², 沈 芳²

(1. 安徽省畜牧推广总站, 安徽合肥 230001; 2. 扬州大学, 江苏扬州 2250009)

摘要:利用筛选后的 12 对荧光标记微卫星引物分析皖南中蜂野生群与皖南中蜂保种场保种群, 探讨小群保种效果。共检测确定 60 个个体基因型, 通过计算 2 个群体的优势等位基因频率(P_i)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)、群体内近交系数(F_{is})分析了皖南中蜂群体内和群体间的遗传变异, 采用配对试验均数差异 t 检验, 比较了保种群体与野生群体的遗传差异。结果表明: 保种群体与野生群体间的 P_i 无显著性差异($P=0.440>0.05$); H_e 略高于野生群体, 差异均不显著($P=0.122$), PIC 显著高于野生群体($P=0.047>0.05$); F_{is} 显著高于野生群体($P=0.019<0.05$)。结果说明, 皖南中蜂采用小群保种效果良好。

关键词:皖南中蜂; 微卫星 DNA; 遗传多样性; 保种效果

中图分类号: S892 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0062-03

皖南中蜂是中华蜜蜂的重要组成, 皖南中蜂具有适应性强、嗅觉灵敏、善于利用零星蜜粉源、抗病虫害、群势强、产量高等优良性状^[1]。皖南中蜂已被农业部和安徽省列入第一批“地方畜禽保护品种名录”。但是长期以来, 由于保种经费不足, 加上西方蜜蜂的大量饲养, 皖南中蜂群数锐减^[2]。近几年安徽中蜂开始实行小群保种。

微卫星是目前普遍使用的分子遗传标记方法, 具有多态性好、共显性、易于鉴定、检测重复性好以及基因组中分布广泛等优点。联合国粮农组织(FAO)在其持续发展和管理动物遗传资源的战略计划中, 推荐将微卫星标记作为优先考虑的分析工具^[2-3]。近几年来微卫星标记已广泛应用于我国各地蜜蜂种质资源分析, 但是目前普遍采用聚丙烯酰胺电泳加放射显影或银染的方法, 不仅费时费力效率低, 而且误差较大^[4-6]。本研究利用筛选后的 12 对荧光标记微卫星引物, 对保种场与野生种群遗传多样性进行比较分析, 旨在初步评价小群保种的效果, 继而探讨小群保种的可能性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究所用皖南中蜂为皖南地区保种场群体和原产地野生群体, 各随机选取 30 群, 每群随机采集成年工蜂 10 只, 用无水乙醇溶液浸泡保存。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 提取参照吉挺等所建立的方法^[7], 提取的基因组 DNA 用微量紫外可见分光光度计(NanoDrop ND-1000)测定含量与纯度, -20°C 保存备用。

1.2.2 常规引物的筛选 根据课题组成员对中华蜜蜂转录组测序结果^[8]所获得的 3 000 多个微卫星位点进行筛选, 选择的原则为等位基因数目多, 具有高度多态性, 结合 GenBank 和相应文献提供的微卫星引物对所选 54 对引物进行优化, 进一步筛选出 30 对扩增效果较好的微卫星引物。引物均由生工(上海)生物工程服务有限公司(Sangon)提供。

1.2.3 PCR 反应体系与产物扩增 由于 PCR 反应中影响因素较多, 试验分别设计了以 DNA 模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶用量、退火温度为因素的梯度试验, 最终确定 PCR 的反应体系。PCR 反应体系: $10 \times \text{buffer}$ 2.0 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.0 μL , 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL , 10 pmol/ μL 上游引物 1.0 μL , 10 pmol/ μL 下游引物 1.0 μL , 5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL , 100 ng/ μL DNA 模板 1.0 μL , 超纯水 13.3 μL 。PCR 扩增程序: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 50 s, ($59 \sim 62$) $^{\circ}\text{C}$ (因不同引物而异) 退火 50 s, 72°C 延伸 50 s, 共 30 个循环; 72°C 再延伸 10 min, 4°C 保存(Eppendorf, Mastercycler pro S)。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和硝酸银染色 配制 3% 琼脂糖凝胶, 点样 6 μL , 120 V 电泳 20 min, 检查产物的有无。如有产物, 配制 8% 聚丙烯酰胺凝胶 80 mL 体系, 100 V 预电泳 5 min, 点样 10 μL , 120 V 电泳 3 h。进行硝酸银染色, 直至出现清晰的等位基因条带。

1.2.5 荧光引物的筛选和组合 根据聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果, 尽量选择不同染色体上的引物进行标记, 淘汰掉无法扩增以及无多态性的引物, 最终选出相对较理想的 12 对多态性较丰富的微卫星引物(表 1)。每对引物的上游 5' 端分别用荧光染料 FAM(蓝色)、HEX(绿色)、TAMRA(黄色)进行标记, 获得的荧光标记引物避光保存。按照微卫星引物的碱基长度进行组合, 为了区分得精确一些, 组合的引物长度至少相差 10 bp, 获得的 5 个荧光标记微卫星引物组合信息见表 1。

1.2.6 荧光 PCR 产物 STR 分型 PCR 荧光产物送至生工(上海)生物工程有限公司进行 STR 分型, 使用 ABI-3730XL DNA Analyzer 全自动测序仪检测。上样的总体积为 13 μL ,

收稿日期: 2015-04-03

作者简介: 孟祥金(1962—), 男, 安徽蚌埠人, 主要从事蜜蜂资源保护和产业推广工作。E-mail: shenshuanger@126.com。

通信作者: 吉 挺, 博士, 主要从事蜜蜂种质资源保护与利用和蜂产品研究与开发。E-mail: 494515018@qq.com。

表 1 荧光标记微卫星引物组合信息及反应条件

组合	编码	Primer 名称	基因名称	修饰	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)	染色体位置
1	P	7 - CL1278. Contig1	LOC410851	FAM	159	59.5	LG2
	γ	51 - CL1114. Contig1	Mblk - 1	HEX	145	59.9	LG15
	X	39 - CL308. Contig6	LOC412784	TAMRA	114	57.5	LG9
2	S	17 - CL1462. Contig5	complexin	FAM	159	59.9	LG4
	T	18 - CL1470. Contig3	LOC413936	HEX	142	59.6	LG4
	W	37 - CL1293. Contig1	LOC100749790	TAMRA	89	60.1	LG9
3	K	29 - CL1229. Contig33	LOC100870946	FAM	156	60.1	LG7
	B	28 - CL1650. Contig3	Vha16	HEX	138	59.7	LG6
4	L	33 - CL1360. Contig14	PMCA	FAM	151	59.7	LG8
	M	1 - CL1229. Contig27	LOC100870946	HEX	137	60.3	LG1
5	R	14 - CL1549. Contig3	RyC4	FAM	150	60.2	LG3
	Q	11 - CL133. Contig41	LOC100577278	HEX	136	60.1	LG3

注:LG 即 Linkage Group(连锁群),表示染色体位置。

其中的上样液 Hi - Di Formamide 10 μL,GS - 500 Size Standard 0.5 μL,另外的 3 μL 为混合 PCR 产物。将 Hi - Di Formamide 和 GS - 500 Size Standard 混合均匀后与等量的同一个体的 PCR 产物进行混合,然后进行个体编号,依次加样到 96 孔板,接着变性和检测。检测结束后,使用 GeneMapper 4.0 软件自动生成独立的图谱文件,读取出片段长度、峰值和峰面积,判断纯合子和杂合子(单峰为纯合子,双峰为杂合子),最后导出 Excel 数据表格。

1.3 群体内遗传多样性分析

1.3.1 等位基因频率

$$P_i = (2n_{ii} + n_{ij1} + n_{ij2} + \cdots + n_{ijn}) / (2N)。$$
式中, P_i 为第 i 个等位基因频率, n_{ii} 为第 i 个等位基因纯合个数, j_n 为与 i 共显的第 n 个等位基因, n_{ijn} 为含 i 与 j_n 共显的等位基因个体数, N 为群体中个体数。

1.3.2 杂合度

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2。$$
式中: k 为等位基因数, P_i 为第 i 个等位基因频率。

1.3.3 多态信息含量

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i P_j = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k P_i P_j (1 - P_i P_j)，$$
式中: k 为等位基因数, P_i 为第 i 个等位基因频率, P_j 为第 j 个等位基因频率。

1.3.4 群体内近交系数

$$F_{is} = (H_s - H_o) / H_s。$$
式中: H_o 为观察杂合度, H_s 为平均期望杂合度。

1.6.5 统计分析 利用 Microsatellite - Toolkit 软件根据 GeneMapper 4.0 软件导出的 Excel 表格来计算等位基因频率与期望杂合度,根据 Botestein 等的公式^[9]设计、计算群体的多态信息含量,再根据 FSTAT 程序^[10]计算群体内近交系数。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂基因组 DNA 提取结果

将提取的基因组 DNA 经 TE 过夜溶解后,用 DanoDrop - 1000 浓度检测仪测定其吸光曲线与浓度。由图 1 可见,曲线平滑单峰, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 介于 1.8 ~ 20 之间,满足微卫星位点序列扩增的要求。

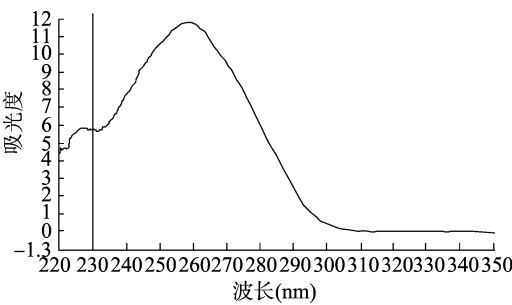


图 1 基因组 DNA 溶解的吸光曲线 (ng/μL)

2.2 荧光 PCR 扩增产物检测分型结果

图 2 - A 中个体 G 位点核心序列相差 7 bp,表现为双峰,为杂合子,基因型为 133/140。图 2 - B 图中个体为单峰,纯合子,基因型为 142。均无杂峰污染,扩增效果良好。

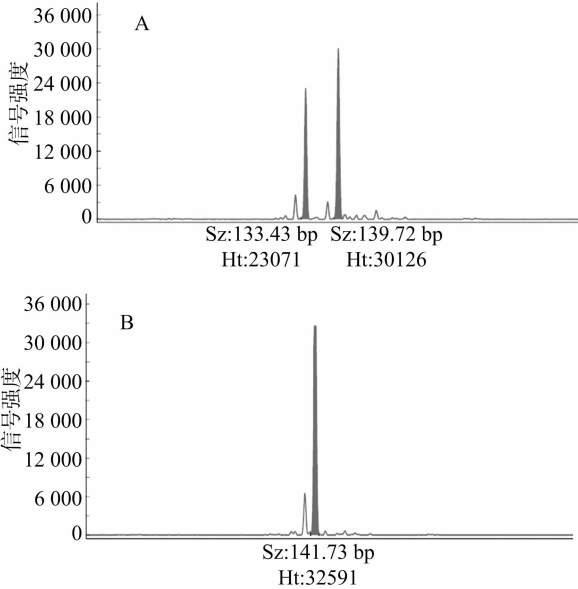


图 2 部分皖南中蜂保种场个体在 G 位点的 PCR 扩增产物电泳结果

2.3 保种场群体与原产地野生群体优势等位基因的比较

2 个中蜂群体优势等位基因及其频率见表 2。由表 2 可见,利用配对试验均数差异双尾 t 检验对 2 个群体优势等位

基因频率进行处理,结果 $P=0.44>0.05$,即 2 个群体在这 12 个微卫星标记检测出的优势等位基因上的差异不显著。

2.4 基因库保种群体与保种场 H_e 、 PIC 、 F_{is}

由表 3 可见,保种场的平均 H_e 为 0.530 9,略高于原产地野生群(0.473 5)、对 2 个群体的 H_e 进行 t 检验,结果显示,2 个群体间无显著差异($P=0.122$)。保种场群体 PIC 、 F_{is} 分别为 0.530 9、0.407 2,均高于原产地野生群(0.422 5、0.123 8), t 检验结果显示,保种场群体和野生群体之间差异显著(P 值分别为 0.047、0.019)。

3 讨论

当前保种方法有活体保种、冷冻保种和生物技术保种 3 种方法,活体保种包括原产地保种和异地保种 2 种方式,活体保种是目前中华蜜蜂保种的唯一方式。本研究对皖南中蜂保种场和原产地野生群进行分析研究,旨在为今后中华蜜蜂的

表 2 2 个中蜂群体在 12 个微卫星座位的优势等位基因及其频率

位点	优势基因大小 (bp)	基因频率(%)	
		绩溪	泾县
P	165	20.00	16.67
S	147	78.33	65.00
K	258	63.33	83.33
L	151	53.33	96.67
R	147	55.00	60.00
γ	139	23.33	40.00
T	132	0.00	63.33
B	132	90.00	100.00
M	145	83.33	0.00
Q	146	0.00	63.33
X	112	80.00	48.33
W	93	30.00	53.33

表 3 2 个群体在 12 个微卫星座位的期望杂合度、多态信息含量及群体内近交系数比较

位点	H_e		PIC		F_{is}	
	绩溪(库)	泾县(保)	绩溪	泾县	绩溪	泾县
P	0.875 7	0.852 5	0.846 4	0.819 2	0.315	0.023
S	0.372 3	0.484 7	0.341 1	0.391 4	0.910	0.862
K	0.581 4	0.300 6	0.549 4	0.281 6	0.541	0.556
L	0.598 9	0.066 1	0.515 8	0.064 0	0.777	0.496
R	0.565 5	0.545 8	0.468 7	0.461 7	-0.002	0.084
γ	0.857 6	0.748 0	0.824 7	0.696 8	0.223	0.064
T	0.533 9	0.524 9	0.465 3	0.449 3	0.313	-0.080
B	0.191 5	0.000 0	0.185 6	0.000 0	0.304	NA
M	0.302 3	0.358 2	0.285 6	0.310 3	0.449	-0.024
Q	0.787 0	0.541 2	0.741 1	0.478 2	0.322	-0.047
X	0.358 8	0.585 3	0.343 5	0.485 2	0.535	-0.708
W	0.832 2	0.674 6	0.796 3	0.632 5	0.199	0.259
$\bar{x} \pm s$	0.571 4 \pm 0.23	0.473 5 \pm 0.25	0.530 9 \pm 0.22	0.422 5 \pm 0.20	0.407 2 \pm 0.25	0.123 8 \pm 0.39

保种工作提供参考依据。

群体中的优势等位基因是物种中最原始、最保守的等位基因,其余等位基因均是由该等位基因突变形成的,因此微卫星的多态性可以反映物种的进化史^[1]。本研究中保种场和原产地野生群之间优势等位基因频率存在差异,但是差异不显著($P=0.440>0.05$),表明保种场保种方式有效地保存了皖南中蜂的种质特征。期望杂合度是衡量遗传变异程度的最佳参数;多态信息含量表示微卫星 DNA 变异程度的高低,反映群体内个体遗传变异的程度,数值越高表明变异程度越高。本研究中保种场 H_e 、 PIC 均高于原产地野生群,表明保种场群体的遗传多样性得到了很好的保存。

本研究对皖南中蜂保种场和原产地野生群进行遗传多样性检测分析。结果表明,皖南中蜂保种场和原产地野生群之间的 P_e 、 H_e 均差异不显著, PIC 显著增加, F_{is} 显著上升。其中,保种场群体的 H_e 略高于原产地, PIC 显著高于原产地;表明基因库通过利用群体内随机交配和家系间随机交配高效保持了保种群体的多样性。出众的飞翔能力使得蜂王在野生状态独特的自然环境中可以和其他起源的雄蜂发生基因交流,所以 F_{is} 很低;但是保种场群体有限,蜂王雄蜂的交配又难以控制,最终导致 F_{is} 显著升高;这提醒我们在以后的保种工作中应该扩大群体规模,采用人工授精技术,准确记录系谱资

料,并且根据群体的具体情况适当引入雄蜂血统,避免近交对保种效果的不利影响,降低 F_{is} ,有效避免近交衰退。

综上所述,本研究利用筛选的 12 对微卫星 DNA 标记分析皖南中蜂保种群和原产地群体的遗传多样性,对皖南中蜂保种效果进行评价。结果表明,皖南中蜂遗传多样性丰富,具有很高的保种价值;同时也表明对地方中蜂品种进行小群保种是可行的,为更好地评价、保护和利用我国的中蜂资源提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] 余林生,吴承武,汪明平,等. 皖南中蜂形态特征与地方品种优势种的筛选[J]. 中国蜂业,2008,59(10):46-47.
[2] 张大利. 中蜂保种场保种模式初探[J]. 蜜蜂杂志,2014,34(7):25-26.
[3] Crooijmans R P, Groen A F, Van Kampen A J, et al. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples[J]. Poultry Science, 1996, 75(7):904-909.
[4] Romanov M N, Weigend S. Genetic diversity in chicken populations based on microsatellite markers[C]. Proceedings of the Conference "From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics". Ames, Iowa, USA, 1999:17.
[5] 徐新建,周姝婧,朱翔杰,等. 海南岛中华蜜蜂遗传多样性的微卫

罗 岸. 烟草合子时期特异表达基因的克隆与分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 65–68.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.017

烟草合子时期特异表达基因的克隆与分析

罗 岸

(长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434023)

摘要:在烟草合子中克隆到 1 种新型的未知功能基因 *NiZE583*, 编码包含有 91 个氨基酸残基的多肽链。生物信息学分析显示:该蛋白的 N 端含有 1 段疏水性信号肽,但在其他物种中没有发现同类蛋白。*NiZE583*–绿色荧光蛋白(*NiZE583*–GFP)融合蛋白亚细胞定位显示,该蛋白可能存在于液泡中。利用染色体步移技术获得该基因 5′端上游 3 866 bp 的侧翼序列(启动子和 5′UTR),经检测发现,具有较强的启动子活性。研究结果为进一步研究该基因在烟草早期胚胎发生中的功能奠定了基础。

关键词:烟草;合子;液泡;基因克隆;信号肽

中图分类号: S572.01; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2016)05–0065–04

被子植物的受精过程被称为双受精,即来自同一花粉的 2 个精子同时进入胚囊,1 个与卵细胞结合形成二倍体的合子,另 2 个与中央细胞结合形成三倍体的胚乳母细胞。受精完成后,胚胎逐渐形成基本的形态和生理结构^[1],而胚乳则在此过程中扮演支持者的角色^[2–3]。

对于受精和早期胚胎发生过程的分子机制在动物中研究得比较深入,但是在植物中由于技术手段的限制导致对这方面的认识一直有许多空白。因为植物的受精和胚胎发生过程都存在于深埋在植物孢子体内的胚囊中,所以很难对整个过程中直接进行观察并了解背后的分子机制。随着现代生物学技术的发展,目前已能获得玉米、拟南芥、大米、大麦等一些植物的配子、合子和早期胚胎;此外,这些植物中与生殖发育息息相关的细胞 cDNA 文库、转录谱等也已陆续获得^[4–7]。这些进展对于研究植物的受精和胚胎发生过程起到了推动作用。

为了探索受精和早期胚胎发生的分子机制,特别是早期胚胎发生中的表观调控机制、合子不等分裂、细胞间通信等重大问题,笔者所在实验室用前期建立的胚胎分离技术^[8–9]和 SMART™ cDNA library construction 试剂盒构建了烟草合子和卵细胞的 cDNA 差减文库,通过筛选获得了许多在合子时期特异表达的基因^[10]。对其中 1 个具有信号肽结构的未知基

因 *NiZE583* 进行克隆和染色体步移,获得了其完整 CDS 序列和有活性的 5′侧翼调控序列,为进一步利用基因敲除和过表达技术来研究其在烟草早期胚胎发育中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白表达载体, GFP 核定位表达载体在 pART27 载体上改造而成,由武汉大学彭雄波副教授提供。大肠杆菌 DH5 α 感受态为笔者所在实验室自制。

1.1.2 植物材料 试验材料为野生型烟草(*Nicotiana tabacum* var. SR1),种植于长江大学生命科学学院所属温室内,室温 25 ℃,光照时间 16 h。

1.1.3 主要试剂 普通 DNA 片段回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司); DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 公司); Universal Genome Walker Kit (Clontech 公司); DNA 聚合酶 Ex Taq (TaKaRa 公司); DNA 聚合酶 Phusion High–Fidelity DNA Polymerase (限制性内切酶(NEB 公司); T4 DNA ligase (Fermentas 公司); Dynalbeads mRNA DIRECT Micro Kit (Life technologies 公司); SMARTer® Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Life technologies 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草 genome walking 文库的构建和 *NiZE583* 基因 5′侧翼区的克隆 取烟草幼叶,按照 DNeasy Plant Mini 试剂盒的要求提取 DNA。用 Universal Genome Walker 试剂盒构建

收稿日期: 2015–04–29

基金项目: 长江大学自然科学基金(编号: 2014NSFY023)。

作者简介: 罗 岸(1984—),男,湖北荆州人,博士,讲师,研究方向为植物生殖发育。E–mail: Anluo@whu.edu.cn。

星 DNA 分析[J]. 昆虫学报, 2013, 56(5): 554–560.

[6] 徐新建, 周妹婧, 朱翔杰, 等. 黄土高原中华蜜蜂遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2013, 42(6): 638–642.

[7] 余林生, 解文飞, 巫厚长, 等. 尼日利亚非洲蜂和安徽意大利蜜蜂及其杂交二代形态特征与微卫星 DNA 遗传多样性[J]. 生态学报, 2012, 32(11): 3555–3564.

[8] 吉 挺. 中国东方蜜蜂资源遗传多样性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2009: 35–48.

[9] 殷 玲. 东方蜜蜂抗螨相关基因的筛选及初步验证[D]. 扬州: 扬州大学, 2013: 31–32.

[10] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314–331.

[11] Goudt J. FSTAT version 2. 9. 3. 2 [M]. Switzerland Lausanne: Department of Ecology and Evolution, 2002.

[12] 张 扬, 黄正洋, 陈 阳, 等. 采用微卫星 DNA 标记分析巢湖鸕异体小群保种效果[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(11): 7–11.