

利用 VNTR 分子标记鉴定蜜蜂群内蜂王交配次数和雄蜂母系来源

谢宪兵^{1,2} 苏松坤^{3,*} 黄康¹ 曾志将^{1,*}

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所,南昌 330045; 2. 泉州师范学院,福建泉州 362000;

3. 浙江大学动物科学院,杭州 310029)

摘要:如何准确测定蜂王交配次数和雄蜂母系来源,是研究蜜蜂亚家系行为生物学的关键。本研究利用王浆主蛋白(MRJP_s)的串联重复序列多态性(VNTR)分子标记分别鉴定了蜂王单雄人工授精、双雄人工授精和自然交尾的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蜂群中的蜂王交配次数和雄蜂母系来源。结果表明:在蜂王单雄人工授精和双雄人工授精蜂群中,蜂王的交配次数分别为 1 和 2;在蜂王自然交尾的 2 个蜂群中,蜂王的交配次数分别为 8 和 5。另外,经鉴定发现:在以上实验蜂群中,所有雄蜂都是由蜂王产的未受精卵发育而来。因此,作为一种分子标记,蜜蜂 MRJP_s VNTR 能简单、有效地鉴定蜂群内蜂王的交配次数和雄蜂母系来源。

关键词:中华蜜蜂;王浆主蛋白;VNTR 分子标记;蜂王交配次数;雄蜂;母系来源

中图分类号:Q965 文献标识码:A 文章编号:0454-6296(2008)01-0020-06

Queen mating frequency and maternity of drones in honeybee colonies detected with VNTR molecular markers

XIE Xian-Bing^{1,2}, SU Song-Kun^{3,*}, HUANG Kang¹, ZENG Zhi-Jiang^{1,*} (1. Institute of Apiculture Research, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of Quanzhou Normal, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The determination on the mating frequency of queens and maternity of drones is exactly among the key factors to understand the behavioral and biological characters of honeybee sub-family. In this study, the mating frequency of queens and maternity of drones were detected based on major royal jelly proteins (MRJP_s) various number tandem repeat (VNTR) in *Apis cerana cerana* colonies, of which the queens were instrumentally inseminated with 1 or 2 drones, or mated naturally, respectively. The results showed that the mating frequencies of queens were 1 and 2 in colonies whose queens were instrumentally inseminated with 1 and 2 drones, respectively; in other two colonies whose queens mated naturally, the mating frequencies of queens were 8 and 5, respectively. In addition, all the drones originated from the unfertilized eggs laid by queens in all of these colonies, that is to say, the queens not workers, were the maternities of drones. Thus the MRJP_s VNTR can be used as molecular markers to detect the mating frequency of queens and maternity of drones simply and effectively.

Key words: *Apis cerana cerana*; major royal jelly proteins; VNTR molecular marker; queen mating frequency; drone; maternity

蜜蜂社会行为学特性一直受到广大生物学家的关注,其原因一方面是人们意识到蜜蜂给农作物授

粉的重要性,另一方面是蜜蜂社会行为学研究结果对整个社会生物学及行为生态学领域都有深远影响

基金项目:国家自然科学基金项目(30560114;30571409)

作者简介:谢宪兵,男,1980年7月生,江西万安人,博士研究生,主要从事蜜蜂研究工作, E-mail: xbxbees@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: bees1965@sina.com; susongkun@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2007-06-02; 接受日期 Accepted: 2007-08-14

(黄智勇,1992;曾志将,2003)。近 20 年来,蜂群中蜂王的交配次数(queen mating frequency)和雄蜂母系来源(maternity of drone)一直是蜜蜂社会行为特性研究的热门课题之一(Oldroyd *et al.*, 2001; Fsoter *et al.*, 2001)。在蜂王自然交尾的蜂群中,处女女王通常与 5~17 只雄蜂交配(Adams *et al.*, 1977),蜂王与每只雄蜂交配时可获得 600 多万精子,精子储存在贮精囊中,这些精子一般够蜂王一生受精时使用(Moritz, 1985)。

研究处女女王与雄蜂交配数量的方法很多,最早的方法是研究者通过在蜂群巢门口观察处女女王交配后带回的交配标志进行计数(Taber, 1955; Laidlaw and Page, 1984);这种方法要求工蜂体色必须存在明显差异。Page 和 Metcal(1982)应用同工酶标记技术研究了处女女王与雄蜂交配数量以及雄蜂精液的使用情况。Sasaki 认为 Page 的方法因分辨力低而不能有效判断工蜂的父亲来源,因此在 1995 年运用 DNA 指纹技术分析确认了蜂王是高度多雄交配(Sasaki *et al.*, 1995);然而该方法受个体 DNA 的数量限制,且反应的条件要求很高。Fondrk 和 Page(1993)应用 RAPD 标记和同工酶标记技术测定了每只工蜂的父亲来源,但 RAPD 作为一种分子标记,它的重复性较差而不为人们所广泛接受。最近发展的微卫星 DNA 技术可以很好地检测出蜂群中蜂王授精次数和雄蜂母系来源(Ratnieks and Kvesscher, 1989; Oldroyd and Ratnieks, 2000; Pirk *et al.*, 2003),可是该技术要有荧光染料标记和精密的 DNA 片断分析仪器等,费用昂贵,因此在一般的实验室中也受到限制。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*(简称中蜂)是我国宝贵的蜂种资源,其王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)基因的克隆及功能研究对获得有益于人类健康的新功能基因具有重要意义。苏松坤等构建了 8 日龄中蜂头部的 cDNA 文库,克隆和测序了 MRJPs 基因家族的 4 个基因(MRJP1, 2, 3 和 5),同时分别在 MRJP2, 3 和 5 的 cDNA 序列中发现了串联重复序列多态(various number tandem repeat, VNTR)片段,这些 VNTR 在中华蜜蜂中呈高度多态性,而且遵循孟德尔遗传规律,呈共显性遗传(苏松坤等, 2004; Su *et al.*, 2005a, 2005b)。本实验在前人研究的基础上,运用中华蜜蜂 MRJP2, MRJP3 和 MRJP5 VNTR 分子标记技术,分别鉴定了蜂王自然交尾、双雄人工授精和单雄人工授精的中蜂群的蜂王交配次数和雄蜂母系来源,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验蜂群:实验蜂群是由江西农业大学蜜蜂研究所购自 3 个相隔较远的江西山区蜂场(靖安、上饶和遂川)的中蜂,然后饲养于江西农业大学蜜蜂研究所院内。

1.1.2 主要试剂和仪器:主要试剂有:Chelex-100(5%); Ringer buffer(130 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L KCl, pH7.4); DTT(1 mol/L); Proteinase K(10 mg/μL); RNase(10 mg/mL); Taq DNA Polymerase(5 U/μL); MgCl₂(25 mmol/L); 10 × Buffer(100 mmol/L KCl, 80 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris-HCl, pH9.0, NP-40); dNTP(10 mmol/L); Primer(mrjp2, mrjp3, mrjp5); Mark(100 bp)。

主要仪器有:高速冷冻离心机(Eppendorf 5415R) PCR 仪(Eppendorf 96 孔)琼脂糖凝胶电泳系统(Tanon EPS300)计算机自动成像系统(Tanon GIS2009)和蜂王人工授精仪(吉林省养蜂科学研究所)等。

1.2 方法

1.2.1 蜂王的人工授精:考虑到亲缘关系的影响,实验采用来自靖安的中蜂培育处女女王,以上饶的雄蜂精液进行单雄人工授精;以上饶和遂川的雄蜂精液进行双雄人工授精。处女女王的培育和蜂王的人工授精方法参照文献(曾志将等 2005)。

1.2.2 样品的采集:为了避免成蜂错投而造成的实验误差,实验分别在 2 群单雄人工授精蜂群(A 和 B)、2 群双雄人工授精蜂群(C 和 D)和 2 群自然交尾蜂群(E 和 F)中采集蜂群内的工蜂蛹和雄蜂蛹各 50 个。样品在蜂王产卵后 7 周采集,所有样品采集后马上放入 -20℃ 的低温冰箱中保存。

1.2.3 蜜蜂基因组 DNA 的提取:单只蜜蜂基因组 DNA 的提取是根据 Su 等的 Chelex-100 方法稍加修改的(Su *et al.*, 2007)。首先将保存在冰箱中的样品取出,在常温下解冻后用 Ringer buffer 清洗再浸泡 30 min;然后取其胸部放入 1.5 mL 的离心管中,加入 5% 的 Chelex-100 200 μL(注意在加 Chelex-100 时一定要迅速并搅拌,否则容易凝固堵塞 Tip 枪头);加入 10 mg/μL 的蛋白酶 K 10 μL 和 1 mol/L 的 DTT 7 μL;再加 10 mg/mL 无 DNA 酶的 RNA 酶 5 μL, 37℃ 水浴 2 h;震荡混匀 10 s, 95℃ 水浴 8 min;再震荡混匀 10 s,然后在 4℃ 低温下 12 000 r/min 离心 3 min;

取上清液保存。

1.2.4 PCR 扩增反应: PCR 扩增反应体系总体积为 20 μL , 其中包含 MgCl_2 (25 mmol/L) 2.4 μL ; $10\times$ Buffer (100 mmol/L KCl, 80 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mmol/L Tris-HCl, pH9.0, NP-40) 2.0 μL ; 上、下引物各 0.8 μL (序列见表 1); dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL ;

表 1 MRJPs VNTR 引物序列及 PCR 反应条件

Table 1 Sequences of primers and PCR conditions for MRJPs VNTR

引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primer	模板 DNA 体积 (μL) Volume of template DNA	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$) Annealing temperature	循环次数 (n) Number of cycles	目标片断 (bp) Size range
MRJP2	F: 5'-TTAATGAGAAATACTCATTCGCG-3' R: 5'-AAGCAGCAACTTGATTATCATTC-3'	2	58	40	160 - 270
MRJP3	F: 5'-CGAATTTTGGGTGCGAATG-3' R: 5'-ATGTGATTTTAAAGAATGATGAGCTTG-3'	2	60	37	550 - 750
MRJP5	F: 5'-AGACACTTCAAACGGTCGTTG-3' R: 5'-CTGTAATTTTCATACTTAAAGCCATC-3'	6	63	40	500 - 700

1.2.5 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳: 将 PCR 扩增产物 5 μL 和 1 μL 的 $6\times$ Loading Buffer 混匀上样于 2% 的 0.5 \times TBE 琼脂糖凝胶中, 以 100 V 电压、60 mA 电流电泳 1 ~ 2 h, 取出染色后在自动成像系统中成像, 观察扩增效果。

1.2.6 PCR 扩增产物片断分析和基因型判读: 将琼脂糖凝胶电泳图片用 BioImaging Systems of LabworksTM Image Acquisition and Analysis (Version 4.0) 软件 (Pharmacia Biotech 公司) 进行数据收集、泳道线校正、分子量内标校正和迁移片断大小测量, 并进行基因型判读。

1.2.7 蜂王基因型的推导和雄蜂母系来源的确定: 由于任何双倍体工蜂都至少有一条等位基因来自母系蜂王, 因此蜂王的两条等位基因总能在工蜂身上出现, 所以由每群工蜂的基因型可以顺利地推导出各自蜂王的基因型 (Palmer *et al.*, 2002)。将单倍体雄蜂的基因型和蜂王对照, 当雄蜂出现了蜂王基因型以外的等位基因时, 便可以断定它是由工蜂所产。然而, 当雄蜂遗传了工蜂母系等位基因时, 以及当工蜂父系和母系等位基因重合时, 我们不能直接将它划分为不是工蜂所产, 这种情况需要通过公式 1 来校正, 另外由于采样不完全导致的误差也须由公式 2 来校正 (Foster *et al.*, 2000)。

$$N_a = \sum_j^n \left(1 - \prod_i^{l_j} (1 - 0.5P_{ij})\right) N_j \quad (1)$$

$$N = (1 - x)^{N_a} \quad (2)$$

式中 l_j 为位点数, N_j 为 n 个蜂群中的第 j 群所分析的雄蜂数, P_{ij} 为 j 蜂群在 i 位点上母系蜂王与父系雄蜂所不同的等位基因基因频率, x 为工蜂所产的

Taq 酶 (5 U/ μL) 0.3 μL ; 模板 DNA (用量见表 1); 剩下的用 ddH₂O 补足。PCR 反应热循环为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 退火 60 s (温度见表 1), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 120 s, 循环 (次数见表 1); 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

雄蜂数。

1.3 数据统计与分析

基因型频率是指某一基因型在群体中出现的概率, 其计算公式为: 基因型频率 = (某基因型数目 / 测定的样本总数) $\times 100\%$ 。基因频率则是指一个群体中某一基因对其等位基因的相对比率, 其计算公式为: $P_i = [2(i_i) + (ij_1) + (ij_2) + \dots + (ij_n)] / 2N$, 其中, P_i 为第 i 个等位基因的频率; i 为纯合复等位基因; j_1, j_2, \dots, j_n 为与 i 共显的第 1 到 n 个等位基因。

2 结果

2.1 MRJPs VNTR PCR 扩增结果

图 1 是自然交尾蜂群的部分雄蜂样品 (12 只) 在 MRJP2 位点上的 VNTR PCR 扩增的产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离出来的条带, 目标片断区域 (见表 1) 被成功扩增。

2.2 蜂王交配次数的计算

根据各蜂群的工蜂基因型计算出基因型频率, 然后用 Relatedness4.2 (Godnight and Queller, 1994) 软件分别计算出基因频率 P , 个体间遗传相似系数 GS 以及与蜂王交配的雄蜂数量 n (表 2)。结果发现: 在蜂王人工授精群 A、B、C 和 D 中, 和蜂王授精的雄蜂数量分别是 1.09、1.21 和 1.95、2.21, 经四舍五入取整后分别为 1、1 和 2、2。理论推导结果与实际人工授精实验设计方案吻合, 这说明 MRJPs VNTR 分子标记能准确测定处女蜂王交配数量。在蜂王自然交尾蜂群 E 和 F 中, 跟蜂王交尾的雄蜂数量分别是 7.59

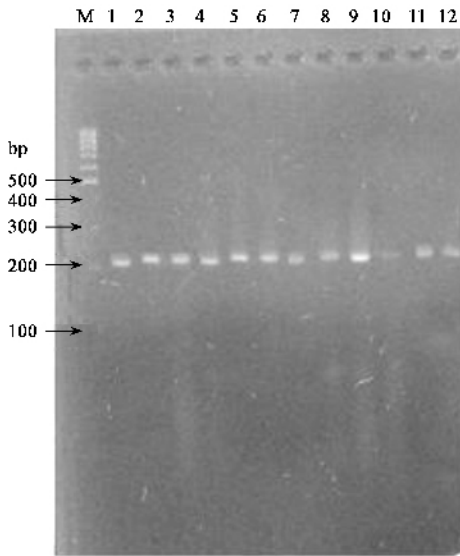


图 1 自然交尾群工蜂 MRJP2VNTR 引物扩增的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR results of workers from the colony whose queen was naturally mated at MRJP2 VNTR

和 5.33, 取整后分别为 8 和 5。

2.3 雄蜂母系来源的确定

蜂王的基因型由各蜂群工蜂的基因型推导而来

(表 3) 然后将各蜂群中的雄蜂和本群蜂王进行基因型对照, 看其是否带有蜂王基因型以外的等位基因, 从而判断它们是由工蜂还是蜂王所产。结果发现所有蜂群的雄蜂在 MRJR2, MRJP3 和 MRJP5 位点上都没有出现各自蜂王基因型以外的等位基因, 从而表明所有雄蜂都是由蜂王所产的未受精卵发育而来, 即都是蜂王之子。

2.4 结论

通过以上结果可知, 利用蜜蜂 MRJPs VNTR 分子标记是一种有效测定蜂群内蜂王的交配次数和雄蜂母系来源的方法。

3 讨论

蜂王可以随机利用储精囊中不同雄蜂的精液, 它的这种产卵特性必然使蜂群中存在许多同母异父的亚家系。而蜂群中工蜂与其它工蜂之子的亲缘关系可以用 $r = 0.125 + 0.25/n$ 来计算(其中 n 为蜂王交配的雄蜂数量)。当蜂王与 1 只雄蜂交配时, 工蜂与其外甥, 即其它工蜂之子的亲缘关系指数($r = 0.375$)要比工蜂与蜂王的儿子(工蜂的兄弟——雄

表 2 各蜂群蜂王交配的数量

Table 2 The mating number of the queen in each colony

蜂群 Colony	位点 Locus	蜂群中的等位基因 Alleles in colony	基因频率 P Allelic frequency	遗传相似系数 GS (mean \pm SD)	蜂王交配数量 Number of matings (n)
A	MRJP2	252 260 266	0.50 0.33 0.17	0.74 \pm 0.06	1.09
	MRJP3	612 661 741	0.19 0.50 0.31		
	MRJP5	586 629 641	0.21 0.50 0.29		
B	MRJP2	229 237 270	0.21 0.29 0.50	0.75 \pm 0.03	1.21
	MRJP3	632 700 750	0.23 0.50 0.27		
	MRJP5	586 629 641	0.27 0.23 0.50		
C	MRJP2	230 245 252	0.50 0.25 0.25	0.50 \pm 0.08	1.95
	MRJP3	627 661 674	0.25 0.25 0.50		
	MRJP5	606 612 641	0.50 0.25 0.25		
D	MRJP2	179 197 207 263	0.23 0.17 0.27 0.33	0.49 \pm 0.06	2.21
	MRJP3	671 683 697 732	0.26 0.27 0.23 0.24		
	MRJP5	563 567 593 652	0.27 0.26 0.23 0.24		
E	MRJP2	160 169 171 178 , 181 182 183 188	0.29 0.08 0.07 0.21 , 0.09 0.08 0.07 0.11 ,	0.37 \pm 0.03	7.59
	MRJP3	571 590 600 613 , 641 670 732	0.21 0.10 0.08 0.90 , 0.11 0.12 0.29 ,		
	MRJP5	588 592 614 617 621 , 628 650 692 712	0.10 0.06 0.04 0.08 0.08 0.29 0.08 0.21 0.06 ,		
F	MRJP2	160 167 171 181 , 182 188 195	0.08 0.09 0.29 0.09 , 0.21 0.08 0.07 0.09 ,	0.36 \pm 0.09	5.33
	MRJP3	571 627 655 685 , 700 716 748	0.10 0.21 0.08 0.90 , 0.29 0.11 0.12 ,		
	MRJP5	603 607 617 621 , 635 639 646 661	0.09 0.29 0.09 0.07 , 0.21 0.08 0.08 0.09 ,		

表 3 雄蜂母系来源的确定

Table 3 The determination of the maternity of drones

蜂群 Colony	位点 Locus	父系等位基因 Alleles of paternity	蜂王等位基因 Alleles of queen	雄蜂等位基因 Alleles of drone	含蜂王以外等位基因的雄蜂个数 Number of drones holding alleles other than queen
A	MRJP2	252	260/266	260 ,266	0
	MRJP3	661	612/741	612 ,741	0
	MRJP5	629	586/641	586 ,641	0
B	MRJP2	270	229/237	229 ,237	0
	MRJP3	700	632/750	632 ,750	0
	MRJP5	641	586/629	586 ,629	0
C	MRJP2	245 ,230/252	230/252	230 ,252	0
	MRJP3	674 ,627/661	627/661	627 ,661	0
	MRJP5	606 ,612/641	612/641	612 ,641	0
D	MRJP2	179 ,207	197/263	197 ,263	0
	MRJP3	671 ,697	683/697	683 ,697	0
	MRJP5	567 ,652	563/593	563 ,593	0
E	MRJP2	160 ,167 ,181 ,188 ,195	171/182	171 ,182	0
	MRJP3	571 ,655 ,685 ,716 ,748	627/700	627 ,700	0
	MRJP5	603 ,617 ,621 ,639 ,646 ,661	607/635	607 ,635	0
F	MRJP2	169 ,171 ,181 ,182 ,183 ,188	160/178	160 ,178	0
	MRJP3	590 ,600 ,613 ,641 ,670	571/732	571 ,732	0
	MRJP5	588 ,592 ,614 ,617 ,621 ,650 ,712	628/692	628 ,692	0

蜂)亲缘关系指数($r = 0.25$)更高;若蜂王是与2只雄蜂交配,工蜂与其外甥的亲缘关系指数($r = 0.25$)和工蜂与蜂王的儿子亲缘关系指数($r = 0.25$)相等;若蜂王是与3只以上雄蜂交配时,工蜂与其外甥要比工蜂与蜂王的儿子亲缘关系指数($r = 0.25$)更低(Hamilton, 1964)。因此根据理论推断,在蜂王单雄交配蜂群中,雄蜂应该都是由工蜂所产;在双雄交配蜂群中,雄蜂应该是蜂王产的和工蜂产的各占一半;在多雄交配蜂群中,雄蜂应该都是由蜂王所产。

在本实验的2个自然交尾蜂群E和F中,运用MRJP2, MRJP3和MRJP5 VNTR分子标记技术鉴定与蜂王交尾的雄蜂数量都分别为8只和5只,因此按照理论推断,蜂群中的雄蜂应该都是由蜂王所产,实验结果也正好符合以上理论依据;在蜂王双雄和单雄人工授精蜂群中,与蜂王交尾的雄蜂数量经过计算也正好分别是2只和1只,因此按照理论推断:蜂群中应该有来自工蜂所产的未受精卵发育而来的雄蜂,然而实验结果却表明这些蜂群中的雄蜂也全部是由蜂王所产,这说明在中蜂群内也存在与西方蜜蜂*Apis mellifera*、小蜜蜂*Apis florea*和黄蜂*Vespula vulgaris*蜂群中一样的工蜂监督行为(Ratnieks and Kvesscher, 1989; Halling *et al.*, 2001; Foster and Ratnieks, 2004; Christian *et al.*, 2004)。

本文首次利用VNTR分子标记技术鉴定中蜂蜂王交配次数和雄蜂母系来源,与以往的RAPD标记与微卫星DNA技术相比,蜜蜂MRJPs VNTR分子标

记能够产生在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳中识别的DNA片断,并且不需要荧光和同位素标记,在一般的实验室中便可完成,因此值得在蜜蜂研究工作中应用。

致谢 在蜂王的人工授精过程中,得到了吉林省养蜂科学研究所薛运波研究员的支持和帮助;另外浙江大学的钟伯雄老师对本实验的完成进行了耐心的指导,在此一并表示衷心感谢。

参考文献 (References)

- Adams J, Rothman ED, Kerr WE, 1977. Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics*, 86: 583–596.
- Pirk CWW, Neumann P, Hepburn R, Moritz RFA, Tautz J, 2004. Egg viability and worker policing in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23: 8 649–8 651.
- Fondrk MK, Page RE, 1993. Paternity analysis of worker honeybees using random amplified polymorphic DNA. *Naturwissenschaften*, 80: 226–231.
- Foster KR, Ratnieks FLW, Raybould AF, 2000. Do hornets have zombie workers? *Molecular Ecology*, 9: 735–742.
- Foster KR, Ratnieks FLW, Gyllenstrand N, Thoren PA, 2001. Colony kin structure and male production in *Dolichovespula* wasps. *Molecular Ecology*, 10: 1 003–1 010.
- Foster KR, Ratnieks FLW, 2004. Facultative worker policing in a wasp. *Nature*, 7: 692–693.
- Godnight KF, Queller DC, 1994. Relatedness 4.2. Goodnight Software.

- Houston, Texas.
- Halling LA, Oldroyd BP, Wattanachaiyingcharoen W, Barron AB, Nanork P, Wongsiri S, 2001. Worker policing in the bee *Apis florea*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49: 509 – 513.
- Hamilton WD, 1964. The genetical evolution of social behaviour I. *Theor. Biol.*, 7: 1 – 16.
- Huang ZY, 1992. The advancement of honeybee ecology. In: Liu JG ed. *The Conceptus of Modern Ecology*. Beijing: China Science and Technology Press. 198 – 205. [黄智勇, 1992. 蜜蜂生态学进展. 见: 刘建国, 主编. 当代生态学博论. 北京: 中国科学技术出版社. 198 – 205]
- Laidlaw HH, Page RE, 1984. Polyandry in honeybees (*Apis mellifera* L.): sperm utilization intracolony genetic relationships. *Genetics*, 108: 985 – 997.
- Moritz RFA, 1985. The effects of multiple mating on the worker-queen conflict in *Apis mellifera*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, (16): 375 – 377.
- Oldroyd BP, Ratnieks FLW, 2000. Anarchistic honey bee workers evade worker policing by laying eggs that have low removal rates. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 47: 268 – 273.
- Oldroyd BP, Halling LA, Good G, Andres WWB, Wongsiri PNS, Ratnieks FLW, 2001. Worker policing and worker reproduction in *Apis cerana*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 50: 371 – 377.
- Palmer KA, Oldroyd BP, Quezada-Euan JJG, Paxton RJ, May-Itaz WDEJ, 2002. Paternity frequency and maternity of males in some stingless bee species. *Molecular Ecology*, 11(10): 2107 – 2113.
- Page RE, Metcalf RA, 1982. Multiple mating sperm utilization and social evolution. *American Naturalist*, 119: 263 – 281.
- Pirk CWW, Neumann P, Ratnieks FLW, 2003. Cape honeybees, *Apis mellifera capensis*, police worker-laid eggs despite the absence of relatedness benefits. *Behav. Ecol.*, 14: 347 – 352.
- Ratnieks FLW, Kvesscher P, 1989. Worker policing in the honeybee. *Nature*, 342: 796 – 797.
- Sasaki K, Satoh T, Obara Y, 1995. Sperm utilization by honey bees queens: DNA fingerprinting analysis. *Appl. Entomol. Zool.*, (2): 335 – 341.
- Su SK, Chen SL, Zhong BX, Albert S, 2004. Cloning and sequence analysis of *mrjp1* cDNA from *Apis cerana cerana*. *Acta Genetica Sinica*, 31(11): 1248 – 1253. [苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, Albert S, 2004. 中华蜜蜂 *mrjp1* cDNA 的克隆及其序列分析. 遗传学报, 31(11): 1248 – 1253]
- Su SK, Chen SL, Albert S, Zhong BX, 2005a. Molecular cloning and analysis of four cDNAs from the heads of *Apis cerana cerana* nurse honeybees coding for major royal jelly proteins. *Apidologie*, 36(4): 389 – 401.
- Su SK, Zheng HQ, Chen SL, Zhong BX, Albert S, 2005b. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding *mrjp3* of *Apis cerana cerana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(3): 612 – 618.
- Su SK, Albert S, Zhang SW, Maier S, Chen SL, Du HH, Tautz J, 2007. Non-destructive genotyping and genetic variation of fanning in a honey bee colony. *Journal of Insect Physiology*, 53: 411 – 417.
- Taber S, 1955. Sperm distribution in the spermathecae of multiple-mated queen honeybees. *J. Ecom. Entomol.*, 48: 522 – 525.
- Zeng ZJ, 2003. Apiculture. Beijing: China Agriculture Press. 55 – 60. [曾志将, 2003. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社. 55 – 60]
- Zeng ZJ, Xie XB, Xue YB, Yan WY, Fan ZB, Xie GX, 2005. Effects of nutritional crossbreeding between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* on morphological characters of worker bees. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 27(3): 454 – 457. [曾志将, 谢宪兵, 薛运波, 颜伟玉, 樊兆斌, 谢国秀, 2005. 中蜂与意蜂营养杂交对工蜂形态指标的影响. 江西农业大学学报, 27(3): 454 – 457].

(责任编辑: 袁德成)