

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

邹垂彬¹, 周林斌¹, 胡景华¹, 席芳贵², 袁芳², 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】比较中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)免移虫育王和人工移虫育王培育的蜂王质量,明确幼虫信息素中的甲基棕榈酸酯(methyl palmitate, MP)和甲基亚油酸酯(methyl linoleate, ML)在育王过程中能否提高蜂王质量。【方法】以中华蜜蜂为试验材料,选择蜂群群势、蜂王年龄、子脾面积等基本一致的健康蜂群3群作为哺育群,群势均为5框,采用郎氏标准蜂箱饲养。另选择一群健康、蜂王产卵性能好的蜂群作为母群。免移虫育王和人工育王的比较过程中,每个哺育群中每种育王方式至少育王3次。幼虫信息素试验过程中,每个哺育群每种信息素至少采用人工育王法育王3次。试验期间,对蜂群进行奖励饲喂,提高工蜂哺育积极性。利用自主研制的塑料免移虫育王生产器进行免移虫育王,人工移虫育王则采用自制的蜡质王台。测定育王过程中的幼虫接受率和蜂王出房率,待蜂王出房后测定蜂王初生重、胸重、胸宽,将蜂王的单侧卵巢制成石蜡切片进行卵巢管计数,并采用荧光定量PCR测定蜂王腹部的卵黄原蛋白基因(*Vitellogenin*, *Vg*)和转铁蛋白基因(*Transferrin*, *Trf*)表达量,从而比较蜂王的质量。为了研究中蜂幼虫信息素中MP和ML在人工育王中使用能否提高蜂王的质量,采用人工移虫育王,在幼虫60—63 h的王台内分别注射1 μL MP和ML(浓度梯度为0、0.1%、1.0%、10.0%),同样测定蜂王初生重、胸重、胸宽和卵巢管数以及其腹部*Vg*和*Trf*表达量等指标。【结果】免移虫育王的幼虫接受率为40.87%,蜂王出房率38.52%;人工移虫育王的幼虫接受率为74.38%,蜂王出房率69.13%。显然工蜂对于人工移虫育王中的蜡质王台更易于接受。免移虫育王培育的蜂王在初生重、胸重、胸宽、单侧卵巢管数和*Trf*表达量等与人工移虫育王的比较均差异不显著($P > 0.05$),平均值也较接近,但蜂王腹部*Vg*表达量显著高于人工移虫育王($P < 0.05$)。在人工移虫育王蜂王幼虫60—63 h时加入MP(或ML),不同浓度的MP对蜂王的各项指标均无显著影响($P > 0.05$);0.1% ML对蜂王质量也无显著影响($P > 0.05$);1.0% ML显著降低蜂王初生重、胸重及其腹部*Vg*的表达($P < 0.05$),对卵巢管数量无显著影响($P > 0.05$);10.0% ML显著降低蜂王的各项指标($P < 0.05$)。MP和ML对蜂王*Trf*表达量均无显著影响($P > 0.05$)。【结论】免移虫育王与人工移虫育王相比,王台接受率显著偏低($P < 0.05$),蜂王腹部的*Vg*表达量增加,但在蜂王初生重、胸部指标、单侧卵巢管数量及*Trf*表达量方面均无显著差异($P > 0.05$)。MP和ML在人工移虫育王过程中的应用并不能达到提高蜂王质量的作用。

关键词: 中华蜜蜂; 免移虫育王; 甲基棕榈酸酯; 甲基亚油酸酯; 蜂王质量

Effects of Queen-Rearing Without Larvae-Grafting and Two Esters of Brood Pheromone on the Queen Quality of *Apis cerana cerana*

ZOU Chui-bin¹, ZHOU Lin-bin¹, HU Jing-hua¹, XI Fang-gui², YUAN Fang², YAN Wei-yu¹

(¹Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045; ²Apiculture Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330052)

收稿日期: 2016-05-09; 接受日期: 2016-07-04

基金项目: 国家自然科学基金(31460641)、江西省青年科学家(井冈之星)培养对象项目(20133BCB23012)、江西省教育厅项目(GJJ14278)

联系方式: 邹垂彬, E-mail: xyynn0192@163.com. 通信作者颜伟玉, E-mail: ywygood-0216@163.com

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to compare the queen quality of queen-rearing with and without larvae-grafting and investigate whether methyl palmitate (MP) and methyl linoleate (ML) used in the process of queen rearing could improve the queen quality. **【Method】** Three colonies of *Apis cerana cerana* were chosen as experimental colonies, each colony with 5 combs, were basically the same in the honeybee population, queen age and brood comb area. These colonies were maintained using standard beekeeping techniques. Another strong colony with well egg-laying queen was served as egg-laying colony. The queen was reared at least 3 times in each colony during the queen-rearing with and without larvae-grafting experiment. And the queen was reared at least 3 times for different brood pheromone in each colony with queen-rearing with larvae-grafting method. Stimulated fed the colony to improve the worker nursing enthusiasm during the period of queen-rearing. Comparing the queen quality by testing the acceptance rate of queen cells, the weight, thorax weight and width of newly-emerged queens reared from the queen-rearing with and without larvae-grafting. The gene expression of vitellogenin (*Vg*) and transferrin (*Trf*) of the queens were tested by qRT-PCR, and the ovarioles were counted by paraffin section. In order to verify whether MP or ML used in the process of queen-rearing can improve the queen quality, 1 μ L solution which contains 0, 0.1%, 1.0% and 10.0% of MP or ML was added into the queen cells with 60-63 h old queen larvae, respectively. The queen quality was also detected. **【Result】** The rate of brood accepted and the percent of queen emerged in queen-rearing without larvae-grafting was 40.87% and 38.52%. In queen-rearing with larvae-grafting it was 74.38% and 69.13%, respectively. So apparently it is easier to accept the wax queen cell than the plastic for workers. No significant difference in the newly-emerged weight, thorax weight and width, ovarioles number in one side and *Trf* expression was observed between these two queen-rearing methods ($P>0.05$). It was also similar in the average value. Nevertheless, *Vg* expression in queens from queen-rearing without larvae-grafting was significantly higher than that in the larvae-grafting ($P<0.05$). 0.1% ML and all concentrations of MP showed no significant effect on all parameters ($P>0.05$), and gene expression of *Trf* was also not different among all treatments ($P>0.05$). 1.0% ML significantly reduced the newly-emerged weight, thorax weight and *Vg* expression of queens ($P<0.05$), and 10.0% ML significantly reduced the index, ovarioles number and *Vg* expression of queens ($P<0.05$). There was no significant effect on *Trf* expression level in both MP and ML ($P>0.05$). **【Conclusion】** The acceptance rate of queen cell was significantly lower ($P<0.05$) in queen-rearing without larvae-grafting compared with larvae-grafting. There was no significant difference in the newly-emerged weight, thorax weight and width, ovarioles number and *Trf* expression of the queens between queen-rearing with and without larvae-grafting ($P>0.05$), but *Vg* expression was considerably higher whereas the acceptance rate of queen cells was lower in queen-rearing without larvae-grafting ($P<0.05$). ML and MP used in queen-rearing process could not improve the queen quality.

Key words: *Apis cerana cerana*; queen-rearing without larvae-grafting; methyl palmitate; methyl linoleate; queen quality

0 引言

【研究意义】 中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂) 是中国特有的蜂种资源, 在山区广泛分布, 对生态环境的平衡起着至关重要的作用^[1]。但自从中国引进西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 以来, 中蜂种群数量和分布区域急剧下降^[2], 因此开展中蜂保护研究是亟需进行的重要工作。在蜂群中, 蜂王是唯一具有完整生殖能力的雌性蜂, 专职产卵, 是蜂群饲养的首要因素。目前在中蜂养殖生产中, 每年需定期更换蜂王, 但人工培育蜂王仍是难题。大多数蜂农采用自然王台换王, 使中蜂的种性难以得到改善, 易飞逃, 分蜂性强, 不易维持强群等, 长此以往会导致饲养的蜂群群势越来越弱。因此, 研究适合中蜂的蜂王培育方法, 提高育王质量, 有利于改良中蜂种性, 提高生产效益, 也对保护、开发和利用中蜂这一宝贵资源具有重要的理论和现实意义。**【前人研究进展】** 自 1888 年美国 DOOLITTLE 在《科学育王法》中介绍了人工育王技

术以来, 单式移虫培育蜂王技术即被普遍采用^[3]。20 世纪 40 年代黄子固在单式移虫育王的基础上发明了复式移虫育王法, 并被养蜂者广泛应用^[4]。目前研究已经发现, 在人工移虫育王时, 随着移入幼虫日龄的增加, 蜂王的初生重、卵巢管数、贮精囊直径、进入贮精囊的精子数等指标都明显下降, 即幼虫日龄越小, 培育蜂王质量越好^[5-7]。育王时王台在育王框的位置对培育的蜂王质量有一定的影响, 位于育王框中部的王台出房的蜂王质量较好^[8-9]。陈世壁等^[10]提出采用大卵育王结合复式移虫, 可以培育出优质的处女王。刘光楠等在研究蜂王浆机械化生产中解决了蜂王浆的人工移虫问题^[11-13], 同时设计了意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 的免移虫育王生产者^[14], 利用免移虫育王生产者进行育王, 可以节省劳动力, 并有效减少因移虫造成的幼虫机械性损伤, 幼虫底部的大部分王浆也都被转移至王台内, 保证了幼虫被充分哺育, 可提高蜂王质量。除了在育王方式上的探索, 在王台内添加信息素成分来提高培育蜂王的质量也是研究的一个方

向。LE CONTE 等研究表明西方蜜蜂幼虫信息素中的甲基亚油酸酯 (methyl linoleate, ML) 和甲基油酸酯 (methyl oleate, MO) 可分别促进单个王台内王浆量和王台接受率, 而甲基棕榈酸酯 (methyl palmitate, MP) 可以提高育王过程中单个幼虫质量^[15-17]。颜伟玉等^[18]研究发现中蜂的幼虫信息素成分与西方蜜蜂的相似, 包括甲基棕榈酸酯、甲基亚油酸酯、甲基油酸酯、甲基硬脂酸酯、甲基亚麻酸酯、乙基棕榈酸酯、乙基亚油酸酯、乙基油酸酯、乙基硬脂酸酯和乙基亚麻酸酯; 曾云峰等^[19]在育王过程中添加信息素, 发现 0.1% 的 MP 可提高中蜂和意蜂幼虫质量; 周冰峰等^[20]以中华蜜蜂为试验材料, 将保幼激素类似物 ZR₅₁₂ 注入王台内的蜂王浆让幼虫吸收, 发现 ZR₅₁₂ 可显著提高蜂王初生重。对蜂王质量的评价通常采用初生重、卵巢管数量、胸重、胸宽等指标, 对与蜂王卵巢发育相关的基因表达研究较少。CORONA 等^[21]研究表明卵黄原蛋白基因 (*Vitellogenin*, *Vg*) 的表达量与蜂王卵巢发育等级呈正相关, 还与蜂王的寿命相关。KOYWIWATTRAKUL 等^[22]研究发现 *Vg* 和转铁蛋白基因 (*Transferrin*, *Trf*) 在卵巢发育的工蜂表达量显著高于卵巢未发育的工蜂, *Vg* 和 *Trf* 表达量的上调将通过一系列下游反应使卵巢活化, 刺激工蜂产卵行为。【本研究切入点】由于中蜂嗅觉灵敏, 分蜂性强, 难以维持强群等特点, 在移虫或移卵过程中稍有不慎便会对卵或幼虫造成伤害, 进而被工蜂清理, 导致蜂王培育难以成功。随着养蜂人员的老龄化, 养蜂者的视力明显下降, 难以进行正常的移虫, 也使得育王变得困难。借鉴意大利蜜蜂免移虫育王的经验, 根据中蜂的生物学特性, 设计适合中蜂的免移虫育王生产器, 并与人工移虫育王进行比较。利用蜜蜂幼虫信息素探索中蜂优质蜂王培育在国内也鲜有相关研究报道, 如果在育王时添加幼虫信息素成分能提高蜂王发育质量, 那将为中蜂优质蜂王培育开辟一条新的途径。【拟解决的关键问题】研究免移虫育王与人工移虫育王对王台接受率、蜂王初生重、胸重、胸宽、卵巢管数量和 *Vg*、*Trf* 表达水平的影响, 并探索在育王过程中分别添加 MP 和 ML 对蜂王质量的影响, 确定适合中蜂优质蜂王培育的方法。

1 材料与方法

试验于 2015 年 4—11 月在江西农业大学蜜蜂研究所试验蜂场 (28.46°N, 115.49°S) 完成。

1.1 试验蜂群

蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂。

选择蜂群群势、蜂王年龄、子脾面积基本一致的健康蜂群 3 群作为哺育群, 群势均为 5 框, 采用郎氏标准蜂箱饲养。另选择一群健康、蜂王产卵性能好的蜂群作为母本群。育王在哺育群中进行, 比较免移虫育王和人工移虫育王过程中, 每群每种育王方式至少育王 3 次。幼虫信息素试验组, 每种信息素每群至少采用人工移虫法育王 3 次。试验期间, 对蜂群进行奖励饲喂, 提高工蜂哺育积极性。

1.2 免移虫育王

免移虫育王是利用自主设计生产的中华蜜蜂免移虫育王生产器^[23]进行蜂王培育。中华蜜蜂免移虫育王生产器由人工塑料巢础、无底单个王台、托虫器、配套王台条等几部分组成^[24]。王台内径 8.0 mm, 高度为 7.0 mm。中蜂免移虫育王生产器采用塑料材质制造单面塑料巢础, 并在单个巢房底部中间预留小孔, 用于安装相同孔径的托虫器。将巢础镶嵌于巢框时在巢脾背面加入抽拉式有机玻璃, 可防止工蜂进入吐蜡造脾。将巢框放入蜂群中造脾, 造脾成功后使用配套隔王装置控制蜂王于巢脾上产卵, 待卵孵化成幼虫 (即 1 日龄) 时, 拔出托虫器安装于配套塑料王台中, 置于王台条上, 然后转移至哺育群中。王台封盖第 5 天再将育王框取出, 单个王台小心取下至于王笼中, 放置恒温恒湿培养箱孵化 (T: 35°C, RH: 70%) (下同)。

1.3 人工移虫育王

人工移虫育王采用蘸蜡棒自制蜡质王台, 内径 8.0 mm, 蘸蜡深度为 7.0 mm。试验采用人工复式移虫育王, 第 1 天移入非试验用 1 日龄工蜂幼虫, 并在次日中午移出王台内幼虫, 采用试验用 1 日龄工蜂幼虫进行第 2 次移虫。

1.4 信息素处理

试验前用正己烷分别溶解 MP 和 ML, 分别配制成浓度为 0 (纯正己烷, 作为对照组)、0.1%、1.0%、10.0% 的溶液。控制蜂王产卵 4 h, 卵经过 3 d 孵化为 1 日龄幼虫, 采用人工复式移虫育王进行蜂王培育。在幼虫 60—63 h 时取出育王框, 将 1 μL 不同浓度信息素分别注入王台内的王浆中, 并做标记。注射完毕, 将育王框小心放回蜂群中。

1.5 王台接受率测定

记录移虫数、移虫第 3 天幼虫接受数和羽化蜂王数, 统计分析幼虫接受率和蜂王出房率, 公式如下:

$$\text{幼虫接受率} = \frac{\text{第 3 天幼虫接受数}}{\text{第 1 天移虫数}} \times 100\%;$$

$$\text{蜂王出房率} = \frac{\text{蜂王出房数}}{\text{第 1 天移虫数}} \times 100\%。$$

1.6 蜂王外部指标测定

蜂王羽化出房后利用电子天平称取初生重；剪取蜂王胸部、去翅足后称取胸重，采用江南永新光学有限公司 CCD 观察测试系统测量蜂王胸部宽度。

1.7 蜂王卵巢管数量测定

参照甘海燕等^[25]的方法，采用石蜡切片法测定蜂王卵巢管数。蜂王羽化出房后饥饿 5 h，处死后将蜂王置于 10% 的甲醛溶液中固定 4 h，解剖蜂王，再次将卵巢放回 10% 的甲醛固定液浸泡 12 h 左右，经一系列由低到高浓度的乙醇脱水，二甲苯透明后，进行浸蜡

处理（具体过程同表 1），石蜡包埋后，在切片机上切成 5 μm 厚的切片，在摊片机上展开，展好的切片在室温下干燥或置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中 30 min，苏木精-伊红染色，封片。每个样品观察 3 个切片，取平均值。

1.8 荧光定量 PCR 测定蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 表达量

活体解剖初生蜂王腹部，采用去除消化道的蜂王腹部（包含内部的卵巢及卵巢上附着的脂肪组织），RNA 提取和 cDNA 合成参考秦秋红^[26]的方法。根据 GenBank 中相关序列，采用 Primer 5 设计引物，由上海生工生物有限公司合成（表 2）。荧光定量 PCR 采

表 1 脱水透明具体步骤及浸泡时间

Table 1 Specific steps and soaking time of dehydration

名称 Name	步骤 Step	试剂 Reagent	浸泡时间 Soak time
脱水 Dehydration	1	75%乙醇 75% ethanol	1 h
	2	85%乙醇 85% ethanol	1 h
	3	95%乙醇 I 95% ethanol I	1 h
	4	95%乙醇 II 95% ethanol II	1 h
	5	无水乙醇 I Absolute ethyl alcohol I	45 min
	6	无水乙醇 II Absolute ethyl alcohol II	45 min
透明 Vitrification	7	二甲苯乙醇混液 I Xylene ethanol mixture I	8 min
	8	二甲苯乙醇混液 II Xylene ethanol mixture II	2 min
	9	纯二甲苯 I Pure xylene I	10 s
	10	纯二甲苯 II Pure xylene II	2 s
透蜡 Transparent wax	11	软蜡（硬蜡与二甲苯 1 : 1 混匀）Soft wax (Hard wax : xylene=1 : 1)	1 h
	12	硬蜡 Hard wax	1 h

表 2 基因引物信息

Table 2 The primer sequences of the genes

基因名称 Target gene	上游引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')
卵黄原蛋白基因 <i>Vg</i>	CGCATCACGAATACGACTAAGA	AGACGCTCCTCAGGCTCAAC
转铁蛋白基因 <i>Trf</i>	TTGGGAAGAAAGAGGCTGAT	GGTGAGTTTGGTGATGGGTAT
内参基因 <i>β-actin</i>	GGCTCCCGAAGAACATCC	TGCGAAACACCGTCACCC

用 10 μL 体系，各反应成分含量见表 3。上下游引物、灭菌水、ROX 和 SYBR GREEN II（TaKaRa 公司）计算多孔总量制成混液后添加至单孔中，cDNA 最后单独加入八连管中。每个基因预留三孔阴性对照，均加入混液，但用灭菌超纯水代替 cDNA。qRT-PCR 反应条件：第一步 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s；第二步进行 40 个 PCR 循环（95 $^{\circ}\text{C}$ ，10 s；60 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min）。扩增反应结束后从 55 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ ，建立熔解曲线。

1.9 数据统计与分析

蜂王外部指标及卵巢管数量的试验数据利用

表 3 荧光定量 PCR 反应体系

Table 3 Reaction system of qRT-PCR assay

试剂 Reagent	体积 Volume (μL)
灭菌超纯水 Sterile water	3
上游引物 Forward primer	0.4
下游引物 Reverse primer	0.4
ROX 校正液 ROX correction fluid	0.2
SYBR GREEN II	5
cDNA	1
总体积 Total volume	10

StatView 软件“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析。蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 表达量利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。

2 结果

2.1 免移虫育王对中蜂蜂王质量的影响

2.1.1 王台接受率 免移虫育王和人工移虫育王的幼虫接受率分别为 40.87% 和 74.38%，差异显著 ($P < 0.05$)；蜂王出房率分别为 38.52% 和 69.13%，差异显著 ($P < 0.05$)。由于免移虫育王采用的是塑料王台，中蜂不易接受，因此幼虫接受率偏低，导致蜂王出房率也显著偏低 (表 4)。

2.1.2 蜂王相关指标 免移虫育王和人工移虫育王在蜂王初生重、胸重、胸宽和卵巢管数等指标均差异

不显著 ($P > 0.05$)，除蜂王初生重外其他各项指标平均值都比较接近。因此，免移虫育王和人工移虫育王培育的蜂王在外部指标上并无显著差异 (表 5)。

2.1.3 蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 表达量 免移虫育王培育的蜂王腹部 *Vg* 表达量显著高于人工移虫育王的蜂王 (图 1-A, $P < 0.05$)，但 *Trf* 表达量无显著差异 (图 1-B, $P > 0.05$) (图 1)。

2.2 甲基棕榈酸酯对中蜂蜂王的质量影响

2.2.1 对蜂王相关指标的影响 由表 6 可知，不同浓度 MP 对蜂王的初生重、胸重、胸宽和卵巢管数量均无显著影响 ($P > 0.05$)。

2.2.2 对蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 的影响 不同浓度的 MP 对蜂王腹部 *Vg* (图 2-A) 和 *Trf* (图 2-B) 表达水平均无显著影响 ($P > 0.05$)。

表 4 育王方式对王台接受率的影响

Table 4 The effect of queen rearing method on the acceptance rate of queen cell

育王方式 Queen-rearing method	幼虫接受率 The acceptance rate of the larvae (%)	蜂王出房率 The emerged rate of the queen (%)
免移虫育王 Queen-rearing without larvae-grafting	40.87±7.88a	38.52±8.30a
人工移虫育王 Queen-rearing with larvae-grafting	74.38±5.47b	69.13±5.27b

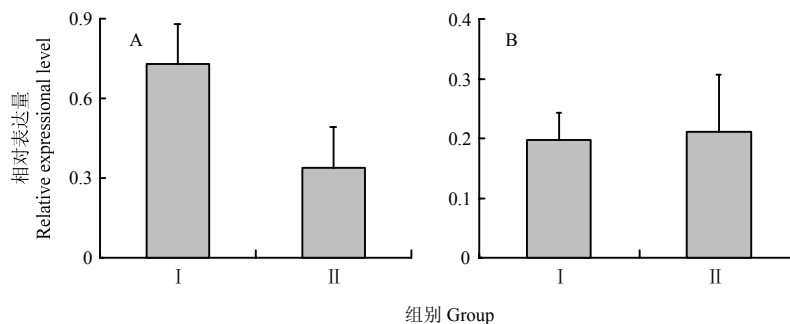
表中数据为平均数±标准差，同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Data were average±SD, values followed with different lowercases indicated significant differences ($P < 0.05$). The same as below

表 5 育王方式对蜂王相关指标的影响

Table 5 The effect of queen-rearing method on the index of queens

育王方式 Queen-rearing method	蜂王数量 (只) The number of the queens	蜂王初生重 Newly-emerged weight (mg)	胸部指标 Thorax index		单侧卵巢管数 (条) One side ovarioles number
			胸重 Thorax weight (mg)	胸宽 Thorax width (mm)	
免移虫育王 Queen-rearing without larvae-grafting	27	189.13±6.25a	53.23±1.74a	4.34±0.10a	93.59±8.04a
人工移虫育王 Queen-rearing with larvae-grafting	27	191.78±6.15a	53.37±2.16a	4.35±0.07a	93.24±9.36a



I: 免移虫育王 Queen-rearing without larvae-grafting; II: 人工移虫育王 Queen-rearing with larvae-grafting

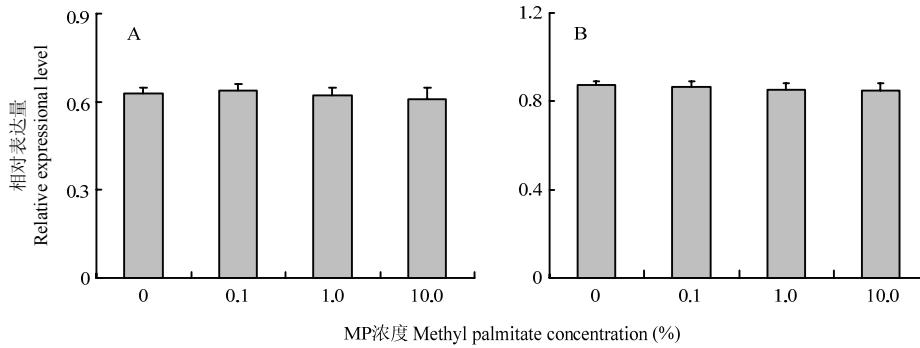
图 1 免移虫育王和人工移虫育王蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 表达量

Fig. 1 The expression level of *Vg* and *Trf* in queen-rearing without and with larvae-grafting

表 6 MP 对蜂王相关指标的影响

Table 6 The effect of methyl palmitate on the index of queens

MP 浓度 MP concentration (%)	蜂王初生重 Newly-emerged weight (mg)	胸部指标 Thorax index		单侧卵巢小管数 (条) One side ovarioles number
		胸重 Thorax weight (mg)	胸宽 Thorax width (mm)	
0	187.22±4.74a	52.89±2.21a	4.37±0.10a	91.56±11.06a
0.1	188.56±4.64a	52.00±2.24a	4.36±0.09a	92.33±7.50a
1.0	186.44±5.41a	52.11±2.32a	4.33±0.07a	91.67±8.73a
10.0	184.22±6.52a	50.89±1.90a	4.34±0.10a	90.33±11.54a

图 2 MP 对蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 表达量影响Fig. 2 The effect of methyl palmitate on the expression level of *Vg* and *Trf* in queen's abdomen

2.3 甲基亚油酸酯对中华蜜蜂王质量的影响

2.3.1 对蜂王相关指标的影响 0.1% ML 对蜂王初生重、胸部指标等均无显著影响 ($P>0.05$)；1.0% 甲基亚油酸酯显著降低了蜂王初生重及胸重 ($P<0.05$)，对胸宽和卵巢管数量无显著影响；10.0% 甲基亚油酸酯显著地降低了蜂王的初生重、胸部指标及卵巢管数

量 ($P<0.05$) (表 7)。

2.3.2 对蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 的影响 0.1% ML 对蜂王 *Vg* 表达量无显著影响 ($P>0.05$)，但 1.0% 和 10.0% ML 显著降低了蜂王腹部 *Vg* 的表达量 (图 3-A, $P<0.05$)；各浓度 ML 对蜂王腹部 *Trf* 表达水平均无显著影响 (图 3-B, $P>0.05$)。

表 7 ML 对蜂王相关指标的影响

Table 7 The effect of methyl linoleate on the index of queens

ML 浓度 ML concentration (%)	蜂王初生重 Newly-emerged weight (mg)	胸部指标 Thorax index		单侧卵巢小管数 (条) One side ovarioles number
		胸重 Thorax weight (mg)	胸宽 Thorax width (mm)	
0	190.44±6.25a	54.56±1.33a	4.37±0.10a	91.90±10.91a
0.1	190.67±3.39a	54.11±1.27a	4.36±0.09a	92.56±7.99a
1.0	180.22±3.42b	50.67±1.32b	4.30±0.08ab	88.33±8.29a
10.0	169.78±5.85c	48.67±1.12c	4.26±0.10b	61.44±11.14b

3 讨论

中蜂免移虫育王的幼虫接受率显著低于人工移虫育王的幼虫接受率，这与刘光楠等^[14]对意大利蜜蜂的试验结果相似。由于免移虫育王是待卵在巢房中孵化

为小幼虫后再将托虫器拔下，插至王台底部，不会对幼虫造成机械性损伤，因此幼虫接受率显著偏低的主要原因是工蜂对塑料王台的排斥。有研究表明中蜂育王时工蜂更易于接受蜡质王台^[27]，这可能与中蜂灵敏的嗅觉^[28-29]有关。在使用免移虫育王生产器时，可使

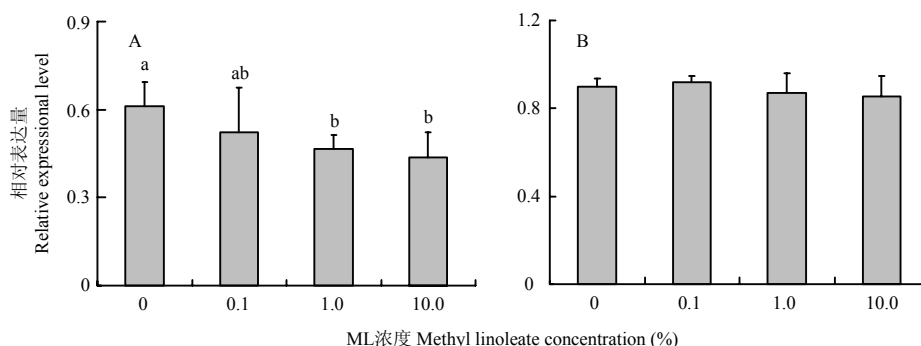


图3 ML对蜂王腹部 *Vg* 和 *Trf* 表达量的影响

Fig. 3 The effect of methyl linoleate on the expression level of *Vg* and *Trf* in queen's abdomen

用旧巢脾水浸泡、在塑料台基表面涂一薄层蜂蜡、密集蜂群群势等使蜜蜂适应塑料王台，提高幼虫的接受率，从而提高育王效率。

免移虫育王培育的蜂王在初生重、胸部指标、卵巢管数量和 *Trf* 表达量等与人工移虫育王的比较并无显著差异，但 *Vg* 的表达量更高。*Vg* 是一种多效性基因，与蜜蜂卵巢活性、寿命、免疫力等均具有一定相关性^[30]。*Vg* 含量高低可能与蜂王体内的保幼激素滴度或蜕皮激素水平有关，但具体机理尚不清楚。免移虫育王培育的蜂王在交尾后的产卵力、寿命和免疫力方面是否表现更为优越也有待于进一步的研究。一个免移虫育王生产器一次可提供 81 个用于育王的幼虫，按 38% 出房率计算，有 30 只蜂王出房，这基本能满足一个普通蜂场的换王需求。免移虫育王还可以减少劳动强度，对于年龄偏大、视力不佳的养蜂人员来说是一种较佳的育王方式，因此可以用来代替人工移虫育王。但在后期对免移虫育王生产器的改进中也应对塑料材质进行进一步地筛选，使中蜂更易于接受，提高幼虫的接受率。

LE CONTE 等^[16]以意大利蜜蜂为试验材料，研究发现 ML 可通过调节工蜂的哺育行为而增加王台内王浆含量。曾云峰等^[19]研究表明，0.1% 和 1.0% 的 MP 对中蜂王台接受率和王台中的王浆质量无显著影响，但单个幼虫的质量显著增加。本试验在中蜂育王过程中添加不同浓度的 MP，对蜂王的各项指标及 *Vg* 和 *Trf* 表达并无显著影响。1.0% 的 ML 显著降低了蜂王的初生重、胸重及 *Vg* 的表达；当浓度为 10.0% 时，蜂王的胸宽与卵巢管数也显著降低，因此过高的浓度可能降低了工蜂的哺育积极性，使蜂王质量下降。因此，在中蜂育王过程中添加 MP 和 ML 并不能达到提高蜂

王质量的目的。本试验只研究了中蜂幼虫信息素中两种单一酯类对育王质量的影响，幼虫信息素中这两种酯类的释放特点、其他酯类、不同酯类成分组合及 10 种酯类混和对育王效果的影响，还有待于进一步研究。

4 结论

免移虫育王和人工移虫育王培育的蜂王比较，在外部指标、卵巢管数量和 *Trf* 表达量方面均无显著差异，王台接受率显著偏低，但免移虫育王的蜂王 *Vg* 表达量显著高于人工移虫育王。在育王过程中使用甲基棕榈酸酯和甲基亚油酸酯不能起到提高蜂王质量的作用。

References

- [1] 余林生. 皖南中华蜜蜂种群数量动态及群体多样性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007: 6-10.
YU L S. Study on population dynamics and colony diversity of *Apis cerana cerana* in southern Anhui[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2007: 6-10. (in Chinese)
- [2] 季荣, 谢宝瑜, 杨冠煌, 李典谟. 从有意引入到外来入侵——以意大利蜜蜂 *Apis mellifera* L. 为例. 生态学杂志, 2003, 22(5): 70-73.
JI R, XIE B Y, YANG G H, LI D M. From introduced species to invasive species—a case study on the Italian bee *Apis mellifera* L. *Chinese Journal of Ecology*, 2003, 22(5): 70-73. (in Chinese)
- [3] DOOLITTLE G M. *Scientific Queen Rearing*//CHICAGO T G. Illinois, USA: Newman & Son, 1888.
- [4] 陈世壁. 人工育王. 北京: 农业出版社, 1989: 7.
CHEN S B. *Artificial Queen Rearing*. Beijing: Agriculture Press, 1989: 7. (in Chinese)
- [5] WOYKE J. Correlations between the age at which honeybee brood

- was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *Journal of Apicultural Research*, 1971, 10: 45-55.
- [6] WEAVER N. Effects of larval age on dimorphic differentiation of the female honey bee. *Annals of the Entomological Society of America*, 1957, 50(3): 283-294.
- [7] GILLEY D C, TARPY D R, LAND B B. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2003, 55: 190-196.
- [8] AL-FATTAH M A A, MAZEED A M, AL-HADY N A. Quality and quantity of honeybee queens as affected by the number and distribution of queen cells within queen rearing colonies. *Journal of Apicultural Science*, 2011, 55(2): 31-41.
- [9] 张建国. 中蜂群最佳育王位置探究. 中国蜂业, 2006, 57(12): 22.
ZHANG J G. Study on the best location of queen rearing in the colony of *Apis cerana cerana*. *Apiculture of China*, 2006, 57(12): 22. (in Chinese)
- [10] 陈世璧, 刘富海, 刘甫秀. 利用大卵培养优质蜂王. 蜜蜂杂志, 1991(3): 18.
CHEN S B, LIU F H, LIU F X. Rearing high quality queen with larger larvae. *Journal of Bee*, 1991(3): 18. (in Chinese)
- [11] 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): 3-6.
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): 3-6. (in Chinese)
- [12] 曾志将, 吴小波, 张飞, 刘光楠, 颜伟玉, 王子龙. 蜂王浆机械化生产关键技术研究与应用(I)——仿生免移虫生产器设计. 江西农业大学学报, 2013, 35(4): 842-847.
ZENG Z J, WU X B, ZHANG F, LIU G N, YAN W Y, WANG Z L. Research and application of key technique for mechanized production of royal jelly (I)—A design of bionic non-grafting larvae ovipositor. *Acta Agricultural Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(4): 842-847. (in Chinese)
- [13] 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 Agricultural Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(5): 1036-1041. (in Chinese)
- [14] 刘光楠, 吴小波, 曾志将, 颜伟玉. 不同育王方式对意大利蜜蜂王台接受率和蜂王质量的影响. 山东农业科学, 2011(3): 106-108.
LIU G N, WU X B, ZENG Z J, YAN W Y. Effects of different methods for queen rearing on queen-cell accepted rate and queen quality in *Apis mellifera ligustica*. *Shandong Agricultural Sciences*, 2011(3): 106-108. (in Chinese)
- [15] LE CONTE Y, SRENG L, POITOUT S H. Brood pheromone can modulate the feeding behavior of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 1995, 88(4): 798-804.
- [16] LE CONTE Y, SRENG L, TROUILLER J. The recognition of larvae by worker honeybees. *Naturwissenschaften*, 1994, 81(10): 462-465.
- [17] LE CONTE Y, SRENG L, SACHER N, TROUILLER J, DUSTICIER G, POITOUT S H. Chemical recognition of queen cells by honey bee workers *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemoecology*, 1994/1995, 5/6(1): 6-12.
- [18] 颜伟玉, CONTE Y L, 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, CONTE Y L, 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)
- [19] 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 *A. mellifera ligustica*. *Acta Entanologica Sinica*, 2010, 53(2): 154-159. (in Chinese)
- [20] 周冰峰, 鲍秀良, 龚蜜, 吴刚, 戴祝英. 保幼激素类似物 ZR512 对蜜蜂蜂王初生重的影响. 福建农业大学学报, 1995, 24(1): 109-112.
ZHOU B F, BAO X L, GONG M, WU G, DAI Z Y. Effect of juvenoid (ZR512) on the emergence weight of bee queen. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1995, 24(1): 109-112. (in Chinese)
- [21] CORONA M, VELARDE R A, REMOLINA S, MORAN-LAUTER A, WANG Y, HUGHES K A, ROBINSON G E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(17): 7128-7133.
- [22] KOYWIWATTRAKUL P, SITTIPRANEED S. Expression of vitellogenin and transferrin in activated ovaries of worker honey bees, *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics*, 2009, 47(1/2): 19-26.
- [23] 颜伟玉, 吴小波, 曾志将, 王子龙, 张丽珍. 中华蜜蜂免移虫人工育王生产器: ZL 2014 2 0568779.2[P]. 2015-01-21[2016-05-09].
YAN W Y, WU X B, ZENG Z J, WANG Z L, ZHANG L Z.

- Queen-rearing device without larvae-grafting of *Apis cerana cerana*: ZL 2014 2 0568779.2[P]. 2015-01-21[2016-05-09]. (in Chinese)
- [24] 邹垂彬, 吴天宝, 胡景华, 曾志将, 颜伟玉. 中华蜜蜂免移虫育王技术研究. 蜜蜂杂志, 2016, 36(1): 8-10.
- ZOU C B, WU T B, HU J H, ZENG Z J, YAN W Y. Research on the non-grafting queen rearing technology of *Apis cerana cerana*. *Journal of Bee*, 2016, 36(1): 8-10. (in Chinese)
- [25] 甘海燕, 田柳青, 颜伟玉. 蜂王卵巢切片及染色技术. 蜜蜂杂志, 2012, 32(2): 9.
- GAN H Y, TIAN L Q, YAN W Y. Ovarian sectioning and staining of the queen. *Journal of Bee*, 2012, 32(2): 9. (in Chinese)
- [26] 秦秋红. 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[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013: 48-53.
- QIN Q H. Comparison of learning and memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera* and analysis of related molecular mechanism of learning and memory in honeybee[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013: 48-53. (in Chinese)
- [27] 王瑞生. 中华蜜蜂蜂王人工培育技术研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2013: 16-31.
- WANG R S. Study on artificial queen breeding techniques in honeybee (*Apis cerana cerana* F.)[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2013: 16-31. (in Chinese)
- [28] DÍAZ P C, GRÜTER C, FARINA W M. Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 2007, 61(10): 1589-1597.
- [29] 段成鼎. 中华蜜蜂与意大利蜜蜂比较生物学的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003: 28.
- DUAN C D. Studies on comparative biology of Chinese bee and Italian bee[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2003: 28. (in Chinese)
- [30] 张卫星, 胥保华. 蜜蜂卵黄原蛋白的研究进展. 蜜蜂杂志, 2014, 34(5): 5-7.
- ZHANG W X, XU B H. Overview of vitellogenin of honeybee. *Journal of Bee*, 2014, 34(5): 5-7. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)