

应用微卫星 DNA 技术研究中华蜜蜂群内工蜂监督效果

谢宪兵^{1,2}, 苏松坤³, 郑云林¹, 吴小波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:【目的】研究不同中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 群内的工蜂繁殖现象, 探讨蜂群的工蜂监督效果。【方法】以中华蜜蜂为试验材料, 对处女蜂王分别进行单雄和双雄人工授精, 并以蜂王自然交尾的蜂群作为对照。蜂王成功繁殖后 7 周, 利用蜜蜂微卫星 DNA 技术检测蜂群内的雄蜂是由蜂王产的未受精卵发育而成, 还是由工蜂产的未受精卵发育而成。【结果】所有蜂群中的雄蜂都是由蜂王产的未受精卵发育而成。【结论】在人工授精和自然交尾蜂群中都明显存在工蜂监督行为。

关键词: 中华蜜蜂; 工蜂繁殖; 工蜂监督; 微卫星 DNA; 人工授精

Study on the Worker Policing in *Apis Cerana Cerana* Based on Microsatellite DNA

XIE Xian-bing^{1,2}, SU Song-kun³, ZHENG Yun-lin¹, WU Xiao-bo¹, ZENG Zhi-jiang¹

(¹Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045; ²College of Quanzhou Normal, Quanzhou 362000, Fujian; ³College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: 【Objective】For exploring the effect of worker policing in *Apis cerana cerana*, the worker reproduction was studied in different colonies. 【Method】Biology of the *Apis cerana cerana* was the studied subject in this paper. Virgin queens were instrumentally inseminated with 1 or 2 males, and the controlled ones were naturally mated. Seven weeks later, the queens reproduced successfully, drones were detected whether developed from the unfertilized eggs laid by queen or by workers, which based on the technology of honeybee microsatellite DNA that sampled the pupae of worker and drone in each colony. 【Result】The drones were developed from the unfertilized eggs laid by queen in all of the colonies. 【Conclusion】The activities of worker policing are taking place universally in colonies that the queens are instrumentally inseminated and naturally mated.

Key words: *Apis cerana cerana*; Worker reproduction; Worker policing; Microsatellite DNA; Artificial inseminated

0 引言

【研究意义】中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 是中国的一种特色经济昆虫, 是中国宝贵的蜂种资源, 也是相对西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 之外的 1 个独立蜂种, 相对于西方蜜蜂, 中蜂具有抗螨强、嗅觉灵敏和善于采集零散蜜源等特性^[1]。近几十年来, 中国有不少学者对中蜂生物学行为进行了卓有成效的研究^[2-4]。【前人研究进展】近 20 年来, 蜂群中工蜂监督一直是蜜蜂社会行为特性研究的热门课题之一。工蜂监督是指工蜂通过某种行为或机制来限制其

它工蜂产卵^[5]。从理论上讲, 蜂群中存在工蜂监督, 可能是由于工蜂与自己儿子 (雄蜂) 的亲缘关系指数 ($r=0.5$) 比工蜂与蜂王的儿子 (工蜂的兄弟——雄蜂) 亲缘关系指数 ($r=0.25$) 要大。显然就单个工蜂来说, 在蜂群培育雄蜂时, 工蜂更愿意自己产卵来培育雄蜂^[6]。从养蜂实践上来看, 在有蜂王的西方蜜蜂蜂群中, 巢脾中约有 7% 雄蜂子脾是由工蜂产的未受精卵发育而成, 然而只有不到 0.1% 成年雄蜂是工蜂的后代, 工蜂产的卵之所以如此低存活率是由工蜂产卵相互监督所致^[7]。对西方蜜蜂 (*Apis mellifera*)、小蜜蜂 (*Apis florea*) 和黄蜂 (*Vespula vulgaris*) 的大量

收稿日期: 2007-05-11; 接受日期: 2007-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560114), 泉州师范学院校自选项目 (2007KJ004)

作者简介: 谢宪兵 (1980-), 男, 江西吉安人, 博士研究生, 研究方向为蜜蜂研究工作。E-mail: xbxbees@163.com。通讯作者曾志将 (1965-), E-mail: bees1965@sina.com

研究都表明蜂群中存在工蜂监督现象^[8-11]。工蜂产卵相互监督也是蜂群克服个体自私主义的最好例子^[12]。

【本研究切入点】开展中蜂蜂群中工蜂监督研究, 不仅能填补国内外有关该方面的空白, 而且为保护、开发和利用中国中蜂这一宝贵资源具有重要意义, 更为重要的是本研究成果将为人们研究动物社会行为学和人类社会行为学提供许多可资借鉴的基础材料, 其具有很高的学术价值、社会意义和理论意义。至今还未见中蜂群中工蜂监督的研究报道。【拟解决的关键问题】笔者结合蜜蜂亲缘关系指数, 运用蜂王人工授精和蜜蜂微卫星 DNA 技术研究中蜂群内工蜂繁殖情况, 以期验证在中蜂群内是否存在工蜂监督现象。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 蜂群来源 试验蜂群是由江西农业大学蜜蜂研究所购自 3 个相隔较远的山区蜂场(即靖安、上饶和遂川)的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂: Chelex-100 (5%); Ringer buffer (130 mmol·L⁻¹ NaCl, 1.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 5 mmol·L⁻¹ KCl, pH 7.4); DTT (1 mol·L⁻¹); Proteinase K (10 mg·μl⁻¹); Rnase (10 mg·ml⁻¹); Taq DNA Polymerase (5 U·μl⁻¹); Mgcl₂ (25 mmol·L⁻¹); 10×Buffer (100 mmol·L⁻¹ KCl, 80 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.0, NP-40); dNTP (10 mmol·L⁻¹); Primer; Mark (100 bp)。

主要仪器: MegaBACE1000 测序仪(Amersham)、高速冷冻离心机(Eppendorf 5415R)、96 孔 PCR 仪(Eppendorf)、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 试验方法

1.2.1 蜂王的人工授精 考虑到亲缘关系在试验中

的影响, 方案采用来自靖安的中蜂作为母本培育处女蜂王, 以上饶雄蜂精液作为父本进行单雄人工授精, 以上饶和遂川的雄蜂精液混合进行双雄人工授精。

由于自然交尾蜂王一般与 7~17 只雄蜂交尾^[13], 所以多雄交配的蜂王采用自然交尾。处女蜂王的培育和蜂王的人工授精方法以及蜂群的管理参照文献^[14]。

1.2.2 样品的采集 授精成功的处女王产卵后 7 周, 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。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 单个蜜蜂蛹基因组 DNA 的提取方法是根据 Walsh 等的 Chelex-100 方法^[15]稍加修改而来。

1.2.4 PCR 扩增反应 实验所用的 3 对微卫星引物是由 Auget Biotechnology 公司合成(序列见表 1), 它们在西方蜜蜂和熊蜂中都可以成功扩增^[16]。PCR 反应体系为 20 μl, 其中包含 MgCl₂ 2.4 μl; 10×Buffer 2.0 μl; 上引物和下引物各 0.8 μl; dNTP 0.4 μl; Taq 酶 0.3 μl; 不同微卫星位点模板 DNA 用量见表 1; 剩下的用 ddH₂O 补足。PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 60 s, 退火 60 s (不同微卫星位点退火温度和循环次数见表 1), 72℃延伸 120 s; 72℃再延伸 10 min; 最后 4℃保存。

1.2.5 PCR 扩增产物的检测 PCR 扩增效果将直接决定个体基因型的分析, 因此在进行毛细管电泳分析片段之前要检测 PCR 的扩增效果, 确保样品中的目的片段已被扩增。将 5 μl PCR 扩增产物和 1 μl Loading Buffer 混匀上样于 2%的 0.5×TBE 琼脂糖胶中, 以 100 V 电压, 60 mA 电流电泳 1 h, 取出染色后在紫外灯下观察扩增效果。

1.2.6 PCR 扩增产物的片段分析及等位基因的命名 用灭菌 ddH₂O (Million Q) 将 PCR 扩增成功的产物稀释

表 1 微卫星核心序列及部分 PCR 反应条件

Table 1 Core sequences in cloned alleles and parts of PCR condition for 3 used microsatellites

位点 Locus	核心序列 Core sequences	引物序列 Sequence of primers	荧光染料 Fluorescent label	模板 DNA 体积 Vol of DNA (μl)	退火温度 T _a (°C)	循环次数 No.Cycles	目标片段 Size rang (bp)
A14	(CT) ₁₃ ...(GGT) ₉	5'-GTGTCGCAATCGACGTAACC-3' 5'-GTCGATTACCGATCGTGACG-3'	HEX	3	58	30	200~250
A107	(GCTC) ₂ (GCT) ₂ (CT) ₂₃	5'-CCGTGGGAGGTTTATTGTGCG-3' 5'-GGTTCGTAACGGATGACACC-3'	FAM	2	60	25	140~190
B124	(CT) ₈ ...(CT) ₁₄ CCTC (GC) ₃ ...(GGCT) ₈	5'-GCAACAGGTCGGGTTAGAG-3' 5'-GTCGTCGGACCGATGCG-3'	FAM	6	55	30	200~250

20 倍, 取 1.2 μl 加入等量的上样缓冲液 (Loading Buffer, PE Applied Biotech systems), 再加入 0.3 μl 的分子量内标 (inner lane size standard, PE Applied Biotech systems), 上样前 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 取出后立即插入冰中。取 1.5 μl 变性后的 PCR 产物用毛细管电泳凝胶在 MegaBACE1000 测序仪上 750 V、50 mA 电泳 2 h, 收集图像。应用 GeneScan2.1 软件进行数据收集、泳道线校正、分子量内标校正和迁移片段大小测量, 并进行基因分型。

GeneScan 分析软件把电泳收集的图谱信息经过计算机处理成数据信息, 这些数据信息与设计等位基因分子大小标记的内标比较后被定义。电泳图谱中不同位点的等位基因由于不同荧光标记而显示出不同颜色, 同一位点的不同等位基因为同一颜色, 它们的迁移率各不相同。电泳图谱中, 不同的颜色代表不同的内容, 本试验采用 2 种荧光染料, FAM 代表蓝色, HEX 代表绿色, 红色的 GENESCAN-350 是设计的等位基因分子量大小的标记, 在变性条件下产生的片段大小分别为: 50、75、100、139、150、160、200、250、340 和 350 bp。等位基因的命名是根据等位基因实际扩增出的片段长度来进行的, 比如 A14 位点上的前 3 个等位基因: 209、210 和 211, 它们的长度分别为 209、210 和 211 bp。

1.2.7 群内雄蜂来源的统计方法 在某一特定位点上, 单倍体雄蜂的等位基因来自母系, 双倍体工蜂的两条等位基因则分别来自母系和父系, 因此根据蜂群内足够多的工蜂个体的基因型可以顺利推导出蜂王以及父系雄蜂 (即与蜂王交配的雄蜂) 的基因型, 然后把蜂群内的雄蜂个体基因型和蜂王及父系雄蜂进行对照, 判断它们的来源^[16]。当蜂群内的雄蜂遗传了父系等位基因 (即与蜂王交配的雄蜂的等位基因), 并且父系等位基因与蜂王等位基因不同时, 可以确定它为工蜂所产。然而根据细胞的有效减数分裂可知, 工蜂产子是以 0.5 的概率将她父系等位基因遗传给单倍体雄蜂的, 另外 50% 的概率是将母系等位基因 (蜂王等位基因) 遗传给雄蜂, 这种雄蜂不能和蜂王自己所产的雄蜂区分开来。因此必须通过以下校正公式来计算工蜂所产雄蜂的数量 (N_a)。

$$N_a = \sum_j^n [1 - \prod_i^{l_j} (1 - 0.5p_{ij})] N_j$$

式中 n 为蜂群数量, N_j 是在 j 蜂群中分析的雄蜂数量, l_j 是位点数量, p_{ij} 为 j 蜂群中 i 位点上继承了父系等位

基因的雄蜂数量。另外由于样品采样数量有限而造成的误差也必须校正, 假设工蜂产的雄蜂数量为 X , 那么没被采到的雄蜂样品数量为 $(1-X)^{N_a}$ 。因此蜂群中工蜂所产的雄蜂实际数量 $X = N_a + (1-X)^{N_a}$ ^[17]。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增效果的检测结果

图 1 是 F 蜂群的 1 号到 23 号雄蜂样品在 A14 位点上 PCR 扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳中检测的结果, 从图 1 可见, 绝大部分样品都能成功扩增出目标片段。少数没有扩增出的样品, 要补做直至扩增成功, 然后进行毛细管电泳, 并对扩增产物进行片段分析。

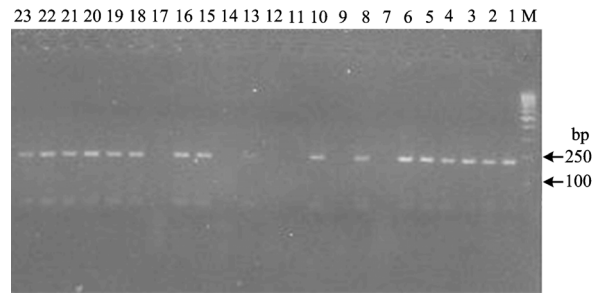


图 1 1~23 号雄蜂在 A14 位点上的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of PCR that No.1 to No.23 male bees were amplified on locus A14

2.2 样品的基因分型结果

经过 MegaBACE1000 测序仪对片段的大小进行测量, 并运用 GeneScan 分析软件进行基因分型。从图 2 可以看出 F01 工蜂个体在 A107 位点上的两条等位基因分别是 223 和 235, 因此该样品在此位点上的基因型为 223/235。同理得出其它样品在各位点上的基因型。

2.3 等位基因的分析及雄蜂来源的推断

由每群工蜂的基因型推导出各自蜂王及与父系雄蜂的基因型 (表 2)。从表 2 可以看出各蜂群在不同位点上的基因分布情况。根据 Jun-ichi T 的方法^[18], 由父系雄蜂等位基因的推断结果可知, 在蜂群 A 和蜂群 B 中, 与蜂王交配的雄蜂数量分别都是 1 只; 在蜂群 C 和 D 中都是 2 只; 而蜂群 E 和蜂群 F 则分别为 4 只和 8 只。这种推导结果与蜂王人工授精结果相一致, 这说明微卫星 DNA 标记是测定处女蜂王与雄蜂交配数量的一种有效方法。另外在蜂群 C 中, 有不少工蜂个体在 3 个微卫星位点上 (A14、A107 和 B124) 都

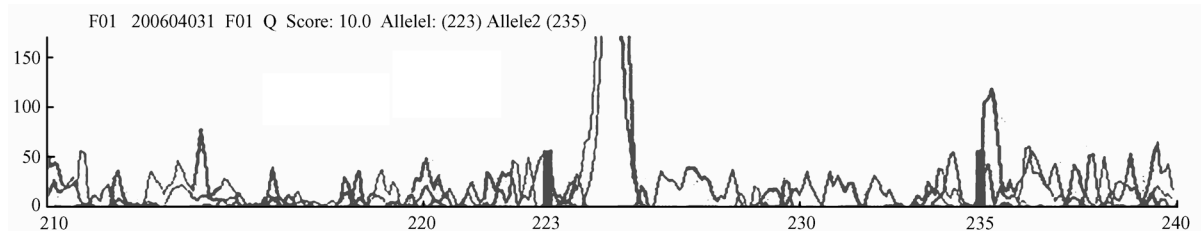


图 2 F01 工蜂个体在 A107 位点上的基因扫描图

Fig. 2 Gene scanning file of F01 on microsatellite loci A107

表 2 等位基因的分析 and 雄蜂来源的推断

Table 2 Analysis of alleles and inference of drones' maternity

蜂群	位点	工蜂等位基因(等位基因频率%)	蜂王	父系	雄蜂	蜂王产的	工蜂产的	与蜂王交配
Colony	Locus	Alleles of workers (Frequency of the alleles)	等位基因 Alleles of queens	等位基因 Alleles of patriline	等位基因 Alleles of males	雄蜂数量 No. of drones reproduced by queens	雄蜂数量 No. of drones reproduced by workers	雄蜂数量 No. of males mated with queen
A	A14	211(53),219(47),233(100)	211/219	233	211,219	40	0	1
	A107	158(43),178(57),182(100)	158/178	182	158,178	40	0	
	B124	224(100),232(47),240(53)	232/240	224	232,240	40	0	
B	A14	213(50),217(50),226(100)	213/217	226	213,217	40	0	1
	A107	161(100),172(40),180(60)	172/180	161	172,180	40	0	
	B124	222(100),228(60),238(40)	228/238	222	228,238	40	0	
C	A14	215(60),227(43),231(97)	215/231	227,231	215,231	40	0	2
	A107	160(97),164(60),166(43)	160/164	160,166	160,164	40	0	
	B124	216(97),224(43),227(60)	216/227	216,224	216,227	40	0	
D	A14	209(53),219(60),233(47),242(40)	219/242	209,233	219,242	40	0	2
	A107	157(63),164(50),172(50),189(37)	157/189	164,172	157,189	40	0	
	B124	221(53),230(47),234(57),240(43)	234/240	221,230	234,240	40	0	
E	A14	217(53),228(27),229(47) 232(27),242(23),244(23)	217/229	228,232,242,244	217,229	40	0	4
	A107	140(20),142(20),156(27) 166(33),168(60),176(40)	168/176	140,142,156,166	168,176	40	0	
	B124	213(27),217(23),221(57) 226(27),230(23),237(43)	221/237	213,217,226,230	221,237	40	0	
F	A14	210(17),217(47),218(17),219(3),221(10) 229(20),231(3),233(53),244(3),248(27)	217/233	210,218,219,221 229,231,244,248	217,233	40	0	8
	A107	149(13),156(3),158(17),161(23),163(10) 166(50),168(7),170(50),172(10),182(17)	166/170	149,156,158,161 163,168,172,182	166,170	40	0	
	B124	211(17),215(57),217(3),221(23),223(10), 229(7),231(13),235(43),237(10),240(17)	215/235	211,217,221,223 229,231,237,240	215,235	40	0	

有纯合子 (231/231, 160/160 和 216/216) 出现, 并且还有跟蜂王基因型完全一致 (215/231; 160/164 和 216/227) 的个体。根据纯合子和与蜂王完全一致的个体可以推导出: 在 3 个微卫星位点上, 蜂群 C 的 1 只父系雄蜂的等位基因与蜂王有 1 条重叠的等位基因, 分别为 231, 160 和 216。

另外, 将雄蜂样品在 A14、A107 和 B124 3 个微卫星位点上 PCR 扩增出来的产物, 经过片段大小测量, 并进行基因分型得出各自的基因型。然后把各群雄蜂样品的基因型与上面推导出的蜂王等位基因相对照, 找出继承了父系等位基因地雄蜂个数, 再按照校正公式计算出来源于工蜂产的雄蜂数量, 结果也见表

2. 从表 2 可知: 6 群试验蜂群中所有雄蜂都是来自蜂王产的未受精卵发育而成的, 没有发现由工蜂产的未受精卵发育而成的雄蜂, 这说明在中华蜜蜂群内存在明显的工蜂监督现象。

3 讨论

蜂群中工蜂与其外甥(其它工蜂之子)的亲缘关系指数 $r=0.125+0.25/N$, 其中 N 为蜂王交配的雄蜂只数^[19]。若蜂王是与单只雄蜂交配, 工蜂与其外甥(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——雄蜂)亲缘关系指数($r=0.25$)更高。从理论上讲, 在单雄人工授精蜂群中, 群内的雄蜂将全部来自工蜂产的未受精卵; 若蜂王是与 2 只雄蜂交配, 工蜂与其外甥(其它工蜂之子)的亲缘关系指数($r=0.25$)和工蜂与蜂王的儿子(工蜂的兄弟——雄蜂)亲缘关系指数($r=0.25$)相等。从理论上讲, 在双雄人工授精蜂群中, 群内的雄蜂将可能来自蜂王和工蜂两者产的未受精卵; 若蜂王是与 3 只以上雄蜂交配, 工蜂与其外甥(其它工蜂之子)的亲缘关系指数($r=0.125+0.25/N$)要比工蜂与蜂王的儿子(工蜂的兄弟——雄蜂)亲缘关系指数($r=0.25$)更低。从理论上讲, 在多雄交配的蜂群中, 群内的雄蜂将全部来自蜂王产的未受精卵^[20]。

在本试验中, 蜂王多雄交配的中蜂群内的雄蜂都是来自蜂王产的未受精卵, 该结果与理论预测相符; 但在蜂王单雄和多雄交配的中蜂群中, 所有的雄蜂也都是来自蜂王所产的未受精卵, 这一结果似乎与蜜蜂亲缘关系指数理论预测相矛盾。然而, 作为有效的社会性昆虫, 蜜蜂之间有着惊人的互作关系。为什么在单雄和双雄人工授精蜂群中没有来自工蜂所产的雄蜂? 这需从蜂群的整体利益和高度有效性以及性比原则来考虑, 首先, 产卵工蜂一般不参加或极少参加采集工作, 这样对蜂群的整体利益是非常不利^[21]; 其次, 将工蜂产的未受精卵培育成雄蜂质量不利蜂群繁殖, 而且浪费群内大量资源; 另外, 如果所有工蜂都产雄蜂, 那么蜂群中的雄蜂至少占有 50%, 这似乎跟蜜蜂群中的性比理论相违背^[22], 而且蜂群中的社会分工也就受到很大的阻碍。显然为了提高蜂群的整体效益和生存概率, 群内工蜂之间应该实行相互监督, 不让其它工蜂产卵。即使蜂群中有部分工蜂卵巢得以发育并产卵, 但其它工蜂可以通过监督行为来辨认并及时清除这些工蜂产的未受精卵。

4 结论

通过以上分析可知: 在蜂王人工授精和自然交尾的中华蜜蜂蜂群中都明显存在工蜂监督现象。

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支持和帮助, 在此表示衷心感谢。

References

- [1] 杨冠煌. 中华蜜蜂. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
Yang G H. *Chinese Honeybees*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2001. (in Chinese)
- [2] 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 ceranas*. *Agricultural Science in China*, 2007, 40(2): 426-432. (in Chinese)
- [3] Tan K, Fiola B, Stefan F. Effects of brood temperature on honey bee *Apis mellifera* wing morphology. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(4): 768-771.
- [4] 谢宪兵, 黄 康, 曾志将. 中华蜜蜂不同蜂卵自然孵化率研究. 江西农业大学学报, 2007, 29(4): 628-630.
Xie X B, Huang K, Zeng Z J. A study on the natural hatching rate of different eggs of *Apis cerana cerana*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2007, 29(4): 628-630. (in Chinese)
- [5] Starr C K. Sperm competition, kinship, and sociality in the aculeate Hymenoptera. In: Smith R L (ed). *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. New York: Academic Press, 1984: 427-464.
- [6] Tom W, Francis L W R. Comparative analysis of worker reproduction and policing in eusocial Hymenoptera supports relatedness theory. *American Naturalist*, 2006, 168(6): 163-179.
- [7] Francis L W R. Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. *American Naturalist*, 1988, 132: 217-236.
- [8] Halling L A, Oldroyd B P, Wandee W, Barron A B, Nanork P, Wongsiri S. Worker policing in the bee *Apis florea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2001, 49: 509-513.
- [9] Francis L W R, Kirk P K. Worker policing in the honeybee. *Nature*, 1989, 342: 796-797.
- [10] Foster K R, Francis L W R. Facultative worker policing in a wasp.

- Nature*, 2004, 407(7): 692-693.
- [11] Christian W W P, Peter N, Randall H, Robin F A M, Jurgen T. Egg viability and worker policing in honey bees. *The National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101(23): 8649-8651.
- [12] Francis L W R. Egg-laying, egg-removal and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1993, 32: 191-198.
- [13] Sasaki K, Satch T, Obara Y. Sperm utilization by bees queens DNA fingerprinting analysis. *Applied Entomology and Zoology*, 1995, (2): 335-341.
- [14] 谢宪兵. 中华蜜蜂与意大利蜜蜂营养杂交研究. 江西农业大学硕士学位论文, 2004.
- Xie X B. Studies on the nutritional crossbreed between *Apis Cerana Cerana* and *Apis Mellifera Ligustica*. Thesis of Master in Jiangxi Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [15] Walsh P S. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991, 10: 507.
- [16] Estoup A, Solignac M, Cornuet J M. Precise assessment of the number of patrilines and of genetic relatedness in honey bee colonies. *Proceedings: Biological Sciences*, 1994, 258: 1-7.
- [17] Kevin R F, Francis L W R, Alan F R. Do hornets have zombie workers. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 735-742.
- [18] Jun-ichi T, Jun N, A scientific note on levels of polyandry of 2 queens of the Himalayan giant honeybee, *Apis laboriosa*. *Apidologie*, 2003, 34: 191-192.
- [19] Brian J F, Michael D B, Jessical M. Mating frequency, within-colony relatedness and male production in a yellow jacket wasp, *Dolicovespula arenaria*. *Molecular Ecology*, 2004, 13(12): 3703-3707.
- [20] Hamilton W D. The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology*, 1964, 7: 1-16.
- [21] Hartmann A, Heinze J. Lay eggs, live longer: division of labor and life span in a clonal ant species. *Evolution*, 2003, 57: 2424-2429.
- [22] Page R E, Metcalf R A. A population investment sex ratio for the honey bee (*Apis mellifera* L.). *American Natralist*, 1984, 124(5): 680-702.

(责任编辑 王红艳)