

中华蜜蜂 *csd* 多态性分析

刘志勇^{1,2}, 王子龙¹, 王欢¹, 曾志将¹

(¹江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045; ²江西省职业病防治研究院实验动物中心, 南昌 330006)

摘要: 【目的】分析不同地理群体中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) *csd* 的多态性。【方法】以吉林长白山、海南海口、广西南宁、湖北神农架和江西靖安 5 个省市的中蜂工蜂为试验材料, 提取每个工蜂样品的基因组 DNA, 对 *csd* 3 区进行 PCR 扩增、克隆和测序, 分析 *csd* 的多态性。【结果】对中国 5 个省市的中蜂 *csd* 3 区基因组序列进行了克隆测序, 获得 32 条 *csd* 基因单倍型, 其中吉林长白山和江西靖安群体 *csd* 的多态性显著高于其它群体, 而吉林长白山群体和江西靖安群体之间, 广西南宁群体、海南海口群体和湖北神农架群体之间 *csd* 的多态性没有显著差异。利用 *csd* 进行群体分析表明江西靖安中蜂与吉林长白山中蜂的核苷酸分歧度和遗传距离均最大, 湖北神农架中蜂与广西南宁中蜂之间核苷酸分歧度和遗传距离最小。系统进化树表明来自 5 个地理群体的单倍型在进化树上混杂在一起, 并没有按照地理来源分为 5 支。【结论】中华蜜蜂 *csd* 在各个地理群体中均具有很高的多态性, 并且多态性水平在群体间有差异。

关键词: 中华蜜蜂; *csd*; 多态性; 单倍型

Polymorphism Analysis of *csd* in Five Populations of Chinese Honeybee

LIU Zhi-yong^{1,2}, WANG Zi-long¹, WANG Huan¹, ZENG Zhi-jiang¹

(¹Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045; ²Experimental Animal Center, Institute of Occupational Disease Prevention of Jiangxi Province, Nanchang 330006)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to analyze the polymorphism of *csd* in different geographical populations of Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*) (Hymenoptera: Apidae). 【Method】 Worker bees collected from Changbaishan (Jilin), Haikou (Hainan), Nanning (Guangxi), Shennongjia (Hubei) and Jing'an (Jiangxi) were used as materials, and genome DNA was extracted from each sample for PCR amplification of the *csd* region 3, PCR products were cloned and sequenced, polymorphism of *csd* in different geographical populations were analyzed by using the obtained sequences. 【Result】 The genomic region 3 of *csd* in *Apis cerana cerana* from 5 geographical populations were cloned and 32 *csd* haplotypes were obtained. The polymorphism of *csd* in Changbaishan (Jilin) and Jing'an (Jiangxi) populations were significantly higher than those in Nanning, Haikou and Shennongjia populations, while the polymorphism of *csd* between Changbaishan (Jilin) and Jing'an (Jiangxi) populations, and that between Nanning (Guangxi), Haikou (Hainan) and Shennongjia (Hubei) populations showed no significant difference. Meanwhile, population analysis based on *csd* haplotypes showed that the nucleotide divergence and genetic distance between Changbaishan (Jilin) and Jing'an (Jiangxi) populations were maximal, while those between Shennongjia (Hubei) and Nanning (Guangxi) populations were minimal. The phylogenetic analysis showed that all the haplotypes from these five geographical populations were mixed on the phylogenetic tree, not from 5 clade according to different geographical origins. 【Conclusion】 *csd* has a high level of polymorphism in all these populations, moreover, the polymorphism level showed some difference among populations.

Key words: *Apis cerana cerana*; *csd*; polymorphism; haplotype

收稿日期: 2010-12-27; 接受日期: 2011-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060327)、国家现代蜂产业技术体系项目 (CARS-45)

联系方式: 刘志勇, E-mail: liuzhiyong0791@163.com. 通信作者曾志将, Tel: 0791-83828158; E-mail: bees1965@sina.com

0 引言

【研究意义】中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 是中国特有的蜂种资源, 也是东方蜜蜂最重要的 1 个亚种, 具有抗螨能力强、嗅觉灵敏和善于采集零散蜜源等特性。近二十年来, 国内学者对中蜂遗传多样性和生物学特性进行了卓有成效的研究^[1-6], 但对于不同地理群体中蜂 *csd* 基因多态性的研究未见报道。开展中蜂 *csd* 基因多态性研究, 不仅能填补这方面的空白, 而且对于保护、开发和利用中蜂这一宝贵资源具有重要意义。【前人研究进展】蜜蜂的性别是由一种“互补性性别决定”(complementary sex determination) 机制决定的, 早在 150 年前研究者就推测在蜜蜂染色体上有 1 个“互补性性别决定因子 (*csd*)”决定个体的雌雄。此后发现该性别决定机制是包括蜜蜂在内的大多数膜翅目昆虫的主要性别决定机制^[7-8]。Beye 等通过定位克隆鉴定出蜜蜂 *csd*^[9], 分析发现蜜蜂 *csd* 存在很高的多态性。当个体为二倍体且含有 2 个不同的 *csd* 等位基因时, 编码的 2 个异质的 Csd 蛋白形成有功能活性的复合体调控下游基因使得个体发育成雌性; 当个体为只含有 1 个 *csd* 等位基因的单倍体时, 编码的 Csd 蛋白不具有功能活性, 使得个体发育成雄性。蜜蜂 *csd* 是果蝇 Tra 蛋白的远缘同系物, 含有 9 个外显子, 它们被 2 个大的内含子分成 3 个区, 分别为 1、2、3 区。3 区有 1 个精氨酸/丝氨酸富聚区和脯氨酸富聚区, 在这 2 个结构域之间是 1 个高变区, Hasselmann 等、Cho 等通过对意大利蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂 *csd* 基因多态性的分析表明该基因受到平衡选择^[10-13], 并且 *csd* 的基因多态性是蜜蜂中性区域的 7 倍^[12]。【本研究切入点】在中蜂遗传多样性和生物学特性研究基础上, 对中国不同地理群体中蜂 *csd* 基因多态性分析。【拟解决的关键问题】本研究拟对中国境内 5 个省中蜂 *csd* 3 区进行克隆测序, 分析 *csd* 的基因多态性, 并构建分子系统树, 以期从分子水平上获得中蜂种群间的相互关系, 为培育中蜂新品种提供理论基础。

1 材料与方法

试验于 2009 年 10 月至 2010 年 11 月在江西农业大学蜜蜂研究所完成。

1.1 试验材料

从吉林长白山(东经 127°40', 北纬 41°35')、海南海口(东经 110°10', 北纬 20°3')、广西南宁(东

经 108°19', 北纬 22°49') 和湖北神农架(东经 109°56', 北纬 31°15') 每处分别采集 2 群中蜂, 江西靖安(东经 115°22', 北纬 28°53') 采集 3 群中蜂, 每群随机采 50—100 只, 放入无水乙醇(分析醇)中, 置 -20℃ 的冰箱保存至 DNA 提取。

1.2 样品的 DNA 提取

取每个个体的胸部肌肉用 Animal Genomic DNA Extraction 试剂盒(博凯, 北京)提取基因组 DNA, 采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测各模板有无降解; 用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度, -20℃ 保存备用。每群中蜂提取 30 个体 DNA 样品, 供 PCR 扩增、克隆及测序使用。

1.3 引物设计、合成

PCR 扩增引物主要参考 Cho 等^[12] 发表的关于 *csd* 基因多态性的文章中使用的引物序列, 并进行了适当修改, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物名称及其序列如下: CSD-3FMDC: AAT TGG ATT TAT TAA TAT AAT TTA TTA TTC AGG (正向); CSD-3RCD: ATY TCA TTA TTC AAT ATG TTN GCA TCA (Y=C/T) (反向)。

1.4 PCR 扩增、克隆及测序

以基因组 DNA 为模板, 采用保真性很高的 LA Tag DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 72℃ 后延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取出 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 40 min, 在凝胶成像系统中观察结果。用 DNA GEL EXTRACTION 试剂盒(博凯, 北京)进行 PCR 产物胶回收。将回收的目的片段与 pEASY-T3 载体(Transgene, 北京)进行连接, 转化到 DH5α 感受态细胞, 阳性克隆用 PCR 方法进行鉴定并送到上海生物工程有限公司进行正反向测序。

1.5 DNA 序列数据处理

测序结果采用 Chromas 软件读取, 并经人工仔细核对, 确保 DNA 序列的正确性。将测序获得的每一个克隆的正反向序列去掉载体和引物序列, 用 DNASTAR 软件包中 Seqman 程序进行拼接获得完整一致序列^[14]; 采用 DAMBE 软件分析单倍型^[15]; 采用 ClustalX1.8 进行多序列比多并进行人工矫正^[16]; 采用 MEGA4.0 软件构建系统进化树以及计算品种间 Kimura 双参数遗传距^[17]; 采用最小进化法(ME), 2000 次自展重抽样构建系统树; 采用 DNAsp5.0 软件分析核苷酸多态性^[18]。

2 结果

2.1 5 个中华蜜蜂地理群体 *csd* 的核苷酸多态性

取吉林长白山、海南海口、广西南宁、湖北神农架和江西靖安 5 个区域的中蜂群体, 用每只个体的胸部肌肉提取 DNA, 用 *csd* 3 区特异引物进行 PCR 扩增, 对目的片段进行克隆, 对每个个体挑取 1—3 个克隆进行测序, 总共获得 131 条 *csd* 3 区的序列, 片段长度为 705—861 bp。其中有很多序列在各个群体内部存在重复, 将各个群体内的重复序列去掉, 5 个群体共有 80 条在各个群体内部无重复的序列 (GenBank 序列号为 HQ915642-HQ915721), 这些序列归属于 69 个单倍型, 其中有 9 个单倍型为 2 个以上群体共有。

在对 *csd* 进行 PCR 扩增时容易扩增出另一个与 *csd* 基因序列高度相似的 *fem*^[19-20], 导致 PCR 产物中混入 *fem* 的序列, 在系统树上与 *csd* 序列形成完全分开的 2 支, 并且 *fem* 缺乏多态性。因此, 笔者首先利用 MEGA4.0 软件构建中蜂各地理种群所有单倍型间的 ME 分子系统树, 如图 1 所示, 所有的单倍型在分子系统树上很明显地形成 2 支, 将它们分别命名为 type I 和 type II, 其中 type I 单倍型有 32 条, type II 单倍型有 37 条。同时从进化树上也可看出, 来自不同地理群体的单倍型混杂在一起, 在系统树上并没有按照地理来源形成 5 支。多态性分析表明, type I 单倍型具有很高

的多态性 ($\pi=0.07487\pm 0.00738$), 远远高于 type II ($\pi=0.01655\pm 0.00115$)。并且本研究所获得的 type II 型单倍型也与 Hasselmann 等^[19-20]报道的 *fem* 序列具有很高的一致性, 因此本试验所获得的 type II 应该为 *fem*, 而 type I 才应该是 *csd*, 故仅用 type I 单倍型来进行进一步的分析。

将 5 个中蜂群体的 32 个 type I 单倍型依次命名为 H1—H32 (图 2), 吉林长白山、海南海口、广西南宁、湖北神农架和江西靖安 5 个群体的单倍型数分别为 11、9、9、7 和 5 个。其中, H3、H10、H11、H15、H23、H28 这 6 个单倍型分别为 2 个群体共有, H6 为吉林长白山、广西南宁、湖北神农架、江西靖安 4 个群体共有 (表 1)。对 5 个群体 type I 单倍型的多态性进行分析表明, 吉林长白山、江西靖安、广西南宁、海南海口和湖北神农架群体的多态性依次为 0.09425、0.09987、0.05096、0.04612 和 0.03588 (表 2)。其中, 吉林长白山和江西群体的多态性显著高于其它群体 (Z 检验, $P<0.01$), 而吉林长白山群体和江西靖安群体之间, 广西南宁群体、海南海口群体和湖北神农架群体之间的多态性没有显著差异。

2.2 5 个中华蜜蜂地理群体间核苷酸分歧度和遗传距离

采用核苷酸分歧度 (D_{xy}) 来表示群体间 *csd* 核苷酸多态性。各群体核苷酸分歧度在 0.03977—0.09208 (表

表 1 *csd* 3 区 type I 单倍型在 5 个中蜂群体中的分布

Table 1 Distribution of *csd* type I haplotypes in five *Apis cerena cerena* populations

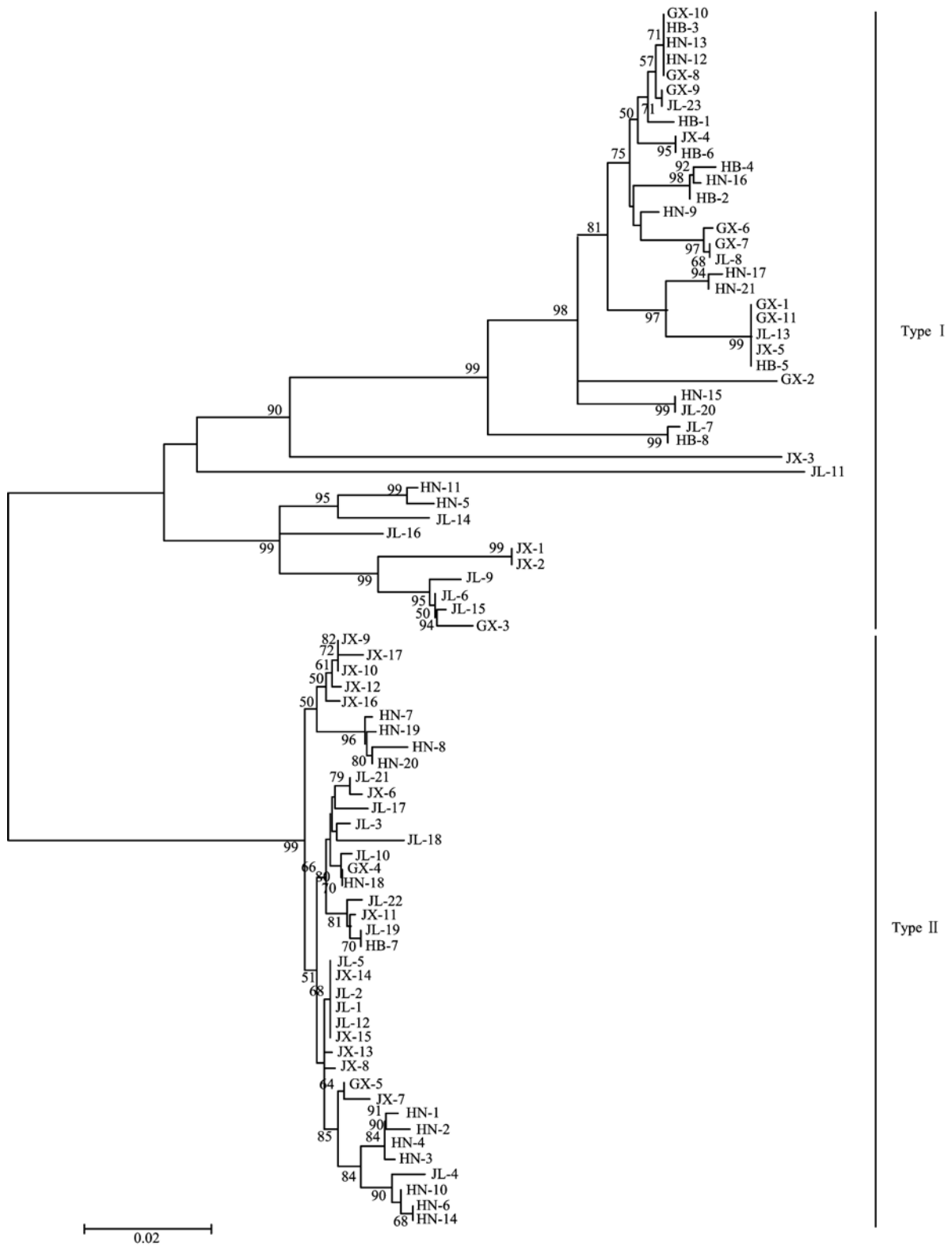
群体 Population	单倍型 Haplotype
吉林长白山 Changbaishan, Jilin	H1, H2, H3 , H4, H5, H6 , H7, H8, H9, H10 , H11
海南海口 Haikou, Hainan	H10 , H12, H13, H14, H15 , H16, H17, H18, H19
广西南宁 Nanning, Guangxi	H3 , H6 , H11 , H15 , H20, H21, H22, H23 , H24
湖北神农架 Shennongjia, Hubei	H6 , H23 , H25, H26, H27, H28 , H29
江西靖安 Jing'an, Jiangxi	H6 , H28 , H30, H31, H32

存在于 2 个以上群体的单倍型用粗体表示 Haplotypes exist in more than two populations are expressed in bold characters

表 2 5 个中蜂群体 *csd* 3 区 type I 单倍型的核苷酸多态性

Table 2 Nucleotide polymorphism of *csd* type I haplotypes in the region 3 from five *Apis cerena cerena* populations

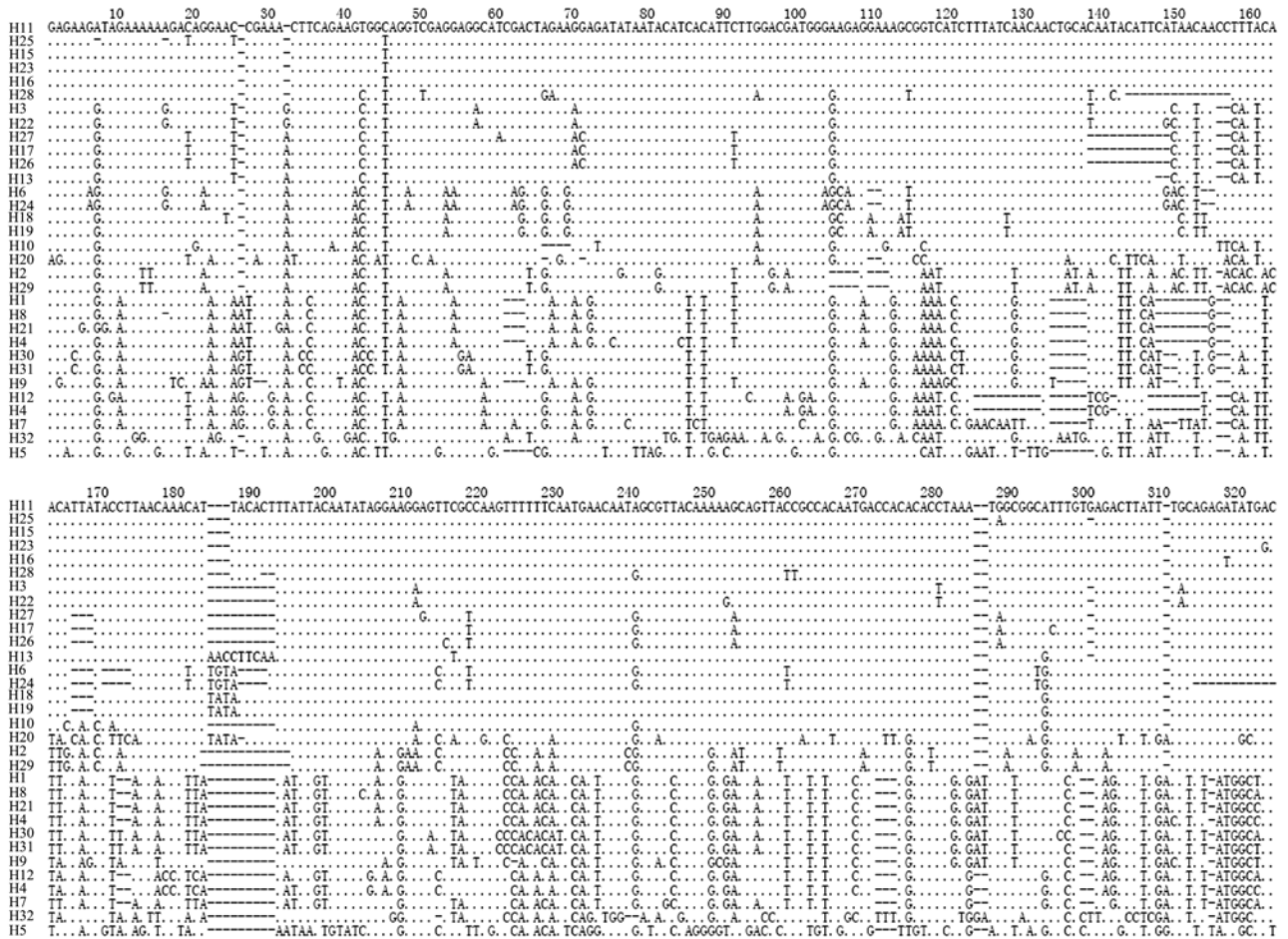
群体 Population	单倍型 Haplotype	变异位点数 Variable site	简约信息位点数 Parsimony informative site	核苷酸多态性 Nucleotide polymorphism (π)
吉林长白山 Changbaishan, Jilin	11	196	91	0.09425 \pm 0.01205a
海南海口 Haikou, Hainan	9	92	73	0.04612 \pm 0.01223b
广西南宁 Nanning, Guangxi	9	118	45	0.05096 \pm 0.01387b
湖北神农架 Shennongjia, Hubei	7	74	22	0.03588 \pm 0.00953b
江西靖安 Jing'an, Jiangxi	5	146	75	0.09987 \pm 0.01897a



JL: 吉林; GX: 广西; HN: 海南; HB: 湖北; JX: 江西, 图 3 同。节点处的数字为自展值
 JL: Jilin; GX: Guangxi; HN: Hainan; HB: Hubei; JX: Jiangxi. The same as fig. 3. Bootstrap percentages are shown on internal branches

图 1 5 个中蜂群体 *csd* 3 区所有单倍型的 ME 分子系统树

Fig. 1 Minimum evolution tree of *csd* haplotypes in the region 3 from five *Apis cerena cerena* populations



.表示碱基相同; -表示插入间隔 Dot indicates the same bases; - indicates the inserting blank

图 2 Type I 单倍型及其变异位点

Fig. 2 Variable sites in type I haplotypes

3)。其中湖北神农架中蜂与广西南宁中蜂之间分歧度最小，为 0.03977；江西靖安中蜂与吉林长白山中蜂分歧度最大，为 0.09208；江西靖安中蜂与湖北神农架中蜂、海南海口中蜂的分歧度也很大。

利用 *csd* 3 区单倍型序列计算 5 个中蜂地理群体间 kimura 双参数遗传距离，看出各种群间遗传距离在 0.02367—0.05728（表 3）。江西靖安中蜂与吉林长白山中蜂的遗传距离最大，湖北神农架中蜂与广西南宁

表 3 5 个中蜂地理群体间核苷酸分歧度 (Dxy) 和遗传距离

Table 3 Nucleotide divergence (Dxy) and genetic distance among five *Apis cerena cerena* populations

群体 Population	吉林长白山 Changbaishan, Jilin	海南海口 Haikou, Hainan	广西南宁 Nanning, Guangxi	湖北神农架 Shennongjia, Hubei	江西靖安 Jing'an, Jiangxi
吉林长白山 Changbaishan, Jilin		0.07872	0.08054	0.07981	0.09208
海南海口 Haikou, Hainan	0.04826		0.04978	0.04500	0.08329
广西南宁 Nanning, Guangxi	0.04871	0.02974		0.03977	0.08165
湖北神农架 Shennongjia, Hubei	0.04849	0.02615	0.02367		0.08510
江西靖安 Jing'an, Jiangxi	0.05728	0.05111	0.05141	0.05181	

上三角为核苷酸分歧度 (Dxy); 下三角为遗传距离 Upper diagonal is nucleotide divergence (Dxy); Lower diagonal is genetic distance

中蜂之间的遗传距离最小。

根据遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 结果显示先是湖北神农架中蜂与广西南宁中蜂聚在一起, 再与海南海口中蜂聚成一支, 然后与吉林长白山中蜂聚在一起, 最后才与江西靖安中蜂聚在一起 (图 3)。

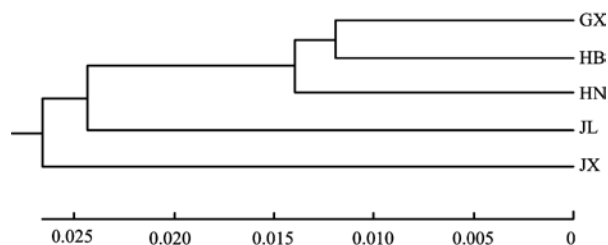


图 3 5 个中蜂地理群体遗传距离 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA diagram of five *Apis cerana cerana* populations based on genetic distance

3 讨论

csd 为蜜蜂性别决定基因, 在同一个蜜蜂种的同一群体中存在多种单倍型, 表现出很高的多态性^[10-13]。本研究中通过克隆测序获得了 *csd* 的多种单倍型, 并且分析表明 *csd* 在 5 个群体中的多态性都很高, 与前人研究结果一致。

笔者用所有获得 *csd* 的单倍型构建系统进化树, 理论上, 如果 *csd* 在不同地理群体间由于进化形成的变异很大, 那么在进化树上就可能会根据不同地理来源聚成不同的进化支, 而本研究的结果表明来自不同地理群体的 *csd* 的单倍型在进化树上并不能按照地理来源分成 5 支, 这可能说明 *csd* 在不同地理群体间的遗传分化还没达到完全按照地理来源分开的程度。另外一种可能就是由于人工养殖导致不同地理群体的中蜂存在生殖交流, 导致 *csd* 在不同地理群体间存在交流。

本研究发现, 吉林长白山中蜂和江西靖安中蜂与另外 3 个群体的遗传距离比较远。对于吉林长白山中蜂, 可能是由于在地理上与其它 3 个群体相隔较远, 彼此之间是相对隔离的群体, 缺乏基因交流, 因而遗传距离远; 而对于江西靖安中蜂, 原因是中蜂样品取自江西省靖安县中蜂种王养殖繁育场, 可能是经过人工定向选育的中蜂, *csd* 会丢失, 表现在 type I 单倍型较少, 多态性较低, 因此与其它群体的遗传距离最远。至于广西南宁、湖北神农架、海南海口遗传距离较近,

可能是人为引进蜂种或蜂群转地饲养致使三地中蜂基因交流。

4 结论

中华蜜蜂 *csd* 在各个地理群体中均具有很高的多态性, 其中吉林长白山和江西靖安群体的多态性显著高于其它群体, 而吉林长白山群体和江西靖安群体之间, 广西南宁群体、海南海口群体和湖北神农架群体之间的多态性没有显著差异。群体分析表明, 江西靖安中蜂与吉林长白山中蜂的核苷酸分歧度和遗传距离均最大, 湖北神农架中蜂与广西南宁中蜂之间核苷酸分歧度和遗传距离最小。系统进化树表明来自 5 个地理群体的单倍型在进化树上混杂在一起, 不能按照地理来源分为 5 支。

致谢: 在采集中蜂样品过程中, 得到薛运波、颜志立、胡军军、王天兵、张青标等老师的支持, 在此表示感谢。

References

- [1] 薛运波, 李兴安, 葛凤晨, 蒋 滢, 历延芳, 李志勇, 王 志. 长白山中华蜜蜂基因组 DNA 多态性的研究. 中国农业科学, 2007, 40(2): 426-432.
- Xue Y B, Li X A, Ge F C, Jiang Y, Li Y F, Li Z Y, Wang Z. The study on genomic polymorphism among different groups of local Changbaishan *Apis cerana cerana*s. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(2): 426-432. (in Chinese)
- [2] 姜玉锁, 赵慧婷, 姜俊兵, 曹果清, 张桂贤, 朱文进, 郭传甲. 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. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1535-1542.
- Jiang Y S, Zhao H T, Jaing J B, Cao G Q, Zhang G X, Zhu W J, Guo C J. Studies on mtDNA tRNA^{leu}~CO II gene holymorphisms of *Apis cerana* distributed in different geographic areas in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(7): 1535-1542. (in Chinese)
- [3] 谢宪兵, 薛运波, 吴小波, 黄 康, 曾志将. 中华蜜蜂群内工蜂监督研究. 江西农业大学学报, 2007, 29(5): 818-820.
- Xie X B, Xue Y B, Wu X B, Huang K, Zeng Z J. A study on the worker policing in *Apis cerana cerana*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2007, 29(5): 818-820. (in Chinese)
- [4] 谢宪兵, 苏松坤, 郑云林, 吴小波, 曾志将. 应用微卫星 DNA 技术研究中华蜜蜂群内工蜂监督效果. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1816-1821.
- Xie X B, Su S K, Zheng Y L, Wu X B, Zeng Z J. Study on the worker policing in *Apis cerana cerana* based on microsatellite DNA.

- Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(6): 1816-1821. (in Chinese)
- [5] 谢宪兵, 孙亮先, 黄 康, 曾志将. 中华蜜蜂急造王台的工蜂亲属优惠. *动物学报*, 2008, 54(4): 695-700.
- Xie X B, Sun L X, Huang K, Zeng Z J. Worker nepotism during emergency queen rearing in Chinese honeybee *Apis cerana cerana*. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(4): 695-700. (in Chinese)
- [6] 颜伟玉, Yves Le Conte, Dominique Beslay, 曾志将. 中华蜜蜂幼虫信息素鉴定. *中国农业科学*, 2009, 42(6): 2250-2254.
- Yan W Y, Yves L C, Dominique B, Zeng Z J. Identification of brood pheromone in Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2250-2254. (in Chinese)
- [7] Cook J M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity*, 1993, 71: 421-435.
- [8] Heimpel G E, de Boer J G. Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review Entomology*, 2008, 53: 209-230.
- [9] Beye M, Hasselmann M, Fondrk M K, Page Jr. R E, Omholt S W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 2003, 114: 419-429.
- [10] Hasselmann M, Beye M. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101: 4888-4893.
- [11] Hasselmann M, Beye M. Pronounced differences of recombination activity at the sex determination locus of the honeybee, a locus under strong balancing selection. *Genetics*, 2006, 174: 1469-1480.
- [12] Cho S, Huang Z Y, Green D R, Smith D R, Zhang J. Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: Balancing selection and trans-species polymorphisms. *Genome Research*, 2006, 16: 1366-1375.
- [13] Hasselmann M, Vekemans X, Pflugfelder J, Koeniger N, Koeniger G, Tingek S, Beye M. Evidence for convergent nucleotide evolution and high allelic turnover rates at the *complementary sex determiner* gene of Western and Asian honeybees. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25: 696-708.
- [14] Burland T G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software// Misener S, Krawetz S A. *Methods in Molecular Biology*, V132, *Bioinformatics Methods and Protocols*, Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2000: 71-91.
- [15] Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 2001, 92: 371-373.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1451-1452.
- [19] Hasselmann M, Gempe T, Schiøtt M, Nunes-Silva C G, Otte M, Beye M. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 2008, 454: 519-522.
- [20] Hasselmann M, Lechner S, Schulte C, Beye M. Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30): 13378-13383.

(责任编辑 岳 梅)