

蜜蜂卵巢激活研究进展^{*}

牛德芳 陈璇 胡福良^{**}

(浙江大学动物科学学院 杭州 310058)

摘 要 蜜蜂 *Apis* 作为典型的社会性昆虫,最重要的特征就是生殖劳动分工。卵巢激活是蜜蜂发挥生殖能力的重要影响因素。本文对蜜蜂卵巢激活的影响因素、蜜蜂卵巢激活相关的基因表达及 microRNA 在蜜蜂卵巢激活过程中的可能作用进行了介绍,为研究蜜蜂级型分化和生殖劳动分工的分子机制提供依据。

关键词 蜜蜂, 卵巢激活, 生殖劳动分工, 基因, microRNA

The research progress of ovary activation in honeybee (*Apis*)

NIU De-Fang CHEN Xuan HU Fu-Liang^{**}

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract As an eusocial insects, the honeybee *Apis*, is characterized by the extreme reproductive division of labor. Ovary activation is an important factor for the honeybee reproductive capacity. Factors affecting ovary activation, gene expression involved in ovary activation and the possible role of microRNA in ovary activation of the honeybee were introduced in this paper. It will provide a basis for the study on the molecular mechanism of the honeybee caste differentiation and reproductive division of labor.

Key words honeybee, ovary activation, reproductive division of labor, gene, microRNA

蜜蜂 *Apis* 作为典型的社会性昆虫,最重要的特征就是具有完善的劳动分工(包括生殖劳动分工)体系,蜂王垄断生殖权力,而工蜂产卵受到抑制(Michener and Brothers, 1974; 郑火青等, 2010)。蜂王生殖器官发育完全,在自然交尾或是人工受精后卵巢被激活,专司产卵(Kaftanoglu and Peng, 1982; Lodesani and Vecchi, 1996; Schlüns *et al.*, 2005);工蜂生殖器官发育不完全,从事除产卵以外的巢内外所有工作,但其卵巢仍具有生殖潜力。当蜂王存在时,大多数工蜂的卵巢处于未激活状态,表现为功能不育;只有在失王的情况下,部分工蜂的卵巢才被激活,具备产卵能力(Velthuis, 1970; Winston, 1987; Ratnieks, 1993; Barron *et al.*, 2001)。

卵巢是蜜蜂生殖系统的重要功能单位,它不仅是蜜蜂级型分化的重要形态指标,也是生殖潜力的重要标志,在蜜蜂的行为功能中起着重要作用。研究蜜蜂卵巢激活的影响因素和相关基因的

表达,对于揭示蜜蜂级型分化和生殖劳动分工的分子机制有着重要意义。

1 蜜蜂卵巢管数对卵巢激活的影响

卵巢管数在社会性昆虫的生殖与非生殖级型间具有明显的二态性,它是影响产卵率和生殖力的重要因素(Richard *et al.*, 2005; Makert *et al.*, 2006)。西方蜜蜂 *A. mellifera* Linnaeus 蜂王的卵巢管数为 200 ~ 360 条(Michener and Brothers, 1974),产卵生殖能力强;工蜂卵巢管数通常小于 20 条,绝大多数工蜂不产卵,表现为功能不育。蜂王和工蜂卵巢管数在幼虫期决定,4 日龄幼虫时卵巢管原基数相同,5 日龄幼虫时,工蜂幼虫保幼激素(JH)滴度降低,卵巢管原基细胞程序性死亡,导致 95% 的工蜂卵巢管缺失(Capella and Hartfelder, 1998; 黄少康和陈盛禄, 2002)。工蜂的卵巢管数是其生殖能力和劳动分工相关的重要表型特征。卵巢管数多的工蜂卵巢易被激活,膨胀明显;

^{*} 资助项目:国家蜂产业技术体系专项(CARS-45)。

^{**} 通讯作者, E-mail: flhu@zju.edu.cn

收稿日期:2012-02-22, 接受日期:2012-03-13

卵巢管数少的工蜂卵巢不易甚至永久不被激活 (Maurizio, 1954; Hartfelder *et al.*, 2002)。自然蜂群中, 同龄工蜂行为具有多态性, 比较同龄参加采集活动和不参加采集活动的工蜂卵巢发现, 不参加采集活动工蜂的卵巢管数和激活程度明显高于参加采集活动的工蜂 (Oldroyd and Beekman, 2008); 人为筛选的花粉高储存蜜蜂系的平均卵巢管数 (5.56 条) 多于花粉低储存蜜蜂系 (2.96 条), 卵巢管数 ≥ 8 条的个体也只出现在花粉高储存蜂群中, 并且卵巢激活持续的时间和可能性也高于后者 (Amdam *et al.*, 2004, 2006)。卵巢管数也影响蜜蜂的采集分工。卵巢管数多的蜜蜂采集日龄提早, 且倾向于采集花粉 (Amdam *et al.*, 2006; Oldroyd and Beekman, 2008; Wang *et al.*, 2010)。这说明卵巢激活与蜜蜂的采集或是采集花粉行为可能是受同样的基因网络调控, 并可能与其他调控工蜂生殖行为的因素相一致。

2 蜜蜂遗传组成对卵巢激活的影响

不同蜜蜂品种, 无论是在有王还是无王的情况下, 工蜂卵巢激活潜力都有很大差别。在蜂王存在的情况下, 大多数野生型蜜蜂的工蜂卵巢处于未激活状态, 只有 1/10 000 的工蜂卵巢处于完全激活状态, 具备产卵能力 (Ratnieks, 1993; Visscher, 1996)。而在无政府主义 (anarchistic) 蜜蜂和海角蜜蜂 *A. m. capensis* Escholtz 有王群中, 工蜂卵巢激活比例比野生型蜜蜂更高 (Barron and Oldroyd, 2001; Lattorff *et al.*, 2005), 且更易于被激活。无政府主义蜜蜂约有 5% ~ 10% 的工蜂卵巢处于激活状态 (Oldroyd *et al.*, 1999; Barron and Oldroyd, 2001), 蜂群中大多数雄蜂是工蜂的后代 (Montague and Oldroyd, 1998); 海角蜜蜂约有 1% 的工蜂产卵 (Hepburn *et al.*, 1991), 并且几乎所有的工蜂都具有产生雌性后代的潜力。在蜂群失王时, 野生型蜜蜂约有 10% 的工蜂卵巢被激活, 并能产成熟卵 (Velthuis, 1970); 无政府主义蜜蜂的卵巢激活比例为 30% ~ 40%, 并以更高频率产未受精卵 (Barron *et al.*, 2001); 海角蜜蜂 75% 的工蜂卵巢被激活, 其中 12% 产成熟卵 (Hepburn and Allsopp, 1994)。

同一蜜蜂品种, 在有王和失王 2 种情况下, 不同亚家系工蜂卵巢的激活潜力也是有差别的。一些亚家系工蜂的卵巢更易于激活, 具有更高的卵

巢激活比例和自私产卵行为 (Oldroyd *et al.*, 1994; Montague and Oldroyd, 1998; Chaline *et al.*, 2002)。Montague 等 (1998) 在实验中发现, 一个无政府主义蜜蜂有王群中, 工蜂产的雄蜂有 90% 来自同一个亚家系, 10% 是其他亚家系工蜂和蜂王的后代, 但是优势产卵工蜂与蜂群失王时的产卵工蜂属于不同的亚家系。

此外, 蜜蜂工蜂卵巢激活潜力是可遗传的 (Oldroyd *et al.*, 1994; Montague and Oldroyd, 1998; Chaline *et al.*, 2002)。Oldroyd 等 (1999) 利用工蜂产的雄蜂精液进行人工授精, 培育出具有无政府主义蜜蜂特性的蜂群, 该蜂群工蜂卵巢管数多, 卵巢激活比例高。

3 蜜蜂卵巢激活相关基因研究进展

蜜蜂卵巢激活受基因表达的调控。基因组成相同的蜂王和工蜂卵巢激活和生殖功能差异显著, 根本原因是卵巢激活相关基因的差异表达。Grozingier 等 (2007) 利用基因芯片分析同龄处女王、不育工蜂、产卵工蜂脑部基因表达。蜂王和工蜂约有 2 000 个差异表达基因, 不育工蜂和产卵工蜂差异表达基因较少, 有 221 个, 而且产卵工蜂差异表达的基因与蜂王特异性表达的基因类似 (Grozingier *et al.*, 2007)。这些差异表达基因通过形成与生殖功能相关的基因调控网络参与调控蜜蜂卵巢激活过程, 而基因的差异表达除了与遗传组成有关外, 还受到其他诱导因素的影响。

3.1 遗传组成对蜜蜂卵巢基因表达的影响

遗传组成对蜜蜂卵巢激活的影响体现在蜂群中工蜂卵巢的激活比例, 但本质上是基因差异表达的结果。Thompson 等 (2008) 比较野生型不育工蜂和无政府主义产卵工蜂脑部、腹部的基因表达文库, 获得 725 个差异表达基因, 其中腹部和脑部分别为 316 个和 409 个。野生型不育工蜂上调 2 个未知基因和 1 个果蝇 CG6004 的直系同源基因; 无政府主义产卵工蜂上调卵黄蛋白原、蜂毒肽、AdoHycase 超家族成员蛋白基因 (Thompson *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2008)。正常有王群、花粉高储存蜜蜂系工蜂卵巢激活比例高于花粉低储存蜜蜂系。比较二者卵巢的基因表达, 获得 2 151 个差异表达转录本, 约占蜜蜂预测基因的 20.3%, 这些卵巢差异表达基因与脑部转录组的

改变显著重叠(Wang *et al.*, 2012)。以上结果表明,遗传组成不同的蜜蜂工蜂卵巢激活潜力差异的根本原因是基因的差异表达。这些差异表达的基因通过形成与工蜂生殖功能相关的基因调控网络,参与调控卵巢的激活或是生殖功能抑制过程。

3.2 受精对蜜蜂卵巢基因表达的影响

蜂王羽化后 5~10 d 达到性成熟,并开始进行 1~3 次的婚飞,平均每只蜂王与 12 只雄蜂交尾(Tarpy *et al.*, 2004)。蜂王完成交尾后,卵巢由发育停滞状态转变为完全激活状态,并开始产卵(Tanaka and Hartfelder, 2004)。蜂王交尾后,其脑和卵巢的大量基因表达发生了改变。Kocher 等(2008)比较了相同日龄的处女王、交尾一次但未开始产卵蜂王以及交尾一次开始产卵蜂王的脑和卵巢的基因表达情况,结果从脑部共获得 10 468 个转录本,其中 971 个在 3 组样本中差异表达;从卵巢共获得 7 377 个转录本,其中 366 个在 3 组样本中差异表达;此外,有 26 个转录本在脑和卵巢中共表达。接着,他们又研究了未开始产卵的同龄处女王、自然交尾一次蜂王和人工授精(盐水、精液)蜂王脑部基因的表达,获得了 631 个差异表达转录本,其中 529 个转录本在处女王和受精蜂王之间差异表达;364 个转录本在自然交尾王和人工受精蜂王之间差异表达,其中自然交尾王高表达基因与热激反应有关,人工受精蜂王高表达基因与蛋白合成有关;而用盐水和用精液进行的人工授精蜂王之间,差异表达转录本数目较少,有 308 个(Kocher *et al.*, 2010)。与之前研究的工蜂行为、生理调控基因对比,发现这些交尾调控基因与它们没有明显的相关性,说明蜂王交尾后,脑部和卵巢差异表达的基因是由不同刺激和诱导引发的,且是分开或是不同时间表达的;蜂王交尾开始后立即引起卵巢基因表达的改变,而脑部基因表达的改变可能需要其他的刺激或是需要更长的时间来完成。

3.3 CO₂ 对蜜蜂卵巢基因表达的影响

CO₂ 麻醉对蜂王和工蜂卵巢的激活起相反作用。CO₂ 促进处女王卵巢的激活和产卵的开始,却抑制工蜂卵巢的激活,能显著降低无王群工蜂卵巢激活的比例(Engels *et al.*, 1976; Engels and Imperatriz-Fonseca, 1990; Harris and Harbo, 1990; Harris *et al.*, 1996; Koywiwattrakul *et al.*, 2005)。

CO₂ 在诱导蜜蜂生殖发生改变的过程中,一些基因的表达发生了改变。Niño 等(2011)研究了处女王、CO₂ 麻醉蜂王和假授精蜂王(进行完整的人工授精操作,但不注射任何物质)行为、生理和转录组差异,结果发现,CO₂ 处理终止蜂王婚飞和促进蜂王卵巢激活,CO₂ 麻醉蜂王和假授精蜂王卵巢激活比例和水平提高。同时,脑部基因的表达也发生了改变,基因芯片筛选获得 1 407 个表达差异显著的转录本(Niño *et al.*, 2011)。Thompson 等(2007)鉴别了 25 个候选基因在蜂王和工蜂 CO₂ 处理组和对照组腹部和脑部的表达情况,结果发现其中 6 个基因的表达显著不同。Koywiwattrakul 等(2005)研究了无王群工蜂在 CO₂ 处理和未处理情况下的基因表达,发现有 8 个基因与卵巢激活相关,其中卵黄蛋白原和转铁蛋白基因的表达明显下调。这与 CO₂ 麻醉蜂王引起其卵黄蛋白原表达上调,进而激活蜂王卵巢的观点是一致的(Engels *et al.*, 1976)。这说明 CO₂ 麻醉诱导产生的基因表达差异与卵巢激活有关,CO₂ 似乎激活了调控卵巢功能的基因网络。因此,CO₂ 麻醉蜂王和工蜂是研究卵巢激活基因调控网络的一个有效方法。

4 miRNA 可能参与蜜蜂卵巢的激活

microRNA(miRNA)是一类内生的、长度约 21~24 nt 的非编码单链 RNA,由内源性的长度约 70~90 nt 具有茎环结构的单链 RNA 前体(pre-miRNA)经 Dicer 酶加工生成,广泛存在于真核生物体内,并在进化中保守(Lau *et al.*, 2001)。miRNA 具有调节基因表达活性的功能,参与动植物生长发育、细胞分化、细胞增殖与凋亡、胚胎和组织分化、激素分泌等过程。

4.1 miRNA 在蜜蜂上的研究

自 1993 年 Lee 等在线虫 *Caenorhabditis elegans* Maupas 上发现第一个 miRNA 以来,miRBase 数据库中(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)已收录了 2 万多条 miRNA,共涵盖个 168 个物种。其中西方蜜蜂收录了 174 条。miRNA 在蜜蜂上的研究较少,主要是从全基因组水平挖掘蜜蜂的 miRNA。Chen 等(2010)利用高通量测序的方法预测得到蜜蜂基因组中 267 个新的候选 miRNA,其中 81 个在其他昆虫中有直系同源基

因。Weaver 等(2007)运用 3 种独立的计算方法识别了蜜蜂基因组中 65 个 miRNA 候选基因,大部分 miRNA 已被证实至少在蜜蜂的一个组织中表达,一些高表达 miRNA 具有级型或日龄表达差异。Behura 和 Whitfield (2010)研究了 20 个预测 miRNA 基因在内勤蜂和采集蜂脑部的表达情况,其中,6 个 miRNA 基因在内勤蜂脑部表达上调;7 个 miRNA 基因在采集蜂脑部表达上调。蜜蜂 miRNA 的表达具有组织特异性。Hori 等(2011)从蜜蜂大脑中分离出 8 个 miRNA,其中 *ame-mir-276* 和 *ame-mir-1000* 分别在工蜂和雄蜂大脑中以大脑-特异性和-偏好性的方式表达。

蜜蜂 miRNA 表达的级型、日龄差异和组织特异性,说明这些差异或是特异性表达的 miRNA 可能参与调控蜜蜂的级型分化、行为调控以及生殖劳动分工。

4.2 miRNA 在卵巢上的研究

miRNA 的表达具有组织特异性和性别差异性,与生殖器官的特异功能有关,在卵巢发育、滤泡生成和早期胚胎发育的过程中起着重要的调控作用。有些 miRNA 在生殖腺中特异性或是偏好性表达。Ro 等(2007)克隆了小鼠 14 d 胚胎和成体的卵巢中非编码小 RNA,获得 122 个 miRNA,其中 15 个新发现 miRNA 在卵巢中偏好表达,7 个在大鼠、斑马鱼、牛和人中共表达。Mishima 等(2008)从小鼠睾丸和卵巢分别筛选出 159 个和 154 个已知 miRNA,2 个新 miRNA。其中,在成体小鼠睾丸和卵巢中偏好性、专一性或是高表达的 miRNA 有 54 个,而且雄性偏好表达的 miRNA 位于 X 染色体上。Ahn 等(2010)从新生小鼠卵巢组织提取小 RNA 片段,并利用 Illumina 基因组分析进行大规模平行测序,获得 398 个已知 miRNA 和 118 个 miRNA 异构体(isomiR)。其中,Let-7 家族表达量最丰富。而 *mmu-mir-672*、*mmu-mir-503*、*mmu-mir-465* 和 *mmu-mir-322* 家族则是表达量最丰富的 X 连锁 miRNA,其中,前 3 个家族在睾丸和卵巢偏好表达。miRNA 在牛的卵巢上也有研究。为了鉴别牛卵母细胞/卵巢中的 miRNA,Tripurani 等(2010)克隆分析了牛胚胎卵巢 miRNA,获得 679 个 miRNA。比较分析 58 个牛特有的 miRNA,发现 8 个在胚胎卵巢偏好表达,其中 *bta-mir-424* 和 *bta-mir-10b* 在卵泡卵母细胞中高表达。新

miRNA 的数量在卵母细胞核早期胚胎分裂时期相对较少,在囊胚期较多,说明 miRNA 在囊胚细胞分化中起作用。

已有研究表明,miRNA 在蜜蜂脑部的表达具有特异性和性别差异性(Hori *et al.*, 2011)。但 miRNA 在蜜蜂其他组织(包括卵巢组织)的表达及其与蜜蜂生殖劳动分工的关系还没有研究。DNA 甲基化是调控工蜂和蜂王级型分化的关键因素(Kucharski *et al.*, 2008; Elango *et al.*, 2009)。miRNA 与 DNA 甲基化的过程相互影响,说明 miRNA 在蜜蜂级型分化中可能起重要作用。因此,研究蜜蜂卵巢激活前后 miRNA 的表达差异对于揭示调控蜜蜂卵巢偏好/特异性表达的 miRNA 及其在卵巢激活过程中的作用有着重要的意义。

5 小结

卵巢激活是蜜蜂发挥生殖能力的重要影响因素。蜜蜂卵巢激活潜力与环境、遗传、诱导等因素有关,并最终通过基因表达调控来实现卵巢激活。蜜蜂卵巢激活相关基因的研究包括级型间(蜂王/工蜂)和级型内(不育工蜂/生殖工蜂)蜜蜂的差异表达基因,多是采用基因芯片技术。miRNA 在卵巢的表达具有组织特异性和性别差异性,在其他生物上的研究已经证实与生殖器官的特异功能有关,参与卵巢发育、滤泡生成、早期胚胎发育等过程,但 miRNA 与蜜蜂卵巢激活的关系还未研究。因此,研究蜜蜂卵巢激活前后的卵巢转录组和 miRNA 表达文库差异,对挖掘更多的卵巢激活相关基因和 miRNA,构建蜜蜂卵巢激活基因调控网络,揭示蜜蜂级型分化和生殖劳动分工的生物学通路等有着重要意义。

参考文献(References)

- Ahn HW, Morin RD, Zhao H, Harris RA, Coarfa C, Chen ZJ, Milosavljevic A, Marra MA, Rajkovic A, 2010. MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing. *Mol. Hum. Reprod.*, 16(7):463—471.
- Amdam GV, Csondes A, Fondrk MK, Page RE, 2006. Complex social behaviour derived from maternal reproductive traits. *Nature*, 439(7072):76—78.
- Amdam GV, Norberg K, Fondrk MK, Page RE, 2004. Reproductive ground plan may mediate colony-level

- selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *PNAS*, 101 (31) :11350—11355.
- Barron AB, Oldroyd BP, 2001. Social regulation of ovary activation in ‘anarchistic’ honey-bees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49 (2) :214—219.
- Barron AB, Oldroyd BP, Ratnieks FL, 2001. Worker reproduction in honey-bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 50 (3) :199—208.
- Behura S, Whitfield C, 2010. Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 19 (4) :431—439.
- Capella ICS, Hartfelder K, 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.*, 44 (5/6) :385—391.
- Chaline N, Ratnieks F, Burke T, 2002. Anarchy in the UK: Detailed genetic analysis of worker reproduction in a naturally occurring British anarchistic honeybee, *Apis mellifera*, colony using DNA microsatellites. *Mol. Ecol.*, 11 (9) :1795—1803.
- Chen X, Yu X, Cai Y, Zheng H, Yu D, Liu G, Zhou Q, Hu S, Hu F, 2010. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 19 (6) :799—805.
- Elango N, Hunt BG, Goodisman MAD, Yi SV, 2009. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *PNAS*, 106 (27) :11206—11211.
- Engels W, Gonçalves L, Engels E, 1976. Effects of carbon dioxide on vitellogenin metabolism in unmated queen honeybees. *J. Apicult. Res.*, 15 :3—10.
- Engels W, Imperatriz-Fonseca V, 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees//Michener C, Engels W (eds.). *Social Insects: An Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*. Berlin:Springer. 166—230.
- Grozinger CM, Fan Y, Hoover SER, Winston ML, 2007. Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.*, 16 (22) :4837—4848.
- Harris J, Harbo J, 1990. Suppression of ovary development of worker honeybees by association with workers treated with carbon dioxide. *J. Apicult. Res.*, 29 (4) :187—193.
- Harris J, Woodring J, Harbo J, 1996. Effects of carbon dioxide on levels of biogenic amines in the brains of queenless worker and virgin queen honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apicult. Res.*, 35 (2) :69—78.
- Hartfelder K, Bitondi M, Santana W, Simões Z, 2002. Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (2) :211—216.
- Hepburn H, Allsopp M, 1994. Reproductive conflict between honeybees: usurpation of *Apis mellifera* scutellata colonies by *Apis mellifera capensis*. *S. Afr. J. Sci.*, 90 :247—247.
- Hepburn H, Magnuson P, Herbert L, Whiffler L, 1991. The development of laying workers in field colonies of the Cape honeybee. *J. Apicult. Res.*, 30 :107—112.
- Hori S, Kaneko K, Saito TH, Takeuchi H, Kubo T, 2011. Expression of two microRNAs, ame-mir-276 and-1000, in the adult honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Apidologie*, 42 (1) :89—102.
- Kaftanoglu O, Peng Y, 1982. Effects of insemination on the initiation of oviposition in the queen honey bee. *J. Apicult. Res.*, 21 :3—6.
- Kocher S, Richard FJ, Tarpy D, Grozinger C, 2008. Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 9 (1) :232.
- Kocher S, Tarpy D, Grozinger C, 2010. The effects of mating and instrumental insemination on queen honey bee flight behaviour and gene expression. *Insect Mol. Biol.*, 19 (2) :153—162.
- Koywiwattrakul P, Thompson GJ, Sithipraneed S, Oldroyd BP, Maleszka R, 2005. Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees, *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.*, 5 :36.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319 (5871) :1827—1830.
- Lattorff H, Moritz R, Fuchs S, 2005. A single locus determines thelytokous parthenogenesis of laying honeybee workers (*Apis mellifera capensis*). *Heredity*, 94 (5) :533—537.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP, 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294 (5543) :858—862.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75 (5) :843—854.
- Lodesani M, Vecchi M, 1996. A study on the development of the ovaries of queen bees (*Apis mellifera ligustica*) instrumentally and naturally mated. *Apicoltura Moderna*,

- 87:65—70.
- Makert GR, Paxton RJ, Hartfelder K, 2006. Ovariole number—a predictor of differential reproductive success among worker subfamilies in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 60(6):815—825.
- Maurizio A, 1954. Pollenernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz*, 68:115—182.
- Michener CD, Brothers DJ, 1974. Were workers of eusocial Hymenoptera initially altruistic or oppressed? *PNAS*, 71(3):671—674.
- Mishima T, Takizawa T, Luo SS, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mizuguchi Y, Ishikawa T, Mori M, Kanda T, Goto T, 2008. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction*, 136(6):811—822.
- Montague CE, Oldroyd BP, 1998. The evolution of worker sterility in honey bees: an investigation into a behavioral mutant causing failure of worker policing. *Evolution*, 52(5):1408—1415.
- Niño E, Tarpy D, Grozinger C, 2011. Genome-wide analysis of brain transcriptional changes in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens exposed to carbon dioxide and physical manipulation. *Insect Mol. Biol.*, 20(3):387—398.
- Oldroyd BP, Beekman M, 2008. Effects of selection for honey bee worker reproduction on foraging traits. *PLoS Biol.*, 6(3):e56.
- Oldroyd BP, Hailing L, Rinderer T, 1999. Development and behaviour of anarchistic honeybees. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 266(1431):1875—1878.
- Oldroyd BP, Osborne KE, 1999. The evolution of worker sterility in honeybees: the genetic basis of failure of worker policing. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 266(1426):1335—1339.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM, Crozler RH, 1994. Anarchy in the beehive. *Nature*, 371:749.
- Ratnieks FLW, 1993. Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 32(3):191—198.
- Richard DS, Rybczynski R, Wilson TG, Wang Y, Wayne ML, Zhou Y, Partridge L, Harshman LG, 2005. Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female sterility of the chico1 insulin signaling mutation is autonomous to the ovary. *J. Insect Physiol.*, 51(4):455—464.
- Ro S, Song R, Park C, Zheng H, Sanders KM, Yan W, 2007. Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *RNA*, 13(12):2366—2380.
- Schlüns H, Moritz RFA, Neumann P, Kryger P, Koeniger G, 2005. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Anim. Behav.*, 70(1):125—131.
- Tanaka ED, Hartfelder K, 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Struct. Dev.*, 33(4):431—442.
- Tarpy D, Nielsen R, Nielsen D, 2004. A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. *Insect Soc.*, 51(2):203—204.
- Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP, 2006. Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees. *Insect Mol. Biol.*, 15(5):537—644.
- Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP, 2008. Genome-wide analysis of genes related to ovary activation in worker honey bees. *Insect Mol. Biol.*, 17(6):657—665.
- Thompson GJ, Yockey H, Lim J, Oldroyd BP, 2007. Experimental manipulation of ovary activation and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers: testing hypotheses of reproductive regulation. *J. Exp. Zool. Part A: Ecol. Genet. Physiol.*, 307(10):600—610.
- Tripurani SK, Xiao C, Salem M, Yao J, 2010. Cloning and analysis of fetal ovary microRNAs in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 120(1):16—22.
- Velthuis H, 1970. Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees. *Entomol. Exp. App.*, 13(4):377—394.
- Visscher PK, 1996. Reproductive conflict in honey bees: a stalemate of worker egg-laying and policing. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 39(4):237—244.
- Wang Y, Kaftanoglu O, Siegel AJ, Page Jr RE, Amdam GV, 2010. Surgically increased ovarian mass in the honey bee confirms link between reproductive physiology and worker behavior. *J. Insect Physiol.*, 56(12):1816—1824.
- Wang Y, Kocher SD, Linksvayer TA, Grozinger CM, Page Jr RE, Amdam GV, 2012. Regulation of behaviorally associated gene networks in worker honey bee ovaries. *J. Exp. Biol.*, 215(1):124—134.
- Weaver DB, Anzola JM, Evans JD, Reid JG, Reese JT, Childs KL, Zdobnov EM, Samanta MP, Miller J, Elisk CG, 2007. Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome. *Genome Biol.*, 8(6):R97.

Winston ML, 1987. The Biology of the Honey Bee.
Cambridge, MA:Harvard Univ. Pr. 181—213.

黄少康, 陈盛禄, 2002. 蜜蜂蜂王与工蜂级型分化研究进

展. 昆虫知识, 39(3):176—181.

郑火青, 赵慧霞, 胡福良, 2010. 蜜蜂群内生殖分工体系的
形成及其维持. 昆虫知识, 47(6):1066—1071.