

意大利蜜蜂同日龄不同职能工蜂上颚腺的转录组学分析

高艳^{1,3} 杨振慧¹ 李秋方¹ 朱雅楠¹ 梁立强¹ 苏松坤^{1*} 聂红毅^{1,2*}

(1. 福建农林大学 动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002;

2. 福建农林大学 基因组与生物技术研究中心, 福州 350002;

3. 江西省养蜂研究所, 南昌 330052)

摘要 为揭示意大利蜜蜂哺育蜂上颚腺中蜂王浆合成和分泌相关的分子机制,通过组建人工蜂群收集3日龄工蜂(3 d)、10日龄哺育蜂(10 dN)、10日龄采集蜂(10 dF)、21日龄哺育蜂(21 dN)和21日龄采集蜂(21 dF),利用高效液相色谱技术检测5种不同职能工蜂上颚腺中10-羟基-2-癸烯酸(10-hydroxy-2(E)-decenoic acid, 10-HDA)的含量,并在转录组学水平全面分析上颚腺中调控蜂王浆合成和分泌密切相关的基因。结果表明:工蜂上颚腺中10-HDA含量随日龄的增加呈逐渐增加趋势,其中21 dF和21 dN上颚腺中10-HDA的含量均显著高于3 d($P < 0.05$),但同日龄采集蜂上颚腺中10-HDA的含量高于相同日龄哺育蜂;RNA-seq分析发现,46个差异基因在10 dN上颚腺中的表达量显著高于3 d、10 dF和21 dF,同时在21 dN上颚腺中的表达量也显著高于21 dF;GO和KEGG富集分析显示这些差异基因主要富集在脂肪酸代谢、能量代谢等方面,暗示哺育蜂的上颚腺可能通过增加脂肪酸代谢和能量代谢等促进蜂王浆中相关脂肪酸的合成。综上,在排除日龄影响下,本研究测定了不同职能工蜂上颚腺中10-HDA的变化趋势,同时筛选了46个与哺育蜂上颚腺中蜂王浆合成和分泌密切相关的基因,为深入阐明其分子机制提供基础,也为研究膜翅目昆虫上颚腺的功能提供新视角。

关键词 意大利蜜蜂; 哺育蜂; 上颚腺; 蜂王浆合成和分泌; 10-HDA; 相同日龄

中图分类号 S89 文章编号 1007-4333(2021)04-0093-11 文献标志码 A

Transcriptome analysis of mandibular glands from worker bees (*Apis mellifera ligustica*) with different functions at the same age

GAO Yan^{1,3}, YANG Zhenhui¹, LI Qiufang¹, ZHU Yanan¹, LIANG Liqiang¹, SU Songkun^{1*}, NIE Hongyi^{1,2*}

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

2. Center for Genomics and Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. Jiangxi Apiculture Research Institute, Nanchang 330052, China)

Abstract In order to reveal the molecular mechanism related to the synthesis and secretion of royal jelly in the mandibular glands (MGs) of nurses, specimens (3-day-old worker bees(3 d), 10-day-old nurses(10 dN), 10-day-old foragers (10 dF), 21-day-old nurses (21 dN) and 21-day-old foragers (21 dF)) were collected from an established bee colony. The content of 10-hydroxy-2(E)-decenoic acid (10-HDA) was detected in the MGs of worker bees with five different functions by high-performance liquid chromatography (HPLC) and genes closely related to the synthesis and secretion of royal jelly were analyzed comprehensively in the MGs at the transcriptional level. The results showed that: The content of 10-HDA in the MGs of worker bees increased gradually with the increase of age. The content of 10-HDA

收稿日期: 2020-07-15

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-44-KXJ4);国家自然科学基金面上项目(31772684);福建省自然科学基金项目(2018 J05043);福建省省属高校科研项目(JK2017014)

第一作者: 高艳, 硕士研究生, E-mail: 2726820378@qq.com

通讯作者: 苏松坤, 研究员, 主要从事蜜蜂遗传育种和蜜蜂分子生物学研究, E-mail: susongkun@zju.edu.cn

聂红毅, 讲师, 主要从事蜜蜂分子生物学研究, E-mail: hnhynie@126.com

in the MGs of 21 dN/F were both significantly higher than that of 3 d ($P < 0.05$), but 10-HDA content of foragers was higher than that of nurses with corresponding age; RNA-seq revealed that the expression of 46 differentially expressed genes (DEGs) in the MGs of 10 dN was significantly higher than those of 3 d, 10 dF and 21 dF, and also those DEGs in the MGs of 21 dN was significantly higher than that of 21 dF; GO and KEGG enrichment analysis showed that up-regulated DEGs were mainly enriched in fatty acid metabolism and energy metabolism, suggesting that the MGs of nurses might increase fatty acid metabolism and energy metabolism to stimulate the synthesis of related fatty acids during the production of royal jelly. In summary, the variation trend of 10-HDA in MGs of worker bees with different performances was determined without the influence of age, and 46 DEGs associated with the secretion of royal jelly were identified, which provide a great deal of valuable information for further elucidating the molecular mechanism underlying the production of royal jelly, and also will provide a new perspective for studying the function of MGs in hymenoptera insects.

Keywords *Apis mellifera ligustica*; nurses; mandibular glands; synthesis and secretion of royal jelly; 10-HDA; same age

工蜂上颚腺呈一对大型囊状,分布于头部内表面两侧^[1],主要合成和分泌脂肪酸以及蜂群报警激素相关的 2-庚酮等信息素,其分泌的脂肪酸主要用于幼虫食物营养^[2]。研究表明,上颚腺的组成和分泌量受蜜蜂级型和日龄等影响^[3]。工蜂上颚腺能分泌蜂王浆成分中的 ω -羟基酸及其相应的二酸^[4],是蜂王浆中的主要脂质成分^[3],其中,脂肪酸中的主要成分 10-羟基-2-癸烯酸(10-hydroxy-2(E)-decenoic acid, 10-HDA)是蜂王浆所特有的成分,也是蜂王浆质量评价的重要参考标准^[5]。

蜂王浆的分泌由哺育蜂哺育行为介导,因此,人们可以利用哺育蜂分泌蜂王浆饲喂幼虫的行为用于大量生产供人类食用的蜂王浆。蜂王浆由哺育工蜂的咽下腺和上颚腺共同分泌。为阐明上颚腺合成和分泌蜂王浆分子机制,前人已对不同发育日龄的上颚腺开展了大量的研究。黄少康等^[6]利用 HPLC 测定 0~30 日龄意大利蜜蜂工蜂头部中 10-HDA 的含量,研究发现工蜂上颚腺中 10-HDA 含量随日龄增加呈逐渐上升的趋势,在 10~20 日龄间保持平衡,30 日龄含量达到最高;转录组学分析不同级型意大利蜜蜂(蜂王、工蜂)上颚腺分泌物合成途径,发现细胞色素 P450(*CYP450*)家族基因参与脂肪酸 β -氧化和 ω -氧化,其中 *CYP6AS8* 是工蜂中 *CYP450* 家族基因中表达量最高的基因,这一发现有助于阐明脂肪酸衍生的信息素生物合成的分子基础^[7]; Huo 等^[3]对不同发育日龄(刚出房工蜂、哺育蜂和采集蜂)的普通意大利蜜蜂和优良产浆意大利蜜蜂上颚腺进行蛋白组学分析,结果显示在哺育蜂阶段,特异性蛋白和高丰富的蛋白主要富集在物质转运和脂质合成相关的通路,推测哺育蜂上颚腺优先启动

脂质合成中的高分泌活性以作为提供幼虫营养方面的来源,进而激活脂质合成维持所需的脂肪酸来源并最大限度地降低脂质降解以增加 10-HDA 合成,从而有助于提高蜂王浆的产量。前人已从转录组学和蛋白质组学等方面对不同日龄上颚腺展开研究,然而,上颚腺中蜂王浆合成和分泌的分子机制尚不明确。

为排除日龄因素对上颚腺蜂王浆合成和分泌分子机制的影响,本研究基于蜂群中工蜂劳动分工的可塑性^[8-9],通过人工组建蜂群,收集 3 日龄工蜂(3 d)、10 日龄哺育蜂(10 dN)、10 日龄采集蜂(10 dF)、21 日龄哺育蜂(21 dN)和 21 日龄采集蜂(21 dF),检测不同职能工蜂上颚腺中 10-HDA 含量,并采用 RNA-seq 技术全面筛选哺育蜂上颚腺中与蜂王浆合成分泌相关的差异基因(Differentially expressed genes, DEGs),为阐明上颚腺合成分泌蜂王浆分子机制提供大量有价值的信息,也为膜翅目昆虫中上颚腺功能的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验蜂种

本研究所用的“蜂强 1 号”意大利蜜蜂蜂种来自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜂场(隶属亚热带季风气候,119°30' E, 26°08' N,海拔 600~1 000 m),样品于 2017 年 10—11 月采自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)教学蜂场。

1.2 主要仪器及试剂

荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、高效液相色谱仪(LC-20A,日本株式会社岛津制作所)、色谱柱(4.6 mm×250 mm 不锈钢柱,填充物不定形硅

胶 C18 键合相, 10 μm)、SPD-M20A 二极管阵列检测器(日本株式会社岛津制作所)、体视显微镜 1 台、冷光源仪器 1 台; DEPC 水(上海生工生物公司)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa 公司)、甲醇(色谱纯, 德国 MECK 基团有限公司)、无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、10-HDA 标准品(纯度 99.3%, 上海安谱实验科技股份有限公司)、对硝基苯甲酯(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 标记蜜蜂及收集样品

试验所用蜂群为正常健康的 5 群强群, 每群蜂中至少含有 2~3 张即将出房的封盖子脾。在组建新的蜂群之前, 去除封盖子脾上的蜜蜂, 放于恒温恒湿培养箱(温度 34.5 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60%)中, 每隔 24 h 用不同颜色的记号笔在刚出房的蜜蜂胸部或腹部做好标记, 连续标记 5 d, 每天标记刚出房工蜂数目为 3 000~5 000 头。标记后投入由 1 只蜂王、蜜粉脾各 1 张和 1 张幼虫脾组建的人工蜂群, 其中幼虫脾置于中间位置, 同时在边脾外侧插入隔板, 纱盖上方盖上覆布, 便于保温。每隔 5 d, 从原有蜂群中抽出小幼虫脾, 替换组建蜂群中的封盖脾, 以保证有充足的幼虫。

标记的工蜂发育到第 3 天时, 直接收取工蜂作为 3 日龄工蜂(3 d); 标记的工蜂发育至第 10 天和 21 天时, 收集头部伸到有幼虫巢房且持续时间超过 10 s 的工蜂分别作为 10 日龄哺育蜂(10 dN)和 21 日龄哺育蜂(21 dN); 在巢门口收集后足花粉筐中载有花粉的外勤蜂, 将其分别作为 10 日龄采集蜂(10 dF)和 21 日龄采集蜂(21 dF)。按照这个要求, 收集 3 d、10 dN、10 dF、21 dN 和 21 dF 共 5 组样本。

1.4 上颚腺的解剖

剪下工蜂头部并去除其触角, 拨开口器后将手术用镊子穿过口器后翻转至反面朝上, 放在自制蜡盘中, 在体视显微镜下用手术刀将工蜂头部的几丁质外壳去除, 沿着工蜂口器两边的上颚挑出上颚腺。

1.5 HPLC 检测上颚腺中 10-HDA 的含量

取上述解剖后的 5 组样品, 每组 5 对上颚腺, 每组设置 3 个生物重复; 上颚腺组织置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μL 甲醇充分研磨后, 移至新的离心管中, 加入 100 μL 内标溶液(对羟基苯甲酸甲酯溶液), 定容至 1 mL 并摇匀, 即得各组样本的上颚腺

待测样品溶液。取 10 μL 10-HDA 标准溶液梯度溶液, 注入色谱仪, 测得 10-HDA 峰面积, 每个样平行 3 次, 基于峰面积的平均值与进样量进行线性拟合, 得到 10-HDA 线性回归方程。根据内标法计算上颚腺中待测样品溶液中的 10-HDA 含量。

试剂(10-HDA 标准溶液、内标溶液和水相溶液)配制、色谱条件参考文献[10-11]的操作。

1.6 上颚腺中蜂王浆合成和分泌相关 DEGs 的表达水平分析

1.6.1 试验组样品 cDNA 文库构建及 Illumina 测序

3 d 的 3 个生物学重复分别为 3 d₁、3 d₂ 和 3 d₃; 10 dN 的 3 个生物学重复分别为 10 dN₁、10 dN₂ 和 10 dN₃; 10 dF 的 3 个生物学重复分别为 10 dF₁、10 dF₂ 和 10 dF₃; 21 dN 的 3 个生物学重复分别为 21 dN₁、21 dN₂ 和 21 dN₃; 21 dF 的 3 个生物学重复分别为 21 dF₁、21 dF₂ 和 21 dF₃。委托北京诺禾致源生物有限公司开展总 RNA 质量控制、cDNA 文库构建和 Illumina 测序。本研究 15 个 RNA-seq 测序的数据已上传 NCBI SRA (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/SUB8031156/overview>), SRA 数据编号为 SUB8031156。RNA-seq 测序数据分析采用西方蜜蜂参考基因组(Amel_{4.5}), 其链接为: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002195.4/。

1.6.2 哺育蜂上颚腺中蜂王浆合成和分泌相关 DEGs 的筛选及表达水平分析

根据 FPKM(Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)值法计算每个基因在 5 组样本中的表达量。利用 DESeq2 软件分析差异基因, 将校正后的 $P < 0.05$ 作为筛选差异基因的标准, 其中 \log_2 Fold change > 0 和 \log_2 Fold change < 0 分别作为筛选上调和下调 DEGs 的标准^[12]。

筛选与上颚腺中蜂王浆合成分泌密切相关的 DEGs 的标准如下: DEGs 在 10 dN 上颚腺中的表达量显著高于 3 d 和 21 dN; DEGs 在 10 dN 上颚腺中的表达量显著高于 10 dF; DEGs 在 21 dN 上颚腺中的表达量显著高于 21 dF; DEGs 在 10 dN 与 21 dN 上颚腺中的表达量无显著差异。将 10 dN 与 3 d 之间产生的 DEGs 记为 10 dN vs 3 d 组, 10 dN 与 21 dF 之间产生的 DEGs 记为 10 dN vs 21 dF 组, 10 dN 与 10 dF 之间产生的 DEGs 记为 10 dN vs 10 dF 组, 21 dN 与 21 dF 之间产生的 DEGs 记

为 21 dN vs 21 dF 组, 10 dN 与 21 dN 产生的 DEGs 为 10 dN vs 21 dN 组。通过韦恩图分析: 10 dN vs 3 d 与 10 dN vs 21 dF、10 dN vs 10 dF、21 dN vs 21 dF 交集产生共有 DEGs(共有 DEGs 包括调控蜂王浆合成分泌相关, 也包括日龄发育等相关); 为减少日龄发育的影响, 从上述 4 组交集共有 DEGs 中去除 10 dN vs 21 dN 与其交集产生的 DEGs, 即为哺育蜂上颚腺中与蜂王浆合成分泌密切相关的 DEGs。

通过 clusterProfiler R 软件包和基因本体(GO)条目将关键差异表达基因 DEGs 映射到 GO 数据库中, 利用 BLAST 软件将筛选得到的 DEGs 与 KEGG 数据库比对, $P < 0.05$ 表示显著性富集。利用诺禾 Novogene 售后工具平台(https://magic.novogene.com/public/customer/main#/tool_rna/add_tool)对 DEGs 进行 KEGG pathway 富集分析。

1.6.3 DEGs 的实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR)验证

利用 Primer Premier 6 为随机选取的 6 个

DEGs 设计特异性引物(表 1), 其中以 *actin*(NM_001185146.1) 作为内参基因。反应体系: SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa 公司, 日本) 5 μ L, 正/反向引物 (2 μ mol/L) 2 μ L, 模板 (500 ng/ μ L) 2 μ L, ddH₂O 补充至 10 μ L。PCR 扩增程序分为 3 步: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环; 最后一步为溶解曲线分析: 65 $^{\circ}$ C 开始, 每 5 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C, 直至上升到 95 $^{\circ}$ C。在荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司, 美国)完成反应程序后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[13] 计算上颚腺 DEGs 的相对表达量。

1.7 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件中单因素方差分析(One-way ANOVA)不同职能工蜂上颚腺 10-HDA 含量的差异显著性以及 qPCR 中 *ACFS2*、*Mrj p1*、*Mrj p2*、*Mrj p3*、*Mrj p4* 和 *Mrj p7* 基因在不同样本中表达量的差异显著性($P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著), 结果用平均值 \pm 标准误表示。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession number	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>ACFS2</i>	NM_001206973.2	F: CTACCCTCCTATCCCACAGA R: TGAAACATGGTCAACAATC
<i>Mrj p1</i>	NM_001011579.1	F: TGACATACATTACGAAGGAGTCCA R: ATCCGAAGAAGAGAACGCCA
<i>Mrj p2</i>	NM_001011580.1	F: CGTCCAATACCAAGGATCCGAA R: ACAAGTCCGACGAAGAGGAC
<i>Mrj p3</i>	NM_001011601.1	F: TGGACAGATGGCGTGATAAGAC R: GAGGTCCACCTTTGCCCTTT
<i>Mrj p4</i>	NM_001011610.1	F: AGACAAAATATCGATGTCGTAGCTC R: TGCCAGATTGTGGAACGTTTT
<i>Mrj p7</i>	NM_001014429.1	F: AGAAAATACCGATATGGTCCGCC R: CAATAATGACGATATGTGGGAGCA
<i>actin</i>	NM_001185146.1	F: CCTAGCACCATCCACCATGAA R: GAAGCAAGAATTGACCCACCAA

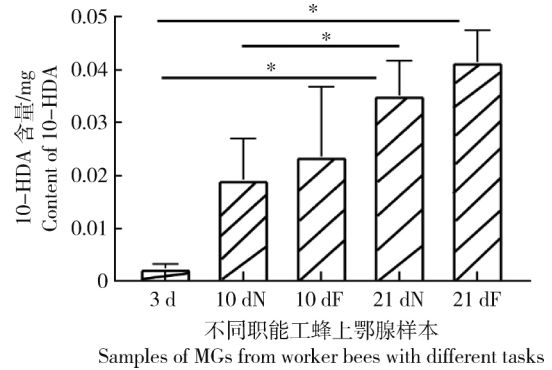
2 结果与分析

2.1 工蜂上颚腺中 10-HDA 的含量测定

HPLC 测定 3 d、10 dN、10 dF、21 dN 和 21 dF 上颚腺中 10-HDA 含量。发现 3 d 上颚腺的 10-HDA 含量最低(0.002 5±0.000 85 mg),10 dN 上颚腺中 10-HDA 的含量为 0.019 2±0.007 78 mg,21 dF 上颚腺的 10-HDA 含量最高(0.041 5±0.005 97 mg);随着日龄增加,上颚腺中 10-HDA 的含量随之增加,其中 21 dN 和 21 dF 上颚腺中 10-HDA 的含量均显著高于 3 d($P<0.05$),21 dF 上颚腺中 10-HDA 的含量显著高于 10 dN($P<0.05$);在相同日龄(10 日龄和 21 日龄)的哺育蜂和采集蜂中,本研究发现采集蜂上颚腺中 10-HDA 含量均高于同日龄哺育蜂,但差异不显著(图 1)。

2.2 不同职能工蜂上颚腺测序文库的质控

过滤低质量 reads 后,每个文库产生约 4 049~8 775 万个 clean reads,与西方蜜蜂基因组匹配率为



图中数据为平均值±标准误, * $P<0.05$

Data in the figure are mean±SE, * $P<0.05$

图 1 不同职能工蜂上颚腺 10-HDA 含量

Fig. 1 Contents of 10-HDA in the MGs of worker bees at different developmental ages

76.49%~90.63%。RNA-seq 测序有效读段数为 35 871 395~67 116 890,样本的单一匹配率均在 72%以上,Q30 值也均在 87.8%以上(表 2),说明 RNA-seq 数据质量较好,测序数据可靠性高。

表 2 上颚腺 15 个文库 RNA-seq 数据总览

Table 2 Overview of RNA-seq data from 15 libraries in MGs

样品 Sample	原始读数 Raw reads	有效读数 Clean reads	有效匹配数 (匹配率/%) Clean map (mapping rate)	单一匹配数 (匹配率/%) Unique map (mapping rate)	多匹配数 (匹配率/%) Multiple map (mapping rate)	99.99%的碱基 正确率/% 99.99% base accuracy
3 d ₁	37 292 859	36 661 357	63 922 541(87.18)	62 206 080(84.84)	1 716 461(2.34)	89.74
3 d ₂	33 633 640	32 994 785	54 188 549(82.12)	52 960 904(80.26)	1 227 645(1.86)	88.73
3 d ₃	31 440 911	30 941 913	48 963 621(79.12)	47 664 067(77.02)	1 299 554(2.10)	89.58
10 dF ₁	29 999 903	29 097 212	50 815 542(87.32)	49 734 709(85.46)	1 080 833(1.86)	90.24
10 dF ₂	24 267 439	23 630 634	41 251 537(87.28)	40 329 745(85.33)	921 792(1.95)	92.45
10 dF ₃	28 535 351	27 991 906	49 243 885(87.96)	48 088 591(85.90)	1 155 294(2.06)	90.86
10 dN ₁	23 430 622	23 059 696	40 533 529(87.89)	38 779 174(84.08)	1 754 355(3.80)	88.31
10 dN ₂	2 6724 571	25 910 505	46 966 723(90.63)	43 049 179(83.07)	3 917 544(7.56)	93.35
10 dN ₃	22 543 596	22 179 142	39 126 499(88.21)	38 187 395(86.09)	939 104(2.12)	92.10
21 dF ₁	24 859 154	24 303 946	43 202 631(88.88)	42 256 301(86.93)	946 330(1.95)	92.62
21 dF ₂	29 856 499	29 391 545	52 258 724(88.90)	51 052 089(86.85)	1 206 635(2.05)	92.19
21 dF ₃	32 289 467	31 859 457	56 442 923(88.58)	55 410 701(86.96)	1 032 222(1.62)	92.48
21 dN ₁	22 749 016	22 305 023	38 490 504(86.28)	36 726 744(82.33)	1 763 760(3.95)	87.80
21 dN ₂	4 4741 657	43 875 367	67 116 890(76.49)	62 962 821(71.75)	4 154 069(4.73)	92.85
21 dN ₃	20 559 535	20 246 273	35 871 395(88.59)	33 750 635(83.35)	2 120 760(5.24)	88.67

注:3 d₁~3 分别表示 3 日龄工蜂上颚腺的 3 个生物学重复;10 dN₁~3 分别表示 10 日龄哺育蜂上颚腺的 3 个生物学重复 10 dF₁~3 分别表示 10 日龄采集蜂的 3 个生物学重复;21 dN₁~3 分别表示 21 日龄哺育蜂上颚腺的 3 个生物学重复;21 dF₁~3 分别表示 21 日龄采集蜂上颚腺的 3 个生物学重复。

Note: 3 d₁~3 represent three biological replications in MGs of 3-day-old workers, respectively; 10 dN₁~3 represent three biological replications in MGs of 10-day-old nurses, respectively; 10 dF₁~3 represent three biological replications in MGs of 10-day-old foragers, respectively; 21 dN₁~3 represent three biological replications in MGs of 21-day-old nurses, respectively; 21 dF₁~3 represent three biological replications in MGs of 21-day-old foragers, respectively.

2.3 相同日龄哺育蜂和采集蜂上颚腺中 *Mrjps* 的表达谱

上颚腺是蜂王浆合成和分泌的重要外分泌腺体,因此,通过 RNA-seq 研究了相同日龄哺育蜂和采集蜂 *Mrjps* 的表达模式(图 2)。*Mrjps* 均表现出相似的表达模式,即这些基因在 10 dN 上颚腺中的表达量远高于 3 d、10 dF 和 21 dF,并且 21 dN 上颚

腺中表达量也高于同龄采集蜂,暗示它们可能在蜂王浆蛋白的合成中起关键作用。在这些基因中, *Mrjp1* 表达量最高,该基因在 3 d、10 dN、10 dF、21 dN 和 21 dF 上颚腺中的 FPKM 值分别为 201.59、40 997.05、387.54、63 157.08 和 399.08; *Mrjp8* 和 *Mrjp9* 表现出相对较低的表达水平 (FPKM<43.33)。

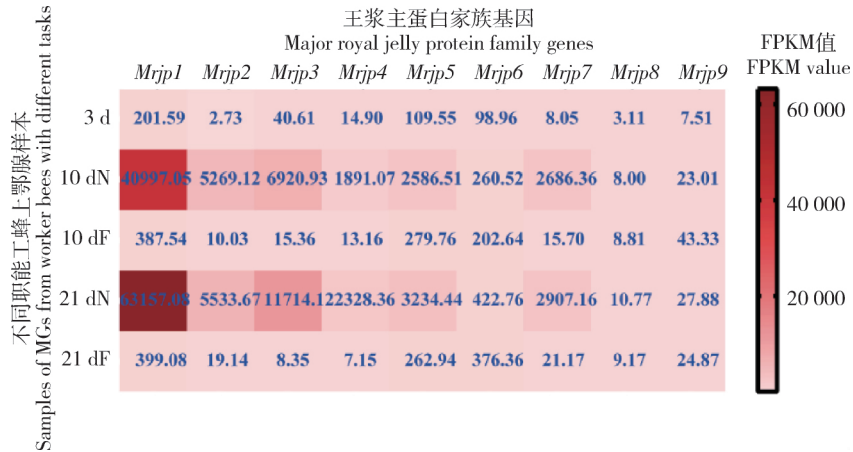


图 2 *Mrjps* 在 5 组工蜂上颚腺中的转录组数据表达谱

Fig. 2 Expression profiles of *Mrjps* in the MGs from five samples of worker bees

2.4 筛选上颚腺中蜂王浆合成分泌相关的 DEGs

由图 3 可看出,10 dN vs 3 d 有 381 个 DEGs; 10 dN vs 21 dF 有 568 个 DEGs;10 dN vs 10 dF 有

374 个 DEGs;21 dN vs 21 dF 有 664 个 DEGs,将这 4 组进行交集得到 67 个共有 DEGs,这 67 个 DEGs 可能与调控蜂王浆合成和分泌及日龄发育等相关。

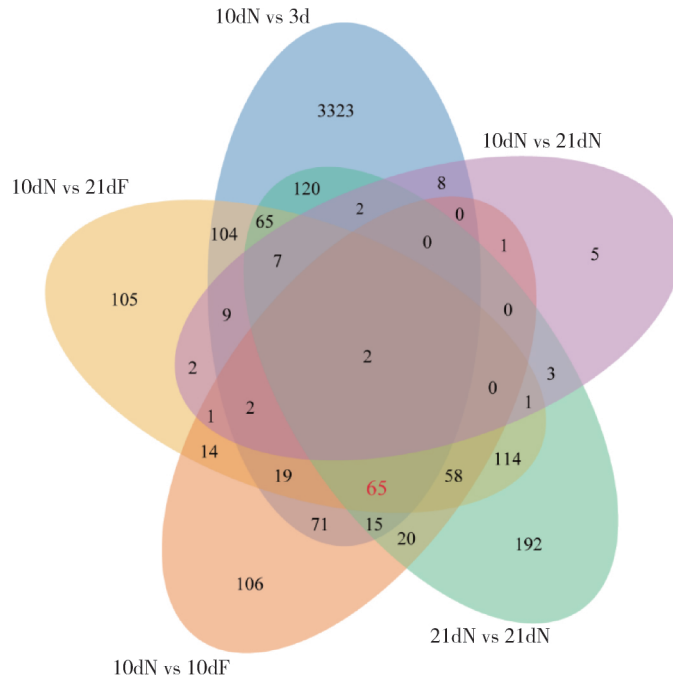


图 3 上颚腺中筛选蜂王浆合成分泌相关 DEGs 韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of DEGs related to synthesis and secretion of royal jelly in MGs

为减少日龄因素的影响,去除 10 dN vs 21 dN 与 67 个 DEGs 交集产生的 2 个 DEGs,最后得到严格筛选条件下与蜂王浆合成与分泌密切相关的 65 个 DEGs(图 3)。在这些基因中,只有 46 个 DEGs 在 10 日龄哺育蜂上颚腺中的表达量显著高于 3 d、

10 dF 和 21 dF 上颚腺中表达量,同时这些基因在 21 日龄哺育蜂上颚腺中的表达量也显著高于 21 dF 中的表达量,符合筛选上颚腺中蜂王浆合成和分泌相关 DEGs 的标准;相反,11 个 DEGs 在哺育蜂上颚腺中则均呈显著下调表达(表 3)。

表 3 5 组样本中上颚腺 65 个 DEGs 的差异性分析

Table 3 Analysis of significance of 65 DEGs in MGs among 5 groups of honeybee samples

基因数目/个	10 dN vs 3 d	10 dN vs 21 dF	10 dN vs 10 dF	21 dN vs 21 dF	10 dN vs 21 dN
46	↑	↑	↑	↑	ns
11	↓	↓	↓	↓	ns
6	↑	↓	↓	↓	ns
2	↓	↑	↑	↑	ns

注:3 d 代表 3 日龄工蜂的上颚腺;10 dN 代表 10 日龄哺育蜂的上颚腺;10 dF 代表 10 日龄采集蜂的上颚腺;21 dN 代表 21 日龄哺育蜂的上颚腺;21 dF 代表 21 日龄采集蜂的上颚腺。“↑”代表基因显著性上调;“↓”“”代表基因显著性下调;“ns”表示 2 组样本之间没有显著性差异。

Notes: 3 d represents MGs from 3-day-old workers; 10 dN represents MGs from 10-day-old nurses; 10 dF represents MGs from 10-day-old foragers; 21 dN represents MGs from 21-day-old nurses; 21 dF represents MGs from 21-day-old foragers; “↑” indicates genes were significantly up-regulated; “↓” indicates that genes were significant down-regulated; “ns” indicated that there was no significant difference between groups.

2.5 哺育蜂上颚腺中上调 DEGs 的 GO 分析

46 个上调 DEGs 的 GO 富集表明,在生物学进程中,上调 DEGs 富集在蛋白质均聚、蛋白质寡聚、大分子复合物组装、大分子复合物亚基组织、细胞组分组装、跨膜运输、细胞组分生物发生、氧化还原过程、蛋白质复合物组装和蛋白质复合物生物发生等;在分子功能上,上调 DEGs 富集在染色体部分、染色体、胞外区、非膜界细胞器、胞内非膜界细胞器、胞内细胞器部分、细胞器部分、细胞核、大分子复合体和胞内膜界细胞器等;在细胞组分方面,上调 DEGs 富集在与血红素结合、四吡咯结合、DNA 结合、连接酶活性、形成碳氮键、气味结合、酸性磷酸酶活性、丝氨酸型肽酶活性、丝氨酸水解酶活性和磷氧裂解酶活性、氧化还原酶活性(图 4(a))。在上调 DEGs 中没有显著的 GO 富集,但是这些 DEGs 中一些基因参与了蛋白磷酸化过程。

2.6 上调 DEGs 的 KEGG 分析

上调 DEGs 共富集 32 条 KEGG,其中包括缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸代谢、脂肪酸延伸、脂肪酸代谢、 β -丙氨酸代谢、脂肪酸降解、碳代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、丙酸新陈代谢、甘油酯新陈代谢、过氧化物

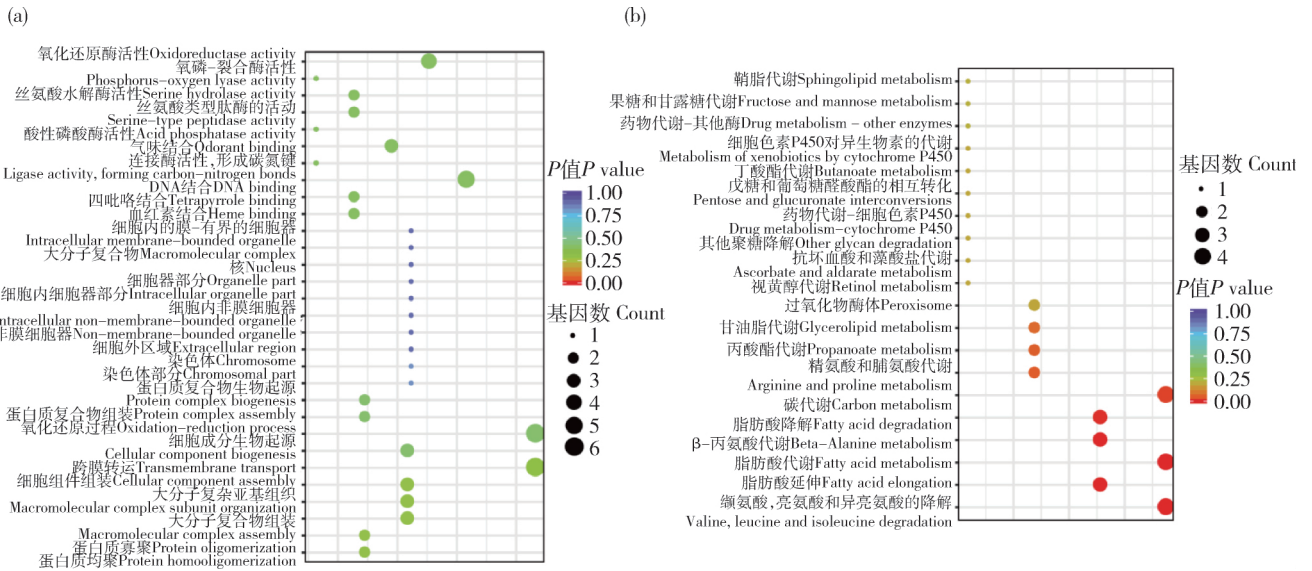
酶体、视黄醇新陈代谢、抗坏血酸和藻酸盐代谢、其他多糖降解、药物代谢-细胞色素 P450、戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化、丁酸代谢、细胞色素 P450 对异生源代谢、药物代谢-其他酶、果糖和甘露糖代谢、鞘脂代谢。而缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸降解、脂肪酸延伸、脂肪酸代谢、 β -丙氨酸代谢、脂肪酸降解、碳代谢均呈显著性富集,这些通路与蛋白质代谢、脂肪酸代谢有关,暗示上颚腺中相关基因可能参与了蛋白质和脂肪酸的生物合成(图 4(b))。

2.7 Real-time PCR 验证 RNA-seq 数据可靠性

为进一步验证 RNA-seq 结果,随机选择 6 个 DEGs(*ACFS2*、*Mrj p1*、*Mrj p2*、*Mrj p3*、*Mrj p4* 和 *Mrj p7*),并使用 qPCR 进行了验证。结果表明,qPCR 检测的 6 个 DEGs 的表达模式与转录组数据中 DEGs 的表达模式一致(图 5),表明上颚腺 RNA-seq 的数据是可靠的。

3 讨论

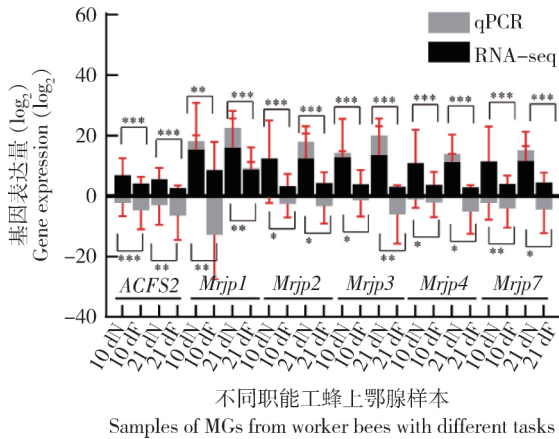
本文比较了不同职能工蜂上颚腺中 10-HDA 的含量,同时使用 RNA-seq 对相同日龄哺育蜂和采集蜂的上颚腺进行了系统分析。



(a) 上调 DEGs 的 GO 富集分类; (b) 上调 DEGs 的 KEGG 富集通路。 (a)、(b) 只列出了 GO 和 KEGG 富集功能上排名前 30 和 20 位的通路
 (a) GO enrichment classification of up-regulated DEGs; (b) KEGG enrichment pathway of up-regulated DEGs. a and b only list the top 30 and 20 pathways in GO and KEGG enrichment function, respectively.

图 4 上调 DEGs 的 GO 和 KEGG 功能富集分析

Fig. 4 GO and KEGG functional enrichment analysis of up-regulated DEGs



从左到右依次为 *ACFS2*、*Mrjp1*、*Mrjp2*、*Mrjp3*、*Mrjp4* 和 *Mrjp7* 6 个基因在样本 10 dN、10 dF、21 dN 和 21 dF 中的表达量, 其中黑色柱状图表示 RNA-seq 数据中基因的 FPKM 值, 灰色表示 qPCR 数据中基因的相对表达量, 纵坐标均为相应取过以 2 为底的对数数值。图中数据为平均值 ± 标准误, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Note: The expression levels of *ACFS2*, *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4* and *Mrjp7* six genes in the samples 10 dN, 10 dF, 21 dN, 21 dF were shown from left to right; The black bar graph represents the FPKM value of the gene in the RNA-seq data, and the gray bar represents the relative expression of genes in the qPCR data; The ordinates are the corresponding logarithmic values with a base of 2. Data in the figure are mean ± SE, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

图 5 上颚腺中转录组数据的 qPCR 验证

Fig. 5 qPCR validation of transcriptome data in MGs

3.1 上颚腺中 10-HDA 的分泌规律以及 *Mrjps* 表达趋势分析

在 3 日龄、10 日龄和 21 日龄工蜂的发育过程中, 发现工蜂上颚腺中 10-HDA 含量总体呈逐渐上升的趋势, 至 21 日龄达最高, 但同日龄条件下, 采集蜂上颚腺中 10-HDA 的含量高于哺育蜂。黄少康等^[6]利用 HPLC 对 0~30 日龄意蜂工蜂头部的 10-HDA 进行测定, 结果发现工蜂上颚腺中 10-HDA 含量随日龄总体呈逐渐上升的趋势, 在 10~20 日龄间保持平衡, 30 日龄含量达到最高, 这与本研究结果基本一致, 推测可能是由于哺育蜂的哺育行为致使腺体分泌物中部分 10-HDA 进入蜂王浆中。

在本研究中, 上颚腺中的 *Mrjp1-9* 表现出一种日龄依赖性的表达谱, 从第 3 天到第 10 天(哺育蜂阶段)转录丰度增加, 随后第 21 天(采集蜂阶段)转录丰度下降; 与此同时, 10/21 日龄的哺育蜂上颚腺的 *Mrjps* 表达量高于相应的采集蜂。 *Mrjp1-4* 和 *Mrjp7* 在哺育蜂上颚腺中大量表达 (FPKM > 2 000), 可能也是构成蜂王浆蛋白的主要成分。其中, 5 个基因 (*Mrjp1*、*Mrjp2*、*Mrjp3*、*Mrjp4* 和 *Mrjp7*) 符合上颚腺中与蜂王浆合成和分泌相关基因的筛选标准。与 10/21 dF 相比, 这些基因在哺育蜂上颚腺中的表达量明显上调。

3.2 上颚腺中脂肪酸的生物合成分泌相关的上调 DEGs

一般认为蜂王浆中的脂质成分主要由上颚腺分泌^[4]。上颚腺的主要功能是分泌脂肪酸和一些信息素。脂肪酸生物合成主要包括最佳前体-硬脂酸的合成、脂肪酸羟基化、脂肪酸链的缩短和末端羟基化修饰^[2,7,14]。

硬脂酸可以从食物中摄入后,直接进入上颚腺,也可以短链脂肪酸为原料,在上颚腺中从头合成^[40,44]。硬脂酸经过 ω -羟基化得到 ω -羟基硬脂酸, ω -羟基硬脂酸经过一系列 β -氧化和功能化修饰得到主要分泌物 10-HDA^[14]。

脂肪酸合成酶是工蜂上颚腺的一种特异性蛋白,也是催化内源性脂肪酸合成的关键酶。工蜂上颚腺以短链脂肪酸为原料,从头合成一种长链软脂酸的过程需要脂肪酸合成酶的催化^[15]。本研究发现编码脂肪酸合成酶的基因 *LOC412815* 在哺育蜂和采集蜂阶段的表达量均较高,但该基因在采集蜂阶段的表达量稍微高于哺育蜂阶段;前人研究结果发现上颚腺中脂肪酸合成酶的表达会影响 10-HDA 含量的变化^[16],本研究发现 10-HDA 在采集蜂上颚腺中的表达量高于哺育蜂,这一结果也说明了 *LOC412815* 在采集蜂阶段的表达量高于哺育蜂。

通过 KEGG 途径分析,发现 3 个上调 DEGs *LOC411662*(2-烯酰基辅酶 A 还原酶)、*LOC408291*(3-酮酰基-CoA 硫解酶)、*LOC409150*(烯酰辅酶 A 水合酶)明显富集在脂肪酸延伸通路上,暗示这 3 个基因可能参与了硬脂酸的生物合成过程。

研究表明,CYP6 家族成员中的 *CYP6AS8* 和 *CYP6AS11* 参与了昆虫脂肪酸羟基化^[7]。本研究发现 *CYP6AQ1* 在筛选的 DEGs 中呈上调表达,暗示该基因可能在上颚腺分泌物的生物合成中发挥重要作用,并可能参与了上颚腺中脂肪酸信息素前体的羟基化。

羟基化后,通过 β -氧化对脂肪酸碳链进行缩短过程。本文的研究结果表明,5 个上调 DEGs,乙酰辅酶 A 合成酶(*ACSF2*)、乙酰辅酶 A 脱氢酶(*LOC408567*)、烯酰辅酶 A 水合酶(*LOC409150*)、羟烷基辅酶 A 脱氢酶(*LOC725274*)、酮脂酰辅酶 A 硫解酶(*LOC408291*)均是参与脂肪酸 β -氧化过程的关键酶。脂肪酸 β -氧化过程中,一种关键酶-脂酰 CoA 脱氢酶在其中起到了催化氧化的作用,本研究在富集的脂肪酸降解通路中发现了 *LOC725274* 编

码的 3-羟烷基酰基-CoA 脱氢酶 II 型这一基因,此外这一氧化过程也需要通过一种电子传递中间体而完成。电子转移黄素蛋白 β (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF- β),是与脂肪代谢相关的酶类,作为脂酰 CoA 脱氢酶的电子受体,通过 ETF 脱氢酶将电子转移给主要的呼吸链,参与脂肪酸 β 氧化过程^[17],在转录组数据中发现 *LOC410308* 基因编码的 ETF- β 在哺育蜂阶段的表达量要高于同日龄的采集蜂阶段。

此外,3-酮脂酰 CoA 硫解酶(*LOC408291*)催化脂肪酸 β -氧化循环中的硫解反应,与脂质的合成、降解以及能量的产生有关^[18-19]。在筛选得到的 DEGs 中发现,相对于采集蜂阶段,*LOC408291* 在哺育蜂阶段呈高量表达。

本文比较了 KEGG 通路中脂质代谢的相关基因,包括脂质降解通路中编码相关酶的基因(烯酰辅酶 A 水合酶 *LOC409150*、乙酰辅酶 A 脱氢酶 *LOC408567*、3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶 *LOC408291*)的表达水平在 DEGs 中均呈上调。载脂蛋白是昆虫体内重要的脂质转运蛋白,值得注意的是,上调 DEGs 中编码载脂蛋白-III 的基因 *A4* 呈大量表达,这与 Wu 等^[7]的研究结果基本一致。GO 功能富集发现,在生物过程中,*A4* 与脂质转运和脂质定位相关,在分子功能中与脂质结合相关,推测载脂蛋白可能在上颚腺的脂肪酸运输方面发挥作用。

脂肪酸的合成均经过羟基化、 β -氧化和功能集团修饰,羟基化和 β -氧化是合成脂肪酸及其衍生物的重要通路。本研究发现在上调 DEGs 中参与羟基化(*CYP6AQ1*)和 β -氧化(*ACSF2*、*LOC408567*、*LOC409150*、*LOC725274*和*LOC408291*)的关键基因,推测这些基因在工蜂上颚腺合成 10-HDA 等相关脂肪酸衍生物方面发挥重要作用。

3.3 其他重要的 DEGs

在昆虫中,气味结合蛋白(Odorant binding proteins, OBPs)和化学感觉蛋白(Chemosensory proteins, CSPs)在运载疏水性气味分子和信息素穿过淋巴液的信号传导中发挥重要作用^[20-21]。有研究表明,一些 OBPs 在上颚腺中高量表达,暗示其可能参与了信号化学物质的溶解和释放^[22]。OBP14 在蜂群成员(蜂王、工蜂和雄蜂)的上颚腺中含量丰富,相对于幼蜂和老年蜂,其在内勤蜂中含量最高,OBP14 与单萜类结构有较好的亲和性^[22];OBP21 在老年蜂上颚腺中含量丰富,并与法尼素结合,法尼

素是一种吸引蜂群的信息素^[22]。此外,在上调 DEGs 中,也检测到 *Obp14*、*Obp17* 和 *Obp21*, 其中 *Obp21* 的表达最为丰富。对于社会昆虫而言,蜜蜂的嗅觉系统对于嗅觉线索的检测和辨别至关重要,这是蜂群社会中成员间主要的协调合作方式,对于蜂群的交流至关重要^[23]。CSP3 已显示与哺育所产生大型脂肪酸和酯衍生物特异性结合^[21],从而影响了哺育蜂的行为^[24]。虽然 OBP 和 CSP 可以与多种配体结合,但它们更倾向于传递不同气味的蜜蜂信息素,且具有较高的结合力^[23]。

脂肪酸代谢通路中的相关 DEGs 以及一些气味结合分子的相关基因在上颚腺中均呈上调表达,推测可能哺育蜂需要提供蜂群食物中所需的关键性脂肪酸物质(10-HDA)和蜂群成员间交流的脂肪酸信息素,因此,相对于采集蜂,同日龄哺育蜂分泌脂肪酸的能力更强。

4 结 论

基于蜂群内社会性劳动分工的可塑性,本研究通过组建人工蜂群的方法获得相同日龄哺育蜂和采集蜂(10日龄和21日龄),测定了不同职能工蜂上颚腺中10-HDA含量变化趋势,发现10-HDA含量总体随日龄逐渐上升至21日龄达最高,但同日龄条件下,采集蜂上颚腺中10-HDA的含量高于哺育蜂。运用转录组学对相同日龄哺育蜂和采集蜂的上颚腺进行系统分析,筛选得到46个与上颚腺中蜂王浆合成和分泌相关的差异基因,发现这些基因主要富集于蛋白质代谢、脂肪酸代谢和能量代谢等方面。本研究是在排除日龄因素的影响下,对上颚腺中基因表达变化模式进行全面分析,为研究上颚腺中蜂王浆合成和分泌的分子机制提供大量有价值的信息,也为膜翅目昆虫中上颚腺的功能研究提供一个新的视角。

参考文献 References

- [1] 韩胜明. 意大利工蜂头部腺体的形态结构研究[J]. 中国养蜂, 2002, 53(4): 4-6
Han S M. Morphological and structural studies on the head glands of *Apis mellifera ligustica* [J]. *Apiculture of China*, 2002, 53(4): 4-6 (in Chinese)
- [2] Plettner E, Slessor K N, Winston M L, Oliver J E. Caste-selective pheromone biosynthesis in honeybees [J]. *Science*, 1996, 271(5257): 1851-1853
- [3] Huo X M, Wu B, Feng M, Han B, Fang Y, Hao Y, Meng L F, Wubie A J, Fan P, Hu H, Qi Y P, Li J K. Proteomic analysis reveals the molecular underpinnings of mandibular gland development and lipid metabolism in two lines of honeybees (*Apis mellifera ligustica*) [J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15(9): 3342-3357
- [4] Barker S A, Foster A B, Lamb D C, Jackman L M. Biological origin and configuration of 10-hydroxy- Δ^2 -decanoic acid [J]. *Nature*, 1959, 184(4686): 634-634
- [5] Cornara L, Biagi M, Xiao J B, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 412
- [6] 黄少康, 荆战星, 李三妹, 蒋星宏, 马静. 不同日龄意蜂工蜂上颚腺 10-HDA 分泌规律研究 [J]. 海峡科学, 2010(10): 231, 237
Huang S K, Jing Z X, Li S M, Jiang X H, Ma J. Study on the secretion of 10-HDA in the mandibular glands of worker bees of different day-age [J]. *Channel Science*, 2010(10): 231-237 (in Chinese)
- [7] Wu Y Q, Zheng H Q, Corona M, Pirk C, Meng F, Zheng Y F, Hu F L. Comparative transcriptome analysis on the synthesis pathway of honey bee (*Apis mellifera*) mandibular gland secretions [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4530
- [8] Robinson G E. Regulation of division of labor in insect societies [J]. *Annual Review of Entomology*, 1992, 37: 637-665
- [9] Behrends A, Scheiner R, Baker N, Amdam G V. Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *Experimental Gerontology*, 2007, 42(12): 1146-1153
- [10] 荆战星. 意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)工蜂上颚腺 10-HDA 分泌规律及腺体蛋白研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010
Jing Z X. Secretion of 10-HDA from mandibular gland of honeybee worker (*Apis mellifera ligustica*) and the gland proteins [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese)
- [11] 张翔. 意大利工蜂上颚腺 10-HDA 合成的蛋白质组学研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014
Zhang X. Proteomic analysis of 10-hydroxy-2-decanoic acid biosynthesis on mandibular gland of honeybee worker (*Apis mellifera L*) [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2014 (in Chinese)
- [12] 高艳, 朱雅楠, 张威, 王雪妍, 李秋方, 苏松坤, 聂红毅. 意大利蜜蜂哺育蜂学习记忆相关基因的转录组学分析 [J]. 昆虫学报, 2020, 63(3): 266-277
Gao Y, Zhu Y N, Zhang W, Wang X Y, Li Q F, Su S K, Nie H Y. Transcriptomic analysis of learning and memory-related genes in nurses of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63(3): 266-277 (in Chinese)
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the

- 2- $\Delta\Delta C_t$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [14] Plettner E, Slessor K N, Winston M L. Biosynthesis of mandibular acids in honey bees (*Apis mellifera*): De novo synthesis, route of fatty acid hydroxylation and caste selective β -oxidation[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28(1): 31-42
- [15] 徐晓伟, 王晓奎, 李松. 脂肪酸合成酶抑制剂的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2): 105-108, 120
Xu X W, Wang X K, Li S. Fatty acid synthase inhibitors: Research advances[J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2009, 36(2): 105-108, 120 (in Chinese)
- [16] 苏欣. 意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)工蜂上颚腺 10-HDA 合成相关基因的表达研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015
Su X. Expression of genes related to 10-HDA synthesis in mandibular glands of worker bees (*Apis mellifera ligustica*) [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015 (in Chinese)
- [17] 刘丽. 蜜蜂上颚腺合成 10-HDA 关键酶的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2016
Liu L. The study of key enzymes on the synthesis of 10-HDA in the mandibular glands of honeybees [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2016 (in Chinese)
- [18] 周延清, 张永华, 张喻, 陈艳梅, 白妍妍, 魏海方, 段红英, 周春娥. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析[J]. 中草药, 2013, 44(1): 76-84
Zhou Y Q, Zhang Y H, Zhang Y, Chen Y M, Bai Y Y, Wei H F, Duan H Y, Zhou C E. Gene cloning, features of sequence, and analysis on temporal and spatial expression of *Rehmannia glutinosa* f *hueichingensis* 3-ketoacyl CoA-thiolase [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(1): 76-84 (in Chinese)
- [19] Fidaleo M, Arnault S, de Clémencet M C, Chevillard G, Royer M-C, De Bruycker M, Wanders R J A, Athias A, Gresti J, Clouet P, Degrace P, Kersten S, Espeel M, Latruffe N, Nicolas-Francès V, Mandard S. A role for the peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase B enzyme in the control of PPAR α -mediated upregulation of SREBP-2 target genes in the liver [J]. *Biochimie*, 2011, 93(5): 876-891
- [20] Steinbrecht R A. Odorant-binding proteins: Expression and function[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 855(1): 323-332
- [21] Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bézirard V, Blon F, Huet J C, Ebert P, Pernollet J C. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L) as a brood pheromone carrier [J]. *European Journal of Biochemistry Febs Journal*, 2002, 269(18): 4586-4596
- [22] Iovinella I, Dani F R, Niccolini A, Sagona S, Michelucci E, Gazzano A, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P. Differential expression of odorant-binding proteins in the mandibular glands of the honey bee according to caste and age[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(8): 3439-3449
- [23] Wu F, Feng Y L, Han B, Hu H, Feng M, Meng L F, Ma C, Yu L S, Li J K. Mechanistic insight into binding interaction between chemosensory protein 4 and volatile larval pheromones in honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 553-563
- [24] Slessor K N, Winston M L, Conte Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31(11): 2731-2745

责任编辑: 秦梅