



胡景华, 赵方媛, 张丽珍, 江武军, 廖春华, 颜伟玉. 甲基硬脂酸酯和 *E*- β -罗勒烯对中华蜜蜂育王质量的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (4): 973–978.

甲基硬脂酸酯和 *E*- β -罗勒烯对 中华蜜蜂育王质量的影响

胡景华^{1,2}, 赵方媛¹, 张丽珍¹, 江武军², 廖春华¹, 颜伟玉^{1*}

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045; 2. 江西省养蜂研究所, 南昌 330052)

摘要: 为研究育王过程中添加蜜蜂幼虫信息素成分甲基硬脂酸酯和 *E*- β -罗勒烯对中华蜜蜂育王质量的影响, 本试验结合免移虫育王技术, 在幼虫 60~64 h 时向王台内注入 1 μ L 配置好的信息素 (浓度梯度分别为 0%、0.1%、1.0%、10.0%), 待蜂王出房后测定蜂王个体指标及蜂王卵巢 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 基因的表达水平。与空白对照相比, 添加 10.0% 浓度的 *E*- β -罗勒烯组蜂王的初生重和单侧卵巢管数显著增加, 同时 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 基因表达水平也显著上升; 添加 1.0% 的 *E*- β -罗勒烯蜂王单侧卵巢管数量显著增加, *Vg* 和 *hex110* 基因的表达量也显著上升; 添加甲基硬脂酸酯对培育蜂王的初生重、胸部指标和卵巢相关基因表达均无显著影响, 但 1.0% 和 10.0% 的甲基硬脂酸酯使蜂王卵巢管数量显著减少。结果表明在中蜂育王过程中添加 *E*- β -罗勒烯可以在一定程度上提高蜂王的质量。

关键词: 中华蜜蜂; 甲基硬脂酸酯; *E*- β -罗勒烯; 育王质量

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 04-0973-06

Effects of methyl stearate and *E*-beta-ocimene on the reared queen quality of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

HU Jing-Hua^{1,2}, ZHAO Fang-Yuan¹, ZHANG Li-Zhen¹, JIANG Wu-Jun², LIAO Chun-Hua¹, YAN Wei-Yu^{1*} (1. Honeybee Research Institute of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Apiculture Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330052, China)

Abstract: In order to explore the effects of the components of brood pheromone, methyl stearate (MS) and *E*-beta-ocimene (e β), on the reared queen quality of *Apis cerana cerana*, 1 μ L of compound with the concentration gradients of 0%, 0.1%, 1.0% and 10.0% was added into queen cells respectively using a micro sampling syringe injector when queen larvae was 60~64 h old. Newly emerged queens were sampled and analyzed for the index of queens and the expression level of *Vg*, *hex70b* and *hex110* genes in queen ovaries. Compared with the blank control group, 10.0% treatment of e β significantly increased the newly-emerged weight and the ovarioles number in one ovary, as well as increased the expression level of *Vg*, *hex70b* and *hex110* genes significantly in queen ovaries. In 1.0% treatment of e β , the ovarioles number in one ovary and the expression of *Vg* and *hex110* of queen were all increased significantly. Adding MS has no obvious effect on the newly-emerged weight, the ovarioles number and the expression level of the genes. But in 1.0% and 10.0% treatment of MS, the number of ovarioles decreased notably. The results showed

基金项目: 国家自然科学基金 (31460641, 31660696); 江西省现代农业产业技术体系建设专项资金 (JXARS-14)

作者简介: 胡景华, 女, 硕士, 实习研究员, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: hujinghua93@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 颜伟玉, 博士, 副教授, 研究方向为蜜蜂资源开发与利用, E-mail: ywygood-0216@163.com

收稿日期 Received: 2019-06-24; 接受日期 Accepted: 2019-08-05

that $e\beta$ added in queen-rearing process can improve the queen quality to a certain extent.

Key words: *Apis cerana cerana*; methyl stearate; E - β -ocimene; quality of reared queen

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 擅于采集零星蜜源且抗胡蜂及抗蜂螨能力较强, 是我国特有的当家蜂种, 对我国养蜂业的发展以及生态系统的平衡均有着重要的作用 (王静等, 2013)。但由于西方蜜蜂的大量引入, 中蜂存在竞争劣势使得生存资源骤减, 种群的数量和分布区域均逐年下降 (余林生, 2007)。蜂王作为蜂群中唯一雌性生殖器官发育完全者, 其专职任务就是产卵, 因此蜂王品质优劣对蜂群的群势和生产性能等至关重要。优质的蜂王不仅有利于蜂群维持强群, 且在产卵性能、抗逆性以及经济效益等方面均有重要意义 (匡邦郁, 2003)。因此, 培育优质的蜂王可以显著提高蜂群的生产效益和竞争优势。

早期研究中单式移虫育王的发明实现了人工科学育王, 后期的复式移虫则更进一步的提高了王台接受率和蜂王质量 (Doolittle, 1888; 陈世壁, 1989)。Le Conte 研究发现, 在培育西方蜜蜂蜂王过程中添加幼虫信息素成分甲基硬脂酸酯 (MS) 可提高王台接受率, 添加甲基亚油酸酯 (ML) 可促进工蜂吐浆进而增加王台内王浆量, 而甲基棕榈酸酯 (MP) 的使用则可提高王台中幼虫重量 (Le Conte *et al.*, 1995)。曾云峰等在蜂王培育过程中添加信息素, 发现 0.1% MP 提高了中意蜂蜂王幼虫的重量 (曾云峰等, 2010)。邹垂彬等在中蜂育王过程中添加 MP 和 ML, 研究结果表明 MP 和 ML 并不能提高中蜂蜂王质量 (邹垂彬等, 2016)。

Gilley 等在成年蜂王头部发现 E - β -罗勒烯, 未能成功介绍到无王群的蜂王 E - β -罗勒烯含量在一周内一直处于相当低的水平 (Gilley *et al.*, 2006)。另外在西方蜜蜂蜂群中添加 E - β -罗勒烯可以显著提高蜂群对蜂王的接受率 (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2007)。在正常蜂群中由于存在蜂王信息素和幼虫信息素, 可以抑制工蜂卵巢发育, 从而防止工蜂产卵。Maisonnasse 等研究发现幼虫体表存在一种高挥发性物质 E - β -罗勒烯, 可以有效抑制工蜂卵巢的发育 (Maisonnasse *et al.*, 2009)。 E - β -罗勒烯作为一种高挥发性信息素, 很容易在整个蜂群中扩散, 对各阶段工蜂的生理及行为均会产生影响。Maisonnasse 等研究表明提高蜂群中

E - β -罗勒烯浓度工蜂的采集日龄会提早, 以增加食物储存量, 为蜂群和幼虫提供更优质和充足的营养 (Maisonnasse *et al.*, 2010)。此外, E - β -罗勒烯还可以促进工蜂王浆腺的发育, 从而影响蜂王浆的分泌 (Traynor *et al.*, 2014), 因此幼虫信息素 E - β -罗勒烯与幼虫食物息息相关。后期大量研究证实, E - β -罗勒烯是蜜蜂幼虫的饥饿信息素, 它与蜂群中食物信息相关, 可以在调控哺育蜂发育的同时调控整个蜂群的采集行为 (Maisonnasse *et al.*, 2010; Traynor *et al.*, 2014)。

为了进一步研究幼虫信息素成分甲基硬脂酸酯和 E - β -罗勒烯对中蜂育王的影响, 本研究通过在育王过程中添加甲基硬脂酸酯和 E - β -罗勒烯, 研究其对蜂王初生重、胸重、胸宽、单侧卵巢管数量以及 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 3 个基因表达量的影响, 为培育优质中蜂蜂王提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验蜂群

试验所需蜂群为中蜂, 均由江西农业大学蜜蜂研究所饲养。试验选取蜂群群势 (5 足框)、蜂群遗传性状和蜂王年龄都基本相似的 3 群蜂作为哺育蜂群。另取 1 群蜂王产卵性能良好的健康蜂群作为母本群用于产卵。育王在哺育群中进行, 每群至少育王 3 次。试验期间, 对蜂群进行奖励饲喂, 提高工蜂哺育积极性。

1.2 免移虫育王

利用中华蜜蜂免移虫育王生产器 (江西农业大学蜜蜂研究所研制) 培育蜂王, 免移虫育王的具体操作参照邹垂彬等 (2016) 的试验方法进行。同时, 在幼虫 60~64 h 时, 往王台中注入 1 μ L 不同浓度 (浓度梯度分别为 0%、0.1%、1.0%、10.0%) 的幼虫信息素酯类成分 (Sigma 试剂公司, 纯度 $\geq 99\%$) 与台内王浆液混合, 每个浓度梯度设 3 个生物学重复, 3 个技术重复。在蜂王出房前 1 d 取出育王框, 并将单个王台小心取下置于自制王笼中, 并一同放置于恒温恒湿培养箱 (BINDER) 中进行孵化 (35 $^{\circ}$ C, RH 70%), 每隔 1 h 观察蜂王出房情况。

1.3 蜂王外部指标测定

培养箱中蜂王出房后立刻用电子天平测定蜂王初生重以及胸重; 同时, 采用 CCD 观察测试系统 (江南永新光学有限公司) 测量蜂王胸宽。测定胸重、胸宽的具体试验方法参照胡景华等 (2018) 的试验方法进行测定, 记录数据。

1.4 蜂王卵巢管计数

解剖蜂王卵巢管时为了便于卵巢管的剥离, 蜂王出房后饥饿预处理 (饥饿 2~4 h), 消耗掉体内脂肪。然后, 参考许少玉等 (1984) 的试验方法对蜂王卵巢管进行解剖计数。

1.5 荧光定量 PCR 引物的设计及荧光定量 PCR

蜂王出房后在超净台中解剖出蜂王卵巢, 并

参考秦秋红的试验方法对卵巢进行 RNA 提取以及反转录合成 cDNA (秦秋红, 2013)。荧光定量 PCR 试验中, *Vg*、*hex110*、*hex70b* 基因以及内参基因 (*β-actin*) 的引物序列均沿用本人前期试验中设计的引物序列 (胡景华等, 2018) (上海生工合成, 表 1)。荧光定量 PCR 反应体系 (10 μL): 1 μL 样品 cDNA, 3.0 μL Nuclease-Free Water, 上游引物和下游引物各 0.4 μL, 5 μL SYBR GREEN II 以及 0.2 μL ROX 校正液。反应条件为 95℃ 预变性 30 s; 95℃, 10 s, 58.9℃, 1 min (40 个 PCR 循环); 扩增反应结束后从 55℃ 匀速加热 (每 6 s 升高 1℃) 至 95℃, 建立熔解曲线。每个样品均设置 3 个重复。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences used in real time quantitative PCR

基因名称 Gene names	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')
<i>Vg</i>	CGTGTTCAGAGGACGTTGA	GGACTTCGTGGCTCTCCATC
<i>hex70b</i>	GAGGACGGTAGCGAGTCCTT	ATGTTGCGGCCCAATACAGG
<i>hex110</i>	CCTGTCGTCCGTTATGCAAG	GCGCCTTGGACTTGAGAGTT
<i>β-actin</i>	GGCTCCCGAAGAACATCC	TGCGAAACACCGTCACCC

1.6 数据统计与分析

Vg、*hex110* 和 *hex70b* 基因的表达量参考 Livak 等建立的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 模型进行计算 (Livak, 2001)。利用 StatView 软件对试验数据进行统计分析, 计算蜂王个体外部指标以及卵巢管数的均值和标准差。

2 结果与分析

2.1 甲基硬脂酸酯对中蜂蜂王质量的影响

2.1.1 甲基硬脂酸酯对蜂王个体指标的影响

在育王过程中添加不同浓度的甲基硬脂酸酯进行处理, 结果表明, 0.1%、1.0% 和 10% 浓度的试验组蜂王初生重和胸部指标均无显著差异 ($P>0.05$); 但 1.0% 和 10.0% 的试验组, 蜂王卵巢管数明显下降 ($P<0.05$) (表 2)。

2.1.2 甲基硬脂酸酯对蜂王卵巢 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 表达量的影响

在育王过程中添加不同浓度的甲基硬脂酸酯对蜂王卵巢 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 基因表达均无显著影响 ($P>0.05$) (图 1)。

表 2 甲基硬脂酸对蜂王个体指标的影响
Table 2 Effects of MS on the index of queens

MS 浓度 (%) MS concentration	初生重 (mg) Newly-emerged weight	胸部指标 Thorax index		单侧卵巢管数 (条) One side ovarioles number
		胸宽 (mm) Thorax width	胸重 (mg) Thorax weight	
0	179.67 ± 2.13 a	4.69 ± 0.02 a	55.38 ± 1.00 a	93.11 ± 0.79 a
0.1	180.01 ± 1.64 a	4.64 ± 0.03 a	53.67 ± 0.78 a	92.89 ± 0.72 a
1.0	183.21 ± 1.71 a	4.54 ± 0.02 a	53.33 ± 0.71 a	90.67 ± 0.76 b
10.0	182.54 ± 2.32 a	4.56 ± 0.02 a	53.31 ± 1.07 a	90.56 ± 0.65 b

注: 同列数据标注不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。表 3 和表 4 同。Note: In the same rank, values with different letters mean significant difference ($P<0.05$). The same for table 3 and table 4.

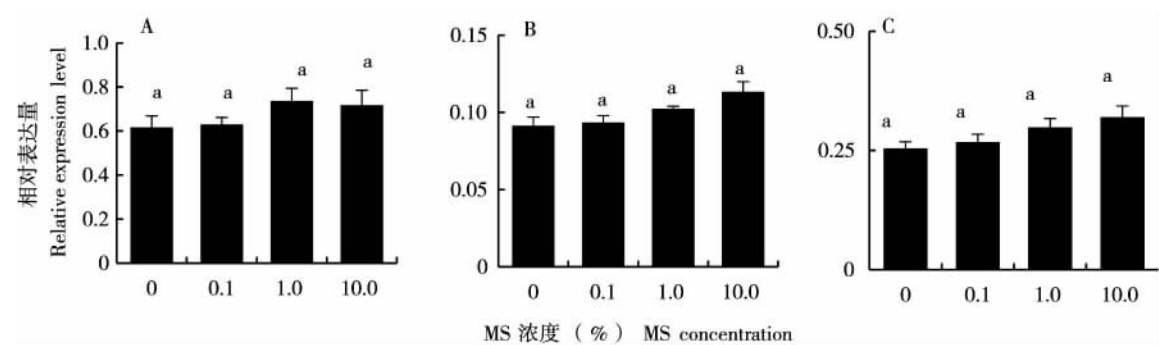


图1 MS对蜂王卵巢 *Vg* (A)、*hex70b* (B) 和 *hex110* (C) 表达量的影响

Fig.1 Effect of MS on the expression level of *Vg* (A), *hex70b* (B) and *hex110* (C) in queen's ovary

注: 图中数据为平均数±标准差; 柱上不同小写字母表示差异显著 (*t* 检验, $P < 0.05$)。下同。Note: Data are mean±SD, and different lowercases above bars indicate significant difference (*t*-test, $P < 0.05$). The same below.

2.2 *E*-β-罗勒烯对中蜂蜂王质量的影响

2.2.1 *E*-β-罗勒烯对蜂王个体指标的影响

在育王过程中添加 *E*-β-罗勒烯的结果表明, 3 个浓度处理组对中蜂蜂王的胸部指标均无显著差异 ($P > 0.05$); 但添加 10% 浓度的 *E*-β-罗勒烯, 蜂王初生重显著增加 ($P < 0.05$); 同时, 1% 和 10% 浓度 *E*-β-罗勒烯处理可以显著增加蜂王单侧卵巢管数 ($P < 0.05$) (表 3)。

2.2.2 *E*-β-罗勒烯对蜂王卵巢 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 表达量的影响

10.0% 浓度的 *E*-β-罗勒烯处理组, 蜂王卵巢的 *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 基因表达量均显著增加 ($P < 0.05$); 在 1.0% 浓度处理组, 只有 *Vg* 和 *hex110* 两个基因的表达量显著增加 ($P < 0.05$); 而 0.1% 浓度处理组, *Vg*、*hex70b* 和 *hex110* 基因表达量与对照组比较均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

表 3 *E*-β-罗勒烯对蜂王个体指标的影响

Table 3 Effects of *E*-beta-ocimene on the index of queens

eβ 浓度 (%) eβ concentration	初生重 (mg) Newly-emerged weight	胸部指标 Thorax index		单侧卵巢管数 (条) One side ovarioles number
		胸宽 (mm) Thorax width	胸重 (mg) Thorax weight	
0	173.95 ± 1.28 b	4.56 ± 0.12 a	52.57 ± 0.47 a	90.43 ± 0.56 b
0.1	174.26 ± 1.43 b	4.61 ± 0.06 a	53.31 ± 0.51 a	91.76 ± 0.73 b
1.0	174.62 ± 1.57 b	4.57 ± 0.07 a	54.02 ± 0.45 a	93.51 ± 0.69 a
10.0	181.36 ± 1.48 a	4.62 ± 0.04 a	53.21 ± 0.49 a	94.78 ± 0.87 a

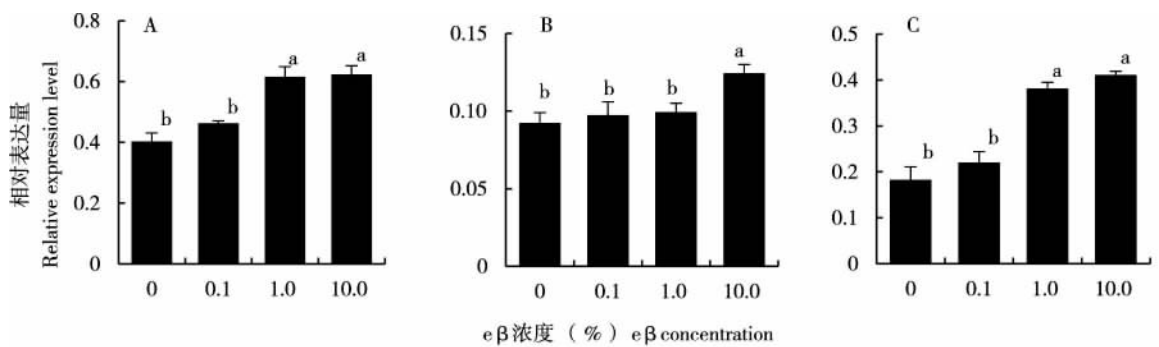


图2 *E*-β-罗勒烯对蜂王卵巢 *Vg* (A)、*hex70b* (B) 和 *hex110* (C) 表达量的影响

Fig.2 Effect of *E*-beta-ocimene on the expression level of *Vg* (A), *hex70b* (B) and *hex110* (C) in queen's ovary

3 讨论与结论

卵黄原蛋白基因 (Vg) 的高表达可以促进蜂王卵巢的发育, 并延长蜂王寿命 (Engels, 1974; Amdam *et al.*, 2005; 张卫星等, 2014)。蜂王体内 Vg 表达量与保幼激素 (JHIII) 以及昆虫储存蛋白基因 (*hexamerin*, *hex*) 的表达相关 (Corona *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010)。JHIII 又与蜜蜂的发育以及极型分化相关, 而 *hex* 为昆虫从幼虫到蛹的变态发育提供物质基础和保障 (Burmester & Scheller, 1999; Barchuk *et al.*, 2007)。研究发现蜂王幼虫体内 JHIII 的含量与 *hex70b* 和 *hex110* 的表达量呈正相关 (庞倩等, 2017a; 庞倩等, 2017b), 而 *hex70b* 以及 *hex110* 的表达水平与昆虫的性别决定、寿命、免疫力以及繁殖力等生物学功能相关 (Bitondi, 2006; Martins *et al.*, 2008; Cristino *et al.*, 2010)。由此可推测 Vg 、*hex70b* 和 *hex110* 基因的表达与蜂王体内 JHIII 水平相关并参与调控蜂王的卵巢发育, 与蜂王的质量相关。

蜂王幼虫的良好发育离开工蜂的积极哺育。早期研究发现甲基硬脂酸酯作为幼虫信息素之一, 参与调节工蜂对幼虫的哺育行为, 西方蜜蜂育王过程中添加甲基硬脂酸酯会促进工蜂积极哺育, 提高蜡质王台接受率 (Le Conte *et al.*, 1995)。那么在中蜂育王过程中添加甲基硬脂酸酯是否也能促进工蜂积极哺育, 使蜂王幼虫发育过程中得到更多的营养物质, 从而提高中蜂蜂王的质量? 本研究利用中华蜜蜂免移虫育王生产器, 在育王过程中添加不同浓度的甲基硬脂酸酯, 发现蜂王初生重、胸重和胸宽等个体指标均无显著差异, 1% 和 10% 浓度处理组的单侧卵巢管数显著减少, Vg 、*hex70b* 和 *hex110* 基因表达量也无显著差异。由此可见, 甲基硬脂酸酯并未能显著提高中蜂蜂王质量, 这或许是由于中蜂对甲基硬脂酸酯的反应与意蜂有所差异, 相关机理还有待于进一步深入研究。

已有研究表明 E - β -罗勒烯作为饥饿信息素的一种成分可以促进工蜂吐浆 (何旭江等, 2016), 而蜂王浆是蜂王及 3 日龄以内幼虫的主要食物, 因此蜂群中 E - β -罗勒烯浓度与蜂群食物或营养是否充足有关。本研究结果表明, 中蜂育王过程中添加 10% 浓度 E - β -罗勒烯可以显著增加了蜂王初生重和单侧卵巢管数, 而且 Vg 、*hex70b* 和 *hex110*

基因表达量也显著升高; 添加 1% 浓度的 E - β -罗勒烯可以显著增加蜂王单侧卵巢管数以及 Vg 、*hex110* 两个基因的表达量。由此可见, 添加一定浓度 E - β -罗勒烯可以提高蜂王的生殖潜能, 这可能是由于 E - β -罗勒烯的添加促进了哺育蜂的积极性, 对王台中的幼虫饲喂更为频繁, 使幼虫得到更多新鲜的食物, 从而培育出更优质的蜂王。在后续的研究中, 可在育王过程中添加 E - β -罗勒烯, 进一步观察蜜蜂的哺育行为, 并研究王台中王浆量的变化。

因此, 在中蜂育王过程中添加 E - β -罗勒烯可以在一定程度上提高蜂王的质量, 但在实际生产中的经济效益 (产浆量、产蜜量)、抗逆性、日产卵量以及维持蜂群群势的能力等均有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Amdam GV, Aase AL, Seehuus SC, *et al.* Social reversal of immunosenescence in honey bee workers [J]. *Experimental Gerontology*, 2005, 40 (12): 939–947.
- Burmester T, Scheller K. Ligands and receptors: Common theme in insect storage protein transport [J]. *Naturwissenschaften*, 1999, 86 (10): 468–474.
- Bitondi MM, Nascimento AM, Cunha AD, *et al.* Characterization and expression of the *hex110* gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2006, 63 (2): 57–72.
- Barchuk A, Cristino A, Kucharski R, *et al.* Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera* [J]. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7 (1): 70.
- Cristino AS, Nunes FMF, Barchuk A, *et al.* Organization, evolution and transcriptional profile of *hexamerin* genes of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19 (Supplement s1): 137–146.
- Corona M, Velarde RA, Remolina S, *et al.* Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling, and queen honey bee longevity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104 (17): 7128–7133.
- Chen SB. Artificial Queen Rearing [M]. Beijing: Agriculture Press, 1989: 7. [陈世壁. 人工育王 [M]. 北京: 农业出版社, 1989: 7]
- Doolittle GM. Scientific Queen Rearing [M]. USA: American Bee Journal, 1888.
- Degrandi-Hoffman G, Gilley D, Hooper J. The influence of season and volatile compounds on the acceptance of introduced European honey bee (*Apis mellifera*) queens into European and Africanized colonies [J]. *Apidologie*, 2007, 38 (3): 230–237.
- Engels W. Occurrence and significance of *Vitellogenins* in female castes of social Hymenoptera [J]. *American Zoologist*, 1974, 14 (4):

- 1229 – 1237.
- Gilley DC, Degrandihoffman G, Hooper JE. Volatile compounds emitted by live European honey bee (*Apis mellifera* L.) queens [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52 (5): 520 – 527.
- He XJ, Jiang WJ, Yan WY, *et al.* Identification and biosynthetic pathway of a hunger pheromone in honeybee queen and drone larvae [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 (23): 4646 – 4655. [何旭江, 江武军, 颜伟玉, 等. 蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素鉴定及其生物合成通路 [J]. 中国农业科学, 2016, 49 (23): 4646 – 4655]
- Hu JH, Zhang LZ, Liao CH, *et al.* Effects of mixtures of brood pheromone esters on the reared queen quality of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61 (3): 40 – 47. [胡景华, 张丽珍, 廖春华, 等. 幼虫信息素酯类混合物对中华蜜蜂王质量的影响 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (3): 40 – 47]
- Kuan BY. Biology of Bee [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Publishing Press, 2003. [匡邦郁. 蜜蜂生物学 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003]
- Le Conte Y, Sreng L, Poitout SH. Brood pheromone can modulate the feeding behavior of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1995, 88 (4): 798 – 804.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} (T) Method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 – 408.
- Martins JR, Nunes FMF, Simões ZLP, *et al.* A honeybee storage protein gene, *hex70a*, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54 (5): 867.
- Maisonnasse A, Lenoir J, Costagliola G, *et al.* A scientific note on *E*-β-ocimene, a new volatile primer pheromone that inhibits worker ovary development in honey bees [J]. *Apidologie*, 2009, 40 (5): 562 – 564.
- Maisonnasse A, Lenoir JC, Beslay D, *et al.* *E*-β-ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*) [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (10): e13531.
- Martins JR, Nunes FM, Cristino AS, *et al.* The four *hexamerin* genes in the honey bee: Structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones [J]. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11 (1): 23.
- Pang Q, Shen F, Wang K, *et al.* Proteomic analysis of ovaries of queen bees (*Apis mellifera*) developed from larvae grafted at different instars [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017a, 60 (7): 760 – 771. [庞倩, 沈芳, 王康, 等. 不同龄期移虫发育的蜂王卵巢蛋白质组学分析 [J]. 昆虫学报, 2017a, 60 (7): 760 – 771]
- Pang Q, Shen F, Yin L, Ji T, *et al.* Study on the effect of instar of the grafted larvae on the queen growth and development [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017b, 39 (1): 93 – 97. [庞倩, 沈芳, 殷玲, 等. 移虫日龄对蜂王生长发育的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2017b, 39 (1): 93 – 97]
- Qin QH. Comparison of Learning and Memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera* and Analysis of Related Molecular Mechanism of Learning and Memory in Honeybee [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University Master Thesis, 2013. [秦秋红. 东方蜜蜂与西方蜜蜂学习记忆比较及蜜蜂学习记忆相关分子机理分析 [D]. 南昌: 江西农业大学硕士论文, 2013]
- Traynor KS, Le Conte Y, Page RJ. Queen and young larval pheromones impact nursing and reproductive physiology of honey bee workers [J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2014, 68 (12): 2059 – 2073.
- Wang J, Gao FC, Yu WQ, *et al.* Study on reproductive potential of queens under different rearing conditions [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2013, 28 (3): 442 – 445. [王静, 高夫超, 于文全, 等. 不同培育条件对蜜蜂蜂王生殖潜能的影响研究 [J]. 云南农业大学学报, 2013, 28 (3): 442 – 445]
- Xu SY, Xiao HL, Li GX. Dissection and simple counting method of queen ovariole [J]. *Apiculture of China*, 1984, 4: 18 – 19. [许少玉, 肖洪良, 李桂仙. 蜂王卵巢管的解剖和简便计数法 [J]. 中国养蜂, 1984, 4: 18 – 19]
- Yu LS. Study on Population Dynamics and Colony Diversity of *Apis cerana cerana* in Southern Anhui [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2007. [余林生. 皖南中华蜜蜂种群数量动态及群体多样性研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007]
- Zeng YF, Zeng ZJ, Yan WY, *et al.* Effects of three aliphatic esters of brood pheromone on worker feeding and capping behavior and queen development of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53 (2): 154 – 159. [曾云峰, 曾志将, 颜伟玉, 等. 幼虫信息素中三种酯类对中华蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂哺育和封盖行为以及蜂王发育影响 [J]. 昆虫学报, 2010, 53 (2): 154 – 159]
- Zhang WX, Xu BH. Overview of *Vitellogenin* of honey bee [J]. *Journal of Bee*, 2014, 34 (5): 5 – 7. [张卫星, 胥保华. 蜜蜂卵黄原蛋白的研究进展 [J]. 蜜蜂杂志, 2014, 34 (5): 5 – 7]
- Zou CB, Zhou LB, Hu JH, *et al.* Effects of queen-rearing without larvae-grafting and two esters of brood pheromone on the queen quality of *Apis cerana cerana* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 (18): 3662 – 3670. [邹垂彬, 周林斌, 胡景华, 等. 免移虫育王和两种酯类幼虫信息素对中华蜜蜂蜂王质量的影响 [J]. 中国农业科学, 2016, 49 (18): 3662 – 3670]