

# 不同类型意大利蜜蜂 MDH II同工酶的研究

陈盛禄, 鲍秀良, 苏松坤, 刘艳荷

(浙江大学华家池校区蜂业研究所, 杭州 310029)

**[摘要]** 运用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术 (IEF-PAGE), 对有代表性的王浆蜂蜜双高产的“浙农大1号”意蜂品种 (浙意, Ea) 和中国本地意蜂 (本意, Eb)、美国意蜂 (美意, Em)、澳大利亚意蜂 (澳意, Eo)、意大利意蜂 (原意, Ee) 等5个意大利蜂 (*Apis mellifera Ligustica*) 品种试飞前的幼龄工蜂进行了苹果酸脱氢酶 (MDH) 同工酶的基因型、基因型频率、基因频率、杂合度和纯合度的研究。由 a、b、c 3 个等位基因编码的 MDH 图谱第二区带应有的 a/a、a/b、a/c、b/b、b/c 和 c/c 6 种基因型, 在 Ea、Eb、Ee 3 种意蜂中全部出现; 在 Eo 中出现 a/b、a/c、b/c、c/c 4 种, 在 Em 中出现 a/c、b/c、c/c 3 种。联列表独立性检验结果, 5 个意蜂品种间的基因型频率、基因频率、杂合度、纯合度存在显著差异。

**[关键词]** 意蜂品种; 苹果酸脱氢酶; 基因型; 基因频率; 杂合度

随着科技进步, 蜜蜂育种的方法已从传统的杂交育种、纯系选育、工程育种和集团闭锁繁殖育种四种育种范畴向分子生物学、生物化学、统计遗传学等新领域渗透、扩增, 甚至结合, 从微观领域里寻找新的育种手段和指标。本研究期待在分子水平上测定意蜂主要品种间 MDH 同工酶基因型、基因型频率、基因频率、基因型杂合度等参数, 为不同的意蜂品种或同一品种不同生产性能的蜂群鉴别、选育提供基础数据或指标。

同工酶是一组结构各异功能相同的酶, 它的产生由基因位点上的基因控制, 分为发育同工酶和分类同工酶。某些分类同工酶的蛋白质多态性的稳定存在, 为研究蜜蜂种性成为可能。李举怀等 1986 年对蜜蜂属 (*Apis*) 6 个种的脂酶 (EST) 同工酶进行测定, 从生化角度证明了这 6 个种存在着种间

特异性, 并明确提出我国西双版纳长期共存的排蜂 (黄色大蜜蜂) 和岩蜂 (黑色大蜜蜂) 的同工酶不同, 属两个不同的种, 解决了这两种蜂是两个种还是同一个种长期争论不休的问题。李绍文等在 1988 年利用 IEF-PAGE 研究了意蜂 EST (脂酶)、IDH (异柠檬酸酶)、Me (苹果酸酶)、MDH (苹果酸脱氢酶) 同工酶。肯定了 ESTIV 和 MDH 的多态性<sup>[1]</sup>。李举怀、李绍文 1990 年又利用 IEF-PAGE 测定了意蜂不同级型和同一级型不同发育阶段虫态的 MDH, 把 MDH 在 pH2~10 区间内的酶谱分为 I、II、III 三个区带, 其中 II 区带的同工酶是由 3 个等位基因编码的。除卵和幼虫不易测出活性外, 其余虫态均能测出, 无组织和发育日龄的特异性<sup>[2]</sup>, 进一步肯定了 MDH II 是稳定的分类同工酶, 这为蜜蜂属、种、亚种、品种 (含地理宗)

**[收稿日期]** 1999-07-19; **修回日期** 1999-11-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (39470552)

**[作者简介]** 陈盛禄 (1938-), 男, 浙江义乌人, 浙江大学蜂业研究所教授

鉴别及种性研究, 提供了一个可鉴别的指标。关迎辉等 1994 年用 IEF - PAGE 分析了 Eb 和 Ea 的 MDH II 同工酶, 发现它们间基因型、基因型频率、基因频率、杂合度都存在显著差异。为 Ea 品种确定提供了遗传和生化依据<sup>[3]</sup>。同样, 我们也运用这个方法, 于 1997 年 2~6 月对主要的世界著名的 5 个意蜂品种的 MDH II 区的同工酶基因型、基因型频率、基因频率、杂合度、纯合度进行了测定, 为创立现代蜜蜂育种新方法及种质研究, 亚种、品种、杂种鉴别提供新的数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 意蜂品种 Ea 来源于浙农大实验蜂场共 30 群; Ee、Eo、Em 引自吉林省养蜂研究所, 隔离扩群后分别为 11 群、6 群、30 群; Eb 引自云南西双版纳景洪药植研究所何远通定地蜂场, 共 21 群。

1.1.2 主要仪器和试剂 LKB 电泳系统 (瑞典): LKB2197 型电泳仪; LKB2117 型电泳槽; LKB2219 冷却水循环仪。DV - 120 - 02 紫外分光光度计 (日本)。

安福林 (Ampholine) pH4~6、pH6~8、pH7~9, 购自华美生物工程公司上海分公司; 辅酶 I (NAD); 硝基四氮唑兰 (NBT); 硫酸甲脂酚嗪 (PMS); 苹果酸 (malic acid); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris); 丙烯酰胺 (Acr); N, N' - 甲叉双丙烯酰胺; N, N, N', N' - 四甲基乙二胺 (TEMED)。

### 1.2 方法

1.2.1 样品处理 每群蜂剪下 35 个试飞前幼龄工蜂头部, -20℃ 保存。任取 30 个用于实验。每个工蜂头置于 0.5 mL Eppendorf 管中, 加 100 μL 提取液, 用玻棒研磨 1 min, 自然沉淀, 取上清液用于实验。

1.2.2 Folin - 酚法测定蛋白含量 样品中的蛋白含量直接影响到试验结果, 样液中蛋白含量少, 染色后图谱条带很淡, 看不清楚; 蛋白含量高, 条带分不清楚。为保证较好的试验重复性, 先测定样液中的蛋白含量, 再决定加样量很有必要。利用 Folin - 酚法测定蛋白含量 ([Pro.]) 快速 (40 min)、简便。它是由两组试剂作用于蛋白质而产生有色物质, 通过比色测知蛋白含量 (Daniel & Stuart, 1991)<sup>[4]</sup>, 本试验加样液量为 20 μL。

1.2.3 MDH II 基因型的测定 采用 IEF - PAGE 法, 先后通过模具准备, 凝胶配制, 灌胶、铺胶片、加电极条和加样纸、加样、电泳、取胶、染色、烘干等步骤。<sup>[5~7]</sup>

### 1.3 数据统计与分析

根据 30 只工蜂头部 MDH II 的图谱, 参照 6 种基因型图谱 (见图 1), 确定基因型, 然后统计三项指标。

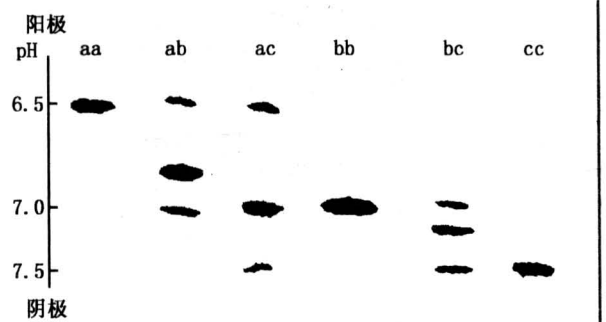


图 1 蜜蜂 MDH II 6 种基因型图谱

Fig.1 Map of six genotypes of MDH II in honeybee

基因型频率 = 基因型数目 / 样本总数。

基因频率由基因型频率求得,

$$a \% = aa \% + 1/2 ab \% + 1/2 ac \%$$

$$b \% = bb \% + 1/2 ab \% + 1/2 bc \%$$

$$c \% = cc \% + 1/2 ac \% + 1/2 bc \%$$

杂合度、纯合度也由基因型频率求得,

$$\text{杂合度} \% = ab \% + ac \% + bc \%$$

$$\text{纯合度} \% = aa \% + bb \% + cc \%$$

独立性检验采用  $c \times r$  联列表卡方分析, 对 5 个品种的基因型频率、基因频率及杂合度、纯合度三项指标作独立性检验<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 蛋白含量

Folin - 酚法测得的 6 支标准蛋白含量管和 2 支样品管在 500 nm 处吸光值 ( $OD_{500}$ ) 见表 1, 蛋白含量与  $OD_{500}$  关系的标准曲线见图 2。测得样品管在 500 nm 处吸光值 ( $OD_{500}$ ) 为 0.276, 由标准曲线求得样品管中的蛋白含量为 194 μg, 样品管中的样液为 20 μL, 因此每微升样液的蛋白含量为 9.7 μg; 100 μL 提取液 (一只工蜂头部) 中的蛋白含量为 970 μg。IEF - PAGE 电泳时加样 5 μL, 蛋白含量为 48.5 μg。

表 1 [Pro.] 与 OD<sub>500</sub> 对应表  
Table 1 List of [Pro.] and OD<sub>500</sub>

管号	1	2	3	4	5	6	样品 1	样品 2
[Pro.] /μg	0	50	100	150	200	250	194	194
OD <sub>500</sub>	0.000	0.084	0.155	0.217	0.293	0.340	0.276	0.275

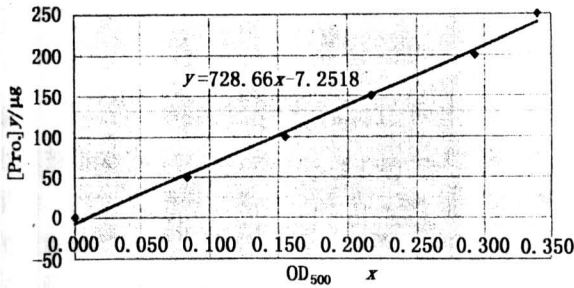


图 2 蛋白含量标准曲线图

Fig.2 The standard curve diagram of protein content

本研究测定了 5 种类型意蜂 2940 个工蜂个体，确实存在 6 种基因型，其中以 cc 型最多，bb 型和 aa 型最少，其中 Em 和 Eo 都未发现 bb、aa 型，具体见表 2。

2.3 基因型频率、基因频率、杂合度和纯合度

根据测得的数据统计基因型频率 cc 型最高，不仅 5 种意蜂平均数最高，而且每个意蜂类型本身也最高，最高值 Eo 达 81.1%，最低值 Ee 为 26.7%；aa、bb 型最低，Em、Eo 都是 0。基因频率 c 最高，最高的 Eo 达 90.3%，最低的 Ee 为 50.5%，也在 50% 以上。杂合度 Ee 最高为 67.9%，Eo 最低为 18.9%，相反，纯合度 Eo 最高，Ee 最低。具体见表 3。

2.2 基因型

表 2 5 种类型意蜂工蜂 MDH II 基因型数目表

Table 2 List of the MDH II genotype numbers in 5 races of Italian honey bees

类型名称	测定数目	基因型数目 (只)					
		aa	ab	ac	bb	bc	cc
Ea	900	20	25	266	6	126	457
Eb	630	2	7	74	4	98	445
Ee	330	11	67	74	7	83	88
Em	900	0	0	282	0	228	390
Eo	180	0	1	2	0	31	146

表 3 不同类型蜜蜂基因型频率、基因频率、杂合度和纯合度表

Table 3 List of genotype frequency, allele frequency, heterozygosity and homozygosity of MDH II in the different Italian honey bees

意蜂类型	基因型频率/%						基因频率/%			杂合度/%	纯合度/%
	aa	ab	ac	bb	bc	cc	a	b	c		
Ea	2.2	2.8	29.6	0.7	14.0	50.8	18.4	9.1	72.6	46.4	53.6
Eb	0.3	1.1	11.7	0.6	15.6	70.6	6.7	9.0	84.3	28.4	71.6
Ee	3.3	20.3	22.4	2.1	25.3	26.7	24.7	24.8	50.5	67.9	32.1
Em	0.0	0.0	31.3	0.0	25.3	43.3	15.7	12.7	71.7	56.6	43.4
Eo	0.0	0.6	1.1	0.0	17.2	81.1	0.8	8.9	90.3	18.9	81.1

2.4 MDH II 三项指标显著性检验

联列表独立性检验结果表明，5 种意蜂类型，

MDH II 基因型频率、基因频率和杂合度/纯合度存在显著差异，见表 4。

表 4 5 种类型意蜂 MDH II 基因型频率, 基因频率, 杂合度、纯合度显著性检验表

Table 4 List of the testing significance for genotype frequency, allele frequency and heterozygous and homozygous degrees of MDH II in 5 races of Italian honey bees

意蜂类型 名称	基因型频率			基因频率			杂合度/纯合度		
	所列联表	X <sup>2</sup>	df	所列联表	X <sup>2</sup>	df	所列联表	X <sup>2</sup>	df
Ea × Eb × Ee × Em × Eo	5 × 6	146.63	20	5 × 3	54.4	8	5 × 2	65.4	4

### 3 讨论

#### 3.1 基因型频率和种群特征

群体遗传学的哈代-温伯格定律指出, 自然交配的大群体, 在没有自然选择、没有新基因加入和遗传漂变的条件下, 上下代之间基因频率和基因型频率是不变的<sup>[8]</sup>。然而在人工饲养情况下, 上述哈代-温伯格定律的条件要求是达不到的。关迎辉等指出, 若有几十个蜂群组成的小群体从一个大群体迁出与原来大群体及其他任何群体隔离, 自行繁衍后代, 则基因频率会偏离大群体频率, 种群越小, 偏离越大。蜜蜂引种, 往往只引进几个种王, 在人为的干预下, 繁殖的种群与原来大群体基因型频率会有差异。通过数个世代, 该群体会形成比较固定的基因型频率, 因此, 这种基因型频率可以成为鉴别这一小群体的指标。如果这个小群体的蜂群具有某种优良性能, 该基因型频率就有较大的应用价值。

#### 3.2 意大利蜜蜂亚种的等位基因频率

李举怀等 (1996) 许多学者报道西方蜜蜂各亚种在 MDH II 位点上存在有 a、b、c 三个等位基因。而且众多的研究结果指出, 欧洲黑蜂 (*Apis mellifera mellifera*) 中 b 的频率最高<sup>[9]</sup>, 非洲蜜蜂 (*Apis mellifera scutellata*) 和非洲化蜜蜂中 a 的频率最高<sup>[10]</sup>, 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 中等位基因 c 最高<sup>[11]</sup>。本试验结果表明, 各种意蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 的 3 个等位基因中, c 基因亦占有优势, Eo 最高达 90.3%, 最低的 Ee 也占 50.5%。根据以上的研究结果, 是否可以把 c 基因频率大于 50% 作为意蜂 c 基因频率的标准, 如果该标准得到确认, c 基因不到半数的蜂种可以认为不是意蜂亚种, 至少是属于混杂十分严重的意蜂, 在生化方面为意蜂亚种鉴别找到了比较可靠的基因频率指标。

#### 3.3 图谱条带的分辨率

根据 MDH II 区的 pH 在 6.5~7.5 之间, 把凝胶 pH 调至 6~8 区间, 由于整个电泳胶板被较小范围的 pH 占据, 使 pH 梯度表现距离增大, 结果明显拉开了条带间距, 甚至使原为重叠部分重叠的一条条带重新分开变成两条可以明显分辨的独立的条带, 从而提高了条带清晰度和基因型分辨率。

#### 3.4 同工酶多态性应用

同工酶及蛋白多态性是生化变异的主要组成部分。它具有较大的应用前景。

3.4.1 种、亚种、品种分类 Sylvester 利用 MDH-1, ADH-1、P-3R 的资料及 Ayala 和 Powell 的方法, 论证了一个用于区分巴西的非洲化蜜蜂和巴西的欧洲蜜蜂的方法<sup>[12]</sup>。这个方法联合地分析了 5 个位点, 可使单只蜜蜂鉴定的准确率大于 99%, 而单独地利用 3 个位点鉴定的准确率分别为 93%、87% 和 85%。

3.4.2 分子标记 当蜜蜂在形态上几乎没有或只有微小差异时, 等位基因具有作为遗传标记的希望。对于那些特定地区稀少或缺乏的等位基因酶有希望成为最有用的等位基因酶。

3.4.3 发育分化 蜜蜂中不同性别, 不同级型的个体及同一个体在不同发育阶段表现有不同的生化变异, 这可作为研究基因在发育分化过程中表达调控的一个很好的模型。

3.4.4 选育指标 许多敏感品系与抗药品系在同工酶条带及强弱上是存在差异的 (张大羽, 1996)。那么会不会不同生产性能的不同类型意蜂间也存在着不同的一组酶或同一组酶中条带强弱差异呢? 在这方面有待进一步进行基础研究。另外对非特异蛋白和基因组 DNA 多态性的研究也应予以重视。

#### 参考文献

- [1] 李绍文, 孟玉萍, 张宗炳, 等. 意蜂和中蜂四种同

- 工酶的研究 [J]. 昆虫学报, 1988, 30 (3): 266~369
- [2] 李举怀, 李绍文. 蜜蜂苹果酸脱氢酶同工酶的电泳表型和基因型 [J]. 北京大学学报 (自然科学版), 1990, 26 (2): 237~242
- [3] 关迎辉, 李绍文, 李举怀, 等. 蜜蜂三个品系间的基因差异 [J]. 昆虫学报, 1994, 37 (2): 159~164
- [4] Daniel M B, Stuart J E. Protein methods [M]. Wiley-liss Press, 1991
- [5] LKB-Pradukter AB. Instruction for high-performance analytical electrofocusing in 0.5 mm thin-layer polyacrylamide gels [M]. Sweden: LKB-Pradukter AB
- [6] 何忠效, 张树政. 等电聚焦 [M]. 北京: 科学出版社, 1985
- [7] 李举怀, 王筱静, 关迎辉, 等. 西方蜜蜂亚种间 MDH 同工酶的研究 [J]. 华北农学报, 1996, 11 (2): 121~126
- [8] 王嘉忠, 杨玉华. 群体遗传学原理 [M]. 成都: 四川大学出版社, 1992
- [9] Sheppard W S, Berlocher S H. Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway [J]. J. Apic. Res., 1984, 23: 64~69
- [10] Nunamaker P A, Wilson W T. Comparison of MDH allozyme patterns in the African honey bee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the africanized population of Brazil [J]. J. Kansas Entomol. Soc., 1981, 54: 707~710
- [11] Sheppard W S, Berlocher S H. New allozyme variability in Italian honey bees [J]. J. Hered., 1985, 76: 45~48
- [12] Sylvester H A. Electrophoretic identification of Africanized honey bee [J]. J. Apic. Res., 1982, 21: 93~97

## Studies on Malate Dehydrogenase II (MDH II) Isozymes in Different Races of *Apis mellifera ligustica*

Chen Shenglu, Bao Xiuliang, Su Songkun, Liu Yanhe

(Research Institute of Apiculture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**[Abstract]** The young workers (in three days) of five races of *Apis mellifera ligustica*—ZAU-1 Italian honey bee (Ea), Chinese Italian honey bee (Eb), American Italian honey bee (Em), Italian Italian honey bee (Ee) and Australian Italian honey bee (Eo) have been used to study the genotype, genotype frequency, allele frequency, heterozygous and homozygous degrees of the malate dehydrogenase II (MDH II) isozymes with polyacrylamide gel isoelectrofocusing (IEF-PAGE). There are six genotypes (a/a, a/b, a/c, b/b, b/c, c/c) in MDH II that is coded by three alleles: a, b and c. All of them are found in Ea, Eb and Ee; four (a/b, a/c, b/c, c/c) are found in Eo; three (a/c, b/c, c/c) in Em. The genotype frequencies are aa (0.022), ab (0.028), ac (0.296), bb (0.007), bc (0.140), cc (0.508) in Ea; aa (0.003), ab (0.011), ac (0.117), bb (0.006), bc (0.156), cc (0.706) in Eb; aa (0.033), ab (0.203), ac (0.224), bb (0.021), bc (0.252), cc (0.267) in Ee; aa (0.000), ab (0.000), ac (0.313), bb (0.000), bc (0.253), cc (0.433) in Em; aa (0.000), ab (0.006), ac (0.011), bb (0.000), bc (0.172), cc (0.811) in Eo. The allele frequencies are a (0.184), b (0.091), c (0.726) in Ea; a (0.067), b (0.090), c (0.717) in Em; a (0.008), b (0.089), c (0.903) in Eo. The heterozygosities (H) of the MDH II locus equal to 0.464 in Ea; 0.284 in Eb; 0.679 in Ee; 0.566 in Em; 0.189 in Eo.

The results of test-independence show that there are significant differences in the distributions of genotype frequency, gene frequency, heterozygous and homozygous degrees among five races of *Apis mellifera*.

**[Key words]** races of *Apis mellifera* malate dehydrogenase (MDH); genotype; allele frequency; heterozygosity