

中华蜜蜂急造王台的工蜂亲属优惠*

谢宪兵^{1,2} 孙亮先² 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

摘要 人为使 3 群中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 失王而出现急造王台后, 应用 3 个蜜蜂微卫星位点 A14、A107 和 B124 对蜂群、急造王台中的幼虫及其哺育蜂的亚家庭进行鉴别, 以此来研究中华蜜蜂急造王台的工蜂亲属优惠。结果显示: 在 3 个实验蜂群 I、II、III 中分别检测到 11、13 和 14 个亚家庭, 各蜂群各亚家庭之间的工蜂分布差异不显著。然而各蜂群中急造王台却分别只出现在少数的 3、4 和 5 个亚家庭中, 各亚家庭之间在王台出现率上存在极显著的差异。另外, 各急造王台的所有哺育蜂并非只来自幼虫所在的亚家庭, 而是分布在更多的亚家庭里, 并且各亚家庭之间差异不显著。以上结果证明: 中华蜜蜂急造王台时, 在蜂王幼虫的选择过程中存在工蜂亲属优惠行为, 但蜂王幼虫与它们的哺育工蜂之间并不存在工蜂亲属优惠 [动物学报 54 (4): 695-700, 2008]。

关键词 中华蜜蜂 工蜂亲属优惠 微卫星 DNA

Worker nepotism during emergency queen rearing in Chinese honeybees *Apis cerana cerana**

XIE Xian-Bing^{1,2}, SUN Liang-Xian², HUANG Kang¹, ZENG Zhi-Jiang^{1**}

1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

2. College of Quanzhou Normal, Quanzhou, Fujian 362000, China

Abstract To study worker nepotism during emergency queen rearing in Chinese honeybees *Apis cerana cerana*, we identified sub-families composed of larval queens and their nurse workers. Three microsatellite loci (A14, A107 and B124) were used to identify individuals in three colonies (I, II and III), in which emergency queen cells were built as a result of losing a queen. Our results showed that colony I, II and III consisted of 11, 13, and 14 sub-families, respectively. There was no significant difference in distribution of worker bees among the subfamilies. However, emergency queen cells appeared in three sub-families in colony I, four in colony II, and five in colony III, there are significant differences in emergency queen cells between sub-subfamilies. The nurse workers which nurse the larvae of emergency queen cells did not come from the same sub-family. They derived from a number of sub-families, and there were no significant differences among sub-families in distribution of nurse workers. Our results suggest that, during emergency queen cell building, worker nepotism exists during selection of larvae, but does not exist between the nurse workers and the larval queens in *Apis cerana cerana* [Acta Zoologica Sinica 54 (4): 695-700, 2008].

Key words *Apis cerana cerana*, Worker nepotism, Microsatellite DNA

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

(Ben-Shahar et al., 2002; Kishi and Nishida, 2008)。近 20 年来, 蜂群中工蜂亲属优惠一直是蜜蜂社会行为特性研究的热门课题之一 (Jordan et al., 2008)。工蜂亲属优惠是指工蜂给予跟自己亲缘关

2007-09-24 收稿, 2008-05-06 接受

* 国家自然科学基金 (No.30560114, No.30760035)、泉州师院校自选项目 (No.2007KJ004) [This research was funded by grants from NSFC (No.30560114, No.30760035), and Quanzhou Normal University (No.2007KJ004)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: bees1965@sina.com

© 2008 动物学报 Acta Zoologica Sinica

系更近的个体某些“利益”而疏远跟自己亲缘关系指数较小的个体的行为 (Barbara et al., 2006; Wenseleers, 2007)。

由于同一亚家庭的工蜂之间 (即全同胞姐妹) 的亲缘关系指数是 0.75, 而不同亚家庭之间的工蜂 (即半同胞姐妹) 的亲缘关系指数只有 0.25。因此当蜂群失王后, 哺育工蜂将面临用不同亲缘关系指数的幼虫来培育蜂王的选择。如果存在亲属优惠, 那么工蜂都希望用跟自己属同一亚家庭的幼虫来培育蜂王。Lacy and Sherman (1983) 发现在西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 中, 工蜂便是选择亲缘关系指数高的幼虫来培育蜂王。当面临饲喂全同胞姐妹幼虫和半同胞姐妹幼虫时, 工蜂多会优先选择饲喂全同胞姐妹幼虫 (Moritz and Neumann, 2004); 当面临蜂王产的卵和工蜂产的卵时, 工蜂可以在 24 h 内辨别工蜂产的卵, 并 99% 地清除它们 (Ratniks and Kvesscher, 1989)。Tarpy and Fletcher (1998) 研究了亲缘关系指数对蜂王的影响, 发现在育王时, 虽然工蜂不会优先饲喂亲缘关系指数近的幼虫, 但蜂王羽化后, 亲缘关系指数近的蜂王成活率显著高于其他蜂王。Page et al. (1989) 认为, 如果蜂群中有某个或几个亚家庭被培育成蜂王的概率明显要高, 那么这现象也应该是亲属优惠的结果。Wenseleers and Ratnieks (2006) 对 109 种社会性昆虫进行分析, 结果发现大部分群体中都存在亲属优惠现象。

中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 是我国宝贵蜂种资源, 蜂群中存在亲属优惠与否的争论非常激烈。微卫星 DNA 技术在蜜蜂生物学上的应用较为常见 (苏松坤, 2002)。因此, 本实验运用蜜蜂微卫星 DNA 技术分析了中华蜜蜂群内急造王台时的工蜂亲属优惠问题, 进一步揭示了中华蜜蜂生物学特性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 蜂群来源

实验蜜蜂是泉州师范学院模式生物研究中心饲养的中华蜜蜂。

1.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂: Chelex-100 (5%); Ringer buffer (130 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L KCl, pH 7.4); 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, pH 9.0, NP-40); dNTP (10 mmol/L); Primer; Mark (100 bp); 30% PAGE (145 g 丙烯酰胺, 5 g 亚甲双丙烯酰胺, 加水定容至 500 ml); 染色液 (每块胶所需) (3.6% NaOH 4.2 ml, 20% AgNO₃ 3.6 ml, 氨水 2 ml 蒸馏水 190 ml); 显色液 (每块胶所需) (1% 柠檬酸钠 1 ml, 甲醛 100 ml, 蒸馏水 200 ml), 以上试剂大部分购自 Sigma 公司。

主要仪器: 高速冷冻离心机 (Eppendorf 5415R)、PCR 仪 (Eppendorf 96 holes)、琼脂糖凝胶电泳系统 (Tanon EPS300)、计算机自动成像系统 (Tanon GIS2009) 和垂直电泳槽 (北京六一 DYY-III24A) 等。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂群的组织

在早春蜂群分蜂季节, 选取 3 群群势较强的中蜂, 将蜂群中的蜂王移走而使蜂群人为失王, 2-3 d 后蜂群中出现急造王台。整个实验对蜂群进行奖励饲喂。

1.2.2 样品的采集

考虑实验统一, 每群蜂取前 10 个急造王台。仔细观察急造王台中幼虫的饲喂情况, 每个王台采集哺育工蜂 20 只。哺育蜂采集完毕, 立刻将对应王台中的蜂王幼虫也采集好。另外每个蜂群采集 30 只工蜂蛹用于蜂群亚家庭鉴定。将所有样品编号后放入 -20 °C 的低温冰箱中保存。

1.2.3 蜜蜂基因组 DNA 的提取

单只蜜蜂的基因组 DNA 是参照 Walsh (1991) 的 Chelex-100 方法提取。

1.2.4 PCR 扩增反应

实验所用的 3 对微卫星引物由上海 GeneCore 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 (Estoup et al., 1994)。PCR 反应体系为 50 μl, 其中包含 MgCl₂ 6.0 μl; 10 × Buffer 5.0 μl; 上、下引物各 2.0 μl; dNTP 1.0 μl; *Taq* 酶 0.75 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 °C 预变性 5 min; 94 °C 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 °C 延伸 120 s; 72 °C 再延伸 10 min; 最后 4 °C 保存。

1.2.5 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 扩增效果将直接决定个体基因型的分析,

表 1 三个微卫星位点的核心序列及部分 PCR 反应条件

Table 1 Core sequences and parts of PCR condition in three used microsatellite locus

位点 Locus	核心序列 Core sequences	引物序列 Sequence of primers	模板 DNA 体积 Volume of template DNA(μ l)	退火温度 Annealing Temperature($^{\circ}$ C)	循环次数 Number of cycles	目标片断 Size rang(bp)
A14	(CT) ₁₃ ...(GGT) ₉	5'-GTGTCGCAATCGACGTAACC-3' 5'-GTCGATTACCGATCGTGACG-3'	7.5	58	30	200-250
A107	(GCTC) ₂ (GCT) ₂ (CT) ₂₃	5'-CCGTGGGAGGTTTATTGTGCG-3' 5'-GGTTCGTAACGGATGACACC-3'	5.0	60	25	140-190
B124	(CT) ₈ ...(CT) ₁₄ CCT C(GC) ₃ ...(GGCT) ₈	5'-GCAACAGGTCGGGTTAGAG-3' 5'-GTCGTCGGACCGATGCG-3'	15	55	30	200-250

因此在进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析片断之前, 应该用琼脂糖凝胶电泳简单检测 PCR 的扩增效果, 确保样品中的目标片断已被扩增, 然后再用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析各自的基因型。

1.2.6 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳基因分型

玻璃板的清洗→12%变性聚丙烯酰胺凝胶制备→灌胶→预电泳→样品的准备→上样→电泳→银染→检测电泳分型结果, 并利用成像软件计算其分子量。

通过分析工蜂的基因型推导出各蜂群的亚家庭组成, 然后通过各蜂群 10 个王台中的蜂王幼虫和 20 只哺育工蜂的等位基因组成的分析, 推导出各自所属的亚家庭。

1.3 数据统计分析

采用 StatView 软件对各亚家庭之间的工蜂分布和哺育蜂的分布进行方差分析, 而各亚家庭之间的王台分布的实验值与理论值之间的分析是采用卡方检验。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中的检测结果

从图 1 可见: 电泳条带在已知大小范围之内, 没有非特异性扩增条带的干扰, 这说明 PCR 反应体系构建合理, 可以用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行多态性分析。

2.2 PCR 扩增产物在 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳上的检测结果

从图 2 可见: PCR 扩增产物在 12% 聚丙烯酰胺胶中能顺利地分辨出双倍体的基因型。

2.3 急造王台中的幼虫及其哺育工蜂亚家庭分析结果

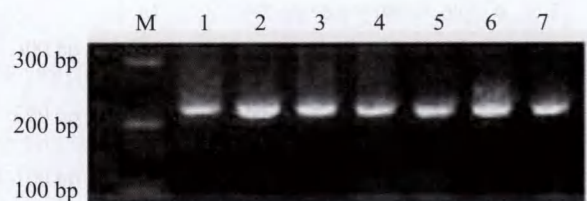


图 1 蜂群 II 的 7 个工蜂样品在 A14 位点上的 PCR 产物经琼脂糖电泳检测的结果

M 为 marker, 1-7 为 7 个工蜂样品。

Fig.1 PCR products of 7 workers belong to colony II on locus A14 was showed in agarose gels

M is the marker, 1-7 are sample of bee workers.

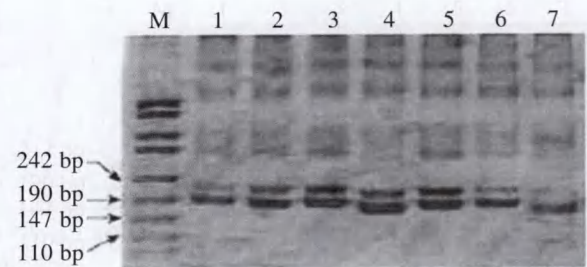


图 2 蜂群 II 的 7 个工蜂样品在 A14 位点上的 PCR 产物在 PAGE 胶中的检测结果

M 为 marker, 1-7 为 7 个工蜂样品。

Fig.2 PCR products of 7 workers belong to colony II on locus A14 was showed in PAGE

M is the marker, 1-7 are sample of bee workers.

从表 2 可知: 通过 A14、A107 和 B124 3 个微卫星位点, 蜂群 I 共检测到 11 个亚家庭, 急造王台却只集中在亚家庭 4 (50%)、9 (30%) 和 11 (20%); 蜂群 II 检测到 13 个亚家庭, 急造王台只集中在亚家庭 1 (30%)、4 (20%)、6 (30%) 和 13 (20%); 蜂群 III 检测到 14 个亚家庭, 急造王台只集中在亚家庭 4 (10%)、7 (10%)、9 (20%)、

11 (10%) 和 14 (50%)。同一蜂群内经卡方检验发现, 出现急造王台的亚家庭与未出现的之间在急造王台出现率上存在极显著差异; 由方差分析发

现, 各亚家庭之间在工蜂分布情况上差异不显著。这说明中华蜜蜂在急造王台时, 存在工蜂亲属优惠行为。

表 2 各蜂群及其急造王台中的幼虫亚家庭分析结果

Table 2 Sub-families in each colony and the larvae stayed in emergency queen-cells

蜂群 Colony	亚家庭 Sub-families														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
I	父系基因型	233	231	216	235	226	233	248	226	226	226	222	0	0	0
	Genotypes of paternity	177	169	165	170	170	163	175	175	175	183	179	0	0	0
	(A14/A107/B124)	232	220	226	224	220	232	220	230	237	240	220	0	0	0
	急造王台率 (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	50 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	30 ^b	0 ^a	20 ^b	0	0	0
	Rate of emergency queen-cell														
	工蜂分布情况 (%)	10 ^a	13 ^a	10 ^a	3 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	3 ^a	0	0	0
	Rate of worker														
	父系基因型	211	219	233	213	227	227	231	248	229	226	217	231	211	0
	Genotypes of paternity	158	178	182	149	156	161	170	182	168	170	179	182	170	0
	(A14/A107/B124)	220	232	220	220	232	220	220	222	226	224	230	240	220	0
II	急造王台率 (%)	30 ^b	0 ^a	0 ^a	20 ^b	0 ^a	30 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	20 ^b	0
	Rate of emergency queen-cell														
	工蜂分布情况 (%)	10 ^a	6.7 ^a	3 ^a	10 ^a	10 ^a	3 ^a	6.7 ^a	10 ^a	3 ^a	6.7 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a	
	Rate of worker														
	父系基因型	233	213	227	231	227	219	217	222	222	243	235	227	219	233
	Genotypes of paternity	170	159	156	170	170	183	179	183	163	178	175	175	156	180
	(A14/A107/B124)	240	220	232	220	230	240	224	220	232	220	220	222	232	240
	急造王台率 (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	10 ^b	0 ^a	0 ^a	10 ^b	0 ^a	20 ^b	0 ^a	10 ^b	0 ^a	0 ^a	50 ^b
	Rate of emergency queen-cell														
	工蜂分布情况 (%)	7 ^a	21 ^a	7 ^a	14 ^a	21 ^a	14 ^a	7 ^a	21 ^a	21 ^a	14 ^a	14 ^a	21 ^a	14 ^a	14 ^a
Rate of worker															

经卡方检验 (χ^2) 得知各蜂群中不同亚家庭之间的急造王台出现率存在显著的差异 (蜂群 I: $df = 10$, $\chi^2 = 28.909$, $P = 0.003$; 蜂群 II: $df = 12$, $\chi^2 = 28.308$, $P = 0.021$; 蜂群 III: $df = 13$, $\chi^2 = 24.857$, $P = 0.048$)。同一行中的不同上标代表差异显著, 各亚家庭之间的工蜂分布情况差异不显著 (One-way ANOVA, $F_{2, 11} = 2.073$, $P = 0.157$.)

Each colony had difference among the sub-families on the rate of emergency queen-cells appearance. (Chi-square test, $df = 10$, $\chi^2 = 28.909$, $P = 0.003$ for the colony I, $df = 12$, $\chi^2 = 28.308$, $P = 0.021$ for the colony II, $df = 13$, $\chi^2 = 24.857$, $P = 0.048$ for the colony III). Within the same row, the different superscripts means significant difference. There were no differences in frequency of worker in each colony (One-way ANOVA, $F_{2, 11} = 2.073$, $P = 0.157$).

从表 3 可知: 各急造王台中幼虫的哺育工蜂并非都出自同一个亚家庭; 与幼虫来自同一亚家庭的哺育工蜂即“全同胞姐妹”最多只有 40%, 有些急造王台中幼虫并没有“全同胞姐妹”哺育。经卡方检验发现: 同一蜂群内, 各亚家庭之间在出现哺育工蜂方面没有差异, 这说明哺育工蜂与急造王台中的幼虫之间并不存在工蜂亲属优惠。

3 讨论

家系选择理论表明, 如果群体中的个体愿意帮助亲属繁殖, 那么基因的遗传总体上会好于个体自己直接繁殖, 比如蜜蜂群体中的利他基因能够得到很好的继承, 而工蜂却能够完全不育。然而该行为也有它的负面结果, 那就是个体之间都会“利于”亲属关系近的而“伤害”关系远的, 即亲属优惠

表 3 蜂群中各急造王台中幼虫的哺育工蜂亚家庭分布情况

Table 3 The distribution of nurse workers' sub-family which breed the larvae

蜂群 Colony	急造王台 Emergency queen-cell	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	所在亚家庭 Sub-family affiliating	9	4	4	11	11	4	4	4	9	9
	同亚家庭哺育率 (%) Possibility of same sub-family	20	30	15	5	40	15	5	0	10	10
	χ^2	9.16	8.63	8.61	9.46	5.37	7.35	7.72	2.37	17.56	9.18
	所在亚家庭 Sub-family affiliating	4	1	1	6	4	6	6	13	1	13
II	同亚家庭哺育率 (%) Possibility of same sub-family	0	15	15	10	10	5	15	0	5	0
	χ^2	9.01	9.25	19.18	17.56	5.37	17.35	19.03	1.85	17.72	4.40
	所在亚家庭 Sub-family affiliating	14	7	14	14	9	9	11	4	14	14
III	同亚家庭哺育率 (%) Possibility of same sub-family	30	10	0	5	0	0	5	10	0	0
	χ^2	8.39	8.59	11.26	9.47	15.07	3.15	17.64	14.03	20.56	18.30

经卡方检验得出蜂群中各急造王台的哺育蜂在不同亚家庭中的分布没有差异 (蜂群 I: $df = 10$, $\chi^2 = 18.31$, $P = 0.06$; 蜂群 II: $df = 12$, $\chi^2 = 21.03$, $P = 0.12$; 蜂群 III: $df = 13$, $\chi^2 = 22.36$, $P = 0.72$)。

There was no difference among the sub-families in nurse workers of larvae stayed in emergency queen-cells ($df = 10$, $\chi^2 = 18.31$, $P = 0.06$ for colony I, $df = 12$, $\chi^2 = 21.03$, $P = 0.12$ for colony II, and $df = 13$, $\chi^2 = 22.36$, $P = 0.72$ for colony III).

(Barbara et al., 2006; Wenseleers, 2007)。

Pagee and Metcalf (1982) 以及 Estoup et al. (1994) 的研究结果表明, 一般蜂群都由 6-21 个亚家庭组成, 因此由于蜂王的多雄交配特性, 加上蜂王使用交配雄蜂的精液呈随机分布 (Fondrk et al., 1993), 使得多雄交配蜂王的蜂群由许多同母异父的亚家庭组成, 从而使蜂群中不同个体间亲缘关系指数变得复杂了许多。由于 r 全同胞姐妹 $> r$ 全同胞兄妹 $> r$ 半同胞姐妹 $> r$ 半同胞兄妹, 因此从理论上必然形成以下亲属优惠结果: 在面临全同胞姐妹和半同胞姐妹时, 工蜂愿意选择其同胞姐妹进行饲喂; 而工蜂在选择全同胞兄弟和半同胞兄弟时, 可能先清除其半同胞兄弟; 同理, 工蜂在选择全同胞姐妹和同胞兄弟时, 可能先清除其同胞兄弟。

在本实验中, 3 群中蜂的蜂王经检测分别与 11、13 和 14 只雄蜂交配, 因此, 这 3 个实验蜂群分别是由 11、13 和 14 个亚家庭组成。当人为地将蜂群中的蜂王移走后, 蜂群在第 2 天就开始出现了急造王台, 经过对蜂群中急造王台里幼虫的亚家庭隶属关系进行鉴定, 结果发现急造王台并非是平均

分配在所有的亚家庭中, 而是只集中在几个亚家庭, 这一结果与西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 研究结果一致 (Tilley and Oldroyd, 1997), 从而说明了蜂群在急造王台时, 蜂王幼虫的选择过程是存在工蜂亲属优惠的; 而根据亲属优惠原则, 哺育工蜂都应该愿意饲喂跟自己是同一亚家庭的全同胞兄妹。然而在本实验中, 某一急造王台的所有哺育蜂与幼虫并非来自同一亚家庭, 而是分布在更多的亚家庭里, 这说明蜂群在哺育蜂王时并不存在亲属优惠现象。这一结果跟亲属优惠的预计结果不一致, 原因可能是急造王台的选择并不是由哺育蜂来完成, 而是由某一特定的“员工”在蜂群失王后决定, 或者可能与中华蜜蜂生物学特性有关, 具体的机理还待于进一步探讨。通过以上分析可知, 在中华蜜蜂群的蜂王选择培育过程中存在工蜂亲属优惠现象, 但蜂王的选择估计不是哺育蜂, 因为哺育蜂与蜂王幼虫之间并不存在亲属优惠现象。

参考文献 (References)

Barbara H, Rolf K, Laurent K, Michel C, 2006. Sham nepotism as a result of intrinsic differences in brood viability in ants. Proceedings of the

- Royal Society B 273: 2049 – 2052.
- Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski MB, Robinson GE, 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296: 741 – 744.
- Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honey bee colonies. *Proceedings of the Royal Society B* 258: 1 – 7.
- Fondrk MK, Page RE, Hunt GJ, 1993. Paternity analysis of worker honeybees using random amplified polymorphic DNA. *Naturwissenschaften* 80: 226 – 231.
- Jordan LA, Allsopp MH, Oldroyd BP, Wossler TC, Beekman M, 2008. Cheating honeybee workers produce royal offspring. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 345 – 351.
- Kishi S, Nishida T, 2008. Optimal investment in sons and daughters when parents do not know the sex of their offspring. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 607 – 615.
- Lacy RC, Sherman PW, 1983. Kin recognition by phenotype matching. *American Naturalist* 121: 489 – 512.
- Moritz RFA, Neumann P, 2004. Differences in nest mate recognition for drones and workers in the honeybee *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour* 67: 681 – 688.
- Page RE, Metcalf RA, 1982. Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. *American Naturalist* 119 (2): 263 – 281.
- Page RE, Robinson GE, Fondrk MK, 1989. Genetic specialists, kin recognition and nepotism in honey-bee colonies. *Nature* 338: 576 – 579.
- Ratniks FLW, Kvesscher P, 1989. Worker policing in the honeybee. *Nature* 342: 796 – 797.
- Su SK, Chen SL, 2002. Application of RAPD and microsatellite molecular markers in the research of honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Bee* 5: 3 – 5 (In Chinese).
- Tarpy DR, Fletcher DJC, 1998. Effects of relatedness on queen competition within honeybee colonies. *Animal Behaviour* 55 (3): 537 – 543.
- Tilley CA, Oldroyd BP, 1997. Unequal subfamily proportions among honeybee queen and worker brood. *Animal Behaviour* 54 (6): 1483 – 1490.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 507.
- Wenseleers T, Ratniks FLW, 2006. Comparative analysis of worker reproduction and policing in eusocial hymenoptera supports relatedness theory. *American Naturalist* 168 (6): 163 – 179.
- Wenseleers T, 2007. Nepotism absent in insect societies-or is it? *Molecular Ecology* 16: 3063 – 3065.
- 苏松坤, 陈盛禄, 2002. RAPD 和微卫星分子标记在西方蜜蜂研究中的应用. *蜜蜂杂志* 5: 3 – 5.