

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

姜玉锁¹, 赵慧婷¹, 姜俊兵¹, 曹果清¹, 张桂贤¹, 朱文进², 郭传甲¹

(¹山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; ²河北科技师范学院动物科学系, 昌黎 066600)

摘要: 【目的】从线粒体水平上探讨中国境内不同地理型东方蜜蜂的系统发育关系, 为东方蜜蜂亚种分化的研究及我国境内东方蜜蜂资源的保护与合理开发利用提供基础资料。【方法】采用公开的 E2、H2 引物对 11 个不同地理型东方蜜蜂线粒体 DNA tRNA^{leu}~CO II 基因进行了 PCR 扩增、测序, 并利用相关软件和网站进行了序列比较分析。【结果】该序列长度为 471bp; 序列中共有 9 个位点发生变异; 序列相似性均在 99%以上; 限制性酶切分析表明: 云南保山东方蜜蜂缺少一个 Swa I 酶切位点; 部分编码蛋白序列比对表明, 海南海口和吉林安图东方蜜蜂各有一个氨基酸发生变异。与 GeneBank 上公开登录的国内外有关东方蜜蜂相关序列的比较表明, 单纯利用非编码区序列对比, 不能把日本蜜蜂同中国大陆的东方蜜蜂区别开来; CO II 基因部分序列对比显示, 东方蜜蜂的线粒体类型包括: 日本-韩国型、中国大陆型、中国台湾型、马来西亚沙巴州-印度黑色蜜蜂型、中国海南型、印度黄色蜜蜂型、泰国南部型和印度黑色蜜蜂型。【结论】中国境内不同地理型东方蜜蜂存在着较明显的遗传分化, 其中海南东方蜜蜂由于长期的海岛隔离形成了一个独特的类群, 支持了通过形态学认定的海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的一个新亚种的观点。本研究部分测序结果已在美国国家生物信息中心 (NCBI) 网站 GeneBank 上登录, 登录号为: DQ385854, DQ388602~DQ388609。

关键词: 东方蜜蜂; 线粒体 DNA; 非编码区; 细胞色素氧化酶 II; 序列分析

Studies on mtDNA tRNA^{leu}~CO II Gene Polymorphisms of *Apis cerana* Distributed in Different Geographic Areas in China

JIANG Yu-suo¹, ZHAO Hui-ting¹, JIANG Jun-bing¹, CAO Guo-qing¹, ZHANG Gui-xian¹, ZHU Wen-jin²,
GUO Chuan-jia¹

(¹College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; ²Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600)

Abstract: 【Objective】 This paper studied the phylogenetic relationship of different geographic *Apis cerana* in China as inferred from mitochondrial DNA. In order to provide the basic datum for study of the divergence among *Apis cerana* subspecies as well as to protect and rationally develop the *Apis cerana* resources in China. 【Method】 The mitochondrial DNA tRNA^{leu}~CO II gene of 11 different geographic *Apis cerana* was amplified using the reported primer pair E2/H2 and sequenced. The alignments were performed using related softwares or online. 【Result】 The length of PCR product was 471 bp. There were nine variation loci in all sequences and their similarity were more than 99%. The restriction endonuclease map showed that one Swa I site was absent in Baoshan sample. The alignment of the encoding protein sequence indicated that there was one amino acid mutation in Haikou and Antu sample respectively. Compared with the reported alignments of *Apis cerana* inside and outside of GeneBank concluded that using the sequence of the non-coding region alone was unable to discriminate Japanese bees from the bees of the mainland China. Based on the analysis of the encoding sequence of CO II gene, the mtDNA of Asian *Apis cerana* can be divided into eight types: Japan-Korean type, Mainland of China type, Chinese Taiwan type, Malaysia Sabah-India black morph type, Chinese Hainan type,

收稿日期: 2006-07-19; 接受日期: 2006-11-28

基金项目: 山西省留办基金 (2003051) 和山西省教育厅高校科技开发项目 (200337)

作者简介: 姜玉锁 (1963-), 男, 山西万荣人, 教授, 博士, 研究方向为动物分子系统发育学。Tel: 0354-6285990; E-mail: jiangys-001@163.com。
通讯作者郭传甲 (1934-), 山东泰安人, 教授, 研究方向为动物分子数量遗传学。Tel: 0354-6289295; E-mail: guochj695124@sohu.com

India yellow morph type, South Tailand type and India black morph type. 【Conclusion】 There were quite apparent hereditary divergence among different geographic *Apis cerana* in China. The bees of Hainan Island formed a distinct group gradually due to the island isolation. The result was consistent with the available morphologic appraisal that Hainan bee was a new subspecies of *Apis cerana*. Some of the sequence products have been submitted to GeneBank of NCBI and the access numbers are DQ385854, DQ388602~DQ388609.

Key words: *Apis cerana*; Mitochondrial DNA; Non-coding region; CO II; Sequence analysis

0 引言

【研究意义】在西方蜜蜂引入中国之前，分布在中国境内的东方蜜蜂是唯一可以进行人工饲养而获得产品的蜜蜂，它的传粉作用对形成中国独特的植被体系起了重要作用，其生产的蜂蜜、蜂蜡、蜂子、蜂毒等对丰富民族食谱、中医药用等具有不可磨灭的功绩^[1]。然而，由于种间竞争处于劣势，再加之数十年来自然生态条件的不断恶化，部分地区的东方蜜蜂面临着濒危的境地，保护与合理开发利用这一宝贵的蜂种资源势在必行。【前人研究进展】国内外学者就东方蜜蜂的分类存在诸多争议。Ruttner^[2]将亚洲的东方蜜蜂划分为4个亚种，即中华蜜蜂、印度蜜蜂、日本蜜蜂及喜马拉雅蜜蜂。其中中华蜜蜂分布于中国、北越、阿富汗、巴基斯坦和北印度^[2]。而中国学者认为，分布于中国境内的东方蜜蜂就有5个亚种，它们是中华亚种、藏南亚种、阿坝亚种、海南亚种和印度亚种^[1,3]。但他们均是以形态特征和地理分布为主要依据。近年来，分子遗传标记尤其是线粒体DNA标记方法在东方蜜蜂的分类、系统演化等方面得到了广泛的应用^[4-14]。研究的方法从最初的探测东方蜜蜂样本的整个线粒体基因组的限制性酶切位点，到PCR扩增线粒体基因组的片段，用限制性酶切位点或序列探寻变异，目前蜜蜂mtDNA的多个基因区域已被广泛用于分析蜜蜂不同分类水平的系统发育关系，其中非编码区(non-coding region or D-loop)和细胞色素氧化酶II(CO II)基因的应用频率最高。【本研究的切入点】迄今为止，这些研究所使用的样本主要来自南亚的印度、斯里兰卡，东南亚的泰国、菲律宾、马来西亚、印度尼西亚，以及东亚的日本、韩国和中国的台湾、香港等国家和地区，缺乏来自广大的中国大陆的东方蜜蜂样本。【拟解决的关键问题】本研究采用公开的E2、H2引物对中国境内不同地理型东方蜜蜂mtDNA tRNA^{leu}~CO II基因进行了PCR扩增、测序及序列分析，为亚洲东方蜜蜂的分类研究及中国东方蜜蜂资源的保护与合理开发利用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 东方蜜蜂样本 本实验所用东方蜜蜂样本采自中国9个省市12个地点(表)，除福建、广东、江西和北京的样本取自人工饲养的标准蜂箱外，其他均为旧法饲养的自然蜂群。每个点采1~5群蜂不等，每群随机采50~100只，放入无水乙醇(分析醇)中，置-18℃的冰箱保存至DNA提取。

1.1.2 主要仪器 PTC200型PCR扩增仪; MAXIMA型超纯净水系统; DYY-III-12B型三恒多用电泳仪; SBD50恒温水浴摇床; DYY-III型电泳槽; Z233MK-2型微型台式冷冻离心机; 凝胶成像系统(USA)。

1.1.3 主要试剂 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、十二烷基磺酸钠(SDS)、溴酚兰、二甲苯腈: 购自华美生物工程公司; Tris 饱和酚: 购自北京鼎国生物技术发展中心; 蛋白酶K(Proteinase K)、RNA酶(Rnase)为Merck公司产品; dNTP、Marker(50bpDNA ladder)、Taq DNA聚合酶、PCR产物纯化试剂盒: 购自北京天为时代科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 无水乙醇浸泡保存的蜜蜂样本于PBS溶液中浸泡24h，弃清洗液; 取蜜蜂胸部置1.5ml的离心管中，用小剪刀剪碎，加适量消化液于55℃消化过夜，然后按常规的酚/氯仿法提取总DNA，TE(pH8.0)溶解后于-20℃保存备用。

1.2.2 PCR扩增与测序 PCR扩增用引物序列^[15]为E2: 5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3'和H2: 5'-CAATATCATTGATGACC-3'。E2和H2分别位于西方蜜蜂线粒体基因组中tRNA^{leu}基因(位置3363)和CO II基因(位置3934)的5'末端^[16]。引物由上海生工合成。

反应体系(25 μl): 模板DNA 1 μl, 10×buffer(含Mg²⁺) 2.5 μl, 2.5 mmol·L⁻¹的dNTPs 2 μl, 10pmol·L⁻¹的引物0.8 μl, 2.5 U·μl⁻¹的Taq酶0.4 μl,

表 实验用蜜蜂种群、采样数量及采样地点

Table List of honeybee samples for mtDNA analysis

种群 Populations	代码 Code	群数 No. of colonies	采样地点 Location
海南东方蜜蜂 <i>A. c. hainana</i>	HNHK	5	海南海口 Haikou, Hainan
福建东方蜜蜂 <i>A. c. in Fujian</i>	FJFZ	5	福建福州 Fuzhou, Fujian
江西东方蜜蜂 <i>A. c. in Jiangxi</i>	JXNC	5	广东广州 Guangzhou, Guangdong
广东东方蜜蜂 <i>A. c. in Guangdong</i>	GDGZ	5	江西南昌 Nanchang, Jiangxi
云南东方蜜蜂 1 <i>A. c. in Yunnan1</i>	YNXSBN	4	云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan
云南东方蜜蜂 2 <i>A. c. in Yunnan2</i>	YNBS	1	云南保山 Baoshan, Yunnan
甘肃东方蜜蜂 <i>A. c. in Gansu</i>	GSTS	5	甘肃天水 Tianshui, Gansu
山西东方蜜蜂 1 <i>A. c. in Shanxi1</i>	SXQS	5	山西沁水 Qinshui, Shanxi
山西东方蜜蜂 2 <i>A. c. in Shanxi2</i>	SXZQ	1	山西左权 Zuoquan, Shanxi
北京东方蜜蜂 <i>A. c. in Beijing</i>	BJFS	5	北京房山 Fangshan, Beijing
吉林东方蜜蜂 1 <i>A. c. in Jilin1</i>	JLHD	5	吉林桦甸 Huadian, Jilin
吉林东方蜜蜂 2 <i>A. c. in Jilin2</i>	JLAT	5	吉林安图 Antu, Jilin

灭菌双蒸水 18.3 μ l。反应条件：96 $^{\circ}$ C 预变性 4 min；95 $^{\circ}$ C 30s，50 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 1.5 min，30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物纯化后，送北京奥科生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.3 序列分析 采用 DNASTar、DNAMAN、dناuser 及 BLAST 等软件，将测定的不同地理型东方蜜蜂 tRNA^{leu}~CO II 基因序列进行相似性分析、限制性酶切位点分析，以及细胞色素氧化酶 II (CO II) 部分编码序列推导性氨基酸序列分析，并通过 NCBI 网站对非编码区完全序列和细胞色素氧化酶 II (CO II) 部分序列与 GenBank 中公开的其他国家和地区东方蜜蜂 mtDNA 相应序列分别进行同源性对比，用 Treeview 软件构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以基因组 DNA 为模板，E2 和 H2 为引物，对来自中国 9 个省市 12 个地点 47 只蜜蜂进行了 PCR 扩增 (图 1)。如图所示，扩增的片段相等，大小约 500 bp。

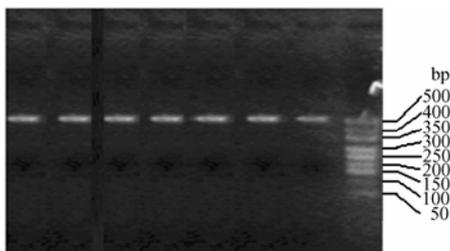


图 1 tRNA^{leu}~CO II 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR product of tRNA^{leu}~CO II gene

2.2 测序结果

本研究共对 12 个采样点的 22 只东方蜜蜂进行了测序 (每群 1 只)，其中成功测序的有 12 个样点的 15 只蜜蜂。由于海南、江西、甘肃和山西的各两个样本序列完全相同，因此参与后续序列分析的样本为 11 个。将扩增、纯化后的 tRNA^{leu}~CO II 基因双向测序并拼接。测序结果表明，该序列长度为 471 bp，包括 tRNA^{leu} 基因部分序列 (1~60 bp)、非编码区完全序列 (61~154 bp) 和细胞色素氧化酶 II (CO II) 部分序列 (155~471bp) 3 个部分。序列中 A+T 所占的比例分别是：海南海口为 83.78%，福建福州、江西南昌、广东广州和吉林桦甸为 83.65%，云南保山、云南西双版纳、山西左权、北京房山和吉林安图为 83.44%，甘肃天水为 83.42%。

2.2.1 tRNA^{leu}~CO II 基因的核苷酸序列分析 如图 2 所示，11 个样本序列中共有 9 个变异位点，其中碱基转换 (A \leftrightarrow G 或 T \leftrightarrow C) 有 8 个，颠换 (A \rightarrow T) 1 个；转换 (TS)/颠换 (TV) 为 8 : 1；无碱基插入或缺失。变异位点中有 3 个发生在非编码区，6 个发生在编码区 (CO II 基因)。非编码区的 3 个变异位点为：100 位上甘肃天水发生了 A \rightarrow G 的转换；102 位上山西左权和北京房山发生了 A \rightarrow G 的转换；142 位上云南保山发生了 T \rightarrow C 的转换。编码区 6 个变异位点为：177 位上海南海口的 G \rightarrow A 转换；216 位上吉林安图的 T \rightarrow C 转换；270 位上云南西双版纳的 A \rightarrow G 转换；375 位上甘肃天水的 A \rightarrow G 转换；424 位上吉林安图的 G \rightarrow A 转换；444 位上海南海口的 A \rightarrow T 颠换。

2.2.2 相似性分析 根据 11 个样本序列，采用 DNAMAN 软件进行相似性分析，结果如图 3。

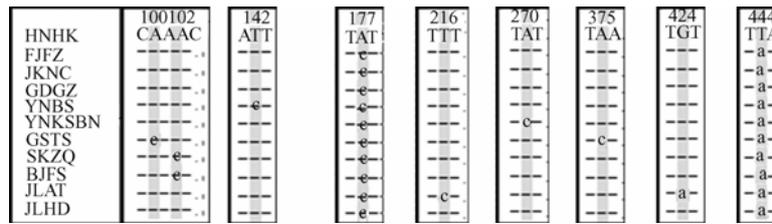


图 2 tRNA^{leu}~CO II 基因间区核苷酸序列中的变异位点

Fig. 2 Variation loci of the tRNA^{leu}~CO II region segment nucleotide sequence

从图 3 可以看出，中国境内不同地理型东方蜜蜂的相似性均在 99% 以上。其中海南海口、甘肃天水和吉林安图的相似性最低，为 99.2%；而福建福州、江

西南昌、广东广州和吉林桦甸的相似性为 100%，山西左权和北京房山的相似性也为 100%；其它的介于 99.4%~99.8% 之间。

HNHK	100%
FJFZ	99.6% 100%
JXNC	99.6% 100.0% 100%
GDGZ	99.6% 100.0% 100.0% 100%
YNBS	99.4% 99.8% 99.8% 99.8% 100%
YNXSBN	99.4% 99.8% 99.8% 99.8% 99.6% 100%
GSTS	99.2% 99.6% 99.6% 99.6% 99.4% 99.4% 100%
SXZQ	99.4% 99.8% 99.8% 99.8% 99.6% 99.6% 99.4% 100%
BJFS	99.4% 99.8% 99.8% 99.8% 99.6% 99.6% 99.4% 100.0% 100%
JLAT	99.2% 99.6% 99.6% 99.6% 99.4% 99.4% 99.2% 99.4% 99.4% 100%
JLHD	99.6% 100.0% 100.0% 100.0% 99.8% 99.8% 99.6% 99.8% 99.8% 99.6% 100%

图 3 11 个序列相似性矩阵

Fig. 3 Similarity matrix of 11 sequences

2.2.3 限制性酶切位点分析 采用 DNAMAN 软件对 11 个序列的限制性酶切位点进行分析，结果表明：序列中共有 *Aha* III 和 *Dra* I 酶切位点各 3 个；*Eco*R I 和 *Vsp* I 酶切位点各 2 个；*Bg* III、*Ssp* I、*Swa* I 和 *Mfe* I 酶切位点各 1 个。所不同的是，由于云南保山样本序列在 142 bp 处发生了转换 (T→C)，缺少了一个 *Swa* I 酶切位点 (ATTT/AAAT→ATTT/AAAC)。

2.2.4 细胞色素氧化酶 II (CO II) 部分基因编码蛋白序列比对 采用 dnauser 和 DNAMAN 软件对细胞

色素氧化酶 II (CO II) 部分基因编码蛋白序列进行比对 (图 4)。结果显示有 2 个位点发生变异：一个是海南海口东方蜜蜂，由 M (蛋氨酸)→I (异亮氨酸)，由于序列中第 177 位上碱基转换引起的 (ATG→ATA)；另一个是吉林安图东方蜜蜂，由 V (缬氨酸)→i (异亮氨酸)，由于序列中第 424 位上碱基转换引起的 (GTA→ATA)。

2.3 测序结果与 GenBank 上登录的国内外有关东方蜜蜂该序列的比对

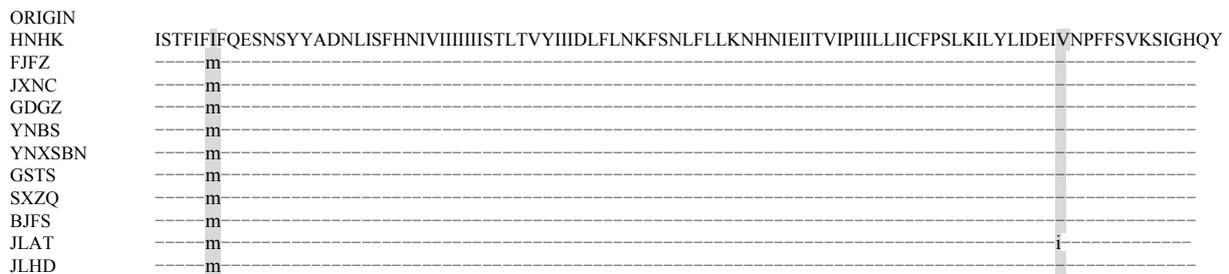


图 4 CO II 部分基因编码蛋白序列比对

Fig. 4 Alignment of the CO II partial protein sequence of mtDNA of *A.c. cerana*

2.3.1 非编码区序列比较 将测定的 11 个中华蜜蜂 tRNA^{leu}~CO II 基因间区中的非编码区完全序列与 GenBank 中公开的其他国家和地区的东方蜜蜂 mtDNA 的相应序列进行同源性比较, 利用 NCBI 上的 TreeView 软件构建聚类图(图 5)。从图 5 可以看出, 不同地理型东方蜜蜂明显分为三大分支: (1) 中国、日本、越南、柬埔寨、老挝和泰国北部样本为一大分支; (2) 泰国南部、马来西亚和印度的黑色蜜蜂为一个分支; (3) 印度黑色蜜蜂为另一分支。

2.3.2 细胞色素氧化酶 II 基因部分序列比较 将测

定的 11 个不同地理型东方蜜蜂 mtDNA 细胞色素氧化酶 II 基因部分序列和 GenBank 中公开的其他国家和地区的东方蜜蜂 mtDNA 的相应序列进行同源性比较, 利用 NCBI 上的 TreeView 软件构建聚类图(图 6)。

从图 6 可以看出, 日本和韩国的东方蜜蜂聚为一类; 中国除海南外的蜜蜂聚为一类; 中国台湾聚为一类; 马来西亚沙巴洲和印度的黑色蜜蜂聚为一类; 中国海南岛的蜜蜂为一类; 印度的黄色蜜蜂聚为一类; 泰国和俄罗斯(Primorie)的蜜蜂聚为一类; 印度的另一黑色蜜蜂为一类。



图 5 非编码区核苷酸序列聚类图

Fig. 5 The dendrogram of non-coding nucleotide sequence

3 讨论

3.1 关于线粒体 DNA 多态性与蜜蜂的分类学研究

线粒体 DNA 作为真核生物细胞的核外遗传物质, 它具有结构简单、进化速率快、无组织特异性、严格的母系遗传方式等特点, 使其在动物的分类和系统发育的研究中得到了广泛的应用。蜜蜂作为社会性生活的昆虫, 其群体由一只蜂王、数百至上千只的雄蜂, 以及 1~数万只的工蜂所组成。蜂王的多雄混合受精使一个蜂群中出现多家模现象(同父同母的全同胞和同母异父的半同胞共存)。由于线粒体 DNA 是单倍

体和母系遗传, 利用线粒体 DNA 评估群体间的遗传变异所需的有效群体数量一般要比通过核标记(如同工酶和核 DNA)所需的量少^[17]。对于像蜜蜂这类真社会性种类的群体遗传研究, 利用线粒体 DNA 进行分析允许比用核 DNA 更简单的采样策略^[18]。在一个特定的蜂群里, 所有个体的线粒体 DNA 都是相同的, 一个个体就能代表这个蜂群的遗传方式, 避免了利用核 DNA 分析时因群体内变异所带来的影响。从本试验的测序结果看, 同一个采样点不同的两群蜂, 其线粒体 DNA tRNA^{leu}~CO II 片段的核苷酸序列完全相同, 如海南海口和甘肃天水; 甚至地理位置相距遥远

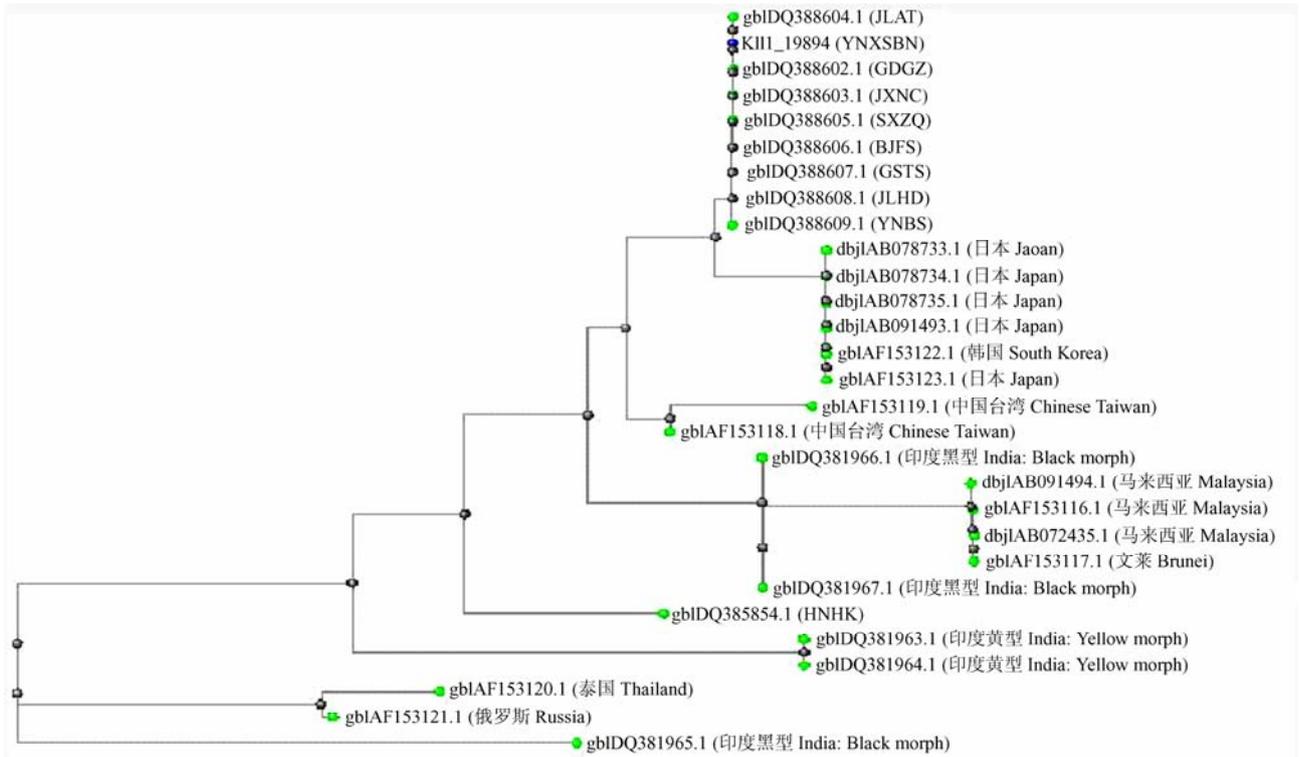


图 6 细胞色素氧化酶 II 基因部分核苷酸序列聚类图

Fig. 6 The dendrogram of partial nucleotide sequence of CO II gene

的山西和北京,该片段的核苷酸序列也是完全相同的。由此可见,利用线粒体 DNA 多态性来研究自然群体间的遗传关系时,无论是在采样数量上还是在采样方式上,较形态学鉴定和核 DNA 分析更具优势。相信随着测序技术的不断改进和完善,对不同地理型东方蜜蜂线粒体 DNA 全序列进行比较分析,将为东方蜜蜂的起源、分类和系统演化提供更准确、更可靠的信息。

3.2 关于 11 个地理型东方蜜蜂 mtDNA tRNA^{leu}~CO II 基因的核苷酸序列分析

目前中国学者普遍认为,分布于中国境内的东方蜜蜂有 5 个亚种(品种):即中华亚种,包括华南型、华中型、云贵高原型、华北型和东北型;西藏亚种,分布于雅鲁藏布江、察隅河、西洛木河、苏斑里河、卡门河等的河谷地带及云南西北部;阿坝亚种,分布在四川西北部的阿坝地区、青海东部及甘肃东南部;海南亚种,分布在海南岛,包括山地型和椰林型两个生态型;印度亚种,分布于云南的西双版纳、德宏两州及思茅、临沧两地区。

从本研究对不同地理型东方蜜蜂线粒体

DNA tRNA^{leu}~CO II 基因核苷酸和部分编码区氨基酸序列比较分析中可以看出,(1)海南的东方蜜蜂由于长期的自然隔离逐渐形成了一个独特的类群。这与龚一飞等^[3]通过形态学分析所得到的结论相一致。(2)吉林安图的东方蜜蜂可能为一个独特的生态型。王瑞武^[19]通过 15 种限制性内切酶的 RFLP 分析,把中国境内 6 个地区的东方蜜蜂线粒体 DNA 归结为两类:即吉林长白山东方蜜蜂和福建东方蜜蜂-广东东方蜜蜂-昆明东方蜜蜂-江西东方蜜蜂-北京东方蜜蜂,其中吉林长白山地区的东方蜜蜂的 mtDNA 是由于其它地区中蜂丢失一个 *EcoR* I 酶切位点所致。(3)甘肃天水和云南保山东方蜜蜂有可能分别是阿坝亚种和西藏亚种的一个过渡类型。(4)云南西双版纳的东方蜜蜂虽然从外部形态上与其它地区的东方蜜蜂有明显的差异^[3,20,21],但从线粒体 DNA 部分序列多态性上看,其遗传分化并不明显。本实验结论并未支持将云南南部的东方蜜蜂划归为印度亚种,与谭昱^[22]通过对云南南部景洪东方蜜蜂的线粒体 DNA 分析所得出的结论不一致,也与龚一飞等^[3]通过形态学分析所得的结论不一致。

3.3 关于测序结果与 GenBank 上登录的国内外有关东方蜜蜂该序列的聚类分析

从非编码区序列聚类分析看, 南亚的印度和东南亚的马来西亚、泰国南部的东方蜜蜂与其它地区的东方蜜蜂有明显的差异, 而东亚的中国(包括台湾)、日本、韩国以及东南亚的越南、柬埔寨、老挝、泰国北部地区的东方蜜蜂之间的该序列无显著的差异, 这与 Smith 等^[9-11]通过对东方蜜蜂 mtDNA 非编码区的研究所得的结论是一致的, 即单从非编码区序列对比不能把日本蜜蜂同其它大陆的东方蜜蜂区别开来。

从编码区 CO II 部分核苷酸序列聚类分析看, 亚洲东方蜜蜂的 mtDNA 可分为以下几个类型即: 日本-韩国型、中国大陆型、中国台湾型、中国海南型、马来西亚沙巴州型、印度黄色蜜蜂型、印度黑色蜜蜂型、泰国南部型。这些结论部分与 Deowansh 等^[4]通过对部分地区东方蜜蜂线粒体 DNA 的 RFLP 分析所获得的结论相一致。由于序列分析中, 缺乏来自喜马拉雅地区以及被认为是东方蜜蜂线粒体 DNA 变异最丰富的菲律宾的该样本序列, 可以推测东方蜜蜂会有更多的线粒体 DNA 类型。

由于东方蜜蜂仍然处于野生或半野生状态, 大规模的转地饲养以及商业育王几乎不存在, 这使得各地的东方蜜蜂都保持了相对原始的状态, 基因交流主要是依靠蜂王的自然交配引起的。自然因素尤其是地理隔离是东方蜜蜂亚种分化的主要原因。在我国陆地地区的东方蜜蜂, 生活在由于空间隔离形成的某些特殊的生境中, 产生了一些独特的生态型应该可以理解的。海南的东方蜜蜂由于海岛隔离, 经过长期的自然选择形成了一个独特的类群也是应该理解的。这一结论同样支持了龚一飞等^[3]通过野外考察和室内形态学鉴定所得出的结论, 即海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的一个新亚种。但与杨冠煌等^[23]及谭昱等^[20]通过形态学分析将海南东方蜜蜂归为印度亚种的结论不一致。

4 结论

4.1 中国境内不同地理型东方蜜蜂遗传分化明显, 遗传多样性丰富; 线粒体 DNA 分子标记适合蜜蜂种以下的分类研究。

4.2 云南保山东方蜜蜂由于样本核苷酸序列在 142 bp 处发生了 T→C 转换, 与其它地区的东方蜜蜂相比, 缺少了一个 *Swa* I 酶切位点。

4.3 11 个地理型东方蜜蜂 mtDNA 中细胞色素氧化酶 II (CO II) 部分基因编码蛋白序列比对发现, 共有

2 个位点发生了变异, 一个是海南海口东方蜜蜂, 由该基因的第 24 个核苷酸处发生转换引起的; 另一个是吉林安图东方蜜蜂, 由该基因的第 271 个核苷酸处发生转换引起的。

4.4 对 11 个地理型东方蜜蜂 mtDNA 中 tRNA^{leu}~CO II 基因的序列比较和聚类分析, 以及与 GeneBank 上公开登录的其它国家和地区东方蜜蜂 mtDNA CO II 基因部分序列的聚类分析发现: 海南东方蜜蜂与我国境内其它地区的东方蜜蜂遗传分化明显, 与其它国家和地区的东方蜜蜂也显著不同。支持了通过形态学分析所认定的海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的一个新亚种的观点。

4.5 通过测序结果与 GenBank 上登录的国内外有关东方蜜蜂该序列的比较分析, 初步确定单纯依靠 mtDNA 中的非编码区序列比较分析来作为东方蜜蜂亚种分化的依据是不可行的; 而利用编码区细胞色素氧化酶 II (CO II) 基因的核苷酸序列分析则能较好地反映出不同地理型东方蜜蜂的遗传变异及其分化状况。

致谢: 本研究用东方蜜蜂样本在采集过程中, 得到了周冰峰、许正鼎、曾志将、陈东海、缪正瀛、林尊诚、高景林等原福建农林大学蜂学院校友的热情支持和帮助; 山西农业大学动物科技学院博士生导师刘文忠教授对论文提出了许多改进的意见, 在此一并表示衷心的感谢!

References

- [1] 杨冠煌. 中华蜜蜂. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
Yang G H. *Chinese Honeybee*. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 2001. (in Chinese)
- [2] Ruttner, F. 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*, Springer-Verlag, Berlin. 284.
- [3] 龚一飞, 张其康. 蜜蜂分类与进化. 福州: 福建科学技术出版社, 2000.
Gong Y F, Zhang Q K. *Taxonomy and Evolution of Honeybees*. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2000. (in Chinese)
- [4] Deowanish S, Nakamura J, Matsuka M, Kimura K. MtDNA variation among subspecies of *Apis cerana* using restriction fragment length polymorphism. *Apidologie*, 1996, 27: 407-413.
- [5] Tanaka H, Roubik D W, Kato M, Liew F, Gunsalam F G. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Insectes Sociaux*, 2001, 48: 44-51.

- [6] Sihanuntavong D, Sittipraneed S, Klinbunga S. Mitochondrial DNA diversity and population structure of the honey bee, *Apis cerana*, in Thailand. *Journal of Apicultural Research*, 1999, 38, 211-219.
- [7] Sittipraneed S, Laoaroon S, Klinbunga S, Wongsiri S. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand revealed by polymorphism of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. *Insectes Sociaux*, 2001, 48: 266-272.
- [8] Smith D R, Palmer M R, Otis G, Damus M. Mitochondrial DNA and AFLP markers support species status of *Apis nigrocincta*. *Insectes Sociaux*, 2003, 50: 185-190.
- [9] Smith D R, Hagen R H. The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 1997, 69, 294-310.
- [10] Smith D R, Hagen R H, Otis G W. Phylogeny and biogeography of *Apis cerana* subspecies: testing alternative hypotheses. In: Hoopgarner R, Connor L (Eds.). *Apiculture for the 21st Century*. Wicwas Press, Cheshire, CT, 1999: 60-68.
- [11] Smith D R, Villafuerte G, Otis and M. Palmer. Biogeography of *Apis cerana* and *A. nigrocincta*: Insights from mtDNA studies. *Apidologie*, 2000, 31: 265-279.
- [12] Sylvester H A, Limbipichai K, Wongsiri S, Rinderer T E, Mardan M. Morphometric studies of *Apis cerana* in Thailand and the Malaysian Peninsula. *Journal of Apicultural Research*, 1998, 37: 137-145.
- [13] De la Rúa P, Simon U E, Tilde A C, Moritz R F A, Fuchs S. MtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines. *Heredity*, 2000, 84: 124-130.
- [14] Smith D R. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. In: Smith D (Ed.): *Diversity in the Genus Apis*. Westview, Boulder, CO, 1991: 131-176.
- [15] Garnery L, Cornuet J M, Solignac M. Evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 1992, 1: 145-154.
- [16] Crozier R H, Crozier C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 1993, 133: 97-117.
- [17] Birky C W J, Furest P, Maruyama T. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 1989, 121: 613-627.
- [18] Garnery L, Mosshine E H, Oldroyd B P, Cornuet J M. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 465-471.
- [19] 王瑞武. 蜜蜂线粒体 DNA 遗传变异与形态特征地理变异的研究. 中国农业大学博士学位论文, 1999.
- Wang R W. Studies on genetic variation of mtDNA and morphological variation of honeybees. PhD Dissertation of China Agricultural University, 1999. (in Chinese)
- [20] 谭 晔, 和邵禹, 刘意秋. 海南岛东方蜜蜂的形态分类研究. 蜜蜂杂志, 2004, (11): 3-4.
- Tan K, He S Y, Liu Y Q. Studies on morphological taxonomy of *Apis cerana* Fab. in Hainan island. *Journal of Bee*, 2004, (11): 3-4. (in Chinese)
- [21] 谭 晔, 张 炫, 和绍禹, 周丹银. 中国东方蜜蜂的形态学及生物地理学研究. 云南农业大学学报, 2005, 20: 410-414.
- Tan K, Zhang X, He SY, Zhou D Y. morphological and biogeographical studies on *Apis cerana* (Fabr.) in China. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 20: 410-414. (in Chinese)
- [22] 谭 晔. 云南东方蜜蜂的形态学与 mtDNA 变异性研究. 云南大学博士论文, 2001.
- Tan K. Study on morphological and mtDNA variation of *Apis cerana* in Yunnan. PhD Dissertation of Yunnan University, 2001. (in Chinese)
- [23] 杨冠煌, 匡邦郁. 东方蜜蜂 *Apis cerana* Fab. 在我国的分布及其亚种分析. 云南农业大学学报, 1986, (12): 89-92.
- Yang G H, Kuang B Y. Distribution and subspecies analysis of *Apis cerana* Fab. in China. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 1986, (12): 89-92. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)