

重庆市4个中华蜜蜂地理种群形态及 mtDNA 多样性分析*

宾先丽¹, 刘璐¹, 谷瑛¹, 谭宏伟², 王瑞生³, 周泽扬¹, 许金山¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 重庆市畜牧技术推广总站, 重庆 401121;

3. 重庆市畜牧科学研究院, 重庆 402460)

摘要:选取重庆武陵山脉、大巴山脉以及大娄山脉的4个中华蜜蜂地理种群,对它们的形态和 mtDNA 非编码区遗传多样性进行了比较分析。6项形态指标聚类分析显示4个地理种群主要分为武陵-南川-江津支、南川-江津-城口支、城口支共3个大支。对 mtDNA tRNA^{leu}~CO II 段的序列进行测定并分析其中的非编码区,发现4个地理种群呈现5个单倍型,包括3个共有单倍型和2个种群特有单倍型,整体单倍型多样性为 0.754±0.005 59,核苷酸多样性为 0.018 19。单倍型网络中介分析和聚类分析发现,单倍型 H1, H3 为武陵与城口中华蜜蜂所共有,与湖北荆门中华蜜蜂2个单倍型最为近缘,而与南川-江津中华蜜蜂单倍型 H4 距离较远;单倍型 H2, H5 分别为城口和南川中华蜜蜂所特有,单倍型 H2 起源于单倍型 H3,单倍型 H5 与其余单倍型表现出分离。以上结果暗示重庆市4个中华蜜蜂地理种群形态分化与三大山脉地理环境具有关联性,但 mtDNA 多样性与地理无直接关系。

关键词:中华蜜蜂;形态;mtDNA;单倍型;多样性

中图分类号:Q963;Q964

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2016)05-0018-06

东方蜜蜂(*Apis cerana*)在分类学上属于昆虫纲(Insecta)、膜翅目(Hymenoptera)、蜜蜂科(Apidae)、蜜蜂属(*Apis*)。东方蜜蜂与西方蜜蜂一样,是人类能够系统饲养的一类蜂种。中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)为东方蜜蜂的一个亚种,在中国俗称“中蜂”,驯养历史悠久^[1]。20世纪中期,蜜蜂遗传资源分析、品种及品系的鉴定和遗传结构分析的主要手段是形态学方法,目前该方法仍然是许多学者在蜜蜂遗传多样性分析时的常用方法^[2-9]。然而,由于蜜蜂属于社会性昆虫,故通过分析线粒体母系遗传方式能够简便快捷地研究整个群体的遗传多样性。已有研究表明,不同亚种的蜜蜂会呈现出 mtDNA 的多态性^[10-11]。蜜蜂 mtDNA tRNA^{leu}~CO II 基因间包含了1个转运 RNA 编码基因和1个 A+T 富集区,该富集区为蜜蜂属特有的非编码区,是蜜蜂亚种分析的重要标记^[12]。有研究者根据蜜蜂 mtDNA tRNA^{leu}~CO II 基因间的 A+T 富集区进行多肽性分析,在150多群东方蜜蜂中共发现了40多种单倍型^[13],因此该区域已成为研究蜜蜂多样性和地理进化的有力工具^[14-18]。

重庆市地处中国西南部,长江上游地区,地貌以丘陵、山地为主,有几大山脉贯穿。重庆市几大自然保护区植物资源颇为丰富,为中华蜜蜂的繁衍生息提供了优越的自然条件;而蜜蜂作为主要的授粉昆虫,对重庆市各地区的植物多样性又起着重要作用。已有研究者对重庆市部分中华蜜蜂种群进行分析,例如于增源等人^[19]对重庆4个区县117群东方蜜蜂样品的 mtDNA 细胞色素 b 基因(*Cyt b*)部分序列进行了分析,认为4个区县的中华蜜蜂群体没有明显的遗传分化;曹联飞等人^[20]对重庆市金佛山地区东方蜜蜂进行了遗传多样性分析,发现3个新的单倍型。但目前为止,对重庆市所属的大巴山脉、大娄山脉和武陵山脉的中华蜜蜂地理种群之间的多样性关系尚不明确。因此,本研究选取了以上区域的4个中华蜜蜂地理种群进行形态和 mtDNA 的鉴定分析,以期找出它们的遗传多样性差异,为重庆市中华蜜蜂的保护和发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集重庆市中华蜜蜂4个地理种群和湖北荆门地区的中华蜜蜂,所有样本均为老桶养殖,每个蜂群采集成

* 收稿日期:2016-01-30 修回日期:2016-04-07 网络出版时间:2016-07-13 14:03

资助项目:重庆师范大学成果转化重点项目(2015年)

作者简介:宾先丽,女,研究方向蜜蜂生物学,E-mail:junbin1991@163.com;通信作者:许金山,教授,E-mail:xujinshan2008@cqnu.edu.cn

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20160713.1403.022.html

年工蜂50~100只,样本采集后用95%乙醇处理并浸泡于50 mL离心管中,不同地理种群样本信息见表1。

1.2 方法

1.2.1 形态测定方法 中华蜜蜂外部形态指标的测定采用Ruttner于1988年提出的方法^[21],并根据国家畜禽遗传资源委员会编的《中国畜禽遗传资源志(蜜蜂志)》中所要求检测的指标内容^[22],每群蜜蜂随机选取5只工蜂,对选取的工蜂测定右前翅的长、宽、面积,以及吻长、第3、4背板总长、肘脉指数共6个指标。

1.2.2 分子测定方法 采用动物基因组DNA快速抽提试剂盒(上海生工)提取中华蜜蜂全基因组DNA,并将之保存于-20℃,用

于后续实验。本研究所用引物为mtDNA tRNA^{leu}~CO II段通用引物E2:5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3', H2:5'-CAATATCATTGATGACC-3'^[23]。PCR扩增反应体系为:1 μL质量浓度为100 ng·μL⁻¹的DNA, 2.5 μL 10×Buffer, 2 μL浓度为2.5 mmol·L⁻¹的dNTP Mixture, 0.125 μL的Taq聚合酶(5 U·μL⁻¹),浓度为10 pmol·L⁻¹上下游引物各0.5 μL,最后加入ddH₂O补足25 μL。反应程序如下:95℃预变性5 min;94℃变性45 s,50~50.5℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸5 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。PCR产物送上海生工生物公司进行双向测序。

1.2.3 数据分析 利用SPSS 16.0软件对所获得的形态指标值进行分析,包括指标间的相关性比较、聚类分析以及判别分析。利用DnaSP 5^[24]分析序列的多态性,并估计序列的变异程度、和核苷酸替代率、基因差异程度。对原始序列用Mega 6软件进行比对^[25],用DnaSP 5分析序列单倍型,再利用Bayes法构建各地理种群单倍型系统进化树。用Arlequin 3.5^[26]软件进行分子方差分析(AMOVA)。利用Network5^[27]软件绘制种群单倍型的网络中介图。

2 结果与分析

2.1 重庆市4个中华蜜蜂地理种群的工蜂形态测定值

采集自重庆市4个地理种群的中华蜜蜂形态指标测定值如图1所示。翅长、翅宽、翅面积以及吻长之间有明显的线性相关性;而肘脉指数与上述指标相关性最为散乱,表明该指标为一个相对独立的指标。这与之前的报道结果相符^[28]。

2.2 重庆市4个中华蜜蜂地理种群形态指标聚类分析

对几个种群中华蜜蜂6项形态指标进行判别分析,结果显示重庆市的4种群中华蜜蜂与湖北荆门中华蜜蜂能够明显分隔开,重庆南川、江津、武隆等地的中华蜜蜂聚为核心群,而重庆城口部分样本分散在核心群外(封二彩图2)。进一步对6项形态指标进行聚类分析,结果显示重庆市的中华蜜蜂与湖北荆门明显分化为两支,具有地理差异性,重庆市内部中蜂可分为两大群,一类是城口中华蜜蜂,一类是南川、江津、武隆中华蜜蜂(图3)。以上两个结果表明,重庆市中华蜜蜂形态指标与地理分布位置间具有相关性。由于在地理分布上城口属于大巴山脉,南川、江津属于大娄山脉,而武隆属于武陵山脉,据此推测重庆市这4个地理种群的中华蜜蜂形态特征可分为大巴山型和大娄山-武陵山型。

2.3 重庆市4个中华蜜蜂地理种群mtDNA非编码区多态性分析

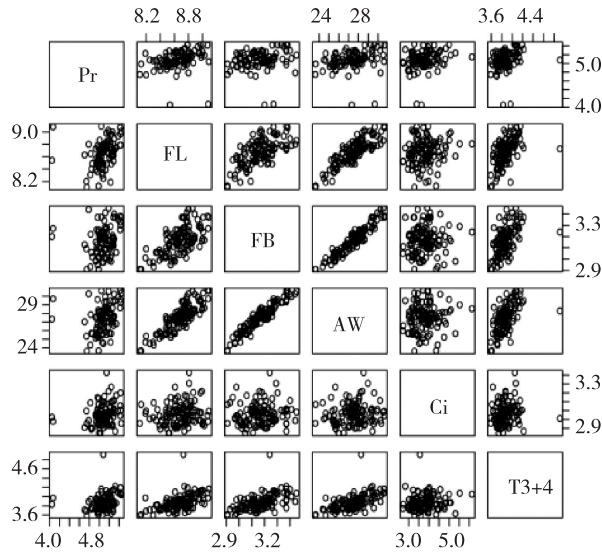
测定获得了所有样本的mtDNA tRNA^{leu}~CO II段的部分序列,包括一段非编码区和部分CO II序列,分析了非编码区序列,大小为97 bp。非编码区A, C, G, T等4种核苷酸的平均比例分别为48.0%, 7.0%, 5.1%, 39.9%; A+T所占比例为87.9%,表明该区域是一段A+T富集区,具有碱基偏倚性。进一步对重庆市4个地

表1 本研究中中华蜜蜂地理种群采样信息表

Tab. 1 The samples information of *A. cerana cerana* in this study

种群	编码	海拔/m	采样地点经纬度	样本个数
重庆城口(CK)	CK1	825	北纬 32°02', 东经 108°31'	2
	CK2	861	北纬 32°02', 东经 108°31'	2
	CK3	750	北纬 32°06', 东经 108°28'	2
	CK4	1 058	北纬 32°06', 东经 108°28'	2
重庆江津(JJ)	JJ1	1 114	北纬 28°38', 东经 106°24'	3
	JJ2	835	北纬 28°41', 东经 106°24'	2
重庆南川(NC)	NC1	900	北纬 29°00', 东经 107°18'	4
重庆武隆(WL)	WL1	184	北纬 29°19', 东经 107°45'	1
	WL2	310	北纬 29°19', 东经 107°28'	2
湖北荆门(HB)	HB1	258	北纬 31°18', 东经 113°03'	2
	HB2	258	北纬 31°18', 东经 113°03'	2

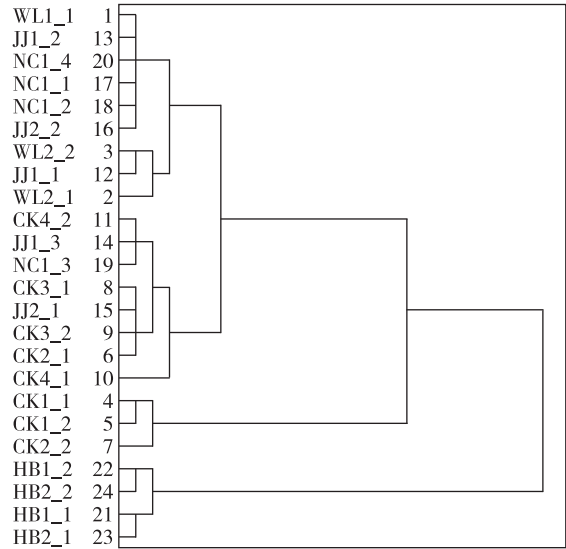
理种群和湖北荆门中蜂的分子遗传多样性进行分析(表 2),所有种群整体的平均核苷酸差异数为 1.764,核苷酸多样性为 1.819%。对各地理种群非编码区序列采用 Tajima's *D* 值进行中性检验,所有群体中性检验的 Tajima's *D* 值为-0.183 45,经显著性检验,其中 $p > 0.10$,符合中性突变。同时,对 4 个地理种群进行 AMOVA 分析(表 3),结果显示各地理种群 mtDNA 非编码区序列群体间的遗传变异为 31.86%,小于群体内的遗传变异(68.14%)。这说明样本种群的变异主要来自种群内部,而种群间的遗传变异较小。固定系数(F_{st})为 0.318 59,差异显著($p < 0.05$),表明 4 个地理种群间存在遗传分化。



注:Pr 表示吻长,FL 表示翅长,FB 表示翅宽,AW 表示翅面积, Ci 表示肘脉指数,T3+4 表示第 3、4 背板总长。

图 1 重庆市不同中华蜜蜂地理种群的 6 项形态指标测定值

Fig.1 Six morphological features of *A. cerana cerana* populations in Chongqing area



注:各种群编号前两个字母具体含义见表 1。下同

图 3 重庆市 4 个中华蜜蜂地理种群的形态指标聚类分析

Fig.3 The clustering of Chongqing *A. cerana cerana* populations based on six morphological indexes

表 2 重庆市 4 个中华蜜蜂地理种群地理种群内 mtDNA 非编码区序列多态性

Tab.2 Haplotype diversity of mitochondrial non-coding region in Chongqing *A. cerana cerana* populations

地理种群	样本数	单倍型数	变异位点数	单倍型多样性	平均核苷酸差异 <i>K</i>	核苷酸多样性 <i>Pi</i>	中性检验 Tajima's <i>D</i>	中性检验显著性
CK	8	4	5	0.75±0.019 36	1.785 71	0.018 41	-0.335 47	$p > 0.10$
JJ	5	1	0	0	0	0	0	0
NC	4	2	2	0.500±0.070 31	1	0.010 31	-0.709 90	$p > 0.10$
WL	3	2	1	0.667±0.098 77	0.667	0.006 87	-0.183 9	$p > 0.10$
HB	4	4	4	1.000±0.031 25	2.500	0.025 77	1.365 22	$p > 0.10$
总计	24	8	7	0.754±0.005 59	1.764	0.018 19	-0.183 45	$p > 0.10$

2.4 重庆市 4 个中华蜜蜂地理种群 mtDNA 非编码区单倍型分析

对本研究中的中华蜜蜂非编码区序列进行单倍型分析,共发现了 8 个单倍型,以单倍型 H1 为标准进行比较,共发现 7 个变异位点,占分析位点总数的 7.22%,单倍型变异度总体为 0.754±0.005 59(表 2),可见整体单倍型多样性较为丰富,其中城口单倍型有 4 种,最为丰富,江津只发现 1 个单倍型。根据获得的非编码区单倍型变异

表 3 重庆市 4 个中华蜜蜂地理种群 mtDNA 非编码区变异的分子方差分析

Tab.3 The analysis of molecular variance of mtDNA non-coding region among Chongqing *A. cerana cerana* populations

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比率	固定系数
群体间	4	8.125	0.299 39	31.86	0.318 59*
群体内	19	12.167	0.640 35	68.14	
总变异	23	20.292	0.939 74		

注:*表示差异显著($p < 0.05$)。

位点,利用 Network 5 绘制单倍型的网络中介图(封二彩图 4),结果显示 H1,H3,H4 为共有单倍型,其余为种群特有单倍型;单倍型 H1 和 H4 为两个主要的聚类簇,但是它们之间距离较远,H1 主要为城口中蜂,而单倍型 H4 则是南川和江津中蜂,武隆中蜂与城口中蜂为共有单倍型。

利用 Bayes 法对所获得的 8 个单倍型进行聚类分析(图 5),结果显示这些单倍型聚为两大支,单倍型 H4,H5,H6 聚为一支,其余单倍型聚为另一支。结合网络中介图(封二彩图 4),可以发现湖北荆门的中华蜜蜂仅有 1 个与重庆中华蜜蜂为共有单倍型,其余为种群特有单倍型,整体单倍型种类表现出与重庆中华蜜蜂的差异。然而在单倍型聚类结果中,荆门中华蜜蜂单倍型与重庆中华蜜蜂单倍型并没有表现出分离;重庆内部中华蜜蜂同一个地理种群单倍型也发生了分化,例如城口中蜂的 4 个单倍型分为 H1,H2,H3 和 H4,各自分化为两支。

3 讨论

本研究选取了湖北荆门的中华蜜蜂做为外群比较,主要是考虑到湖北省紧邻重庆市,但两地地形地势仍有差异,对中华蜜蜂遗传多样性比较具有一定辨识度。6 项形态指标聚类发现,湖北中华蜜蜂可区别于重庆中华蜜蜂,也表明本研究选取的外群中华蜜蜂具有参考价值。值得一提的是,调查的重庆 4 个中华蜜蜂地理种群的 6 项指标均高于湖北荆门,存在显著性差异($p < 0.05$)。由于重庆 4 个地理位置相对于湖北荆门地势为多山、丘陵地带,海拔更高,推测这种环境差异导致重庆 4 个中华蜜蜂地理种群需要更强的飞翔与寻觅蜜源的能力,这也是中华蜜蜂适应环境的结果^[29]。

进行形态指标聚类分析,发现城口中蜂与南川、江津中蜂具有明显差异,它们与地理位置具有一定关系:南川、江津属于大娄山脉,而城口位于大巴山脉。气候上城口为北亚热带山地气候,其他 3 个区县均为亚热带季风气候,可见地理差异与气候类型对中蜂形态差异也有影响^[30]。但是结果中有个别蜂群不符合地理差异,这可能是由于重庆中华蜜蜂养殖业的不断发展,蜂种的区县辗转导致了中华蜜蜂遗传资源的变化^[31-32]。

mtDNA 分子量小,具有严格的母系遗传方式和遗传自主性,研究动物种间和种内的 mtDNA 多态性,不仅可以了解近缘种及种内群体间亲缘关系,动物群体的遗传结构,也可以了解物种的形成和进化历程^[33],但是地理距离绝不是影响蜜蜂种群间的遗传亲缘关系的决定因素^[28],不同地理亚种之间的基因交流也会影响 mtDNA 的遗传多样性^[34]。本研究结果也支持了以上观点,即重庆市 4 个地理种群与湖北荆门的中华蜜蜂在形态差异上与地理有关,但是分子水平上并没有显示出地理相关性,比如城口和武隆中蜂形态上属于两个地理型,但是在分子上却具有共有单倍型。

总之,得益于重庆市独特的多山地势,三大山脉蕴藏着丰富的中华蜜蜂资源。本研究也证明了重庆市中华蜜蜂具有形态和分子水平的多样性,特别是城口中华蜜蜂,它的非编码区序列核苷酸突变位点数目相对最多,单倍型种类也最为丰富。但是当前重庆市养蜂业发展迅猛,部分区县存在商业育王的情况;又由于中华蜜蜂普遍具有较强的迁徙能力,存在频繁的自然分蜂现象;因而蜂群不断向外扩张,并与周边蜂群发生基因流动,终将导致遗传资源的混杂。因此,对重庆市不同中华蜜蜂地理种群资源的保护尤为必要。此外本研究仅用线粒体标记对重庆市中华蜜蜂遗传多样性进行调查研究,在今后的研究中可运用更多的遗传标记如微卫星 DNA、SNP 标记等,这样将更加有助于深入了解重庆市乃至三峡库区中华蜜蜂的遗传结构。

参考文献:

[1] 陈盛祿. 中国蜜蜂学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
Chen S L. The apicultural science in China[M]. Beijing:
China Agriculture Press,2001.

[2] 谭垦,祁文忠. 甘肃东方蜜蜂的形态特征研究[J]. 蜜蜂杂志,2004(3):6-7.
Tan K, Qi W Z. Morphometric study of *A. cerana* in Gansu

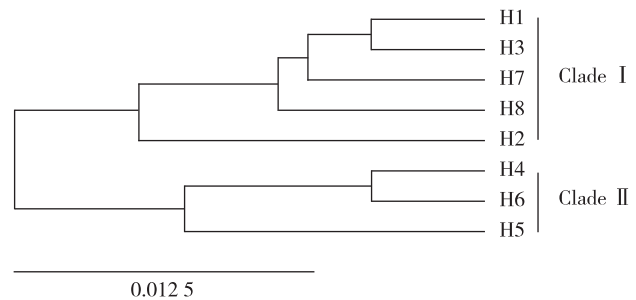


图 5 使用贝叶斯法构建的重庆各地理种群 mtDNA 非编码区单倍型分子系统树

Fig. 5 Bayesian trees of eight haplotypes derived from non-coding region of mtDNA tRNA^{Leu}~CO II fragment in Chongqing

A. cerana cerana populations

- [J]. Journal of Bee, 2004(3): 6-7.
- [3] 谭昱, 张炫, 和绍禹, 等. 云南东方蜜蜂的形态特征数值分类研究[J]. 中国养蜂, 2003, 54(3): 4-6.
Tan K, Zhang X, He S Y, et al. Morphometric and biogeography of Yunnan *A. cerana* [J]. Apiculture of China, 2003, 54(3): 4-6.
- [4] 谭昱, 张炫, 和绍禹, 等. 中国东方蜜蜂的形态学及生物地理学研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(3): 410-414.
Tan K, Zhang X, He S Y, et al. Morphology and biogeography of *Apis cerana* (Fabr.) in China [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2005, 20(3): 410-414.
- [5] 谭昱, 张炫. 云南省东方蜜蜂形态学研究[J]. 蜜蜂杂志, 2001(6): 3-4.
Tan K, Zhang X. Morphology study of *A. cerana* in Yunnan [J]. Journal of Bee, 2001(6): 3-4.
- [6] 谭昱, 葛凤晨, 赵蓉, 等. 长白山东方蜜蜂的形态特征研究[J]. 蜜蜂杂志, 2004(6): 8-9.
Tan K, Ge F C, Zhao R, et al. Morphometric characters of Changbaishan *A. cerana* [J]. Journal of Bee, 2004(6): 8-9.
- [7] 苏松坤, 陈盛禄. 意蜂王浆生产性能形态学遗传标记的研究[J]. 遗传, 2003, 25(6): 677-680.
Su S K, Chen S L. Research on morphological genetic marker of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) in royal Jelly production performance [J]. Hereditas, 2003, 25(6): 677-680.
- [8] Ruttner F, Tassenocourt L, Louvaux J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. [J]. Apidologie, 1978, 9(4): 363-381.
- [9] 樊贤, 谭昱, 和绍禹. 河南东方蜜蜂的形态特征研究[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(2): 235-238.
Fan X, Tan K, He S Y. Morphometric characters of *Apis cerana* in Henan province [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2006, 21(2): 235-238.
- [10] Arias M C, Sheppard W S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence [J]. Molecular Phylogenetics and evolution, 1996, 5(3): 557-566.
- [11] Onuma S, Siriporn S, Sirawut K. Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand [J]. Biochem Genet, 2006, 44(56): 256-269.
- [12] Cornuet J M, Carney L, Solignac M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA [J]. Genetics, 1991, 128(2): 393-403.
- [13] Smith D R, Villafuerts G, Palmer M. Biogeography of *Apis cerana* F. and *Apis nigrocincta*: insights from mtDNA studies [J]. Apidologie, 2000, 31(2): 265-279.
- [14] Yin L, Ji T. Genetic diversity of the honeybee *Apis cerana* in Yunnan, China, based on mitochondrial DNA [J]. Genetics and Molecular Research, 2013, 12(2): 2002-2009.
- [15] De L R P, Simon U A, Moritz R, et al. MtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines [J]. Heredity, 2000, 84(1): 124-130.
- [16] Özdil F, İlhan F. Phylogenetic relationship of Turkish *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase I region [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(2): 1130-1141.
- [17] Willis L G, Winston M L, Honda B M. Phylogenetic relationships in the honeybee (genus *Apis*) as determined by the sequence of the cytochrome oxidase II region of mitochondrial DNA [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1992, 1(3): 169-178.
- [18] 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}~CO II 基因多态性研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1535-1542.
Jiang Y S, Zhao H T, Jiang J B, et al. Studies on mtDNA tRNA^{leu}~CO II gene polymorphisms of *Apis cerana* distributed in different geographic areas in China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(7): 1535-1542.
- [19] 于增源, 刘意秋, 周丹银, 等. 利用线粒体 Cytb 为遗传标记分析重庆地区东方蜜蜂的遗传多样性 [J]. 蜜蜂杂志, 2012, 32(11): 1-3.
Yu Z Y, Liu Y Q, Zhou D Y, et al. Genetic diversity of *Apis cerana* in Chongqing using mtDNA cytochrome b gene sequences [J]. Journal of Bee, 2012, 32(11): 1-3.
- [20] 曹联飞, 姬聪慧, 任勤, 等. 重庆金山地区东方蜜蜂遗传多样性研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 35(5): 162-166.
Cao L F, Ji C H, Ren Q, et al. Report on genetic diversity of *Apis cerana* in Jinpo mountain of Chongqing [J]. Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition, 2010, 35(5): 162-166.
- [21] Ruttner. Biogeography and taxonomy of honeybees [M]. Berlin: Springer, 1988.
- [22] 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.
China National Commission of Animal Genetic Resources. Animal genetic resources in China (Bees) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- [23] Garnery L, Cornuet J M, Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis [J]. Molecular Ecology, 1992, 1(3): 145-154.
- [24] Rozas J, Rozas R. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data [J]. Comput Applic Biosci, 1995, 11(6): 621-625.

- [25] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 2725-2729.
- [26] Excoffier L, Lischer H E L. 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.
- [27] Bandelt H J, Forsterr P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies[J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37-48.
- [28] 吉挺. 中国东方蜜蜂资源遗传多样性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2009.
Ji T. Research of genetic diversity among *Apis cerana* in China[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009.
- [29] 任再金, 孙庆海. 西藏蜜蜂资源状况[J]. *中国养蜂*, 1985(5): 9-10.
Ren Z J, Sun Q H. Tibet *Apis* resources[J]. *Apiculture of china*, 1985(5): 9-10.
- [30] 杨冠煌, 许少玉, 匡邦郁. 东方蜜蜂 *Apis cerana* Fab. 在我国分布及其亚种分化[J]. *云南农业大学学报*, 1986(1): 89-92.
Yang G H, Xu S Y, Kuang B Y. The distribution of the Genus *Apis cerana* Fab. in China and some of its subspecies[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 1986(1): 89-92.
- [31] 余林生, 邹运鼎, 毕守东, 等. 安徽省蜜蜂种群消长及其分布与自然环境的关系[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(8): 1465-1468.
Yu L S, Zhou Y D, Bi S D, et al. Relationships of bee population fluctuation and distribution with natural environment in Anhui province[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(8): 1465-1468.
- [32] 余林生, 邹运鼎, 曹义锋, 等. 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 与中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 生态位的比较[J]. *生态学报*, 2008, 28(9): 4575-4581.
Yu L S, Zhou Y D, Cao Y F, et al. Comparative study on the niches of *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(9): 4575-4581.
- [33] 张亚平, 施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况[J]. *动物学研究*, 1992, 13(3): 289-298.
Zhang Y P, Shi L M. Animal research of mitochondrial DNA polymorphism overview[J]. *Zoological Research*, 1992, 13(3): 289-298.
- [34] Bertrand B. MtDNA COI-COII marker and drone congregation area: an efficient method to establish and monitor honeybee (*Apis mellifera* L.) conservation centres[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(3): 673-83.

Animal Sciences

Morphological and mtDNA Diversity of Four *Apis cerana cerana* Populations in Chongqing

BIN Xianli¹, LIU Lu¹, GU Ying¹, TAN Hongwei², WANG Ruisheng³, ZHOU Zeyang¹, XU Jinshan¹

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Chongqing City Animal Husbandry Technology Extension Station, Chongqing 401121;

3. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China)

Abstract: In this study, four *Apis cerana cerana* populations, collected from Chongqing Wuling, Daba and Dalou Mountains respectively, were subjected to survey their morphological diversity and haplotypes polymorphism. The cluster of six morphological indexes showed that these four populations can be formed three apparent clades, which included Wulong-Jiangjin clade, Nanchuan-Jiangjin-Chenkou clade and Chenkou clade. After sequencing and analyzing of non-coding region from mtDNA tRNA^{leu}~COII segment, these population presented five haplotypes, three of which were shared commonly and two were exclusive in a certain population. The haplotypes diversity of all populations surveyed here were computed to be 0.754 ± 0.00559 , and nucleotides polymorphism were 0.01819. Based on phylogenetic tree of haplotypes, it can be shown that haplotype H1 and H3, which shared commonly among Wulong and Chenkou *Apis* populations, were closely related to the two haplotypes from Jinmen of Hubei than haplotype H4 that shared among Nanchuan and Jiangjin populations; Haplotype H2 presented only in Chengkou populations and H5 only exist in Nanchuan populations. All the results above suggested that morphological diversity of Chongqing bees was related to the geographic distribution of Chongqing that surrounded by three mountains; however, there was no correlation between the mtDNA polymorphism of Chongqing bees and geographic distribution.

Key words: *Apis cerana cerana*; morphological; mtDNA; haplotype; diversity