

蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素鉴定及其生物合成通路

何旭江, 江武军, 颜伟玉, 曾志将

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 【目的】蜜蜂幼虫在饥饿状态下会通过释放特定信息素来向外界传递饥饿信号, 称为蜜蜂幼虫饥饿信息素 (hunger pheromone)。论文旨在研究西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素化学成分及在幼虫体内的生物合成通路, 明确蜜蜂幼虫与成年蜂之间的化学信息素交流机制。【方法】采集 2 日龄与 4 日龄西方蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫及其食物, 将其分为饥饿组、饲喂组与纯食物组。饲喂组幼虫平躺在预先准备好的食物表面, 饥饿处理组则不提供食物。所有样品分别放入 20 mL 密封采样瓶中并在 35℃ 条件下放置 45 min。利用 Needle trap 技术从样品瓶中采集 10 mL 气体, 富集气体中的挥发性化学物质。在气质联用进样口以 250℃ 高温将富集的化学物质解离, 并通过气质联用技术分析鉴定蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素。同时, 采用 RNA-Seq 技术分析饥饿信息素在蜂王与雄蜂幼虫体内的生物合成通路及相关基因表达。【结果】从蜂王与雄蜂幼虫中分别分析鉴定出 10 种与 9 种信息素, 其中蜂王幼虫含有一种特有的幼虫信息素——2-庚酮, 且在蜂王食物中含量最高。E- β -罗勒烯在蜂王与雄蜂幼虫各饥饿组含量均显著高于其饲喂幼虫组与食物组, 表明蜂王与雄蜂幼虫均以 E- β -罗勒烯为其饥饿信息素。2 日龄蜂王与雄蜂幼虫饥饿组 E- β -罗勒烯含量均差异不显著, 但 4 日龄蜂王幼虫饥饿组 E- β -罗勒烯含量显著低于雄蜂幼虫组。其余 8 种信息素为肉豆蔻酸、棕榈酸、甲基棕榈酸酯、硬脂酸、棕榈油酸、十五烷酸、乙酸与乙酸乙酯, 均未出现饥饿组高于其他两组的规律。其中乙酸乙酯与乙酸在食物组与饲喂组含量高于饥饿组, 推测其可能来自于幼虫食物。RNA-Seq 结果表明蜂王与雄蜂幼虫通过甲羟戊酸途径由乙酰辅酶 A 从头合成 E- β -罗勒烯。发现 *Geranylgeranyl pyrophosphate synthase-like* 与 *Farnesyl pyrophosphate synthase* 等 9 个基因参与该通路, 但在饥饿组与其饲喂组幼虫中表达差异均不显著。【结论】蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫利用 E- β -罗勒烯作为其饥饿信息素乞求食物, 并且在体内从头合成 E- β -罗勒烯。工蜂利用 2-庚酮标记蜂王幼虫, 但未对雄蜂幼虫进行标记。

关键词: 西方蜜蜂; 饥饿信息素; E- β -罗勒烯; 生物合成; 表达分析

Identification and Biosynthetic Pathway of a Hunger Pheromone in Honeybee Queen and Drone Larvae

HE Xu-jiang, JIANG Wu-jun, YAN Wei-yu, ZENG Zhi-jiang

(Institute of Honeybee, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to identify the hunger pheromone of honeybee queen and drone larvae and its biosynthetic pathway, which would enormously contribute to understanding of the mechanism of communication between adults and larvae in honey bees *Apis mellifera*. 【Method】 Two- and four-day-old queen and drone larvae and their food were collected and divided into three groups: fed larvae, starving larvae and food. For the fed larvae they were lain on their relative foods prepared in advance, and for the starving larvae their foods were totally deprived. All samples were immediately put into 20 mL sealed glass bottles and were kept in an incubator under 35℃ for 45 min. Afterward, a needle trap system was employed to extract

收稿日期: 2016-06-07; 接受日期: 2016-08-03

基金项目: 国家蜂产业技术体系 (CARS-45-KXJ12)、江西省科技落地计划 (KJLD13028)、江西省研究生创新专项基金 (YC2014-B033)

联系方式: 何旭江, E-mail: hexujiang3@163.com。江武军, E-mail: 1165703453@qq.com。何旭江和江武军为同等贡献作者。通信作者曾志将, E-mail: bees1965@sina.com

10 mL gas from those bottles and the volatile chemicals were enriched in needles. The needles were injected into a gas chromatography-mass spectrometry system and the chemicals were dissociated by a high temperature of 250°C for identifying the hunger pheromone of honeybee queen and drone larvae. RNA-Seq was used for identifying the biosynthetic pathway of their hunger pheromone and the expression of related genes. 【Result】 Nine and ten chemicals were identified in drone larvae and queen larvae, respectively, in which queen larvae had one more chemical (2-heptanone) that was the highest royal jelly. E- β -ocimene was identified as the hunger-signal pheromone of queen and drone larvae, since their starving larvae had significantly more E- β -ocimene than related fed larvae. The E- β -ocimene released from queen and drone starving larvae was not significantly different at 2-day-old, but queen larvae released significantly less E- β -ocimene than drone larvae at 4-day-old. Other eight chemicals were myristic acid, palmitic acid, methyl palmitic ester, stearic acid, palmitoleic acid, pentadecanoic acid, acetic acid and ethyl acetate, but did not show a clear pattern that significantly more amount of these chemicals were detected in starving larvae released than fed larvae and food groups. Acetic acid and ethyl acetate were detected higher in food and fed larvae groups compared to starving larvae groups, indicating that these two chemicals may be from their food rather themselves. RNA-Seq analysis showed that there was a *de novo* E- β -ocimene biosynthetic pathway in queen and drone larvae via a mevalonate pathway. Nine genes such as *Geranylgeranyl pyrophosphate synthase-like* and *Farnesyl pyrophosphate synthase* were involved in this biosynthetic pathway, but all these genes were not significantly differentially expressed between starving larvae and their relative fed larvae. 【Conclusion】 Honeybee queen and drone larvae both use E- β -ocimene as their hunger pheromone for food begging, and they have a *de novo* E- β -ocimene biosynthetic pathway. Further, nurse honeybees specifically use 2-heptanone to mark queen larvae for guiding other nurses. This study will enrich our understanding of the biological characteristics of honeybees.

Key words: *Apis mellifera*; hunger pheromone; E- β -ocimene; biosynthetic pathway; gene expression

0 引言

【研究意义】蜜蜂是一种真社会性昆虫，其内部具有一套十分完整的信息交流系统，保证群体与个体能够正常生长、发育与繁衍^[1]。研究蜜蜂蜂群内部的信息交流机制是深入探索其社会性的重要内容，也可对人类及其他动物的社会性研究提供科学借鉴。【前人研究进展】蜜蜂的信息交流主要分为舞蹈语言系统与化学语言系统。其中蜜蜂信息素是蜂群内社会管理、婚飞交尾、个体交流以及报警防卫等主要交流媒介^[2-6]。例如，蜂王利用反式-9-氧代-2-癸烯酸（(2E)-9-oxodecenoic acid）等 9 种蜂王信息素来引起工蜂的侍从行为、雄蜂的追逐行为以及参与蜂群的社会管理^[7-9]；工蜂利用牻牛儿醇（geraniol）、橙花醛（neral）和金合欢醇（farnesol）信息素招引处女王与工蜂回巢，招引本群的工蜂结团，以及招引其他工蜂前来采集^[10-11]；而蜜蜂幼虫利用甲基棕榈酸酯（methyl palmitate）与甲基油酸酯（methyl oleate）等 10 种表皮信息素可以诱导工蜂封盖幼虫巢房行为与刺激工蜂出巢采集等^[12]。在正常蜂群中，哺育蜂每天需要饲喂大量幼虫以保证整个蜂群的正常繁衍。HE 等^[13]研究表明工蜂幼虫利用信息素 E- β -罗勒烯（E- β -ocimene, C₁₀H₁₆）向其哺育蜂乞求食物，并发现了该饥饿信息素（hunger pheromone）的生物合成通路。然而，蜂群中含有蜂王、工蜂与雄蜂，称为三型

蜂，它们在发育过程中所需的食物存在明显差异。蜂王幼虫在 5 d 饲喂期均食用蜂王浆，而工蜂与雄蜂幼虫在 1—3 日龄时采食工蜂浆与雄蜂浆，4—5 日龄采食蜂蜜与花粉混合而成的蜂粮^[14]。有研究表明蜂王浆与工蜂浆及雄蜂浆成分不同，且即使是同一类型的蜜蜂幼虫，每天采食的王浆在成分与数量上也存在显著差异^[14-17]。【本研究切入点】蜂王与雄蜂幼虫如何进行乞食，其乞食信息素成分是否有所不同？哺育蜂又是如何区分三型蜂幼虫以及其日龄，并饲喂以不同成分的食物？针对上述问题，利用 Needle trap 与气质联用技术，分析鉴定蜂王与雄蜂幼虫的饥饿信息素，并利用 RNA-Seq 技术分析鉴定蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素的生物合成通路。【拟解决的关键问题】通过分析鉴定蜂王与雄蜂幼虫的饥饿信息素，并对比两者之间的饥饿信息素差异，从而深入探索蜂群内蜜蜂幼虫的乞食行为及哺育蜂的饲喂行为机制。

1 材料与方法

信息素鉴定试验于 2014 年 4—6 月在南京中医药大学完成，转录组测序试验于 2014 年 4—7 月在北京百迈克生物科技有限公司完成。

1.1 供试昆虫

信息素鉴定试验使用 3 个西方蜜蜂（*Apis mellifera*）种群，饲养于南京中医药大学（32.6°N，118.56°E）。RNA-Seq 试验使用西方蜜蜂 3 个种群，

饲养于江西农业大学蜜蜂研究所(28.46°N, 115.49°E)。试验蜜蜂蜂群参照西方蜜蜂的营养标准进行饲养^[18]。

1.2 气质联用标准曲线的建立

利用捕集针(Needle trap)系统(德国PAS科技公司)与气质联用仪(安捷伦公司, 7890A/5975C)结合来鉴定并精确定量蜜蜂饥饿信息素, 在试验前首先建立了标准曲线。从Sigma公司购得内标物1-壬烯(CAS: 124-11-8, C₉H₁₈, 纯度>99.5%)与标准物E-β-罗勒烯(CAS: 13877-91-3, C₁₀H₁₆, 纯度>90%)。将2 μL的1-壬烯配入20 mL的无水乙醇(南京化学试剂股份有限公司, 分析纯)中, 并分为6组, 每组分别加入0、1、2、4、8和16 μL的E-β-罗勒烯, 振荡搅匀。用移液枪从各组中选取2 μL溶液, 并迅速移入20 mL采样瓶中, 封盖后立即放入35℃培养箱(扬州三发电子有限公司, SHP-250)中放置45 min。然后利用捕集针从采样瓶中吸取10 mL气体, 注入气质联用仪进行分析。结果表明DB-5与VOC的标准曲线R²值为0.9916与0.9926, 均>0.99, 符合气质联用一般的曲线标准^[19]。

1.3 幼虫样品的采集

利用免移虫产卵技术^[20-21], 控王产卵12 h, 并将卵移到王台中进行培育蜂王, 在2日龄与4日龄幼虫期取蜂王幼虫, 做进一步试验分析; 利用同群已婚飞交尾的成年蜂王, 在预先准备好的雄蜂巢脾上控王产卵12 h。控王产卵时, 将蜂王用隔王栅隔离在单一的雄蜂巢脾上, 并放在蜜蜂平箱群所有巢脾的最内侧, 使其产卵。在雄蜂幼虫发育到2日龄与4日龄幼虫期, 采集样品进行试验。

信息素鉴定试验中, 利用移虫针在30℃室温条件下采集20只2日龄蜂王或雄蜂幼虫, 立即放入20 mL采样瓶中, 并迅速加入2 μL 1-壬烯内标溶液(v : v=1 : 10 000)。在35℃的培养箱中放置45 min, 作为饥饿幼虫组; 另外采集20只幼虫, 放入之前已经铺好2日龄蜂王浆或雄蜂浆的采样瓶中, 使每只幼虫横躺在王浆表面, 加入内标后放置到培养箱45 min, 作为饲喂组; 最后采集2日龄蜂王浆或雄蜂浆到采样瓶中, 作为对照组。饥饿45 min后, 利用捕集针从采样瓶中采集10 mL气体, 并注入气质联用仪进行分析。每个样品采集时间严格控制在5 min内。每组样品采集12个平行样, 其中6个样品由DVB、PDMS与CAR1000捕集针采集, 剩余6个样品由脂肪酸型捕集针采集。由于4日龄工蜂个体较大, 每个样品只采集10只幼虫。

分别取2日龄与4日龄蜂王、雄蜂幼虫, 进行饥饿与饲喂处理45 min, 然后立即液氮冷冻, 用于RNA-Seq试验。

1.4 Needle Trap与GC-MS分析

利用捕集针(Needle trap)技术与气质联用系统分析鉴定蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素。将捕集针一头插入密闭的20 mL采样瓶, 一头连接采集器, 从采样瓶中抽取气体。本试验利用20 MPa的压强以5 mL·min⁻¹的速度从采样瓶中采集10 mL气体。采集时将采样瓶放入35℃的温控装置中恒温采集。捕集针为极性(DVB、PDMS与CAR1000)与非极性(脂肪酸)两种, 分别配对DB-5(长度30 m, 直径25 μm)与VOC柱子(长度30 m, 直径25 μm)分离柱。

采集好的捕集针立即注入安捷伦公司生产的7890A/5975C型气质联用仪。通过摸索, 按如下最佳程序进样分析: 进样口温度为250℃; 柱温程序为35℃保持2 min, 然后以8℃·min⁻¹的速度从35℃上升至250℃, 最后250℃保持5 min。离子源为电子轰击源(electron impact ionization, EI), 流动相为氦气。氦气气压保持6.7776 psi。获得的化学物质离子图谱采用NIST32I数据库进行比对, 最终鉴定出捕集针中所吸附的挥发性化学物质。在进样时取一个1 mL容量的无菌注射器, 从气质联用仪中抽取1 mL氦气, 然后与采集完样品的捕集针相连, 并手动插入气质联用仪的进样口, 30 s内将1 mL氦气缓缓注入气质联用仪。该处理可使捕集针中的化学物质完全洗脱, 进入气质联用仪分析。

1.5 RNA-Seq

采集蜂王与雄蜂2日龄与4日龄幼虫的饥饿组与饲喂组幼虫, 进行RNA-Seq测序, 获得饥饿信息素的生物合成通路及调控基因。按标准TRLzol Reagent方法提取RNA(Life technologies, California, USA), 用于RNA-Seq测序分析。利用3群西方蜂群, 每个试验组含有3个生物学重复。

首先, 利用TRLzol法提取样品的总RNA, 再通过NEBNext Poly(A) mRNA磁性分离技术(NEB, E7490)分离出所需的mRNA。将mRNA反转录为cDNA, 并连接到Illumina上构建上机文库。制备好的文库用1.8%琼脂糖凝胶电泳进行检测文库插入片段大小, 然后用Library Quantification Kit-Illumina GA Universal(Kapa, KK4824)进行qPCR定量。检测合格的文库在illumina bot上进行簇的生成, 最后用Illumina HiSeqTM 2500进行测序。

为了保证测序结果的高度准确性，去除了未知碱基比率 >5% 的 reads，只保留测序错误率 <1% 的 reads (Q20 > 98%)。然后利用 Tophat2 软件^[22]将所获得的所有 clean reads 与蜜蜂基因组 (OGSv3.2) 进行比对。比对后的各个基因对应的 reads 在 cufflinks 软件^[23]中对其表达量水平进行估计，并以 FPKM 值来记录每个基因的表达量。最后，利用 DESeq 差异分析与 Q-value 统计方法来比对饥饿组与饲喂组之间基因的 reads 数，最终获得差异表达基因。当 FDR 值 < 0.05 且 $\lg 2 \geq 1.5$ 时，即为基因表达存在显著差异^[24]。使用 BLAST 软件对提取的基因序列与 nr、SwissProt、GO、COG 与 KEGG 数据库进行比对，获得各基因的注释信息。

1.6 数据统计方法

气质联用实验所获得的数据全部利用“ANOVA or ANCOVA”在 Statview 5.01 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 软件中进行比较分析。

2 结果

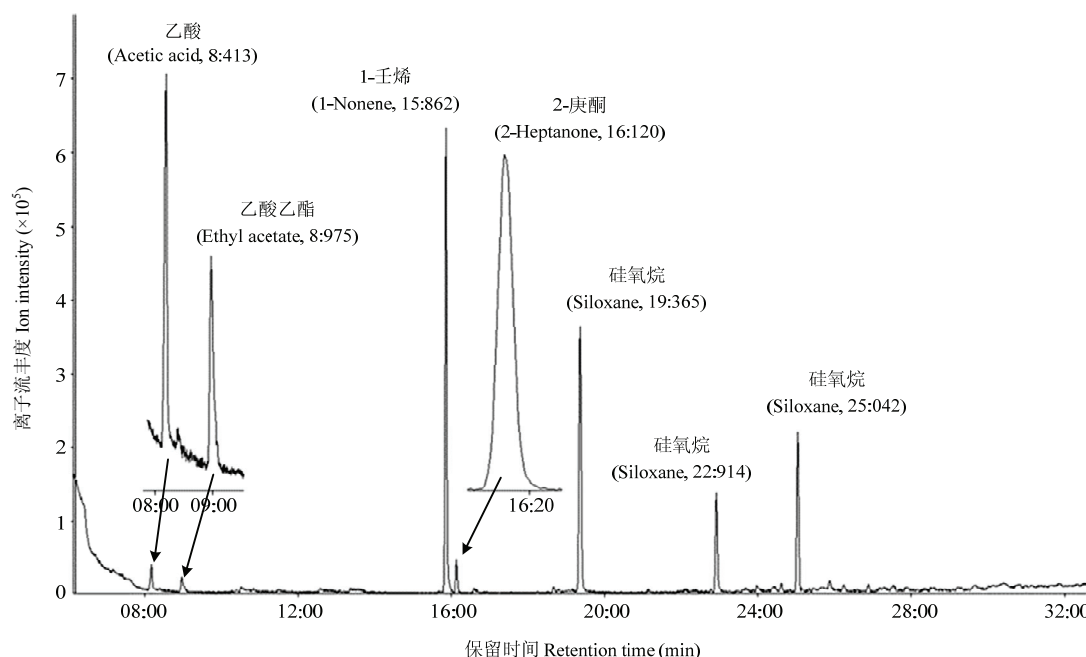
2.1 蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素鉴定

通过 Needle trap 与气质联用系统分析，从 2 日龄

与 4 日龄的雄蜂幼虫中获得了 9 个化学物质：E- β -罗勒烯 (E- β -ocimene)、肉豆蔻酸 (myristic acid)、棕榈酸 (palmitic acid)、甲基棕榈酸酯 (methyl palmitic ester)、硬脂酸 (stearic acid)、棕榈油酸 (palmitoleic acid)、十五烷酸 (pentadecanoic acid)、乙酸 (acetic acid)、乙酸乙酯 (ethyl acetate)，与其对应标准物的离子图谱匹配率均高于 78% (表 1、图 1、图 2)。在蜂王幼虫中，除了发现这 9 种化学物质，还发现了一种特殊的化学物质，即 2-庚酮 (2-heptanone) (表 1)。同时，图 3 表明，E- β -罗勒烯是雄蜂与蜂王幼虫中唯一在饥饿组中的释放量显著高于饲喂组的信息素，且在蜂王浆中未测到任何 E- β -罗勒烯，表明蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素为 E- β -罗勒烯。在饥饿幼虫组对比中，2 日龄的蜂王与雄蜂幼虫 E- β -罗勒烯含量没有差异，而 4 日龄组对比中，蜂王幼虫的 E- β -罗勒烯含量显著低于雄蜂幼虫组。值得注意的是，2 日龄饥饿幼虫组 E- β -罗勒烯释放量显著高于 4 日龄饥饿幼虫组 (图 4)。

2.2 蜂王与雄蜂幼虫饥饿组与饲喂组差异表达基因

2 日龄蜂王幼虫饥饿组与饲喂组差异基因为 6 个，



各个化学物质的离子峰及出峰时间已标注。其中 1-壬烯为内标物，硅氧烷为色谱柱的柱流失
The ion peaks and time of the main chemicals were presented. 1-Nonene was the interior standard substance and the siloxane was the column bleeding

图 1 2 日龄西方蜜蜂蜂王饲喂组幼虫 VOC 色谱柱气质联用总离子图

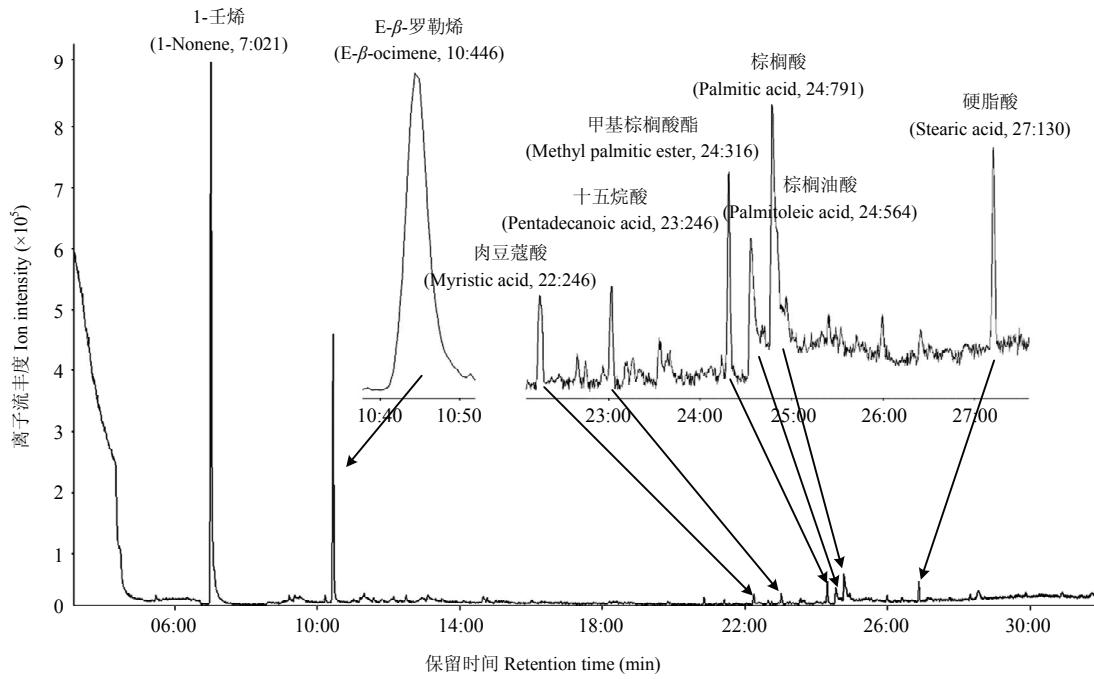
Fig. 1 Total ion chromatogram of chemicals from 2-day-old fed queen larvae of *A. mellifera* by using VOC chromatographic column

表1 气质联用所测单只西方蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫释放的化学物质及含量

Table 1 Ten chemicals detected in each treatment by Needle trap and GC-MS from one queen or drone larva of *A. mellifera*

样品名 Name	组别 Group	97	98	99	99	78	95	99	86	86	95
		E- β -ocimene	棕榈酸 Palmitic acid	肉豆蔻酸 Myristic acid	甲基棕榈酸酯 Methyl palmitic ester	硬脂酸 Stearic acid	棕榈油酸 Palmitoleic acid	十五烷酸 Pentadecanoic acid	乙酸 Acetic acid	乙酸乙酯 Ethyl acetate	2-庚酮 2-Heptanone
与标准物匹配率											
Mapping degree to standard chemical (%)											
2 日龄蜂王幼虫	食物组	0.00±0.00a	0.15±0.08a	0.06±0.03a	0.3±0.00a	0.02±0.01a	0.05±0.02	0.02±0.01a	0.12±0.04a	0.08±0.03a	0.06±0.02a
2-day-old queen larvae	Food	3.30±0.28b	0.22±0.05a	0.06±0.01a	0.02±0.01a	0.02±0.00a	0.10±0.05a	0.02±0.00a	0.11±0.05a	0.14±0.05a	0.03±0.01a
	Fed larvae	5.61±0.64c	0.23±0.18a	0.10±0.04a	0.01±0.00a	0.03±0.01a	0.07±0.02a	0.02±0.01a	0.18±0.07a	0.05±0.02a	0.00±0.00b
	Starving larvae	0.00±0.00a	0.07±0.01a	0.02±0.00a	0.01±0.00a	0.01±0.00a	0.02±0.00a	0.01±0.00a	0.05±0.02a	0.16±0.04a	0.11±0.04a
4 日龄蜂王幼虫	食物组	0.38±0.03b	0.16±0.06a	0.05±0.01a	0.01±0.00a	0.02±0.01a	0.04±0.01a	0.01±0.00a	0.10±0.02ab	0.21±0.09a	0.10±0.02a
4-day-old queen larvae	Food	1.12±0.27c	0.26±0.11a	0.08±0.03a	0.01±0.00a	0.05±0.03a	0.07±0.02a	0.02±0.01a	0.13±0.03b	0.08±0.02a	0.00±0.00b
	Fed larvae	0.18±0.02a	0.02±0.00a	0.03±0.01a	0.02±0.01a	0.02±0.01a	0.01±0.00a	0.00±0.00a	0.45±0.06a	0.51±0.04a	0.00±0.00a
	Starving larvae	1.50±0.13b	0.10±0.04a	0.07±0.02a	0.07±0.01b	0.10±0.03a	0.05±0.02a	0.01±0.00b	0.14±0.04b	0.45±0.11a	0.00±0.00a
	Fed larvae	4.57±0.66c	0.16±0.06a	0.12±0.45a	0.08±0.02b	0.10±0.02a	0.04±0.02a	0.01±0.00b	0.80±0.10c	0.01±0.02b	0.00±0.00a
	Starving larvae	0.25±0.01a	0.05±0.02a	0.03±0.01a	0.05±0.02a	0.02±0.01a	0.01±0.00a	0.02±0.01a	0.09±0.02a	0.16±0.04a	0.00±0.00a
4 日龄雄蜂幼虫	食物组	0.59±0.07b	0.10±0.05a	0.07±0.02a	0.13±0.06a	0.10±0.03a	0.05±0.02a	0.07±0.01b	0.07±0.01ab	0.07±0.01a	0.00±0.00a
4-day-old drone larvae	Food	1.89±0.27c	0.23±0.14a	0.12±0.05a	0.23±0.14a	0.10±0.02a	0.04±0.02a	0.07±0.02b	0.04±0.01b	0.07±0.03a	0.00±0.00a
	Fed larvae										
	Starving larvae										

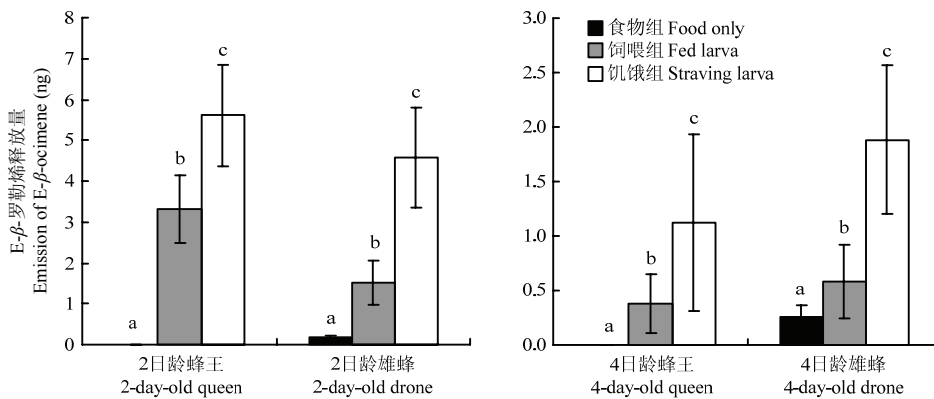
表中数据为平均数±标准误, 是各化学物质对 1-壬烯的相对含量, E- β -罗勒烯为所测得的质量 (ng)。各幼虫组内食物组、饥饿组与饥饿组进行方差分析比较, 同列不同小写字母表示在 5%水平上差异显著
Values were the ratio of identified chemical to 1-nonene (means±SE), except the E- β -ocimene groups which were the real quality from each larva (ng). Food, fed and starving larvae in one larval group were analyzed with ANOVA test. Different letters in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$)



各个化学物质的离子峰及出峰时间已标注。1-壬烯为内标物
The ion peaks and time of the main chemicals were presented. 1-Nonene was the interior standard substance

图 2 2 日龄西方蜜蜂蜂王饥饿组幼虫 DB-5 色谱柱气质联用总离子图

Fig. 2 Total ion chromatogram of chemicals from 2-day-old starving queen larvae of *A. mellifera* by using DB-5 chromatographic column



不同字母表示同日龄幼虫对比差异显著 Different letters on the bars indicated significant differences ($P < 0.05$) within the same age larva comparisons

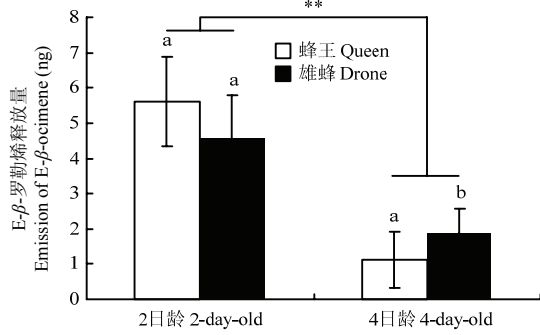
图 3 2 日龄 (A) 与 4 日龄 (B) 西方蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫 E-β-罗勒烯单只幼虫释放量

Fig. 3 Emission of E-β-ocimene from a 2- and 4-day-old queen and drone larva of *A. mellifera*

4 日龄对比组为 287 个; 2 日龄雄蜂幼虫饥饿组与饲喂组差异基因为 8 个, 4 日龄对比组为 0 个。这些差异基因中, 未发现任何基因与幼虫的信息素合成相关。

蜂王幼虫与雄蜂幼虫具有一条从头合成 E-β-罗勒

烯的生物合成通路 (图 5), 表明 E-β-罗勒烯在幼虫体内由乙酰辅酶 A 经甲羟戊酸途径合成, 这与工蜂幼虫 E-β-罗勒烯的生物合成通路相同^[13]。参与该通路的 9 个基因在饥饿组与饲喂组中均表达差异不显著 (表 2)。



“**”表示两个日龄间差异显著 Significant differences between 2- and 4-day-old comparisons ($P < 0.05$)

图 4 西方蜜蜂蜂王与雄蜂饥饿组幼虫 E-β-罗勒烯含量对比

Fig. 4 Comparison of E-β-ocimene from a queen and drone larva of *A. mellifera*

3 讨论

信息素是蜜蜂幼虫与成年蜂之间的重要交流方

式^[12,25]。本研究鉴定分析出蜂王与雄蜂幼虫饥饿信息素的主要成分为 E-β-罗勒烯，这与工蜂幼虫饥饿信息素成分相同^[13]。前人研究表明，蜂王幼虫采食 5 d 蜂王浆，而雄蜂幼虫采食 3 d 雄蜂浆，后 2 d 采食蜂粮。即使在 1—3 日龄，蜂王浆与雄蜂浆成分也不同^[14]。图 4 表明 2 日龄时蜂王与雄蜂幼虫释放的罗勒烯并无显著差异。那么哺育蜂是如何在黑暗的蜂箱中分辨出蜂王与雄蜂幼虫，并饲喂其所需的各种食物的？有研究表明，蜂王在产卵过程中，先利用其触角与前足丈量巢房的大小，再进行产受精卵或未受精卵^[26]。因此，推测哺育蜂也可能利用相似的测量来分辨巢房大小，进而饲喂不同食物。有趣的是，蜂王幼虫含有独特的 2-庚酮这类物质。该信息素是工蜂上颚腺分泌的标记信息素，主要用于标记蜂巢的巢门方向与采集的花朵上，同时也可作为标记敌人的报警信息素^[27-29]。因此，哺育蜂也可能利用 2-庚酮标记需要饲喂的蜂王幼虫，从而引导其他哺育蜂对蜂王幼虫进行准确定位与饲喂。

本试验表明 2 日龄蜂王与雄蜂幼虫释放 E-β-罗勒烯量均显著高于与其 4 日龄幼虫，这与前人在不同日

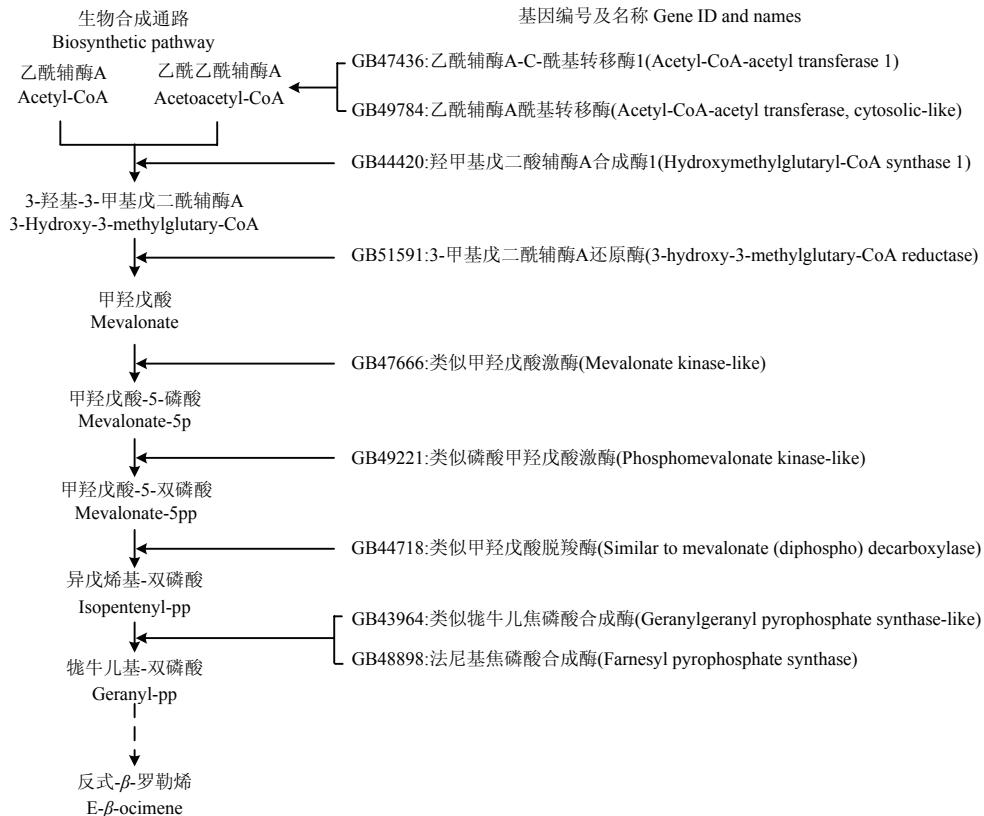


图 5 蜂王与雄蜂幼虫 E-β-罗勒烯的生物合成通路

Fig. 5 The biosynthetic pathway for E-β-ocimene in queen and drone larvae

表 2 蜂王与雄蜂幼虫 E- β -罗勒烯合成通路基因表达Table 2 The expression of E- β -ocimene biosynthetic pathway genes between fed and starving larvae in queen and drone larvae

基因编号 Gene ID	饲喂幼虫组 vs 饥饿幼虫组 Fed larvae vs starving larvae		FDR 值 FDR value	lg2 FC 值 lg2 FC value	基因注释 Annotation
	幼虫组别 Larval groups	日龄 Day-old			
	GB47436	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.067	-0.088 0.470
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.009 -0.129	
GB49784	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.954	-0.107 -0.026	Acetyl-CoA acetyl transferase, cytosolic-like [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.054 -0.205	
GB44420	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.422	-0.185 -0.253	PREDICTED: Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase I [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.105 0.039	
GB51591	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.459	-0.006 -0.210	PREDICTED: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.010 0.031	
GB47666	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.137	-0.116 0.428	PREDICTED: Mevalonate kinase-like [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	0.050 -0.259	
GB49221	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.192	-0.071 -0.506	PREDICTED: phosphomevalonate kinase-like [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.191 -0.028	
GB44718	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.998	-0.042 0.010	Similar to mevalonate (diphospho) decarboxylase [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.129 -0.028	
GB48898	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.447	-0.062 0.201	PREDICTED: Farnesyl pyrophosphate synthase [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	0.083 -0.001	
GB43964	蜂王幼虫对比组 Queen larval comparison	2 4	1 0.268	-0.037 0.397	PREDICTED: Geranylgeranyl pyrophosphate synthase-like [<i>A. mellifera</i>]
	雄蜂幼虫对比组 Drone larval comparison	2 4	1 1	-0.150 -0.097	

龄工蜂幼虫中测得的 E- β -罗勒烯量相一致^[13,30]。哺育蜂是否可通过感知 E- β -罗勒烯不同释放量来区分幼虫的日龄, 仍需进一步研究。蜂王 4 日龄幼虫 E- β -罗勒烯释放量显著低于 4 日龄雄蜂幼虫, 这可能是由于蜂王幼虫采食蜂王浆且个体较大, 其耐饿性较强, 从而在饥饿处理状态下 E- β -罗勒烯释放量较低。

蜂王幼虫与雄蜂幼虫的 E- β -罗勒烯由乙酰辅酶 A 与乙酰乙酰辅酶 A 通过甲羟戊酸途径合成(图 5)。这一单萜生物合成途径是一条十分保守的途径, 在其他昆虫与植物中均发现了相似的合成途径与同源基因^[31-32]。因此, 蜜蜂幼虫通过该生物合成通路从头合成 E- β -罗勒烯, 然而饥饿幼虫组的 E- β -罗勒烯通路相关基因的表达量与其饲喂组并无显著差异。这可能是 E- β -罗勒烯的合成量只有几纳克, 其基因表达量较低, 不能直观地从基因表达中表现出来。同时, 饲喂幼虫也释放 E- β -罗勒烯, 从而减小了与饥饿组的基因表达差异。

4 结 论

利用 Needle trap 与气质联用技术分析鉴定出了蜜蜂蜂王与雄蜂幼虫的饥饿信息素为 E- β -罗勒烯, 并且利用 RNA-Seq 技术证实在幼虫体内通过甲羟戊酸途径从头合成该信息素。蜂王具有一种特有的信息素——2-庚酮。

References

- [1] 陈盛禄. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 158-175.
CHEN S L. *The Apicultural Science in China*. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 158-175. (in Chinese)
- [2] 曾志将. 养蜂学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009: 39-56.
ZENG Z J. *Apiculture*. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 39-56. (in Chinese)
- [3] 颜伟玉, LE CONTE Y, BESLAY D, 曾志将. 中华蜜蜂幼虫信息素鉴定. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2250-2254.
YAN W Y, LE CONTE Y, BESLAY D, ZENG Z J. Identification of brood pheromone in Chinese honeybee [*Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2250-2254. (in Chinese)
- [4] 张含, 颜伟玉, 曾志将. 蜜蜂幼虫信息素对工蜂发育和采集行为的影响. 蜜蜂杂志, 2009(9): 5-8.
ZHANG H, YAN W Y, ZENG Z J. Effects of brood pheromone on behavioral development and foraging of worker. *Journal of Bee*, 2009(9): 5-8. (in Chinese)
- [5] 赵红霞, 梁勤, 张学锋, 黄文忠, 陈华生, 罗岳雄. 蜜蜂化学通讯的研究进展. 中国农学通报, 2014, 30(2): 1-6.
ZHAO H X, LIANG Q, ZHANG X F, HUANG W Z, CHEN H S, LUO Y X. The progress of chemical communication in the honeybee. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(2): 1-6. (in Chinese)
- [6] 胡福良, 玄红专. 蜜蜂蜂王信息素研究进展. 昆虫知识, 2004, 41(3): 208-211.
HU F L, XUAN H Z. The recent advances in honeybee queen pheromone. *Entomological Knowledge*, 2004, 41(3): 208-211. (in Chinese)
- [7] CALLOW R K, JOHNSTON N C. The chemical constitution and synthesis of queen substance of honeybees (*Apis mellifera*) preliminary note. *Bee World*, 1960, 41(6): 152-153.
- [8] KEELING C I, SLESSOR K N, HIGO H A, WINSTON M L. New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(8): 4486-4491.
- [9] PANKIW T, WINSTON M L, FONDRK M K, SLESSOR K N. Selection on worker honeybee responses to queen pheromone (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften*, 2000, 87(11): 487-490.
- [10] BUTLER C G, CALAM D H. Pheromones of the honey bee- The secretion of the Nassanoff gland of the worker. *Journal of Insect Physiology*, 1969, 15(2): 237-244.
- [11] FERGUSON A W, FREE J B, PICKETT J A, WINDER M. Techniques for studying honeybee pheromones involved in clustering, and experiments on the effect of Nasonov and queen pheromones. *Physiological Entomology*, 1979, 4(4): 339-344.
- [12] LE CONTE Y, ARNOLD G, TROUILLER J, MASSON C, CHAPPE B. Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften*, 1990, 77(7): 334-336.
- [13] HE X J, ZHANG X C, JIANG W J, BARRON A B, ZHANG J H, ZENG Z J. Starving honey bee (*Apis mellifera*) larvae signal pheromonally to worker bees. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22359.
- [14] HAYDAK M H. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology*, 1970, 15(1): 143-156.
- [15] BROUWERS E V M. Glucose/fructose ratio in the food of honeybee larvae during caste differentiation. *Journal of Apicultural Research*, 1984, 23(2): 94-101.
- [16] ASECOT M, LENSKEY Y. Juvenile hormone induction of 'queenliness' on female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1984, 78(1): 109-117.
- [17] KAMAKURA M. Royalactin induces queen differentiation in

- honeybees. *Nature*, 2011, 473(7348): 478-483.
- [18] 董文滨, 马兰婷, 王颖, 李成成, 郑本乐, 冯倩倩, 王改英, 李迎军, 焦震, 刘锋, 杨维仁, 胥保华. 意大利蜜蜂春繁、产浆、越冬和发育阶段营养需要建议标准. *动物营养学报*, 2014, 26(2): 342-347.
- DONG W B, MA L T, WANG Y, LI C C, ZHENG B L, FENG Q Q, WANG G Y, LI Y J, JIAO Z, LIU F, YANG W R, XU B H. Proposed standard of nutrient requirement for *Apis mellifera ligustica* Spinola during the periods of spring multiplication, royal jelly production, overwintering and development. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(2): 342-347. (in Chinese)
- [19] TREFZ P, KISCHKEL S, HEIN D, JAMES E S, SCHUBERT J K, MIEKISCH W. Needle trap micro-extraction for VOC analysis: effects of packing materials and desorption parameters. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1219: 29-38.
- [20] PAN Q Z, WU X B, GUAN C, ZENG Z J. A new method of queen rearing without grafting larvae. *American Bee Journal*, 2013, 12: 1279-1280.
- [21] 张飞, 吴小波, 颜伟玉, 王子龙, 曾志将. 蜂王浆机械化生产关键技术研究与应 用 (II)——仿生免移虫蜂王浆生产技术. *江西农业大学学报*, 2013, 35(5): 1036-1041.
- ZHANG F, WU X B, YAN W Y, WANG Z L, ZENG Z J. Research and application of key technique for mechanized production of royal jelly (II)——A bionic non-grafting larvae technique for royal jelly production. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(5): 1036-1041. (in Chinese)
- [22] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, PIMENTEL H, KELLEY R, SALZBERG S L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 2013, 14(4): R36.
- [23] TRAPNELL C, WILLIAMS B A, PERTEA G, MORTAZAVI A, KWAN G, VAN BAREN M J, SALZBERG S L, WOLD B J, PACHTER L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [24] ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 2010, 11(10): R106.
- [25] 曾云峰, 曾志将, 颜伟玉, 吴小波. 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. *昆虫学报*, 2010, 53(2): 154-159.
- ZENG Y F, ZENG Z J, YAN W Y, WU X B. 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*. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53(2): 154-159. (in Chinese)
- [26] KOENIGER N. Über die Fähigkeit der Bienenkönigin (*Apis mellifica* L.) zwischen Arbeiterinnen- und Drohnenzellen zu unterscheiden. *Apidologie*, 1970, 1(2): 115-142.
- [27] FERGUSON A W, FREE J B. Production of a forage-marking pheromone by the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 1979, 18(2): 128-135.
- [28] SHEARER D A, BOCH R. 2-Heptanone in the mandibular gland secretion of the honey-bee. *Nature*, 1965, 206: 530.
- [29] KERR W E, BLUM M S, PISANI J F, STORT A C. Correlation between amounts of 2-heptanone and iso-amyl acetate in honeybees and their aggressive behaviour. *Journal of Apicultural Research*, 1974, 13(3): 173-176.
- [30] MAISONNASSE A, LENOIR J C, BESLAY D, CRAUSER D, LE CONTE Y. E- β -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13531.
- [31] SEYBOLD S J, BOHLMANN J, RAFFA K F. Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: evolutionary perspective and synthesis. *The Canadian Entomologist*, 2000, 132(6): 697-753.
- [32] DUDAREVA N, MARTIN D, KISH C M, KOLOSOVAN, GORENSTEIN N, FÄLDT J, MILLER B, BOHLMANN J. (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *The Plant Cell*, 2003, 15(5): 1227-1241.

(责任编辑 岳梅)