

王浆高产蜜蜂与意大利蜜蜂卵期蛋白质组比较

李建科¹, 张 兰^{1,2}

(¹中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; ²郑州大学生物工程系, 郑州 450001)

摘要:【目的】比较王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 浆蜂) 与原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 原种意大利蜜蜂) 工蜂卵期 3 d 发育阶段蛋白质组。【方法】采用双向电泳的方法比较两个蜂种卵期发育蛋白质组。【结果】结果显示, 两个蜂种卵期 3 d 所得 6 张胶图检测到的蛋白点均具有相同的分子量与等电点范围, 分子量范围为 11.00~94.00 kD, 等电点范围为 3.40~8.60。在工蜂卵 3 d 的发育过程中, 浆蜂分别检测到 502、523 和 516 个蛋白点, 而原种意大利蜜蜂分别检测到 349、361 和 354 个蛋白点。同时, 卵期 3 天发育过程中, 两个蜂种分别检测到 180、151 和 197 个共有的表达蛋白。此外, 浆蜂还检测到 322、372 和 319 个特有蛋白, 而原种意大利蜜蜂也分别检测到 169、210、157 个特有蛋白, 这些蛋白 90% 以上都是低表达量蛋白。【结论】在工蜂胚胎发育过程中, 浆蜂有更多的基因参与表达调控, 特有蛋白可能与调节王浆产量相关的基因相关。

关键词: 蜜蜂; 王浆; 工蜂卵; 双向电泳; 蛋白质组

Comparative Analysis of the Proteome of the Egg of the Higher Royal Jelly Producing Bees (*Apis mellifera* L.) and Italian Bees (*Apis mellifera* L.)

LI Jian-ke¹, ZHANG Lan^{1,2}

(¹Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093;

²Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract: 【Objective】The purpose of the study was to investigate and compare the protein composition of the higher producing royal jelly bees (*Apis mellifera* L.) and the native Italian bees (*Apis mellifera* L.) during three days egg development of the worker bees. 【Method】Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) employed to separate and quantify proteins of the worker bees' egg development of the two bee species. 【Result】The results showed that all the expressed protein spots on the six gels with the same range of molecular weight (MW) and pI in terms of 11.00-94.00 kD and 3.40-8.60, respectively. The detected spot number on day 1, day 2 and day 3 of the higher production royal jelly worker bees were 502, 523 and 516, respectively. Whereas, the detected spot number on day 1, day 2 and day 3 of the unselected native Italian bees were 349, 361, 354, respectively. Meanwhile, there were 180, 151, 197 mutual-matched proteins between the two bee species corresponding to the eggs' 3 days development. Furthermore, 322, 372, 319 specific proteins in the higher production royal jelly bees and 169, 210, 157 specific proteins in the unselected native Italian bees, 90 percent of low abundance in both of them. 【Conclusion】The results indicate that significantly higher numbers of genes are expressed in the royal jelly producing bees than those of the Italian bee during their embryogenesis. And the specific proteins are probably concern with royal jelly production.

Key words: Honeybees; Royal jelly; Worker bee's egg; Two-dimensional gel electrophoresis; Proteome

0 引言

【研究意义】蜜蜂 (*Apis mellifera*) 具有严密的

社会组织形态, 在社会组织方面是为数不多的进化到最高级别的几个物种之一^[1]。在完全社会性的蜂群中, 雌性群体可分为蜂王和工蜂两种不同的级型, 蜂群中

收稿日期: 2007-01-10; 接受日期: 2007-09-10

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD06B04、2006BAD12B08-06) 及中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JBKY 0032007016CAAS) 和公益性行业科研专项 (nyhyzx07-041) 资助

作者简介: 李建科 (1962-), 男, 北京人, 教授, 研究方向为蜜蜂饲养学与分子生物学。Tel: 010-62591449; E-mail: apislijk@126.com

的蜂王能繁殖后代, 而不具生殖能力的雌性工蜂则从事酿造蜂蜜、哺育幼蜂、建造巢房、抵御外敌的各种蜂群劳动^[2]。不管是蜂王、雄蜂还是工蜂, 蜜蜂的所有级型均需经历卵、幼虫、蛹及成蜂 4 个发育阶段^[3]。

【前人研究进展】蜂卵约长 1.6~1.8 mm, 是直径约 0.35 mm 的长圆柱形^[4]。卵期发育过程包括从蜂卵刚被产入蜂房至孵化这一阶段, 约 72 h, 历经 10 个发育阶段^[5]。利用显微注射技术, 将一段 300 bp 长的 dsRNA 注入胚前期的蜂卵, 可在胚胎期阻断目的基因表达^[6]。将 dsRNA 注入胚前期蜂卵, 可阻断所有发育阶段的基因表达。例如, 将一段编码卵黄蛋白原的长 504 bp 的 dsRNA 注入蜂卵, 由此发育而成的工蜂的卵黄蛋白原 mRNA 表达水平降低了 15%^[7]。最近, 有关人员发现了一种可以在体外长期培养蜜蜂胚胎细胞的方法, 利用该方法已经成功将蜜蜂前肠胚期细胞在体外进行培养, 并维持有丝分裂活性 3 个多月^[8]。另有研究表明, 蜜蜂胚胎发育早期存在 *vasa* 和 *nanos* RNA, 但是这两个 RNA 很快就消失了, 在胚胎的第 2 阶段过后细胞中即不见这两种 RNA 表达。但在胚胎期的第 9 阶段, 这两个消失的 RNA 又重新出现于背索闭合后的生殖隆起处^[9]。【本研究切入点】作为研究发育生物学、衰老^[10]、社会行为^[11]、神经生物学^[12]等领域的模式生物, 蜜蜂 (*Apis mellifera*) 得到越来越多的关注。近期, 蜜蜂基因组的成功测序对于蜜蜂遗传以及与其它物种之间的比较提供了途径^[2], 这加速蜜蜂 (包括胚胎期) 蛋白质组的进展。【拟解决的关键问题】本试验通过比较浆蜂与原种意大利蜜蜂卵期蛋白质组, 希望能对王浆高产分子机理从蛋白质组水平上进行一些探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂

固相 pH 梯度 (IPG) 胶条 (pH 3-10, 线性)、双向凝胶电泳 (2-DE) 蛋白分子量标准、Bio-lyte (pH3-10)、矿物油均购于伯乐公司。Tris 碱、过硫酸铵 (AP)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、甘氨酸、TEMED 均购自 Sigma 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、考马斯亮兰 (CBB) G-250、硫脲、CHAPS、牛血清白蛋白 (BSA) 购于 Amresco 公司。琼脂糖和尿素买自 Solarbio 公司。DTT、碘乙酰胺来自 Merk 公司。

1.2 取样

浆蜂纯种蜂王来自中国浙江省平湖。而原种意大

利蜜蜂纯种蜂王来自意大利佛罗伦萨。

试验蜜蜂饲养在中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场。将蜂王连同一张空巢脾一同放入蜂王产卵控制器 (仅能放一张巢脾, 工蜂可以自由出入而蜂王无法通过的一种塑料或竹制容器) 中, 使蜂王在巢脾上产卵 5 h 以供 3 d 取样。5 h 时将巢脾由控制器中提出, 蜂王置于其他巢脾上, 再将已经产有蜂卵的巢脾 (不含蜂王) 放回控制器, 一同放入蜂箱。24 h 时取 1 日龄工蜂卵放入 1.5 ml Ep 管中。已取过 1 日龄工蜂卵的巢脾重新放回蜂王控制器, 一同放入蜂箱, 分别于 48、71 h 取 2 日龄、3 日龄工蜂卵。每次的取样量为 280 粒工蜂卵。

1.3 蛋白提取

蛋白提取方法根据钟伯雄等^[13]报道的方法稍做改良。每 1 mg 工蜂卵中加入 10 μ l 磷酸缓冲液 (pH 7.6, 含 32.5 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄, 2.6 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 400 mmol·L⁻¹ NaCl), 冰上研磨 20 min, 超声 2 min。然后 4℃, 12 000 g, 离心 10 min; 接着 4℃, 15 000 g, 再离心 10 min。取上清液放入另一 1.5 ml Ep 管中, 沉淀中按照每 1 mg 工蜂卵中加入 2 μ l 上述的磷酸缓冲液, 4℃, 15 000 g, 离心 10 min。取上清与上步所得上清合并, 作为磷酸易溶性蛋白溶液备用。沉淀中按每 1 mg 工蜂卵中加入 10 μ l 蛋白裂解缓冲液 (8 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol·L⁻¹ Tris 碱, 30 mmol·L⁻¹ DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10), 冰上研磨 10 min, 超声 2 min。4℃, 15 000 g, 离心 10 min。取上清作为磷酸难溶性蛋白溶液与上述磷酸易溶性蛋白溶液合并, 沉淀弃去。在混合上清液中加入 100% TCA 使其终浓度达到 10%, 冰上静置 10 min, 以沉淀蛋白并除去样品中的盐份。将此混合液在 4℃, 15 000 g, 每次 10 min, 离心 2 次。弃去上清液, 沉淀中按每 1 mg 工蜂卵中加入 4 μ l 上述的蛋白裂解缓冲液, 冰上研磨 5 min, 超声 2 min, 使混合液充分溶解, 用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调溶液 pH 至中性, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或是 -70℃ 冷藏备用。

1.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度按照 Bradford^[14]介绍的方法进行测定。使用 BSA 做标准曲线, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

1.5 双向电泳 (2-DE)

45 μ l 蛋白样品溶液与 55 μ l 蛋白裂解缓冲液及 120 μ l 水化上样液 (8 mol·L⁻¹ 尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚兰, 65 mmol·L⁻¹ DTT, 0.2% Bio-lyte pH 3~

10) 充分混合。取上述混合液 400~430 μl (使每个样品均含蛋白 470 μg) 上样。使用 17 cm IPG 胶条 (pH 3~10, 线性), 在 18 $^{\circ}\text{C}$ 按以下程序进行第一向等电聚焦 (Protean IEF Cell system, Bio-Rad Hercules, CA, USA): 50V 电压下, 水化 14 h; 500 V 电压下, 每次 30 min, 除盐 4 次; 1 000 V 电压下, 1 h 再除盐 1 次; 线性升压 5 h 至 9 000 V; 9 000 V 电压下, 聚焦 60 000 V·h。第一向聚焦结束后, 将 IPG 胶条放入平衡缓冲液 I (6 mol·L $^{-1}$ 尿素, 0.375 mol·L $^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS, 2% DTT) 中 12.5 min。然后将 IPG 胶条转入平衡缓冲液 II (6 mol·L $^{-1}$ 尿素, 0.375 mol·L $^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS, 2.5% 碘乙酰胺) 中 15 min。平衡后 IPG 胶条转移到 1 mm 厚 12% T 的分离胶上, 20 μl 2-DE 蛋白分子量标准加到上样滤纸上后, 放在胶条的酸性端开始进行第二向 SDS-PAGE 电泳。第二向电泳采用 Protean II Xi Cell (Bio-Rad Hercules, CA, USA), 以 25 mA/IPG 胶的恒流运行电泳, 直到溴酚兰指示前沿跑出分离胶, 结束第二向电泳。凝胶使用 CBB G-250 进行染色。

1.6 图像分析

染色后凝胶使用透射模式进行扫描, 扫描结果直接导入计算机 (32 位, 300 dpi 分辨率, 全彩)。扫描图像使用 PDQuest V 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行分析。

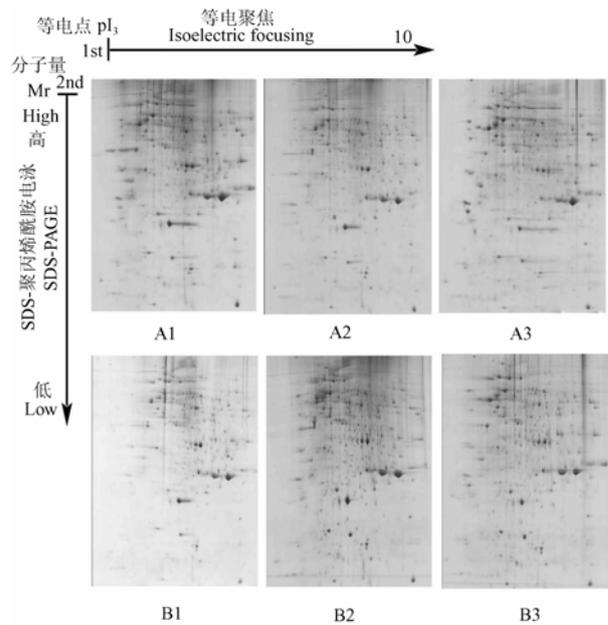
2 结果与分析

2.1 浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂卵期 3 d 的 2-DE 电泳图谱

图 1 所示 6 张胶图分别对应浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂 1 日龄、2 日龄及 3 日龄卵期 2-DE 电泳图谱。6 张胶图使用 PDQuest 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 相同参数 (灵敏度 16.93, 尺寸规模 9) 进行分析。分析结果显示, 两个蜂种不同日龄可检测到的蛋白具有相似的分子量 (11.00~94.00 kD) 及等电点 (3.40~8.60) 范围。浆蜂卵期 3 d 分别检测到 502、523 和 516 个蛋白点, 而原种意大利蜜蜂在相应阶段分别检测到 349、361 和 354 个蛋白点 (图 2)。

2.2 浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂卵期 3 d 蛋白比较

通过对比浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂 1 日龄卵 2-DE 电泳图可以看出, 1 日龄卵可检测出 180 个共有蛋白, 这些共有蛋白表达量由低到高, 范围分布较宽 (图 1-A1, B1), 另外还能看出有一半的蛋白在浆蜂中表达量较高, 而另一半蛋白在原种意大利蜜蜂中表

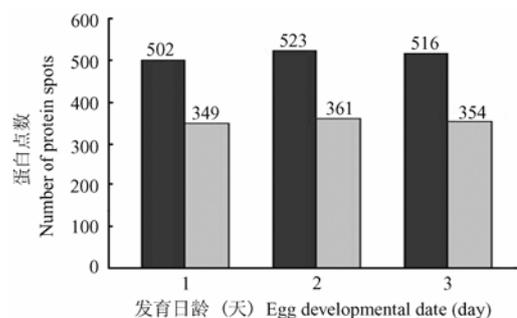


A1、A2、A3 分别代表浆蜂 1 日龄、2 日龄及 3 日龄蛋白表达图谱; 而 B1、B2、B3 分别代表原种意大利蜜蜂 1 日龄、2 日龄及 3 日龄蛋白表达图谱。每个样品上样 470 μg , CBB G-250 染色

(A1), (A2), (A3) are the protein profile corresponding to day 1, day 2 and day 3 of the higher production royal jelly bees (*Apis mellifera* L.), respectively. And (B1), (B2), (B3) are the protein profile corresponding to day 1, day 2 and day 3 of the native Italian bees (*Apis mellifera* L.), respectively. 470 μg of each sample were subjected to 2-DE and stained by CBB G-250

图 1 浆蜂与原种意大利蜜蜂卵期发育蛋白表达图谱

Fig. 1 Profile of the 2-DE analysis of the worker bees' eggs both the higher production royal jelly honeybees and the native Italian honeybees on the different days



图中深色柱状代表浆蜂, 而浅色柱状代表原种意大利蜜蜂
Dark and light bars represent the higher production royal jelly bees (*Apis mellifera* L.) and the native Italian bees (*Apis mellifera* L.), respectively

图 2 浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂卵期 3 d 可检测到的所有蛋白点数

Fig. 2 The number of the detected protein spots of the worker bees' eggs both the higher production royal jelly honeybees and the native Italian honeybees on the different days

达量较高。同时, 这些共有蛋白还具有较宽的分子量范围(11.00~94.00 kD)及较窄的等电点范围(78%以上的蛋白等电点都处于5.00~8.00之间)。除共有蛋白外, 浆蜂在1日卵期还检测出322个特有的表达蛋白, 而原种意大利蜜蜂检测到169个特有蛋白。

同样的方法对比浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂2日龄及3日龄卵2-DE电泳图可以看出, 2日龄卵可检测出151个共有蛋白, 这些共有蛋白表达量由低到高, 范围分布较宽(图1-A2, B2), 另外还能看出有一半的蛋白在浆蜂中表达量较高, 而另一半蛋白在原种意大利蜜蜂中表达量较高。同时, 这些共有蛋白还具有较宽的分子量范围(11.00~94.00 kD)及较窄的等电点范围(79%以上的蛋白等电点都处于5.00~8.00之间)。此外, 浆蜂在2日卵期检测出372个特有蛋白, 而原种意大利蜜蜂检测到210个特有的表达蛋白。

3日龄卵期可检测出197个共有表达蛋白, 这些共有蛋白表达量由低到高, 范围分布较宽(图1-A3, B3), 另外还能看出有一半的蛋白在浆蜂中表达量较高, 而另一半蛋白在原种意大利蜜蜂中表达量较高, 这些共有蛋白还具有较宽的分子量范围(11.00~94.00 kD)及较窄的等电点范围(75%以上的蛋白等电点都处于5.00~8.00之间)。除这些共有蛋白, 浆蜂在3日卵期检测出319个特有蛋白, 而原种意大利蜜蜂检测到157个特有蛋白。

3 讨论

自从20世纪80年代中国由意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.)中成功的选育出浆蜂以来^[15,16], 浆蜂已经成为世界上王浆产量最高的蜂种, 并成为全球蜂王浆的主要生产蜂种。几十年来, 中国从表型^[17-22]、分子生物学^[16]及数量遗传^[23,24]水平上对浆蜂进行了大量研究。本课题首次从蛋白质组学的角度利用双向电泳技术对浆蜂与原种意大利蜜蜂工蜂卵期发育阶段蛋白质组进行比较研究。由于这两个蜂种是同一亚种, 同属意大利蜜蜂, 除王浆产量不同外, 在体形、体色、卵重、形态结构及蜂蜜产量等方面都具有相同的特性^[17-19], 因此将原种意大利蜜蜂作为对照品种研究浆蜂的卵期发育, 在选材上是较合理的。

两蜂种准备取样前同时将蜂王关在产卵控制器内且同时将蜂王从产卵控制器内放出; 也采用相同的方法取样及提取蛋白, 因此卵的发育基本是同步的。而且利用高通量的双向电泳设备同时对6个样品进行分离及分析, 这些都尽量避免了取样和实验过程引起的

误差。

试验结果表明在工蜂卵期发育阶段, 浆蜂3d分别可检测到502、523及516个蛋白, 而原种意大利蜜蜂分别检测到349、361和354个蛋白(图2)。也就是说, 浆蜂卵期3d分别比原种意大利蜜蜂多检测到153、162、162个蛋白。此结果表明, 较原种意大利蜜蜂而言, 浆蜂在胚胎期有更多的基因参与表达。浆蜂卵期发育3d分别检测到322、372和319个特有蛋白, 这些特有蛋白90%以上都是低丰度蛋白, 而原种意大利蜜蜂检测到169、210、157特有蛋白, 90%以上也是低丰度蛋白。尽管王浆产量是可遗传的数量性状^[23,24], 即产浆性状由多基因位点的累积效应调控, 是否这些差异蛋白就与王浆产量相关还需进一步实验验证。

本文仅是对两蜂种卵期蛋白质组研究的一个初步报道。为了探明与王浆高产相关的基因功能, 将会进一步对目的蛋白进行鉴定及功能验证。

4 结论

试验结果表明, 浆蜂较未经王浆高产选育的原种意大利蜜蜂在3d的卵期发育过程中检测出的蛋白数量明显增加; 在浆蜂卵期发育3d分别检测出322、372和319个特有蛋白, 而原种意大利蜜蜂检测出169、210、157特有蛋白, 这些特有蛋白90%以上都是低丰度蛋白, 表明浆蜂的卵期发育较原种意大利蜜蜂基因表达更加活跃。同时也表明浆蜂在适应中国自然条件和人工选育过程中卵的发育与原种意大利蜜蜂产生了差异, 究竟那些差异蛋白直接与王浆产量有关还有待进一步研究。

References

- [1] Wilson E O, Holldobler B. Eusociality: origin and consequences. *Proc Proceedings National Academy of Sciences USA*, 2005, 102: 13367-13371.
- [2] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443: 931-949.
- [3] Joe M G. *The Hive and the Honey Bee*. Illinois: Dadant & Sons, INC., 1992.
- [4] DuPraw E J. *The Honeybee Embryo*. New York: Crowell, 1967.
- [5] Fleig R, Sander K. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea): a SEM study. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1986, 15: 449-462.

- [6] Beye M, Poch A, Burgtorf C, Moritz R F A, Lehrach H A. Gridded genomic library of the honeybee (*Apis mellifera*): A reference library system for basic and comparative genetic studies of a hymenopteran genome. *Genomics*, 1998, 49: 317-320.
- [7] Amdam G V, Simões Z L P, Guidugli K R, Norberg K, Omholt S W. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Developmental Biology*, 2003, 3: 1. [http://www.biomedcentral.com/1472-6750/3/1]
- [8] Bergem M, Norberg K, Aamodt R M. Long-term maintenance of *in vitro* cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6: 17. [http://www.biomedcentral.com/1471-213X/6/17]
- [9] Peter K Dearden. Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); Vasa and Nanos expression. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6:6. [http://www.biomedcentral.com/1471-213X/6/6]
- [10] Amdam G V, Omholt S W. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, 216: 209-228.
- [11] Robinson G E, Grozinger C M, Whitfield C W. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6: 257-271.
- [12] Heisenberg M. Mushroombody memoir: from maps to models. *Nature*, 2004, 4: 266-275.
- [13] Zhong B X, Li J K, Lin J R, Liang J S, Su S K, Xu H S, Yan H Y, Zhang P B, Fujii H. Possible effect of 30K proteins in embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37(5): 355-361.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(5): 248-254.
- [15] Chen S L, Li J K, Zhong B X, Su S K. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(10): 1037-1044.
- [16] Li J K, Wang A P. Comprehensive technology for maximizing royal jelly production. *American Bee Journal*, 2005, 145(8): 661-664.
- [17] 陈世壁, 韩胜名. “浆蜂”生产性能考察试验总结. 中国养蜂, 1992, 43(3): 2-5.
Chen S B, Han S M. Summary of the production capacity of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1992, 43(3): 2-5. (in Chinese)
- [18] 沈基楷, 肖体元. 浙农大 A 系意蜂生产性能考察试验报告. 中国养蜂, 1993, 44(1):4-6.
Shen J K, Xiao T Y. Experimental report on the production performance of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1993, 44(1): 4-6. (in Chinese)
- [19] 陈盛禄, 林雪珍. 浙农大 A 系意蜂王浆高产试验. 中国农业科学, 1995, 28(5): 89-93.
Chen S L, Lin X Z. Experiment on the higher production royal jelly bee. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(5): 89-93. (in Chinese)
- [20] 徐祖荫, 邵峰泉, 李上星, 陈学晴. 西方蜜蜂蜜浆高产杂交优势利用研究. 中国养蜂, 2000, 51(1): 10-12, 18.
Xu Z Y, Shao F Q, Li S X, Chen X Q. Study on utilizing of the cross-breed in higher honey and royal jelly production western honeybees (*Apis mellifera* L.) (I). *Apiculture of China*, 2000, 51(1): 10-12, 18. (in Chinese)
- [21] 徐祖荫, 邵峰泉, 张瑞文, 李江生, 李宏清, 赵伟亚, 陈学晴. 西方蜜蜂蜜浆高产杂交优势利用研究(二). 中国养蜂, 2001, 52(2): 9-11.
Xu Z Y, Shao F Q, Zhang R W, Li J S, Li H Q, Zhao W Y, Chen X Q. Study on utilizing of the cross-breed in higher honey and royal jelly production western honeybees (*Apis mellifera* L.) (II). *Apiculture of China*, 2001, 52(2): 9-11. (in Chinese)
- [22] 刘艳荷, 陈盛禄, 钟伯雄. 西方蜜蜂王浆产量与品质性状的配合力和杂种优势分析. 遗传学报, 2001, 28(10): 926-932.
Liu Y H, Chen S L, Zhong B. The combining ability and heterosis analysis of royal jelly yield and quality properties in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(10): 926-932. (in Chinese)
- [23] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂咽下腺与繁殖力的发育遗传研究. 中国畜牧杂志, 2003, 39(6):9-11.
Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analysis for developmental behavior of reproductive ability and hypopharyngeal gland in western honey bees (*Apis mellifera* L.). *Chinese Journal of Animal Science*, 2003, 39(6): 9-11. (in Chinese)
- [24] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂产浆量的动态遗传研究. 遗传学报, 2003, 30(6): 547-554.
Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analysis for developmental behavior of honeybee colony's royal jelly production traits in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(6): 547-554. (in Chinese)