应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(1): 112−120. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2016.015

云南野生小蜜蜂群体 SSR 遗传多样性分析*

杨 洁[1**] 徐建欣[1] 范武波[1] 和绍禹[2***] 黎仁军[2]

（1. 中国热带农业科学院湛江实验站，湛江 524013；2. 云南农业大学东方蜜蜂研究所，昆明 650201）

摘 要 【**目的**】 小蜜蜂 *Apis florea* 是蜜蜂属野生种类之一，在我国主要分布于西南部。对于小蜜蜂的研究我国多集中在形态方面，遗传多样性的研究较少。本文旨在阐明云南地区小蜜蜂的群体遗传特征，评价其遗传多样性。【**方法**】 本研究利用 14 对微卫星引物对采自云南省的 13 群野生小蜜蜂进行了群体遗传变异检测和遗传多样性分析。【**结果**】在小蜜蜂群体中共检测到 53 个等位基因，平均等位基因数为 3.7857，平均有效等位基因数 2.9420，平均期望杂合度和表观杂合度分别为 0.5708 和 0.2184，平均多态信息含量为 0.5300。根据 Nei's 遗传距离用 UPGMA 方法对 13 群小蜜蜂进行亲缘关系分析，结果 13 群野生小蜜蜂先分出红河（HH），再分出缅甸（MD）和普洱（PE），最后所有的西双版纳的聚在一起。【**结论**】 说明同一地区的小蜜蜂的遗传距离相对不同地区的较近。

关键词 小蜜蜂，微卫星，遗传多样性，遗传分化

Genetic diversity in wild populations of *Apis florea* inferred from nuclear SSR markers in Yunnan

YANG Jie[1**] XU Jian-Xin[1] FAN Wu-Bo[1] HE Shao-Yu[2***] LI Ren-Jun[2]

(1. Zhanjiang Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524013, China;
2. Eastern Bee Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract [**Objectives**] To elucidate the genetic characteristics of *Apis florea*, a wild species of *Apis*, and evaluate its genetic diversity in China. [**Methods**] We used 14 microsatellite DNA markers to compare the genetic similarity of 13 colonies of *Apis florea* sampled from Yunnan province. A total of 53 alleles were detected. [**Results**] The mean number of alleles, mean number of effective alleles, mean expected heterozygosity, mean observed heterozygosity and mean polymorphism information content of 14 loci were 3.7857, 2.9420, 0.5708, 0.2184 and 0.5300, respectively. Phylogenetic and genetic divergence analysis ranked the HH population as the most genetically distinct, followed by the MD and PE populations. Based on Nei's genetic distance, all *A. florea* from Xishuangbanna were one lineage. [**Conclusion**] The results indicate a high degree of correlation between the genetic and geographic distance between *A. florea* populations.

Key words *Apis florea*, microsatellite, genetic diversity, genetic differentiation

小蜜蜂 *Apis florea* 别名小挂蜂、小草蜂、小蒿蜂，属于膜翅目，蜜蜂科，蜜蜂属。小蜜蜂在蜜蜂属中属于体型较小的一种，工蜂体长 7~8 mm，与其同属的大蜜蜂和黑大蜜蜂体长达 16~20 mm，而东方蜜蜂和西方蜜蜂的工蜂分别为 9.5~13 mm 和 12~14 mm。小蜜蜂在世界的分布集中在尼泊尔、缅甸、老挝、柬埔寨、越南、泰国、马来西亚半岛、苏门答腊岛、爪哇岛、婆罗洲（印度尼西亚）、巴拉望（菲律宾）、沙特阿拉伯、阿曼东部、伊朗南部、巴基斯坦、斯里兰卡、印度等地区，在中国分布于云南北纬 26°40′以南的广大地区，以及广西南部的龙州、上思等地（Hepburn and Sarah，2011）。

小蜜蜂目前还处于野生状态，主要栖息在灌

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金青年科学基金项目（31400280）；中央预算事业单位科研启动财政专项经费（zjky201302）

**第一作者 First author，E-mail：yangjie418529@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：kmhsy@163.com

收稿日期 Received：2015-05-21，接受日期 Accepted：2015-06-29

木丛和杂草丛，护脾力强，常有 3 层以上工蜂爬覆在巢脾上，当暴风雨袭击时，结成紧密的蜂团保护巢脾。蜜源丰富时，性温驯，蜜源枯竭时，性凶猛（Otis and Hadisoesilo，1998）。受季节变动，蜜源缺乏影响，由平原到山区往返迁徙。基于以上特点小蜜蜂的采集相对困难。

蜜蜂属遗传多样性方面的研究以往对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的遗传分化以及起源进化等方面研究的较多（Estoup *et al.*，1995；Rowe *et al.*，1997；Chen *et al.*，2005），Ruttner 等（1978，1988）就提出了一系列经典的形态学指标用于研究西方蜜蜂的起源分化，将欧洲的 24 个西方蜜蜂亚种划分为 4 个世系。近年，对东方蜜蜂 *Apis ceran* 遗传多样性也有较广泛的研究（Sittipraneed *et al.*，2001a；2001b；Tanaka *et al.*，2001；Tan *et al.*，2011），而对于蜜蜂属的其余野生蜜蜂却研究相对较少。

对于小蜜蜂的研究，李有泉等（1981）赴大理、临沧、思茅等地/州的 8 个县，对小蜜蜂进行野外考察并采回样本做室内鉴定，研究其地理分布及生态环境，形态特征、生物学特征等；张祖芸等（2009）针对小蜜蜂和黑小蜜蜂 *A. andreniformis* 的形态进行过比较研究，每群选择 20 头工蜂，每头工蜂测定 38 个形态指标，然后对测定的形态指标数据进行 *t*-检验分析，结果发现黑小蜜蜂与小蜜蜂有 33 个形态特征指标差异显著，从数值分类学的角度证实了小蜜蜂与黑色小蜜蜂分别是独立的两个物种；Wongsiri 等（1996）对泰国同一分布区的小蜜蜂和黑小蜜蜂进行了生物学特性比较，发现两者在形态特征和行为特征等方面存在许多差异；Wongsiri 等（1990）发现黑小蜜蜂和小蜜蜂后腿构造和翅脉特征上存在差异，更重要的是外生殖器特征存在很大差别，说明两者之间存在生殖隔离。Higgs 等（2010）通过比较线粒体 DNA 核糖体大亚基的扩增片段大小可以区分黑小蜜蜂和小蜜蜂。

对于小蜜蜂的形态研究相对较多，主要集中在比较小蜜蜂与黑小蜜蜂形态差异（Rinderer *et al.*，1995），Rinderer 等（1995）比较泰国东南部菲律宾的巴拉望岛的小蜜蜂的形态特征，研究表明黑小蜜蜂与同域的小蜜蜂的形态差异还是很明显的，主要表现在小盾片的颜色上。也有研究比较小蜜蜂与大蜜蜂的形态差异（Moritz *et al.*，2010）；Randall 等（2005）研究了小蜜蜂的形态，分类及生物地理学，样本取自 103 个自然分布区的 184 个群体的 2 923 个个体，样本横跨越南、中国、伊拉克、也门，基于欧氏距离的亲缘关系聚类分析，随机交配群体由于季节性繁殖会有一定的基因交流；Nanork（2001）研究小蜜蜂在泰国的线粒体 DNA 的多样性；Moritz 等（2010）利用 9 个微卫星标记重建了小蜜蜂在近东地区的入侵历史。

微卫星具有许多优点，近年来发展迅速，成为应用广泛的分子标记之一。微卫星 DNA 标记具有多态性高，在基因组中分布广，呈共显性遗传，容易检测并且重复性好等优点，是进行群体遗传变异检测的理想遗传标记，已经在群体遗传多样性评价，构建遗传图谱，亲缘关系鉴定等方面得到广泛应用（Vaiman *et al.*，1995）。微卫星 DNA 多态性与其核心序列重复次数和重复程度有关，重复次数的多少与该位点的等位基因数呈正相关（李建科，2003）。

本文利用 14 个微卫星 DNA 标记检测了云南野生小蜜蜂群体遗传变异，对其群体遗传分化进行了分析，并评估了其遗传多样性状况。以期揭示小蜜蜂群体遗传特征，为该遗传资源的保护及利用提供依据。

图 1　小蜜蜂生活的生态环境

Fig. 1　The ecological environment of *Apis florea*

1 材料与方法

1.1 材料

本文样品采自云南省西双版纳傣族自治州（下文简称西双版纳）、普洱市、红河哈尼族彝族自治州（下文简称红河），以及缅甸，共 13 群。其中采自西双版纳傣族自治州样品有 10 群（以地名首字母命名，即 BN），普洱市样品 1 群（同上，即 PE），红河哈尼族彝族自治州 1 群（同上，即 HH），缅甸 1 群（同上，即 MD）。用无水酒精浸泡，带回实验室于 – 80℃保存待用。

1.2 基因组 DNA 的制备

每群小蜜蜂随机抽取 10 头，取其胸部及头部作为提取总 DNA 的材料，参照《分子克隆实验指南》第三版的酚氯仿法（Sambrook and Russell，2002）。取蜜蜂胸部肌肉组织放入 1.5 mL EP 管中，用剪刀剪成糊状；加入 450 μL STE 缓冲液，70 μL 10% SDS，25 μL 蛋白酶 K，充分混匀后于 55℃水浴箱中消化至澄清（每隔 2 h 翻转 1 次）；加入 600 μL 水饱和酚，DNA 混合仪上转 24 h 混匀，然后 6 000 r/min 离心 10 min；加入 600 μL 苯酚：氯仿：异戊醇混合液（25：24：1），DNA 混合仪上混匀 24 h，6 000 r/min 离心 10 min，上清液转至另一干净的 EP 管中；加入氯仿：异戊醇混合液（24：1）600 μL，DNA 混合仪上混匀 12 h，6 000 r/min 离心 10 min，上清液转至另一干净的 EP 管中；向上清液中加入 1 mL 异丙醇，放置于 – 20℃冰箱中 4 h 以上；8 000 r/min 离心 12 min，使 DNA 贴到管壁或沉于管底，弃上清液；加入 1 mL 70%乙醇洗 2 次，每次 1 3000 r/min 离心 15 min，弃上清液；将 EP 管开盖置于真空干燥箱中，至剩余酒精完全蒸发；取出 EP 管加入 50 μL TE 溶液，置于 68℃水浴锅中 30 min；放入 4℃冰箱中溶解 3 d 后，置于 – 20℃长期保存。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测其纯度和浓度，然后稀释成 50 ng/μL，作为 PCR 分析的模板。

1.3 微卫星多态性检测

1.3.1 微卫星引物的合成与筛选 微卫星引物筛选于 Solignac 等（2003）及 NCBI 数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）。从中筛选出适合小蜜蜂分析的 14 对引物（表 1）。所用引物先后由生工生物工程（上海）有限公司和北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物溶于灭菌 ddH_2O，贮存浓度为 100 pmol，工作浓度为 10 pmol。将这些小蜜蜂群体的个体 DNA 等比例混合成 DNA 池，选择退火温度一致的引物进行筛选。

1.3.2 PCR 反应体系 PCR 反应总体积为 10 μL，其中 dNTPs（2.5 mmol/L each）0.8 μL，10×PCR Buffer（Mg^{2+}浓度 15 mmol/L）1~1.47 μL，引物（20 μmol/L）各 0.2 μL，r*Taq* 酶（5 U/μL）0.05 μL，模板 1 μL，超纯水补足至 10 μL。PCR 扩增程序为：95℃预变性 5 min，94℃变性 35 s，45℃~60℃退火 35 s，72℃延伸 45 s，25 个循环，最后 72℃延伸 5 min。

1.3.3 PCR 产物电泳检测及基因分型 PCR 产物先用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳初步检测，如果条带明显，特异性较好，再用 10%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，然后银染显色，最后照相保存。聚丙烯酰胺凝胶电泳条带采用 Labwork 4.5 确定扩增片段大小，结合人工判读基因型。对于基因分型较难确定的座位进行了克隆测序验证。

1.3.4 数据统计分析 运用选择的 14 对多态性较好的引物对 13 个小蜜蜂群体进行遗传多样性分析。采用 PopGene 1.32 软件（Yeh *et al.*，1999）计算各微卫星座位的等位基因数（N_a）、有效等位基因数（N_e）、等位基因频率、表观杂合度（H_o）、期望杂合度（H_e）、遗传距离、遗传分化系数（F_{st}）。在 PIC_CALC（Xu *et al.*，2010）中，计算多态信息含量（*PIC*）。采用 GenAlex 6.1（Meirmans，2006）对供试群体进行分子方差（AMOVA）分析，利用 PopGene 1.32 软件对 13 个小蜜蜂蜂群进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 云南野生小蜜蜂 SSR 遗传多样性分析

13 个小蜜蜂群体中共检测到 53 个等位基因，各座位期望杂合度，表观杂合度，多态信息含量详见表 1。单个座位的等位基因数从 2 个（AT165，AC306，AP274）到 7 个（AC105）

表 1　14 个微卫星座位信息及其检测的遗传多样性

Table 1　The information of 14 microsatellite loci and their genetic variability in the populations of *Apis florea*

座位 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	等位基因数 Alleles number	有效等位基因数 Effective alleles number	表观杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 *PIC*
AT165	AJ509603	2	1.7331	0.1600	0.4100	0.3255
AC074	AJ509652	5	4.2715	0.2343	0.7117	0.6826
AT122	AJ509565	3	1.6208	0.0329	0.3836	0.3468
AC306	AJ509721	2	1.3332	0.0124	0.2731	0.2355
AP274	AJ509486	2	1.0272	0.0639	0.2930	0.3164
AP225	AJ509454	4	2.7349	0.1743	0.5482	0.4897
AC105	AJ509667	7	5.0888	0.3999	0.8731	0.7753
AP313	AJ509504	4	3.6770	0.2714	0.7239	0.6726
A024	AJ509241	4	3.7448	0.2171	0.7332	0.6817
AP249	AJ509470	3	2.4460	0.2643	0.5808	0.5119
A107	AJ509287	5	4.5669	0.3257	0.7805	0.7437
AP273	AJ509485	3	2.8098	0.2457	0.6319	0.5589
AP243	AJ509466	4	2.4432	0.2186	0.5061	0.5465
AP092	AJ509364	5	3.6907	0.4372	0.5426	0.5332
平均数±SE Mean±SE		3.7857±0.3806	2.9420±0.3379	0.2184±0.0335	0.5708±0.0492	0.5300±0.0459

不等，平均为 3.7857 个；有效等位基因数在 1.0272~5.0502，平均为 2.9420。AC105 座位拥有最高的期望杂合度和多态信息含量，两者分别为 0.8731 和 0.7753，而座位 AC306 的期望杂合度和多态信息含量最低，分别为 0.2731 和 0.2355。对于整个小蜜蜂群体而言，平均期望杂合度和平均多态信息含量分别为 0.5708 和 0.5300。

2.2　野生小蜜蜂群体遗传分化

2.2.1　云南野生小蜜蜂 ***F*** 统计量分析　*F* 统计量包括 F_{is}、F_{it} 和 F_{st}，F_{it} 表示总群体中基因型的实际频率和理论频率的离差；F_{is} 表示亚群体中基因型的实际频率和理论频率的离差；F_{st} 表示随机抽取每个亚群体两个配子间的相互关系，一般用它测定亚群体间的遗传分化程度。通过每个微卫星座位的固定指数 F_{is}、F_{it} 和 F_{st} 检验小蜜蜂的遗传分化，13 个小蜜蜂群体的 14 个座位的 *F*-statistics 分析结果详见表 2。对于 13 个蜂群，14 个微卫星座位 F_{st} 在 0.0822~0.3011，蜂群间的平均遗传分化系数为 15.77%，而 F_{is} 和 F_{it} 分别为 0.1909~0.9220 和 0.4188~0.9344，平均 F_{is} 和 F_{it} 为 0.5672 和 0.6383，杂合子缺失显著。

2.2.2　云南野生小蜜蜂群体分子方差分析　对来自西双版纳州、红河、普洱、缅甸 4 个地区的 13 群小蜜蜂微卫星 DNA 数据进行 AMOVA 分析结果详见表 3。本研究小蜜蜂蜂群间和地区间的差异达到了极显著水平，AMOVA 分析表明小蜜蜂的遗传变异主要存在于蜂群内（82%），只有 5%遗传变异存在于地区间，蜂群间的遗传变异占 7%。

2.2.3　云南野生小蜜蜂不同地区间遗传多样性分析　对这 4 个小蜜蜂分布集中地区的遗传多样性进行分析比较。从表 4 可知，4 个地区中西双版纳州的遗传多样性最为丰富，其次是普洱市、缅甸，红河州的遗传多样性最低。单因素方差分析表明，红河州的 N_a 值、*I* 值和 H_e 值与其他 3 个地区呈现显著差异，而西双版纳州、普洱市、缅甸之间的差异不显著。由此可见，小蜜蜂的遗传多样性以滇南的普洱市、西双版纳州及缅甸为

表 2 小蜜蜂各位点 ***F*** 统计量值与基因流

Table 2 The value of *F*-statistics at 14 microsatellite loci of *Apis florea*

座位 Locus	蜂群总近交系数 F_{is} Sum of inbreeding coefficient F_{is}	蜂群内近交系数 F_{it} Inbreeding coefficient in clony F_{it}	蜂群间分化系数 F_{st} Genetic differentiation coefficient between clonies F_{st}	基因流 N_m Gene flow
AT165	0.7319	0.7903	0.0892	5.3012
AC074	0.4209	0.4978	0.1429	0.8562
AT122	0.9220	0.9344	0.2295	1.5684
AC306	0.8787	0.9254	0.1397	0.6945
AP274	0.1909	0.5228	0.3011	0.0098
AP225	0.5449	0.6098	0.2247	0.9956
AC105	0.4076	0.5172	0.0822	7.3621
AP313	0.5912	0.5945	0.2343	1.2365
A024	0.6994	0.6934	0.1592	2.0125
AP249	0.5512	0.5888	0.0889	6.3201
A107	0.6278	0.5821	0.0888	2.9623
AP273	0.5696	0.6711	0.1053	3.6231
AP243	0.4903	0.5903	0.1948	0.1269
AP092	0.3146	0.4188	0.1266	2.6512
平均值±SE Mean±SE	0.5672±0.0589	0.6383±0.0482	0.1577±0.0301	2.5515±0.0108

表 3 小蜜蜂 AMOVA 分析结果

Table 3 The results of analysis of molecular variance (AMOVA) of *Apis florea*

变异来源 Source of variation	自由度 *df*	总方差 Sum of squares	均方差 Mean squared deviation	变异百分率 Percentage of variation (%)	方差成分 Variance component	*P* 值 *P* value
地区间 Among regions	3	20.266	30.256	5	0.327	0.001
蜂群间 Among colonies	9	402.254	22.280	7	0.712	0.001
蜂群内 Within colonies	117	3130.600	10.161	88	11.161	0.001

概率为 999 次置换所得。

Probability is based on 999 permutation.

表 4 不同地区间小蜜蜂的遗传多样性比较

Table 4 Genetic diversity of *Apis florea* among different regions in Yunnan

地区 Regions	占总面积（%） Percentage of the total area	蜜蜂数 Number of varieties	等位基因数 N_a Number of alleles	香农指数 *I* Shannon index	Nei's 基因多样性指数 *H* gene diversity index
西双版纳州 Xishuangbanna	10.07	100	5.8261±2.0372	1.3011±0.4310	0.6406±0.1771
普洱市 Puer	42.74	10	7.0435±2.2458	1.3005±0.4119	0.6297±0.1787
缅甸 Burma	21.58	10	6.2174±1.9059	1.2365±0.3943	0.6096±0.1813
红河 Honghe	10.37	10	3.6957±0.9261**	0.9525±0.3024**	0.5258±0.1581*

*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

* and ** represent significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

中心逐渐向滇东南的红河州延伸。

2.2.4　云南野生小蜜蜂遗传距离与聚类分析　13 个小蜜蜂蜂群间的 Nei's 遗传距离在 0.0316~0.1767，平均遗传距离为 0.1004，其中同是来自西双版纳勐仑植物园的 BN7 与 BN10 遗传距离最小，来自红河州个旧市冷镦村 HH 与西双版纳州的 BN5 遗传距离最大。基于 Nei's 遗传距离构建的 MP 聚类树见图 1。所检测的 13 群野生小蜜蜂先分出 HH（红河），再分出 MD（缅甸）和 PE（普洱），最后所有的西双版纳的聚在一起，说明不同地区的小蜜蜂的遗传距离相对同一地区的较远。

3　讨论

3.1　微卫星标记的选择

进入 20 世纪 90 年代，我国遗传多样性主要从生化和 DNA 两个水平开展，DNA 水平主要采用 SSR、RAPD、RFLP 和 AFLP 等遗传标记，微卫星遗传标记以其在在基因组中良好的覆盖性、丰富的多态性、共显性以及方便检测等优点被认为是较为理想的分子标记之一。本文选用的

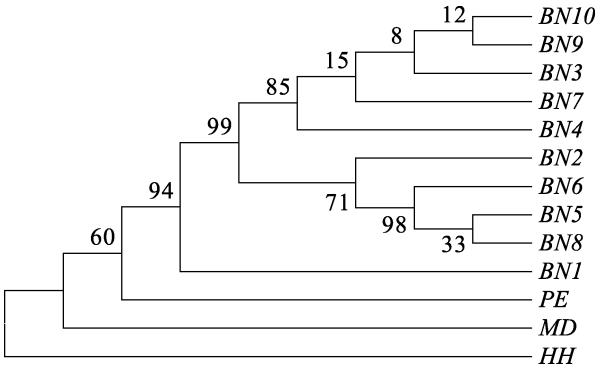

图 2　基于 Nei's 遗传距离运用 UPGMA 法获得的 13 个小蜜蜂群体系统发育树

Fig. 2　UPGMA tree of phylogenetic relationships among 13 populations of *Apis florea* based on Nei's genetic distance

系统发育树的字母是样品采集地区的名字首字母缩写，*HH*：红河；*MD*：缅甸；*BN*：版纳；*PE*：普洱。

The letters in phylogenetic tree is acronyms of the name of sample area , *HH*：Honghe; *MD*：Miandian; *BN*：Banna; *PE*：Puer.

表 5　小蜜蜂 Nei'遗传距离

Table 5　Nei' genetic distance of *Apis florea*

群体 Populations	BN1	BN2	BN3	BN4	BN5	BN 6	BN 7	BN 8	BN 9	BN 10	PE	HH	MD
BN1													
BN2	0.0867												
BN3	0.1150	0.0997											
BN4	0.0774	0.1069	0.0525										
BN5	0.0864	0.1574	0.1131	0.0820									
BN6	0.0681	0.1078	0.0855	0.0580	0.0760								
BN7	0.0924	0.0741	0.0930	0.0744	0.0957	0.0805							
BN8	0.1207	0.0951	0.0800	0.0520	0.0669	0.1029	0.0583						
BN9	0.1231	0.1097	0.1534	0.1293	0.1321	0.1396	0.0692	0.1306					
BN10	0.0797	0.0560	0.0824	0.0723	0.0995	0.0983	0.0316	0.0858	0.0329				
PE	0.1076	0.1216	0.0804	0.0801	0.0893	0.0638	0.0909	0.0624	0.1511	0.1044			
HH	0.1245	0.1667	0.1217	0.0949	0.1767	0.0794	0.1150	0.1379	0.1231	0.1252	0.1041		
MD	0.0819	0.1130	0.1100	0.1061	0.1605	0.1091	0.0985	0.1209	0.1540	0.1080	0.1630	0.0974	

表中的字母是样品采集地区的名字首字母缩写，HH：红河，MD：缅甸，BN：版纳，PE：普洱；BN1 代表采自版纳的第 1 群，BN2 代表第 2 群， BN3 代表第 3 群，然后以此类推。

The letters in table is acronyms of the name of sample area , HH：Honghe，MD：Miandian，BN：Banna，PE：Puer; BN1is the first colony from Banna area, BN2 is the second colony, BN3 is the third colony,then by this analogy.

14 个微卫星标记有较广泛的基因覆盖率，且表现出较高的多态性。微卫星座位上的等位基因数 2~7 个不等，座位 AC105 检测到 7 个等位基因。基因型的判读过程中，聚丙烯酰胺凝胶有时不能精确分离仅差一个碱基的等位基因，而导致在基因型判读的过程中造成误判，这也就解释了有些座位的几个等位基因常常处于纯合状态。

3.2 云南野生小蜜蜂的遗传多样性

从各群体的等位基因组成可以评价其遗传背景。本研究中 14 个微卫星基因座位在 13 个小蜜蜂群体 130 个被检测个体中共检测到 53 个等位基因，平均每个基因座 2.9420 个等位基因，其中基因座 AC105 上的等位基因数最多，共发现 7 个等位基因，基因座 AT165、AC306、AP274 上的等位基因数最少，均发现 2 个等位基因，说明不同蜂群的小蜜蜂遗传多样性较低。小蜜蜂也是泰国的本土蜂种，Nanork（2001）对泰国的北部、东北部、东部、中部、南部苏梅岛、 帕岸岛的小蜜蜂蜂群进行了 RFLP 多样性检测，研究发现其遗传多样性相对于其他蜂种也较低；Liu 等（2011）通过研究性别决定补偿基因 csd 核苷酸变异，共发现 190 个变异位点，与其他蜂种相比具有较高的多态性；Cao 等（2012）通过微卫星分析我国海南岛、广西、云南的大蜜蜂遗传多样性，研究表明来自海南岛的大蜜蜂比来自中国大陆的群体其遗传多样性低，据此推测海南岛大蜜蜂群体从大陆群体分离出去以后可能经历过遗传漂变，大蜜蜂较低的遗传多样性恰恰也反映了它在海南岛的瓶颈效应。

遗传距离是研究物种遗传多样性的基础，它反映了所研究群体的系统进化，被用于描述群体的遗传结构。一般认为群体分化时间越短，遗传距离越小。群体间遗传距离是遗传变异的尺度。本研究 13 个小蜜蜂蜂群间的遗传距离在平均遗传距离为 0.1004，同是来自西双版纳勐仑植物园的 BN7 与 BN10 遗传距离最小，为 0.0316；而来自红河州个旧市冷镦村 HH 与西双版纳州的 BN5 遗传距离最大，为 0.1767。西双版纳植物园的两群小蜜蜂可能有频繁的基因交流，或者就是由一个蜂群分蜂而来。来自红河的 HH 小蜜蜂蜂群与西双版纳的 BN5 遗传距离较大，可能由于地理距离较远，基因交流较少的缘故。从图 2 的系统发育树也可以看出，红河的蜂群 HH 与其他蜂群亲缘关系最远，这同样支持了红河的 HH 小蜜蜂蜂群与西双版纳的 BN5 遗传距离最大。

微卫星大部分属于非结构基因序列，它的变异几乎不受选择的影响，从而在进化过程中变异就可在群体内大量积累，所以微卫星 DNA 能较客观地反映品种间的遗传变异与分化。本研究的 13 群小蜜蜂遗传分化系数是 0.1577，表明有 15.77%的遗传变异来自于蜂群间，而另外 84.23%的遗传变异来自于蜂群内。13 群小蜜蜂的遗传分化程度较低，依据 Nei's 遗传距离构建的小蜜蜂群体系统发育树可以看到，云南西双版纳州的所有小蜜蜂聚在一起，而与周边的红河州，普洱地区分开，说明不同地区间的小蜜蜂基因交流较少。小蜜蜂这一支内部有分化，从系统发育树上得知，BN1 首先以 94%的支持率分出来，然后是 BN5，BN6，BN8 以 99%的支持率分出来，即云南西双版纳州的 10 群小蜜蜂可以分成 3 个主要的支系。聚类分析结果显示小蜜蜂的遗传分化存在明显的地区差异。

3.3 云南野生小蜜蜂资源保护

虽然全球在整体变暖，但是我国野生蜜蜂资源的锐减主要是生境的破坏。小蜜蜂在我国正遭受着各种生存挑战。一方面，人类对森林资源的过分砍伐，破坏了野生蜜蜂原本的栖息环。就在 2010 年，我们采样的过程中，就看到大面积的蜜源植物正在遭到砍伐或者焚烧，其中云南腾冲县的一片山桂花林刚刚被烧光，带路向导跟我们介绍，农户之所以砍伐并烧掉这片山桂花是为了腾出这块土地用来种植喂猪的玉米。在我们惋惜之余，不得不承认这是我国农户自身经济发展与生态环境的矛盾。另一方面，在城市里随着人们对品质生活的追求越来越高，蜂产业集中生产的蜂蜜已经不再能够迎合这部分消费群体的需求，他们普遍认为野生蜜蜂所产的蜂蜜没有工业源的污染，没有化学添加剂，没有抗生素残留，宁

愿花高出几倍的价钱购买。在利益的驱动下，猎蜜者冒着被群蜂攻击的危险去猎取野生蜂巢，这就导致了野生小蜜蜂被过度开采。蜜蜂是自然界中重要的传粉昆虫，对于维持生态平衡起着无法估量的作用，蜂群遗传多样性水平是决定其适应性进化的重要因素，研究其遗传多样性有助于进一步探索其适应性进化，遗传资源的保护和利用。

参考文献 (References)

Cao LF, Zheng HQ, Hu FL, Hepburn HR, 2012. Genetic structure of Chinese *Apis dorsata* population based on microsatellites. *Apidologie*, 43(6): 643–651. DOI: 10.1007/s 13592- 012-0139-8.

Chen SL, LI JK, Zhong BX, 2005. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera* Liguatica). *Acta Genetica Sinica*, 32(10): 1037–1044.

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

Hepburn HR, Sarah ER, 2011. Biogeography//Hepburn HR, Sarah ER (eds.). Honeybees of Asia. Berlin: Springer-Verlag. 51–69.

Higgs JS, Mchale M, Oldroyd BP, 2010. A scientific note on a rapid method for the molecular discrimination of *Apisandreniformis* and *Apis florea*. *Apidologie*, 41(1): 96–98.

Li JK, 2003. Microsatellite DNA and quantitative genetics analysis of royal jelly producing traits of western honeybee. Hangzhou: Zhejiang University. [李建科, 2003. 意大利蜜蜂产浆量性状的微卫星 DNA 和数量遗传研究. 杭州: 浙江大学.]

Li YQ, Kuang BY, Liu Q, Tang YP, 1981. Research on *Apis florea* Fab. in Yunnan. *Journal of Bee*, (4): 11–12. [李有泉, 匡邦郁, 刘勤, 唐玉平, 1981. 云南小蜜蜂 *Apis florea* Fab 研究. 蜜蜂杂志, (4): 11–12.]

Liu ZY, Wang ZL, Wu XB, Yan WY, Zeng ZJ, 2011. csd alleles in the red dwarf honey bee (*Apis florea*, Apidae, Hymenoptera) show exceptionally high nucleotide diversity. *Insect Science*, 18(6): 645–652.

Meirmans PG, 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60(11): 2399–2402.

Moritz RFA, Haddad N, Bataieneh A, Shalmon B, Hefetz A, 2010. Invasion of the dwarf honeybee *Apis florea* into the near East. *Biological Invasions*, 12(5): 1093–1099.

Nanork P, 2001. Mitochondrial DNA variability of dwarf honey bee *Apis florea* Fabricius, 1787 in Thailand using PCR-RFLP technique. Master thesis. Bangkok: Chulalongkorn University.

Otis GW, Hadisoesilo S, 1998. Differences in drone cappings of *Apis cerana* and *Apis nigrocincta*. *Journal of Apiculture Reserch*, 37(1): 11–15.

Randall HH, Sarah ER, Otis GW, Stefan F, Verma LR, Tan K, Chaiyawong T, Tahmasebi G, Ebadi R, Siriwat W, 2005. *Apis florea*: morphometrics, classification and biogeography. *Apidologie*, 36 (3): 359–376.

Rinderer TE, Oldroyd BP, Wongsiri S, Sylvester HA, Guzman LI, Riggio RM, 1995. A morphological comparison of the dwarf honey bees of southeastern Thailand and Palawan, Philippines. *Apidologie*, 26(5): 387–394.

Rowe DJ, Rinderer TE, Stelzer JA, Oldroyd BP, Crozier RH, 1997. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 44(2): 85–93.

Ruttner F, Tassencourt L, Louveaux J, 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9(4): 363–381.

Ruttner F, 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin: Springer-Verlag Press. 2–10.

Sambrook J, Russell DW, 2002. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Beijing: Science Press. 463–470. [Sambrook J, Russell DW, 2002. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社. 463–470.]

Solignac M，Vautrin D，Loiseau A，Mougei 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. *Molecular Ecology Notes*, 3(2): 307–311.

Sittipraneed S, Laoaroons, Klinbungss, 2001a. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand: evidence from microsatellite polymorphism. *J. Apic. Res.*, 40(1): 9–16.

Sittipraneed S，Sihanuntavong D，Klinbunga S, 2001b. Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand revealed by polymorphism of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. *Insectes Sociaux*, 48(3): 266–272.

Tanaka H, Suka T, Roubik DW, Mohamed M, 2001. Genetic differentiation among geographic groups of three honeybee species, *Apis cerana*, *A. koschevnikovi* and *A. dorsata,* in Borneo. *Nature & Human Activities*, 6: 5–12.

Tan HW, Liu GH, Dong X, Lin RQ, Song HQ, Huang SY, Yuan ZG, Zhao GH, Zhu XQ, 2011. The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE*, 6(8): 1–10.

Xu N, Shi F, Xiong M, Que YF, Yang Z, Zhu B, Chang JB, 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhinogobio ventralis*. *Conservation Genetics Resources*,

21 (Suppl.): 1–3.

Vaiman D, Pailhoux E, Payen E, Saidi-Mehtar N, Cotinot C, 1995. Evolutionary conservation of a microsatellite in the Wilms Tumour (WT) gene: mapping in sheep and cattle. *Cytogenetic and Genome Research*, 70(1/2): 112–115.

Wongsiri S, Lekprayoon C, Thapa R, Thirakupt K, Renderer TE, Sylvester HA, Oldroyd BP, Booncham U, 1996. Comparative biology of *Apis andreniformis* and *Apis florea* in Thailand. *Bee World*, 77(1): 23–35.

Wongsiri S, Limbipichai K, Tangkanasing P, Mardan M, Renderer TE, Sylvester HA, Koeniger G, Otis GW, 1990. Evidence of reproductive isolation confirms that *Apis andreniformis* (Smith, 1858) is a separate species from sympatric *Apis florea* (Fabricius, 1787). *Apidologie*, 21(1): 47–52.

Yeh FC, Yang R, Boyle T, 1999. POPGENE. Microsoft Window Based Freeware for Population Genetic Analysis. Version 1.32. Centre for International Forestry Research, University of Alberta.

Zhang ZY, Li H, Luo LJ, Tan K, 2009. Morphology of Xishuangbanna honeybees *Apis florea* and *Apis andreniformis*. *Apiculture of China*, 60(1): 8–12. [张祖芸, 李华, 罗凌娟, 谭肯 2009. 云南西双版纳地区小蜜蜂和黑小蜜蜂的形态测定分析. 中国蜂业, 60(1): 8–12.]