

日本で飼養されているセイヨウミツバチの系統

平成 26 年 5 月 23 日受付

高橋 純 一^{1,2)}

竹内 実^{1,2)}

松本 耕 三^{1,2)}

野村 哲 郎^{1,2)}

¹⁾ 京都産業大学総合生命科学部

²⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

要 約

日本で飼養されているセイヨウミツバチ *Apis mellifera* の系統調査とアフリカ化ミツバチやアフリカ系統が侵入してきたときの識別法としてミトコンドリア DNA の PCR-RFLP および塩基配列の適用性の検討を行った。サンプルはヨーロッパおよびアフリカと日本各地の 12 地域のミツバチ群を使用した。ミトコンドリア DNA の COI-COII 間を特異的に増幅する PCR を行ったところ PCR 産物長の違いで亜種間を識別できることが示された。日本のセイヨウミツバチは、すべての個体が *A. mellifera ligstica* の C 系統と一致していたため PCR と電気泳動によりアフリカ系統のセイヨウミツバチ *A. mellifera scutellata* と識別可能であることがわかった。M 系統のセイヨウミツバチは輸入されている可能性もあるため、もし M 系統のハプロタイプが見つかった場合には、PCR-RFLP と塩基配列の解析の方法を併用することにより迅速に日本におけるセイヨウミツバチの遺伝構造やアフリカ産のミツバチと識別が可能であることが明らかになった。

キーワード：セイヨウミツバチ、日本、遺伝的多様性、ミトコンドリア DNA、アフリカ化ミツバチ

緒 言

セイヨウミツバチ *Apis mellifera* L. は、元々はアフリカ大陸、ヨーロッパ、西アジアにのみ生息していたが、養蜂種として利用するために世界各地に導入され、現在は全世界的に生息している。このセイヨウミツバチには、アフリカ大陸からユーラシア大陸にかけておおよそ 25 亜種が分布しているが (Ruttner, 1988; Sheppard et al., 2003)、このうち養蜂種として適して

いるのは、ヨーロッパ系統の *A. mellifera ligatica*、*A. mellifera carnica*、*A. mellifera caucasia* などである。日本では、明治初頭に蜂蜜や蜜蝋の生産を行うために多くの国からセイヨウミツバチが導入され、現在でも日本各地で養蜂種として利用されている（岡田，1975）。

日本ではツキノワグマやオオスズメバチなどの天敵である捕食者がいるために野生下では生息することはないと考えられている（松浦&山根，1984）。ただしこれらの天敵が生息していない小笠原諸島や沖縄以南の南西諸島などの島嶼地域では本種の帰化が一部で確認されている（Kato 1993；高橋&片田，2002）。帰化した地域では、在来のはなバチとの花資源の競合や植物相に与える影響が懸念されている（Kato，1993）。またブラジルでは当初ヨーロッパ原産の *A. mellifera ligistica* 系統のミツバチが使われていたが、熱帯性の気候に適していなかったためより適応性の高い南アフリカ原産のアフリカミツバチ *A. mellifera scutellata* が導入されたが、この一部が逃げ出したところにより両亜種の間で交雑化が起きた。この亜種間雑種個体は、激しい攻撃性および盗食性があったためアフリカ化（Africanized）ミツバチ（あるいは killer bee）とよばれ養蜂種としては不適である。そのため日本を含めた多くの国では、アフリカ系統との雑種化がおきているアメリカ大陸からの導入については、アフリカ系統の混入を防ぐ目的で輸入管理体制を厳しくしている。現在の日本とミツバチの輸入協定がある国・地域には、ロシア、チリ、スロベニア、オーストラリア、ニュージーランド、ハワイ州である。もしこのアフリカ原産の亜種が日本のセイヨウミツバチと交雑した場合にアメリカ大陸でみられるようなアフリカ化ミツバチの性質も持つ可能性が予測される。これらの理由からアフリカミツバチとアフリカ化ミツバチは、環境省が定める外来生物法の要注外来生物リストに掲載されている（www.env.go.jp）。

ミツバチの系統を判定するには、形態形質や遺伝マーカーを使った方法が多数開発されている。ただし形態形質では容易に識別することは難しいため、現在は遺伝マーカーを使った方法が一般的である。アフリカ化ミツバチの問題は、特にアメリカ大陸で深刻であったため、アフリカ系統との亜種間雑種を識別するために形態形質や遺伝マーカーを使った方法が多数開発されている（Hall & McMichael, 2001; Suzao et al., 2002）。その中でもセイヨウミツバチのミトコンドリア DNA の COI-COII 間領域には、非コード領域が存在していて、2 種類の P と Q と呼ばれる特異的な配列構造をもっている（Cornuet et al., 1991）。この部分に挿入、欠損、置換、反復などの変異による多数の多型が存在していて、制限酵素 *Dra* I を使った PCR-RFLP 法により特徴的なハプロタイプによるセイヨウミツバチにおける産地の識別が可能であることが報告されている（Garnery et al., 1993）。これまでに南部および中央アフリカから 24 個のハプロタイプ（A 系統は P₀Q, P₀QQ, P₀QQQ, P₀QQQQ）が、アフリカ西部で（Y 系統は P₀QQ）が、アフリカ北部とヨーロッパ北西部から 25 個のハプロタイプ（M 系統は PQ, PQQ, PQQQ, PQQQQ）が、ヨーロッパ南東部から 3 個のハプロタイプ（C 系統は Q 配列のみである）が、中東地域から 5 個のハプロタイプ（O 系統は P₀Q, P₀QQ, P₀QQQ）をそれぞれが持っているこ

とが報告されている (Garnery et al., 1992, 1993; Clarke et al., 2001; Franck et al., 1998, 2001)。この手法を用いることにより、これまでにもアフリカ化ミツバチの遺伝子浸透の解析が行われている (Franck et al., 2001; Clarke et al., 2002)。アフリカ化ミツバチの原因となっているアフリカミツバチ *A. mellifera scutellata* は、南アフリカ原産の種で A 系統のハプロタイプのみを持っている。一方の *A. mellifera ligstica* はイタリア原産の種で C 系統のハプロタイプのみである。

日本にこれまで輸入されたセイヨウミツバチの系統は、過去の輸入実績からみてもイタリア原産の C 系統が主であると思われるが、過去には複数の国から輸入されていたため、どのような系統が現存しているのか不明である。また今回、系統造成を行うにあたり、日本で飼養および野生化しているセイヨウミツバチがどのような遺伝子型を持っているのか解明することが大切であると考え。そこで養蜂家からのヒアリング、文献調査および遺伝子解析の方法を用いて、日本において飼養および野生化しているセイヨウミツバチの系統解析を行った。

材料および方法

セイヨウミツバチの輸入系統を解析するために昭和時代から養蜂を行っている日本全国の養蜂家を対象に、過去にどの国から輸入したセイヨウミツバチを飼養していたかヒアリング調査を行った。また、過去に日本に輸入されたミツバチの系統に関して文献に記載されている情報を調査した。さらに、現在日本で飼養・野生化しているセイヨウミツバチの遺伝子型を解析し、その系統について調査した。遺伝子解析に使用した日本のセイヨウミツバチは、種蜂群と野生化している個体群を捕獲して行った。種蜂群は、長谷川木工、大阪府養ほう農業協同組合、西岡養蜂園、熊谷養蜂場(株)、俵養蜂場から購入したものをを用いた。

鋳型 DNA の調整は、働き蜂成虫の触角をピンセットで摘出し、それを試料として鋳型 DNA の調整を行った。これらの試料は DNeasy blood & Tissue kit を使用した。抽出の方法は、キットに添付されているプロトコールに従った。DNA 抽出溶液は、PCR 実験に供試するまで -20℃ で保存した。

プライマーと PCR 条件は、セイヨウミツバチのミトコンドリア DNA の COI-COII 遺伝子間領域を増幅することを目的として、その塩基配列に基づき設計したものである。センスプライマー (E2) の配列は、5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3'、アンチセンスプライマー (H2) の配列は 5'-CAATATCATTGATGACCA-3'である。PCR は 1 サンプルあたり全量 30μl で行った。反応液の組成は *Takara Ex Taq* ポリメラーゼ (5 units/μl) を 0.15μl 使用し、添付の 100μM の 2.5mM dNTP mix を 2.4μl、10×緩衝液を 3μl、100μM の各プライマーを 0.05μl、鋳型 DNA 溶液 (約 50 ng/μl) を 5μl 加えて、滅菌水で 30μl とした。反応は、プログラムサーマルサイクラー (TaKaRa) を用いて行い、94℃で 30 秒、46℃で 30 秒、72℃で 1 分間のサイクルを 35

回繰り返した後、72℃で5分間の伸長反応を行った。増幅したDNAは、アガロースゲル電気泳動法で分離してエチジウムブロマイド溶液(0.5µg/ml)で染色し、UV照射下で増幅の確認を行い、制限酵素処理まで-20℃で保存した。

制限酵素による消化は、*Dra* I (Takara) で処理を行った。反応液の組成はPCR産物を15µl、*Dra* I (10 units) を1µl、添付の10×緩衝液を2µl、滅菌水で20µlとした。反応条件は37℃で3時間行った。制限酵素処理をしたPCR産物の電気泳動には、まず6%のLongrangerアクリルアミドゲル(TaKaRa)を用い、電極用緩衝液にはTBE緩衝液(50 mM Tris, 50 mM ホウ酸, 1 mM EDTA, pH8.2)を用いた。電気泳動装置にはジェノケンサー装置(アトー)を使用し、107×60 mmのゲルを用いて室温条件下において200 V定電圧で60分間の泳動を行った。泳動後、ゲルはサイバーゴールド溶液(0.5µg/ml)で染色し、UV照射下で検出されたバンドパターンをVersaDoc(バイオラッド)で写真撮影をした。

ハプロタイプのDNAの塩基配列の決定は、PCR-RFLP法により特異的であったハプロタイプの塩基配列を決定した。塩基配列決定のための鋳型DNAは、PCR-RFLPで使用したPCR産物と同じものを使用した。鋳型DNAの精製は、ExoSAP IT (GE アマシャム)で処理を行ったものを使用してBigDye terminator cyclesequencing kit ver.3.1 (アプライドバイオシステムズ)でサイクルシーケンシング反応を行った。反応はプログラムサーマルサイクラー(TaKaRa)を用いて行い、94℃で15秒、46℃で30秒、60℃で4分間のサイクルを30回繰り返して解析まで-20℃で保存した。塩基配列の決定には、エタノール沈殿で緩衝液をHiDi フォルムアミド(アプライドバイオシステムズ)に交換した後、自動DNAシーケンサーABI 3500(アプライドバイオシステムズ)を用いて行った。

結果および考察

(1) 文献調査

資料をもとに1963年から2011年までに日本に輸入されたミツバチの国別輸入実績を図1に示した。1963年以降、14か国から輸入してことがわかった。タイ、スロベニア、スイス、カナダ、中国、ユーゴスラビア、フィジー、イタリア、ニュージーランド、オーストラリア、コロンビア、ロシア(ソ連)、アメリカである。2008年から2009年には、オーストラリアからの輸入の停止措置が行われたため、輸入件数はゼロとなっていた。近年は、国内での増殖に力が入れられ輸入量は減少傾向で、スロベニアとオーストラリアからのみとなっている。

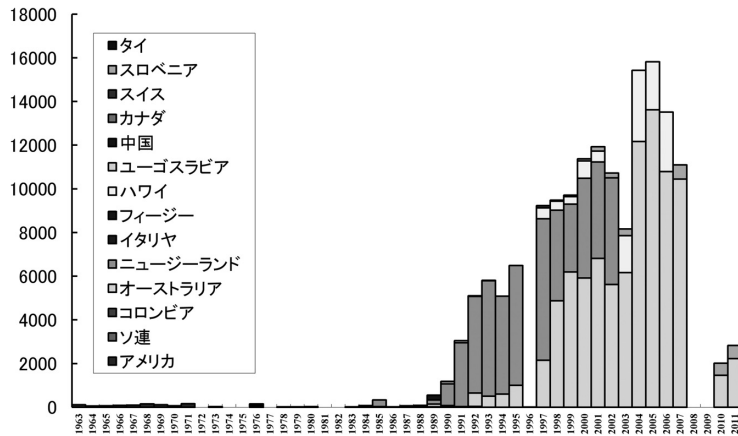


図1 1963年から2011年までの国別輸入実績

(2) 輸入実績のある系統

ヒアリングおよび文献調査の結果から、過去に日本に持ち込まれた可能性のある系統を以下の表1から6に示した。

表1 日本に輸入されたことがあるイタリアン系統

イタリアン	日本の気候に適応していたことから明治時代にアメリカ、イタリアから、大正時代にはイギリスからも輸入されていた。現在は、主にオーストラリアからスリーバンドの系統が輸入されている。
スターライン	イタリアン同士の雑種で集蜜性および蜂児生産性が高いと言われている。1代雑種のため次世代の女王蜂が産む働き蜂には、同等の能力は期待できない。
スリーバンド (三条)	イタリアンから選抜された系統で、日本では三条と呼ばれている。オーストラリアから輸入されている女王蜂は、この系統であると言われている。
コルドバン	イタリアンから選抜された系統である。イタリアンに比べてわずかに大人しいと言われている。体色には、黒色の縞模様がなく、頭部や脚の体色が、薄茶色いのが特徴である。過去にコロンビアなどから輸入されていたようである。

表2 日本に輸入されたことがあるカーニオラン系統

カーニオラン (スロベニア産)	イタリアンに比べて性質は温和であり、夜間や低温時に巣箱を開けても大人しい傾向がある。集蜜性や低温耐性も高いため、越冬はイタリアンより小群で行うことができるが、夏場の高温には弱い傾向がある。働き蜂の体長は、イタリアンに比べて大きく、また舌の長さも長いため蜜腺が長い花からも採蜜することができる。体色は灰から茶色と黒色の縞模様で被毛は白色で、欧州では蜜蓋が白色で見た目が美しいため、巣蜜販売用に良く利用されている。
--------------------	---

表3 日本に輸入されたことがあるコーカシアン系統

コーカシアン	ロシア（旧ソ連）のコーカサス地方を原産地としているセイヨウミツバチの一亜種 <i>Apis mellifera caucasia</i> Pollmann, 1879 である。ふそ病やヘギイタダニなどの病害虫に対して他のセイヨウミツバチよりも抵抗性が高いと言われている。働き蜂の体長は、カーニオランよりは小さく、イタリアンに比べると大きく、舌はカーニオランよりも長いのでシロツメクサなどの蜜槽の深い花からも採蜜することができる。体色は薄灰色と黒色の縞模様が特徴である。過去に日本で飼育された記録では、産卵開始が遅く、産卵数も他の2亜種と比べて少なく、またプロポリスを多く集める傾向が見られる。ただし国内では現在飼養されていない。
ミッドナイト	コーカシアンから選抜された系統同士の雑種で、集蜜性および蜂児生産性がコーカシアンよりも高いと言われているが、1代雑種のため次世代の女王蜂には、同等の能力は期待できない。
ロシアン	沿海州のハバロスク（プリモルスキー）地方原産の <i>A. m. caucasica</i> の個体群ことを指す。古くからミツバチヘギイタダニに抵抗性が高いことが知られている。女王蜂や働き蜂は巣板上を動きまわり、落ち着きがないので扱いにくいと言われていたが、改良が進んで現在は大人しくなっている。アメリカでは、ミツバチヘギイタダニからの被害を低減させるため、2000年から隔離した島で増殖した個体の導入試験が進められている。

表4 日本に輸入されたことがあるメリフェラ系統

欧州産黒蜂	働き蜂の体色は、黒褐色が強いのが特徴で、分類学上は、セイヨウミツバチ原名亜種の <i>Apis mellifera mellifera</i> Linnaeus 1758 で、イギリス、ドイツ、オランダなどの在来種のことを指している。スイスの系統は、特に黒色が強いのでニグラ (<i>Nigra</i>) と呼ばれている。過去に日本にも散発的に輸入されているが、養蜂種としての実用性は原産地でも低い。
-------	--

(3) 国内の系統

これまでに国内で作出された系統および野外に帰化した個体群から見つかった系統を表4および表5に示した。

表5 国内で作成された系統

ふくおか ハイクイーン	福岡県畜産研究所で開発が試みられたセイヨウミツバチのイタリアンを基本とした雑種である。アメリカから輸入した系統と福岡県畜産研究所で維持していた優良系統とを隔離交配し、産卵数や耐病性が高く、温和な群を作成し、集蜜力を高めることに成功した。1990年代はじめに、未交尾女王蜂を配布していたが、現在では生産されていない。
----------------	---

表6 国内で見つかった系統

Varroa surviving bee (VSB; ミツ バチヘギイタ ダニ抵抗性系統)	セイヨウミツバチの中でミツバチヘギイタダニに抵抗性を持つ群のことで、殺ダニ剤を使用しないで飼養することができる。1990年代にフランスとアメリカの野生群からミツバチヘギイタダニの寄生率が低い群が相次いで見つかるとともに系統造成が進められている。ダニ耐性以外のVSB群の特徴には、働き蜂の攻撃性は高い一方で、集蜜力が低いのが問題と言われているが、実用化に向けて改良が試みられている。日本でも島嶼で野生化した一部の群で同様の系統が見つかっている。
--	---

(4) PCR および PCR-RFLP の解析

本実験に使用したサンプルは、PCR によって全ての個体が増幅した。各個体の PCR 産物はアガロースゲル電気泳動において1本のDNAバンドを示したが、系統間でPCR産物長に違いが見られた。イタリアンとコントロールで使用したアフリカ系統 *A. mellifera scutellata* の間では、明瞭に増幅サイズの違いが確認できた。日本のセイヨウミツバチは、イタリアン系統は、*A. mellifera ligstica* と全ての個体が同一サイズであった。

PCR-RFLP のパターンは、日本のセイヨウミツバチと5亜種のPCR-RFLPパターンは表6に示した。イタリアン系統は、C1ハプロタイプに一致していた。コントロールに使用した *A. mellifera mellifera* は、65、130、142、422bpの4つの断片のM6ハプロタイプと *A. mellifera ligstica* と同じC1タイプに一致していた。*A. mellifera scutellata* は、47、109、483bpの3つの断片のA4ハプロタイプと一致していた。*A. mellifera capensis* は、47、108、483bpの3つの断片のA1ハプロタイプのパターンと一致していた。日本のサンプルのほぼ全てが、P構造の欠損しているCタイプのC1ハプロタイプパターンを示していた。C1ハプロタイプは、41、47、64、420bpの4つの断片になった。

(5) ハプロタイプの塩基配列の決定

各亜種および個体群ごとに特異的なハプロタイプの塩基配列を決定し、得られた各ハプロタイプの配列のうちP構造の部分を図に示した。この部分はそれぞれC、A、Mのハプロタイプそれぞれに特徴的な欠損を示しているため塩基配列による系統識別が可能であった。また得られた配列はPCR-RFLP法により得られた断片長のパターンと配列内での *Dra* I 認識配列箇所が一致していたことからPCR-RFLP法は成功していると判断することができた。イタリアン系統と思われるサンプルは、P構造が欠損しているQのC1ハプロタイプの配列と一致した。コントロールの *A. mellifera mellifera* は、PQQのM6ハプロタイプの配列とC1ハプロタイプの配列に一致した。*A. m. carnica* は、Pが欠損しているC1ハプロタイプと一致した。*A. mellifera scutellata* は、P₀QQのA4ハプロタイプに *A. mellifera capensis* はP₀QのA1ハプロタイプの配列と一致した。スロベニア産カーニオラン系統のほとんどは、P領域が欠損しているC1ハプロタイプと一致していた。さらに2個体のみであるが、ハプロタイプC1以外にカーニオラン特有のC2eとC2dが見つかった。日本のセイヨウミツバチのハプロタイプは、ほぼすべての個体でP構造が欠損していたC1ハプロタイプの配列と一致していた(表7)。

表7 ミトコンドリア DNACOI-COII 領域間のハプロタイプ

系 統	購入先/捕獲地	MtDNA ハプロタイプ					
		P	P0	P0			
		○	○	○	○	○	○
		M6	A1	A4	C1	Ce	Cd
イタリアン	長谷川養蜂				10		
イタリアン	大阪府養ほう農業協同組合				2		
イタリアン	西岡養蜂園				12		
イタリアン	熊谷養蜂				1		
カーニオラン	依養蜂場				10	3	3
イタリアン	北海道札幌市				20		
イタリアン	宮城県仙台市				20		
イタリアン	新潟県上越市				20		
イタリアン	京都府京都市				20		
イタリアン	山口県山口市				20		
イタリアン	熊本県八代市				20		
イタリアン	沖縄県那覇市				20		
<i>A. mellifera capensis</i>	South Africa		2	3			
<i>A. mellifera scutellata</i>	South Africa			5			
<i>A. mellifera ligstica</i>	Italia				5		
<i>A. mellifera carnica</i>	Croatia				5		
<i>A. mellifera mellifera</i>	France	3			2		

実験調査のまとめ

今回初めて国内で飼養されているセイヨウミツバチの系統を遺伝子レベルで明らかにすることができた。特に *A. mellifera ligstica* と *A. mellifera scutellata* の間には顕著な差異が認められ、PCR による増幅産物によって両者を識別することが可能であった。日本のセイヨウミツバチは、ほぼすべての個体がハプロタイプ C と同じ大きさであった。ヨーロッパ原産とアフリカ原産のセイヨウミツバチにおける COI-COII 遺伝子間領域の PCR 産物の電気泳動では、亜種ごとに差異が認められているが (Garnery et al., 1993)、これらの結果は、過去の海外での研究調査と一致していた。

イタリアン系統 *A. mellifera ligstica* とアフリカ系統 *A. mellifera scutellata* 両亜種間の PCR 産物サイズの大きな差異は、2 亜種の亜種間交雑個体がアフリカ化ミツバチになることから、仮に日本でアフリカ産のセイヨウミツバチやアフリカ化ミツバチが侵入してきた時にこれらを識別する上で簡易な PCR 診断方法による有効な遺伝子マーカーとして利用できることも示され

た。また、DNA 抽出から PCR および電気泳動までおおよそ 3 時間程度で行うことが可能であるため非常に迅速な診断方法でもある。

PCR-RFLP および塩基配列の解析によって日本のセイヨウミツバチには、三つのハプロタイプ C1、Cd、Ce が存在していることが示された。Cd、Ce ハプロタイプも含めて、C 系統のハプロタイプは、*A. mellifera ligstica* や *A. mellifera carnica* などのヨーロッパ南西部系統のセイヨウミツバチが持っている特徴的な遺伝子型であり (Garner et al., 1992, 1993; Franck et al., 1998)、それと同じ断片パターンであった。塩基配列の解析から P 構造部分の配列の欠損状態がそれぞれ A、M、C 系統特異的であり、この部分の配列により系統を明瞭に識別することができた。今回の解析では、日本で C 系統のハプロタイプ以外は見つかっていないことから、アフリカ系統の遺伝子の流入は現在のところおきていないことが示された。また、在来のニホンミツバチ *Apis cerana japonica* も同じプライマーによって PCR 増幅が可能であるが、PCR 産物サイズは 400bp 以下ときわめて小さいため簡単に識別することが可能である (Takahashi et al., 2002)。

日本のセイヨウミツバチは、これまでオーストラリア、ハワイ、スロベニア等の限られた地域からのみの輸入を行っている。また特に、クマヤスズメバチなどの天敵が生息している地域では、野生下での繁殖が難しいため養蜂家の保護下でなければ一般的に生息することができない (松浦 & 山根, 1984)。これらの原因により、日本でのセイヨウミツバチの遺伝的な多様度は、2 次的にセイヨウミツバチが持ち込まれたアメリカ大陸 (Franck et al., 2001; Clarke et al., 2002) やオセアニア地域 (Koulinanos and Crozier, 1996; Oldroyd et al., 1995) と比較してミトコンドリア DNA レベルではあるが極めて多様性が低いことが示された。

セイヨウミツバチのミトコンドリア DNA の COI-COII 間は亜種ごとに非常に多型に富んでいることから、この領域の PCR および PCR-RFLP 法により日本ではアフリカ化ミツバチやアフリカ系統への判定に使用できることも明らかになった。また、P 構造部分の塩基配列の欠損パターンによっても亜種間のハプロタイプが識別可能である。ハプロタイプ M と A 系統間の PCR 産物サイズおよび RFLP パターンは、似ている場合があるため (Garner et al., 1992, 1993; Franck et al., 1998)、塩基配列を解析することで、より精度の高い判定方法になることが予測された。日本のセイヨウミツバチのハプロタイプは、ほぼ全てが C1 ハプロタイプである。そのため PCR-RFLP や塩基配列の解析は、極めてまれなハプロタイプ M 系統の個体のみで行えばよい。COI-COII 遺伝子間領域による解析は、非常に日本では有効であると考えられた。しかしながら、ミトコンドリア DNA の解析は、母系からの診断になってしまうことから、亜種間雑種の場合には父系による遺伝子侵入も考えられるため核ゲノムを用いた診断方法の適用性の検討も行わなければならないと考える。

引用文献

- Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Franck, P., Quezada-Euan, J. G. and B. P., Oldroyd. (2002) The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution* 56: 1462-1474.
- Counuet, J.-M. and L., Garnery, L. (1991) Putative origin of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics* 128: 393-403.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. and J.-M., Cornuet. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52: 1119-1134.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B.P., Hepburn, H. R., Solignac, M. and J.-M., Cornuet. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86: 420-430.
- Garnery, L., Cornuet J.-M. and M., Solignac. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1: 145-154.
- Garnery L., Solignac, M., Celebrano, G. and J.-M. Cornuet. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49: 1016-1021
- Hall, G. H. and M., McMichael. (2001) Frequencies of restriction fragment-length polymorphism indicate that neotropical honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations have African and West European origins. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 670-676.
- Kato, M., Shibata, A., Yasui, T. and H., Nagamasu. (1999) Impact of introduced honeybees, *Apis mellifera*, upon native bee communities in the Bonin (Ogasawara) Islands. *Res. Popul. Ecol.* 41: 217-228.
- Koulianos, S. and R. H., Crozier. (1996) Mitochondrial DNA sequence data provides further evidence that the honeybees of Kangaroo Island, Australia are of hybrid origin. *Apidologie* 27: 165-174.
- 松浦誠・山根正気 (1984) スズメバチの比較行動学.北海道大学図書刊行会.
- 岡田一次 (1975) ミツバチの科学.玉川大学出版部.
- Oldroyd, B. P., Cornuet, J.-M., Rowe, D., Rinderer, T. E. and R. H., Crozier. (1995) Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia: similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. *Heredity* 74: 315-325.
- Ruttner, F. (1988) Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.
- Suzao, A., Lee, M. Y. and H. G. Hall. (2002) A locus with restriction fragment length polymorphism characteristic of African and European honey bee (Hymenoptera: Apidae) group of subspecies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 115-124.
- 高橋純一・片田信一 (2002) 西表島の養蜂とセイヨウミツバチの帰化状況.ミツバチ科学 23: 71-74.
- Takahashi, J., Nakamura, J., Sasaki, M., Tingek, S. and S., Akimoto. (2002) New haplotypes for the non-coding region of mitochondrial DNA in cavity-nesting honey bees *Apis koschevnikovi* and *Apis nuluensis*. *Apidologie* 33: 25-31.

謝 辞

本原稿を作成するにあたり、故吉田忠晴教授、木村澄博士、中村純教授および加藤学氏にはご助言を受けた。この場を借りてお礼申し上げる。本研究は、平成 24 年度日本学術振興会科学研究費若手 B（課題番号 24780323）、山田養蜂場(株)みつばち研究助成基金および社団法人日本養蜂はちみつ協会による支援により行われた。

付録データ

ミトコンドリア DNACOI-COII 領域間のハプロタイプの塩基配列

>M6 ハプロタイプ

```
TTAATAAATTAATATAAAAATA-----TAAATTATATTTATTAAAA-TTAAATTTATTAAAA  
TTT-CCCACTTAATTCATTTTAAATTTAAAAATAAATTAATAACAATTTTAAATAAAAATAA  
ATAA- -TTAATTTTATTTTATATGAATTTTAAATTCATCTTAAAGATTTAATCTTTTT  
ATTAATAATTAATAAATTAATATAAAAAATAAAACAAAATATAACAAAATATATTTATTA  
AAATTTAATTTATTAAA
```

>A1 ハプロタイプ

```
TTAATAAATTAATATAAA - TAAAACAAAATATAACAAAATATATTTATTAAAAATTTAA  
TTTATTAAAAATCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTA-TAACAAT-TTT  
AATAAAAATAAATAATTAATTTTATTTTATATGAATTTTAAATTCATCTTAAAGATTT  
AATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAAA--TAAAACAAAATATAACAGAATATA  
TTTATTAAAAATTTAATTTATTAAA
```

>A4 ハプロタイプ

```
TTAATAAATTAATATAAA - TAAAACAAAATATAACAAAATATATTTATTAAAAATTTAA  
TTTATTAAAAATCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTA-TAACAAT-TTT  
AATAAAAATAAATAATTAATTTTATTTTATATGAATTTTAAATTCATCTTAAAGATTT  
AATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAAA--TAAAACAAAATATAACAGAATATA  
TTTATTAAAAATTTAATTTATTAAAAATCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAA  
TTAA-TAACAAT-TTAAATAAAAATAAATAATTAATTTTATTTTATATGAATTTTAAAT  
CAATCTTAAAGATTTAATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAAA -TAAAACAAA  
ATATAACAGAATATATTTATTAAAAATTTAATTTATTAAA
```

Cd ハプロタイプ

```
GTATTTTTAAACTTTTATTAAAATTTCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTA  
ATAACAATTTTAAATAAAAATAAATAATTAATTTTATTTTATATGAATTTTAAATTCAT  
CTTAAAGATTTAATCTTTTTATTAAAATTAATAAATTAATATAAAAATAAAACAAAATAT  
AACAGAATATATTTATTAAAATTTAATTTATTAAAAATTTCCACATGATTCATATTTATAT  
TTCAAGAATCAAATTCATATATGCTGATAATTTAATTTCAATTCATAATATAGTTATAAT  
AATTATTATTATAATTTCAACATTAAGTATATATTATTTAGATTTATTTATAAACAA
```

ATTTTCAAATTTATTTTTATTAAAAAATCATAATATTGAAATTATTTGAACAATTATTCC
AATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTTCCATCATTAATAAATTTTATATTTAATTGATGAA
ATTGTAAATCCTTTTTTTTTCAATTAATCAATTGGTCATCAATG

Ce ハプロタイプ

GTATTTTTAAACTTTTTATTAAAAATTTCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTA
ATAACAATTTTAATAAAAATAAATAATTAATTTTATTTTTATATTGAATTTTAAATTCAAT
CTTAAAGATTTAATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAAAATAAAACAAAATAT
AACAGAATATATTTATTAAAAATTTAATTTATTAAAAATTTCCACATGATTTCATATTTATAT
TTCAAGAATCAAATTCATATTTATGCTGATAATTTAATTTTCATTTTCATAATATAGTTATAAT
AATTATTATTATAATTTCAACATTAAGTATATATTATTTTAGATTTATTTATAAACAA
ATTTTCAAATTTATTTTTATTAAAAAATCATAATATTGAAATTATTTGAACAATTATTCC
AATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTTCCATCATTAATAAATTTTATATTTAATTGATGAA
ATTGTAAATCCTTTTTTTTTCAATTAATCAATTGGTCATCAATG

C1 ハプロタイプ

GTATTTTTAAACTTTTTATTAAAAATTTCCCACTTAATTCATATTAATTTAAAAATAAATTA
AATAACAATTTTAAATAAAAATAAATAATTAATTTTATTTTTATATTGAATTTTAAATTCA
ATCTTAAAGATTTAATCTTTTTATTAAAAATTAATAAATTAATATAAAAATAAAACAAAAT
ATAACAGAATATATTTATTAAAAATTTAATTTATTAAAAATTTCCACATGATTATATTTAT
ATTTCAAGAATCAAATTCATATTTATGCTGATAATTTAATTTTCATTTTCATAATATAGTTATA
ATAATTATTATTATAATTTCAACATTAAGTATATATTATTTTAGATTTATTTATAAAC
AAATTCTCAAATTTATTTTTATTAAAAAATCATAATATTGAAATTATTTGAACAATTATT
CCAATTATTATTCTATTAATTATTTGTTTTCCATCATTAATAAATTTTATATTTAATTGATG
AAATTGTAAATCCTTTTTTTTTCAATTAATCAATTGGTCATCAATG

Genetic structure of apicultural honeybee *Apis mellifera* in Japan

Jun-ichi TAKAHASHI
Minoru TAKEUCHI
Kozo MATSUMOTO
Tetsuro NOMURA

Abstract

The apicultural honeybee *Apis mellifera* L. has been introduced for about hundred years in Japan. We sequenced the non-coding intergenic region between COI and COII mitochondrial genes from 12 populations collected through Japan. About 50 different haplotypes have been reported for the non-coding region of *A. mellifera*. This study detected *A. mellifera ligstica* type in Japan, which we consisted haplotype C1. These results suggested that PCR product only was distinguished from African haplotype. In addition PCR-RFLP and sequencing of the non-coding region increased the reliability of diagnostic when found other haplotype from Japan.

Keywords: *Apis mellifera*, genetic diversity, Japan, mitochondrial DNA, Africanized honeybee