基于微卫星标记的饶河黑蜂亲缘关系分析*

彭文君[1**] 罗其花[2***] 李长春[2] 刘晓东[2] 马玉珍[2]

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 北京市密云县园林绿化局 北京 101500)

摘 要 为了摸清我国饶河黑蜂(亦称东北黑蜂)群体与俄罗斯蜜蜂(亦称 USDA-ARS 俄罗斯蜜蜂)、C 形态学分支的卡尼鄂拉蜂 *Apis mellifera carnica*、O 形态学分支的高加索蜂 *Apis mellifera caucasica* 和安拉托尼亚蜂 *Apis mellifera anatoliaca* 之间的亲缘关系,本试验运用 16 个微卫星 DNA 标记,以来自饶河县 7 个区域(东北黑蜂国家级自然保护区所在地)的东北黑蜂为研究对象,其它 5 个蜜蜂群体为对照,分析了东北黑蜂与其他西方蜜蜂的亲缘关系、群体遗传结构和种质特性。结果表明东北黑蜂群体与俄罗斯蜜蜂亲缘关系最近(遗传距离$(d\mu)^2 = 0.31 \sim 0.55$),在遗传进化关系上处于同一进化分支,而与高加索蜂、安拉托尼亚蜂和卡尼鄂拉蜂的亲缘关系相对较远(遗传距离$(d\mu)^2 = 0.52 \sim 0.86$)。该实验结果进一步证明东北黑蜂起源于俄罗斯蜜蜂,其对东北黑蜂的选育、推广和保护具有重要的现实意义。

关键词 饶河黑蜂,俄罗斯蜜蜂,遗传距离,亲缘关系,微卫星标记

Genetic relationships of the Raohe black bee (*Apis mellifera* ssp.) inferred from microsatellite markers

PENG Wen-Jun[1**] LUO Qi-Hua[2***] LI Chang-Chun[2] LIU Xiao-Dong[2] MA Yu-Zhen[2]

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;
2. Miyun County Bureau of Landscape and Forestry, Beijing 101500, China)

Abstract Population genetic structure and differentiation among Northeastern black bee (also known as the Raohe black bee), Russian bee (also called the USDA-ARS Russian honey bees), *Apis mellifera carnica* (of the C morphological group), *Apis mellifera caucasica* (of the O morphological group) and *Apis mellifera anatoliaca* (also of the O morphological group), honeybee populations samples from 7 areas in Raohe county (where the China National Nature Reserve for the black bee is located) were assessed on the basis of 16 microsatellite loci. The results show that the genetic relationship between the Raohe black bee and Russian bee was the closest (genetic distance $(d\mu)^2 = 0.31 - 0.55$) and that genetic relationships between the Raohe black bee, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* and *A. m. anatoliaca* were relatively distant (genetic distance $(d\mu)^2 = 0.52 - 0.86$). These results provide genetic evidence supporting a Russian origin for the Raohe black bee, and could help inform selective breeding programs and the design and location of reserves for variety that are more likely to resist invasion.

Key words Raohe black bee, Russian bee, genetic relationships, genetic distance, microsatellites

东北黑蜂国家级自然保护区位于黑龙江省饶河县,因此东北黑蜂亦称饶河黑蜂。东北黑蜂是被长期生产实践证明了的适应中国北方气候和蜜源特点的优良蜂种,其特点是具有较强的采蜜能力,既能利用大宗蜜源,又能利用零星蜜源(孙德山和金垣,1987;潘云河等,1996);在生产中表现出极强的抗逆性,对蜡螟、幼虫病、微孢子虫病、白垩病等具有较强的抵抗能力,而且耐低温,在冬季低温为 -32 ~ -35℃ 的环境条件下,可在户外安全越冬(刘清河,2006;张守明,2006)。东北黑蜂

* 资助项目:农业部引进国际先进农业科学技术"948"滚动项目(2006-G19)。

** E-mail: pengwenjun@vip.sina.com

*** 通讯作者,E-mail: luoqihua0825@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-02-07,接受日期:2012-03-28

还是作为杂种优势利用的重要蜂种之一,东北黑蜂与黄色蜂种杂交后,其杂交一代的蜂蜜产量可提高 30% 以上,且抗病能力显著增强(何康,1993;龚一飞和张其康,2000;陈盛禄,2001);东北黑蜂和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 杂交是获得高质量王浆的组合,东北黑蜂和乌克兰蜂 *Apis mellifera acervorum* 杂交亲和力较高(刘艳荷等,2001;刘艳荷和陈盛禄,2001;苏松坤等,2003)。目前,东北黑蜂已被大部分种王场作为杂种优势利用的父本或母本,培育商品王以提高养蜂生产能力。

东北黑蜂是我国养蜂生产中的重要蜂种之一,然而对于东北黑蜂的亲缘关系至今仍不明确。在西方蜜蜂分类上,国外很多研究者先后采用形态学测定(Ruttner,1988)、线粒体 DNA 序列分析技术(Garnery *et al.*, 1993;Smith *et al.*, 1997)、单核苷酸多态性分析技术(Whitfield *et al.*, 2006)和微卫星标记技术(Franck *et al.*, 1998, 2000, 2001),将西方蜜蜂分为了四大进化分支,即非洲类型(A)、西欧和北欧类型(M)、地中海东部类型(C)和近东类型(O)。迄今为止,根据东北黑蜂的饲养史、体型、体色以及一些简单的形态指标的分析,有关研究者认为东北黑蜂是欧洲黑蜂 *Apis mellifera mellifera* 的一个生态型(何康,1993;葛凤晨等,1996;龚一飞和张其康,2000;陈盛禄,2001;马英和鞠桂兰,2001);也有研究者认为东北黑蜂是高加索蜂 *Apis mellifera caucasica* 或卡尼鄂拉蜂 *Apis mellifera canica* 的后代(葛凤晨等,1996;黄文诚,2000)。彭文君等(2009)采用线粒体 DNA 序列分析技术和线粒体 DNA 聚合酶链式反应 - 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术,将东北黑蜂归为线粒体 O 分支,即近东类型。为了摸清我国东北黑蜂与 O 分支的高加索蜂、安拉托尼亚蜂 *Apis mellifera anatoliaca*、俄罗斯蜜蜂(亦称 USDA-ARS 俄罗斯蜜蜂)和另一黑色蜂种卡尼鄂拉蜂(C 分支)之间的亲缘关系,本文采用微卫星标记技术对东北黑蜂保护区内的蜜蜂群体和其他参考群体进行了比较研究,以期为东北黑蜂的进一步保护、蜜蜂育种、纯种鉴定、种群进化研究以及基因渗入监测等方面提供理论依据和现实指导意义。

1　材料与方法

1.1　样品采集和 DNA 提取

样本采集地点涉及黑龙江省饶河县 7 个区域(CA, CB, CC, CD, CE, CF 和 CG),详见表 1。俄罗斯蜜蜂 RA 群体和 RB 群体来自于牡丹江农科院保种场;高加索蜂(O - C)、安拉托尼亚蜂(O - A)和卡尼鄂拉蜂(C - C)来自于吉林种蜂场。样本采集地点以区域为单位,每个区域或乡镇随机采集 3 ~ 10 个蜂场(表 1),蜂场之间的距离至少为 15 km,每个蜂场随机采集 3 ~ 5 群蜂,每群蜂只采集工蜂 1 只。样品采集后直接投入 75% 的酒精瓶,-20℃ 保存待用。DNA 的提取方法参照 Garnery 等(1993)。

1.2　微卫星位点扩增和片段分析

根据文献报道,NCBI 数据库检索和之前的预实验,我们共筛选到多态性稳定的微卫星引物位点 16 个,分别是 A011, A113, A107, A124, A024, A028, A306, A007, A088, A014, A085, A001, A256, A036, A033 和 A226 (Estoup *et al.*, 1994, 1995, 1996; Baudry *et al.*, 1998; Solignac *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005)。PCR 反应总体积为 15 μL,其中 DNA 模板 15 ~ 50 ng,荧光标记的正反向引物各 1.5 μmol,dNTP Mixture 1.2 mmol,$MgCl_2$ 0.75 ~ 1.5 mmol,*Taq*DNA 聚合酶 0.075 U。扩增采用 Mastercycler 5330 自动循环仪(德国 Eppendorf 公司)。PCR 反应条件:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,53 ~ 58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,4℃ 保存。各引物退火温度、引物序列和 $MgCl_2$ 浓度参考 Estoup 等(1995)和 Solignac 等(2003)。扩增片段采用 ABI 377 测序仪(美国应用生物系统公司)进行电泳分离,并使用 GENESCAN 3.1 软件和 GENOTYPER DNA 2.5 片段分析软件进行分析。

1.3　统计分析

采用 GENEPOP 3.2 软件(Raymond and Rousset, 1995)计算 F-statistics 分化指数(F_{st}),并由 Benferroni 程序计算其显著性;采用 DISPAN 软件(Ota, 1993)计算东北黑蜂与其他参考蜜蜂群体之间的 Nei's 遗传距离$(d\mu)^2$;采用邻接法(NJ)和非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析(Saitou and Nei, 1987),并利用 Bootstrap Test 检验

表 1 采样地点及采集数量

Table 1 Sampled localities and number of workers, colonies and apiaries sampled

实验群体[a] Population	采样点 Localities	N[b]	纬度 Latitude	经度 Longtitude
CA	饶河县(Raohe county)	35/35/9	47.34N	133.72E
CB	饶河县(Raohe county)	35/35/10	46.55N	133.66E
CC	饶河县(Raohe county)	35/35/9	46.96N	134.06E
CD	饶河县(Raohe county)	35/35/8	47.19N	133.58E
CE	饶河县(Raohe county)	35/35/9	47.03N	133.33E
CF	饶河县(Raohe county)	35/35/8	46.79N	134.00E
CG	饶河县(Raohe county)	35/35/9	47.08N	133.31E
RA	牡丹江农科院保种场(Reservation Station of Mudanjiang Academy of Agricultural Sciences)	35/35/3		
RB	牡丹江农科院保种场(Reservation Station of Mudanjiang Academy of Agricultural Sciences)	35/35/3		
O-C	吉林养蜂所种蜂场(Reservation Station of Jilin Institute of Apicultural Research)	35/35/3		
O-A	吉林养蜂所种蜂场(Reservation Station of Jilin Institute of Apicultural Research)	35/35/3		
C-C	吉林养蜂所种蜂场(Reservation Station of Jilin Institute of Apicultural Research)	35/35/3		

[a] CA,CB,CD,CE,CF,CG 代表东北黑蜂; RA,RB 代表俄罗斯蜜蜂; O-C 代表高加索蜂; O-A 代表安拉托尼亚蜂; C-C 代表卡尼鄂拉蜂。下表及下图同。

[b] 采集的工蜂数量/蜂群数/蜂场数。

[a] CA,CB,CD,CE,CF,CG = Raohe black bee; RA,RB = Russian bee; O-C = *A. m. caucasica*; O-A = *A. m. anatoliaca*; C-C = *A. m. carnica*. The same below.

[b] Number of workers/colonies/ apiaries sampled.

所得聚类结果可靠性。

由于从系统发生树中不能发现瓶颈效应对群体的影响和群体的混杂程度,而采用主成分分析能够考虑到群体的混杂程度,主成分分析可以使大量的变异数据转变为少量的不相关的变异数据而不会丢失太多的信息(罗玉柱等,2009),因此本实验采用 Genetix 4.0 (Belkhir *et al.*, 2004) 软件进行主成分分析,并由 AFC sur populations' option 程序绘制三维图,验证聚类结果。

Pritchard 等(2000)应用多座位的基因型数据和类聚的方法建立了一种推导群体和估计个体遗传结构的贝叶氏模型,它可以区分具有不同等位基因频率的亚群体。模型先假设研究个体的基因(遗传物质)来自于 K 个祖先或 K 个不同的群体,且多座位的基因频率遵循哈代-温伯格定律,根据基因频率将同一群体的不同个体归入不同的遗传背景中(用不同颜色表示),不同背景的数目与 K 的取值是一致的,K 事先给定,K 取大于等于 1 的整数,K 的最大数值取决于最终的分类数,当分类不明显时(用各背景的颜色比例来区分),K 的取值即终止(Rosenberg, 2004)。本实验根据 Pritchard 等(2000)的方法,采用 STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) 和 DISTRUCT(Rosenberg, 2004)软件对东北黑蜂群体进行遗传结构推导分析。

2 结果与分析

2.1 遗传距离和遗传分化指数估计

东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂 RA 群体之间的遗传距离最小($(d\mu)^2 = 0.31 \sim 0.43$,表 2),其次是与俄罗斯蜜蜂 RB 群体($(d\mu)^2 = 0.47 \sim 0.55$),说明东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂之间的亲缘关系最近;东

北黑蜂与安拉托尼亚蜂($(d\mu)^2$ = 0.49 ~ 0.68)、高加索蜂($(d\mu)^2$ = 0.61 ~ 0.84)、卡尼鄂拉蜂($(d\mu)^2$ = 0.66 ~ 0.86)之间的亲缘关系较远。东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂的群体遗传分化指数在 0.12 ~ 0.19 之间(表 2),与安拉托尼亚蜂的群体遗传分化指数在 0.19 ~ 0.21 之间,与高加索蜂的群体遗传分化指数在 0.19 ~ 0.22 之间,与卡尼鄂拉蜂的群体遗传分化指数在 0.19 ~ 0.24 之间。

表 2　遗传分化指数 F_{st} 值(对角线下方)和遗传距离 $(d\mu)^2$(对角线上方)

Table 2　Pairwise multilocus unbiaised estimate of F_{st} (below diagonal) and genetic distance $(d\mu)^2$ (above diagonal) in honeybee populations

	CA	CB	CC	CD	CE	CF	CG	RA	RB	O – C	O – A	C – C
CA		0.13	0.24	0.12	0.26	0.16	0.18	0.31	0.50	0.73	0.55	0.70
CB	0.05**		0.16	0.10	0.24	0.13	0.22	0.36	0.50	0.63	0.56	0.66
CC	0.09**	0.06**		0.19	0.36	0.21	0.30	0.41	0.55	0.72	0.57	0.86
CD	0.05**	0.03**	0.07**		0.19	0.09	0.19	0.34	0.47	0.63	0.52	0.71
CE	0.12**	0.10**	0.14**	0.08**		0.17	0.27	0.43	0.52	0.84	0.68	0.82
CF	0.06**	0.05**	0.08**	0.03**	0.07**		0.16	0.35	0.46	0.61	0.50	0.67
CG	0.07**	0.08**	0.11**	0.07**	0.11**	0.06**		0.35	0.50	0.72	0.49	0.73
RA	0.14**	0.14**	0.16**	0.14**	0.18**	0.14**	0.14**		0.29	0.83	0.80	0.90
RB	0.17**	0.16**	0.18**	0.16**	0.19**	0.15**	0.17**	0.12**		0.90	0.88	1.01
O – C	0.22**	0.19**	0.21**	0.20**	0.25**	0.19**	0.21**	0.25**	0.24**		0.44	0.69
O – A	0.21**	0.20**	0.20**	0.19**	0.25**	0.19**	0.19**	0.27**	0.26**	0.17**		0.62
C – C	0.21**	0.19**	0.22**	0.20**	0.24**	0.19**	0.21**	0.25**	0.24**	0.20**	0.21**	

注: * 表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。

Data followed by * indicate siginificantly different at 0.05 level, and followed by ** indicate extremely significantly different at 0.01 level.

2.2　系统发生关系分析

从 Nei 氏遗传距离和邻接法(NJ)法构建的系统发生树中可以看出(图 1),2 个俄罗斯蜜蜂群体与 7 个东北黑蜂群体聚为一类,且自展值较高(98%),表明其亲缘关系最近。高加索蜂(O – C)和安拉托尼亚蜂(O – A)聚为一类,卡尼鄂拉蜂(C – C)单独成一类,它们与中国东北黑蜂群体表现出较远的亲缘关系。该结果与遗传距离估计值反应的结果一致。

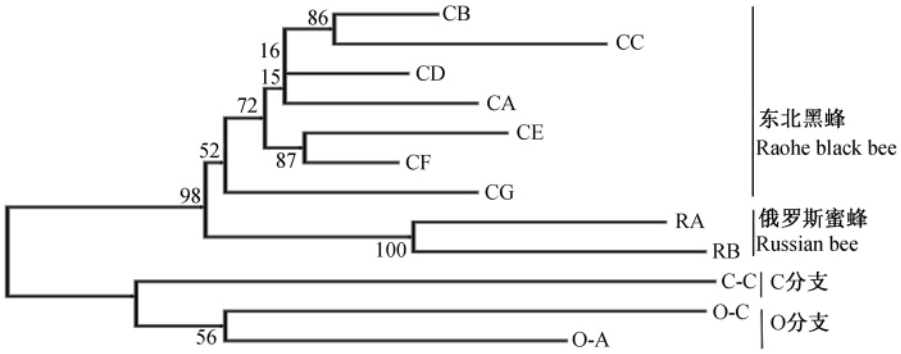

图 1　遗传距离 NJ 法构建的系统发生树

Fig. 1　NJ phylogenetic tree

2.3　主成分分析

由主成分分析结果可看出(图 2),在三维空间内,东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂的坐标距离最近,可见东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂具有相似的主要成分

值。高加索蜂(O－C)、安拉托尼亚蜂(O－A)和卡尼鄂拉蜂在主成分坐标系中均远离俄罗斯蜜蜂2个群体和东北黑蜂7个群体,表明3个参考群体与东北黑蜂和俄罗斯蜜蜂群体在主成分上都具有较大的差异。

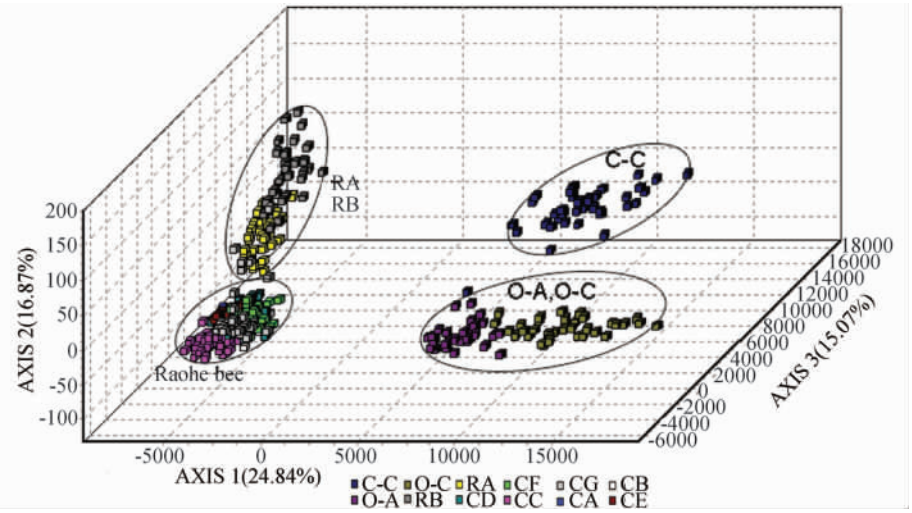

图2　三维图展示12个实验群体的亲缘关系(主成分分析法)

Fig. 2　Three dimensional representation of the factorial correspondence analysis based on microsatellite genotypes for test 12 populations

2.4　群体遗传结构的推导

本实验先假定研究的12个群体可以分为两类,即有两个共同祖先,也就是 K 取值为2时,可看出东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂在遗传结构上不同于高加索蜂(O－C)、安拉托尼亚蜂(O－A)和卡尼鄂拉蜂(C－C)(图3),当 $K=3$ 时(假定这12个蜜蜂群体有3个共同祖先),东北黑蜂从俄罗斯蜜蜂群体中分开,即东北黑蜂单独成一类,俄罗斯蜜蜂成一类,其余3个群体共同成一类。当 $K=4$ 时(假定这12个蜜蜂群体有4个共同祖先),卡尼鄂拉蜂被分离出来,单独成一类,这种分类结果与系统发生树和主成分分析结果一致。当 $K=5$ 时,已经不能看出新的分类结果,因此12个蜜蜂群体可以分为4类,即俄罗斯蜜蜂第一类,高加索蜂(O－

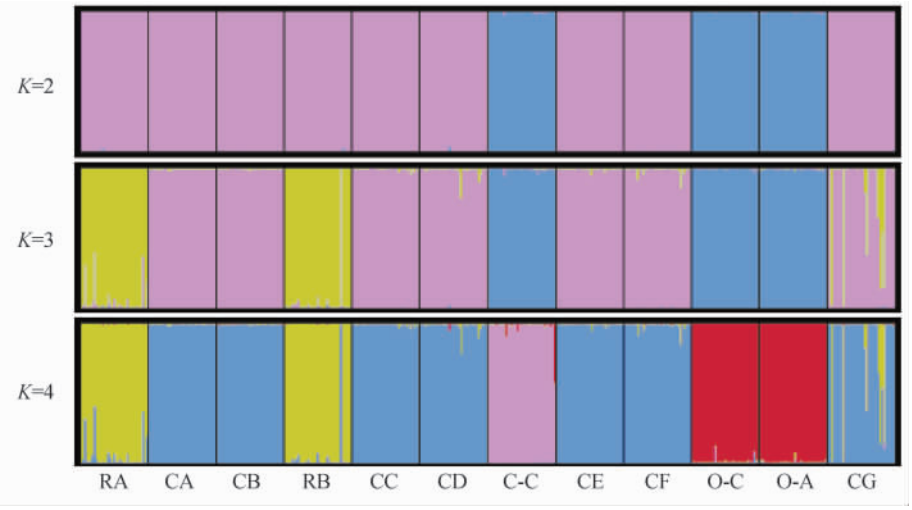

图3　群体遗传结构的推导

Fig. 3　Estimated population structure

C)和安拉托尼亚蜂(O－A)第二类,卡尼鄂拉蜂(C－C)第三类,其余的东北黑蜂第四类。这种分类结果与构建的系统发生树和主成分分析结果相一致。

3　讨论

彭文君等(2009)前期采用线粒体 DNA 序列分析技术和线粒体 DNA PCR－RFLP 分析技术,将我国东北黑蜂归为 O 分支,即近东类型,但是由于 O 分支西方蜜蜂亚种的线粒体 DNA 序列高度相似,因此仅靠线粒体 DNA 序列分析技术很难再将同一线粒体分支的西方蜜蜂亚种进行细分。本实验结果表明,35 只不相关的工蜂样本和 16 对多态性稳定的微卫星引物能很好将 C、O 分支的西方蜜蜂亚种分开。因此,线粒体 DNA 序列分析技术结合微卫星标记技术可以有效地应用于西方蜜蜂亚种的种质特征分析和亲缘关系分析。

遗传分化指数 F_{st} 值常被用来衡量种群之间的分化程度(Wright,1965,1978):F_{st} = 0～0.05 表示很小的遗传分化或没有发生遗传分化;F_{st} = 0.05～0.15 表示中等程度的遗传分化;F_{st} = 0.15～0.25 表示发生了高的遗传分化,F_{st} > 0.25 表示发生了非常高的遗传分化。根据以上判断标准,东北黑蜂种群自身也发生了中等程度的遗传分化(0.03～0.12),而东北黑蜂与俄罗斯蜜蜂、O 分支的安拉托尼亚蜂和高加索蜂、C 分支的卡尼鄂拉蜂之间出现高的遗传分化(F_{st} = 0.14～0.27),表明东北黑蜂在引入我国后,经过长达近 100 年的人工选育和改良,其进化方向已不同于同一线粒体分支的其他西方蜜蜂亚种。

系统发生关系分析、主成分分析和遗传结构推导分析得到相同的结果:12 个蜜蜂群体被分为了 4 类,即东北黑蜂、俄罗斯蜜蜂、O 类群(安拉托尼亚蜂和高加索蜂)和 C 类群(卡尼鄂拉蜂)。安拉托尼亚蜂和高加索蜂属于同一进化分支,且它们不同于卡尼鄂拉蜂,该结果和形态学、线粒体 DNA 序列分析和单核苷酸多态性分析结果相一致(Ruttner, 1988;Whitfield *et al.*, 2006)。此外,大量的饲养史资料表明:俄罗斯黑蜂在 1898 年前后进入中国东北,早期的时候大部分由于品种混杂而被淘汰,只有小部分在饶河县得以幸存了下来,即现在的东北黑蜂(何康,1993;葛凤晨等,1996;黄文诚,2000;龚一飞和张其康,2000;马英和鞠桂兰,2001;陈盛禄和苏松坤,2003;王树壮等,2003),本实验结果表明东北黑蜂和俄罗斯蜜蜂聚为一个大类,即东北黑蜂和俄罗斯蜜蜂亲缘关系最近,因此,该结果与早期的蜜蜂饲养史资料相符。

4　结论

东北黑蜂群体来源于俄罗斯蜜蜂,与俄罗斯蜜蜂的亲缘关系最近,与高加索蜂、安拉托尼亚蜂、卡尼鄂拉蜂之间的关系相对较远。东北黑蜂经过近一个世纪选育和改良,其与俄罗斯蜜蜂相比,已经发生了较大的遗传分化。该结果对中国黑蜂的选育、推广和保护具有重要的现实意义。

参考文献(References)

Baudry E, Solignac M, Garnery L, Gries M, Cornuet JM, Koeniger N, 1998. Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 265(1409):2009—2014.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F, 2004. GENETIX 4.02. Logiciel sous Windows pour la Genetique des Populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060, Universite de Montpellier II, Montpellier, France.

Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 1995. Microsatellite variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140(2):679—695.

Estoup A, Solignac M, Cournuet JM, 1994. Precise assessment of the number of patrilines and of genetic relatedness in honey bee colonies. *Proc. R. Soc. Lond B*, 258(1351):1—7.

Estoup A, Solignac M, Cournuet JM, Goudet J, Scholl A, 1996. Genetic differentiation of continental and island population of *Bombus terrestris* (Hymenopera: Apidae) in Europe. *Mol. Ecol.*, 5(1):19—31.

Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M, Cornuet M, 2001. Genetica diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86(4):420—430.

Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 1998. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52(4):1119—1134.

Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from Middle-East. *Apidologie*, 31(2):167—180.

Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM, 1993. A simple test using restricted PCR—amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49(11):1016—1021.

Jensen AB, Palmer KA, Chaline N, Raine NE, Tofilski A, Martin SJ, Pedersen BV, Boomsma JJ, Ratnieks FLW, 2005. Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conserv. Genet.*, 6(4):527—537.

Ota T, 1993. Dispan: Genetic distance and phylogenetic analysis. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. http://www.bio.psu.edu/people/faculty/Nei/Lab/dispan2.htm. http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/Programs.html.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2):945—959.

Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86(3):248—249.

Rosenberg NA, 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes*, 4(1):137—138.

Ruttner F, 1988. Biogeography and Taxonomy of Honey Bees. Berlin: Springer Verlag. 1—284.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4):406—425.

Smith DR, Slaymaker A, Palmer M, Kaftanoglu O, 1997. Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage. *Apidologie*, 28(5):269—274.

Solignac M, Vautrin D, Loiseau A, Mougel F, Baudry E, Estoup A, Garnery L, Haberl M, Cornuet JM, 2003. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes*, 3(2):307—311.

Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D, Tsutsui ND, 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799):642—645.

Wright S, 1965. The interpretation of population structure by Fstatistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3):395—420.

Wright S, 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Chicago: University of Chicago Press. 1—520.

陈盛禄，2001. 中国蜜蜂学. 北京:中国农业出版社. 1—777.

陈盛禄，苏松坤，2003. 西方蜜蜂不同蜂种及其正反交组合采胶力研究. 中国养蜂，54(2):4—5.

葛凤晨，陈东海，历延芳，1996. 从近代引进的西蜂品种看东北地区蜂种的血统结构. 蜜蜂杂志，(2):21—23.

龚一飞，张其康，2000. 蜜蜂分类与进化. 福州:福建科学技术出版社. 1—69.

何康，1993. 中国农业百科全书 · 养蜂卷. 北京:中国农业出版社. 1—396.

黄文诚，2000. 蜜蜂品种介绍. 吉林畜牧兽医，(5):34.

刘清河，2006. 饶河黑蜂在中原地区的饲养. 蜜蜂杂志，(5):18.

刘艳荷，陈盛禄，2001. 西方蜜蜂(*Apis mellifera* L.)主要经济性状的配合力与杂种优势分析. 上海交通大学学报(农业科学版)，19(3):169—173.

刘艳荷，陈盛禄，钟伯雄，2001. 西方蜜蜂王浆产量与品质性状的配合力和杂种优势分析. 遗传学报，28(10):926—932.

罗玉柱，成述儒，胡江，Hanotte O，韩建林，2009. 利用微卫星 DNA 标记分析高原型细毛羊的种质特性. 中国农业科学，42(2):669—676.

马英，鞠桂兰，2001. 东北黑蜂探源. 黑龙江史志，(6):39—40.

潘云河，金望强，叶丰久，1996. 杂一代蜂群与本地意蜂生产性能对比实验. 浙江畜牧兽医，(2):9—10 转 21.

彭文君，罗其花，安建东，黄家兴，郭军，2009. 东北黑蜂(*Apis mellifera* ssp.)亲缘关系的分析. 中国农业科学，42(4):1494—1502.

苏松坤，陈盛禄，董利生，2003. 西方蜜蜂不同类型杂交子代形态指标的测定及杂种优势分析. 昆虫知识，40(6):535—538.

孙德山，金垣，1987. 东北黑蜂性状的研究. 中国蜂业，(2):1—3.

王树壮，梁志杰，陈丽，2003. 东北黑蜂国家级自然保护区的发展概况. 蜜蜂杂志，(11):33—34.

张守明，2006. 东北黑蜂习性点滴谈. 养蜂科技，(4):19.