



曹联飞, 苏晓玲, 陈道印, 赵东绪, 华启云. 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.

浙江省金华市中华蜜蜂线粒体 DNA 遗传多样性研究

曹联飞¹, 苏晓玲^{2*}, 陈道印², 赵东绪², 华启云²

(1. 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021; 2. 金华市农业科学研究院, 浙江金华 321000)

摘要: 为了解浙江省金华市中华蜜蜂的遗传多样性及遗传分化现状, 基于 mtDNA tRNA^{leu} ~ CO II 序列对金华市 9 个区县市共 81 个中蜂样本进行序列测定, 分析了金华市中蜂群体的遗传多样性、遗传结构和遗传分化情况。结果共发现 14 个单倍型, 其中主体单倍型 JH1 为 9 个地理群体所共享, 与已报道的福建省中蜂主体单倍型以及浙江省丽水市的中蜂主体单倍型相同。金华市中蜂的平均单倍型多样度为 0.610, 平均核苷酸多样度为 0.00162, 遗传多样性低于浙江省丽水市中蜂。分子变异分析 (AMOVA) 显示, 金华市中蜂不同地理群体间具有明显的遗传分化 ($F_{ST} = 0.212, P < 0.01$), 但大多数遗传变异存在于群体内 (78.79%), 群体间的遗传变异为 21.21%。进一步分析发现金东区、浦江县与金华市其它中蜂地理群体之间存在显著的遗传分化, 东阳市与金华市其它群体间的遗传距离也较大。中性检验结果表明, 金华市中蜂可能经历过群体扩张。相关研究结果对浙江省金华市中华蜜蜂的资源保护与合理开发利用具有重要意义。

关键词: 金华; 中华蜜蜂; 遗传多样性; 线粒体 DNA

中图分类号: Q968.1; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 04-0986-06

Genetic diversity of *Apis cerana cerana* based on mitochondrial DNA in Jinhua, Zhejiang, China

CAO Lian-Fei¹, SU Xiao-Ling^{2*}, CHEN Dao-Yin², ZHAO Dong-Xu², HUA Qi-Yun² (1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China; 2. Jinhua Academy of Agricultural Science, Jinhua 321000, Zhejiang, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity and genetic differentiation of *Apis cerana cerana* in Jinhua, Zhejiang, China, the mitochondrial DNA tRNA^{leu} ~ CO II sequences of 81 samples from each district and county of Jinhua were determined, and then the genetic diversity, genetic structure and genetic differentiation were analyzed. Fourteen haplotypes were found. The haplotype JH1 was shared by all nine districts and counties of Jinhua, which was identical to the main haplotype of *A. cerana cerana* in Fujian Province and Lishui, Zhejiang. It was shown that the haplotype diversity (Hd) was 0.610 and the nucleotides polymorphism (Pi) was 0.00162, which indicated that the genetic diversity of *A. cerana* in Jinhua was lower than Lishui. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed significant genetic subdivision among populations ($F_{ST} = 0.212, P < 0.01$), with 78.79% molecular variation within populations and 21.21% molecular variation among populations. Further analyses showed that significant

基金项目: 金华市农业研究计划 (2018-2-002); 浙江省农业 (畜禽) 新品种选育重大科技专项 (2016C02054-11); 浙江省农业重大技术协同推广计划 (2019XTTGXM03-02); 国家蜂产业技术体系 (CARS-44-SYZ7)

作者简介: 曹联飞, 男, 1981 年生, 河南卢氏人, 博士, 副研究员, 主要从事蜜蜂科学研究, E-mail: beekeepingcao@163.com

* 通讯作者 Author for corresponding: 苏晓玲, 硕士, 主要从事蜜蜂科学研究, E-mail: linger_su@163.com

收稿日期 Received: 2020-05-22; 接受日期 Accepted: 2020-11-02

genetic differentiations existed between *A. cerana cerana* from Jindong district and other populations of Jinhua. The differentiations of Pujiang country and other populations of Jinhua were also significant. The genetic distances between Dongyang and other populations of Jinhua were large. Neutral test showed that the population of *A. cerana cerana* in Jinhua might have experienced recent expansion. The results had important significance for the protection and rational development and utilization of *A. cerana cerana* in Jinhua, Zhejiang.

Key words: Jinhua; *Apis cerana cerana*; genetic diversity; mitochondrial DNA

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*, 即中蜂, 是中国境内东方蜜蜂 *Apis cerana* 的总称, 广泛分布于除新疆以外的全国各地, 特别是南方的丘陵、山区 (国家畜禽遗传资源委员会, 2011)。中蜂适合山区定地饲养, 善于采集零星蜜源, 抗逆能力强, 在我国具有悠久的饲养历史, 已被列入《国家级畜禽遗传资源保护名录》。近年来, 国家非常重视中蜂的遗传资源保护工作, 建立了多个保种场和保护区。浙江是中蜂的传统分布区, 近几年中蜂养殖发展迅猛, 已由 2013 年的 10 多万群增长到 2018 年的 40 多万群 (施金虎等, 2019)。

遗传多样性研究中蜂资源有效保护和合理开发利用的基础。传统上我国中蜂可划分为北方中蜂、华南中蜂、华中中蜂、云贵高原中蜂、长白山中蜂、海南中蜂、阿坝中蜂、滇南中蜂和西藏中蜂等 9 个类型 (国家畜禽遗传资源委员会, 2011)。近些年来, 线粒体分子标记在我国中蜂的遗传多样性研究中大量应用。姜玉锁等 (2007) 利用线粒体分子标记研究发现我国境内不同地理型中蜂存在着较明显的遗传分化。周姝婧等 (2016) 利用线粒体分子标记对福建省的中蜂研究发现遗传分化不明显。李彪等 (2018) 和王俊杰等 (2018) 分别利用线粒体分子标记研究发现四川唐家河国家级自然保护区和陕西秦巴山区的中蜂遗传多样性丰富。关于浙江省中蜂的遗传多样性研究, 赵东绪等 (2013) 利用形态学特征研究发现浙江省中蜂变异丰富, 曹联飞等 (2017) 利用线粒体分子标记研究发现浙江丽水地区中蜂的遗传多样性水平较高。

金华市位于浙江省中部, 交通便利, 为浙中丘陵盆地地区, 属亚热带季风气候, 蜜源植物丰富。金华市中蜂养殖历史悠久, 各个区县市均有分布。据统计, 金华市中蜂养殖数量已由 2012 年的 1 万余群增长到目前的 7 万余群 (赵东绪等, 2012)。然而目前还没有关于金华市中蜂遗传多样性的系统研究。为了解金华市中蜂的遗传多样性

及遗传分化现状, 本研究基于常用的 mtDNA tRNA^{leu} ~ CO II 序列对金华市中蜂进行遗传多样性分析, 旨在为金华市中蜂资源的有效保护和合理开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

2016 年在金华市下辖所有 9 个区县市各随机选择 3 个蜂场, 每个蜂场采集 3 群中华蜜蜂。蜂场的蜂群来源主要为本地野生收捕, 长期定地饲养。每群随机取几十头工蜂, 放入无水乙醇中, 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

取无水乙醇浸泡保存的蜜蜂样本, 每群随机取 1 头工蜂, 剪取蜜蜂胸部肌肉, 按照细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 DP1201 (北京百泰克生物技术有限公司) 的说明和步骤提取蜜蜂总 DNA。

1.2.2 序列扩增与测序

使用 PCR 引物 E2: 5'-GGCAGAATAAGTG CATTG-3' 和 H2: 5'-CAATATCATTGATGACC-3' 对 mtDNA tRNA^{leu} ~ CO II 序列进行扩增 (Garner *et al.*, 1992)。PCR 反应体系为 40 μL, 其中 10 × buffer 4 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, 10 mmol/L dNTP 4 μL, 10 nmol/L 引物各 1.6 μL, DNA 模板 3 μL, Taq 酶 0.5 μL。反应程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司进行双向测序。

1.2.3 数据分析

使用 DNASTar 5.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 和 Clustal X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) 进行序列拼接和比对。利用 MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) 输出碱基组成、变异位点、简约信息位点, 进行遗传距离计算, 构建 NJ 系统发育树等。利用

DnaSP 6.0 (Rozas *et al.*, 2017) 进行单倍型分析, 计算单倍型多样性、核苷酸多样性和核苷酸差异数。应用 Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) 软件进行分子方差分析 (AMOVA) 检测遗传变异来源, 计算群体间遗传分化系数 (F_{ST} statistics, F_{ST}) 及其显著性, 并采用 Tajima's D 和 Fu's F_s 中性检验估算群体历史动态变化 (Tajima, 1989; Fu, 1997)。应用 Network 4.0 (Bandelt *et al.*, 1999) 构建单倍型网络图。

2 结果与分析

2.1 序列碱基组成及变异

对 81 个样品的序列进行比对, 截除两端引物序列后, 大部分序列长度为 414 bp, 另外 8 条序列由于缺失 1 个碱基为 413 bp。以 414 bp 序列为标准, 1 ~ 18 bp 为 tRNA^{leu} 基因部分序列, 19 ~ 107 bp 为非编码区序列, 108 ~ 414 bp 为 CO II 部分序列。1 个碱基缺失发生在非编码区。所有序列碱基 A、T、G、C 的平均含量为 39.4%、45.2%、5.5% 和 9.9%, A + T 碱基含量 (84.6%) 明显高于 G + C 含量 (15.4%)。

序列变异分析结果显示共有 14 个变异位点,

其中 9 个在非编码区, 5 个在 CO II 编码区。一个变异位点为 A 缺失, 其余变异位点 A/G 有 6 个, T/C 有 3 个, A/T 有 3 个, A/C 有 1 个。变异位点包括 6 个简约信息位点和 7 个单一多态位点。

2.2 群体多样性

金华市中蜂共发现 14 个单倍型, 各地理群体的单倍型数量为 2 ~ 4 种 (表 1)。单倍型 JH1 为金华市所有 9 个地理群体的共享单倍型, 占金华市中蜂总样本数的 61.73%。金东、义乌和浦江的单倍型 JH1 占各自样本数不到 50%, 其余区县市单倍型 JH1 占各自样本数均超过 50%。单倍型 JH2 和 JH3 分别仅在金东和浦江的样本中发现, 且均占自身样本总数超过 50%; 单倍型 JH5 和 JH9 仅在东阳的样本中发现; 单倍型 JH6 仅在永康的样本中发现; 单倍型 JH7 和 JH10 仅在兰溪的样本中发现; 单倍型 JH11 和 JH12 仅在磐安的样本中发现; 单倍型 JH13 和 JH14 仅在义乌的样本中发现。所有单倍型中, 单倍型 JH9 和 JH13 序列在 NCBI 数据库中尚未见报道 (新申请的 NCBI 登录号分别为 MT263731 和 MT263732)。

金华市中蜂整体单倍型多样性 (Hd) 为 0.610 (表 1)。各个地理群体中, 义乌的单倍型多样性最高 (0.750), 其次是东阳 (0.639), 婺城、

表 1 金华市中蜂样本采集信息与多样性指数

Table 1 Sample information and diversity index of *Apis cerana cerana* in Jinhua

采样地点	群体代码	样本数	单倍型数	单倍型多样性	核苷酸多样性	核苷酸平均差异数	Tajima's D	Fu's F_s
Collecting locality	Population code	Number of samples	Number of haplotypes	Haplotype diversity (Hd)	Nucleotide diversity (Pi)	Average number of nucleotide differences (K)	中性检验	中性检验
婺城	WC	9	3	0.417	0.00054	0.222	-1.08823	-1.08110*
金东	JD	9	2	0.556	0.00134	0.556	1.40117	1.01511
兰溪	LX	9	3	0.556	0.00148	0.611	-0.58325	-0.53211
义乌	YW	9	4	0.750	0.00108	0.444	-1.36240	-1.15682
东阳	DY	9	3	0.639	0.00282	1.167	-0.84257	1.37772
永康	YK	9	2	0.500	0.00121	0.500	0.98627	0.84950
武义	WY	9	3	0.417	0.00054	0.222	-1.08823	-1.08110*
浦江	PJ	9	2	0.556	0.00134	0.556	1.40117	1.01511
磐安	PA	9	3	0.417	0.00107	0.444	-1.36240	-1.08110*
全部	ALL	81	14	0.610	0.00162	0.671	-2.06640**	-11.37870**

注: *, 差异显著 ($P < 0.05$); **, 差异极显著 ($P < 0.01$); 下同。Notes: *, significant difference ($P < 0.05$); **, extremely significant difference ($P < 0.01$); the same below.

武义、磐安的单倍型多样性最低 (均为 0.417)。金华市中蜂整体核苷酸多样性 (P_i) 为 0.00162, 各地理群体中东阳最高 (0.00282), 婺城和武义最低 (均为 0.00054)。各个地理群体的平均核苷酸差异数也是东阳最大, 婺城和武义最小。

2.3 群体遗传结构

金华市中蜂地理群体间的遗传距离分析显示 (表 2), 平均遗传距离为 0.002 ± 0.001 。金东 (JD)、浦江 (PJ)、东阳 (DY) 两两群体间的遗传距离最大, 均为 0.003, 而且这 3 个群体与金华市其它群体间的遗传距离也较大 (0.002 ~ 0.003)。婺城 (WC) 与武义 (WY) 群体间的遗传距离最小 (0.000)。

群体分子变异分析 (AMOVA) 结果显示, 金华市中蜂地理群体间有较明显的遗传分化 ($F_{ST} = 0.212, P < 0.01$), 但这种变异大部分来自于群体内部, 占 78.79%, 少部分的遗传变异来自于群体间, 占 21.21%。

各地理群体间的遗传分化系数 F_{ST} 为 $-0.125 \sim 0.500$ (表 2)。其中金东 (JD) 与金华市其它地理群体间的遗传分化系数 F_{ST} 最大 (0.286 ~ 0.500), 存在显著或极显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其次, 浦江 (PJ) 与金华市其它地理群体间的遗传分化系数 F_{ST} 也较大 (0.224 ~ 0.500), 存在显著或极显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 金华市中蜂地理群体间的遗传距离 (对角线上) 和遗传分化指数 (对角线下)

Table 2 Estimates of pairwise genetic distances (above diagonal) and the F_{ST} (below diagonal) among geographic populations of *Apis cerana cerana* in Jinhua

种群代码 Population code	WC	JD	LX	YW	DY	YK	WY	PJ	PA
WC		0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.000	0.002	0.001
JD	0.357*		0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.003	0.002
LX	0.357	0.344*		0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001
YW	0.013	0.325**	0.125		0.002	0.001	0.001	0.002	0.001
DY	0.081	0.286**	0.146	0.021		0.002	0.002	0.003	0.002
YK	0.150	0.406**	0.167	0.188*	0.188		0.001	0.002	0.001
WY	-0.125	0.357*	0.050	0.013	0.081	0.150		0.002	0.001
PJ	0.357*	0.500**	0.344*	0.325*	0.224*	0.406**	0.357*		0.002
PA	0.000	0.357*	0.050	0.107	0.136	0.150	0.000	0.357*	

2.4 群体历史动态

Tajima's D 中性检验和 Fu's F_s 中性检验可用于推测群体经历的历史。当 Tajima's D 和 Fu's F_s 呈负值, 并达到显著水平 ($P < 0.05$) 时, 可能预示着群体经历过群体扩张。而且一般认为, 与 Tajima's D 相比, Fu's F_s 能更好地检测种群扩张现象。本研究结果显示 (表 1), 婺城、兰溪、义乌、武义、磐安中蜂群体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 均为负值, 但是只有婺城、武义、磐安的 Fu's F_s 检验达到了显著差异 ($P < 0.05$)。金华市中蜂整体的 Tajima's D 和 Fu's F_s 均为负值, 且都达到了极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.5 系统进化树及单倍型网络图

利用邻接法 (NJ) 对 14 个单倍型进行聚类分析, 形成了两个较为明显的分支 (图 1), 单倍型 JH3 和 JH9 聚为一支, 其它单倍型聚为一支。结合单倍型在样本中的分布, JH3 来源于浦江, 且占浦江样本的大多数, JH9 来源于东阳的一个样本。利用单倍型网络图能够更直观看出各单倍型之间的演化关系以及在不同地理群体中的分布情况。单倍型网络图显示 (图 2), 其它单倍型都以单倍型 JH1 为中心辐射分布, 单倍型 JH1 可能是最原始的单倍型。

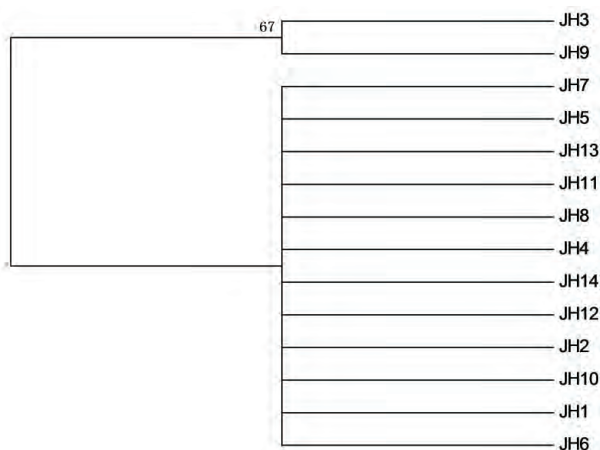


图1 基于邻接法对金华市中蜂单倍型聚类分析

Fig. 1 Neighbor-Joining (NJ) method for cluster analyses of haplotypes of *Apis cerana cerana* in Jinhua

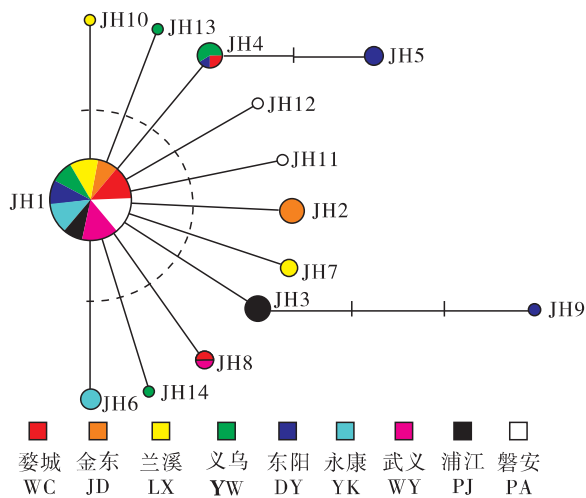


图2 金华市中蜂单倍型网络图分析

Fig. 2 Network of haplotypes of *Apis cerana cerana* in Jinhua

3 结论与讨论

蜜蜂是社会性昆虫，同一个蜂群里的所有工蜂具有相同的母系，因此利用线粒体 DNA 进行蜜蜂遗传多样性研究具有很大优势。目前已有大量基于线粒体 DNA 的中蜂遗传多样性研究，尤其是 mtDNA tRNA^{leu} ~ CO II 序列最为常用 (姜玉锁等, 2007; 周姝婧等, 2016; 李彪等, 2018; 王俊杰等, 2018)。本研究采用 mtDNA tRNA^{leu} ~ CO II 序列对金华市中蜂进行遗传多样性分析，便于与邻近地区中蜂已有研究数据进行对比分析。

本研究单倍型分析发现，单倍型 JH1 占金华

中蜂样本总数的 61.73%。而这一单倍型序列也是福建主体单倍型 (59.9%) (周姝婧等, 2016)，与已报道的广州序列 (姜玉锁等, 2007) 以及浙江省丽水市中蜂的主体单倍型 (41.5%) (曹联飞等, 2017) 也相同。说明金华市中蜂的主要遗传背景与浙江丽水以及福建、广州中蜂相同。单倍型网络图显示，其它单倍型都以单倍型 JH1 为中心辐射分布，说明单倍型 JH1 可能是最原始的单倍型，进而进化形成其它单倍型。这可能与群体历史动态分析显示的金华市中蜂群体经历了快速扩张有关。其它 13 个单倍型中有 11 个单倍型为某个地理群体的独享单倍型。单倍型 JH9 和 JH13 序列则为新发现的单倍型。说明各地理群体也有自己特有的遗传背景。

线粒体序列遗传多样性丰富程度主要以单倍型多样性 (Hd) 及核苷酸多样性 (Pi) 为指标。本研究结果显示，81 群金华中蜂共存在 14 个单倍型，平均单倍型多样性 Hd 为 0.610，平均核苷酸多样性 Pi 为 0.00162。之前邻近地区丽水基于相同基因序列的研究发现 94 群中蜂存在 20 个单倍型，平均单倍型多样性 Hd 为 0.772，平均核苷酸多样性 Pi 为 0.00352 (曹联飞等, 2017)。金华市中蜂的遗传多样性低于丽水市中蜂。金华交通便利，而丽水多山区地理隔离条件更好，可能是主要影响因素。基于相同基因序列的福建省中蜂遗传多样性研究发现，平均单倍型多样性为 0.484，平均核苷酸多样性为 0.00193 (周姝婧等, 2016)。金华市中蜂的平均核苷酸多样性略小于福建，而平均单倍型多样性金华市中蜂明显较大。可能的解释是金华市中蜂群体经历了快速扩张，扩张过程中积累了大量的新突变，单倍型多样性会非常丰富，但是没有充足的时间积累足够的核苷酸变异 (Avisé *et al.*, 1984)。本研究的群体历史动态研究结果也给予了支持。中蜂适应能力较强，当气候环境适宜时群体数量增长较快。金华市地处浙中丘陵盆地，蜜源植物丰富，可能为中蜂群体的快速扩张提供了有利条件。

当研究个体数较少时，核苷酸多样性 (Pi) 比单倍型多样性 (Hd) 更有说服力。金华市中蜂各地理群体中，东阳的核苷酸多样性最高 (0.00282)。此外，东阳与金华市其它地理群体间的遗传距离也较大，在东阳群体中还发现了新单

倍型 JH9, 聚类分析中单倍型 JH9 和 JH3 单独聚为一支, 说明东阳中蜂群体具有一定的特殊性。一般认为, $F_{ST} > 0.25$ 时, 群体间有很大的遗传分化。金东群体与金华市其它群体间的遗传分化系数 F_{ST} 较大 (0.286 ~ 0.500), 浦江群体与金华市其它群体间的遗传分化系数 F_{ST} 也较大 (0.224 ~ 0.500)。遗传距离分析也显示金东和浦江两个群体与金华市其它群体间的遗传距离较大。因此, 在未来金华市中蜂资源的保护与利用中, 金东、浦江、东阳群体需要给予重视。

参考文献 (References)

- Avice JC, Neigel JE, Arnold J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1984, 20 (2): 99 - 105.
- 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]
- 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]
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10 (3): 564 - 567.
- Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147 (2): 915 - 925.
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M. Evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis [J]. *Molecular Ecology*, 1992, 1 (3): 145 - 154.
- Jiang YS, Zhao HT, Jiang JB, et al. Studies on mtDNA tRNA^{leu} ~ COII gene polymorphisms of *Apis cerana* distributed in different geographic areas in China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40 (7): 1535 - 1542. [姜玉锁, 赵慧婷, 姜俊兵, 等. 中国境内不同地理型东方蜜蜂线粒体 DNA tRNA^{leu} ~ COII 基因多态性研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40 (7): 1535 - 1542]
- 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.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (21): 2947 - 2948.
- 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]
- Rozas J, Ferrer-mata A, Sánchez-delbarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34 (12): 3299 - 3302.
- Shi JH, Yang JY, Li K, et al. Analysis and suggestions on the development of bee industry in Zhejiang Province [J]. *Apiculture of China*, 2019, 70 (12): 54 - 56. [施金虎, 杨金勇, 李奎, 等. 浙江省蜂产业发展情况分析与建议 [J]. 中国蜂业, 2019, 70 (12): 54 - 56]
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123 (3): 585 - 595.
- Wang JJ, Li WM, Qiu LF, et al. The genetic diversity of *Apis cerana cerana* from Qinling - Daba mountain areas in Shaanxi Province based on mitochondrial DNA sequence analysis [J]. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2008, 46 (1): 84 - 90. [王俊杰, 李婉玫, 邱立飞, 等. 陕西秦巴山区中华蜜蜂线粒体 DNA 的遗传多样性 [J]. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 2018, 46 (1): 84 - 90]
- Zhao DX, Hua QY, Lou FF, et al. The present status, protection and utilization of the resource of *Apis cerana cerana* in Jinhua District [J]. *Journal of Bee*, 2012, 32 (6): 11 - 12. [赵东绪, 华启云, 楼芳芳, 等. 金华地区中华蜜蜂资源现状及其保护利用 [J]. 蜜蜂杂志, 2012, 32 (6): 11 - 12]
- Zhao DX, Su XL, Cao LF, et al. Morphometric characters of *Apis cerana cerana* in Zhejiang Province [J]. *Apiculture of China*, 2013, 64 (Z2): 4 - 9. [赵东绪, 苏晓玲, 曹联飞, 等. 浙江省中华蜜蜂形态特征研究 [J]. 中国蜂业, 2013, 64 (Z2): 4 - 9]
- Zhou SJ, Zhu XJ, Xu XJ, et al. Genetic variation and genetic diversity of *Apis cerana* from Fujian province based on mitochondrial DNA sequence analysis [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2016, 45 (3): 310 - 315. [周姝婧, 朱翔杰, 徐新建, 等. 福建东方蜜蜂线粒体 DNA 的遗传变异和遗传多样性 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2016, 45 (3): 310 - 315]