

蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 甲基化影响

石元元, 田柳青, 张 飞, 刘俊峰, 颜伟玉, 曾志将

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要:【目的】研究蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平影响。【方法】以意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 和中华蜜蜂 (*A. cerana cerana*) 1 日龄幼虫为试验材料, 分别饲喂意大利蜜蜂蜂王浆和中华蜜蜂蜂王浆, 并提取每组 3 日龄和 6 日龄幼虫样品的基因组 DNA, 利用 Sequenom MassARRAY 技术检测 *dynactin p62* 甲基化水平。【结果】饲喂异种蜂王浆可以更显著降低雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平; 饲喂同一种蜂王浆, 均为 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平显著低于 3 日龄; 2 种蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 各位点甲基化水平影响不同。【结论】2 种蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平和各位点甲基化水平影响不同, 这说明不同蜂王浆具有不同的生物学效应。

关键词: 蜜蜂; 蜂王浆; *dynactin p62*; DNA 甲基化

Effect of Royal Jelly on the DNA Methylation of *dynactin p62* in Female Honeybee Larvae

SHI Yuan-yuan, TIAN Liu-qing, ZHANG Fei, LIU Jun-feng, YAN Wei-yu, ZENG Zhi-jiang

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

Abstract:【Objective】The objective of this study is to analyze the influence of royal jelly on DNA methylation of *dynactin p62* in female honeybee larvae. 【Method】One-day-old larvae of *Apis mellifera ligustica* and *A. cerana cerana* were used as materials, they were fed with royal jelly either from *A. mellifera* (RJM) or from *A. cerana* (RJC), and genome DNA was extracted from 3-and 6-day-old larvae, then DNA methylation of *dynactin p62* was detected by Sequenom MassARRAY. 【Result】The whole DNA methylation of *dynactin p62* in female honeybee larvae decreased significantly after feeding with heterospecific royal jelly. The whole DNA methylation of *dynactin p62* in 6-day-old larvae was significantly lower than 3-day-old larvae after feeding with homologous royal jelly. The methylated sites of *dynactin p62* in larvae were different after feeding with royal jelly (RJM and RJC). 【Conclusion】Royal jelly (RJM and RJC) had different effects on the whole DNA methylated and methylated sites of *dynactin p62* in female honeybee larvae. These results indicate that different types of royal jelly have different biological effects.

Key words: honey bee; royal jelly; *dynactin p62*; DNA methylation

0 引言

【研究意义】蜂王浆是 5—15 日龄青年工蜂咽下腺和上颚腺分泌的一种乳白色或淡黄色、味辛辣酸涩略甜的浆状物质, 是工蜂用来饲喂蜂王和蜜蜂幼虫的一种高营养物质^[1]。蜂王产下受精卵, 受精卵经过 3 d 孵化为幼虫, 由于幼虫采食蜂王浆天数的不同, 将发

育成雌性生殖器官发育完全的蜂王和发育不完全的工蜂^[2]。Weaver 发现第 3.5 天是幼虫发育的关键时期, 当给 1—3 日龄工蜂幼虫饲喂蜂王浆后, 幼虫可以发育成具有成熟卵巢的蜂王; 当给大于 4 日龄工蜂幼虫饲喂蜂王浆后, 幼虫不能发育成蜂王^[3]。大量研究表明, 雌性蜜蜂级型分化与幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平有着密切联系^[4-6], 但异种蜂王浆对 *dynactin p62* 甲基化

收稿日期: 2012-04-26; 接受日期: 2012-07-02

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20103603110003)、江西省自然科学基金 (2010GZN0044)、国家蜂产业技术体系 (CARS-45-kxj12)

联系方式: 石元元, E-mail: shiyuanyuan7046@163.com. 通信作者曾志将, Tel: 0791-83828158; E-mail: bees1965@sina.com

水平影响研究未见报道。开展意大利蜜蜂蜂王浆 (royal jelly from *Apis mellifera ligustica*, RJM, 简称意蜂浆) 和中华蜜蜂蜂王浆 (royal jelly from *A. cerana cerana*, RJC, 简称中蜂浆) 对幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平影响的研究, 不仅能填补这方面的空白, 而且可为雌性蜜蜂分化的分子机制提供理论依据。【前人研究进展】蜂王和工蜂具有相同的遗传物质, 但在个体形态结构、寿命、繁殖性能等方面都存在显著差异^[7], 造成这些差异的主要物质是蜂王浆。Drapeau 等通过研究蜂王浆中的王浆主蛋白 (major royal jelly proteins, MRJPs), 发现 MRJPs 可以促进雌性蜜蜂生殖细胞的成熟发育^[8]。Kamakura 从蜂王浆中分离出 57 kD 蛋白 Royalactin, 并发现 Royalactin 可以显著提高幼虫的个体大小、促进卵巢发育的成熟、缩短幼虫的发育时间、诱导幼虫发育成蜂王^[9]。随着表观遗传学的发展, 大量研究表明雌性蜜蜂分化与 DNA 甲基化有着密切的联系^[10-12]。Kucharski 等利用 RNA 干扰技术沉默 *Dnmt3* (DNA methyltransferase 3) 基因的表达, 可以显著降低幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平, 诱使幼虫发育成蜂王^[4]。【本研究切入点】利用 Sequenom MassARRAY 技术分析意蜂浆和中蜂浆对意大利蜜蜂 (*A. mellifera ligustica*, 简称意蜂) 和中华蜜蜂 (*A. cerana cerana*, 简称中蜂) 3 日龄和 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平的差异。【拟解决的关键问题】分析异种蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平的影响, 以期从分子水平上解释蜂王浆对幼虫发育的影响。

1 材料与方法

试验于 2011 年 4—11 月在江西农业大学蜜蜂研究所完成。

1.1 试验材料

试验蜂群是江西农业大学蜜蜂研究所 (28.46°N, 115.49°E) 按活框饲养技术进行饲养的意蜂和中蜂各 2 群。

蜂王浆: 意蜂浆和中蜂浆是按照免移虫生产蜂王浆技术生产的新鲜王浆^[13]。

1.2 蜜蜂的饲养与取样

试验幼虫均孵化于同一只蜂王产的卵, 保证了幼虫的遗传物质基本相同。

试验共饲养了 1 600 只幼虫, 分 2 批, 每批 800 只, 成活率是 35.0%。试验分 4 组: 第 1 组, 用新鲜意蜂浆饲喂 1 日龄意蜂幼虫 (mRJM) 5 d; 第 2 组,

用新鲜中蜂浆饲喂 1 日龄意蜂幼虫 (mRJC) 5 d; 第 3 组, 用新鲜中蜂浆饲喂 1 日龄中蜂幼虫 (cRJC) 5 d; 第 4 组, 用新鲜意蜂浆饲喂 1 日龄中蜂幼虫 (cRJM) 5 d。将 4 组幼虫放于孵化箱 (温度 35℃, 湿度 80%—85%) 避光孵育。取每组 3 日龄和 6 日龄幼虫, 测定其 *dynactin p62* 甲基化水平。

人工饲喂幼虫新鲜蜂王浆: 吸取 0.2 mL 新鲜蜂王浆于 24 孔细胞培养板 (Costar, NY, USA) 内, 放入培养箱 (温度 35℃, 相对湿度 80%—85%) 中 15 min, 用移虫针移取幼虫至新王台中, 幼虫基本是浮在食物上, 每隔 12 h 换一次新鲜蜂王浆 (0.2 mL)。

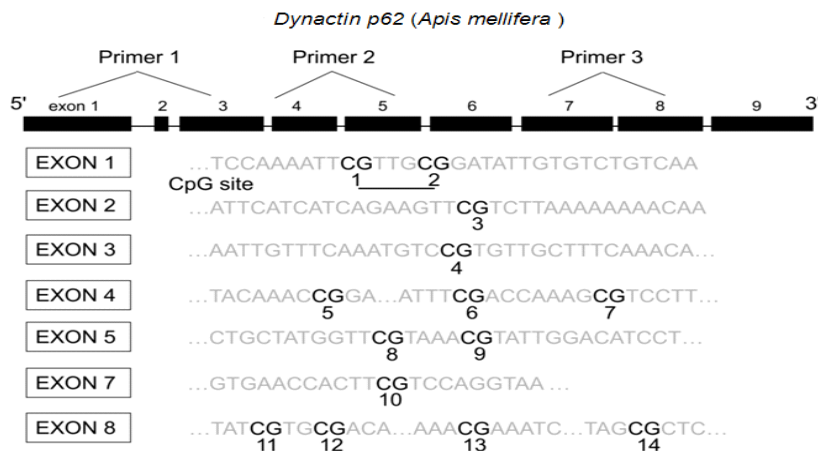
1.3 雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平的测定

每组随机取 3 日龄和 6 日龄幼虫各 10 只, 将 100 mg 组织在匀浆器中磨成粉末, 按照 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 (Cat.No.DV811A TaKaRa, Dalian, China) 操作说明提取 DNA, 用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。委托北京博奥生物有限公司利用 Sequenom MassARRAY 技术检测幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平^[5-6]。具体过程如下:

评估意蜂和中蜂 *dynactin p62* 甲基化水平 (图 1、图 2), 各设计了 3 对引物进行扩增。意蜂 *dynactin p62*^[5-6]: *dynactin p62*-1F: aggaagagagGAAGATTTATT TTTGTAGGTATTGTT; *dynactin p62*-1R: agggagaaggct TTA CTCTTAAAAATACATATCCA ACTC; *dynactin p62*-2F: aggaagagagAATTAGTTATAGGAGGTTGGTT TGAA; *dynactin p62*-2R: agggagaaggctAATTCCTCT ACTTCTATACTAACAACAA; *dynactin p62*-3F: aggaagagagATTAGAAGTAAGGATTGTTATTTGTGA A; *dynactin p62*-3R: agggagaaggctTCATCATATTCAA CAACATCATCTCT。

中蜂 *dynactin p62*: *dynactin p62*-1F: aggaagagag TTAGAAGTAAGGATTGTTATTTGTGAATTA; *dynactin p62*-1R: agggagaaggctTCATATTCAACAACA TCATCTCTAAAAA; *dynactin p62*-2F: aggaagagagTTT GTATTGGTAATAGTTGGAGATGG; *dynactin p62*-2R: agggagaaggctAAATTAACCTAAACAAAAAAT CCTCA; *dynactin p62*-3F: aggaagagagTTTTGTAGAGT GTGTATAAAAAATTTGG; *dynactin p62*-3R: agggagaag gctCCATCTCCA ACTATTACCAATACAAA。

使用 EZ 96 DNA Methylation Kit 转化幼虫 DNA。将亚硫酸氢盐转化的 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增反应: 每个反应体积 5 μ L (DNA 1 μ L, 5 U \cdot μ L⁻¹ Hotstar Taq 0.2 U, 引物 1 μ mol, 25 mmol L⁻¹ dNTP 0.04 μ L),

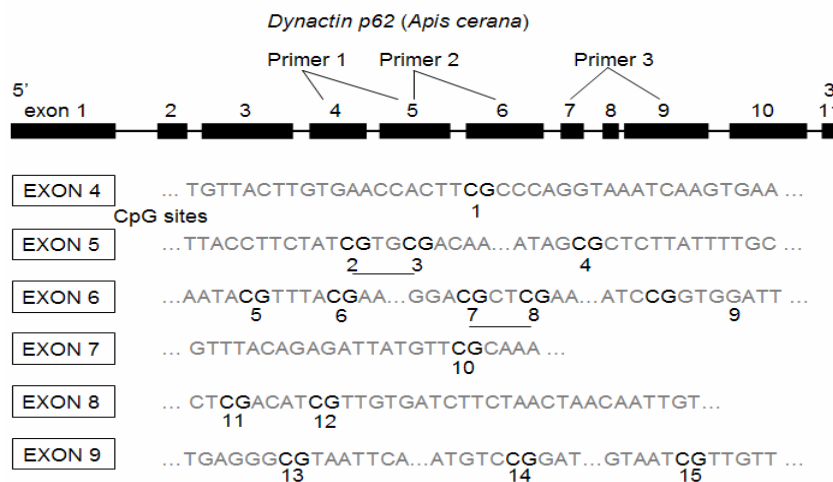


意蜂 *dynactin p62* 共有 9 个外显子，14 个 CpG 双核苷酸发生甲基化反应。由于 CpG-1 和 CpG-2、CpG-11 和 CpG-12 位点相距太近，使用的 RNase A 内切酶无法单独测定每个位点的甲基化，因此 CpG-1 和 CpG-2 以及 CpG-11 和 CpG-12 位点分别一起测定甲基化

There are 9 exons in *dynactin p62* of *A. mellifera*, in which 14 CpG dinucleotides are methylated. Because of minute distance both between CpG-1 and CpG-2 sites and between CpG-11 and CpG-12 sites, RNase A could not measure the methylation level of every site, respectively, so that the methylation level was measured together in CpG-1 and CpG-2 sites and in CpG-11 and CpG-12 sites, respectively

图 1 意蜂 *dynactin p62* 甲基化位点

Fig. 1 The methylated sites of *dynactin p62* in *A. mellifera ligustica*



中蜂 *dynactin p62* 共有 11 个外显子，15 个 CpG 双核苷酸发生甲基化反应。由于 CpG-2 和 CpG-3、CpG-7 和 CpG-8 位点相距太近，使用的 RNase A 内切酶无法单独测定每个位点的甲基化，因此 CpG-2 和 CpG-3 以及 CpG-7 和 CpG-8 位点分别一起测定甲基化

There are 11 exons in *dynactin p62* of *A. cerana*, in which 15 CpG dinucleotides are methylated. Because of minute distance both between CpG-2 and CpG-3 sites and between CpG-7 and CpG-8 sites, RNase A could not measure the methylation level of every site, respectively, so that the methylation level was measured together in CpG-2 and CpG-3 sites and in CpG-7 and CpG-8 sites, respectively

图 2 中蜂 *dynactin p62* 甲基化位点

Fig. 2 The methylated sites of *dynactin p62* in *A. cerana cerana*

反应条件为 94℃, 15 min; 45 轮循环 (94℃, 20 s, 62℃, 30 s, 72℃, 1 min); 72℃, 3 min。用 2 μL SAP (shrimp alkaline phosphatase) 处理 PCR 反应产物: 每个反应体积 7 μL (PCR 产物 5 μL, SAP 混合液 2

μL), 反应条件为 37℃, 20 min; 85℃, 5 min。使用 RNase A 特异性酶 T 切反应, 每个反应体积 7 μL (SAP 处理后 PCR 产物 2 μL, RNase-free ddH₂O 3.15 μL, 5x T7 Polymerase Buffer 0.89 μL, T Cleavage Mix 0.24

μL , 100 mmol L^{-1} DTT $0.22 \mu\text{L}$, T7 RNA & DNAPolymerase $0.44 \mu\text{L}$, RNase A $0.06 \mu\text{L}$, 反应条件为 37°C , 3 h。每个样品中用 $20 \mu\text{L}$ 双蒸水稀释, 震荡混匀, 加入 6 mg Clean Resin 树脂纯化 10 min, $3\ 200 \text{ g}$ 离心 5 min。用 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪 (SEQUENOM) 将纯化产物点至 384 孔 SpectroCHIP (SEQUENOM) 上, 把制好的芯片放入 MassARRAY Compact System (SEQUENOM) 进行检测。SpectroCHIP 芯片使用 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析技术, 检测数据通过 EpiTYPER 软件 (SEQUENOM) 分析并输出结果^[5-6]。

$$\text{甲基化水平} = \text{mC}/\text{C} \times 100\%$$

其中 mC 表示发生甲基化胞嘧啶的个数, C 表示所有胞嘧啶碱基的个数^[6]。以上试验重复 8 次。

1.4 数据统计与分析

雌性幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平数据采用 StatView 软件“ANOVA and t-test”中的“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析^[4]。

2 结果

2.1 意蜂浆和中蜂浆对意蜂幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平的影响

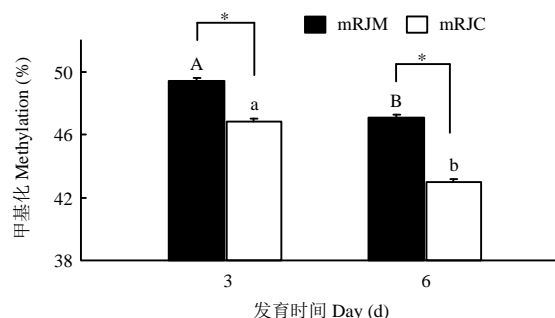
从图 3 可知, 与意蜂浆对照, 中蜂浆能显著降低 3 日龄和 6 日龄意蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平 ($P < 0.05$); 饲喂同一种蜂王浆, 2 种蜂王浆都是 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平显著低于 3 日龄 ($P < 0.05$)。

从表 1 可知, 2 种蜂王浆对意蜂幼虫 *dynactin p62* 各位点甲基化水平影响不同。以饲喂意蜂浆对照, 饲喂中蜂浆 3 日龄幼虫 *dynactin p62* 甲基化下调位点有 7 个, 上调的位点有 3 个; 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 甲基化下调位点和上调位点也分别是 7 个和 3 个, 但下调和上调位点分布规律不尽相同。

2.2 意蜂浆和中蜂浆对中蜂幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平的影响

从图 4 可知, 与中蜂浆对照, 意蜂浆能显著降低 3 日龄和 6 日龄中蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平 ($P < 0.05$); 饲喂同一种蜂王浆, 2 种蜂王浆也都是 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平显著低于 3 日龄 ($P < 0.05$)。

从表 2 可知, 2 种蜂王浆对中蜂幼虫 *dynactin p62* 各位点甲基化水平影响不同。以饲喂中蜂浆对照, 饲

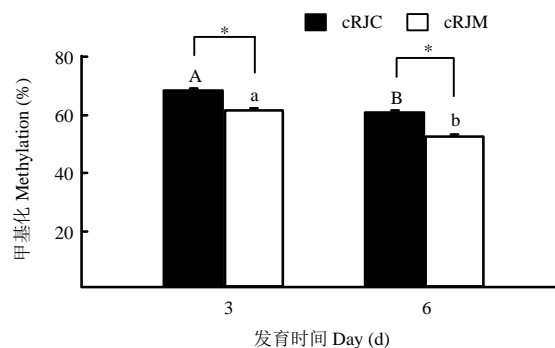


mRJM: 饲喂意蜂浆的意蜂幼虫; mRJC: 饲喂中蜂浆的意蜂幼虫。不同大写字母表示不同日龄的 mRJM 在 5% 水平差异显著, 不同小写字母表示不同日龄的 mRJC 在 5% 水平差异显著, * 表示相同日龄的 mRJM 和 mRJC 在 5% 水平差异显著

mRJM: *A. mellifera* developed from larvae fed with RJM; mRJC: *A. mellifera* developed from larvae fed with RJC. The different capital letters indicated significant difference at the 5% level in different age mRJM, the different small letters indicated significant difference at the 5% level in different age mRJC, * indicated significant difference at the 5% level in the same age mRJM and mRJC

图 3 意蜂浆和中蜂浆对意蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平的影响

Fig. 3 The influence of RJM and RJC on the methylation level of *dynactin p62* (whole sites) in *A. mellifera* larvae



cRJC: 饲喂中蜂浆的中蜂幼虫; cRJM: 饲喂意蜂浆的中蜂幼虫。不同大写字母表示不同日龄的 cRJC 在 5% 水平差异显著, 不同小写字母表示不同日龄的 cRJM 在 5% 水平差异显著, * 表示相同日龄的 cRJC 和 cRJM 在 5% 水平差异显著

cRJC: *A. cerana* developed from larvae fed with RJC; cRJM: *A. cerana* developed from larvae fed with RJM. The different capital letters indicate significant difference at the 5% level in different age cRJC, the different small letters indicate significant difference at the 5% level in different age cRJM, * indicate significant difference at the 5% level in the same age cRJC and cRJM

图 4 意蜂浆和中蜂浆对中蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平的影响

Fig. 4 The influence of RJM and RJC on the methylation level of *dynactin p62* (whole sites) in *A. cerana* larvae

表 1 意蜂浆和中蜂浆对意蜂幼虫 *dynactin p62* 各位点甲基化水平的影响Table 1 The influence of RJM and RJC on the methylation level of *dynactin p62* (single site) in *A. mellifera* larvae (%)

组别 Group	<i>dynactin p62-1</i>			<i>dynactin p62-2</i>			<i>dynactin p62-3</i>			
	CpG-1,2	CpG-3	CpG-4	CpG-5	CpG-6	CpG-7	CpG-8	CpG-10	CpG-11,12	CpG-14
3 日龄 3-day-old										
mRJM	6.2 ± 0.7a	4.9 ± 0.4a	84.4 ± 0.5a	77.4 ± 0.3a	25.3 ± 0.5a	36.0 ± 0.5a	88.5 ± 0.5a	79.6 ± 0.3a	33.7 ± 0.4a	58.0 ± 0.4a
mRJC	6.9 ± 0.6a	2.6 ± 0.2b	80.4 ± 0.4b	99.8 ± 0.2b	15.9 ± 0.4b	19.2 ± 0.3b	87.5 ± 0.5a	76.8 ± 0.4b	16.0 ± 0.6b	66.4 ± 0.4b
6 日龄 6-day-old										
mRJM	2.1 ± 0.7b	3.6 ± 0.3b	83.9 ± 0.4a	53.0 ± 0.3c	32.0 ± 0.5c	38.0 ± 0.3c	91.1 ± 0.3b	74.3 ± 0.3c	19.6 ± 0.5c	78.6 ± 0.4c
mRJC	4.7 ± 0.5c	2.6 ± 0.3b	72.5 ± 0.6c	99.8 ± 0.2b	11.9 ± 0.3d	20.0 ± 0.4b	83.6 ± 0.3c	83.8 ± 0.4d	15.5 ± 0.5b	55.0 ± 0.4d

表中数据为平均数 ± 标准误, 同列不同小写字母表示在 5% 水平上存在差异显著性。表 2 同 Table 2 同 The data in the table indicated mean ± SE. Different small letters in the same column indicated significant difference at the 5% level, respectively. The same as Table 2

表 2 意蜂浆和中蜂浆对中蜂幼虫 *dynactin p62* 各位点甲基化水平的影响Table 2 The influence of RJM and RJC on the methylation level of *dynactin p62* (single site) in *A. cerana* larvae (%)

组别 Group	<i>dynactin p62-1</i>			<i>dynactin p62-2</i>			<i>dynactin p62-3</i>					
	CpG-1	CpG-2,3	CpG-4	CpG-5	CpG-7,8	CpG-9	CpG-10	CpG-12	CpG-13	CpG-14	CpG-15	
3 日龄 3-day-old												
cRJC	86.9 ± 0.6a	44.4 ± 0.4a	77.1 ± 0.5a	69.4 ± 0.2a	45.9 ± 0.5a	49.8 ± 0.2a	99.3 ± 0.2a	89.3 ± 0.2a	74.6 ± 0.2a	46.9 ± 0.3a	57.4 ± 0.4a	
cRJM	94.0 ± 0.6b	13.1 ± 0.3b	60.2 ± 0.5b	59.1 ± 0.3b	35.1 ± 0.4b	57.5 ± 0.3b	87.4 ± 0.3b	89.4 ± 0.3a	70.1 ± 0.3b	42.2 ± 0.3b	52.1 ± 0.2b	
6 日龄 6-day-old												
cRJC	76.4 ± 0.4c	28.1 ± 0.5c	80.2 ± 0.3c	68.6 ± 0.3a	38.6 ± 0.4c	44.8 ± 0.3c	99.8 ± 0.2a	84.5 ± 0.2b	62.5 ± 0.2c	34.4 ± 0.3c	44.6 ± 0.2c	
cRJM	76.0 ± 0.5c	23.4 ± 0.3d	30.4 ± 0.3d	59.9 ± 0.2b	28.5 ± 0.4d	45.5 ± 0.3c	75.5 ± 0.4c	84.9 ± 0.3b	67.5 ± 0.2d	29.5 ± 0.2d	44.0 ± 0.3c	

喂意蜂浆 3 日龄幼虫 *dynactin p62* 甲基化下调位点有 8 个, 上调的位点有 3 个; 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 甲基化下调位点和上调位点也分别是 8 个和 3 个, 同样下调和上调位点分布规律不完全相同。

3 讨论

Ruttner 等对西方蜜蜂不同品种之间的交替哺育特性进行了系统的研究, 利用中蜂浆来饲喂西方蜜蜂的幼虫, 发现意蜂翅膀翅脉出现中蜂特性^[14-15]。当把中蜂幼虫放入意蜂群饲喂后, 成年蜂的腹部出现了意蜂特有的 2—3 条浅黄环; 同理当把意蜂幼虫放入中蜂群中饲喂后, 成年蜂也具有中蜂某些体色特性^[16-17], 而且抗螨力增强^[18]。这些研究结果均表明不同食物(王浆)对幼虫发育有明显影响。

蜂王浆对幼虫发育影响机理一直是个热点问题。早在 20 世纪 60 年代就推断蜂王浆含有 DNA 和 RNA, 牛春艳等^[15]测定了王浆核酸含量; Zeng 等^[19]研究表明意蜂浆中的 DNA 含量显著高于中蜂浆, 但 2 种蜜蜂王浆中的 RNA 含量没有显著差异。增加蜂王浆的摄入量, 雌性蜜蜂幼虫体内 DNA 甲基化酶活性、*dynactin*

p62 甲基化水平会显著降低, 幼虫发育成蜂王的比例增加^[4-5]。通过 Western-blot 检测, Fang 等^[20]发现意蜂浆有 52 种蛋白, 中蜂浆有 60 种蛋白。Kamakura 从蜂王浆中分离出的 Royalactin 在幼虫发育的过程中扮演者重要的角色^[9]。本研究用 2 种不同蜂王浆(RJM 和 RJC)饲喂意蜂和中蜂幼虫, 随着异种王浆摄入量的增加, 发现 6 日龄幼虫 *dynactin p62* 甲基化水平显著低于 3 日龄幼虫, 这与前人研究结果一致。蜂王浆中含有丰富的 microRNA (miRNA)^[21], DNA 甲基化修饰和 miRNA 都是表观遗传学的重要内容, 它们之间存在着复杂的调控机制。在 DNA 甲基化修饰过程中, DNA 甲基化酶起着重要作用, miRNA 可以通过调节 DNA 甲基化酶的表达而影响 DNA 甲基化作用。当意蜂和中蜂幼虫采食异种王浆后, *dynactin p62* 甲基化水平显著降低, 可能会影响 *dynactin p62* 表达, 进而影响幼虫发育。

利用 Sequenom MassARRAY 技术不仅可以检测基因的整体甲基化水平, 而且还可以检测单个 CpG 位点的甲基化水平。笔者在意蜂幼虫的 *dynactin p62* 中检测到 10 个甲基化位点, 在中蜂幼虫中检测到 11 个

甲基化位点。饲喂不同蜂王浆后,不同日龄幼虫 *dynactin p62* 整体和位点甲基化水平都发生了变化。在 3 日龄和 6 日龄意蜂幼虫中,饲喂异种王浆致使 *dynactin p62* 甲基化始终显著上调位点只有 CpG-5,而始终显著下调位点有 CpG-4、CpG-6、CpG-7、CpG-11,12; 在 3 日龄和 6 日龄中蜂幼虫中,饲喂异种王浆致使 *dynactin p62* 甲基化没有始终显著上调位点,而始终显著下调位点有 CpG-2,3、CpG-4、CpG-5、CpG-7,8、CpG-10、CpG-14。显然饲喂异种王浆,会导致更多 *dynactin p62* 甲基化位点显著下调。*dynactin p62* 甲基化位点调控机理以及每个甲基化位点的功能目前还不清楚,有待于进一步研究。

4 结论

从 DNA 甲基化角度研究了异种蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫发育的影响,发现饲喂异种蜂王浆可以更显著降低雌性蜜蜂幼虫 *dynactin p62* 整体甲基化水平,同时进一步证实了蜂王浆对雌性蜜蜂幼虫发育与 DNA 甲基化有密切联系。

致谢: 本研究得到吴小波、王子龙、张丽珍等老师的支持和帮助,在此一并表示感谢。

References

- [1] 曾志将. 养蜂学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
Zeng Z J. *Apology*. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009. (in Chinese)
- [2] 曾志将. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社, 2007.
Zeng Z J. *The Biology of the Honeybee*. Beijing: China Agriculture Press, 2007. (in Chinese)
- [3] Weaver N. Physiology of caste determination. *Annual Review of Entomology*, 1966, 11: 79-102.
- [4] Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 2008, 319(5871): 1827-1830.
- [5] Shi Y Y, Huang Z Y, Zeng Z J, Wang Z L, Wu X B, Yan W Y. Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae). *PLoS One*, 2011, 6(4): e18808.
- [6] 石元元, 曾志将, 吴小波, 颜伟玉, 王子龙. 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂雌性发育的影响. *昆虫学报*, 2011, 54(3): 272-278.
Shi Y Y, Zeng Z J, Wu X B, Yan W Y, Wang Z L. Influence of injecting Dnmt3 siRNA on the development of females of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54(3): 272-278. (in Chinese)
- [7] Smith C R, Toth A L, Suarez A V, Robinson G E. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9: 735-748.
- [8] Drapeau M D, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R. Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honeybees. *Genome Research*, 2006, 16: 1385-1394.
- [9] Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 2011, 473(7348): 478-483.
- [10] Wang Y, Jorda M, Jones P L, Maleszka R, Ling X, Robertson H M, Mizzen C A, Peinado M A, Robinson G E. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 2006, 314(5799): 645-647.
- [11] Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng S, Jacobsen S E, Robinson G E, Maleszka R. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(13): 4968-4973.
- [12] Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biology*, 2010, 8(11): e1000506.
- [13] 刘光楠, 曾志将, 吴小波, 颜伟玉. 免移虫生产蜂王浆技术研究. *蜜蜂杂志*, 2009, 10: 3-5.
Liu G N, Zeng Z J, Wu X B, Yan W Y. Study on the technique of royal jelly production without grafting larvae. *Journal of Bee*, 2009, 10: 3-5. (in Chinese)
- [14] Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988: 50-51.
- [15] 牛春艳, 申春玲, 李玉海, 苏艳林. 王浆核酸含量的测定和核糖核酸的提取. *中国养蜂*, 1979(6): 17-19.
Niu C Y, Shen C L, Li Y H, Su Y L. The determination of the nucleic acids content and the extraction of RNA in royal jelly. *Apiculture of China*, 1979(6): 17-19. (in Chinese)
- [16] 李焱生. 中意蜂营养杂交育种的探讨. *养蜂科技*, 1982(1): 42-44.
Li M S. Discuss on breeding of cross-feeding between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apicultural Science and Technology*, 1982(1): 42-44. (in Chinese)
- [17] 吴文光. 中意蜂无性杂交试探. *养蜂科技*, 1985(1): 13-14.
Wu W G. Study on asexuality crossbreed between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apicultural Science and Technology*,

- 1985(1): 13-14. (in Chinese)
- [18] 谢宪兵, 彭文君, 曾志将. 应用蜜蜂营养杂交技术培育抗螨蜂种. 中国农业科学, 2008, 41(5): 1530-1535.
- Xie X B, Peng W J, Zeng Z J. Breeding of mite-resistant honeybee by using nutritional crossbreed technology. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(5): 1530-1535. (in Chinese)
- [19] Zeng Z J, Zou Y, Guo D S, Yan W Y. Comparison studies of DNA and RNA in royal jelly from *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Indian Bee Journal*, 2006, 68(1/4): 18-21.
- [20] Fang Y, Feng M, Li J K. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(5): 2207-2215.
- [21] 郭向前. 工蜂和蜂王发育、分化机制以及蜜蜂浆小 RNA 在工蜂和蜂王级型分化中的作用[D]. 北京: 中国科学院, 2010.
- Guo X Q. The development and molecular mechanism of queen-worker differentiation, the miRNAs of royal jelly make a difference to queen-worker differentiation[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2010. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)