

中华蜜蜂二倍体雄蜂人工培育及形态测定

甘海燕, 李淑云, 曾志将, 颜伟玉

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 【目的】研究中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 二倍体雄蜂并进行人工培育, 测定其形态指标, 明确中华蜜蜂二倍体雄蜂的生物学特性。【方法】采用复式移虫方法培育中华蜜蜂蜂王, 待蜂王性成熟时进行 CO₂ 麻醉处理后放回原群, 用糖水进行奖励饲喂。蜂王产下大量未受精卵, 待雄蜂出房后采用颜料进行标记。雄蜂性成熟后, 利用蜂王人工授精技术使蜂王与本群子代雄蜂进行母子回交 (多雄交配)。控制蜂王产卵, 将工蜂巢房中刚孵化的幼虫移至恒温恒湿培养箱 (相对湿度: 95%; 温度: 35℃) 中进行人工培育。幼虫前 3 日龄食物配制为: 蜂王浆 90%, 无菌水 10%; 第 4—6 日龄食物成分比例为: 蜂王浆 50%, 葡萄糖 6%, 果糖 6%, 酵母抽出物 1%, 无菌水 37%; 从第 7 日龄起食物比例为: 蜂王浆 43%, 葡萄糖 9%, 果糖 9%, 酵母抽出物 1%, 无菌水 38%, 直到幼虫进入排便期为止。采用流式细胞仪对人工培育和蜂群工蜂巢房出房的雄蜂进行倍性鉴定, 并对蜂群工蜂巢房出房的单倍雄蜂和二倍体雄蜂进行形态指标测定比较。【结果】室内人工培育的中华蜜蜂总羽化率偏低, 平均为 36%, 其中 26.9% 为雄蜂; 通过流式细胞仪分析雄蜂倍性发现人工培育的雄蜂 92% 为二倍体, 蜂群工蜂巢房中出房的雄蜂 82% 为二倍体雄蜂; 形态指标测定显示, 二倍体雄蜂的初生重与生殖器官重分别为 99.78 和 6.05 mg, 均比单倍体雄蜂 (分别为 105.64 和 7.02 mg) 显著偏小, 而前翅长、前翅宽、翅钩数等指标差异不显著。【结论】中华蜜蜂近亲交配的蜂群会产生二倍体雄蜂, 部分二倍体雄蜂可在蜂群中发育至成蜂出房, 其形态指标与单倍体雄蜂存在一定差异。

关键词: 中华蜜蜂; 二倍体雄蜂; 人工培育; 形态测定

Artificial Rearing and Morphological Determination of the Diploid Honey Bee in *Apis cerana cerana*

GAN Hai-yan, LI Shu-yun, ZENG Zhi-jiang, YAN Wei-yu

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract: 【Objective】The objective of this experiment is to study artificial rearing and determination of morphological index of diploid drones, and to reveal the biological characters of *Apis cerana cerana*. 【Method】Queens were firstly reared by the method of larvae double-transferring, and then anaesthetized with CO₂. The colony were fed with sucrose for stimulative feeding. Unfertilized eggs were laid by queen, and they were marked by painting after emergence. Haploid drones of sexual maturity were caught for insemination with their mother queen. The queen was then controlled to lay eggs on an empty frame. Larvae developed from the eggs were transferred to incubator (RH: 95%; T: 35℃) for artificial rearing. Larvae in first 3 days were fed with diet containing 90% royal jelly and 10% ddH₂O. During 4-6 days old, the larvae food was changed to 50% royal jelly, 6% fructose, 6% glucose, 1% yeast extract and 37% ddH₂O. From 7 days old to defecating period the diet is constituted of 43% royal jelly, 9% fructose, 9% glucose, 1% yeast extract and 38% ddH₂O. The cell ploidy of cultivated drones was determined using flow cytometry instrument and morphological index of haploid and diploid drones in colony were measured. 【Result】The total emerged rate in

收稿日期: 2014-05-19; 接受日期: 2014-07-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31160486)、江西省青年科学家 (井冈之星) 培养对象项目 (20133BCB23012)

联系方式: 甘海燕, E-mail: 616339366@qq.com. 李淑云, E-mail: 844643996@qq.com. 甘海燕和李淑云为同等贡献作者。通信作者颜伟玉, E-mail: ywygood-0216@163.com

honeybee of artificial feeding was low (36% in average), in which 26.9% were drones. There were 92% of emerged drones reared *in vitro* and 82% developed in natural colony drones were diploid examined by the cell ploidy. According to the morphological index investigation, the birth weight and reproductive organs of diploid drones (99.78 and 6.05 mg, respectively) were significantly smaller than that of haploid drones (105.64 and 7.02 mg, respectively), and in other indexes (the fore wing length, the fore wing width, the number of the hooks on the wing, etc) the difference was not significant. 【Conclusion】 After inbreeding, the queens (*A. cerana cerana*) can produce the diploid drones, and some larvae can reach adult stage. And some morphological differences exist between them and haploid drones.

Key words: *Apis cerana cerana*; diploid drones; artificial rearing; morphological determination

0 引言

【研究意义】一个正常蜂群通常由一只蜂王，成千上万的工蜂和随季节出现变动的成百上千的雄蜂组成，故蜂王、工蜂和雄蜂统称三型蜂^[1]。蜂王与工蜂均为二倍体的雌性蜂，而雄蜂一般为单倍体的雄性蜂。蜂王和工蜂由受精卵发育而成，雄蜂一般由未受精卵发育而来，但高度近亲交配的蜂王产下的受精卵，在人工培育下也能发育成雄蜂（即二倍体雄蜂）^[2]。二倍体雄蜂的研究对进一步了解蜜蜂的生物学特性具有重要意义。【前人研究进展】二倍体雄蜂产生的理论依据为单双倍体性别决定机制（雄性是单倍体、雌性是二倍体），该机制在膜翅目昆虫普遍存在，具有非常重要的作用。这种机制认为个体的性别由单一性位点“性等位基因”决定，在性位点（X）上存在复等位基因（X_a、X_b、X_c……）。当X位点上的基因纯合时就发育成雄性，当这一位点上的基因杂合时则发育成雌性。而未受精卵是单倍体，在X位点上就相当于纯合的，所以发育成雄性。当高度近亲交配情况下，受精卵的性等位基因常因近交纯合而出现二倍体雄性^[3]。蜜蜂的性别决定基因（*csd*）已经被成功分离，这为单双倍体性别决定机制提供了有力的分子生物学证据。*csd*由1453个碱基组成，含有9个外显子，现已发现19个复等位基因（*csd1*，*csd2*，…，*csd19*）^[4]。关于西方蜜蜂（*Apis mellifera*）二倍体雄蜂，Woyke进行了系统的研究，发现性等位基因纯合产生二倍体雄蜂，这种卵并非“致死性的”，而是在小幼虫阶段被工蜂吞食^[5-7]。Woyke尝试人工培育二倍体雄蜂，其成活率与单倍体雄蜂相近，但在孵化后期两者死亡率都高^[8-10]。而将工蜂巢房的幼虫移至雄蜂巢房同样不能避免被工蜂吞食^[11]，并采用染色体计数的方法证实了被吞食的雄蜂为二倍体^[12]。近亲交配的蜂王产的二倍体后代约50%是雄蜂，但是卵在孵化后数小时即被工蜂清理，因此在蜂群中并不存在二倍体雄蜂。为了更好研究二倍体雄蜂，Woyke建立了夏季二倍体雄蜂

的人工培育方法^[13]，将卵脾提至孵化箱中孵化，再将幼虫移至有相似日龄幼虫的王台中哺育，2—3日龄后再移至有相似日龄幼虫的雄蜂房中，最后羽化出房。1979年，Woyke发现兄妹交尾的印度蜜蜂（*A. cerana indica*）同样产生二倍体雄蜂，但封盖子比西方蜜蜂的更为分散^[14]；印度蜜蜂的二倍体雄蜂大部分在幼虫孵化第2天被工蜂吃掉，在有利条件下有一部分可以在蜂群发育出房^[15]。1981年，Hoshiba等发现日本蜜蜂（*A. cerana japonica*）也产生二倍体雄蜂，有32条染色体^[16]。2000年，Polaczek等在秋季末期采用小核心群成功培育了西方蜜蜂的二倍体雄蜂^[17]，避免了人工移虫的繁琐。【本研究切入点】作为中国宝贵的蜂种资源——中华蜜蜂（*A. cerana cerana*），关于二倍体雄蜂的研究相对较少。仅有李位三等观察研究了自然蜂群中的二倍体雄蜂的产生及其一些生物学特性^[18-19]，而人工培育中华蜜蜂二倍体雄蜂在国内尚无相关报道。【拟解决的关键问题】室内人工培育中华蜜蜂二倍体雄蜂，应用流式细胞术对培育的二倍体雄蜂进行倍性鉴定，同时对蜂群中产生的雄蜂进行倍性鉴定和形态测定比较，分析二倍体雄蜂的生物学特性。

1 材料与amp;方法

试验于2012—2013年在江西农业大学蜜蜂研究所完成。

1.1 试验材料

试验蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂健康强群10群。

蜂王人工授精仪、恒温恒湿培养箱（广东广智）、电子分析天平（岛津）、超净工作台（苏净集团）、生物实体显微镜、摄影体式显微镜（江南光电）、Cytomics FC500MCL(BECKMAN COULTER)、解剖镜、离心机、冰箱等。

生理盐水、75%的酒精、青霉素、新鲜蜂王浆、酵母抽提物(OXOID)、果糖（分析纯）、葡萄糖（分析纯）、凡士林、胰蛋白酶（购自北京索莱宝科技有

限公司)；磷酸缓冲液(PBS)、碘化丙啶(PI)、Triton X-100、EDTA、RNaseA(购自北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 蜂王的培育 采用复式移虫方法培育蜂王。取10只性成熟的处女王进行CO₂麻醉处理,5 min后放回原群,加强奖励饲喂,待蜂王产大量未受精卵,对刚出房的蜂王产的雄蜂后代进行标记。

1.2.2 蜂王人工授精 在试验蜂群巢门口加脱粉片,限制雄蜂出入。在晴朗的午后定期在蜂箱上加继箱,蜂箱盖打开(纱盖盖严,防止蜜蜂飞出蜂箱)以便光线透入诱导雄蜂排便飞行。待雄蜂性成熟,将本群雄蜂与产卵蜂王进行人工授精(母子回交)。将受精成功的蜂王介绍到原蜂群中,同时将蜂群中的单倍体雄蜂全部清除。整个试验过程,均在试验蜂群巢门口装了脱粉片,防止其他蜂群的雄蜂进入试验群。

1.2.3 幼虫食物配制 前3日龄食物配制为:蜂王浆90%,无菌水10%。第4—6日龄食物成分比例如下:蜂王浆50%,葡萄糖6%,果糖6%,酵母抽提物1%,无菌水37%。从第7日龄起食物比例为:蜂王浆43%,葡萄糖9%,果糖9%,酵母抽出物1%,无菌水38%,直到幼虫进入排便期为止^[20]。

1.2.4 幼虫饲养 将受精成功的蜂王控制在一个空巢脾上产卵,产卵12 h后,将蜂王隔离在其他巢脾上。3 d后从蜂箱中取出该巢脾,用于移虫。移虫前,先在24孔幼虫培养板中每孔加入100 μL自己配制的食物,并放入培养箱预热30 min。再将已取出的巢脾工蜂巢房中的1日龄内小幼虫轻轻的转移到培养板上,每孔内饲养2—4只幼虫。移虫完成后,将培养板放入恒温恒湿(RH:95%;T:35℃)培养箱中,避光培养。每12 h更换一次食物,即将幼虫转移到放有新鲜食物的已消毒的幼虫培养板上。第2天以后,将幼虫的饲养密度降低至1只幼虫/孔。1—3日龄幼虫每天每孔所加的食物量为100 μL,4日龄至排便期幼虫每天每孔所加的食物量为200 μL。当大幼虫开始排便,说明幼虫即将化蛹。幼虫排便过程中,能在培养板的孔底部看到尿素晶体和纤维状物质。此时,将大幼虫转移至化蛹培养板上,调整恒温恒湿培养箱的湿度(RH:75%),避光培养,直至蜜蜂羽化。每天统计幼虫与蛹期的死亡数量,最后记录雄蜂与雌性蜂的羽化数量。

1.2.5 雄蜂形态指标测定 单倍体雄蜂的采集:上述经CO₂麻醉处理的处女王,在工蜂巢房产下大量未受精卵,待其发育为成年雄蜂,即可采样。样品从3个

试验群中采集,随机取50只。

二倍体雄蜂的采集:蜂王人工授精成功后,会在工蜂巢房产成片的受精卵,但到大幼虫期,会出现很多的空巢房,呈“插花子脾”现象,在工蜂封盖子中间发现少量工蜂巢房改造的雄蜂封盖子,待这些改造的雄蜂封盖子羽化为成年雄蜂(此时蜂群如果有雄蜂巢房的封盖子,将其除去),即可采样。样品采集蜂群与单倍体雄蜂采集的蜂群相同,采集数量50只。经倍性鉴定确认为二倍体的再将其形态指标与单倍体进行比较。

形态指标测定:将快出房的具有雄蜂封盖子的巢脾放入蜂王产卵控制器中,将其放在恒温恒湿培养箱中,定时查看是否有雄蜂出房。将刚出房雄蜂装入EP管,并逐一编号,然后将其插在冰中,待雄蜂冻晕,进行初生重、翅长、翅宽、翅钩数及生殖器官进行测定。

初生重测定:将冻晕的雄蜂逐一称重,记录数据。**翅长和翅宽测定:**先在载玻片上涂一层凡士林(便于翅膀黏连),再将已冻晕的雄蜂用镊子夹住其右前翅,从翅褶基部摘下右前翅,将其整齐排列在载玻片上,在摄影体式显微镜下进行测量,记录数据。**翅钩数:**翅钩在后翅,将后翅摘下,排列在另一载玻片上,同样在摄影体式显微镜下,找到翅钩所在位置,调整放大倍数,数翅钩数。**生殖器官重:**将冻晕的雄蜂固定在蜡盘上,在解剖镜下逐一进行解剖,取生殖器官,即刻称量,并记录数据。

1.2.6 流式细胞仪鉴定雄蜂倍性 取上述人工培育的刚出房雄蜂和蜂群中从工蜂巢房自然出房的雄蜂胸部,剪至匀浆状,加入1 mL胰蛋白酶消化液放入37℃水浴锅中消化60 min,消化完毕后,将细胞悬液通过300目孔径不锈钢网滤过,以除掉未充分消化的组织。已过滤的细胞悬液经1 500 r/min离心3 min后,弃上清液,加入PBS清洗1次,弃上清液再加入200 μL PBS制备单细胞悬液,最后加入200 μL PI染料,室温避光染色30 min,即可上机检测。

工蜂和单倍体雄蜂作为对照样,样品处理与二倍体雄蜂处理步骤相同。上机检测时,先测定工蜂样品,并用其调整FCM的放大倍数,使对照的DNA峰值处在200线附近;再测定单倍体雄蜂样品,观察峰值是否在100线附近;而被测样品峰值在100线位置的认为是单倍体,在200线位置的即为二倍体^[21]。

1.3 数据统计与分析

对测定的单倍体与二倍体雄蜂的各项形态指标参

数进行比较, 采用 StatView 软件“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA or ANCOVA”对数据进行统计分析, 倍性测定的数据从随机软件 CellQuest 获取, 通过 ModFit 软件进行 DNA 含量分析。

2 结果

2.1 人工培育蜜蜂

饲养蜜蜂幼虫的各发育阶段如图 1。整个饲养过程各个阶段均有蜜蜂死亡, 而羽化的蜜蜂除了雄蜂和工蜂, 还出现了中间型和蜂王。从表 1 可以看出, 蛹期死亡率比幼虫期高, 且蛹期死亡数量接近总幼虫数量的 50%, 而 3 个群的总羽化率平均为 36%, 其中雄

蜂平均羽化率为 26.9%。

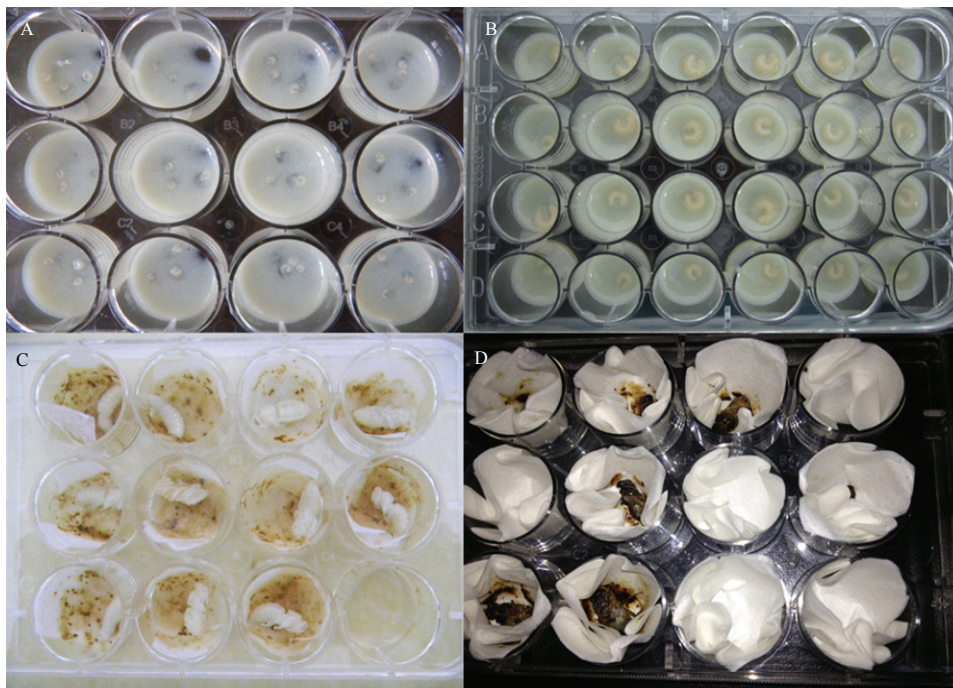
2.2 细胞倍性分析

流式细胞仪的检测结果以 DNA 相对含量的直方图形式表示, 图中 x 轴表示 DNA 相对含量值, y 轴表示细胞相对数量, 计算 G_0/G_1 变异系数 ($CV(\%) = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100$)。根据未知样本和标准样本直方图中峰值的相对位置, 确定未知样本的染色体倍性。一般 CV 值小于 3 表示结果准确, CV 值小于 5 基本正确^[22]。如图 2 所示, 无论单倍体还是二倍体检测到的细胞量都足够, 并形成了明显的峰值, 工蜂标准样峰值在 200 位置, 单倍体雄蜂标准样峰值处在 100 位置。雄蜂倍性检测根据峰值位置即可判断。

表 1 人工培育蜜蜂

Table 1 Artificial rearing honeybee

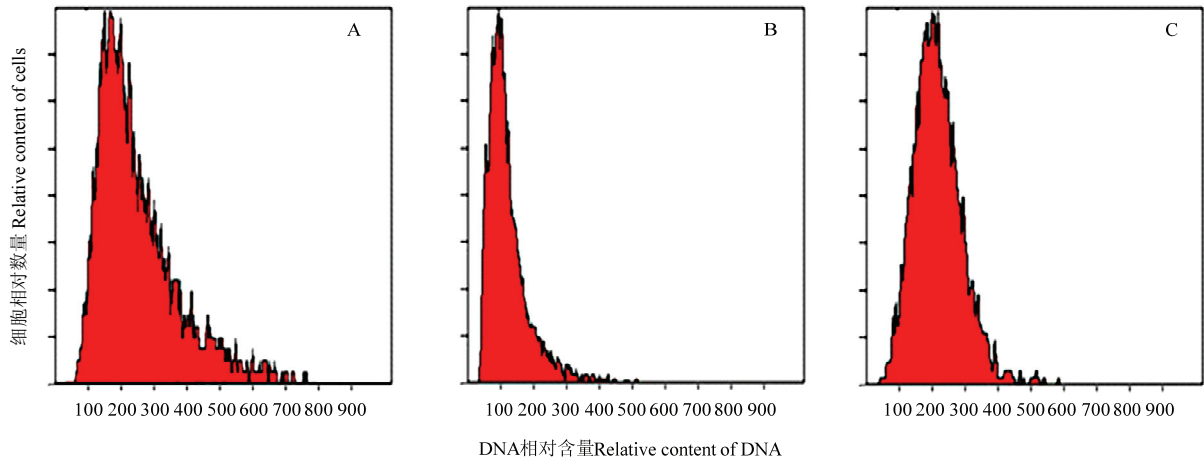
蜂群号 Number of colony	1 日龄幼虫数 Number of 1 day-old larvae	幼虫期死亡数 Number of dead larvae	蛹期死亡数 Number of dead pupae	雌性蜂羽化数 Number of emerged female	雄蜂羽化数 Number of emerged drones	总羽化率 Total emerged rate (%)	雄蜂羽化率 Percentage of drones (%)
2	100	18	42	29	11	40.0	27.5
5	100	22	44	26	8	34.0	23.5
14	100	19	47	24	10	34.0	29.4



A: 小幼虫; B: 大幼虫; C: 蛹; D: 出房蜂 A: Young larvae; B: Old larvae; C: Pupae; D: Adult

图 1 人工培育蜜蜂的各发育阶段

Fig. 1 Different development stages of artificial rearing honeybee



A: 工蜂标样; B: 单倍体雄蜂; C: 二倍体雄蜂 A: Standard sample of worker; B: Haploid drone; C: Diploid drone

图 2 FCM 检测

Fig. 2 FCM test

本试验测定人工培育的雄蜂和蜂群自然羽化雄蜂各 50 只, 发现人工培育的雄蜂中, 有 46 只为二倍体雄蜂, 占总数量的 92%; 而自然羽化的雄蜂也有 41 只为二倍体, 占总测定数的 82% (表 2)。

2.3 雄蜂形态指标

所有样品的各项指标测定后, 采用 StatView 软件分析, 发现蜂群间的单倍体雄蜂之间不存在差异,

同时蜂群间的二倍体雄蜂也不存在差异, 但二倍体雄蜂与单倍体雄蜂的形态指标存在差异。由表 3 可知, 二倍体雄蜂的初生重、前翅长、前翅宽、翅钩数、生殖器官等各项指标值均比蜂王产在工蜂巢房的未受精卵发育成的单倍体雄蜂小; 经分析发现单倍体雄蜂与二倍体雄蜂初生重与生殖器官重存在差异显著。

表 2 雄蜂鉴定结果

Table 2 Number of drones under identification

雄蜂来源 Source of drones	测定数量 Number of test	二倍体数量 Number of diploid	二倍体雄蜂比例 Percentage of drones (%)
人工培育雄蜂 Drones from artificial rearing	50	46	92
自然羽化雄蜂 Drones from natural colony	50	41	82

表 3 单倍体雄蜂与二倍体雄蜂形态指标比较

Table 3 Morphological indexes comparison between haploid and diploid drones

雄蜂类型 Drones type	初生重 Birth weight (mg)	翅长 Length of the wings (mm)	翅宽 Width of the wings (mm)	翅钩数 (个) Number of hooks on the wing	生殖器官重 Weight of reproductive organs (mg)
单倍体 Haploid (n)	105.64±7.23	9.01±0.56	3.28±0.15	16.84±1.28	7.02±0.04
二倍体 Diploid (2n)	99.78±5.07*	8.55±0.548	3.18±0.12	16.67±1.44	6.05±0.02*

*表示差异显著 ($P<0.05$) * indicated significantly different ($P<0.05$)

3 讨论

关于室内人工培育蜜蜂幼虫研究较多, 在食物配

制与温湿度控制方面技术也较为成熟^[20,23-27]。本研究将室内人工培育蜜蜂技术用于中华蜜蜂二倍体雄蜂的培育, 可以简化二倍体雄蜂培育的步骤和避免季节因

素的限制。但试验幼虫平均羽化率仅为 36.0%，与王倩等^[26]的研究最高可达 72.9% 比较显著偏低。幼虫饲养过程中，蛹期出现大量死亡，且大部分为雄蜂蛹，导致雄蜂的羽化率很低，平均 26.9%。目前对于中华蜜蜂的室内人工培育研究主要集中在工蜂幼虫方面，而雄蜂幼虫的营养和环境需求可能与工蜂存在一定差异，将来需在该方面进一步探索和完善，以满足雄蜂生长发育的需要。

目前，昆虫的倍性鉴定方法主要有染色体计数方法、间接鉴定法和流式细胞测定法。采用流式细胞测定法进行倍性鉴定具有制样简单，灵敏度、分辨率及准确性较高等特点。Cournault 等应用流式细胞仪检测了蚁王受精囊中精子的倍性^[28]，分析比较了蚂蚁 (*Tapinoma erraticum*) 的三倍体雌性、二倍体雄性和二倍体精子^[3]。本研究采用流式细胞测定，发现人工室内培育的雄蜂 92% 为二倍体。在蜂群工蜂巢房自然羽化的雄蜂 82% 为二倍体，这与印度蜜蜂的研究相一致^[15]，在近亲交配的蜂群中条件适宜的情况下，部分二倍体雄蜂可发育至成蜂出房。但西方蜜蜂的二倍体雄蜂在卵孵化后几小时后即被工蜂吞食。由于通常认为二倍体雄蜂不具备繁殖能力，西方蜜蜂的这种行为可以减少蜂群因哺育而产生的损耗。东方蜜蜂与西方蜜蜂的这种特性差异，暗示着西方蜜蜂的进化程度相对更高。

Woyke 的研究表明，西方蜜蜂二倍体雄蜂腹部第 4 腹节显著偏大，后翅的翅钩数显著偏少，初生重明显偏大^[29]。造成这种“超级雄蜂”的出现，可能与人工培育过程中雄蜂幼虫所处的环境有关。Herrmann 等研究显示，西方蜜蜂二倍体雄蜂和单倍体雄蜂比较，初生重差异不显著，但翅钩数偏少，生殖器官偏小^[30]。本研究发现室内人工饲养的雄蜂与蜂群中自然发育的雄蜂比较，初生重明显偏大，可能是受人工培育营养和环境的影响。因此，为了更好比较二倍体雄蜂和单倍体雄蜂的形态差异，都选取自然蜂群中蜂王产在工蜂巢房中的雄蜂，待出房后测定其形态指标。研究结果发现中蜂二倍体雄蜂在初生重和生殖器官重方面都比单倍体雄蜂显著偏小，但前翅长、前翅宽、翅钩数等方面差异不显著，与余林生等研究结果基本一致^[19]。中华蜜蜂二倍体雄蜂的精子活力、倍性及精子能否与卵子结合产生三倍体蜜蜂等还有待于进一步研究。

4 结 论

采用常规的室内人工培育蜜蜂方法成功地培育了

中华蜜蜂二倍体雄蜂。此外，研究比较了自然蜂群出房的二倍体雄蜂与单倍体雄蜂的形态指标，发现二倍体雄蜂的初生重和生殖器官重比单倍体的小，但前翅长、前翅宽、翅钩数等方面无显著差异。

References

- [1] 曾志将. 养蜂学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
Zeng Z J. *Apiculture*. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009. (in Chinese)
- [2] 颜伟玉, 吴晓波, 王子龙, 曾志将. 蜂群中的二倍体雄蜂. 蜜蜂杂志, 2010(12): 10-12.
Yan W Y, Wu X B, Wang Z L, Zeng Z J. The diploid drones in colony. *Journal of Bee*, 2010(12): 10-12. (in Chinese)
- [3] Cournault L, Aron S. Diploid males, diploid sperm production, and triploid females in the ant *Tapinoma erraticum*. *Naturwissenschaften*, 2009, 96: 1393-1400.
- [4] Beye M, Hasselmann M, Fondrk M K, Page 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(4): 419-429.
- [5] Woyke J. The hatchability of 'lethal' eggs in a two sex-allele fraternity of honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 1962, 1: 6-13.
- [6] Woyke J. Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 1963, 2(1): 19-24.
- [7] Woyke J. What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research*, 1963, 2(2): 73-75.
- [8] Woyke J. Rearing and viability of diploid drone larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1963, 2(2): 77-84.
- [9] Woyke J. Study on the comparative viability of diploid and haploid larval drone honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 1965, 4(1): 12-16.
- [10] Woyke J. Rearing diploid drone larvae in queen cells in a colony. *Journal of Apicultural Research*, 1965, 4(3): 143-148.
- [11] Woyke J. Do honeybees eat diploid drone larvae because they are in worker cells? *Journal of Apicultural Research*, 1965, 4(2): 65-70.
- [12] Woyke J, Knytel A. The chromosome number as proof that drones can arise from fertilized eggs of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 1966, 5(3): 149-154.
- [13] Woyke J. A method of rearing diploid drones in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research*, 1969, 8(2): 65-74.
- [14] Woyke J. Sex determination in *Apis cerana indica*. *Journal of Apicultural Research*, 1979, 18(2): 122-127.
- [15] Woyke J. Evidence and action of cannibalism substance in *Apis cerana indica*. *Journal of Apicultural Research*, 1980, 19(1): 6-16.

- [16] Hoshiba H, Okada I, Kusanagi A. The diploid drone of *Apis cerana japonica* and its chromosomes. *Journal of Apicultural Research*, 1981, 20(3): 143-147.
- [17] Polaczek B, Neumann P, Schrick B, Moritz R F A. A new, simple method of rearing diploid drones in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 2000, 31: 525-530.
- [18] 李位三, 余林生. 中华蜜蜂二倍体雄蜂的产生及生物学特性. 蜜蜂杂志, 1990(12): 3-6.
- Li W S, Yu L S. The generation and biological characteristics of the *Apis cerana cerana* diploid drones. *Journal of Bee*, 1990(12): 3-6. (in Chinese)
- [19] 余林生, 孟祥金, 陈宏权. 中华蜜蜂产生二倍体雄蜂的生物学研究. 中国养蜂, 2004, 55(6): 7-9.
- Yu L S, Meng X J, Chen H Q. Biological research on diploid drones produced by *Apis cerana cerana*. *Apiculture of China*, 2004, 55(6): 7-9. (in Chinese)
- [20] 江敬皓. 室内人工饲养蜜蜂幼虫之研究[D]. 台北: 国立台湾大学, 1999.
- Jiang J H. Study on indoor artificial feeding of honeybee larvae[D]. Taipei: National Taiwan University, 1999. (in Chinese)
- [21] 耿小丽, 魏臻武, 姚喜红, 赵艳. 苜蓿花药培养再生植株染色体倍性检测研究. 草地学报, 2010, 18(5): 714-718.
- Geng X L, Wei Z W, Yao X H, Zhao Y. Anther culture of *Medicago sativa* L. and ploidy detection. *Acta Agrestia Sinica*, 2010, 18(5): 714-718. (in Chinese)
- [22] Dolezel J, Binarova P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 1989, 31(2): 113-120.
- [23] Vandenberg J D, Shimanuki H. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. *Journal of Apicultural Research*, 1987, 26(2): 90-97.
- [24] Peng C Y S, Mussen E. Effects of chlortetracycline of honeybee worker larvae reared in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, 60: 127-133.
- [25] 刘光楠, 张飞, 颜伟玉, 吴小波, 曾志将. 蜂王幼虫与工蜂幼虫发育期食物消耗量的研究. 应用昆虫学报, 2011, 48(1): 113-115.
- Liu G N, Zhang F, Yan W Y, Wu X B, Zeng Z J. Study on the quantity consuming of food in larvae stage of queen and worker. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48(1): 113-115. (in Chinese)
- [26] 王倩, 孙亮先, 肖培新, 刘锋, 康明江, 胥保华. 室内人工培育中华蜜蜂幼虫技术研究. 山东农业科学, 2009(11): 113-116.
- Wang Q, Sun L X, Xiao P X, Liu F, Kang M J, Xu B H. Study on technology for indoor artificial feeding of *Apis cerana cerana* larvae. *Shandong Agricultural Sciences*, 2009(11): 113-116. (in Chinese)
- [27] 颜伟玉, 潘珂, 李琳, 曾志将. 培育雄蜂和工蜂所需能量值的研究. 经济动物学报, 2004, 8(3): 146-147.
- Yan W Y, Pan K, Li L, Zeng Z J. Studies on the general energy needed for rearing a drone and a worker. *Journal of Economic Animal*, 2004, 8(3): 146-147. (in Chinese)
- [28] Cournault L, Aron S. Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insectes Sociaux*, 2008, 55: 283-287.
- [29] Woyke J. Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee III. The abdomen, and weight. *Journal of Apicultural Research*, 1978, 17(4): 206-217.
- [30] Herrmann M, Trenzcek T, Fahrenhorst H, Engels W. Characters that differ between diploid and haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Genetics and Molecular Research*, 2005, 4(4): 624-641.

(责任编辑 岳梅)