

幼虫信息素酯类混合物对中华蜜蜂育王质量的影响

胡景华¹, 张丽珍¹, 廖春华¹, 江武军², 曾志将¹, 颜伟玉^{1,*}

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045; 2. 江西省养蜂研究所, 南昌 330052)

摘要:【目的】基于免移虫育王技术,探究幼虫信息素酯类混合物在育王中对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 蜂王质量的影响,为优质蜂王的培育奠定基础。【方法】利用中华蜜蜂免移虫育王生产器培育蜂王,在幼虫 60–64 h 时向王台内注入 1 μ L 不同酯类组成的混合物(酯类混和物的浓度梯度分别为 0, 0.1%, 1.0% 和 10.0%),待蜂王出房后测定蜂王初生重、胸重、胸宽以及单侧卵巢管数量;并利用荧光定量 PCR 测定蜂王卵巢卵黄原蛋白基因 *Vitellogenin (Vg)*, 昆虫储存蛋白基因 *hexamerin70b (hex70b)* 和 *hexamerin110 (hex110)* 的表达量。【结果】免移虫育王过程中添加 3 种信息素酯类混合物 3E(1.0% 甲基亚油酸酯、16.0% 甲基亚麻酸酯和 35.0% 甲基油酸酯),不同浓度处理时蜂王的初生重较对照(石蜡油)均显著增加,但蜂王胸宽和胸重均无显著变化;0.1% 和 1.0% 浓度处理组蜂王单侧卵巢管数显著增加;不同浓度处理组 *Vg* 和 *hex70b* 的表达量均无显著变化,但 1.0% 和 10.0% 浓度处理组蜂王卵巢的 *hex110* 表达量显著升高。4 种信息素酯类混合物 4E(4.5% 甲基棕榈酸酯、1.0% 甲基亚油酸酯、16.0% 甲基亚麻酸酯和 35.0% 甲基油酸酯)试验组只有 10.0% 浓度处理组蜂王的初生重和单侧卵巢管数较对照显著上升($P < 0.05$),0.1% 和 1.0% 浓度处理对蜂王的个体发育指标均无显著影响($P > 0.05$);0.1% 和 1.0% 浓度处理组 *Vg* 的表达量、10.0% 浓度处理组 *hex70b* 的表达量以及 1.0% 和 10.0% 浓度处理组 *hex110* 的表达量均显著上升($P < 0.05$)。10 种信息素酯类混合物 10E(4.5% 甲基棕榈酸酯、2.5% 甲基硬脂酸、35.0% 甲基油酸酯、1.0% 甲基亚油酸酯、16.0% 甲基亚麻酸酯、3.5% 乙基棕榈酸酯、1.5% 乙基硬脂酸酯、18.0% 乙基油酸酯、0.5% 乙基亚油酸酯和 17.5% 乙基亚麻酸酯)试验组,各个浓度处理蜂王的初生重以及 *Vg* 和 *hex110* 的表达量均显著下降($P < 0.05$),但蜂王的单侧卵巢管数和胸部指标无显著变化($P > 0.05$),10.0% 浓度处理时 *hex70b* 的表达量也显著降低($P < 0.05$)。【结论】中华蜜蜂育王过程中添加 1.0% 的 3E 和 10.0% 的 4E 幼虫信息素酯类可以在一定程度上提高蜂王质量。

关键词: 中华蜜蜂; 幼虫信息素; 卵黄原蛋白基因; 昆虫储存蛋白基因; 育王质量

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)03-0300-08

Effects of mixtures of brood pheromone esters on the reared queen quality of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

HU Jing-Hua¹, ZHANG Li-Zhen¹, LIAO Chun-Hua¹, JIANG Wu-Jun², ZENG Zhi-Jiang¹, YAN Wei-Yu^{1,*} (1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Apiculture Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330052, China)

Abstract: 【Aim】The objective of this study is to investigate the effects of mixtures of brood pheromone esters on the queen quality of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, reared by queen-rearing

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460641, 31660696); 国家蜂产业技术体系(CARS-44-kxj15); 江西省青年科学家(井冈之星)培养对象项目(20133BCB23012)

作者简介: 胡景华, 女, 1993 年 1 月生, 江西景德镇人, 硕士研究生, 主要研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: hujinghua93@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ywygood-0216@163.com

收稿日期 Received: 2017-12-10; 接受日期 Accepted: 2018-02-09

technology without larvae-grafting, and to find a way to rear high-quality queen. 【Methods】 Queen-rearing technology without larvae-grafting was employed to rear queen of *A. cerana cerana*. Using a micro sampling syringe injector, 1 μL of mixture of brood pheromone esters with the concentration gradients of 0, 0.1%, 1.0% and 10.0% was added into queen cells, respectively, when the queen larvae were 60–64 h old. The body weight, the weight and width of thorax, the number of ovarioles in one ovary of the newly-emerged queens were tested. And the gene expression levels of *vitellogenin* (*Vg*), *hexamerin70b* (*hex70b*) and *hexamerin110* (*hex110*) were quantified by qPCR. 【Results】 The results showed that the body weight of the newly-emerged queens of *A. cerana cerana* was increased significantly ($P < 0.05$) in the treatments with the mixture of three brood pheromone esters (3E) (1.0% methyl linoleate, 16.0% methyl linolenate, and 35.0% methyl oleate) at all the three concentrations, while the width and weight of thorax of reared queens had no significant change as compared with the control (paraffin oil) ($P > 0.05$). The number of ovarioles in one ovary was increased significantly ($P < 0.05$) in 0.1% and 1.0% treatment groups. The expression levels of *Vg* and *hex70b* in all 3E treatment groups had no significant change, while that of *hex110* in 1.0% and 10.0% 3E treatment groups increased significantly ($P < 0.05$) as compared with the control. When the queens were reared with the mixture of four brood pheromone esters (4E) (4.5% methyl palmitate, 1.0% methyl linoleate, 16.0% methyl linolenate, and 35.0% methyl oleate), the body weight of the newly-emerged queens and the number of ovarioles in one ovary significantly increased in 10.0% 4E treatment group ($P < 0.05$), while no significant difference of developmental indexes existed in 0.1% and 1.0% 4E treatment groups ($P > 0.05$). The expression levels of *Vg* in ovaries in 0.1% and 1.0% 4E treatment groups, *hex70b* in 10.0% 4E treatment group and *hex110* in 1.0% and 10.0% 4E treatment groups all significantly increased as compared with the control ($P < 0.05$). When the queens were reared with the mixture of 10 brood pheromone esters (10E) (4.5% methyl palmitate, 2.5% methyl stearate, 35.0% methyl oleate, 1.0% methyl linoleate, 16.0% methyl linolenate, 3.5% ethyl palmitate, 1.5% ethyl stearate, 18.0% ethyl oleate, 0.5% ethyl linoleate, and 17.5% ethyl linolenate), the body weight of the newly-emerged queens, and the expression levels of *Vg* and *hex110* in ovaries in all treatment groups significantly decreased as compared with the control ($P < 0.05$), while the number of ovarioles in one ovary and the thorax indexes showed no significant change ($P > 0.05$). The expression level of *hex70b* also reduced significantly in 10% 10E treatment group ($P < 0.05$). 【Conclusion】 To a certain extent, the 1.0% 3E and 10.0% 4E added in queen-rearing process of *A. cerana cerana* could improve the queen quality.

Key words: *Apis cerana cerana*; brood pheromone; vitellogenin gene; hexamerin gene; reared queen quality

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 是我国特有的本土蜂种, 具有较强的抗蜂螨及抗胡蜂能力, 而且采蜜期长, 能够很好地利用零星蜜粉源, 对我国的生态系统、农业授粉以及养蜂业均有着至关重要的作用(王静等, 2013)。但中蜂的产蜜量以及产卵能力远不及西方蜜蜂 *A. mellifera*, 且易躁、易分蜂、易飞逃难以维持强群, 这些特征使得中蜂处于竞争劣势, 中蜂野生种群数量和分布区域均呈下降趋势(余林生, 2007)。正常蜂群由大量工蜂、雄蜂以及单头蜂王组成, 蜂王作为蜂群中唯一具有完整生殖能力的个体, 其品质优劣对蜂群的意义重大, 蜂群的

群势、采集能力以及抗病虫害能力均与蜂王的质量紧密相关(匡邦郁, 2003)。培育优质的中蜂蜂王可以使蜂群易于维持强群, 提高蜂群的抗病力、采集力等, 从而提高中蜂的自然竞争力, 促进中蜂养殖业的发展。因此, 培育优质蜂王对中蜂资源的利用及开发具有重大意义。

早期研究中, 人工育王主要集中在移虫方式的探究, 由最初的单式移虫发展为复式移虫, 在一定程度上提高了王台接受率以及蜂王的质量(Doolittle, 1889; 陈世壁, 1989)。人工育王应选取4日龄以内的幼虫, 且幼虫日龄越小培育出的蜂王质量越优。

研究表明育王时移取的幼虫日龄越小培育出的蜂王初生重、卵巢管数、储精囊大小及储精囊中精子数等各项指标均呈上升趋势(Woyke, 1971)。陈世壁等(1991)提出卵的大小影响蜂王质量,采用控王产卵的方法获取大卵并结合复式移虫成功地培育出了优质蜂王。Gabka等(2011)利用不同日龄的卵培育蜂王,发现卵的日龄越大接受率越高。

Le Conte等(1989, 1990)发现西方蜜蜂的幼虫信息素由10种脂肪酸酯即甲基棕榈酸酯(methyl palmitate, MP)、甲基亚油酸酯(methyl linoleate, ML)、甲基油酸酯(methyl oleate, MO)、甲基硬脂酸酯(methyl stearate, MS)、甲基亚麻酸酯(methyl linolenate, MLN)、乙基棕榈酸酯(ethyl palmitate, EP)、乙基亚油酸酯(ethyl linoleate, EL)、乙基油酸酯(ethyl oleate, EO)、乙基硬脂酸酯(ethyl stearate, ES)和乙基亚麻酸酯(ethyl linolenate, ELN)组成。其中MP, EP和ML单独或者混和使用都能吸引蜂螨(Le Conte *et al.*, 1989), MO, ML和MLN 3种酯类混和或10种酯类混和都能促进工蜂封盖(Le Conte *et al.*, 1990)。幼虫信息素在西方蜜蜂的蜂王培育中也起重要作用, MS可提高王台接受率, ML可促进工蜂吐浆增加王台内王浆量, 而MP可提高王台中幼虫重量(Le Conte *et al.*, 1995)。曾云峰等(2010)研究表明,在人工育王过程中添加0.1%的MP可以提高中蜂和意蜂的幼虫重量。中蜂的幼虫信息素成分与西方蜜蜂的相似,也是由相同的10种脂肪酸酯组成(颜伟玉等, 2009)。但单独的MP或ML在中蜂育王中的应用并不能显著提高蜂王的质量(邹垂彬等, 2016b)。

研究发现,卵黄原蛋白基因 *vitellogenin* (*Vg*)和昆虫储存蛋白基因 *hexamerin70b* (*hex70b*)及 *hexamerin110* (*hex110*)的表达受到蜂王体内保幼激素水平的调控,与蜂王的卵巢发育及蜂王的质量相关(Engels, 1974; 庞倩等, 2017a)。为了进一步研究幼虫信息素酯类对中蜂育王的影响,本研究通过在育王过程中添加酯类混和物来探索幼虫信息素酯类对蜂王个体发育指标(初生重、胸重、胸宽、单侧卵巢管数量)以及 *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 3个基因表达量的影响,为培育优质中蜂蜂王提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验蜂群

试验所需蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养

的中蜂。蜂群采用郎氏标准蜂箱饲养。试验选取蜂王年龄、蜂群群势(5足框)和蜂群遗传性状基本一致的3群蜂作为哺育蜂群;取1群蜂王产卵性能良好的健康蜂群作为母本群专职产卵。

1.2 主要试剂与仪器

DEPC水、ddH₂O、Nuclease-Free Water以及Trizol试剂均购于北京全式金生物技术有限公司,乙醇(分析纯)、氯仿及异丙醇均由上海生工生物工程股份有限公司提供,ROX和SYBR GREEN II购于TaKaRa试剂公司,所有化学信息素(纯度≥99%)均购置于Sigma试剂公司。

中华蜜蜂免移虫育王生产器(江西农业大学蜜蜂研究所研制),电子天平(MINQIAO, JN3103N),恒温恒湿培养箱(BINDER),超净工作台(苏净集团),摄影体式显微镜(江南光电),实时定量PCR仪(Applied Biosystems, 7500),离心机(Anke, TGL-16B),PCR仪(Eppendorf, Mastercycler),小型台式冷冻离心机(Eppendorf, Centrifuge 5424R)。

1.3 幼虫信息素酯类配制

先将各种酯类成分按一定比例混和配制成酯类混合物3E[1.0%甲基亚油酸酯(ML)、16.0%甲基亚麻酸酯(MLN)和35.0%甲基油酸酯(MO)]、4E[(4.5%甲基棕榈酸酯(MP)、1.0%甲基亚油酸酯(ML)、16.0%甲基亚麻酸酯(MLN)和35.0%甲基油酸酯(MO)]以及10E[(4.5%甲基棕榈酸酯(MP)、2.5%甲基硬脂酸(MS)、35.0%甲基油酸酯(MO)、1.0%甲基亚油酸酯(ML)、16.0%甲基亚麻酸酯(MLN)、3.5%乙基棕榈酸酯(EP)、1.5%乙基硬脂酸酯(ES)、18.0%乙基油酸酯(EO)、0.5%乙基亚油酸酯(EL)和17.5%乙基亚麻酸酯(ELN)],再用石蜡油分别将各种酯类混合物稀释成浓度为0.1%, 1.0%和10.0%的溶液待用;以纯石蜡油作为对照组(0%)。在幼虫60-64h时,将育王框从哺育蜂群中小心取出,用微量进样器将1 μL不同浓度的酯类混合物小心分别注入王台内的王浆中,每组设3个生物学重复,3个技术重复。3种酯类混合物中所含的幼虫信息素酯类成分比例如下:

3E: ML: MLN: MO = 1: 16: 35;

4E: ML: MLN: MO: MP = 1: 16: 35: 4.5;

10E: MP: MS: MO: ML: MLN: EP: ES: EO: EL: ELN = 4.5: 2.5: 35: 1: 16: 3.5: 1.5: 18: 0.5: 17.5。

以上各种酯类成分的比例参考Trouiller等(1994)测定的蜂王幼虫封盖前体表信息素含量比例配制。

1.4 免移虫育王

利用中华蜜蜂免移虫育王生产器,参照邹垂彬等(2016a)的试验方法进行免移虫育王,在幼虫60–64 h时,用事先配制好的信息素进行处理。蜂王出房前一天取出育王框,并将单个王台置于王笼中转移至恒温恒湿培养箱中孵化(温度: $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$,相对湿度: $70\% \pm 1.5\%$)。

1.5 蜂王个体发育指标测定

蜂王出房后立即用电子天平称量初生重,记录数据;用小手术剪取胸部并去除足、翅,用电子天平称量胸重并记录数据;然后采用江南永新光学有限公司 CCD 观察测试系统测量蜂王胸宽,记录数据(每个浓度梯度均取9头蜂王)。

蜂王单侧卵巢管计数参考许少玉等(1984)的方法,采用蜂王卵巢管解剖和简便记数法进行蜂王单侧卵巢管计数,蜂王出房后饥饿数小时,消耗体内脂肪便于解剖计数,将蜂王置于75%的酒精中固定7 d,固定好的蜂王在体视显微镜下解剖,取出卵巢置于滴有蒸馏水的载玻片上切3段,取中间段进行染色,并用解剖针剥离卵巢管进行计数,每个浓度梯度均取9头蜂王。

1.6 荧光定量 PCR 引物的设计及荧光定量 PCR

根据本实验室前期研究测得的中蜂转录本序列(甘海燕, 2014),参照 *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 基因的

转录组序列,用 Primer5.0 软件设计引物序列(表1),以 β -肌动蛋白基因(*β -actin*)作为内参基因(引物均由上海生工生物公司合成)。蜂王出房后进行活体解剖并立即置于液氮中,参考秦秋红(2013)的试验方法对卵巢进行 RNA 提取并反转录合成 cDNA。荧光定量 PCR 反应体系:灭菌超纯水 ddH₂O 3.0 μL , 上下游引物各 0.4 μL , SYBR GREEN II 5 μL , ROX 校正液 0.2 μL , 样品 1 μL , 构成总体积为 10 μL 的反应体系。反应条件: 95°C 预变性 30 s; 95°C 10 s, 58.9°C 退火复性 1 min, 40 个 PCR 循环,扩增反应结束后从 55°C 匀速加热(每 6 s 升高 1°C)至 95°C , 建立熔解曲线。每个样品为 1 头蜂王,设置 3 个重复。

1.7 数据统计与分析

荧光定量 PCR 的结果参考 Livak 和 Schmittgen (2001)建立的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。蜂王个体发育指标和基因表达量数据均利用 StatView 软件“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析。

2 结果

2.1 幼虫信息素酯类混合物 3E 对中蜂蜂王质量的影响

2.1.1 蜂王个体发育指标:幼虫信息素酯类混合物 3E 对中蜂蜂王质量的影响如表 2 所示,不同浓度处

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences used in qPCR

基因 Genes	上游引物(5'–3') Forward primer	下游引物(5'–3') Reverse primer
<i>Vg</i>	CGTGTCCAGAGGACGTTGA	GGACTTCGTGGCTCTCCATC
<i>hex70b</i>	GAGGACGGTAGCGAGTCCTT	ATGTTGCCGCCAATACAGG
<i>hex110</i>	CCTGTCTCCGTTATGCAAG	GCGCCTTGGACTTGAGAGTT
<i>β-actin</i>	GGCTCCCGAAGAACATCC	TGCGAAACACCGTCACCC

表 2 3E 对中华蜜蜂蜂王个体发育指标的影响
Table 2 Effects of 3E on the developmental indexes of queens of *Apis cerana cerana*

3E 浓度(%) 3E concentration	初生重(mg) Body weight of newly-emerged queens	胸部指标 Thorax indexes		单侧卵巢管数(条) Number of ovarioles in one ovary
		胸宽(mm) Thorax width	胸重(mg) Thorax weight	
0	169.67 \pm 2.40 b	4.60 \pm 0.04 a	52.00 \pm 0.47 a	90.22 \pm 0.83 b
0.1	182.00 \pm 2.14 a	4.63 \pm 0.05 a	53.56 \pm 0.60 a	93.78 \pm 0.94 a
1.0	184.00 \pm 1.73 a	4.67 \pm 0.02 a	52.44 \pm 0.71 a	93.67 \pm 0.91 a
10.0	180.22 \pm 2.81 a	4.68 \pm 0.02 a	51.78 \pm 0.66 a	92.89 \pm 1.36 b

3E: 3 种信息素酯类混合物(1.0% 甲基亚油酸酯 + 16.0% 甲基亚麻酸酯 + 35.0% 甲基油酸酯) Mixture of three brood pheromone esters (1.0% methyl linoleate + 16.0% methyl linolenate + 35.0% methyl oleate). 表中数据为平均数 \pm 标准差; 同列数据后不同小写字母表示差异显著 (*t* 检验, $P < 0.05$)。表 3 和 4 同。Data are mean \pm SD, and different lowercases following the data in a column indicate significant difference (*t*-test, $P < 0.05$). The same for Tables 3 and 4.

理下蜂王初生重均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 胸宽和胸重均无显著变化, 不同浓度处理间差异不显著 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 0.1% 和 1.0% 浓度处理组蜂王的单侧卵巢管数显著增加 ($P < 0.05$)。

2.1.2 蜂王卵巢 *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 表达量: 3E 各浓度处理组蜂王卵巢的 *Vg* 及 *hex70b* 表达量均无

显著差异 ($P > 0.05$) (图 1: A, B); 0.1% 处理组蜂王卵巢 *hex110* 表达量与对照相比无显著差异 ($P > 0.05$), 但 1.0% 和 10.0% 处理组蜂王卵巢 *hex110* 的表达量较对照显著上升, 且 10.0% 处理组显著高于 1.0% 处理组 ($P < 0.05$) (图 1: C)。

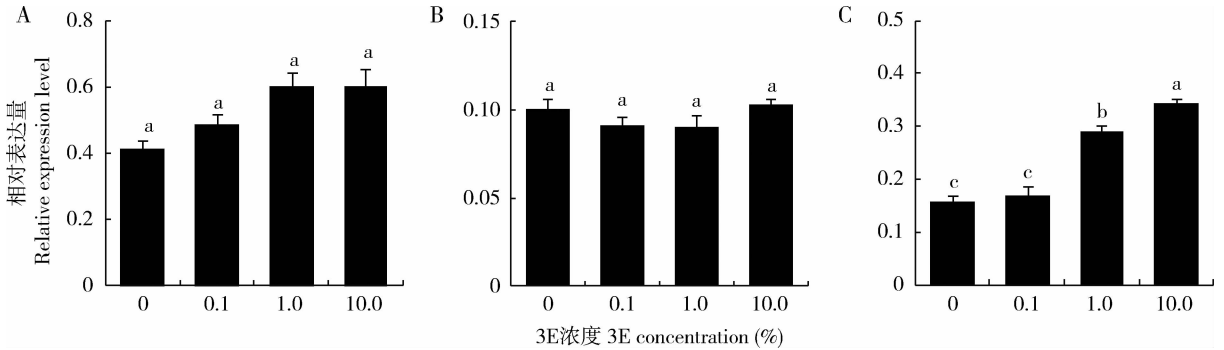


图 1 3E 对中华蜜蜂蜂王卵巢 *Vg* (A), *hex70b* (B) 和 *hex110* (C) 表达量的影响

Fig. 1 Effects of 3E on the expression levels of *Vg* (A), *hex70b* (B) and *hex110* (C) in queen ovary of *Apis cerana cerana*

3E: 3 种信息素酯类混合物 (1.0% 甲基亚油酸酯 + 16.0% 甲基亚麻酸酯 + 35.0% 甲基油酸酯) Mixture of three brood pheromone esters (1.0% methyl linoleate + 16.0% methyl linolenate + 35.0% methyl oleate). 图中数据为平均数 \pm 标准差; 柱上不同小写字母表示差异显著 (t 检验, $P < 0.05$)。图 2 和 3 同。Data are mean \pm SD, and different lowercases above bars indicate significant difference (t -test, $P < 0.05$). The same for Figs. 2 and 3.

2.2 幼虫信息素酯类混合物 4E 对中蜂蜂王质量的影响

2.2.1 蜂王个体发育指标: 幼虫信息素酯类混合物 4E 对中蜂蜂王质量的影响见表 3, 与对照组相比, 0.1% 和 1.0% 处理组蜂王初生重、胸部指标以及单侧卵巢管数均无显著差异 ($P > 0.05$); 10.0% 处理组蜂王的初生重及单侧卵巢管数量显著增加 ($P < 0.05$), 但蜂王胸宽和胸重与对照相比均差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.2 蜂王卵巢 *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 表达量:

0.1% 和 1.0% 处理组蜂王卵巢 *Vg* 的表达量均显著高于对照组和 10.0% 处理组 ($P < 0.05$) (图 2: A), 但 0.1% 和 1.0% 两处理组间无显著差异 ($P > 0.05$); 而 0.1% 和 1.0% 处理组蜂王卵巢 *hex70b* 表达量与对照相比无显著差异 ($P > 0.05$), 10.0% 处理组蜂王卵巢 *hex70b* 表达量显著增加 ($P < 0.05$) (图 2: B); 1.0% 和 10.0% 处理组蜂王卵巢 *hex110* 的表达量显著高于对照组和 0.1% 处理组 ($P < 0.05$) (图 2: C), 但两处理组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3 4E 对中华蜜蜂蜂王个体发育指标的影响

Table 3 Effects of 4E on the developmental indexes of queens of *Apis cerana cerana*

4E 浓度 (%) 4E concentration	初生重 (mg) Body weight of newly-emerged queen	胸部指标 Thorax indexes		单侧卵巢管数 (条) Number of ovarioles in one ovary
		胸宽 (mm) Thorax width	胸重 (mg) Thorax weight	
0	171.67 \pm 1.68 b	4.57 \pm 0.03 a	53.67 \pm 0.67 a	90.33 \pm 0.78 b
0.1	173.56 \pm 2.40 b	4.60 \pm 0.02 a	54.0 \pm 0.91 a	92.67 \pm 1.09 b
1.0	174.22 \pm 2.74 b	4.61 \pm 0.023 a	54.11 \pm 0.66 a	93.11 \pm 0.86 b
10.0	180.56 \pm 2.40 a	4.63 \pm 0.03 a	53.11 \pm 1.09 a	94.89 \pm 1.20 a

4E: 4 种信息素酯类混合物 (4.5% 甲基棕榈酸酯 + 1.0% 甲基亚油酸酯 + 16.0% 甲基亚麻酸酯 + 35.0% 甲基油酸酯) Mixture of four brood pheromone esters (4.5% methyl palmitate + 1.0% methyl linoleate + 16.0% methyl linolenate + 35.0% methyl oleate).

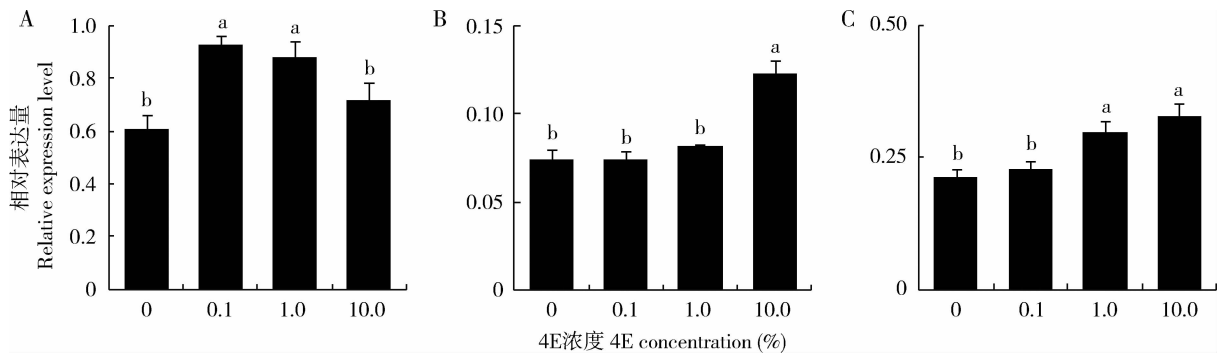


图2 4E对中华蜜蜂蜂王卵巢 *Vg* (A), *hex70b* (B)和 *hex110* (C)表达量的影响

Fig. 2 Effects of 4E on the expression levels of *Vg* (A), *hex70b* (B) and *hex110* (C) in queen ovary of *Apis cerana cerana*
4E: 4种信息素酯类混合物(4.5% 甲基棕榈酸酯+1.0% 甲基亚油酸酯+16.0% 甲基亚麻酸酯+35.0% 甲基油酸酯) Mixture of four brood pheromone esters (4.5% methyl palmitate+1.0% methyl linoleate+16.0% methyl linolenate+35.0% methyl oleate).

2.3 幼虫信息素酯类混合物 10E 对中蜂蜂王质量的影响

2.3.1 蜂王个体发育指标:从表4可以看出,不同浓度处理组蜂王的初生重与对照组比较均显著降低 ($P < 0.05$),但蜂王胸部指标无显著差异 ($P >$

0.05);且随着浓度的增加蜂王的单侧卵巢管数呈下降趋势,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3.2 蜂王卵巢 *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 表达量: 0.1%, 1.0% 和 10.0% 10E 处理均显著降低了 *Vg* 和 *hex110* 的表达量(图3: A, C; $P < 0.05$); 0.1%

表4 10E对中华蜜蜂蜂王个体发育指标的影响

Table 4 Effects of 10E on the developmental indexes of queens of *Apis cerana cerana*

10E 浓度 (%) 10E concentration	初生重(mg) Body weight of newly-emerged queens	胸部指标 Thorax indexes		单侧卵巢管数(条) Number of ovarioles in one ovary
		胸宽(mm) Thorax width	胸重(mg) Thorax weight	
0	190.22 ± 2.80 a	4.59 ± 0.02 a	51.67 ± 0.94 a	94.78 ± 1.47 a
0.1	178.44 ± 1.69 b	4.58 ± 0.02 a	52.44 ± 0.77 a	93.44 ± 1.02 a
1.0	178.67 ± 2.69 b	4.58 ± 0.02 a	51.44 ± 1.16 a	92.89 ± 1.07 a
10.0	181.11 ± 1.89 b	4.60 ± 0.02 a	53.11 ± 0.75 a	91.78 ± 1.06 a

10E: 10种信息素酯类混合物(4.5% 甲基棕榈酸酯+2.5% 甲基硬脂酸+35.0% 甲基油酸酯+1.0% 甲基亚油酸酯+16.0% 甲基亚麻酸酯+3.5% 乙基棕榈酸酯+1.5% 乙基硬脂酸酯+18.0% 乙基油酸酯+0.5% 乙基亚油酸酯+17.5% 乙基亚麻酸酯) Mixture of 10 brood pheromone esters (4.5% methyl palmitate+2.5% methyl stearate+35.0% methyl oleate+1.0% methyl linoleate+16.0% methyl linolenate+3.5% ethyl palmitate+1.5% ethyl stearate+18.0% ethyl oleate+0.5% ethyl linoleate+17.5% ethyl linolenate).

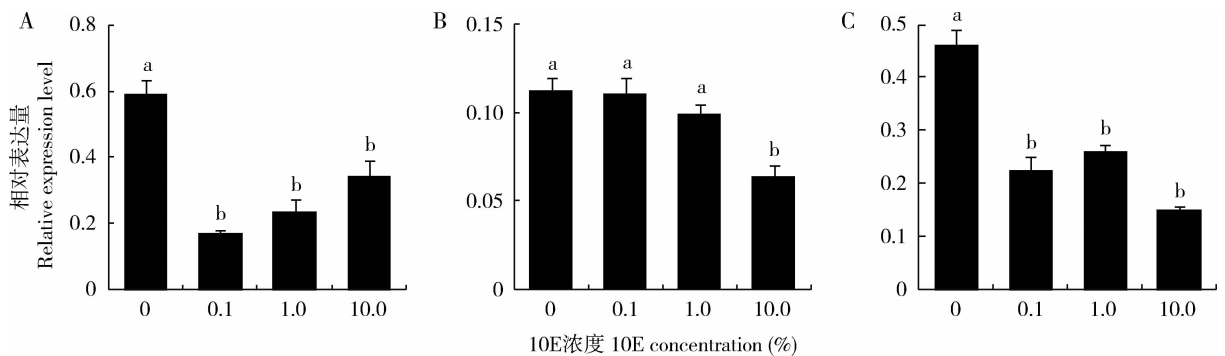


图3 10E对中华蜜蜂蜂王卵巢 *Vg*(A), *hex70b*(B)和 *hex110*(C)表达量的影响

Fig. 3 Effects of 10E on the expression levels of *Vg* (A), *hex70b* (B) and *hex110* (C) in queen ovary of *Apis cerana cerana*
10E: 10种信息素酯类混合物(4.5% 甲基棕榈酸酯+2.5% 甲基硬脂酸+35.0% 甲基油酸酯+1.0% 甲基亚油酸酯+16.0% 甲基亚麻酸酯+3.5% 乙基棕榈酸酯+1.5% 乙基硬脂酸酯+18.0% 乙基油酸酯+0.5% 乙基亚油酸酯+17.5% 乙基亚麻酸酯) Mixture of 10 brood pheromone esters (4.5% methyl palmitate+2.5% methyl stearate+35.0% methyl oleate+1.0% methyl linoleate+16.0% methyl linolenate+3.5% ethyl palmitate+1.5% ethyl stearate+18.0% ethyl oleate+0.5% ethyl linoleate+17.5% ethyl linolenate).

和 1.0% 10E 处理对蜂王卵巢 *hex70b* 表达量无显著影响 ($P > 0.05$), 但 10.0% 10E 显著降低了 *hex70b* 表达水平(图 3: B; $P < 0.05$)。

3 讨论

卵黄原蛋白为蜂王卵巢的发育提供营养和功能性物质, 具有激活卵巢、延长寿命等功能(张卫星和胥保华, 2014), 与蜂王的生殖能力相关(Engels, 1974; Amdam *et al.*, 2005)。卵黄原蛋白基因表达量高低与蜂王体内的保幼激素(JHIII)相关(Corona *et al.*, 2007), 而 JHIII 参与调节蜜蜂的发育和雌性蜂的极型分化(Barchuk *et al.*, 2007)。JHIII 还与昆虫储存蛋白基因(hexamerin gene, *hex*)的表达相关, 蜜蜂幼虫经 JHIII 处理可以诱导 *hex* 基因的高表达(Martins *et al.*, 2010)。昆虫储存蛋白为昆虫从幼虫到蛹的变态发育提供物质基础和保障, 在昆虫变态发育过程中具有至关重要的作用(Burmester and Scheller, 1999), 甚至还与昆虫的性别决定、产卵能力、寿命以及免疫力等生物学功能相关(Martins *et al.*, 2008, 2010; Cristino *et al.*, 2010)。在幼虫发育阶段的蜂王卵巢和雄蜂睾丸均检测到 *hex70b* 和 *hex110* 的转录本(Martins *et al.*, 2010)。卵巢发育的工蜂与卵巢未发育的工蜂比较, *hex110* 基因的表达量显著偏高, 表明 *hex110* 可能与卵巢发育相关(Bitondi *et al.*, 2006)。育王时随着移虫日龄的增加, 蜂王幼虫体内 JHIII 含量显著下降(庞倩等, 2017b), *hex70b* 和 *hex110* 编码蛋白的表达量也显著下降(庞倩等, 2017a)。因此, *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 基因的表达可能受到蜂王体内 JHIII 水平的调控, 与蜂王的卵巢发育及蜂王的质量相关。

早期研究表明, 工蜂可以通过幼虫体表信息素来识别幼虫的类型、生长阶段以及巢房内食物的多少, 从而高效地完成哺育、封盖等一系列活动(Le Conte *et al.*, 2001)。王台中幼虫体表信息素的比例及含量会影响工蜂行为从而影响蜂王的生长发育。本研究发现王台内添加 1.0% 浓度的 ML, MLN 和 MO 的混合物 3E 不仅显著提高了蜂王的初生重和卵巢管数量, *hex110* 基因的表达量也显著升高。庞倩等(2017b, 2017c)研究表明, 蜂王初生重与卵巢管数量呈线性关系, 利用 1 日龄幼虫培育的蜂王初生重、卵巢管数及蜂王卵巢 *hex110* 基因表达量显著高于利用 2 日龄和 3 日龄幼虫培育的蜂王, 这提示了 *hex110* 基因可能与蜂王的繁殖能力相关, 其高表

达有利于蜂王提高繁殖性能。

在中蜂育王时王台内单独添加 MP 可以显著提高幼虫的重量, 但对王台的封盖率、蜂王的初生重和卵巢管数量并没有显著影响(曾云峰等, 2010; 邹垂彬等, 2016b)。在 3E 基础上添加了 MP 的 4E 试验中发现, 10.0% 浓度的处理组蜂王初生重和卵巢管数与对照组相比显著提高, 因此在中蜂幼虫发育过程中 MP 可能与其他酯类一起共同作用影响蜂王的发育。不同浓度的 4E 对 *Vg*, *hex70b* 和 *hex110* 基因表达量的影响存在差异, 相关机理有待于进一步深入研究。

在 10 种酯类混合物的试验中, 各浓度处理组蜂王的初生重均较对照组的偏低, 蜂王卵巢 *Vg* 和 *hex110* 基因的表达量也均显著下降, 这不难解释, 由于 10 种酯类成分含量是在幼虫封盖前 1 d 的蜂王体表测定的(从卵开始发育第 7 天), 其主要作用与幼虫封盖行为相关(Trouiller *et al.*, 1994), 而不同日龄的幼虫体表酯类成分存在很大差异(Le Conte, 1994), 因此蜂王幼虫信息素的组成和含量可能随着幼虫日龄的不同而发生变化。为了更好地研究中蜂幼虫信息素对育王质量的影响, 需进一步研究明确不同日龄蜂王幼虫体表信息素成分的差异。

参考文献 (References)

- Amdam GV, Aase AL, Seehuus SC, Kim FM, 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.*, 40(12): 939–947.
- Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LDF, Simoes ZLP, Maleszka R, 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.*, 7(1): 70.
- Bitondi MM, Nascimento AM, Cunha AD, Guidugli KR, Nunes FM, 2006. Characterization and expression of the *Hex 110* gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63(2): 57–72.
- Burmester T, Scheller K, 1999. Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Sci. Nat.*, 86(10): 468–474.
- Chen SB, 1989. Artificial Queen Rearing. Agriculture Press, Beijing. 7. [陈世璧, 1989. 人工育王. 北京: 农业出版社. 7]
- Chen SB, Liu FH, Liu FX, 1991. Rearing high quality queen with larger larvae. *J. Bee*, (3): 16–17. [陈世璧, 刘富海, 刘甫秀, 1991. 利用大卵培养优质蜂王. 蜜蜂杂志, (3): 16–17]
- Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE, 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(17): 7128–7133.
- Cristino AS, Nunes FM, Barchuk AR, Aguiar-coelho VM, Simões ZL, Bitondi MM, 2010. Organization, evolution and transcriptional profile of *hexamerin* genes of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Insect Mol. Biol.*, 19(S1): 137–146.

- Doolittle GM, 1889. Scientific Queen-Rearing. Illinois, Newman & Son, USA.
- Engels W, 1974. Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *Am. Zool.*, 14(4): 1229–1237.
- Gabka J, Ochnio M, Kaminski Z, Madras-Majewska B, 2011. Effect of age of eggs used for rearing honey bee queens on the number of received queen cells. *J. Apic. Sci.*, 55(1): 47–53.
- Gan HY, 2014. Artificial Rearing of the Diploid Honeybee (*Apis cerana cerana*) Drones, Cannibalism Substance Identification and Sequencing of Transcriptome. MSc Thesis, Jiangxi Agricultural University, Nanchang. [甘海燕, 2014. 中蜂二倍体雄蜂的人工培育、相残信息素鉴定及转录组分析. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文]
- Kuan BY, 2003. Biology of Bees. Yunnan Science and Technology Publishing Press, Kunming. 45–46. [匡邦郁, 2003. 蜜蜂生物学. 昆明: 云南科技出版社. 45–46]
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B, Ourisson G, 1989. Attraction of the parasitic mite varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*, 245(4918): 638–639.
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Trouiller J, Masson C, Chappe B, 1990. Identification of a brood pheromone in honeybees. *Sci. Nat.*, 77(7): 334–336.
- Le Conte Y, Mohammedi A, Robinson GE, 2001. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc. Biol. Sci.*, 268(1463): 163–168.
- Le Conte Y, Sreng L, Poitout SH, 1995. Brood pheromone can modulate the feeding behavior of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 88(4): 798–804.
- Le Conte Y, Sreng L, Trouiller J, 1994. The recognition of larvae by worker honeybees. *Sci. Nat.*, 81(10): 462–465.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Martins JR, Nunes FM, Simões ZL, Bitondi MM, 2008. A honeybee storage protein gene, *hex70a*, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. *J. Insect Physiol.*, 54(5): 867–877.
- Martins JR, Nunes MF, Cristino AS, Simões ZL, Bitondi MM, 2010. The four *hexamerin* genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Mol. Biol.*, 11: 23.
- Pang Q, Shen F, Wang K, Zhang WW, Yin L, Ji T, 2017a. Proteomic analysis of ovaries of queen bees (*Apis mellifera*) developed from larvae grafted at different instars. *Acta Entomol. Sin.*, 60(7): 760–771. [庞倩, 沈芳, 王康, 张文文, 殷玲, 吉挺, 2017a. 不同龄期移虫发育的蜂王卵巢蛋白质组学分析. 昆虫学报, 60(7): 760–771]
- Pang Q, Shen F, Yin L, Ji T, 2017b. Study on the effect of instar of the grafted larvae on the queen growth and development. *J. Environ. Entomol.*, 39(1): 93–97. [庞倩, 沈芳, 殷玲, 吉挺, 2017b. 移虫日龄对蜂王生长发育的影响. 环境昆虫学报, 39(1): 93–97]
- Pang Q, Wang Y, Wang K, Zhang WW, Ji T, 2017c. Analysis on differential expression of *hexamerin110* and *hexamerin70b* in the ovaries of queens reared from different instar of the grafted larvae. *J. Environ. Entomol.*, 39(1): 62–67. [庞倩, 王莹, 王康, 张文文, 吉挺, 2017c. 不同移虫日龄蜂王卵巢中 *hexamerin110*、*hexamerin70b* 的差异表达分析. 环境昆虫学报, 39(1): 62–67]
- Qin QH, 2013. Comparison of Learning and Memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera* and Analysis of Related Molecular Mechanism of Learning and Memory in Honeybee. MSc Thesis, Jiangxi Agricultural University, Nanchang. [秦秋红, 2013. 东方蜜蜂与西方蜜蜂学习记忆比较及蜜蜂学习记忆相关分子机理分析. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文]
- Trouiller J, Arnold G, Chappe B, Le Conto Y, Billion A, Masson C, 1994. The kairomonal esters attractive to the *Varroa jacobsoni* mite in the queen brood. *Apidologie*, 25(3): 314–321.
- Wang J, Gao FC, Yu WQ, Lang Y, He SY, 2013. Study on reproductive potential of queens under different rearing conditions. *J. Yunnan Agric. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 28(3): 442–445. [王静, 高夫超, 于文全, 郎雁, 和绍禹, 2013. 不同培育条件对蜜蜂蜂王生殖潜能的影响研究. 云南农业大学学报(自然科学), 28(3): 442–445]
- Woyke J, 1971. Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *J. Apicult. Res.*, 10(1): 45–55.
- Xu SY, Xiao HL, Li GX, 1984. Dissection and simple counting method of queen ovariole. *Apicult. China*, (4): 18–19. [许少玉, 肖洪良, 李桂仙, 1984. 蜂王卵巢管的解剖和简便计数法. 中国蜂业, (4): 18–19]
- Yan WY, Le Conte Y, Beslay D, Zeng ZJ, 2009. Identification of brood pheromone in Chinese honeybee [*Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)]. *Sci. Agric. Sin.*, 42(6): 2250–2254. [颜伟玉, Le Conte Y, Beslay D, 曾志将, 2009. 中华蜜蜂幼虫信息素鉴定. 中国农业科学, 42(6): 2250–2254]
- Yu LS, 2007. Study on Population Dynamics and Colony Diversity of *Apis cerana cerana* in Southern Anhui. PhD Dissertation, Anhui Agricultural University, Hefei. 6–10. [余林生, 2007. 皖南中华蜜蜂种群数量动态及群体多样性研究. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文. 6–10]
- Zeng YF, Zeng ZJ, Yan WY, Wu XB, 2010. Effects of three aliphatic esters of brood pheromone on worker feeding and capping behavior and queen development of *Apis cerana cerana* and *A. mellifera ligustica*. *Acta Entomol. Sin.*, 53(2): 154–159. [曾云峰, 曾志将, 颜伟玉, 吴小波, 2010. 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, 53(2): 154–159]
- Zhang WX, Xu BH, 2014. Overview of vitellogenin of honey bee. *J. Bee*, 34(5): 5–7. [张卫星, 胥保华, 2014. 蜜蜂卵黄原蛋白的研究进展. 蜜蜂杂志, 34(5): 5–7]
- Zou CB, Wu TB, Hu JH, Zeng ZJ, Yan WY, 2016a. Research on the non-grafting queen rearing technology of *Apis cerana cerana*. *J. Bee*, (1): 8–10. [邹垂彬, 吴天宝, 胡景华, 曾志将, 颜伟玉, 2016a. 中华蜜蜂免移虫育王技术研究. 蜜蜂杂志, (1): 8–10]
- Zou CB, Zhou LB, Hu JH, Xi FG, Yuan F, Yan WY, 2016b. Effects of queen-rearing without larvae-grafting and two esters of brood pheromone on the queen quality of *Apis cerana cerana*. *Sci. Agric. Sin.*, 49(18): 3662–3670. [邹垂彬, 周林斌, 胡景华, 席芳贵, 袁芳, 颜伟玉, 2016b. 免移虫育王和两种酯类幼虫信息素对中华蜜蜂蜂王质量的影响. 中国农业科学, 49(18): 3662–3670]