



赵金玉, 龙见坤, DAVID Tembong Cham, 陈祥盛, 常志敏. 贵州省东方蜜蜂 *Apis cerana* 线粒体 DNA 遗传多样性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (3): 595–605.

贵州省东方蜜蜂 *Apis cerana* 线粒体 DNA 遗传多样性研究

赵金玉^{1,2}, 龙见坤^{1,2}, DAVID Tembong Cham^{3,4}, 陈祥盛^{3,4}, 常志敏^{1,2,3,4*}

(1. 贵州大学动物科学学院, 高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳 550025;

2. 贵州大学动物科学学院, 贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025; 3. 贵州大学昆虫研究所, 贵阳 550025;

4. 贵州大学昆虫资源开发利用省级特色重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 为探明贵州省东方蜜蜂 *Apis cerana* 遗传多样性及遗传分化现状, 对贵州省 9 个地级市 79 个样点采集的东方蜜蜂样本线粒体 DNA (mt DNA) COI-COII 序列进行扩增与测序, 分析其遗传多样性、遗传结构及亲缘关系。序列结果显示扩增后 COI-COII 序列长度约为 760 bp, A + T 平均含量 (82.3%) 明显高于 C + G (17.7%), 碱基偏移性明显。单倍型分析共发现 33 个单倍型, 其中主体单倍型 H1 为 9 个地理群体共有。单倍型多样性分析表明平均单倍型多样性为 0.802, 其中黔南地区最高, 遵义地区最低; 平均核苷酸多样性为 0.014, 其中六盘水地区最高, 黔西南及安顺地区最低。中性检验结果表明贵州省部分地区东方蜜蜂可能经历过群体扩张。9 个地区样点的平均遗传距离介于 0.0012 ~ 0.0044 之间, 其中毕节与黔东南地区间最大, 为 0.0044, 安顺与黔南、遵义地区间最小, 均为 0.0012。在单倍型系统进化树中, 79 个样点东方蜜蜂可分为两个类群。研究结果为贵州省东方蜜蜂遗传分化研究、种质资源保护与开发利用提供参考依据。

关键词: 贵州省; 东方蜜蜂; 线粒体 DNA; 遗传多样性; 遗传距离

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 03-0595-11

Mitochondrial DNA diversity of *Apis cerana* in Guizhou Province

ZHAO Jin-Yu^{1,2}, LONG Jian-Kun^{1,2}, DAVID Tembong-Cham^{3,4}, CHEN Xiang-Sheng^{3,4}, CHANG Zhi-Min^{1,2,3,4*}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountain Region, Ministry of Education, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Guizhou Province, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 4. Provincial Special Key Laboratory for the Development and Utilization of Insect Resources, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: To clarify the genetic diversity and genetic differentiation of *Apis cerana* in Guizhou Province, *A. cerana* mt DNA CO I-CO II of 79 locations from nine cities were amplified and sequenced, then genetic diversity, genetic structure and relationship were analyzed. The results of sequence analysis showed that the lengths of genes were 760 bp, and the base composition was obviously A + T biased, with the averaging value 82.3%. The haplotype analysis indicated that 33 haplotypes were found, of which

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 [2018] 1032); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2019] 2291); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2020] 1Y113)

作者简介: 赵金玉, 男, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂形态及遗传等, E-mail: 2549141884@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 常志敏, 副教授, 研究方向为蜜蜂、熊蜂等资源昆虫, E-mail: cczzmm111@126.com

收稿日期 Received: 2021-05-13; 接受日期 Accepted: 2021-06-22

the main haplotype H1 was shared by nine geographic groups. The nucleotide diversity indicated that the average haplotype diversity was 0.802, the highest in Qiannan region, the lowest in Zunyi region; and the average nucleotide diversity was 0.014, of which Liupanshui region was the highest, Qianxinan and Anshun regions were the lowest. The neutral test deemed that the populations of *A. cerana* may have expansion in some areas of Guizhou Province. The average genetic distance of 9 locations was 0.0012 ~ 0.0044, and the maximum was 0.0044 between Bijie and Qiandongnan, the minimum was 0.0012 among Anshun, Qiannan and Zunyi. In clustering tree of haplotype, *A. cerana* populations of 79 locations could be clustered into two groups. The above results provided a certain reference for genetic differentiation, protection of germplasm resources and utilization of *A. cerana* in Guizhou Province.

Key words: Guizhou Province; *Apis cerana*; mitochondrial DNA; genetic diversity; genetic distance

东方蜜蜂 *Apis cerana* 又称中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*, 是我国分布最广、数量最多及饲养量最大的一个地理亚种, 属中国独有蜜蜂品种, 除新疆外, 全国各地均有分布, 尤其是南方的丘陵及山区 (国家畜禽遗传资源委员会, 2011)。东方蜜蜂具有西方蜜蜂所不可比拟的优势, 如抗寒御敌能力强, 其 7℃ 左右即可正常采集; 另外, 东方蜜蜂善于利用零星蜜源植物, 采蜜期长, 非常适合山区饲养。近年来, 国家较重视东方蜜蜂的种质遗传资源保护, 目前已划建多个保护区及保种场。贵州省是东方蜜蜂重要分布区, 近 5 年来, 其蜂群数量增至约 51 万群 (韦小平等, 2020)。

目前, 我国东方蜜蜂有北方型、华南型、华中型、云贵高原型、长白山型、海南型、滇南型、阿坝型及西藏型 9 个类型 (国家畜禽遗传资源委员会, 2011)。东方蜜蜂遗传分化现状是其种质资源保护及开发利用的基础。近年来, mt DNA 被广泛应用于东方蜜蜂遗传多样性研究。谭垦等 (2004) 对云南及北京地区东方蜜蜂 mt DNA CO II 基因进行分析, 发现其存在碱基差异且属于不同类群。丁桂玲等 (2008) 对中国 25 个省 100 余个样点的东方蜜蜂 mt DNA tRNA^{leu}-CO II 非编码区进行研究, 获得 18 个单倍型及 12 个多态位点, 并认为西北地区单倍型数量较多, 蜜蜂多样性较丰富。刘振国等 (2015) 分析了我国 20 个地理种群东方蜜蜂 mt DNA CO II 基因遗传多样性, 结果表明不同地理种群间存在显著遗传分化。谷瑛等 (2016) 对重庆 139 群东方蜜蜂 mt DNA tRNA^{leu}-CO II 片段非编码区进行分析, 发现不同生境种群间存在基因交流。曹联飞等 (2017) 基于 tRNA^{leu}-CO II 序列对浙江省 94 个样点东方蜜蜂进行相关分析, 发现 20 个单倍型。李彪等 (2018) 基于 mt DNA tRNA^{leu}-CO II 非编码区对唐家河自然保护区 37 个

蜂群进行分析, 发现 14 个单倍型, 指出单倍型分布与地理、气候等因素有较大关系。刘意秋等 (2019) 基于 CO I 片段分析了陕、甘、宁、青、晋 5 省东方蜜蜂遗传分化状况, 定义了 21 个单倍型, 并指出该地区种群总体遗传分化不显著。曹联飞等 (2020) 基于 mt DNA tRNA^{leu}-CO II 序列对浙江金华地区东方蜜蜂遗传多样性分析, 共发现 14 个单倍型, 且发现该地区存在显著遗传分化。

贵州省地处云贵高原与湘桂丘陵之间, 属温暖湿润季风高原山地气候区, 西部为高原地貌, 最典型的威宁地区, 平均海拔 2 200 m 以上, 其气候、植被与全省差异较大, 年均气温 13℃ 以下, 降雨量较小, 为低温少雨区, 日照较丰富 (徐祖荫, 1986); 东部主要为山地和丘陵, 植被茂盛、受外界干扰小、有保存较好的东方蜜蜂资源。因此, 贵州蜜蜂资源是研究复杂地形下东方蜜蜂遗传分化的良好对象。近年来, 仅于瀛龙等 (2017) 利用微卫星标记法对贵州省 9 个样点东方蜜蜂遗传多样性进行研究, 认为贵州省东方蜜蜂未发生遗传分化。但由于涉及样点较少, 贵州省东方蜜蜂是否存在遗传分化有待进一步研究。

1 材料与方法

1.1 样本采集

样本点选择标准: 为减少实验误差, 采样在蜜源植物丰富, 种群群势较强的季节进行, 并结合海拔、经纬度及距离等因素, 优先选择野生蜂群及原始饲养蜂群, 其次选择无人工育王蜂群。共采集 79 个理想样点, 具体采样信息 (见图 1, 表 1), 样本采集后暂存于装有无水乙醇的 15 mL 试管中, 带回实验室后更换无水乙醇并保存于 -20℃ 冰箱待用。

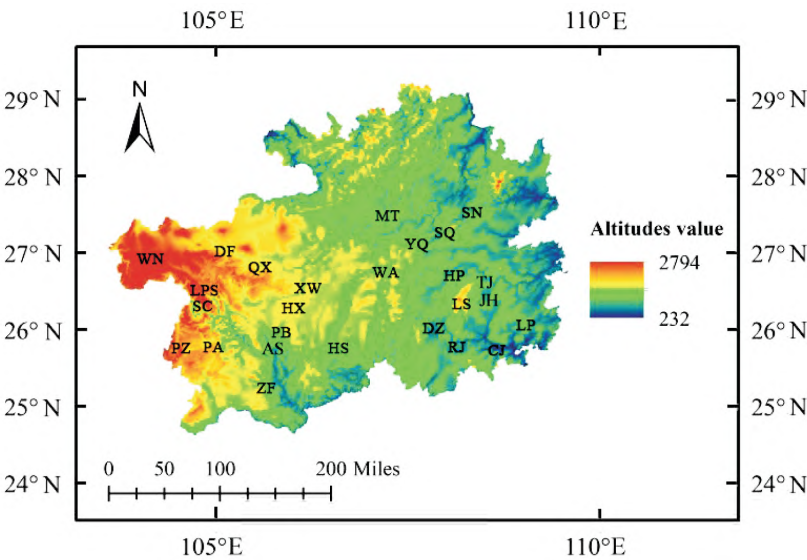


图 1 东方蜜蜂样本采集信息图

Fig. 1 Information of *Apis cerana* sample collection

表 1 东方蜜蜂样本采集信息表

Table 1 Information of *Apis cerana* sample collection

样点及代码 Locations and code	来源 Source type	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 (m) Altitude	采样日期 Collection date
花溪区 HX	HX1 人工 Manage	N26. 52972°	E106. 58932°	1 294	2019-09-06
	HX2 野外 Field	N26. 46726°	E106. 68819°	1 127	2019-08-10
	HX3 野外 Field	N26. 43494°	E106. 66845°	1 159	2019-08-23
	HX4 野外 Field	N26. 44958°	E106. 65548°	1 142	2019-08-09
	HX5 人工 Manage	N26. 52972°	E106. 58932°	1 294	2019-09-06
	HX6 人工 Manage	N26. 52972°	E106. 58932°	1 294	2019-09-06
	HX7 人工 Manage	N26. 52972°	E106. 58932°	1 294	2019-09-06
	HX8 人工 Manage	N26. 52972°	E106. 58932°	1 294	2019-09-06
黄平县 HP	HP1 人工 Manage	N26. 90554°	E107. 64153°	959	2019-09-14
	HP2 野外 Field	N26. 89193°	E107. 70794°	919	2019-09-14
	HP3 人工 Manage	N26. 90554°	E107. 64153°	959	2019-09-14
	HP4 人工 Manage	N26. 97237°	E107. 83237°	788	2019-07-22
	HP5 人工 Manage	N26. 97237°	E107. 83237°	788	2019-07-22
水城区 SC	SC1 野外 Field	N26. 24526°	E105. 90324°	1 566	2019-09-21
	SC2 人工 Manage	N26. 39003°	E105. 09326°	1 413	2019-09-20
	SC3 野外 Field	N26. 32774°	E104. 95782°	1 716	2019-09-21
	SC4 野外 Field	N26. 26095°	E104. 83896°	1 021	2019-09-21
	SC5 野外 Field	N26. 35959°	E104. 99209°	1 435	2019-09-21
	SC6 人工 Manage	N26. 39003°	E105. 09326°	1 413	2019-09-20
	SC7 野外 Field	N26. 31832°	E104. 93742°	1 740	2019-09-21

续表 1 Continued table 1

样点及代码 Locations and code		来源 Source type	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 (m) Altitude	采样日期 Collection date
六盘水 LPS	LPS	野外 Field	N26. 33251°	E104. 95361°	1 724	2019-09-21
	PZ1	野外 Field	N26. 15811°	E104. 63007°	2 664	2019-09-21
	PZ2	野外 Field	N26. 16084°	E104. 63264°	2 541	2019-09-21
盘州市 PZ	PZ3	野外 Field	N26. 15965°	E104. 63822°	2 513	2019-09-21
	PZ4	野外 Field	N25. 47551°	E104. 41399°	2 093	2019-09-21
	PZ5	野外 Field	N25. 48587°	E104. 49238°	2 173	2019-09-21
惠水县 HS	HS1	人工 Manage	N26. 03914°	E106. 59813°	1 006	2019-09-09
	HS2	人工 Manage	N26. 03914°	E106. 59813°	1 006	2019-09-09
湄潭县 MT	MT1	人工 Manage	N27. 71584°	E107. 47766°	1 010	2019-09-13
	MT2	人工 Manage	N27. 71584°	E107. 47766°	1 010	2019-09-13
普安县 PA	PA1	野外 Field	N25. 73671°	E104. 90372°	1 708	2019-09-22
	PA2	野外 Field	N25. 75990°	E104. 90049°	1 723	2019-09-22
	PA3	野外 Field	N25. 82334°	E104. 95489°	1 315	2019-09-22
	PA4	野外 Field	N25. 90060°	E104. 98844°	1 581	2019-09-22
平坝区 PB	PB1	野外 Field	N26. 17168°	E105. 85823°	1 342	2019-09-20
	PB2	野外 Field	N 26. 4097°	E106. 36948°	1 228	2019-03-18
	PB3	野外 Field	N26. 42910°	E106. 21067°	1 450	2019-03-18
安顺市 AS	AS1	野外 Field	N26. 24316°	E105. 97940°	1 369	2019-3-18
	AS2	野外 Field	N26. 01203°	E106. 02862°	1 251	2019-05-23
黔西市 QX	QX1	人工 Field	N27. 03536°	E106. 21888°	1 275	2019-09-10
	QX2	野外 Field	N27. 10099°	E105. 98518°	1 296	2019-03-21
	QX3	人工 Manage	N27. 03536°	E106. 21888°	1 275	2019-09-10
大方县 DF	DF1	野外 Field	N27. 20758°	E105. 92193°	1 668	2019-03-19
	DF2	野外 Field	N27. 30142°	E105. 64920°	1 653	2019-03-19
	DF3	野外 Field	N27. 41084°	E105. 64128°	1 527	2019-03-20
威宁县 WN	WN1	野外 Field	N26. 86844°	E104. 29879°	2 325	2019-06-27
	WN2	野外 Field	N26. 90547°	E104. 08696°	2 521	2019-06-27
	WN3	野外 Field	N26. 90698°	E104. 08662°	2 408	2019-06-27
	WN4	野外 Field	N26. 87004°	E104. 30100°	2 527	2019-06-27
	WN5	野外 Field	N26. 97614°	E104. 03900°	2 139	2019-06-27
	WN6	野外 Field	N26. 97606°	E104. 03874°	2 137	2019-06-28
	WN7	野外 Field	N26. 86800°	E104. 29900°	2 322	2019-09-28
	WN8	野外 Field	N26. 87310°	E104. 28503°	2 184	2019-09-28
	WN9	野外 Field	N26. 87801°	E104. 28305°	2 217	2019-09-29
	WN10	野外 Field	N26. 84215°	E104. 17187°	2 165	2019-09-29
	WN11	野外 Field	N26. 85989°	E104. 25979°	2 283	2019-07-13

续表 1 Continued table 1

样点及代码 Locations and code		来源 Source type	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 (m) Altitude	采样日期 Collection date
修文县 XW	XW1	野外 Field	N26. 84259°	E106. 58845°	1 250	2019-03-30
	XW2	野外 Field	N26. 80241°	E106. 59500°	1 329	2019-03-30
石阡县 SQ	SQ1	野外 Field	N27. 51681°	E108. 21979°	638	2019-07-18
	SQ2	野外 Field	N27. 32367°	E108. 14991°	810	2019-07-19
思南县 SN	SN	野外 Field	N27. 94169°	E108. 24879°	685	2019-07-20
余庆县 YQ	YQ1	野外 Field	N27. 21885°	E107. 90096°	1 043	2019-07-18
	YQ2	野外 Field	N27. 15559°	E107. 82963°	667	2019-07-21
瓮安县 WA	WA	野外 Field	N27. 06471°	E107. 47371°	1 303	2019-07-17
从江县 CJ	CJ	野外 Field	N25. 89064°	E109. 10629°	263	2019-10-10
榕江县 RJ	RJ1	野外 Field	N25. 92838°	E108. 52129°	260	2019-10-10
	RJ2	野外 Field	N25. 94932°	E108. 53122°	259	2019-10-11
丹寨县 DZ	DZ1	野外 Field	N26. 20185°	E107. 78478°	852	2019-08-08
	DZ2	野外 Field	N26. 29154°	E107. 78961°	754	2019-08-08
台江县 TJ	TJ	野外 Field	N26. 66987°	E108. 31780°	1 086	2019-07-27
剑河县 JH	JH	野外 Field	N26. 73147°	E108. 43673°	629	2019-07-28
雷山县 LS	LS1	野外 Field	N26. 37576°	E108. 08229°	1 077	2019-07-23
	LS2	野外 Field	N26. 38691°	E108. 08763°	2 178	2019-07-24
黎平县 LP	LP1	野外 Field	N26. 23437°	E109. 13243°	406	2019-08-09
	LP2	野外 Field	N25. 96013°	E109. 29503°	438	2019-08-09
贞丰县 ZF	ZF1	野外 Field	N25. 38948°	E105. 64676°	748	2019-06-29
	ZF2	野外 Field	N25. 36900°	E105. 58859°	716	2019-06-29

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 提取

每群随机抽取 1 头无水乙醇保存的蜜蜂样本，取其胸部，尽量除去外表几丁质，置于 1.5 mL 离心管中加入 TL Buffer 后充分研磨，添加 OB 蛋白酶后 55℃ 水浴 4 h。具体方法及步骤参照动物基因组 DNA 快速提取试剂盒 DP302（天根生化科技有限公司）。

1.2.2 序列扩增与测序

依据东方蜜蜂 mt DNA 全基因组（Genbank Acession No: GQ162109）设计 COI-COII 片段的引物（Tan *et al.* , 2016）。具体引物信息为 R: 5′-CTATACCTCGACGATACTCAG-3′，F: 5′-TCAGGGTATTCATAGGATC-3′，并对 mt DNA COI-COII 序列进行扩增。PCR 反应体系为 20 μL，其中 2 × Taq

MasterMix 10 μL，引物 F 及引物 R 各 1 μL，DNA 模板 2 μL，ddH₂O 6 μL。反应程序为：94℃ 5 min（预变性）、95℃ 30 s（变性）、54℃ 30 s（退火）、64℃ 30 s（延伸）、34 个循环，72℃ 5 min（终延伸）。PCR 产物送生工生物工程股份有限公司进行双向测序。

1.2.3 数据分析

以地级市行政区划为单位，将贵州省 79 个样点分为 9 个地区样点，包括毕节地区（BJ）、六盘水地区（LPS）、黔西南地区（QXN）、黔南地区（QN）、黔东南地区（QDN）、铜仁地区（TR）、遵义地区（ZY）、贵阳地区（GY）、安顺地区（AS）。

使用 Mega 6.05（Kumar *et al.* , 2016）对 9 个地区样点进行比对、计算碱基组成、统计保守位

点及变异位点、计算 Kinura2-Parameter (K2P) 平均遗传距离等; 运用 DNAsp 5.0 (Rozas *et al.*, 2017) 检测并统计单倍型数目及分布, 进而计算单倍型多样性及核苷酸多样性; 然后使用 DNAsp 5.0 依据 $Ta_{n\alpha s}$ 值 (D) 及 $F_{u\&s}$ 值 (Fs) 进行中性检验, 当两者均呈一个相对较大的负值时, 表明种群可能经历过群体扩张; 分别采用 Mega 6.05 和 Network 4.61 (Bandelt *et al.*, 1999) 软件 ML 法构建单倍型系统发育树及单倍型网络中介图。

2 结果与分析

2.1 核苷酸碱基组成及变异位点

对贵州省 9 个地区样点东方蜜蜂 mt DNA COI-COII 序列测序校正后, 获得片段长度约 760 bp, 碱基 A、T、C、G 平均含量分别为 39.2%、43.1%、11.0%、6.7%, A + T 平均含量为 82.3%, C + G 平均含量为 17.7%, 表现出明显的 A + T 偏移性。该片段中发现简约信息位点 19 个及单突变位点 14 个, 共 33 个变异位点, 其中变异位点 A/G 有 10 个, T/A 有 7 个, T/C 有 8 个, C/T 有 6 个, C/A 有 1 个, T/G 有 1 个。

2.2 单倍型分析

贵州省 9 个地区样点共检测到 33 种单倍型, 分别命名为 H1-H33。其中, 共享单倍型 11 个 (H1、H2、H3、H4、H5、H11、H13、H14、H16、H21、H23), 占全部单倍型的 33.33%; 独有单倍型 22 个, 占有单倍型的 66.67% (见表 2)。在 9 个地区样点中, 从单倍型出现的种类及数量来看, 毕节地区最多, 包括 H1、H11、H14、H19、H20、H21、H22、H23、H24、H25、H26 11 种单倍型, 11 种单倍型分布在 17 个样点; 其次为黔东南地区, 包括 H1、H3、H5、H6、H7、H8、H28、H30、H31、H32 10 种单倍型, 分布在 19 个样点。

11 个共享单倍型中, H1 广泛分布在 9 个地区。从其出现频率来看, H1 分布最多, 其中六盘水地区分布 4 个样点 (SC1、PZ1、PZ4、PZ5)、毕节地区分布 5 个样点 (QX1、DF3、QX2、WN9、WN10)、黔东南地区分布 8 个样点 (CJ、RJ1、RJ3、DZ1、JH、LP1、LP2、ZF1) 等 9 个地区共

分布 33 个样点; 其次为 H3, 分布在六盘水地区 (SC4、LPS)、黔南地区 (HS1)、贵阳地区 (HX5) 共分布 4 个样点; H4、H11 及 H14 均分布在 2 个样点, H4 分布在贵阳地区 (HX8) 及六盘水地区 (SC5); H11 分布在六盘水地区 (SC3) 及毕节地区 (WN11); H14 分布在黔南地区 (HS2) 及毕节地区 (WN2)。部分单倍型出现次数较多, 但仅存在相邻较近样点, 如 H5 仅分布在黔东南地区 (HP3、DZ2、SS、LS2) 4 个较近样点, H13 分布在六盘水地区 (PZ2、PZ3) 2 个较近样点, H16、H21 及 H23 均分布在相邻样点。

22 个独有单倍型主要分布在毕节、黔东南、贵阳等地区, 其中毕节地区有 H19、H20、H22、H24、H25、H26 6 种, 分布在 QX3、DF1、WN3、WN4、WN1、WN8 6 个样点; 黔东南有 H6-H8、H28、H30-H32 7 种, 分布在 HP2、HP4、HP5、TJ、CG、LS1 7 个样点; 六盘水地区有 H9、H10、H12 3 种, 分布在 SC2、SC6 及 SC7 3 个样点; 安顺地区有 H17、H18 2 种, 分布在 PB1 及 AS2 2 个样点; 贵阳、铜仁、遵义及黔西南地区均有 1 种, 分别为 H27、H29、H15、H33, 分别分布在 XW2、SN、MT1、ZF1 4 个样点; 黔南地区未发现独有单倍型。

2.3 核苷酸多样性及中性检验

总体平均单倍型多样性为 0.802, 其中黔南地区最高, 为 1.000, 遵义地区最低, 为 0.500; 总体平均核苷酸多样性为 0.014, 其中六盘水地区最高, 为 0.102, 黔西南及安顺地区最低, 均为 0.002 (表 3)。

中性检验结果显示, 黔东南、黔南、安顺、毕节地区的 $Ta_{n\alpha s}$ 值 (D) 及 $F_{u\&s}$ 值 (Fs) 均为负数, 分别为 -0.162 和 -1.330、-0.797 和 -1.514、-1.048 和 -0.186、-0.707 和 -0.227, 表明上述地区东方蜜蜂可能经历过种群扩张, 其余地区均有正有负 (表 3)。

2.4 遗传距离分析

9 个地区样点间平均遗传距离介于 0.0012 ~ 0.0044 之间, 其中毕节与黔东南地区间最大, 为 0.0044; 安顺与黔南、遵义地区间最小, 均为 0.0012 (表 4)。

表 2 33 个单倍型分布情况
Table 2 Distribution of 33 haplotypes

单倍型 Haplotype	样点 Location									总数 Total number
	BJ	LPS	QXN	QN	QDN	TR	ZY	GY	AS	
H1	5	4	3	1	8	1	3	5	3	33
H2	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2
H3	—	2	—	1	—	—	—	1	—	4
H4	—	1	—	—	—	—	—	1	—	2
H5	—	—	—	—	4	—	—	—	—	4
H6	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H7	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H8	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H9	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H10	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H11	1	1	—	—	—	—	—	—	—	2
H12	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H13	—	2	—	—	—	—	—	—	—	2
H14	1	—	—	1	—	—	—	—	—	2
H15	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H16	—	—	2	—	—	—	—	—	—	2
H17	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H18	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H19	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H20	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H21	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H22	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H23	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H24	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H25	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H26	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H27	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H28	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H29	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H31	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H32	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H33	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1

注 “—” 表示此处数字为 “0”，下同。Note “—” meant the number here was “0”，the same below.

表 3 核苷酸多样性及中性检验结果

Table 3 Nucleotide diversity and neutral test results

种群 Population	单倍型 多样性 Haplotype diversity	核苷酸 多样性 Nucleotide diversity	Taunai's D	Fu's Fs 值 Fs
GY	0.844	0.003	0.068	-1.637
QDN	0.801	0.005	-0.162	-1.330
LPS	0.910	0.102	-2.402	6.591
QN	1.000	0.003	-0.797	-1.514
ZY	0.500	0.006	-0.612	0.172
QXN	0.733	0.002	-0.676	0.540
AS	0.700	0.002	-1.048	-0.186
BJ	0.897	0.003	-1.529	-5.139
TR	0.833	0.003	0.798	0.461
平均值 Average	0.802	0.014	-0.707	-0.227

2.5 基于单倍型系统进化分析

基于 ML 法构建 33 个单倍型系统发育树, 结果显示所有单倍型聚为 2 个大类群。一个类群包括 H6、H15、H18 及 H23 4 种单倍型, 另外一大枝除 3 个小枝 (H22 及 H25 为一枝、H27 及 H28 为一枝、H4 及 H29 为一枝) 外, 均各自单独聚类在一起 (图 2)。

2.6 单倍型网络中介图

构建 9 个地区样点中 33 个单倍型网络中介图, 其中 H1 面积最大, 颜色类型最多, 表明 H1

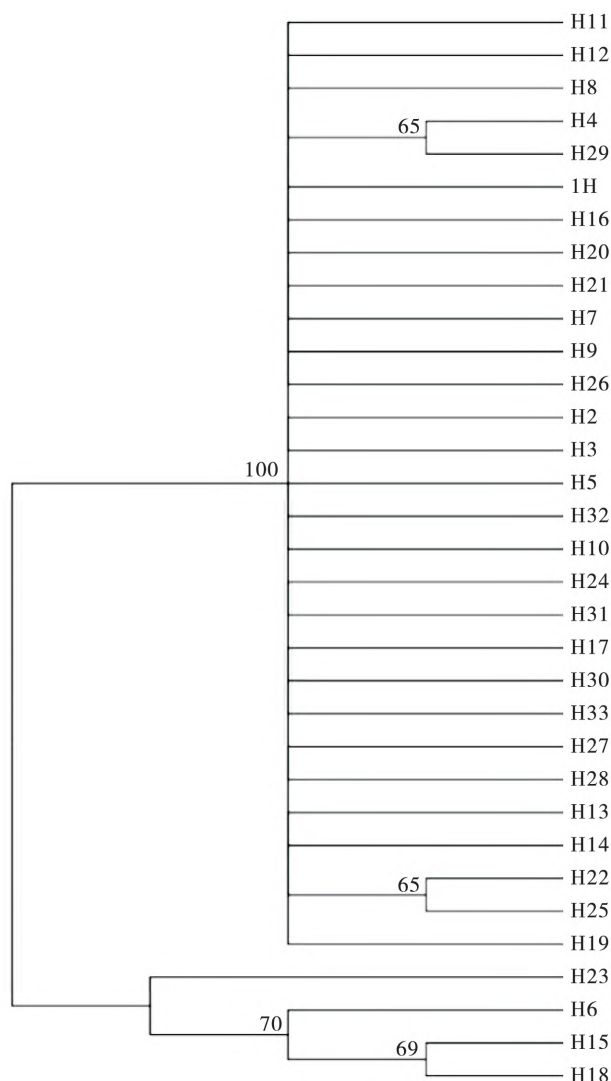


图 2 基于 ML 法构建的单倍型系统发育树

Fig. 2 Construction of haplotype phylogenetic tree based on ML method

表 4 9 个地区样点间的 K2P 平均遗传距离

Table 4 Average genetic distance of K2P among 9 sampling locations of *Apis cerana*

	GY	QDN	LPS	QN	ZY	QXN	AS	BJ	TR
GY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QDN	0.0043	-	-	-	-	-	-	-	-
LPS	0.0027	0.0038	-	-	-	-	-	-	-
QN	0.0023	0.0037	0.0017	-	-	-	-	-	-
ZY	0.0028	0.0037	0.0019	0.0018	-	-	-	-	-
QXN	0.0031	0.0039	0.0024	0.0022	0.0019	-	-	-	-
AS	0.0022	0.0030	0.0013	0.0012	0.0012	0.0016	-	-	-
BJ	0.0033	0.0044	0.0026	0.0022	0.0026	0.0030	0.0019	-	-
TR	0.0032	0.0042	0.0024	0.0023	0.0023	0.0027	0.0016	0.0031	-

出现次数最多, 分布最广, 存在贵州省 9 个地区样点群体中, 黔东南群体中分布最丰富, H1 为最原始单倍型, 其余单倍型均起源于此。同时可根据单倍型起源情况, 将其分为 3 个大类, 第一类

包括 H6、H15、H18、H23 及 H19, 此大类和单倍型进化树基本一致; 第二类包括 H22、H25、H27-28 及 H14; 其余单倍型为第三类 (图 3)。

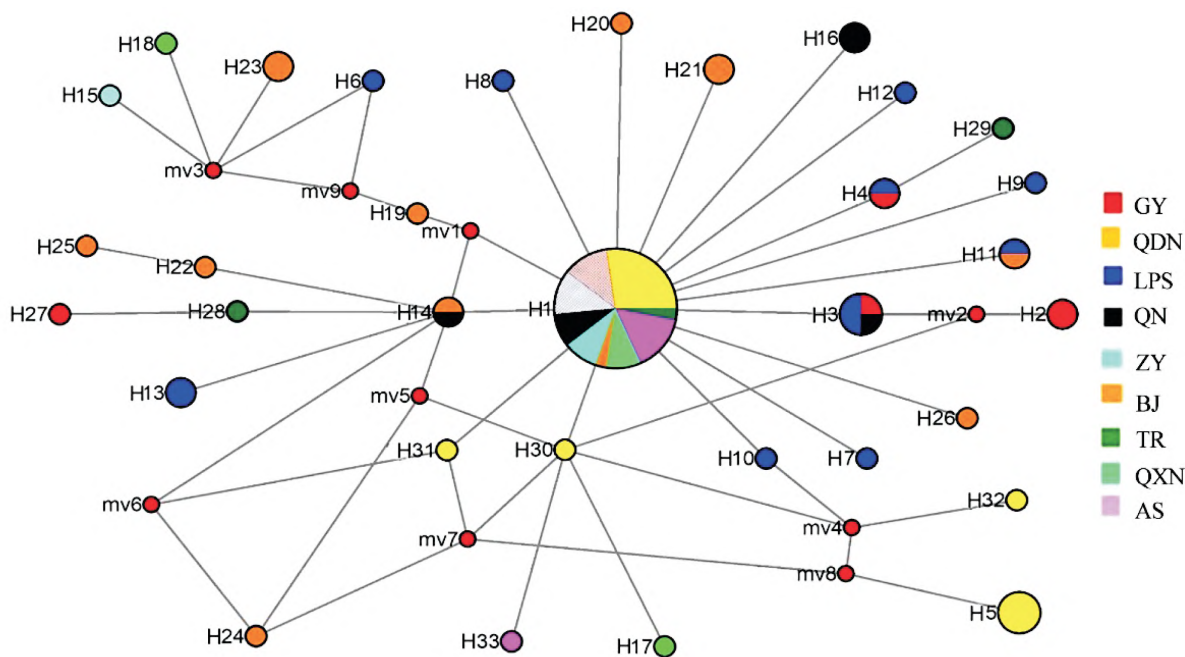


图 3 单倍型网络中介图

Fig. 3 Haplotype network mediation diagram

注: 通过单倍型网络中介图可直观看出 33 个单倍型之间的亲缘关系, 不同颜色代表不同样点种群, 圆圈面积代表所含样本数量大小。Note: The relationship among 33 haplotypes could be obtained by the haplotype network intermediary diagram. Different colors represented different geographical populations, and the circle area represented the number of samples.

3 结论与讨论

3.1 遗传多样性分析

本研究基于 CO I-CO II 片段对采自贵州省 9 个地区样点东方蜜蜂进行遗传多样性分析, 结果表明, 东方蜜蜂 mt DNA 序列在 9 个地区样点间存在一定变异。

碱基组成分析表明 CO I-CO II 序列中, A + T 平均含量为 82.3%, 此片段为 A + T 富集区, 该结果与前人研究结果相似, 该序列碱基偏移性明显。Tan 等 (2011) 研究表明亚洲地区东方蜜蜂该片段 A + T 平均含量为 77.5%; 冯毅楠等 (2016) 指出云南地区东方蜜蜂 CO I-CO II 片段 A + T 平均含量为 82.4%; 徐国威等 (2014) 指出四川省东方蜜蜂 CO I-CO II 片段 A + T 平均含量为 82.8%。综上可知, 贵州省与云南省、四川省东方蜜蜂的

mt DNA CO I-CO II 片段 A + T 平均含量相近。张卓等 (2015) 研究发现黑带食蚜蝇 *Episyrphus balteatus* CO I-CO II 序列 A + T 平均含量为 70.3%, 其含量明显低于东方蜜蜂。

单倍型分析表明, 9 个地区样点中 CO I-CO II 基因共存在 33 个单倍型, 11 个为共享单倍型, 22 个为独有单倍型, 平均总体单倍型多样性为 0.802, 其中遵义地区单倍型多样性为 0.500, 在所有样点中相对偏低, 王俊杰 (2018) 研究发现遵义地区单倍型多样性在所有样本中也相对偏低, 为 0.400, 可见该地区的东方蜜蜂种群与外界交流相对较少, 也有学者认为这可能是东方蜜蜂与该地区特殊地理气候相适应而产生的一种结果 (田嵩浩, 2014)。黔西南地区单倍型多样性也相对较低, 其余 7 个样点单倍型遗传多样性均大于 0.800。

3.2 遗传距离分析

9 个地区样点间平均遗传距离介于 0.0012 ~ 0.0044 之间, 其中黔东南地区与其它 8 个地区平均遗传距离相对较大, 均大于 0.0030; 安顺地区与其它 8 个地区平均遗传距离相对较小, 均小于 0.0030。徐国威等 (2014) 研究表明四川省东方蜜蜂平均遗传距离介于 0.0018 ~ 0.0049 之间; 冯毅楠等 (2016) 研究表明云南地区东方蜜蜂平均遗传距离介于 0.0004 ~ 0.0012 之间。综上, 贵州省东方蜜蜂平均遗传距离大于云南省, 略小于四川省。在实际距离上, 毕节地区与黔东南地区相隔最远, 而遗传距离也最大; 黔西南、贵阳与黔东南相隔较远, 其遗传距离也相对较大。黔东南地区与其它地区整体遗传较大, 这可能与人为措施有关, 如蜂群引进、人工育王、放蜂普遍等因素 (张明华等, 2019; 徐祖荫, 2019)。安顺地区位于贵州省中部, 其实际距离与其它地区相对较近, 与其它地区遗传距离也最小。综上, 贵州省东方蜜蜂各样点种群间遗传距离与实际距离可能存在一定相关性。

3.3 系统发育关系分析

单倍型系统发育树显示, 33 个单倍型聚为 2 个大类, 第一大类包含 H6、H15、H18 及 H23 4 种单倍型, 分别对应黔东南州黄平县纸坊乡、遵义市湄潭县云贵山、安顺市唐家湾、毕节市威宁县观风海样点; 其余种群均包含在第二类群中。综上, 东方蜜蜂种群未能按照相应地理区域聚类, 这可能与盲目引种、放蜂等有关, 张明华等 (2019) 调查发现每年初春两广及福建地区华南型中蜂被引入贵州地区, 徐祖荫 (2019) 调查发现贵州地区有引进越南东方蜜蜂的现象, 徐祖荫 (2019) 研究表明盲目引种, 会导致当地蜂种混乱及退化, 生产性能降低等现象。

33 个单倍型网络图显示, 单倍型 H1 扩散最广, 出现频率最高, 分布于以地级市为单位划分的所有样点, 其次为 H14, 出现在毕节、黔南、铜仁及贵阳 4 个样点。根据逆祖理论 (Gyllensten, 1991), 可将 H1 认定为起源单倍型或祖先单倍型。

参考文献 (References)

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16 (1): 37–48.

Cao LF, Gu PP, Lin YQ. Genetic diversity of *Apis cerana cerana* based on mitochondrial DNA in Lishui, Zhejiang, China [J]. *Journal of*

Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2017, 43 (4): 425–430. [曹联飞, 顾佩佩, 林宇清. 浙江丽水中华蜜蜂线粒体遗传多样性分析 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2017, 43 (4): 425–430]

Cao LF, Su XL, Chen DY, et al. Genetic diversity of *Apis cerana cerana* based on mitochondrial DNA in Jinhua, Zhejiang, China [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (4): 986–991. [曹联飞, 苏晓玲, 陈道印, 等. 浙江省金华市中华蜜蜂线粒体 DNA 遗传多样性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (4): 986–991]

China National Commission of Animal Genetic Resources. Animal Genetic Resources in China-Bees [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2011: 7–8. [国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志—蜜蜂志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 7–8]

Ding GL, Shi W, Lv LP, et al. Haplotypes of mitochondrial DNA (mt DNA) noncoding region of *Apis cerana cerana* [C]. Abstracts of the 9th Asian Beekeeping Congress, 2008: 81. [丁桂玲, 石巍, 吕丽萍, 等. 中华蜜蜂线粒体 DNA (mt DNA) 非编码区单倍型 [C]. 第九届亚洲养蜂大会论文摘要集, 2008: 81]

Feng YN, Zhou DY, Liu YQ, et al. Genetic diversity analysis of *Apis cerana* in Yunnan Province based on mitochondrial DNA *COI* ~ *COII* [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2016, 31 (1): 73–80. [冯毅楠, 周丹银, 刘意秋, 等. 基于线粒体 DNA *COI* ~ *COII* 分析云南省东方蜜蜂遗传多样性 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2016, 31 (1): 73–80]

Gu Y, Bin XL, Liu L, et al. Morphological and genetic diversity of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) in Chongqing, southwestern China [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59 (12): 1386–1394. [谷瑛, 宾先丽, 刘璐, 等. 重庆中华蜜蜂的形态和遗传多样性 [J]. 昆虫学报, 2016, 59 (12): 1386–1394]

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, et al. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice [J]. *Nature*, 1991, 352 (6332): 255–257.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33 (7): 1870–1874.

Li B, Lai K, Xian FH, et al. Genetic diversity of *Apis cerana cerana* based on mitochondrial DNA in Tangjiahe National Nature Reserve, Sichuan, China [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2018, 36 (3): 386–391. [李彪, 赖康, 鲜方海, 等. 唐家河国家级自然保护区中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 的线粒体遗传多样性分析 [J]. 四川农业大学学报, 2018, 36 (3): 386–391]

Liu YQ, Feng YN, Zhou DY, et al. Genetic diversity of *Apis cerana* in Shaanxi, Gansu, Ningxia, Qinghai, Shanxi based on sequences of mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2019, 48 (2): 216–224. [刘意秋, 冯毅楠, 周丹银, 等. 陕甘宁青晋东方蜜蜂线粒体 DNA *COI* 序列遗传多样

- 性分析 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2019 , 48 (2) : 216 – 224]
- Liu ZG , Ji T , Shen F , *et al.* Genetic diversity of geographical population of *Apis cerana cerana* estimated by mitochondrial *COII* gene sequence [J]. *Journal of Environmental Entomology* , 2015 , 37 (3) : 567 – 575. [刘振国, 吉挺, 沈芳, 等. 基于线粒体 CO II 基因序列的中华蜜蜂地理种群的遗传多样性研究 [J]. 环境昆虫学报, 2015 , 37 (3) : 567 – 575]
- Rozas J , Albert FM , Sánchez – delbarrio JC , *et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution* , 2017 , 34 (12) : 3299 – 3302.
- Tan HW , Liu GH , Xia D , *et al.* The complete mitochondrial genome of the asiatic cavity – nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *PLoS ONE* , 2011 , 6 (8) : e23008.
- Tan K , Qu Y , Wang Z , *et al.* Haplotype diversity and genetic similarity among populations of *Apis cerana* from Himalaya – southwest China and Nepal (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Apidologie* , 2016 , 47 (2) : 197 – 205.
- Tan K , Zhang X , Zhou DY , *et al.* Study on the mt DNA polymorphism of *Apis cerana* in parts of Asia [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University* , 2004 , 19 (2) : 227 – 230. [谭垦, 张炫, 周丹银, 等. 亚洲部分地区东方蜜蜂 mt DNA 多态性研究 [J]. 云南农业大学学报, 2004 , 19 (2) : 227 – 230]
- Tian SH. Sub Differentiation of *Apis cerana* Population in China [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University , 2014: 55. [田嵩浩. 中国境内东方蜜蜂群体亚分化研究 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2014: 55]
- Wang JJ. Analysis of Population Genetic Structure of *Apis cerana cerana* Based on mt DNA Sequence [D]. Xian: Shaanxi Normal University , 2018: 64. [王俊杰. 基于 mt DNA 序列的中华蜜蜂群体遗传结构分析 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2018: 64]
- Wei XP , He XJ , Xiang H , *et al.* Development status and trend of apiculture in Guizhou Province [J]. *Guizhou Agricultural Sciences* , 2020 , 48 (10) : 87 – 92. [韦小平, 贺兴江, 向华, 等. 贵州蜂产业发展现状与趋势 [J]. 贵州农业科学, 2020 , 48 (10) : 87 – 92]
- Xu GW , Zhou DY , Liu YQ , *et al.* Genetic diversity of *Apis cerana* in Sichuan Province based on mitochondrial DNA sequence *COI ~ COII* [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University* (Natural Science Edition) , 2014 , 29 (1) : 63 – 70. [徐国威, 周丹银, 刘意秋, 等. 基于线粒体 DNA (mt DNA) *COI ~ COII* 分析四川省东方蜜蜂遗传多样性 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2014 , 29 (1) : 63 – 70]
- Xu ZY. Investigation of Chinese bee resources and its development and utilization in Guizhou Province—Division , evaluation and development and utilization opinions of different ecological types of Chinese bee in Guizhou [J]. *Guizhou Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology* , 1986 , 1: 13 – 19. [徐祖荫. 贵州省中蜂资源调查及其开发利用研究—贵州中蜂不同生态类型的划分、评价及开发利用意见 [J]. 贵州畜牧兽医科技, 1986 , 1: 13 – 19]
- Xu ZY. Beekeeping and poverty alleviation must not be formalism—talking about the experience and lessons of success and failure in beekeeping and poverty alleviation [J]. *Chinese Bee Industry* , 2019 , 70 (1) : 51 – 53. [徐祖荫. 养蜂扶贫, 决不能搞形式主义—谈谈养蜂扶贫工作中成功与失败的经验教训 [J]. 中国蜂业, 2019 , 70 (1) : 51 – 53]
- Yu YL , Zhou SJ , Xu XJ , *et al.* Genetic diversity and genetic differentiation of *Apis cerana* in Guizhou Province of southwest China [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition) , 2017 , 46 (3) : 323 – 328. [于瀛龙, 周姝婧, 徐新建, 等. 贵州省东方蜜蜂微卫星 DNA 遗传分化与遗传多样性分析 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2017 , 46 (3) : 323 – 328]
- Zhang MH , Tian Q , Zhou Y , *et al.* Problems and development suggestions of *Apis cerana cerana* breeding in Guizhou [J]. *Guizhou Animal Husbandry and Veterinary* , 2019 , 43 (5) : 33 – 35. [张明华, 田琴, 周怡, 等. 贵州中华蜜蜂养殖存在的问题及发展建议 [J]. 贵州畜牧兽医, 2019 , 43 (5) : 33 – 35]
- Zhang Z , Hu JN , Wang XX , *et al.* Genetic diversity of *Episyrphus balteatus* based on mitochondrial DNA sequences *COI ~ COII* [J]. *Journal of Shenyang University* (Natural Science Edition) , 2015 , 27 (2) : 116 – 119. [张卓, 胡建楠, 王晓昕, 等. 基于线粒体 *COI ~ COII* 序列的黑带食蚜蝇 (*Episyrphus balteatus*) 遗传多样性初探 [J]. 沈阳大学学报 (自然科学版), 2015 , 27 (2) : 116 – 119]