



熊翠玲, 张璐, 付中民, 等. 基于 RNA-seq 数据大规模开发中华蜜蜂幼虫的 SSR 分子标记 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 68–74.

# 基于 RNA-seq 数据大规模开发中华蜜蜂幼虫的 SSR 分子标记

熊翠玲<sup>\*</sup>, 张璐<sup>\*</sup>, 付中民, 王鸿权, 侯志贤, 童新宇, 李汶东,  
郑燕珍, 陈大福<sup>\*\*</sup>, 郭睿<sup>\*\*</sup>

(福建农林大学蜂学学院, 福州 350002)

**摘要:** 中华蜜蜂是东方蜜蜂的一个亚种, 也是我国的特有蜂种。本研究基于已获得的中华蜜蜂幼虫肠道转录组数据预测 SSR 分子标记, 并进行 SSR 位点的信息分析和 SSR 引物的发掘。利用 MISA 软件对幼虫肠道转录组中数据组装得到的 43557 条 unigenes 进行搜索, 共预测出 13448 个 SSR 位点, 它们分布于 7763 条 unigene 中, 其中最主要的重复类型为二核苷酸重复 (58.03%), 其次为三核苷酸重复 (28.23%) 和四核苷酸重复 (9.72%)。二核苷酸重复中的基序主要是 AT/AT (占总量的 30.4%)。对于所有的 SSR 位点, 利用 Primer Premier 5 软件成功设计出 21627 对引物, 随机选取 48 对引物对 5 个不同来源的中华蜜蜂幼虫肠道样品进行 SSR 位点扩增, 共有 15 对成功扩增出符合预期的目的片段。研究结果表明利用转录组数据大规模开发中华蜜蜂幼虫的 SSR 引物是可行的, 本研究开发出的 SSR 引物为研究中华蜜蜂分子遗传学奠定了基础。

**关键词:** RNA-seq; 中华蜜蜂; 幼虫肠道; SSR 分子标记

中图分类号: Q963; S891

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-068-07

## Large-scale development of SSR primers for *Apis cerana cerana* larvae based on its RNA-seq datasets

XIONG Cui-Ling<sup>\*</sup>, ZHANG Lu<sup>\*</sup>, FU Zhong-Min, WANG Hong-Quan, HOU Zhi-Xian, TONG Xin-Yu, LI Wen-Dong, ZHENG Yan-Zhen, CHEN Da-Fu<sup>\*\*</sup>, GUO Rui<sup>\*\*</sup> (College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** *Apis cerana cerana* is a subspecies of *Apis cerana*, and it's also an unique honeybee species in China. In the present study, SSR molecular markers for *A. c. cerana* were predicted based on the transcriptome datasets of *A. c. cerana* larval gut previously obtained. Further, we performed information analysis of SSR loci and development of SSR primers. First, MISA software was used to search 43557 unigenes assembled from RNA-seq data of eastern honeybee larval gut, and a total of 13448 SSR loci were found, which distributed in 7763 unigenes. Among these SSR loci, the main repeat types were di-nucleotide repeats (58.03%), followed by tri-nucleotide repeats (28.23%) and finally tetra-nucleotide repeats (9.72%). The AT/AT motif was the most abundant (30.4%) in di-nucleotide repeats. In total, 21627 pairs of primers were designed from all SSRs. 48 pairs of SSR primers were randomly selected and used to amplify the SSR loci in *A. c. cerana* larva gut samples from five different regions in

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-45-KXJ7); 福建农林大学科技发展资金 (KF2015123); 国家自然科学基金 (30800806)

<sup>\*</sup> 共同第一作者简介: 熊翠玲, 女, 1977 年生, 福建永定人, 实验师, 研究方向为蜜蜂保护学, E-mail: pandacl@sina.com; 张璐, 女, 1996 年生, 河南濮阳人, 本科生, 研究方向为蜂学, E-mail: m17805949180@163.com

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 Authors for correspondence, E-mail: fafu\_ruiguo@126.com; dfchen826@163.com

收稿日期 Received: 2016-12-08; 接收日期 Accepted: 2017-01-16

China, and 15 SSR primer pairs could amplify the target fragments with expected size. Our findings suggested that large-scale development of *A. c. cerana* larvae's SSR primers on basis of transcriptome data is feasible, additionally, the 15 SSRs primers developed here can lay a foundation for study on molecular genetics of *A. c. cerana*.

**Key words:** RNA-seq; *Apis cerana cerana*; larval gut; SSR

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 也称微卫星 (microsatellite), 由 1-6 个核苷酸碱基为重复单元 (motif) 组成。SSR 分子标记具有多态性高、重复性好、实验操作容易及呈共显性遗传等特点 (Jarne *et al.*, 1996), 因此广泛应用于动植物及微生物等学科领域。然而, SSR 分子标记的特异性在一定程度上限制了其引物的通用性 (Glenn *et al.*, 2005)。对于基因序列未知的物种, SSR 标记的开发较为困难。SSR 分子标记的传统开发方法以基因文库构建法 (包括 SSR 富集文库) 为主 (Hamilton *et al.*, 1999; Zane *et al.*, 2002), 但费时费力且效率低下。利用公共数据库 (如 NCBI、EMBL 和 DDBJ) 中的共享基因序列挖掘 SSR 分子标记也是一种较好的方法, 但对于非模式生物或新物种而言, 有限的基因序列资源严重阻碍 SSR 分子标记的开发。第二代高通量测序技术的迅速发展和应用为规模化遗传变异检测 (O'Neill *et al.*, 2013) 和分子标记位点开发 (Davey *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2013) 带来了宝贵机遇。然而, 基于高通量测序数据挖掘 SSR 分子标记仍面临着大数据对生物信息学方法和技术的挑战。东方蜜蜂 *Apis cerana* (简称东蜂) 分布广泛, 但各地不同的蜜源和气候条件使各地的东蜂在形态和种性上存在诸多差异。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 起源于古喜马拉雅山系的热带、亚热带雨林, 已适应我国各种生态地理条件, 广泛分布在长江流域的亚热带常绿阔叶林区和稻茶区 (段成鼎, 2003)。目前, 中蜂已经分化为不同的地理系, 并在长期进化中形成其独特的适应性 (杨冠煌, 1983)。较之西方蜜蜂 *Apis mellifera* (简称西蜂), 中蜂具有抗病虫害、耐寒、善利用零星蜜粉源等优点。

西蜂基因组早在 2006 年就已完成测序并公布 (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), 为蜜蜂行为、遗传进化和基因功能研究提供了重要的参考信息, 也有力推动了其 SSR 分子标记的开发和应用。2015 年, 韩国的研究人员公布了东方蜜蜂的基因组 (Park D, 2015), 但当时并没有

公布基因位置及功能注释信息。目前, 中蜂可利用的 SSR 分子标记极少, 有限的基因序列资源极大地限制了中蜂微卫星标记的开发, 中蜂种群遗传学研究受到严重制约。此前, 梁勤等 (2009) 利用 6 对微卫星 DNA 标记对福建省 4 个中蜂群体进行遗传多样性分析, 评估群体内的遗传变异和群体间的遗传分化。徐新建 (2013) 等应用 10 个微卫星 DNA 标记对海南岛 11 个地点和大陆 2 个地点中蜂分析表明, 海南中蜂多样性丰富, 岛屿和邻近大陆种群发生了明显的遗传分化。本课题组利用 RNA-seq 技术对中蜂幼虫肠道进行转录组测序, 成功组装了中蜂幼虫肠道的参考转录组并对其进行了功能及代谢通路注释 (未发表数据), 可为中蜂的微卫星标记开发提供重要的参考信息。

本研究基于已获得的中蜂幼虫肠道 RNA-seq 数据, 利用 MISA 软件搜索所有 unigenes 中的 SSR 位点信息, 并通过 Primer Premier 5 软件设计特异性引物, 进而对 5 个不同来源的中蜂幼虫肠道样品的 SSR 位点进行 PCR 扩增, 研究结果将为中蜂分子遗传学的相关研究奠定基础, 也为其它非模式生物或新物种的 SSR 分子标记挖掘提供方法借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 转录组数据

中蜂幼虫肠道的转录组测序委托广州基迪奥生物科技有限公司进行, 测序平台为 Illumina HiSeq 2500, 采用双端测序 (PE125), RNA-seq 共获得 43577 条 unigenes。本研究测得的转录组数据已上传美国国家生物技术信息中心 (NCBI) SRA 数据库, SRA 号: SRA456721。

### 1.2 供试蜜蜂幼虫

本研究用于验证 SSR 引物的中蜂幼虫取自四川、辽宁、福建、江西和广东。每个来源的中蜂幼虫分别剖取肠道, 液氮速冻后转移至 -80℃ 保存备用。使用组织 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Genomic, 中国), 提取各肠道样品的总 DNA,

-20℃ 保存备用。

### 1.3 SSR 鉴定

利用软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 搜索 unigenes 的 SSR 分子标记, 标准如下: 二核苷酸重复  $\geq 6$  次, 三核苷酸重复  $\geq 5$  次, 四核苷酸重复  $\geq 5$  次, 五核苷酸重复  $\geq 5$  次和六核苷酸重复  $\geq 5$  次。

### 1.4 SSR 引物设计与验证

根据 MISA 的输出结果, 利用 Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft Int., Palo Alto, CA) 对每一个含有 16 bp 碱基重复的 SSR 设计特异性引物。设置目的片段必须包含 SSR 起始 -3 bp, 终止 +6 bp, 扩增片段大小为 100 - 300 bp。引物的长度设置为 18 - 25 bp, 最适长度为 22 bp, 引物最大允许有一个不能识别的碱基。设置引物的退火温度 ( $T_m$ ) 为 55℃ - 65℃, 最适  $T_m$  为 58℃, 上下游引物间的  $T_m$  差异最大允许 3℃, 引物末端稳定性最大为 250。引物由上海生工生物工程有限公司进行合成。为验证设计引物的稳定扩增, 随机挑选 48 对引物进行验证。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: 其中中蜂幼虫肠道总 DNA 模板 1  $\mu$ L, Mixture 10  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 无菌水补至 20  $\mu$ L。反应程序如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华蜜蜂幼虫肠道转录组中 SSR 位点的分布特点

利用 MISA 软件对中蜂幼虫肠道转录组中 43577 条 unigenes 进行搜索, 共预测出 13448 个 SSR 位点, 它们分布于 7763 条 unigenes 中, 出现频率 (含有 SSR 的 unigene 数量与总 unigene 数量之比) 为 17.82%。这些 SSR 基序包含 1 - 5 bp 的串联重复序列。在中华蜜蜂幼虫肠道转录组数据中, SSR 基序的重复类型中总数最多的是二核苷酸重复, 达 SSR 总数的 58.03%; 其次是三核苷酸重复和四核苷酸重复, 分别占 SSR 总数的 28.23% 和 9.72%; 五核苷酸和六核苷酸重复的数量很少 (2.53% 和 1.49%) (表 1)。中蜂幼虫肠道转录组 SSR 重复单元的重复次数分布在 4 - 24 次。二核苷酸重复次数分布在 6 - 24 次, 三核苷酸重复次数分布在 5 - 24 次, 四核苷酸重复次数分布在 4 - 24 次, 五核苷酸重复次数分布在 4 - 12 次, 六核苷酸重复次数分布在 4 - 10 次, 其中, 重复次数最多的为 6 次, 占 24.22%。对 SSR 基元出现频率进行统计, 结果显示二核苷酸重复中主要是 AT/AT 基元, 占总量的 30.04%, AG/CT 基元其次, 占 22%, 其它基元百分比超过 2% 的只有 AC/GT、AAC/GTT、AAG/CTT、AAT/ATT、AGC/CTG、AGG/CCT 和 AAAG/CTTT, 其比例分别为 4.7%、2.9%、5.2%、7.2%、2.4%、2.9% 和 3% (图 1)。三核苷酸中 ACT/AGT 基元最少, 占 SSR 总数的 1.3% (图 1)。

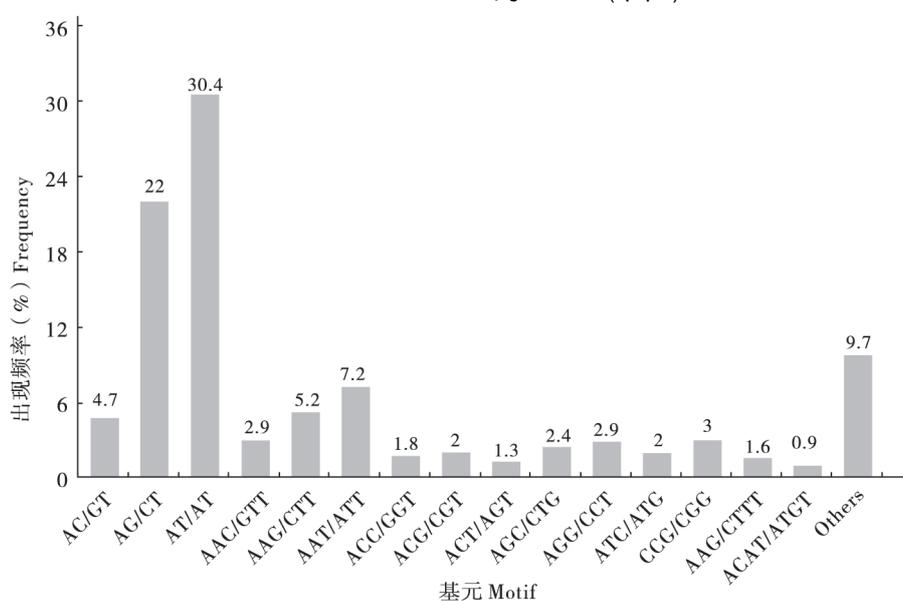


图 1 基于基序类型中 SSRs 在中华蜜蜂幼虫肠道转录组中的出现频率

Fig. 1 Frequency distribution of SSRs based on motif types in *Apis cerana cerana* larval gut transcriptome

表 1 基于重复单元数目中 SSRs 在中华蜜蜂幼虫肠道转录组中的出现频率

Table 1 Frequency of SSRs based on the number of repeat units in *Apis cerana cerana* larval gut transcriptome

重复类型 Repeat type	重复数 Number of repeats												合计 Total	百分比 (%) Percentage
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	> = 15		
二核苷酸 Dinucleotide	-	-	2320	1609	1203	874	595	335	122	14	98	634	7804	58.03
三核苷酸 Trinucleotide	-	1553	797	579	168	176	260	22	49	44	38	111	3797	28.23
四核苷酸 Tetranucleotide	667	325	94	120	46	11	16	9	7	3	2	7	430	9.72
五核苷酸 Pentanucleotide	216	53	44	3	8	2	5	4	1	-	-	3	26	2.53
六核苷酸 Hexanucleotide	133	47	2	3	6	2	5	-	1	-	-	2	201	1.49
总计 Total	1016	1978	3257	2314	1431	1065	881	370	180	61	138	757	13448	-
百分比 (%) Percentage	7.56	14.71	24.22	17.21	10.64	7.92	6.55	2.75	1.34	0.45	1.03	5.62	-	-

## 2.2 中华蜜蜂幼虫肠道 SSRs 引物设计

利用 Primer Premier 5 软件进行 SSR 引物的批量设计, 针对 7209 个 unigenes 共设计出 21627 对 SSR 引物。随机挑选 48 对引物对国内 5 个不同来源的中蜂幼虫样品进行扩增, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 共有 15 对引物扩增成功

(表 2), 并且扩增片段与预期片段大小基本一致(图 2), 有效扩增的比例达 31.25%。上述结果表明基于 RNA-seq 数据开发 SSR 引物的方法可行, 这些 SSR 位点多态性的高低有待于进一步的试验评估。



图 2 不同来源中华蜜蜂幼虫肠道样品 15 个 SSR 位点的 PCR 扩增产物电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis for PCR amplification of 15 SSR loci in *Apis cerana cerana* larval gut samples from different regions in China  
注: A - E, 不同 SSR 引物在各中蜂幼虫肠道样品中 SSR 位点扩增产物电泳; S, 四川来源的中蜂幼虫肠道样品; L, 辽宁来源的中蜂幼虫肠道样品; F, 福建来源的中蜂幼虫肠道样品; J, 江西来源的中蜂幼虫肠道样品; G, 广东来源的中蜂幼虫肠道样品; M, DNA marker; SSR1 - 15 分别代表 15 对 SSR 引物, 引物序列见表 2。Note: A - E, Agose gel electrophoresis for PCR amplification of SSR loci in each *A. c. cerana* larval gut sample using different SSR primers; S, *A. c. cerana* larval gut sample from Sichuan province; L, *A. c. cerana* larval gut sample from Liaoning province; F, *A. c. cerana* larval gut sample from Fujian province; J, *A. c. cerana* larval gut sample from Jiangxi province; G, *A. c. cerana* larval gut sample from Guangdong Province; M, DNA marker; SSR1 - 15 represent 15 pairs of SSR primer and the sequences are shown in Table 2.

表 2 SSR 引物的特征  
Table 2 Characterization of selected SSR primers

编号 No.	Unigene ID	引物序列 Primer sequence	产物大小 (bp) Product size	基序和重复数 Motif and repeat	PCR 扩增 PCR amplification
1	1943	F: CATGGCAAAATACGAACACG R: GCCTATCGAATCATCGGAGA	251	(CTCTC) <sub>4</sub> (TC) <sub>6</sub>	S
2	1965	F: TCGACGGCCTGTACAACATA R: CTCCTCCATCTTCACGTTCC	269	(GAG) <sub>6</sub> (CAC) <sub>7</sub>	S
3	2000	F: TCCGTTTTCGAAACGAAGAT R: AGCACATATCGCATCACGAG	173	(GAAA) <sub>4</sub>	S
4	2047	F: TCTGTAATAGGAAGAACGCGAA R: TCCTCTCCCCCTGTTTTCT	139	(TCG) <sub>5</sub>	S
5	2069	F: CGGAATCATCGTCATCCTCT R: GTTGCTGTTGTTGAGCCTGA	183	(TCC) <sub>6</sub>	S
6	2071	F: TAAGGTGGATCTCGTCGGAG R: TAGATCCGTCGCGATTTTTTC	222	(AG) <sub>8</sub> (AG) <sub>7</sub> (GA) <sub>6</sub>	S
7	2194	F: GCCAAGAAGAAACGGAACAA R: GCCCTTCCTCTTCGACTTCT	207	(ACG) <sub>6</sub> (CAG) <sub>10</sub> (GAA) <sub>6</sub>	S
8	2358	F: ATTGTTACGGTCAATTTCGC R: AATCCGTATCCACATTTGGC	229	(TCC) <sub>6</sub>	S
9	2042	F: CAGCCTGCAATTGCCTATTT R: TACGAGTGCAGAAAACGAGA	139	(TC) <sub>10</sub>	S
10	2242	F: GAAAAAGGCAAGAGGCGTAA R: GGAATCGTCGAAGAATGGAA	280	(AT) <sub>10</sub>	S
11	2522	F: CGGTGAGTTGCCATTCTTCT R: ATCCGCGGATATACGTAAC	163	(CTTC) <sub>5</sub>	S
12	2686	F: AAATGGGAATATCCGGGAAG R: ACGTCGAACTCGAGAAGGAG	220	(CA) <sub>10</sub>	S
13	3249	F: ATTTCTCCTACGACGTTGC R: AAGTCGGTCAGTTGGTCGAT	185	(CGAC) <sub>5</sub>	S
14	4155	F: GTTCGCATGTTGATTGGTTG R: GATGACCGATGACGATGATG	126	(TTCCA) <sub>4</sub>	S
15	2043	F: TTGAGCTCGATCGGAAATCT R: AAATCGACCAATTCTCCAA	111	(ATT) <sub>16</sub>	S

### 3 结论与讨论

此前, 本课题组利用 RNA-seq 技术对中蜂幼虫肠道进行深度测序, 成功组装并注释其参考转录组。本研究利用生物信息学方法从中蜂幼虫肠道的转录组数据中预测出多达 13448 个 SSR 位点,

这些 SSR 位点种类丰富, 以二核苷酸重复类型为主, 其次为三核苷酸重复。其它昆虫如黄粉虫 *Tenebrio molitor* (朱家颖, 2013)、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (罗梅, 2014) 和沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (张鹏飞, 2016) 等的相关研究结果显示单核苷酸重复是最主要的重复类型, 其次为三核苷酸重复; 沟眶象 *Eucryptorrhynchus*

*chinensis* (武政梅等, 2016)、二点委夜蛾 *Athetis lepigone* (Li *et al.*, 2013) 及云南切梢小蠹 *Tomicus yunnanensis* (袁远等, 2014) 等昆虫的 SSR 以三碱基重复为主。这与本研究的结果略有不同, 以二核苷酸重复类型为主可能是中蜂 SSR 分子标记的特征。在表达序列标签 (ESTs) 中, 多数情况下单核苷酸重复最多, 其次为三核苷酸重复。三核苷酸重复是昆虫 EST-SSR 中的核心重复类型, 因为三核苷酸核心基元极少产生编码框滑动突变现象, 其在编码区较其它重复基元类型更加稳定 (Wang *et al.*, 2012)。本研究中, 中蜂幼虫的 SSR 出现频率为 17.82%, 高于沟眶象 (武政梅等, 2016)、黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* (9.98%) (Huang *et al.*, 2012) 及烟粉虱 *Bemisia tabaci* (5.07%) (Xie *et al.*, 2012) 等昆虫中 SSR 的出现频率。推测较高的 SSR 出现频率是中蜂幼虫的特征之一。在动植物的转录组或基因组中, GC/CG 是二碱基重复的 SSR 中的稀有重复基元。本研究发现 GC/CG 核心基元数量仅为 1 个, 与前人研究结果类似 (张琳琳, 2008; 张鹏飞, 2016)。

Tkhashi 等 (2009) 曾通过传统方法开发出 12 个东蜂微卫星标记, 其中 8 个具有高多态性。郭慧萍等 (2016) 利用 8 个微卫星标记对秦巴山区 17 个样点共 979 个蜂群的中蜂遗传多态性进行评估, 并以长白山中蜂和阿坝中蜂作为外群进行种群遗传分化分析。总体而言, 目前已有的中蜂 SSR 分子标记数量十分有限, 严重制约中蜂遗传进化与种群遗传研究。本研究中, 设计合成的特异性 SSR 引物多达 21627 对, 为了验证上述 SSR 引物, 随机挑选其中的 48 对对国内 5 个不同来源的中蜂幼虫样品的 SSR 位点进行 PCR 扩增, 结果显示有 15 对引物可有效扩增出 SSR 位点, 有效扩增率达 31.25%, 说明基于 RNA-seq 数据预测出的 SSR 位点只有部分真实存在, 然而, 通过此法开发出的可用于多态性分析的 SSR 位点数目仍非常可观。本研究中, SSR 位点扩增产物的电泳采用的是琼脂糖凝胶法, 此法较聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 法分辨率低, 上述 SSR 位点多态性的确定有待于进一步研究。

综上所述, 利用以 RNA-seq 为代表的二代测序技术挖掘 SSR 分子标记具有通量高、速度快和效率高的优点, 解决了传统开发方法的瓶颈问题, 使微卫星标记的大规模开发成为现实。中蜂是非模式生物, 其基因组信息刚刚公布 (Park, 2015),

本研究说明基于高通量测序数据开发非模式生物的 SSR 分子标记是一种快速高效的途径。目前, 以单分子测序技术为代表的三代测序技术逐渐兴起, SSR 分子标记开发及功能基因定位将更为方便快捷。

## 参考文献 (References)

- Fries I, Wei H, Shi W, *et al.* Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. [J]. *Apidologie*, 1996, 27 (1): 3–11.
- Gong YF, Zhang QK. Classification and Evolution of *Apis* [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2000, 21–26. [龚一飞, 张其康. 蜜蜂分类与进化 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2000, 21–26]
- Guo HP, Zhou SJ, Zhu XJ, *et al.* Population genetic analysis of *Apis cerana cerana* from the Qing-Daba mountain areas base on microsatellite DNA [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59 (3): 337–345. [郭慧萍, 周姝婧, 朱翔杰, 等. 秦巴山区中华蜜蜂种群微卫星 DNA 遗传分析 [J]. 昆虫学报, 2016, 59 (3): 337–345]
- Guo R, Wang S, Xue R, *et al.* The gene expression profile of resistant and susceptible *Bombyx Mori* strains reveals *Cypovirus*-associated variations in host gene transcript levels [J]. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 2015, 99 (12): 5175–87.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Nature*, 2006, 443: 931–949.
- Huang Q, Sun P, Zhou X, *et al.* Characterization of head transcriptome and analysis of gene expression involved in caste differentiation and aggression in *Odontotermes formosanus* (Shiraki) [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (11): e50383.
- Lin Z, Page P, Li L, *et al.* Go east for better honey bee health: *Apis cerana* is faster at hygienic behavior than *A. mellifera* [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (9): e0162647.
- Li HL. Construction of cDNA Libraries from Head of Bees, Cloning, Expression and Subcellular Localization of the Antenna Specific Protein Gene in the Chinese Honeybee, *Apis cerana cerana* [D]. Zhejiang University, 2007. [李红亮. 中华蜜蜂头部 ests 文库构建和主要触角特异蛋白基因克隆、定位及其表达鉴定 [D]. 2007, 浙江大学]
- Liang Q, Zhang LQ. Analysis of genetic diversity of four *Apis cerana cerana* populations in Fujian province with microsatellite markers [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2009, 38 (4): 388–392. [梁勤, 张立卿. 利用微卫星标记分析福建 4 个中华蜜蜂群体的遗传多样性 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2009, 38 (4): 388–392]
- Luo M, Zhang H, Bin SY, *et al.* High-throughput discovery of SSR genetic markers in the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae), from its transcriptome database [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (4): 395–400. [罗梅, 张鹤, 宾淑英, 等. 基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉

- 蚘微卫星引物 [J]. *昆虫学报*, 2014, 57 (4): 395–400]
- Novaes E, Drost DR, Farmerie WG, *et al.* High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9 (1): 312.
- Park D, Jung JW, Choi BS, *et al.* Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 1–16.
- Peng YS. Geographical races of *Apis cerana* Fabricius in China and their distribution. Review of Recent Chinese Publications and a Preliminary Statistical Analysis [J]. *Apidologie*, 1989, 20 (1): 9–20.
- Peng YS, Fang YZ, Xu SY, *et al.* The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr, to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans [J]. *Science Open Research*, 1987, 49 (1).
- Takahashi JI, Shimizu S, Koyama S, *et al.* Variable microsatellite loci isolated from the Asian honeybee, *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9 (3): 819.
- Wang Q, Sun LX, Xiao PX, *et al.* Study on technology for indoor artificial feeding of *Apis cerana cerana* larvae [J]. *Shandong Agriculture Science*, 2009 (11): 113–116. [王倩, 孙亮先, 肖培新, 等. 室内人工培育中华蜜蜂幼虫技术研究 [J]. *山东农业科学*, 2009 (11): 113–116]
- Werner R. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud [J]. *Apidologie*, 1999, 30 (2–3): 97–110.
- Wei DD, Shi JX, Zhang XX, *et al.* Analysis of microsatellite loci from *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome dataset. [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25 (6): 1799–1805. [魏丹丹, 石俊霞, 张夏瑄, 等. 基于转录组数据的桔小实蝇微卫星位点信息分析 [J]. *应用生态学报*, 2014, 25 (6): 1799–1805]
- Wu ZM, Gao P, Wen JB. Characteristic analysis of microsatellite in *Eucryptorrhynchus chinensis* transcriptome [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38 (5): 979–983. [武政梅, 高朋, 温俊宝. 沟眶象转录组微卫星特征分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2013, 56 (5): 554–560]
- Xie W, Meng QS, Wu QJ, *et al.* Pyrosequencing the *Bemisia tabaci* transcriptome reveals a highly diverse bacterial community and a robust system for insecticide resistance [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (4): e35181.
- Xu XJ, Zhou SJ, Zhu XJ, *et al.* Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Hainan island, southern China [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (5): 554–560. [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星 DNA 分析 [J]. *昆虫学报*, 2013, 56 (5): 554–560]
- Yuan Y, Zhang LF, Wu GX, *et al.* High-throughput discovery microsatellites in *Tomicus yunnanensis* (Coleoptera: Scolytinae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36 (2): 166–170. [袁远, 张丽芳, 吴国星, 等. 云南切梢小蠹微卫星的高通量发掘 [J]. *环境昆虫学报*, 2014, 36 (2): 166–170]
- Yu YL, Zhou SJ, Xu XJ, *et al.* Analysis on genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Changbai mountains [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2013, 42 (6): 643–647. [于瀛龙, 周姝婧, 徐新建, 等. 长白山中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 遗传多样性分析 [J]. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2013, 42 (6): 643–647]
- Zhou BF, Zhu XJ. The protection of *Apis cerana cerana*. In: China Apicultural Conference on Sustainable Development & Apicultural Technology and Ecology [C]. 2008. [周冰峰, 朱翔杰. 论中华蜜蜂种质资源的保护. 见: 中国蜂业科技可持续发展学术研讨会暨蜂业科技与生态研讨会 [C]. 2008]
- Zhu JY, Wu GX, Yang B. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), from its transcriptome database [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (7): 724–728. [朱家颖, 吴国星, 杨斌. 基于转录组数据高通量发掘黄粉甲微卫星引物 [J]. *昆虫学报*, 2013, 56 (7): 724–728]
- Zhang LL, Wei ZM, Lian ZM, *et al.* Abundance of microsatellites in the entire genome and EST of *Tribolium castaneum* [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45 (1): 38–42. [张琳琳, 魏朝明, 廉振民, 等. 赤拟谷盗全基因组和 EST 中微卫星的丰度 [J]. *昆虫知识*, 2008, 45 (1): 38–42]
- Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, *et al.* High-throughput discovery of microsatellite markers in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) from a transcriptome database [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53 (5): 1058–1064. [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 等. 基于转录组数据高通量发掘沙葱萤叶甲微卫星引物 [J]. *应用昆虫学报*, 2016, 53 (5): 10581064]