



刘振国, 宋红玉, 郝学鹏, 姚玉凤, 胥保华. 蜂王受精囊维持精子可育性的生理基础研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1136–1142.

蜂王受精囊维持精子可育性的生理基础研究进展

刘振国, 宋红玉, 郝学鹏, 姚玉凤, 胥保华*

(山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

摘要: 蜜蜂是社会性群居昆虫, 蜂群中通常只有 1 头生殖系统发育健全、具有繁殖能力的雌性个体——蜂王, 保持蜂王旺盛的产卵力是蜂群繁衍和发展的重要保障。受精囊是蜂王交配后存储精子的结构, 它可以维持精子可育性长达数年之久, 其生理结构和功能值得深入探讨。本文综述了近年来蜜蜂受精囊结构与生殖生理、精子活力的影响因素和蜂王受精囊微环境的生理功能等领域的研究进展, 旨在为蜜蜂种质资源评价、保护和利用以及害虫防治策略提供指导。

关键词: 蜜蜂; 受精囊; 精子; 抗氧化; 活性氧

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1136-07

Research advances in the physiological basis of spermatheca of honeybee queen on stored sperm viability

LIU Zhen-Guo, SONG Hong-Yu, CHI Xue-Peng, YAO Yu-Feng, XU Bao-Hua* (College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

Abstract: In a eusocial bee colony with a single queen, the only fertile female one who lays fertilized and unfertilized egg to breed population. A fertile queen is necessarily linked to colony fitness. The mature virgin queen only mates during a very brief period to acquire and store a lifetime supply of sperm. As sperm cannot be replenished, the polyandrous queen must keep the stored sperm viable in the spermatheca for several years. However, certain aspects of the physiological roles remain largely unclear and further studies are required to address it. This article reviewed the accumulated evidences of morphology, reproductive physiology, sperm motility factors and micro environment of spermatheca support on the sperm long term storage, to provide the systematic understanding of honeybee resources evaluation, protection and utilization, as well as the pest control strategies.

Key words: Honey bee; spermatheca; sperm; antioxidant; ROS

昆虫种类繁多、形态各异, 是地球上数量最多的动物群体, 而受精囊的出现在昆虫进化中是“质的飞跃”。受精囊是由雌性昆虫外胚层发育而来, 不同昆虫的受精囊在数量、形态和结构方面存在明显差异 (Pascini and Martins, 2017)。已有

研究报道表明, 受精囊及其附属腺体结构已在直翅目中国宽翅曲背蝗 *Pararcyptera microptera meridionalis* (Ke *et al.*, 2016)、半翅目地长蝽科 Rhyparochromidae (王俊茹, 2016)、鳞翅目螟蛾科香梨优斑螟 *Euzophera pyriella* Yang (阿依古丽·买

基金项目: 国家自然科学基金 (31802144); 山东省自然科学基金 (ZR2019PC005); 山东省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (201910434021)

作者简介: 刘振国, 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为蜜蜂营养生理与生物学, E-mail: zgliu@sda.u.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 胥保华, 博士, 教授, 主要研究方向为蜜蜂营养生理与生物学, E-mail: bhxu@sda.u.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-06-26; 接受日期 Accepted: 2020-08-04

买提等, 2019), 双翅目蠓科 Ceratopogonidae (蒋晓红等, 2018)、大蚊科 Tipulidae (赵晴等, 2019)、果蝇科 Drosophilidae (Mayhew and Merritt, 2013), 网翅目白蚁科 Termitidae (Khan, 2019), 膜翅目蚁科 Formicidae (Wheeler and Kruttsch, 1994)、金小蜂科 Pteromalidae (刘霞和吴伟坚, 2018)、蜜蜂科 Apidae (吴黎明等, 2007) 等多种昆虫中发现, 在维持精子可育性方面发挥作用 (何建平和奚耕思, 2003)。

蜜蜂是重要的传粉昆虫, 被誉为“农业之翼”。意大利蜂 *Apis mellifera ligustica* 在全世界范围内分布广泛, 其蜂王每年约产 20 万个受精卵, 并且能够保持这样的产卵力达 2~4 年, 因此需要大量的精子参与受精 (Winston, 1991)。健康的蜂王是维持蜂群群势的基础 (Pettis *et al.*, 2016), 而受精囊内精子的可育性是蜂群发展的重要保障。通常情况下, 蜂王产卵后不再婚飞交尾, 蜂王长达数年的受精卵生产过程中, 所需的精子均源于受精囊, 而蜂王产卵力下降则会导致蜂群分蜂或者新老更替, 因此, 受精囊是蜂王维系产卵功能和群内地位的重要器官。在存储过程中, 受精囊及附属腺体分泌物可保持精子在相当长时间内保持可育性, 贮存时间远高于雄蜂的寿命 (Stürup

et al., 2013)。这种特殊的器官构造对蜂王有很大的帮助。其作用可归纳为: (1) 减少天敌在蜜蜂婚飞中对蜂王的威胁和婚飞的耗能。正常情况下, 蜂王在一次婚飞中可与 12 头左右的雄蜂依次交尾 (Simone-Finstrom and Tarpy, 2018), 可获得足够的精子, 专心产卵, 不必反复寻偶、交尾, 而增加暴露在天敌前的风险, 耗费时间和精力。(2) 蜂王“多雄授精”机制可有效防止近交衰退。(3) 蜂王对后代性别比例的控制与受精囊密不可分。有研究发现, 受精囊开口的肌肉受大脑控制, 蜂王可以根据季节、蜂群状况和巢房大小对其腹部的反馈来决定产受精卵 (雌性、二倍体) 还是未受精卵 (雄性、单倍体)。

1 蜂王受精囊结构与蜜蜂生殖生理

1.1 蜂王受精囊结构

蜜蜂受精囊呈球形结构, 直径约为 1.1 mm, 由 1 层上皮细胞组成的隔膜组成, 内部低氧环境 (Paynter, 2015); 表面粗糙, 外围包裹着密集的气管网。受精囊内腔中充满了透明的液体, 与 1 对管状腺体相连 (吴黎明等, 2008), 其结构详见图 1。

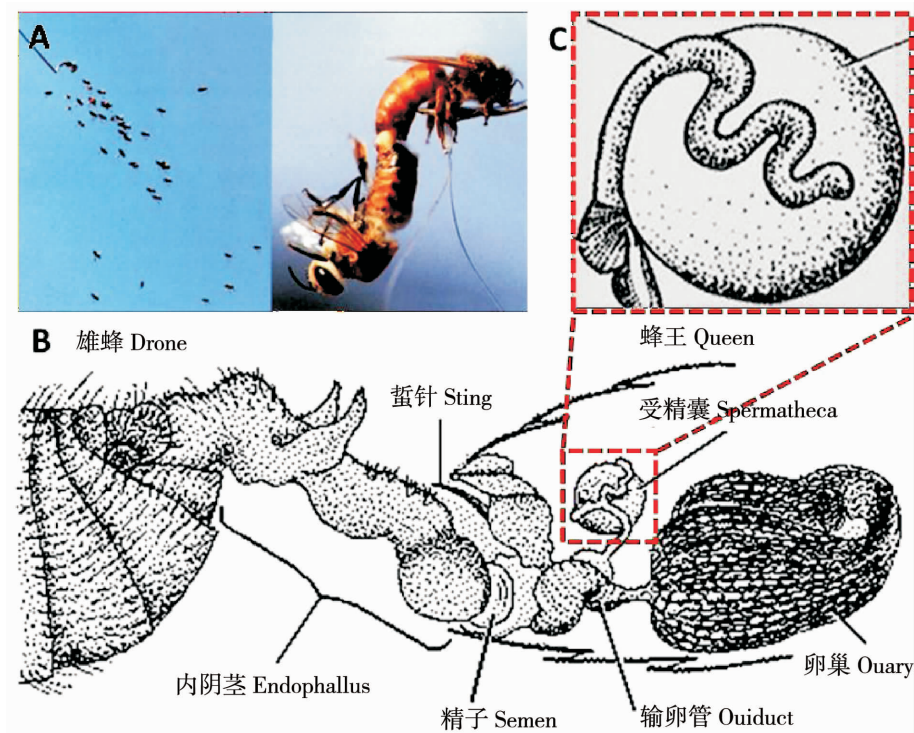


图 1 蜜蜂婚飞 (A)、蜂王与雄蜂交配结构 (B) 及受精囊形态示意图 (C) (改编 Koning, 1994)

Fig. 1 Honey bee mating fly (A), the mating structure of the queen bee and the drone (B) and the queen's spermatheca (C) (Adapted from Koning, 1994)

1.2 蜜蜂生殖生理

蜂群通常由 1 头产卵蜂王、上万头雌性工蜂和几百头季节性出现的雄蜂组成 (Rangel *et al.*, 2019)。蜜蜂最重要的生殖特征是一雌多雄交配, 并且蜂王产卵后, 终生不再交配。蜂王交配后将数百万个精子贮存于受精囊中长达数年之久, 并仍能保持活力, 贮存时间远高于雄蜂的寿命。

蜜蜂性别受到染色体倍数控制 (Haplodiploid sex determination system) (Charlesworth, 2004), 其生殖方式包括孤雌产雄 (Arrhenotokous parthenogenesis) (Heimpel and de Boer, 2008) 和卵式生殖两者, 其中雄蜂是由未受精卵发育而来, 它的遗传信息代表了母群的性状。传统蜜蜂饲养观点认为, 雄蜂不采蜜, 除了和蜂王交尾以外, 基本不参与巢内劳作 (Galizia *et al.*, 2012), 但也有研究发现雄蜂具有刺激工蜂出巢采集行为作用 (曾志将, 2020)。养蜂生产中, 雄蜂对食料的消耗量大, 还会引起分蜂热, 对生产不利。因此, 从经济学的角度来看, 培育种用雄蜂的成本较高。蜂群培育雄蜂具有较强的季节性特征, 在蜜粉充足的分蜂季节, 强群会培育数量较多的雄蜂, 其寿命在繁殖季节约 40 d, 特殊情况下, 越冬雄蜂的寿命也只有 8 个月左右 (葛凤晨和薛运波, 2002), 这给蜜蜂育种、保种等方面带来了很大的困难。

交尾后精子在蜂王体贮存内过程在前人研究中有详细描述 (吴黎明等, 2008)。进入受精囊后的精子处于静止还是运动状态? Tofilski 等利用荧光染色技术研究了蜜蜂受精囊中精子的运动性, 发现在授精后的前 8 h 精子处于静止状态, 随后在受精囊壁附近呈现圆周运动 (Tofilski *et al.*, 2018)。大阪举腹蚁 *C. osakensis* 的精子包裹在精囊中, 在交配时转移至交配囊的过程中, 精子的活动性受到限制, 能有效的阻止氧化呼吸作用产生活性氧 (ROS) 带来的损失 (Gotoh and Furukawa, 2018)。精子进入受精囊后贮存起来, 直到给卵子进行授精 (Haberl and Tautz, 1998)。在受精过程中也体现出蜜蜂对于精子的高效利用率 (Hunter and Birkhead, 2002)。

2 精子活力影响因素

精子活力是评价精液品质和推测蜂王产卵性能的重要指标, 可以参考 Rzymski 等的测定方法

(Rzymski *et al.*, 2012)。具体方法是通过流式细胞仪对蜜蜂储精囊中的精子进行活性检测, 通过 SYBR-14、碘化丙啶 (Propidium iodide) 染色, 分别在绿色 (FL-1) 和红色 (FL-3) 荧光通道, 通过对比密度点图区分有活性和死亡的精子细胞, 并计算存活率, 有效地测定蜜蜂精子的质量。

2.1 温度

研究发现, 酷热能损害昆虫精子活力, 而且这种损伤能够跨代遗传 (Sales *et al.*, 2018)。Bienkowska 发现置于 40℃ 高温或 9 ~ 10℃ 低温环境的雄蜂鲜精液中死精子比例高达 40%, 因此高温和低温均会影响精液品质, 通过人工授精发现受精囊内的死亡精子比例分别为 17% (9 ~ 10℃ 低温环境) 和 21% (40℃ 高温环境) (Bienkowska *et al.*, 2011)。McAfee 研究发现, 蜜蜂通过激活受精囊内 ATP 依赖的 HSP 消除热应激 (McAfee *et al.*, 2020)。

2.2 杀虫剂

有机磷类、新烟碱类杀虫剂广泛使用给蜜蜂健康带来严重威胁。Chaimanee 等研究结果表明, 亚致死剂量 (0.02 ppm) 吡虫啉处理 7 d 后雄蜂精子存活率降至 50%, 而高剂量 (100 ppm) 的蝇毒磷胁迫下, 蜂王受精囊内精子存活率下降 33% (Chaimanee *et al.*, 2016)。Gajger 发现噻虫嗪处理后的蜂王受精囊内精子数量下降 20% (Gajger *et al.*, 2017)。因此, 杀虫剂胁迫会减低蜜蜂繁殖力 (Kairo *et al.*, 2016)。在发育过程中受到新烟碱类杀虫剂 (噻虫嗪和噻虫胺) 胁迫会影响与蜂王交尾的雄蜂数量, 从而降低了遗传多样性 (Forfert *et al.*, 2017)。受精囊内精子活力在杀虫剂作用下有所降低, 因此可以作为害虫防治的潜在靶点。

2.3 季节因素

Tarpy 等 (2012) 研究发现, 新产卵蜂王存储的精子活力最高。随后通过对蜂王受精囊内精子活力的检测发现, 5 月份的活力最高, 达到 90.3%, 随后的 5 个月份逐月降低, 到 10 月份时降为 81.3% (Tarpy and Olivarez, 2014)。这可能与蜜蜂的营养水平受季节因素的影响 (崔学沛等, 2014)。另外, 在分蜂季节, 蜂群会培育大量的雄蜂参与交尾, 体格健壮的雄蜂有更大的机会通过与处女王交尾将自己的遗传物质保留下来, 花粉等饲料为雄蜂发育提供必要的营养, 也影响精液量、精子活力、精子数量 (Rangel and Fisher, 2019)。

2.4 pH 和离子环境

蜂王受精囊中 pH 值高达 8.6 (Paynter *et al.*, 2017), 并有大量 Zn^{2+} 存在 (Weirich *et al.*, 2002)。精子细胞膜上的精子特异性钙通道 CATsper 调节 Ca 内流使精子超活化 (Quill *et al.*, 2001), 从而影响精子运动活性、顶体反应及受精能力 (Ren *et al.*, 2001)。研究发现, Zn 通过信号转导调节精子运动性; 精子细胞内 Zn 浓度受 ZIPT-7.1 调节, 后者将胞 Zn 内释放到细胞质中, 激发信号转导通路使精子获能 (Chu, 2018)。硒在消除 ROS 损伤、维持细胞膜完整性方面发挥重要作用, 额外添加硒 (2 $\mu\text{g/mL}$) 能显著提高精细胞运动性、活性和线粒体膜电位 (Ghafari-zadeh *et al.*, 2017)。精子与透明带结合是受精过程的关键步骤, 为了揭示微量元素在这一过程的作用, Anchordoquy 研究发现, 在体外受精培养基中加入铜 (0.4 $\mu\text{g/mL}$ Cu)、锰 (5 ng/mL Mn)、硒 (100 ng/mL Se)、锌 (0.8 $\mu\text{g/mL}$ Zn) 和上述混合物 (Cu + Mn + Se + Zn), 与不添加微量元素的对照组相比, Cu、Se 和 Zn 单一添加处理组的精子-透明带结合数量明显增多, 添加 Zn 1 h 处理组顶体完整率显著上升, 添加 Cu 或 Cu + Mn + Se + Zn 处理组的脂质过氧化反应显著上升; 添加上述微量元素使精子总抗氧化能力下降 (Anchordoquy *et al.*, 2019)。

3 蜂王受精囊微环境的生理功能

雄蜂精液和受精囊内容物共同构成了交尾蜂王受精囊的微环境。Baer 等鉴定了蜜蜂精液中 57 个表达丰度最高的蛋白质, 包括酶、调控因子和结构蛋白, 起到维持精子活力、抗菌等功能; 尽管几种主要的糖蛋白在精液中被鉴定到, 但精子中没有检测到任何糖蛋白成分; 与果蝇 (包括附性腺蛋白) 和人类精液蛋白质相比, 在蜜蜂精液中新发现了一些蛋白, 并且与人类的更为接近, 为开展昆虫精液比较蛋白质组学研究提供可靠数据 (Baer *et al.*, 2009)。Zareie 等 (2013) 对蜜蜂精子蛋白质组学研究发现, 所鉴定出 336 个蛋白, 与人、果蝇共有的蛋白 116 个, 大多数与酶的调控或核酸结合和处理有关。Baer 等从意蜂受精囊液中鉴定出 100 余种蛋白质, 其凝胶图谱与受精囊腺分泌物相似, 推断受精囊腺分泌物是受精囊液中蛋白质的主要来源, 并以能量代谢和抗

氧化相关酶最为富集 (Baer *et al.*, 2009)。

3.1 免疫识别与抗菌活性

雄性昆虫的精液在多雄交配时可以保护和提高自身精子的生存率。雄性蜜蜂或南美切叶蚁的精液可以在 15 min 内杀死对手 50% 的精子; 而蜂王和南美切叶蚁后同时也会选择合适的时机分泌出一种液体, 保护最强壮的精子不受伤害。表明精液中具有识别“自身”和“非自身”的成分 (den Boer *et al.*, 2010)。从蜂王的角度分析, 交尾后获得的精子属于“非自身”的成分, 那蜂王如何能够使得非自身细胞在其体内长期储存并保持活力, 是值得深入探讨的科学问题。

Pearcy 在蚂蚁 *C. savignyi* 中发现: 多雄交配中来自同一父本的精子形成精子束 (平均 73 个精子形成一束), 比单雄交配的单个精子游行的速度平均快上两倍, 以尽快在受精囊中占据一席之地, 对其在受精囊中长期存储并保存实力具有非常大的帮助 (Pearcy *et al.*, 2014)。但在蚁后的受精囊中未发现任何精子束, 推测精子束在到达目的地之后散开了。Chapman 等通过对果蝇精液贮存机制的研究发现, 来自雄性果蝇附性腺分泌的 Acp36DE 蛋白在精子转运到受精囊的过程中发挥着重要作用, 另一种蛋白酶抑制剂 Acp62F 蛋白是维持精子长期保存的“精液防腐剂” (Chapman, 2001)。

蜜蜂、蚂蚁等膜翅目昆虫婚飞交配的特性 (过程中) 使精子易受到细菌侵染, 导致可育性降低, 因此受精囊抗菌能力是其长期维持精子可育性的关键。研究表明, 蚂蚁的附睾和受精囊内容物抗菌活性截然不同, 前者能促进细菌生长, 而后者对细菌生长有强烈的抑制能力, 蜂王的免疫系统在交尾过程中增强, 但在交尾后抑菌能力显著下降, 由此推测, 蜂王交尾时免疫系统快速应答有助于将接纳的精子进行无菌化处理 (Dávila *et al.*, 2018)。

3.2 能量代谢与抗氧化作用

受精囊内环境氧含量低, 存储精子主要以糖酵解方式进行能量代谢 (Paynter, 2015)。研究发现精液中有精氨酸、赖氨酸和谷氨酸 3 种重要的氨基酸组分, 有利于精子的体外存活和长期保存。

Paynter 等 (2017) 测定了蜜蜂精子能量代谢, 发现磷酸甘油醛 (GA3P) 是精子存活的关键底物和能量代谢产物。虽然精子在受精囊内存储依赖于无氧能量代谢, 但作者也发现了少量氧气的存在; 相比新获得的精子, 存储精子中磷酸甘油醛

脱氢酶 (GAPDH) 显著上调表达, 在获取糖酵解中 ATP 产生过程中也避免了活性氧 (ROS) 所致的氧化损伤。作者认为, 精子在进入受精囊前进行有氧代谢, 从而可以尽快的进入受精囊, 而在受精囊中存储过程时转而进行无氧代谢, 以避免氧化损伤, 这种能量代谢策略的转变能最大程度地增加自身竞争优势和降低损伤, 糖酵解酶 (Glycolytic enzyme)、三磷酸肌醇异构酶 (Trisphosphate isomerase) 参与其中; 研究发现高浓度 K^+ 、高 pH 能降低受精囊内储存精子的代谢率 (Klenk *et al.*, 2004)。

先前有报道称精子在受精囊内转录沉默, 其自身的功能受到限制, 依赖于受精囊的能量供应和气体交换, 以维持自身活性需要。由此可见, 蜂王为精子存活提供了重要的保障 (Baer *et al.*, 2009)。精子在受精囊内储存时仍然会进行呼吸作用, 抗氧化酶系在降低 ROS 损失中发挥作用。除此之外, 抗氧化酶在受精囊长期维持精子活性方面发挥关键作用。Weirich 等发现交尾蜂王的受精囊比处女王的受精囊具有更高的过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽 s -转移酶 (GST) 活性 (Weirich *et al.*, 2002), 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性在组织间差异不显著, 该结果在转录水平上也得到了验证。Gotoh 等 (2017) 通过对蚁后受精囊转录组学研究发现与抗氧化酶、蛋白酶相关基因, 通过比较交尾 1 周和 1 年的受精囊, 发现前者抗氧化相关基因表达量高于后者。

酚氧化酶原 (prophenoloxidase, proPO) 系统是昆虫天然免疫的主要组成部分, 通过产生酚氧化酶 (Phenoloxidase, PO) 清除异质物, 对于受精囊存储精子带来极大挑战。Dávila 等在蚂蚁除受精囊以外的组织中检测到 PO 的存在, 推测受精囊的进化适应性为储存精子提供了有利条件 (Dávila *et al.*, 2015)。Collins 等 (2004) 测定了蜜蜂生殖系统中过氧化氢酶 (Catalase)、谷胱甘肽转移酶 (Glutathione-S-transferase, GST) 和超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD1), 结果表明, 过氧化氢酶和 GST 的基因表达量在产卵蜂王受精囊中比处女王高 10 ~ 20 倍, SOD1 表达量在两者中都高表达; 雄蜂生殖系统和体组织中三者都高表达, 并且性成熟雄蜂比青年雄蜂表达量升高, 尽管并不局限于生殖系统, 在成熟的雄蜂精液中能检测到抗氧化酶 mRNA, 表明抗氧化酶在生殖生理过程中发挥抗氧化保护作用。

4 总结与展望

蜂王受精囊维持精子活力和繁殖性能方面取得了显著的研究进展, 也展示出广阔的应用前景。通过对蜂王受精囊构造、微环境 (包括 pH、离子、抗氧化酶等)、能量代谢系统、免疫系统等生理过程的研究, 论述受精囊维持精子可育性的生理基础, 有助于研发精子保护剂和激活剂, 开展蜜蜂精子冷冻保存与复苏 (Wegener *et al.*, 2014), 促进蜜蜂良种种质资源推广和保护 (薛运波, 2016), 与人工授精相结合, 在蜜蜂繁育中发挥重要作用 (Pieplow *et al.*, 2017), 由此延伸出来的单雄受精技术为基因相关研究提供了系谱清晰的种群和近交系 (Liu *et al.*, 2013)。也为寻找与蜂王产卵量等性状提供相关分子标记, 长远看来可用于分子辅助选择。

多雄受精现象在动物界中广泛存, 其进化意义尚不明确。来自于不同父本的精子在进入受精囊后存在竞争关系, 那么雌性个体各自为了取得生殖效益最大化, 在交配后竞争中, 受精囊如何对特定父本来源的精子加以保护, 或者雄性精液如何在竞争中保护自身精子不被破坏的机制为揭示昆虫生殖进化提供良好研究素材, 为进一步了解生殖生理与性比调控提供依据。

受精囊及其附属腺体结构存在于多种昆虫中, 通过研究受精囊生理功能影响因素, 找到新型农药作用靶点, 进一步培育敏感型昆虫品系, 从源头上控制昆虫的繁殖速率, 为有关害虫防治领域提供借鉴。

参考文献 (References)

- Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Lizarraga RM, *et al.* The importance of trace minerals copper, manganese, selenium and zinc in bovine sperm-zona pellucida binding [J]. *Zygote*, 2019, 27 (2): 89–96.
- Ayiguli MMT, Wang DG, Xiao HB, *et al.* Adults of *Euzophera pyriella*: Observation on the internal reproductive system structure [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35 (13): 126–129.
- [阿依古丽·买买提, 王德钢, 肖海兵, 等. 香梨优斑螟成虫内生殖系统结构观察 [J]. 中国农学通报, 2019, 35 (13): 126–129]
- Baer B, Eubel H, Taylor NL, *et al.* Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Genome Biology*, 2009, 10 (6): R67.
- Baer B, Heazlewood JL, Taylor NL, *et al.* The seminal fluid proteome

- of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Proteomics*, 2009, 9 (8): 2085–2097.
- Bienkowska M, Panasiuk B, Węgrzynowicz P, *et al.* The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee [J]. *Journal of Apicultural Science*, 2011, 55: 161–168.
- Chaimanee V, Evans JD, Chen Y, *et al.* Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016, 89: 1–8.
- Chapman T. Seminal fluid - mediated fitness traits in *Drosophila* [J]. *Heredity*, 2001, 87 (5): 511–521.
- Charlesworth D. Sex determination: Balancing selection in the honey bee [J]. *Current Biology*, 2004, 14 (14): R568–569.
- Chu DS. Zinc: A small molecule with a big impact on sperm function [J]. *Plos Biology*, 2018, 16 (6): e2006204.
- Collins A, Williams V, Evans J. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13 (2): 141–146.
- Cui XP, Wu XB, Liu F, *et al.* Nutrient content of lotus pollen and corn pollen from different regions [J]. *Shandong Agricultural Science*, 2014, 46 (11): 124–128. [崔学沛, 吴小波, 刘锋, 等. 不同产地荷花花粉与玉米花粉营养成分及含量分析 [J]. 山东农业科学, 2014, 46 (11): 124–128]
- Dávila F, Botteaux A, Bauman D, *et al.* Antibacterial activity of male and female sperm - storage organs in ants [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2018, 221 (6): 1–17.
- Dávila F, Chérasse S, Boomsma JJ, *et al.* Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase constitutive immune activity [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2015, 78: 9–14.
- den Boer SPA, Baer B, Boomsma JJ. Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects [J]. *Science*, 2010, 327 (5972): 1506–1509.
- Forfert N, Troxler A, Retschnig G, *et al.* Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12 (10): e0186109.
- Gajger IT, Sakač M, Gregorc A. Impact of thiamethoxam on honey bee queen (*Apis mellifera carnica*) reproductive morphology and physiology [J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 2017, 99 (3): 297–302.
- Galizia CG, Eisenhardt D, Giurfa M. Honeybee Neurobiology and Behavior: A Tribute to Randolph Menzel [M]. Heidelberg: Springer Press, 2012.
- Ge FC, Xue YB. Research of life and reproduction ability about wintering drone [J]. *Apiculture of China*, 2002, 53 (1): 4–5. [葛凤晨, 薛运波. 越冬雄蜂寿命及其生殖力的研究 [J]. 中国养蜂, 2002, 53 (1): 4–5]
- Ghafarizadeh AA, Vaezi G, Shariatzadeh MA, *et al.* Effect of *in vitro* selenium supplementation on sperm quality in asthenoteratozoospermic men [J]. *Andrologia*, 2018, 50 (2): e12869.
- Gotoh A, Furukawa K. Journey of sperms from ejaculation by males to storage by queens in *Crematogaster osakensis* (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2018, 105: 95–101.
- Gotoh A, Shigenobu S, Yamaguchi K, *et al.* Transcriptome profiling of the spermatheca identifies genes potentially involved in the long-term sperm storage of ant queens [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 5972.
- Haberl M, Tautz D. Sperm usage in honey bees [J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 1998, 42 (4): 247–255.
- He JP, Xi GS. Structure and function of insect spermathecae [J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 40 (5): 476–479. [何建平, 奚耕思. 昆虫受精囊的结构与功能 [J]. 昆虫知识, 2003, 40 (5): 476–479]
- Heimpel GE, de Boer JG. Sex determination in the hymenoptera [J]. *Annual Review Entomology*, 2008, 53: 209–230.
- Hunter FM, Birkhead TR. Sperm viability and sperm competition in insects [J]. *Current Biology*, 2002, 12 (2): 121–123.
- Jiang XH, Chang QQ, Hou XH. Morphology and ultrastructure of female and male adults of *Culicoides arakawai* (Arakawa) (Diptera: Ceratopogonidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61 (4): 498–504. [蒋晓红, 常琼琼, 侯晓晖. 荒川库蠓雌雄成虫形态和超微结构 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (4): 498–504]
- Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, *et al.* Drone exposure to the systemic insecticide fipronil indirectly impairs queen reproductive potential [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6 (1): 1–12.
- Ke L, Yu JY, Lei M, *et al.* Morphology and ultrastructure of the spermatheca of *Paracryptera microptera meridionalis* (Orthoptera: Arcypterinae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59 (5): 523–529.
- Khan Z. Embryo Development of the Parthenogenetic, Sexual and Hybrid Eggs in the Lower Termites [D]. Xi'an: Northwest University, 2019. [扎希德·可汗. 低等白蚁中孤雌生殖、有性生殖和杂交卵的胚胎发育 [D]. 西安: 西北大学, 2019]
- Klenk M, Koeniger G, Koeniger N, *et al.* Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera* [J]. *Apidologie*, 2004, 35 (4): 371–381.
- Koning RE. Honeybeebiology [OL]. *Plant Physiology Website*, 1994. http://koning.ecsu.ctstateu.edu/plants_human/bees/bees.html.
- Liu X, Wu WJ. Ovarian development in *Spalangia endius* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (3): 651–656. [刘霞, 吴伟坚. 蝇蛹俑小蜂卵巢发育的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (3): 651–656]
- Liu ZG, Ji T, Yin L, *et al.* Transcriptome sequencing analysis reveals the regulation of the hypopharyngeal glands in the honey bee, *Apis mellifera carnica* Pollmann [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (12): e81001.
- Mayhew ML, Merritt DJ. The morphogenesis of spermathecae and spermathecal glands in *Drosophila melanogaster* [J]. *Arthropod Structure & Development*, 2013, 42 (5): 385–393.
- McAfee A, Chapman A, Higo H, *et al.* Vulnerability of honey bee

- queens to heat – induced loss of fertility [J]. *Nature Sustainability*, 2020, 3 (5): 367 – 376.
- Pascini TV, Martins GF. The insect spermatheca: An overview [J]. *Zoology (Jena)*, 2017, 121: 56 – 71.
- Paynter E. Cellular Energetics of Long-term Survival and Storage in Honeybee Sperm [D]. Perth: University of Western Australia, 2015.
- Paynter E, Millar AH, Welch M, *et al.* Insights into the molecular basis of long-term storage and survival of sperm in the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 1 – 9.
- Pearcy M, Delescaille N, Lybaert P, *et al.* Team swimming in ant spermatozoa [J]. *Biology Letter*, 2014, 10 (6): 20140308.
- Pettis JS, Rice N, Joselow K, *et al.* Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative factors [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (2): e0147220.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, *et al.* A voltage – gated ion channel expressed specifically in spermatozoa [J]. *PNAS*, 2001, 98 (22): 12527 – 12531.
- Rangel J, Fisher A. Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—a review [J]. *Apidologie*, 2019, 50 (6): 759 – 778.
- Ren D, Navarro B, Perez G, *et al.* A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility [J]. *Nature*, 2001, 413: 603 – 609.
- Rzymiski P, Langowska A, Fliszkiewicz M, *et al.* Flow cytometry as an estimation tool for honey bee sperm viability [J]. *Theriogenology*, 2012, 77 (8): 1642 – 1647.
- Sales K, Vasudeva R, Dickinson ME, *et al.* Experimental heatwaves compromise sperm function and cause transgenerational damage in a model insect [J]. *Nature Communication*, 2018, 9 (1): 4771.
- Simone-Finstrom M, Tarpy DR. Honey bee queens do not count mates to assess their mating success [J]. *Journal of Insect Behavior*, 2018, 31: 200 – 209.
- Stürup M, Baer-Imhoof B, Nash DR, *et al.* When every sperm counts: Factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Behavioral Ecology*, 2013, 24 (5): 1192 – 1198.
- Tarpy DR, Keller JJ, Caren JR, *et al.* Assessing the mating ‘health’ of commercial honey bee queens [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2012, 105 (1): 20 – 25.
- Tarpy DR, Olivarez R. Measuring sperm viability over time in honey bee queens to determine patterns in stored – sperm and queen longevity [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2014, 53 (4): 493 – 495.
- Tofilski A, Chudamickiewicz B, Czekońska K. Circular movement of honey bee spermatozoa inside spermatheca [J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2018, 62: 63 – 66.
- Wang JR. Study on Female Spermathecas and Phylogeny of Rhyparochromidae (Hemiptera: Rhyparochromidae) [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016. [王俊茹. 地长蝽科 Rhyparochromidae 雌性受精囊及系统发育研究 (半翅目: 地长蝽科) [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016]
- Weirich GF, Collins AM, Williams VP. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Apidologie*, 2002, 33 (1): 3 – 14.
- Wheeler DE, Krutzsch PH. Ultrastructure of the spermatheca and its associated gland in the ant *Crematogaster opuntiae* (Hymenoptera, Formicidae) [J]. *Zoomorphology*, 1994, 114 (4): 203 – 212.
- Winston ML. The Biology of the Honey Bee [M]. Cambridge: Harvard University Press, 1991.
- Wu LM, Peng WJ, Hu FL. Progress in sperm storage research for queen bee [C]. Hangzhou: The 4th academic seminar of Apicultural Science Association of China, 2007. [吴黎明, 彭文君, 胡福良. 蜂王体内精子贮存研究进展 [C]. 杭州: 中国养蜂学会蜜蜂育种专业委员会第四次学术研讨会, 2007]
- Wu LM, Peng WJ, Hu FL. Sperm storage if queen honeybee [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45 (2): 323 – 327. [吴黎明, 彭文君, 胡福良. 蜂王体内的精子贮存 [J]. 应用昆虫学报, 2008, 45 (2): 323 – 327]
- Xue YB. Artificial Insemination of Bees [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2016. [薛海波. 蜜蜂人工授精技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- Zareie R, Eubel H, Millar AH, *et al.* Long-term survival of high quality sperm: Insights into the sperm proteome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12 (11): 5180 – 5188.
- Zeng ZJ. Advances in honeybee biology in China over the past 70 years [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2020, 57 (2): 259 – 264. [曾志将. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2020, 57 (2): 259 – 264]
- Zhao Q, Zhang J, Sheng N, *et al.* Morphological study on internal reproductive system of *Tipula* (*Formotipula*) *holoserica* [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2019, 25 (12): 75 – 76, 92. [赵晴, 张佳, 盛楠, 等. 螺祖丽大蚊生殖系统结构研究 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25 (12): 75 – 76, 92]