

基于线粒体基因的东方蜜蜂群体亚分化研究*

田嵩浩^{1**} 赵照林⁴ 赵慧婷² 马卫华^{1,3} 杨珊珊¹ 孟 娇¹ 姜玉铭^{1***}

(1. 山西农业大学动物科技学院 太谷 030801; 2. 山西农业大学生命科学学院 太谷 030801;

3. 山西农业科学院园艺研究所 太原 030031; 4. 山西农业科学院食用菌研究所 太原 030031)

摘 要 【目的】进一步了解我国境内东方蜜蜂 *Apis cerana* (Fabricius) 群体的亚分化状况, 为保护和合理利用这一宝贵的蜂种资源提供理论依据。【方法】采用公开的两对引物对中国境内 19 个地区的东方蜜蜂线粒体 tRNA^{Ile} ~ ND₂ 与 16S rRNA 基因的部分序列进行了扩增、测序, 并与其他地区东方蜜蜂的相应序列进行了比对分析。【结果】扩增获得的 tRNA^{Ile} ~ ND₂ 基因的部分序列长度为 471~474 bp, 序列中共 13 个变异位点; 16S rRNA 基因的部分序列长度为 581~585 bp, 序列中共 6 个变异位点。ND₂ 基因部分蛋白比对结果显示, 仅山西沁源东方蜜蜂有一个位点发生变异。【结论】基于两基因部分序列所构建的系统发育树表明, 海南东方蜜蜂明显区别于其他地区的东方蜜蜂; 阿坝地区的东方蜜蜂可能属于高海拔地区的一种生态型, 未支持其单独作为一个亚种的结论; 吉林 3 个地区的东方蜜蜂之间亲缘关系较近, 可能属于一个生态型; 云南东方蜜蜂的变异比较丰富。

关键词 东方蜜蜂, 线粒体基因, 遗传多样性, 序列分析, 系统发育

Study of the population structure of *Apis cerana* based on mitochondrial gene variation

TIAN Song-Hao^{1**} ZHAO Zhao-Lin⁴ ZHAO Hui-Ting² MA Wei-Hua^{1,3} YANG Shan-Shan¹
MENG Jiao¹ JIANG Yu-Suo^{1***}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

3. Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural, Taiyuan 030031, China;

4. Shanxi Provincial Academy of Agricultural Sciences, Institute of edible fungi, Taiyuan 030031, China)

Abstract 【Objectives】To clarify the taxonomic status of *Apis cerana* (Fabricius) subspecies in China as well as provide a theoretical basis for protecting and rationally developing honeybee resources. 【Methods】Mitochondrial DNA tRNA^{Ile}-ND₂ and 16S rRNA genes of *A. cerana* collected from 19 locations in China were amplified using two previously developed pairs of primers and sequenced. Sequences of these two genes were compared with the corresponding sequences from other locations. 【Results】The results indicate that the length of the tRNA^{Ile}-ND₂ partial sequence was 471-474 bp with 13 variable sites. The length of the 16S rRNA partial sequence was 581-585 bp with 6 variable sites. The alignment of the partial ND₂ gene protein sequence indicated that there was only one amino acid mutation in the Qinyuan sample. 【Conclusion】A phylogenetic tree based on tRNA^{Ile}-ND₂ and 16S rRNA partial gene sequences indicates that the *A. cerana* population from Hainan was significantly different from the other 18 populations. The *A. cerana* population from Aba may be a high altitude ecotype. The

* 资助项目: 山西省留学管理委员会办公室基金 (2010043)

**E-mail: tshibm@163.com

***通讯作者, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期: 2013-09-28, 接受日期: 2014-01-09

result did not, however, support the conclusion that the Aبا population was a separate subspecies. Three populations from Jilin may belong to the same ecotype. The variation between *A. cerana* populations in Yunnan was high.

Key words *Apis cerana*, mitochondrial gene, genetic diversity, sequence analysis, phylogenetic

我国境内的东方蜜蜂分布于除新疆和内蒙古北部外的广大地区(杨冠煌等, 1986), 由于长期的自然选择, 对我国气候和蜜粉源条件产生了惊人的适应能力, 在维持生态平衡和生物多样性方面起到了非常重要的作用。自上世纪初, 西方蜜蜂引入我国以来, 由于在种间竞争上处于劣势, 加之农药、杀虫剂的广泛使用以及生态环境的人为破坏, 部分地区的东方蜜蜂面临着濒危的境地(刘新宇和高崇东, 2009)。因此, 保护和合理开发利用这一宝贵的蜂种资源势在必行。

关于中国境内的东方蜜蜂分类状况, 一直存在诸多争议。Maa (1944) 将分布于西藏南部的不同于印度亚种的蜜蜂命名为 *Apis cerana skorikori* (Maa)。Kellogg (1954) 将中国福建的蜂种定名为 *Apis cerana peroni* (Kellogg), 并且认为中国其他地方的蜂种均为中华蜜蜂亚种(糜佳霖和谭垦, 2007)。Ruttner (1988) 依据形态学数据分析提出东方蜜蜂有 4 个亚种, 即中华亚种、印度亚种、日本亚种和喜马拉雅亚种, 并且提出来自菲律宾的蜂种 *Apis cerana philippina* (Skor.) 可能是一个新的亚种。Damus 和 Otis (1997) 通过对东南亚的东方蜜蜂形态特征研究, 正式提出了东方蜜蜂的菲律宾亚种。我国学者杨冠煌 (1984) 及龚一飞和张其康 (2000) 则将中国的东方蜜蜂分为 5 个亚种, 分别是中华亚种、海南亚种、阿坝亚种、西藏亚种和印度亚种。

由于蜜蜂蜂群的特殊社会结构和线粒体 DNA (mtDNA) 具有母系遗传的特点, 蜜蜂线粒体 DNA (mtDNA) 被广泛应用于蜜蜂种内和种间的系统发育和群体遗传多样性研究 (Smith and Hagen, 1996; 徐新建, 2009)。Arias 和 Sheppard

(1996) 采用 ND₂ 基因序列对西方蜜蜂群体的亚分化状况进行了研究, 共发现 20 个不同单倍型, 系统发育分析得到 3~4 个主要亚种, 该结果与通过形态学研究得到的结论一致。Irfan 等 (2006) 通过线粒体 ND₂ 基因的系统发育分析, 将塞浦路斯大部分地区的蜜蜂归为西方蜜蜂 C 分支。Sheppard 和 Meixner (2003) 通过对分布于中亚天山地区的西方蜜蜂亚种 *Apis mellifera pomonella* 的 ND₂ 序列分析后认为, 其属于西方蜜蜂 C 分支。Ilyasov 等 (2011) 通过对俄罗斯乌拉尔和乌克兰基辅附近蜜蜂的 ND₂ 基因所作的序列分析显示, 欧洲黑蜂 *Apis mellifera mellifera* (L.) 是西方蜜蜂 M 进化支上的独特的一个亚种, 来自乌克兰基辅附近的蜜蜂被确定为 *Apis mellifera macedonica* (Kiesenwetter) 亚种。Tan 等 (2006) 扩增了中国境内 19 个地方的东方蜜蜂 ND₂ 基因, 研究其生物地理学和种内变异, 结论显示, ND₂ 基因的序列变异与形态学的地理变异一致。利用蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因进行种内分类研究的报道较少, 可能是由于该基因在种内比较保守。Sittipraneed 等 (2001) 利用限制性酶切分析泰国境内的东方蜜蜂的线粒体 16S rRNA 基因, 获得了 4 种不同的单倍型。谭宏伟等 (2009) 对云南省 16 个地理居群的东方蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因部分序列进行扩增和分析, 不同地理居群的基因序列完全一致。

本研究采用公开的引物对中国境内 19 个地区的东方蜜蜂 mtDNA ND₂ 和 16S rRNA 基因部分序列进行扩增、测序及序列分析, 以进一步了解我国境内东方蜜蜂的群体亚分化状况, 为保护和合理利用这一宝贵的蜂种资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

东方蜜蜂样本采自全国 10 个省 19 个地区 (表 1), 除广东和福建的样本取自人工饲养的标准蜂箱外, 其他均为旧法饲养的蜂群。每个样点分别采 1~5 群, 每群采 50~100 头工蜂, 置于无水乙醇 (分析醇) 中, 保存于 -20℃ 冰箱中, 至 DNA 提取。

1.2 DNA 的提取、PCR 扩增及测序

总 DNA 的提取采用 TIANamp Genomic DNA Kit (购自北京天根生化科技有限公司)。胶回收采用 Gel Extraction Kit (D2500-01) (购自 OMEGA 公司)。克隆采用 PGM-T Cloning Kit (购自北京天根生化科技有限公司)。

实验用引物 (Cameron *et al.*, 1992; Arias and Sheppard, 2005) 由北京六合华大基因公司合成

(表 2)。ND₂ 基因的反应体系 (40 μL): DNA 模板 2 μL, 10×Buefer (含 Mg²⁺) 4 μL, dNTP 3.2 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL, Tag DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.6 μL, 灭菌双蒸水 28.6 μL。扩增条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 1 min, 46℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 10 min。16S rRNA 基因反应体系 (40 μL): DNA 模板 2 μL, 10×Buefer (含 Mg²⁺) 4 μL, dNTP 3.2 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 0.8 μL, Tag DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.6 μL, 灭菌双蒸水 28.6 μL。扩增条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 10 min。

表 1 实验用蜜蜂样本及采集地点

Table 1 Honeybee samples and locations for mtDNA analysis

种群 Populations	代码 Code	群数 Number of colonies	采样地点 Location
山西东方蜜蜂 1 A. c. in Shanxi1	SXTG	5	山西太谷 Taigu, Shanxi
山西东方蜜蜂 2 A. c. in Shanxi2	SXZQ	1	山西左权 Zuoquan, Shanxi
山西东方蜜蜂 3 A. c. in Shanxi3	SXQY	5	山西沁源 Qinyuan, Shanxi
山西东方蜜蜂 4 A. c. in Shanxi4	SXQS	5	山西沁水 Qinshui, Shanxi
吉林东方蜜蜂 1 A. c. in Jilin1	JLHN	5	吉林辉南 Huinan, Jilin
吉林东方蜜蜂 2 A. c. in Jilin2	JLAT	5	吉林安图 Antu, Jilin
吉林东方蜜蜂 3 A. c. in Jilin3	JLHD	5	吉林桦甸 Huadian, Jilin
云南东方蜜蜂 1 A. c. in Yunnan1	YNKM	5	云南昆明 Kungming, Yunnan
云南东方蜜蜂 2 A. c. in Yunnan2	YNBS	1	云南宝山 Baoshan, Yunnan
云南东方蜜蜂 3 A. c. in Yunnan3	YNXSN	4	云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan
四川东方蜜蜂 1 A. c. in Sichuan1	SCJZ	3	四川九寨 Jiuzhai, Sichuan
四川东方蜜蜂 2 A. c. in Sichuan2	SCYB	3	四川宜宾 Yibin, Sichuan
四川东方蜜蜂 3 A. c. in Sichuan3	SCMEK	1	四川马尔康 Maerkang, Sichuan
海南东方蜜蜂 A. c. in Hainan	HNHK	5	海南海口 Haikou, Hainan
福建东方蜜蜂 A. c. in Fujian	FJFZ	5	福建福州 Fuzhou, Fujian

山东东方蜜蜂 <i>A. c.</i> in Shandong	SDFX	3	山东费县 Feixian, Shandong
甘肃东方蜜蜂 <i>A. c.</i> in Gansu	GSTS	2	甘肃天水 Tianshui, Gansu
广东东方蜜蜂 <i>A. c.</i> in Guangdong	GDGZ	1	广东广州 Guangzhou, Guangdong
广西东方蜜蜂 <i>A. c.</i> in Guangxi	GXQZ	5	广西钦州 Qinzhou, Guangxi

表 2 实验用引物序列
Table 2 Primer sequences for research

基因 Gene	引物名称 Primers name	引物序列 (5 ' - 3 ') Primer sequences
ND ₂	ILE	TGATAA AAGAAATATTTTGA
	L2	TGA AACTATTATATAAATTG
16S rRNA	16SmF	TTATTCACCTGTTTATCAAAACAT
	16S1R	TATAGATAGAAACCAAYCTG

将 PCR 产物切胶回收并克隆, 其产物送北京六合华大基因公司进行双向测序。

1.3 序列分析

利用 DNAMAN 对测序后序列拼接, 同时根据测序峰图手工校正序列, 确保序列的准确性。利用 DNASTar 软件包和 MEGA4.0 分析序列的碱基组成、蛋白组成、序列相似性以及核酸和蛋白变异位点。采用 UPGMA 法构建系统发育树, 采用 Bootstrap test 估计系统发育树的可靠性, 复制数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 tRNA^{Ile}~ND₂ 基因部分序列及氨基酸序列

经 PCR 扩增、克隆和测序, 获得了中国境内 19 个地区的东方蜜蜂 tRNA^{Ile}~ND₂ 基因部分序列, 序列长度为 471~474 bp, 包括 tRNA^{Ile} 基因部分序列 (1~52 bp/53 bp/55 bp) 和 NADH 脱氢酶 II 基因 (长度均为 418 bp)。tRNA^{Ile} 基因部分序列差异源自碱基的插入或缺失。本序列测序结果已在 GenBank 登录, 登录号分别为 KF663574~KF663592。序列中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 38.5%、45.7%、9.6%和

6.3%。其中 A+T 含量为 84.2%, G+C 含量为 15.9%, 呈明显的 AT 偏倚。19 个序列中海南海口与福建福州的相似性最低, 为 92.7%; 云南昆明与云南西双版纳的相似性最高, 为 97.9%; 其他地区序列相似性介于 94.0%~97.7%之间 (图 1)。海南海口和甘肃天水的序列分歧度最高, 为 2.4; 其他介于 0~2.2 之间 (图 1)。

如图 2 和表 3 所示, 在所得到的 19 个序列中共发现 19 个变异位点, 其中转换 14 个, 颠换 2 个; 转换 / 颠换为 7 : 1; 碱基插入和缺失位点 3 个。有 5 个变异位点发生在非编码区, 其余 13 个位点发生在编码区 (ND₂ 基因), 碱基的插入和缺失位点只存在于非编码区。

ND₂ 基因部分编码区域的氨基酸使用频率统计显示: 19 个序列中氨基酸平均含量最高的是异亮氨酸 (Ile), 为 17.27%, 最低的是半胱氨酸 (Cys) 和精氨酸 (Arg), 均为 0。氨基酸序列比对结果显示, 19 个序列中共出现 1 个氨基酸变异位点, 即山西沁源 88 位点上的氨基酸由 Q (谷氨酰胺) →K (赖氨酸), 是由于编码区 262 位上的碱基颠换引起的 (CAA→AAA) (图 3)。

收稿日期：2013-09-28，接受日期：2014-01-09

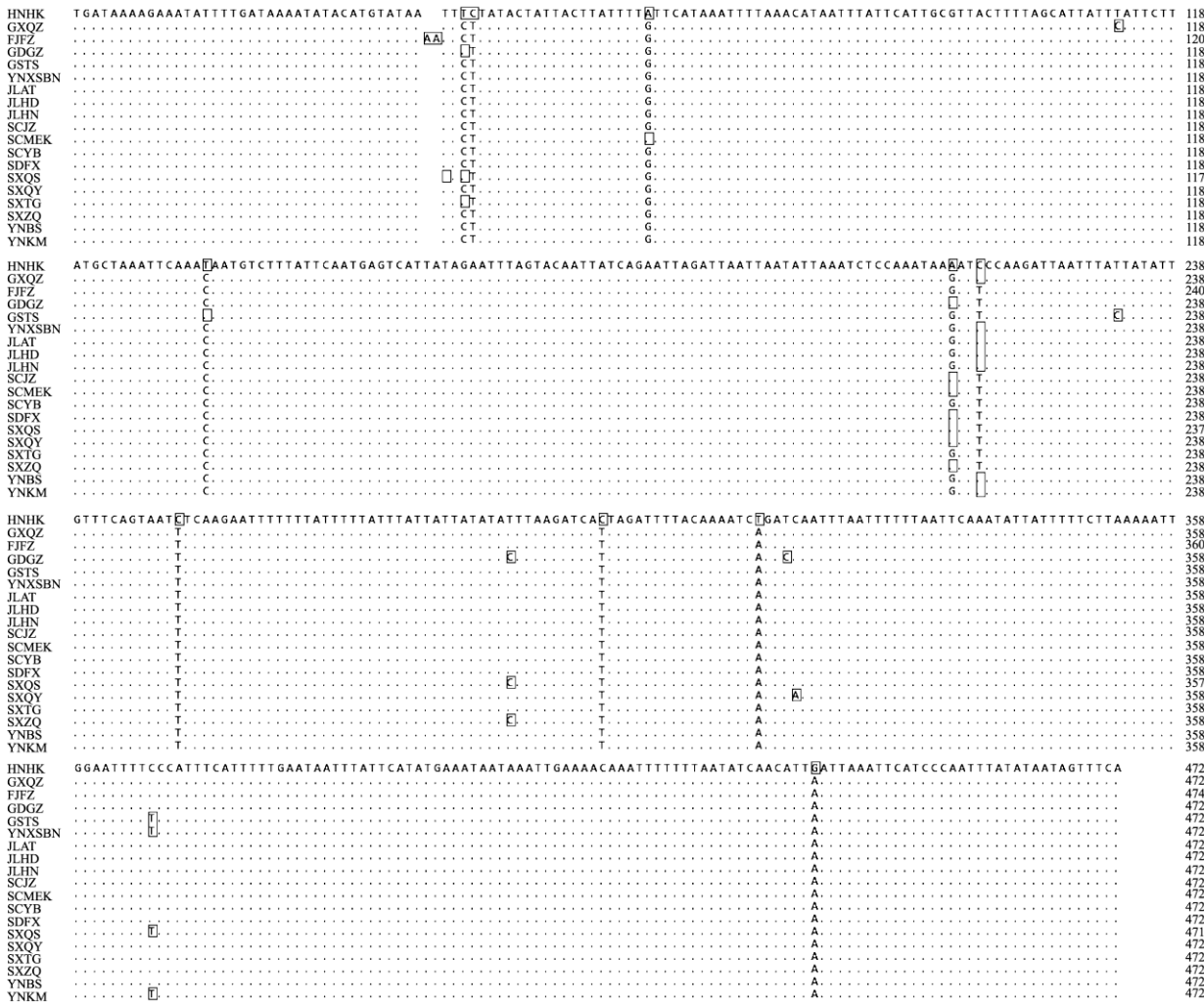


图 2 19 个地区东方蜜蜂 tRNA^{Ile}~ND₂ 基因部分序列比对结果

Fig. 2 Alignment results of partial sequence of tRNA^{Ile}-ND₂ gene of 19 different locations

注：图中方框内碱基为变异位点，图 5 同。

The bases inside the box are the variation sites, the same for Fig.5.

表 3 tRNA^{Ile}~ND₂ 基因部分序列变异位点

Table 3 Variation sites of tRNA^{Ile}-ND₂ gene partial sequences

突变类型 Mutation types	碱基变异 Bases variations	位点 Sites	种群 Populations
转换 Transition	T→C	44	HNHNK
		114	GXQZ
		219	HNHNK, GXQZ, JLHD, JLHN, JLAT, YNBS, YNKM, YNXSBN
		234	GSTS
		252	HNHNK
		288	GDGZ, SXQS, SXZQ
		298	HNHNK

		318	GDGZ
续表 3 (Table 3 continued)			
突变类型 Mutation types	碱基变异 Bases variations	位点 Sites	种群 Populations
颠换 Transversion	C→T	43	HNHK, GDGZ, SXQS, SXTG
		135	HNHK, GSTS
		369	GSTS, SXQS, YNKM, YNXSBN
	G→A	63	HNHK, SCMEK
		216	HNHK, GDGZ, SCJZ, SDFX, SXQS, SXQY, SXZQ, SCMEK
	A→G	441	HNHK
	A→T	315	HNHK
	C→A	319	SXQY
插入 Insertion	A	39	FJFZ
	A	40	FJFZ
缺失 Deletion	T	41	SXQS

HNHK	MLFMNFKHNLFIALLLALFILLMLNSNNVFIQWIMEFSTIISISLINIKSPNKIPSLIYYIVSVISSIFL	70
GXQZ		70
FJFZ		70
GDGZ		70
GSTS		70
YNXSBN		70
JLAT		70
JLHD		70
JLHN		70
SCJZ		70
SCMEK		70
SCYB		70
SDFX		70
SXQS		70
SXQY		70
SXTG		70
SXZQ		70
YNBS		70
YNKM		70
HNHK	FLFIIMYLSLDFTKSDQFNFLIQMLFFLKI GIPFHFWMISYEMMNWKQIFLMS TLI KFIPIYMMVS	139
GXQZ		139
FJFZ		139
GDGZ		139
GSTS		139
YNXSBN		139
JLAT		139
JLHD		139
JLHN		139
SCJZ		139
SCMEK		139
SCYB		139
SDFX		139
SXQS		139
SXQY		139
SXTG		139
SXZQ		139
YNBS		139
YNKM		139

图 3 19 个地区东方蜜蜂 ND₂ 基因部分蛋白序列比对结果Fig. 3 Alignment results of partial protein sequence of ND₂ gene of 19 different locations

2.2 16S rRNA 基因序列

经 PCR 扩增、克隆和测序后获得了中国境内 19 个地区的东方蜜蜂 16S rRNA 基因的部分序列, 长度为 581~585 bp。序列差异主要是由于碱基的插入和缺少造成的。本序列测序结果已在 GenBank 上登录, 登录号分别为 KF572594 ~ KF572612。序列中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 37.3%、38.5%、9.4%和 14.8%。其中 A+T 的含量为 75.8%, G+C 含量为 24.2%。碱基组成呈现一定的 AT 偏倚。19 个地区东方蜜蜂的序列中, 四川宜宾、吉林安图和吉林桦甸的相似性最低, 为 97.9%; 福建福州、广东广州、甘肃天水、广西钦州、山西沁水和山西沁源与其他大部分地区的相似性为 100%; 其余地区的序列相似性介于 98.1%~99.8% (图 4)。海南海口与其他 18 个地区的序列分歧度为 0.2, 其他地区间均为 0 (图 4)。

通过对 19 个地区的序列进行比对, 共发现 6 个变异位点, 其中碱基转换位点 1 个, 碱基插入位点 4 个, 碱基缺失位点 1 个。如图 5 所示, 海南海口的 34 位上 G→A 转换; 吉林辉南、吉林安图和吉林桦甸在 271 和 272 位上分别插入一

个 A, 吉林辉南和山东费县在 371 位上插入一个 T, 四川宜宾在 371 和 372 位上分别插入一个 T; 云南保山和云南西双版纳在 370 位上缺失了一个 T。

2.3 系统发育分析

以本研究所获得的中国境内 19 个地区东方蜜蜂线粒体 tRNA^{Ile} ~ ND₂ 与 16S rRNA 基因的部分序列, 与来自 GenBank 数据库中已有的蜜蜂属中相关种及亚种的同源序列进行比对, 采用 UPGMA 法分别构建系统发育树 (图 6, 图 7)。

基于 tRNA^{Ile} ~ ND₂ 部分基因序列所构建的系统发育树 (图 6) 可以看出, 共有 4 个大的分支, 其中沙巴蜂、泰国东方蜜蜂、海南东方蜜蜂各为一个分支, 越南东方蜜蜂、尼泊尔东方蜜蜂和我国其他 18 个地区的东方蜜蜂为一大分支。

通过序列比对发现 16S rRNA 基因在种内比较保守, 因此未选择其他蜂种作为外群。基于本研究所获得的 16S rRNA 部分基因序列所构建的系统发育树 (图 7) 可以看出, 海南海口的东方蜜蜂为一个单独的分支, 其余 18 个地区的东方蜜蜂为一个分支。

		Percent identity																				
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
	1		99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.1	99.1	98.3	100.0	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	1	YNXSBN
	2	0.0		99.1	99.1	99.1	99.1	99.0	98.3	98.3	98.3	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	100.0	99.1	2	FJFZ
	3	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.8	99.1	99.1	98.3	100.0	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	3	GDGZ
	4	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.8	99.1	99.1	98.3	100.0	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	4	GSTS
	5	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.8	99.1	99.1	98.3	100.0	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	5	GXQZ
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.8	99.1	99.1	98.3	100.0	99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	6	HNHK
	7	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		99.0	99.0	98.1	99.8	99.0	99.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.0	99.8	7	JLAT
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2		100.0	99.1	99.1	97.9	98.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.3	99.1	8	JLHD
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0		99.1	99.1	97.9	98.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.3	99.1	9	JLHN
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0		98.3	98.1	99.1	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	10	SCJZ
	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0		99.1	99.1	100.0	100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	11	SCMEK
	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0		99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	12	SCYB
	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	13	SDFX
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.1	100.0	14	SXQS
	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.1	100.0	15	SXQY
	16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.1	100.0	16	SXTG
	17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.1	100.0	17	SXZQ
	18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.1	18	YNBS
	19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		19	YNKM
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		

图 4 19 个 16S rRNA 部分序列分歧度和相似性矩阵

Fig. 4 Sequence divergence and Percent identity of 19 partial sequences for 16S rRNA

* 资助项目：山西省留学管理委员会办公室基金（2010043）

**E-mail: tshibm@163.com

***通讯作者，E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期：2013-09-28，接受日期：2014-01-09

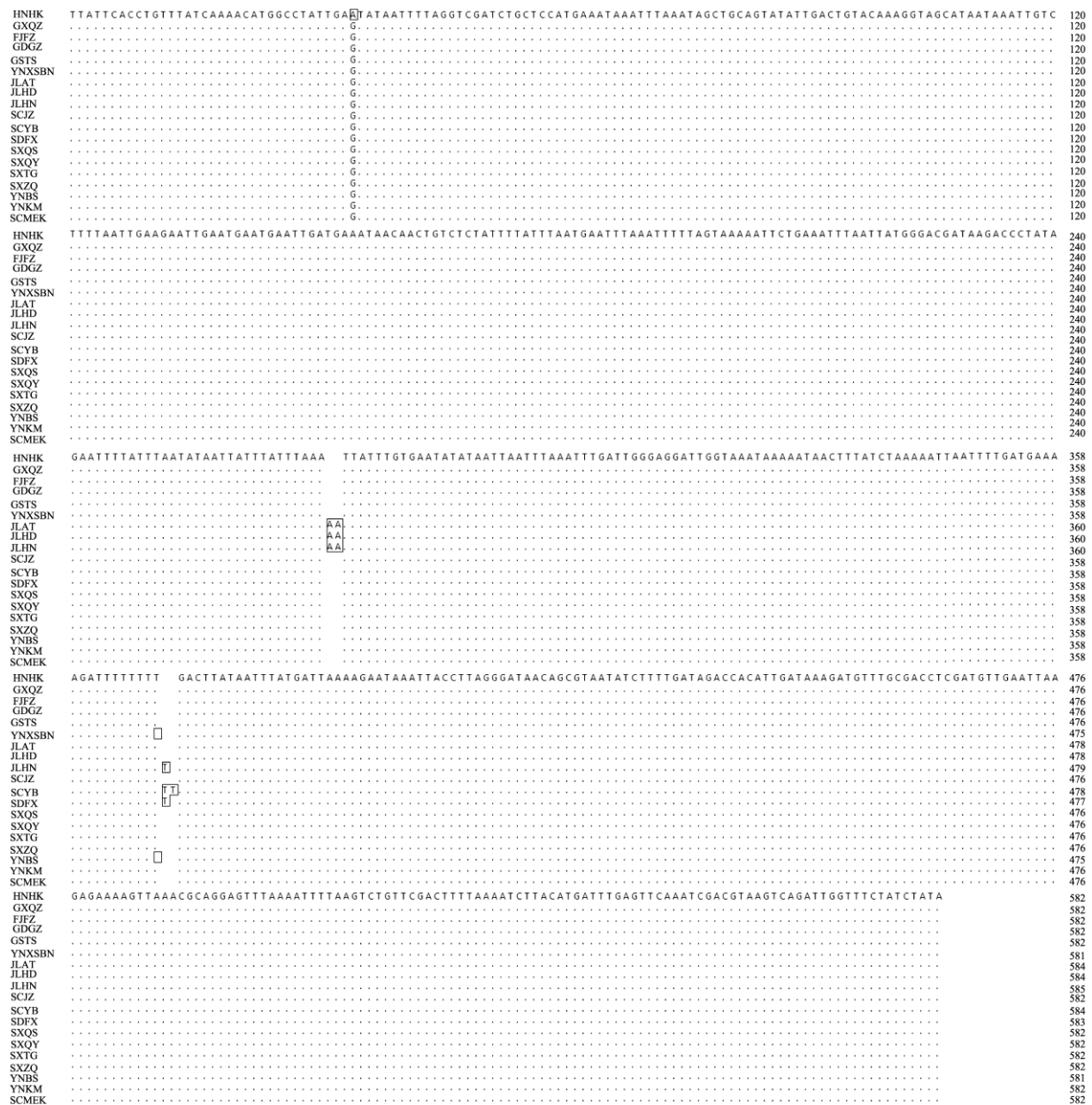


图 5 19 个地区东方蜜蜂 16S rRNA 基因部分序列比对结果
Fig. 5 Alignment results of partial sequence of 16S rRNA gene of 19 different locations

3 讨论

3.1 关于海南东方蜜蜂的分类地位

杨冠煌等 (1986) 依据形态学测定结果 , 将分布于我国海南省的东方蜜蜂作为一个新的亚种 , 定名为海南亚种 *Apis cerana hainana*

(Yang)。谭昱等 (2004a) 对海南岛的东方蜜蜂进行形态学测定后 , 把海南东方蜜蜂归为东方蜜蜂印度亚种。姜玉锁等 (2007a , 2007b) 根据基因组 DNA 的 AFLP 分析和线粒体 tRNA^{leu} ~ CO II 基因扩增和序列分析 , 均认为海南东方蜜

蜂是一个独特的类群,支持形态学认定的海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的新亚种。赵慧婷等(2008)

采用 RAPD 对中国境内 8 个省市的 28 群东方蜜

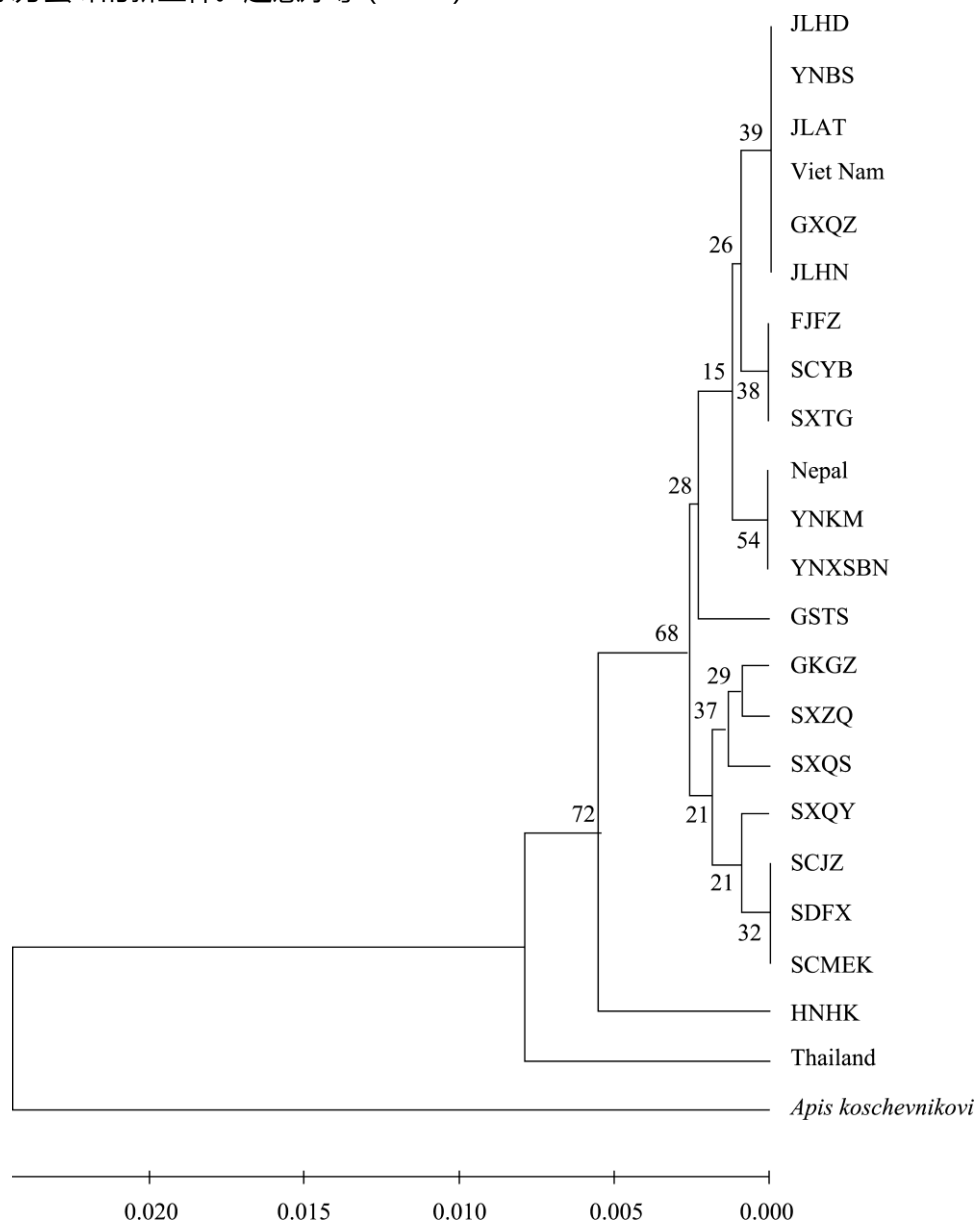


图 6 基于 tRNA^{Ile}~ND₂ 部分基因序列以 UPGMA 法所构建的系统发育树

Fig. 6 The phylogenetic tree reconstructed by UPGMA using the tRNA^{Ile}-ND₂ gene partial sequences

注:外群的 GenBank 登录号分别为沙巴蜂 (AY_712677), 越南东方蜜蜂 (AY_849569), 泰国东方蜜蜂 (AY_849566) 和尼泊尔东方蜜蜂 (AY_849568)。

The accession number of outgroup are *Apis koschevnikovi* (Buttel-Reepen)(AY_712677), *A. c.* in Viet Nam (AY_849569), *A. c.* in Thailand (AY_849566) and *A. c.* in Nepal, respectively.

蜂研究后认为,海南东方蜜蜂与其他地区的遗传距离较远,但群体内遗传相似度较高,是一个较

为特殊的群体。

全新世早期,随着海平面的上升,海南岛与

大陆分离,加之长期温暖湿润的气候条件,形成了海南岛独特的生物多样性特点(颜家安, 2006)。从本研究所获得的 19 个地区的东方蜜蜂 tRNA^{Ile} ~ ND₂和 16S rRNA 部分基因序列中可以

看出,分布于海南的东方蜜蜂与其他 18 个地区的东方蜜蜂差异最大。tRNA^{Ile} ~ ND₂ 序列的 19 个

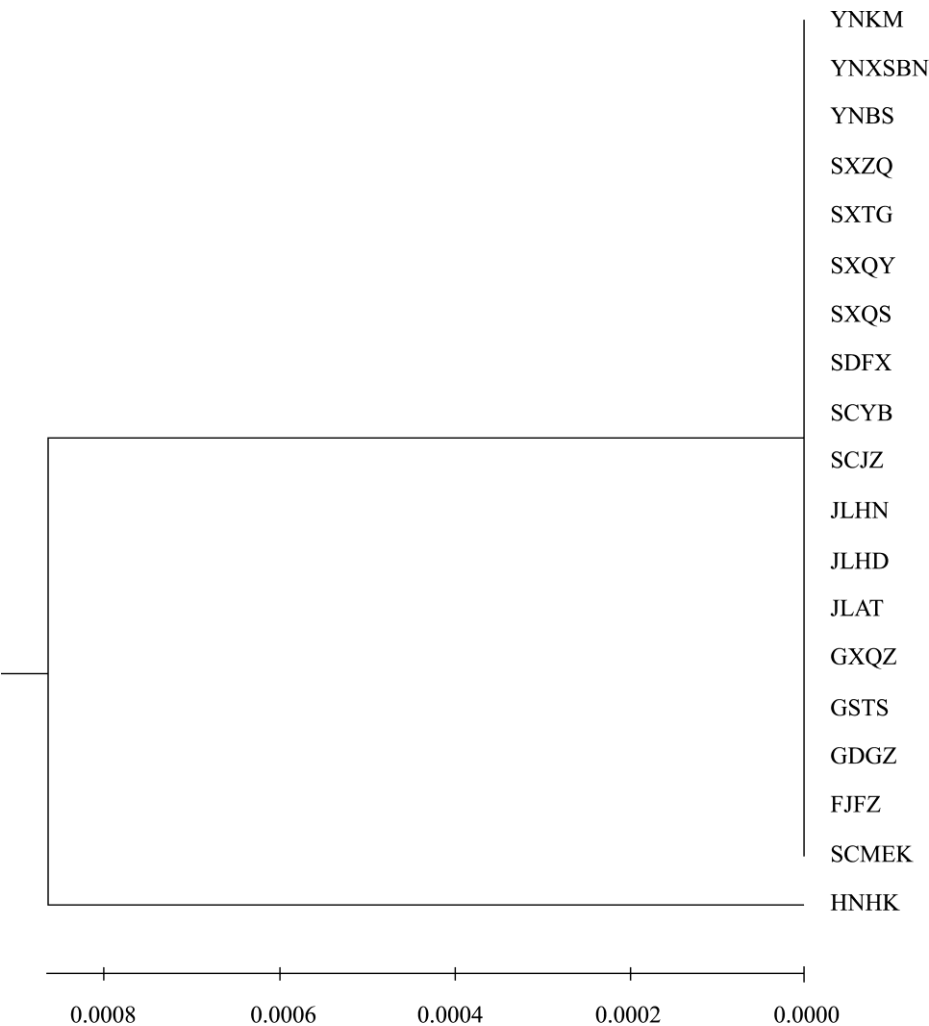


图 7 基于 16S rRNA 部分基因序列以 UPGMA 法所构建的系统发育树

Fig. 7 The phylogenetic tree reconstructed by UPGMA using the 16S rRNA gene partical sequences

变异位点中,海南海口的东方蜜蜂占 10 个,其中,转换位点 9 个,颠换位点 1 个。16S rRNA 基因部分序列 6 个变异位点中,只有海南海口的 1 个位点发生了碱基转换,其余均为插入和缺失位点。基于 tRNA^{Ile} ~ ND₂和 16S rRNA 部分基因序列构建的系统发育树结果均显示,海南东方蜜蜂也明显区别于其他 18 个地区的东方蜜蜂。这

可能是由于长期的地理隔离和特殊的气候条件,使得海南东方蜜蜂与大陆东方蜜蜂间的缺乏基因交流,进而形成了比较特殊的类群。

3.2 关于阿坝地区东方蜜蜂的分类地位

杨冠煌等(1986)依据形态学测定结果,将分布于我国四川西北部阿坝地区及青海东部和

甘肃南部的东方蜜蜂作为一个新的亚种,定名为阿坝亚种 *Apis cerana abansis* (Yang)。杨冠煌等(1995)通过同工酶电泳测定方法证实了阿坝蜜蜂是东方蜜蜂新亚种。谭垦等(2005)认为中国东方蜜蜂分为5个地理类型,其中阿坝中蜂为一个地理类型。

四川省阿坝藏族羌族自治州马尔康县是阿坝亚种的分布区中心(孙福勇等,2009)。本研究基于 $tRNA^{Ile} \sim ND_2$ 序列构建的系统发育树表明,来自阿坝地区马尔康和九寨沟的东方蜜蜂与山东费县和山西沁源的东方蜜蜂亲缘关系较近。从 $tRNA^{Ile} \sim ND_2$ 基因部分序列比对结果来看,四川马尔康有两个转换位点,四川九寨沟有一个转换位点,山东费县有一个位点发生转换,山西沁源有一个转换位点和一个颠换位点。19个地区的 ND_2 基因部分蛋白比对结果显示,仅山西沁源有一个氨基酸位点发生突变,其余18个地区突变位点均为无义突变。四川马尔康、四川九寨沟、山东费县和山西沁源均位于海拔较高,其中山东费县和山西沁源海拔均在1 000 m以上,马尔康和九寨沟均在2 000 m以上。由此可以推断,这四个地区的东方蜜蜂可能是由于高海拔地区特殊的地理和气候等条件经过长期自然选择的结果,属于高海拔地区的一种生态型。本研究结论并未支持杨冠煌等(1986,1995)依据形态学和同工酶分析将阿坝地区的东方蜜蜂作为一个独立亚种的结论。

3.3 关于吉林和云南东方蜜蜂的分类地位

谭垦等(2004b)依据形态学分析认为,分布于吉林长白山地区的东方蜜蜂形态上接近日本和韩国的东方蜜蜂。高鹏飞等(2008)对我国10个省市的21群东方蜜蜂的线粒体 *cytb* 基因片段所作的序列分析显示,吉林三个地区的东方蜜

蜂与其他地区东方蜜蜂的差异很高,形成了一个独特的生态型。张春香等(2011)采用 AFLP 分子标记对中国境内10个省的东方蜜蜂研究后认为,吉林东方蜜蜂可能为一个独特的生态型。

从 $tRNA^{Ile} \sim ND_2$ 基因部分序列比对来看,来自吉林三个地区的东方蜜蜂均在同一个位点发生转换,从16S rRNA 基因部分序列比对来看,这三个地区均在同一位置插入两个A。基于 $tRNA^{Ile} \sim ND_2$ 基因部分序列构建的系统发育树表明,这三个地区的东方蜜蜂亲缘关系较近。本研究结果表明,来自吉林三个不同地区的东方蜜蜂与其他地区相比均表现出了一定的特异性,可能属于一个生态型。这与高鹏飞等(2008)和张春香等(2011)的研究结论一致。由于本研究缺乏来自于日本和韩国的蜜蜂样本及数据。因此,有关吉林东方蜜蜂的分类地位,还有待进一步研究。

杨冠煌等(1986)通过形态学特征分析将云南西双版纳的东方蜜蜂归为印度亚种。匡邦郁和李有泉(1990)认为分布于云南西北部的东方蜜蜂属于西藏亚种,分布于云南西南部的东方蜜蜂属于印度亚种。董霞等(2001)利用随机扩增多态DNA的方法对云南东方蜜蜂遗传多样性进行了研究,结果表明云南东方蜜蜂具有丰富的遗传多样性。谭垦等(2003)利用形态测定法对云南东方蜜蜂研究后发现,云南东方蜜蜂总体分为南方和北方两大类群;云南地区是亚洲东方蜜蜂分布的“交混区”和“分化区”。李华等(2012)通过对云南东方蜜蜂的形态特征分析,认为云南中西部地区是云南境内两大东方蜜蜂的过渡地带。

从 $tRNA^{Ile} \sim ND_2$ 基因部分序列比对来看,来自云南省三个地区的东方蜜蜂变异位点非常相似,三个地区有一个共同的转换位点,云南昆

明和云南西双版纳有两个相同的转换位点。从 16S rRNA 基因部分序列比对来看, 云南保山和云南西双版纳在同一位点共同缺失一个 T。基于 tRNA^{Ile} ~ ND₂ 基因部分序列构建的系统发育树表明, 云南昆明、云南西双版纳和尼泊尔的东方蜜蜂的亲缘关系很近, 而云南保山的东方蜜蜂与越南和吉林的亲缘关系较近。这表明云南西双版纳东方蜜蜂可能与南部尼泊尔的为一个类群。云南保山的东方蜜蜂与南部的越南、东部的广西和遥远北部的吉林为一类, 说明云南东方蜜蜂变异比较丰富。该结论与董霞等 (2001)、谭昱等 (2003) 和李华等 (2012) 研究结论基本一致。由于该研究中缺乏来自于西藏和云南南部其他地区的样本及相关数据, 未能进一步验证杨冠煌等 (1986) 与匡邦郁和李有泉 (1990) 的结论。

参考文献 (References)

- Arias MC, Sheppard WS, 1996. Phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(3): 557–566.
- Arias MC, Sheppard WS, 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1): 25–35.
- Cameron SA, Derr JN, Austin AD, Wharton RA, 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera: a review. *Hymenop. Res.*, 25(24): 4876–4882.
- Damus MS, Otis GW, 1997. A morphometric analysis of *Apis cerana* F and *Apis nigrocincta* Smith populations from southeast Asia. *Apidologie*, 28(5): 309–323.
- Ilyasov RA, Kutuev IA, Petukhov AV, 2011. Phylogenetic relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and west European populations. *Journal of Apicultural Science*, 55(1): 67–75.
- Irfan K, Marina DM, Ayca O, Walter SS, 2006. Genetic characterization of honey bee (*Apis mellifera cypria*) populations in northern Cyprus. *Apidologie*, 37(5): 547–555.
- Maa TC, 1944. On the classification and phylogeny of the Chinese honey bees (Abstr.) *Ento-mol. Shaowuanna*, 1: 4–5.
- Ruttner F, 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin: Springer-Verlag. 1–284.
- Sheppard WS, Meixner MD, 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34(4): 367–375.
- Smith DR, Hagen RH, 1996. The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 69(4 suppl.): 294–310.
- Sittipraneed S, Sihanuntavong D, Klinbunga S, 2011. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand revealed by polymorphism of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. *Insectes Sociaux*, 48(3): 266–272.
- Tan K, Meixner MD, Fuchs S, Zhang X, He S, Kandemir I, Sheppard WS, Koeniger N, 2006. Geographic distribution of the eastern honeybee, *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae), across ecological zones in China: morphological and molecular analyses. *Systematics and Biodiversity*, 4(4): 473–482.
- 董霞, 史宪伟, 张炫, 禹一川, 吴世芳, 陈永久, 张亚萍, 2001. 云南东方蜜蜂随机扩增多态 DNA 研究. *蜜蜂杂志*, (8): 3–5.
- [DONG X, SHI XW, ZHANG X, YU YC, WU SF, CHEN YJ, ZHANG YP, 2001. Genetic Diversity Detected by RAPD in Yunnan *Apis cerana*. *Journal of Bee*, (8): 3–5.]
- 高鹏飞, 赵慧婷, 张春香, 姜玉锁, 2008. 基于线粒体 Cytb 基因部分序列的中国东方蜜蜂不同地理种群的系统发育分析. *动物学报*, 54(6): 1005–1013.
- [GAO PF, ZHAO HT, ZHANG CX, JIANG YS, 2008. Phylogeny of different geographic populations *Apis cerana* in China based on mtDNA cytochrome *b* gene sequences. *Acta Zoologica Sinica*, 54(6): 1005–1013.]
- 龚一飞, 张其康, 2000. 蜜蜂分类与进化. 福州: 福建科学技术出版社. 1–69.
- [GONG YF, ZHANG QK, 2000. The Classification and Evolution of Bee. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 1–69.]
- 姜玉锁, 刘文忠, 张春香, 乔丽英, 朱文进, 张桂贤, 2007a. 中国境内不同地理型东方蜜蜂遗传多样性的 AFLP 分析. *昆虫学报*, 50(2): 144–152.
- [JIANG YS, LIU WZ, ZHANG CX, QIAO LY, ZHU WJ, ZHANG GX, 2007a. AFLP analysis of genetic diversity of *Apis cerana* Fabricius distributed in different geographic areas in China. *Acta Entomologica Sinica*, February, 50(2): 144–152.]
- 姜玉锁, 赵慧婷, 姜俊兵, 曹果清, 张桂贤, 朱文进, 郭传甲, 2007b. 中国境内不同地理型东方蜜蜂线粒体 DNA tRNA^{leu} ~ CO II 基因多态性研究. *中国农业科学*, 40(7): 1535–1542.

- [JIANG YS, ZHAO HT, JIANG JB, CAO GQ, ZHANG GX, ZHU WJ, GUO CJ, 2007b. Studies on mtDNA tRNA^{Leu} ~ CO II Gene Polymorphisms of *Apis cerana* Distributed in Different Geographic Areas in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 40(7): 1535-1542.]
- 匡邦郁, 李有泉, 1990. 云南东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 的研究. 云南农业大学学报, 4(5): 224-229.
- [KUANG BY, LI YQ, 1990. Study on Subspecies of *Apis cerana* Fabricius. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 4(5): 224-229.]
- 李华, 胡宗文, 汪正威, 庄迪, 杨爽, 谭垦, 和绍禹, 2012. 云南省中西部地区东方蜜蜂形态特征研究. 云南农业大学学报, 27(4): 611-615.
- [LI H, HU ZW, WANG ZW, ZHUANG D, YANG S, TAN K, HE SY, 2012. Morphologic Study on *Apis cerana* in Middle and Northwest of Yunnan Province. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 27(4): 611-615.]
- 刘新宇, 高崇东, 2009. 中蜂保护与高效养殖. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社. 1-282.
- [LIU YX, GAO CD, 2009. Protection and High Effective Raising of the Chinese bee. Yangling: North West Agriculture and Forestry University Press, 1-282.]
- 糜佳霖, 谭垦, 2007. 中国东方蜜蜂分类研究结果和进展. 中国蜂业, 58(7): 13-16.
- [MI JL, TAN K, 2007. Research Progress of *Apis cerana* Taxonomy in China. *Apiculture of China*, 58(7): 13-16.]
- 孙福勇, 王维春, 罗金宝, 2009. 阿坝蜜蜂的生态分布与品种特点. 中国蜂业, 60(7): 25.
- [SUN FY, WANG WC, LUO JB, 2009. The Ecological Distribution and Variety Characteristics of *Apis cerana abanisis*. *Apiculture of China*, 60(7): 25.]
- 谭宏伟, 董霞, 和绍禹, 2009. 云南省东方蜜蜂线粒体 16S rRNA 基因的扩增及序列分析. 云南农业大学学报, 24(3): 403-407.
- [TAN HW, DONG X, HE SY, 2009. Amplification and Sequence Analysis of the Mitochondrial 16S rRNA Gene of *Apis cerana* from Yunnan Province. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 24(3): 403-407.]
- 谭垦, 张炫, 和绍禹, 张丹银, 2003. 云南东方蜜蜂的形态特征数值分类研究. 中国养蜂, 54(3): 4-6.
- [TAN K, ZHANG X, HE SY, ZHANG DY, 2003. Morphometric and Biogeography of Yunnan *A. cerana*. *Apiculture of China*, 54(3): 4-6.]
- 谭垦, 和绍禹, 刘意秋, 2004a. 海南东方蜜蜂的形态分类研究. 蜜蜂杂志, 11: 3-4.
- [TAN K, HE SY, LIU YQ, 2004a. Study on morphological classification of *Apis cerana* in Hainan. *Journal of Bee*, 11: 3-4.]
- 谭垦, 葛凤晨, 赵蓉, 和绍禹, 2004b. 长白山东方蜜蜂形态特征研究. 蜜蜂杂志, 6: 8-9.
- [TAN K, GE FC, ZHAO R, HE SY, 2004b. Morphometric Study of *Apis cerana* in Changbai Mountain. *Journal of Bee*, 6: 8-9.]
- 谭垦, 张炫, 和绍禹, 张丹银, 2005. 中国东方蜜蜂形态学及生物地理学研究. 云南农业大学学报, 20(3): 410-414.
- [TAN K, ZHANG X, HE SY, ZHANG YD, 2005. Morphology and Biogeography of *Apis cerana*(Fabr.) in the China. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 20(3): 410-414.]
- 徐新建, 周冰峰, 朱翔杰, 吴显达, 2009. 东方蜜蜂线粒体应用进展. 中国蜂业, 60(5): 5-8.
- [XU XJ, ZHOU BF, ZHU XJ, WU XD, 2009. Progress on Mitochondrial DNA Application in *Apis cerana*. *Apiculture of China*, 60(5): 5-8.]
- 杨冠煌, 1984. 中华蜜蜂资源调查. 中国养蜂, 3: 4-7.
- [YANG GH, 1984. The Resources Investigation of the Chinese bee (*Apis cerana cerana*). *Apiculture of China*, 3: 4-7.]
- 杨冠煌, 许少玉, 匡邦郁, 刘宜细, 1986. 东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabr. 在我国的分布及其亚种分化. 云南农业大学学报, 1(1): 89-92.
- [YANG GH, XU SY, KUANG BY, LIU YX, 1986. The Distribution of The Genus *Apis cerana* Fab. In China and Some of Its Subspecies. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 1(1): 89-92.]
- 杨冠煌, 林桂莲, 孙庆海, 韩胜明, 1995. 东方蜜蜂 *Apis cerana* Fab. 在四川西北高原的分布、变异和特性考察. 中国农业科学, (28): 202-206.
- [YANG GH, LIN GL, SUN QH, HAN SM, 1995. The Distribution, Morphological Variation and Behavior of Chinese Honeybee in Northwestern Plateau of Sichuan Province. *Scientia Agricultura Sinica*, (28): 202-206.]
- 颜家安, 2006. 海南岛第四纪古生物及生态环境演变. 古地理学报, 8(1): 103-115.
- [YAN JA, 2006. Paleontology and ecologic environmental evolution of the Quaternary in Hainan Island. *Journal of Palaeogeography*, 8(1): 103-115.]
- 张春香, 张学锋, 陈廷珠, 滕跃中, 刘文忠, 姜玉锁, 2011. 基于 AFLP 技术的 12 个蜜蜂种群遗传多样性分析. 中国农业科学, 44(18): 3877-3885.
- [ZHANG CX, ZHANG XF, CHEN TZ, TENG YZ, LIU WZ, JIANG YS, 2011. Analysis of Genetic Diversity in Twelve Honeybee Populations Based on AFLP Technique. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(18): 3877-3885.]

赵慧婷, 高鹏飞, 姜玉锁, 杨桂英, 陈廷珠, 2008. 中国东方蜜蜂
不同地理种群的 RAPD 分析. 动物分类学报, 33(1): 89–96.
[ZHAO HT, GAO PF, JIANG YS, YANG GY, CHEN TZ, 2008.

RAPD Analysis among Different Populations of *Apis cerana* in
China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 33(1): 89–96.]