

不同行为表现的蜜蜂脑部多巴胺及其受体基因的检测分析*

张壘楠** 黄景南** 封王江 余岢骏 李志国 聂红毅 苏松坤***

(福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002)

摘要 【目的】对不同行为表现的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂脑部多巴胺及其受体基因进行检测。【方法】从蜜蜂观察箱中采集不同行为表现的工蜂, 解剖其脑部, 用高效液相色谱-电化学检测器和实时荧光 PCR 仪分别检测多巴胺含量和受体基因相对表达量, 并进行计算分析研究。【结果】建立了不同行为表现的蜜蜂脑部多巴胺及受体基因的研究方法。意大利蜜蜂哺育蜂脑部的多巴胺含量与新出房工蜂、采集蜂、休息状态下的工蜂存在显著差异。多巴胺受体 1 基因及多巴胺转运体基因在哺育蜂脑部处于高表达状态, 4 种不同分工的意大利蜜蜂脑部多巴胺受体 2 基因、受体 3 基因相对表达量差异不显著。【结论】多巴胺与蜜蜂不同行为表现密切相关, 多巴胺受体 1 基因与转运体基因可能参与蜜蜂哺育行为。

关键词 意大利蜜蜂; 多巴胺; 神经递质; 高效液相色谱-电化学检测; 基因; 行为

The amount of dopamine, and the expression of its receptor genes, in the brains of worker honey bees engaged in different activities

ZHANG Zhao-Nan** HUANG Jing-Nan** FENG Wang-Jiang YU Ke-Jun
LI Zhi-Guo NIE Hong-Yi SU Song-Kun***

(College of Animal Science (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract [Objectives] To quantify the amount of dopamine, and the expression of its receptor genes, in the brains of worker bees (*Apis mellifera ligustica*) engaged in different activities. [Methods] Worker bees performing different activities were collected from a bee observation hive, and their whole brain dissected and removed. The dopamine content was measured with a high performance liquid chromatography-electrochemical detector and the relative expression of its receptor genes with a Quantitative Real-time PCR instrument. [Results] A method for measuring dopamine and the expression of its receptors gene in the brains of honeybees with different roles was established. The dopamine content in the brain of nurse honeybees was significantly different from that of newly emerged, foraging or resting, workers. Furthermore, the dopamine receptor gene 1 and transporter genes were more highly expressed in nurse bees. However, the relative expression level of the dopamine receptor genes 2 and 3 in the brains of workers engaged in these four different activities was not significantly different. [Conclusion] Dopamine is closely related to the behavior of bees; the dopamine receptor 1 gene and transporter genes may be involved in feeding behavior.

Key words *Apis mellifera ligustica*; dopamine; neurotransmitters; high performance liquid chromatograph-electrochemical detection system; gene; behaviors

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31772684); 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-44-KXJ4)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 15236055367@163.com; hjnhoneybee@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: susongkun@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-12-27; 接受日期 Accepted: 2019-08-26

社会性昆虫 (Social insects) 其特征之一是在群体内出现劳动分工, 繁殖后代并不由所有个体执行。蜜蜂群内成年蜂分为三个级型, 包括蜂王司产卵、雄蜂司繁殖和工蜂司采集, 巢内的工作大多由工蜂担任。在蜂群中每只工蜂都忙碌工作, 看似杂乱无章, 而实际它们都各司其职, 井然有序。工蜂的分工主要以日龄和行为为依据, 羽化之后分为内勤蜂和外勤蜂, 分别担任清理巢房、哺育幼虫、建造巢房、修整巢脾等巢内工作和外出采集蜜粉、移除废弃物、保卫蜂群等巢外工作; 羽化 3 d 内的工蜂, 主要清理巢房; 羽化后 6-12 d 的工蜂, 主要负责饲喂幼虫的工作, 其头部内的上颚腺与咽下腺可分泌幼虫所需食物; 羽化后 12-18 d 的工蜂, 腹部 4 对蜡腺发育成熟, 可分泌蜂蜡, 用以建造巢脾及封盖; 羽化后 19 d 之后的工蜂, 主要活动由巢内转向巢外, 参加守卫、采集等工作。工蜂劳动分工行为表现受外界环境及巢内需求的影响, 常发生提前或滞后的现象, 表现出行为的可塑性 (Huang *et al.*, 1994)。

对于蜜蜂劳动分工行为表现的研究, 研究人员主要集中在保幼激素对劳动分工行为表现的影响等方面, 而涉及蜜蜂脑部中枢神经系统中的脑内神经递质方面的研究很少 (Robinson, 2002)。蜜蜂脑部生物胺类神经递质对生殖发育、昼夜节律、生活特性等方面都具有十分重要的调控作用 (Whitfield *et al.*, 2002)。前人研究表明, 蜜蜂脑部生物胺类神经递质含量的改变可能直接影响其行为 (Božič and Woodring, 1998; Wagener-Hulme *et al.*, 1999; Matsuyama *et al.*, 2015; Cabe *et al.*, 2017)。另外, 多巴胺与亢奋和欢愉的信息传递有关, 能调节高等动物大脑的情感认知、学习记忆、躯体运动等行为活动, 并作为蜜蜂脑内一种非常重要的单胺类神经递质, 参与蜜蜂复杂的社会行为如运动、繁殖以及处女蜂王的打斗行为等 (Mustard *et al.*, 2010; Pignatelli *et al.*, 2017)。

本研究选取蜜蜂群体中具有代表性的 4 种行为表现的个体, 即新出房工蜂、采集蜂、晚上安静休息的采集蜂、哺育蜂, 对不同行为表现工

蜂脑部的重要神经递质多巴胺进行检测分析, 运用灵敏度高、分离度好、耗费时间较短的高效液相色谱匹配选择性较高的电化学检测器, 通过横向与纵向的比较, 明确多组不同行为神经递质的变化趋势, 研究与蜜蜂行为表现相关的神经活性物质, 再通过多巴胺受体及转运体基因相对表达量进行检测, 有助于进一步深入了解蜜蜂行为表现相关的脑部分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂样品

本研究使用的意大利蜜蜂来自标准饲养的福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院) 科研实验蜂场, 将蜂群转移至蜜蜂观察箱内, 根据以下蜜蜂生物学现象作为判断标准抓取样本: 新出房工蜂 (Emergence): 咬破封盖从巢房爬出的蜜蜂; 哺育蜂 (Nurse): 持续饲喂幼虫; 采集蜂 (Forage): 白天采集花粉回巢的工蜂; 休息状态下的工蜂 (Rest): 白天表现出采集花粉行为并被人工标记后放回, 晚上无任何明显活动, 长时间静止的工蜂。

1.2 供试仪器

所需分析标准品: 多巴胺购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 流动相组分 A: pH=3.30 的磷酸盐缓冲溶液; 流动相组分 B: 超纯水; 流动相组分 C: 100% 甲醇溶液; 流动相组分 D: 100% 乙腈溶液; 蜜蜂行为观察箱 (515 mm×73 mm×570 mm); 蜜蜂脑部解剖工具: 眼科剪刀、眼科镊子、昆虫针、手术刀。

高效液相色谱仪 (U-3000, Thermo Fish Scientific 中国有限公司); 具体组成: 泵 (LPG-3400SD); 自动进样器 (WPS-3000TBSL); 安培池检测器 (5041A 型) (Thermo Fish Scientific 中国有限公司); Acclaim C18 色谱柱 (2.2 μm, 2.1 mm×150 mm, 美国戴安公司)。

荧光定量所需仪器及试剂: PCR 仪 (CFX384 Touch, 美国 Bio Rad 公司); 反转录试剂盒 (RR047A, 日本 TaKaRa 公司); 荧光定量试剂盒 (RR820A, 日本 TaKaRa 公司)。

1.3 意大利蜜蜂不同行为表现脑部神经递质定量检测

蜜蜂脑部解剖:解剖前用 75%酒精对解剖器材进行清洗和消毒。开启冷光源灯,将蜡盘放在 - 80 °C 冷冻的圆形冰块上,取出蜜蜂置于蜡盘上,置于体视显微镜下剪下蜜蜂头部,并用昆虫针将其固定,环切并打开几丁质外壳,剔除王浆腺、头唾腺、上颚腺等无关腺体及单眼和复眼的色素层,确定全脑完整、干净后,将其立即放入 1.5 mL 离心管中并置于 - 80 °C 保存(赵元洪等, 2014)。



图 1 意大利蜜蜂工蜂脑部
Fig. 1 Brain of worker of *Apis mellifera ligustica*

高效液相色谱-电化学检测方法:流速:0.25 mL/min;柱温:40 °C;磷酸盐流动相:pH=3.30;乙腈比例:6%;检测电压:350 mV;进样量:40 μL;本系统分离效果较好,所用时间控制在 30 min。采用外标法,根据出峰面积与浓度的对应关系,由 Chromelon7 计算出蜜脑部神经递质精确含量。利用 IBM SPSS Statistics 22 和 GraphPad Prism 6 进行数据处理和制图(赵晓蒙和苏松坤, 2016)。多巴胺保留时间为 8.23 min,此次实验神经递质标准品的线性回归方程、相关系数和最低检测限良好(表 1)。

1.4 意大利蜜蜂不同行为表现工蜂脑部多巴胺受体及转运体基因相对定量检测

利用 Primer Premier 5 (Premier 公司,加拿大)设计引物,根据试剂反应的最佳条件,引物设计的 TM 值控制在 55-60 °C 之间,GC 含量 50%左右,发卡结构、自我配对、引物二聚体的 |ΔG|均小于 6,且上下游引物间相差不超过 1 °C,

表 1 神经递质的线性回归方程、相关系数和最低检测限

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of neurotransmitter

神经递质 Neurotransmitter	线性回归方程 Linear regression equations	相关系数 Correlation coefficients	最低检测限 (ng/mL) Detection limits
多巴胺 Dopamine	$y=9.08x+5.24$	0.999 0	7

引物长度 18-25 bp,产物大小在 130-190 bp 之间。设计好的引物用 NCBI 的 blast 功能检查引物的特异性,确保只有一个基因匹配。设计好后的序列由生工生物工程(上海)股份有限公司代为合成,合成的引物用 TE Buffer 溶解为 10 nmol/L 的引物后保存在冰箱备用。经过普通 PCR 扩增后,进行琼脂糖凝胶电泳,判断其产物是否单一,如果仅有一个产物条带则代表引物特异性好,则该引物符合后续实验的要求。内参基因选用 *Gapdh*, 目标基因为多巴胺受体基因 *Amdop1*, *Amdop2*, *Amdop3*, 转运体基因 *Amdat* (表 2)。

表 2 引物序列

Table 2 Primers sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	预期片段大小 (bp) Expected fragment size
<i>Amdop1</i> -F	TCATATCCTTCGTCCCCATC	184
<i>Amdop1</i> -R	CTGTGCGTAGCAATAGAGCC	
<i>Amdop2</i> -F	CACCACCATCCAGCACAAAC	190
<i>Amdop2</i> -R	GACGACGAAGAAAGGTAGCC	
<i>Amdop3</i> -F	CGGCTTTGTCTGTGACTTTTA	131
<i>Amdop3</i> -R	TCTTGTGCTTGCGTATTTT	
<i>Amdat</i> -F	CGAATCAAGGATACAACAGCA	147
<i>Amdat</i> -R	GATAGACCATCAGCAGGCATAAT	
<i>Gapdh</i> -F	TGCTCAGGTTGTTGCCATT	170
<i>Gapdh</i> -R	TTTTTGCCTCTCGTTCACTAA	

Gapdh 为内参基因,其余为目的基因。

Reference gene is *Gapdh* and other genes are target genes.

2 结果与分析

2.1 意大利蜜蜂不同行为表现脑部神经递质定量检测

比较新出房工蜂 (Emergence)、哺育蜂 (Nurse) 脑部多巴胺的含量, 二者差异显著 ($F_{3,63} = 5.151, P < 0.05$)。新出房工蜂、采集蜂、休息状态下的工蜂脑部多巴胺含量均高于哺育蜂, 并呈显著性差异。4 组工蜂脑部多巴胺含量由高到低排序: 休息状态下蜜蜂最高, 新出房蜜蜂次之, 第 3 是采集蜂, 最低是哺育蜂。采集蜂 (Forage) 与新出房蜜蜂脑部多巴胺含量差异不显著且最为接近。造成这一结果的原因一是采集蜂回巢后, 通过舞蹈行为向其它蜜蜂传递蜜粉源信息, 此时脑内中枢神经系统内多巴胺含量产生变化; 二是可能是由于二者对食物的生理需求一致 (图 2)。

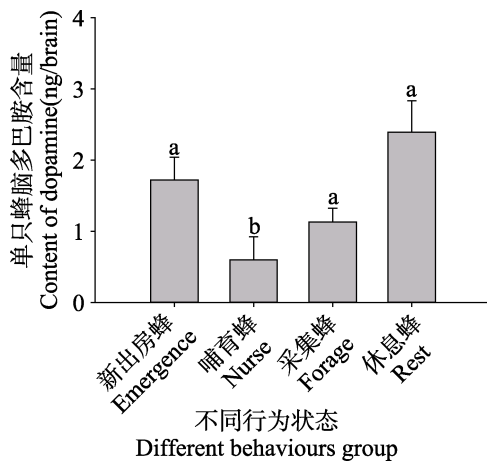


图 2 不同行为表现工蜂脑部多巴胺检测

Fig. 2 Concentration of dopamine in the brains of honey bee with different behaviors

图中数据为平均值 $\pm$ 标准误; 柱上标有不同小写字母表示不同行为间差异显著 ($P < 0.05$)。

Data in the figure are mean $\pm$ SE. Histograms with different letters indicate significant difference among different behaviors ($P < 0.05$). The same below.

2.2 意大利蜜蜂脑部多巴胺受体基因的相对表达量分析

对 4 种不同行为表现的意大利蜜蜂脑部多巴胺受体 1 基因 (*Amdop1*)、多巴胺受体 2 基因

(*Amdop2*)、多巴胺受体 3 基因 (*Amdop3*) 以及多巴胺转运体基因 (*Amdat*) 的相对表达量进行检测。在多巴胺受体 1 基因中, 哺育蜂组脑部基因表达量显著高于其它 3 组 ($P < 0.05$) (图 3)。

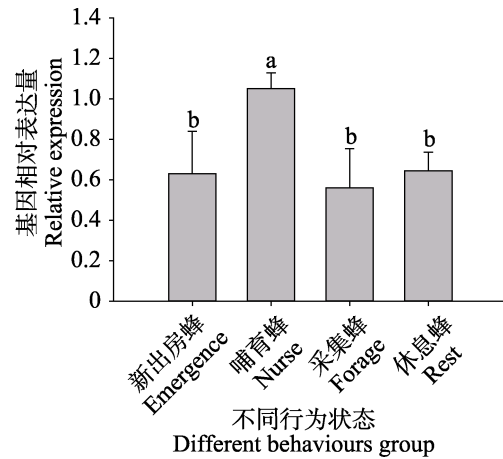


图 3 不同行为表现工蜂脑部 *Amdop1* 相对表达量检测分析

Fig. 3 The expression of dopamine receptor 1 in honey bee with worker brain with different behaviors

多巴胺受体 2 基因中, 4 组蜜蜂的基因表达量并无显著差异 ($P > 0.05$), 但哺育蜂组的表达量仍然高于其它 3 组 (图 4)。

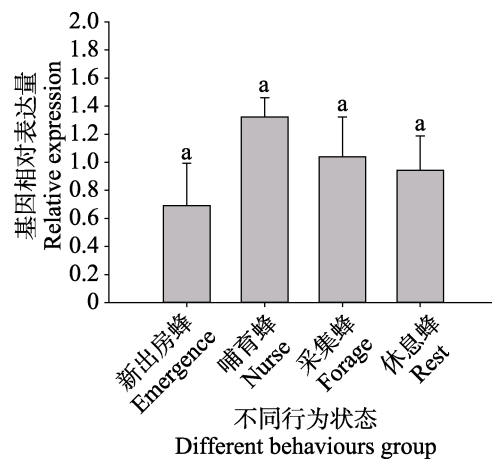


图 4 不同行为表现工蜂脑部 *Amdop2* 相对表达量检测分析

Fig. 4 The expression of dopamine receptor 2 in honey bee with worker brain with different behaviors

多巴胺受体 3 基因中, 4 组蜜蜂的基因相对表达量并无差异, 其中休息蜂表达量最高 ($P > 0.05$) (图 5)。

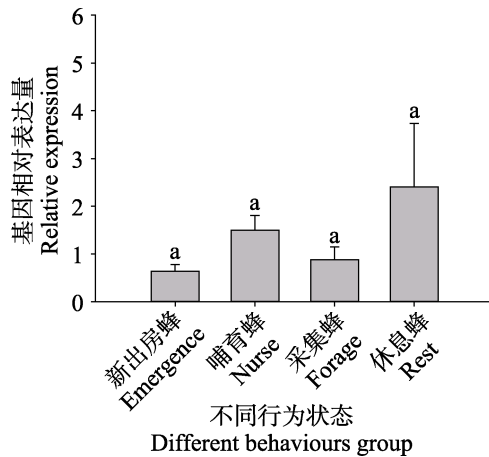


图5 不同行为表现工蜂脑部 *Amdop3* 相对表达量检测分析

Fig. 5 The expression of dopamine receptor 3 in honey bee with worker brain with different behaviors

多巴胺转运体基因中的情况与多巴胺受体 1 基因相似,同样是哺育蜂最高,并与其它 3 组差异显著 ($P < 0.05$)。由此看来,多巴胺受体 1 基因及转运体基因与工蜂哺育行为的关系更为直接;与工蜂采集行为相关的可能是多巴胺受体 3 基因;多巴胺受体 2 基因在 4 种劳动分工中表达量并无差异(图 6)。

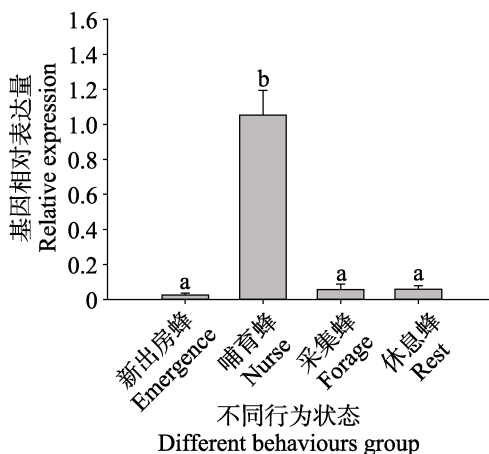


图6 不同行为表现工蜂脑部 *Amdat* 相对表达量检测分析

Fig. 6 The expression of dopamine transporter in honey bee with worker brain with different behaviors

3 讨论

在多巴胺含量和受体基因相对表达量的研

究中,哺育蜂的多巴胺含量是 4 组中最低的,并与其它 3 组差异显著,哺育蜂从巢内取食食物饲喂幼虫的行为引起脑部多巴胺的降低,这与人类抑郁症患者脑中多巴胺增加形成反差;哺育蜂脑部多巴胺受体 1、受体 2 及转运体基因的相对表达量却是 4 组中最高的,多巴胺受体基因 1 和转运体基因与其它 3 组差异显著。采集蜂脑部多巴胺含量在 4 组中含量较低;*Amdop2*、*Amdop3* 在 4 种劳动职能分工中基因相对表达量均无差异,这种情况也发生在我们后续研究的其它蜜蜂行为中,可能这两个基因在蜜蜂脑部发挥的作用较为稳定。至于神经递质的检测含量与受体基因的相对表达量为何出现不一致的情况,可能是蜜蜂脑部多巴胺含量的变化不仅仅与蜜蜂当时的行为状态有关系,蜜蜂日龄的变化以及 24 h 内不同的时间节点或许也会引起中枢神经系统多巴胺水平的变化,基因与神经递质的作用机理不同也可能是原因之一,在之后更为深入和精准的行为实验研究中,控制蜜蜂的日龄这一关键因素就显得至关重要。在我们后续的行为实验中,发现多巴胺受体 1 基因的相对表达量与多巴胺的含量并不是完全相对应,其中存在某些机制或者通路还不十分的明确,但可以肯定的是在二者之间存在某些影响因子。社会性昆虫的劳动分工具有重要的进化意义(李文峰等, 2014)。许多研究者证实蜜蜂行为转变的相关因子,工蜂的社会分工行为与群体生活需要和外界环境是同步的,比如涉及到工蜂生理、神经、脑部结构及内部化学物质激素改变(Robinson, 1992; Fahrbach *et al.*, 1995; Robinson and Vargo, 1997)。脑部基因表达(Whitfield *et al.*, 2003)。影响劳动分工的其它因素包括蜂王信息素、幼虫信息素等(Robinson, 1992)。对不同工种蜜蜂之间的生理和分子差异(哺育蜂与采集蜂)研究包括行为转变相关基因的表达差异研究(刘芳等, 2015)、保幼激素浓度、油酸乙酯量、*Period* 和 *Foraging* 基因表达量、脑部生物胺水平(侦查蜂与非侦查蜂)等。意大利蜜蜂脑部生物胺包含 5-羟色胺、多巴胺、酪胺等(黄景南等, 2018)。蜜蜂脑在

不断发生变化,在解剖中发现了不同日龄和不同行为的蜜蜂脑部或腺体的形状略有不同;在观察取样时也发现有些采集蜂回巢后并未跳舞,以上两点或许值得深入研究。另外,在神经递质受体基因表达量和定位(受体基因往往不止一个)使用组织透明化技术对蜜蜂脑部处理后用荧光标记化学物质的位置,构建立体模型等方面需要更深入的研究。正向遗传研究中利用数量性状基因坐标的方法研究蜜蜂劳动分工的其它方面(Page and Robinson, 1991)。

社会性昆虫的绝大部分物种,与日龄相关的劳动分工是以形态发育为基础(Liu *et al.*, 2015)。如红火蚁随着虫龄增长职能发生变化;酪胺、章鱼胺含量水平的增加会导致白蚁守卫蚁的攻击和防御行为高于其它白蚁(Ishikawa *et al.*, 2016)。蜂群中的劳动分工行为表现是动态变化的,蜜蜂对外界蜜粉源环境以及蜂群内部环境(比如病害等)的改变是敏感的(Liu *et al.*, 2015)。因此,进行相同日龄哺育蜂和采集蜂脑内多巴胺含量比较变得十分必要。通过组建人工蜂群并分别抓取日龄相差都在1 d以内的哺育蜂和采集蜂,以排除日龄对实验结果的可能影响,这样确保了在自然蜂群中工蜂可以根据生物学规律自然的产生劳动分工和行为现象;判断蜜蜂职能通常是通过蜜蜂行为表现,二者密不可分。随着巢内和巢外环境的不断变化,劳动分工的灵活系统对蜂群的适应性非常重要。蜂群实现健康发展并完成繁殖,蜂群日龄结构的变化是重要调控因子(Robinson, 1992)。我们对社会进化的理解受制于对社会分子基础的认知,这些关系可能存在于社会性和非社会性物种间,也存在于脊椎动物和非脊椎动物间,神经递质对于人类有着重要意义,对于蜜蜂也同样重要。当蜜蜂采集食物回巢后,对它来说意义非凡,一种来自于食物本身的奖赏,另一种是内勤蜂会接过采集蜂带回来的食物并给予采集蜂某种类似王浆酸的物质作为回报。相对于无脊椎昆虫的蜜蜂来说较为复杂的舞蹈行为,此时蜜蜂脑部的神经活动很可能极其活跃,这将为揭开无脊椎动物世界神经科学

的研究提供宝贵研究模式。探究蜜蜂劳动分工行为表现的相关脑部神经分子可对探索人类自身的脑科学和复杂社会行为的分子基础提供有价值的研究信息(李莉等, 2012)。

参考文献 (References)

- Božič J, Woodring J, 1998. Variations of brain biogenic amines in mature honeybees and induction of recruitment behavior. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 120(4): 737–744.
- Cabe SIM, Ferro MWB, Farina WM, Hrncir M, 2017. Dose- and time-dependent effects of oral octopamine treatments on the sucrose responsiveness in stingless bees (*Melipona scutellaris*). *Apidologie*, 48(1): 1–7.
- Fahrbach SE, Robinson GE, 1995. Behavioral development in the honey bee: Toward the study of learning under natural conditions. *Learning & Memory*, 2(5): 199–224.
- Huang JN, Zhang ZN, He JF, Li ZG, Zhu YN, Yu KJ, Su SK, 2018. The research progress of dopaminergic neural pathways in honeybee brain. *Apiculture of China*, 69(4): 69–72. [黄景南, 张墨楠, 何静芳, 李志国, 朱雅楠, 余岢骏, 苏松坤, 2018. 蜜蜂脑部多巴胺神经通路研究进展. 中国蜂业, 69(4): 69–72.]
- Huang ZY, Borst DW, Robison GE, 1994. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *Journal of Comparative Physiology a Sensory Neural & Behavioral Physiology*, 174(6): 731–739.
- Ishikawa Y, Aonuma H, Sasaki K, Miura T, 2016. Tyraminerpic and octopaminergic modulation of defensive behavior in termite soldier. *PLoS ONE*, 11(5): e0154230.
- Li L, Liu F, Su SK, 2012. Dopaminergic pathways and its effects on honeybee behaviors. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(4): 1061–1065. [李莉, 刘芳, 苏松坤, 2012. 多巴胺神经通路及其对蜜蜂行为的影响. 应用昆虫学报, 49(4): 1061–1065.]
- Liu F, Zong C, Yu LS, Su SK, 2015. Analysis of differentially expressed genes associated with the behavioral transition between nurses and foragers in *Apis mellifera ligustica*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 300–307. [刘芳, 宗超, 余林生, 苏松坤, 2015. 意大利蜜蜂哺育蜂与采集蜂行为转变相关基因的表达差异研究. 应用昆虫学报, 52(2): 300–307.]
- Li WF, Zhong BX, Su SK, 2014. Mechanisms of caste differentiation in honey bees. *Acta Entomologica Sinica*, 57(2): 248–256 [李文峰, 钟伯雄, 苏松坤, 2014. 蜜蜂级型分化机理.

- 昆虫学报, 57(2): 248–256.]
- Matsuyama S, Nagao T, Sasaki K, 2015. Consumption of tyrosine in royal jelly increases brain levels of dopamine and tyramine and promotes transition from normal to reproductive workers in queenless honey bee colonies. *General and Comparative Endocrinology*, 211: 1–8.
- Mustard JA, Pham PM, Smith BH, 2010. Modulation of motor behavior by dopamine and the d1-like dopamine receptor amdp2 in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 56(4): 422–430.
- Page RE, Robinson GE, 1991. The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Advances in Insect Physiology*, 23: 117–169.
- Pignatelli M, Umanah GK, Ribeiro SP, Chen R, Karuppagounder SS, Yau HJ, Stephen ME, Valina LD, Ted MD, Antonello B, 2017. Synaptic plasticity onto dopamine neurons shapes fear learning. *Neuron*, 93(2): 425–440.
- Robinson GE, 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37(1): 637–665.
- Robinson GE, Vargo E, 1997. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 559–583.
- Robinson GE, 2002. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *American Naturalist*, 160 (Suppl. 6): S160.
- Wagener-Hulme C, Kuehn JC, Schulz DJ, Robinson GE, 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A-neuroethology Sensory Neural & Behavioral Physiology*, 184(5): 471–479.
- Whitfield CW, Band MR, Bonaldo MF, Kumar CG, Liu L, Pardinas JR, Robertson HM, Soares MB, Robinson GE, 2002. Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. *Genome Research*, 12(4): 555–566.
- Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE, 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, 302(5643): 296–299.
- Zhao XM, Su SK, 2016. Applications of high performance liquid chromatography-electrochemical method in content determination of monoamine neurotransmitters and their metabolites in honeybee brains. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 45(6): 668–672. [赵晓蒙, 苏松坤, 2016. 高效液相色谱-电化学法检测蜜蜂脑部单胺类神经递质及其酸性代谢产物含量. 福建农林大学学报(自然版), 45(6): 668–672.]
- Zhao YH, Zhao XM, Su SK, 2014. New method on dissection of whole of honeybee. *Apiculture of China*, 65(1): 4–7. [赵元洪, 赵晓蒙, 苏松坤, 2014. 蜜蜂全脑解剖新方法的研究. 中国蜂业, 65(1): 4–7.]