

王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 工蜂幼虫发育期蛋白质组分析

李建科¹, 李华玮^{1,2}, 张 兰¹

(¹中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; ²郑州大学生物工程系, 郑州 450001)

摘要: 【目的】20世纪90年代中国成功培育出的王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 是当今世界最优良的蜂种, 使中国的王浆年产量高达2600多吨, 占世界总产量的90%以上, 稳居世界第一, 通过对该蜂种不同发育日龄工蜂幼虫的蛋白质组进行研究, 以探明其发育机理。【方法】采用双向电泳法对王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 不同发育期的工蜂幼虫进行蛋白质组研究。【结果】在幼虫期6d的发育过程中, 2日龄、4日龄、6日龄幼虫中分别检测到了262、418、194个蛋白点。这些蛋白的分子量在12.2~88.2 kD的较大范围之间, 等电点在pH 4.00~9.24之间。有84个蛋白在幼虫期整个发育过程中均有表达, 其中33%呈上调趋势, 21%呈下调趋势, 46%蛋白的表达没有规律。2日龄、4日龄、6日龄幼虫中分别有88、209、63个特异表达的蛋白。除此之外, 有84个蛋白在幼虫发育的6日龄表达关闭, 而在2日龄和4日龄幼虫中表达; 有41个蛋白在2日龄表达关闭, 而在4日龄和6日龄中表达; 仅有6个蛋白在4日龄表达关闭, 而在2日龄和6日龄表达。【结论】幼虫的发育过程有大量基因参与表达和调控, 是一个复杂而动态有序的过程, 且发育到4日龄的幼虫蛋白表达最为活跃。幼虫整个发育过程中的共有蛋白是发育必需的保守蛋白。幼虫不同的发育阶段由不同的特异蛋白进行调控。

关键词: 蜜蜂; 王浆高产; 工蜂幼虫; 双向电泳; 蛋白质组

Analysis of the Proteome of the Larvae of the High Royal Jelly Producing Worker Bees (*Apis mellifera* L.)

LI Jian-ke¹, LI Hua-wei^{1,2}, ZHANG Lan¹

(¹Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093;

²Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract: 【Objective】The purpose was to investigate the protein composition of worker bees larvae of the high producing royal jelly bees (*Apis mellifera* L.). 【Method】Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was employed to separate and quantify proteins of the larvae of the high producing royal jelly worker bees (*Apis mellifera* L.) during their six days development. 【Result】The results showed that 262, 418 and 194 proteins with a range of molecular weight 12.2-88.2 kD and relatively narrow scope of pI 4.00-9.24 could be detected on day 2, day 4 and day 6 during the developmental process of the larvae, respectively. Meanwhile 84 protein spots were constantly detected during the larvae development, among them 33 percent were expressed in up trend along with the larvae development, 21 percent were in down trend and 46 percent were irregular. In addition, the specific proteins expressed on day 2, day 4, and day 6 were 88, 209, and 63, respectively. Except the constant and specific expressed proteins, 84 proteins were expressed on day 2 and day 4 but silenced on day 6, 41 proteins were expressed on day 2 and day 4 but silenced on day 6, only 6 proteins were expressed on day 2 and day 6 but silenced on day 4. 【Conclusion】The result indicates that the larvae development is a sequential and complex gene controlled process, while the proteins of larvae of day 4 express the most active. The eternal expressed proteins suggest that they are conservative and indispensable for this event. The specific proteins detected at different developmental

收稿日期: 2007-01-11; 接受日期: 2007-11-08

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD06B04, 2006BAD12B08-06, 2006BAD14B07-5-7)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JBKY 0032007016CAAS) 和公益性行业科研专项 (nyhyzx07-041)

作者简介: 李建科 (1962-), 男, 北京人, 教授, 研究方向为蜜蜂饲养学与生物技术。Tel: 010-62591449; E-mail: apislijk@126.com

stages suggesting it is indispensable to regulate the larvae' growth.

Key words: Honeybees; Higher production royal jelly; Worker bee's larvae; Two-dimensional gel electrophoresis; Proteome

0 引言

【研究意义】蜜蜂是全变态膜翅目社会性昆虫,其发育经过卵、幼虫、蛹和成蜂 4 个阶段,西方蜜蜂的工蜂经过卵期 3 d、幼虫期 6 d、蛹期 12 d 发育为成蜂^[1]。工蜂幼虫期是生长发育最快的一个时期,在其 5 龄发育过程中,前 48 h 工蜂和蜂王幼虫保持几乎相同的发育速度,在接下来的 24~96 h 工蜂幼虫的发育速度要高于蜂王幼虫,但在 96 h 后蜂王幼虫的发育速度超过工蜂,工蜂幼虫在 120 h (5 d) 体重达 160 mg,是第 1 天的 1 600 倍^[2,3]。工蜂在蜜蜂社会里担任最重要的角色,成千上万的工蜂执行蜂群所需要的各种活动,蜂群所表达的群体性状实际上是由工蜂体现的^[1]。因此利用蛋白质组学的方法在此阶段开展发育机理的研究,对探讨工蜂幼虫期基因表达的时空秩序性、阐明工蜂幼虫期发育机理具有重要意义。【前人研究进展】蜜蜂基因组测序工作的完成为蜜蜂蛋白质组学的研究奠定了基础^[4]。工蜂和蜂王幼虫都是受精卵发育而成的非遗传多态体,其级型分化是营养调控的结果。蜜蜂幼虫摄取的营养物质不同决定了它发育成工蜂还是蜂王。受精卵孵化成雌性幼虫后由工蜂饲喂,在幼虫发育 3 d 后如果饲喂蜂蜜和花粉混合物,就发育成工蜂;同样的雌性幼虫,如果被不间断地饲喂大量的蜂王浆,就将发育成蜂王^[5]。形态学研究表明,工蜂幼虫在发育期的 96 h 前比蜂王幼虫大,之后蜂王幼虫比工蜂幼虫重 60%以上^[6];生理学研究证明,蜂王幼虫在发育至 50 h 时其耗氧率和代谢率比工蜂高,在 72 h 达到峰值^[7],在发育 72~120 h 的蜂王幼虫中检测到的保幼激素是工蜂幼虫中的 15 倍^[8,9]。分子遗传学表明,在蜂王和工蜂幼虫发育过程中都有特定的基因被激活^[10]。在幼虫发育 2 龄期(1~2 日龄)蜂王幼虫基因表达的胰岛素样肽和胰岛素受体较工蜂幼虫高^[11]。在幼虫级型分化的关键时期,蜂王和工蜂的蜕皮激素和维持细胞分化的转录因子的转录水平,工蜂是下调表达而蜂王上调表达^[12]。通过比较蜂王和工蜂幼虫扣除 cDNA 文库基因片段的阵列,发现蜂王和工蜂幼虫的基因表达模式存在极大差异,蜂王幼虫过表达了一些代谢酶,而工蜂幼虫的一个 P450 细胞色素家族基因、储存蛋白、过氧化氢酶基因的表达量增加,过表达 70 和 90 kD 的 2 个热敏蛋白,几个与 RNA 加工和

翻译相关的蛋白^[13]。【本研究切入点】前人从形态、生理、基因水平上对蜂王和工蜂幼虫级型分化进行了大量研究,但还没有文献报道工蜂幼虫发育期系统的基因表达情况。【拟解决的关键问题】本研究利用蛋白质组学的方法对王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 工蜂幼虫期蛋白表达谱进行分析,以探明该蜂种幼虫期不同发育阶段蛋白质表达调控方面的一些特点,为今后进一步阐明王浆高产分子机理以及优良基因资源的保护奠定基础。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

固相 pH 梯度 (IPG) 胶条 (pH 3~10 线性)、双向凝胶电泳 (2-DE) 蛋白分子量标准、Bio-lyte (pH 3~10) 均为伯乐公司产品。Tris-Base、过硫酸铵 (AP)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、甘氨酸均为 Sigma 公司产品。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、考马斯亮兰 (CBB)G-250、硫脲、CHAPS、牛血清白蛋白 (BSA) 为 Amresco 公司产品。琼脂糖和尿素为 Solarbio 公司产品。DTT、碘乙酰胺购自 Merk 公司。其余化学试剂均产自北京化学试剂公司。

1.2 取样

所有样品均取自中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场。将蜂王连同一张空巢脾一同放入蜂王控制器(仅能放一张巢脾,工蜂可以自由出入而蜂王无法通过的一种塑料框)中,使蜂王在巢脾上产卵 10 h 以供取样,10 h 时将蜂王从控制器中提出放在其它巢脾上,这个有卵的巢脾仍旧放在控制器中,卵 3 天后发育成为蜂幼虫,幼虫发育到第 2、4、6 日龄时分别取 60 只幼虫经生理盐水洗涤 3 次后立即放入-70℃备用。

1.3 蛋白提取

蛋白提取方法根据钟伯雄等^[13]报道的方法。每 1 mg 蜂幼虫中加入 10 μ l 磷酸缓冲液 (pH 7.6, 含 32.5 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄, 2.6 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 400 mmol·L⁻¹ NaCl), 冰上研磨 20 min, 超声处理 2 min。4℃, 12 000×g, 离心 10 min; 接着 4℃, 15 000 g, 再离心 10 min。避开脂肪层取上清液放入另一 Ep 管中, 沉淀中按照每 1 mg 幼虫加入 2 μ l 上述磷酸缓冲液, 4℃, 15 000×g, 离心 10 min。取上清与上步所得上清合并, 作为磷酸易溶性蛋白溶液备用。沉淀中按每

1 mg 幼虫加入 10 μl 蛋白裂解缓冲液 (8 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol·L⁻¹ Tris 碱, 30 mmol·L⁻¹ DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10), 冰上研磨 10 min, 超声 2 min。4℃, 15 000 g, 离心 10 min, 共离心 1 次。取上清作为磷酸难溶性蛋白溶液与上述磷酸易溶性蛋白溶液合并, 沉淀弃去。在混合上清液中加入 100% TCA 使其终浓度达到 10%, 冰上静置 10 min 以上, 以沉淀蛋白并除去样品中的盐份。将此混合液在 4℃, 15 000×g, 离心 10 min, 共离心 2 次。弃去上清液, 沉淀中按每 1 mg 蜂幼虫加入 3.5 μl 上述的蛋白裂解缓冲液, 冰上研磨 5 min, 超声 2 min, 使混合液充分溶解, 用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调溶液 pH 至中性, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或是-70℃冷藏备用。

1.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度按照 Bradford^[15]介绍的方法进行测定。使用 BSA 做标准曲线, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。测得王浆高产蜜蜂 2 日龄、4 日龄、6 日龄幼虫蛋白液浓度分别为 10.2、9.85、8.5 mg·ml⁻¹。

1.5 双向电泳 (2-DE) 分析

将不同浓度的蛋白样品用蛋白裂解缓冲液 (8 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol·L⁻¹ Tris 碱, 30 mmol·L⁻¹ DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10) 稀释后再与上样水化液 (8 mol·L⁻¹ 尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚蓝, 65 mmol·L⁻¹ DTT, 0.2% Bio-lyte pH 3~10) 按照 1:4 的比例充分混合, 取此混合液 410~420 μl 上样, 使得 3 个样品的上样量均为 501 μg 。使用 17 cm IPG 胶条 (pH 3~10 线性), 在 18℃ 按以下程序进行第一向等电聚焦 (Protean IEF Cell system, Bio-Rad Hercules, CA, USA): 50 V, 14 h 水化; 250 V, 30 min 除盐 2 次; 1 000 V, 1 h 再次除盐; 9 000 V, 5 h 线性升压; 9 000 V, 60 000 V·h 聚焦。

第一向聚焦结束后, 将 IPG 胶条分别用含 2% DTT 的平衡缓冲液 1 和 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液 2 (平衡缓冲液 1 和 2 均含有 6 mol·L⁻¹ 尿素, 0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS) 平衡胶条各 15 min。平衡后 IPG 胶条转移到 1.0 mm 厚 12% T 的聚丙烯酰胺分离胶上, 15 μl 2-DE 蛋白分子量标准加在胶条的酸性端, 开始进行第二向 SDS-PAGE 电泳。第二向电泳采用 PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 恒流 25 mA/gel 进行。第二向电泳结束后, 浸泡入固定液中 (40% 乙醇, 10% 醋酸) 摇床固定 4 h 以上。然后将凝胶转入染色液 (CBB G-250 染色母液

与甲醇 4:1 混合) 中进行染色 14 h 以上。

1.6 图像分析

染色后凝胶使用透射模式进行扫描, 扫描结果直接导入计算机 (32 位, 300 dpi 分辨率, 全彩)。扫描图像使用 PDQuest V 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行图像扫描、斑点检测和匹配分析。并用总密度方法 (total density in gel image) 标准化处理 (normalization)。

2 结果与分析

2.1 王浆高产蜜蜂幼虫不同发育阶段蛋白质双向电泳图谱分析

对不同批次的样品进行电泳, 图谱达 5 次重复。图谱使用 PDQuest 7.3.0 相同的参数进行分析。下图分别为 2 日龄 (图-A)、4 日龄 (图-B) 和 6 日龄 (图-C) 工蜂幼虫的蛋白质表达谱。通过对图谱分析发现, 2 日龄、4 日龄、6 日龄工蜂幼虫蛋白图谱检测到的蛋白点分别为 262 (图-A), 418 (图-B), 194 (图-C)。2 日龄幼虫蛋白点分子量、等电点和表达量的范围分别是 12.2~88.2 kD、4.60~8.84、 $132.7\times 10^{-6}\sim 6950.5\times 10^{-6}$ 。4 日龄幼虫蛋白点分子量、等电点、表达量的范围是 12.3~86.6 kD、4.60~9.24、 $39.8\times 10^{-6}\sim 40\ 328.3\times 10^{-6}$ 。6 日龄幼虫蛋白点分子量范围是 12.2~86.8 kD, 等电点范围是 4.77~9.04 和表达量是 $115.7\times 10^{-6}\sim 36\ 269.2\times 10^{-6}$ 。

2.2 王浆高产蜜蜂幼虫不同发育阶段特异表达蛋白表达分析

通过对王浆高产蜜蜂不同发育阶段的幼虫特异性蛋白质斑点比较分析, 结果表明 2 日龄幼虫特有的蛋白质斑点为 88 个, 其分子量范围是 13.0~88.2 kD, 等电点在 4.66~8.49 之间, 表达量范围为 $132.7\times 10^{-6}\sim 33\ 940.7\times 10^{-6}$ (表 1)。4 日龄幼虫中特有的蛋白质斑点有 209 个, 分子量范围 12.5~85.5 kD, 等电点在 4.72~9.24 之间, 表达量范围为 $39.8\times 10^{-6}\sim 25\ 238.8\times 10^{-6}$ (表 2)。6 日龄幼虫特有的蛋白质斑点为 63 个, 这些点分子量范围是 12.3~86.8 kD, 等电点在 4.77~9.04 之间, 表达量范围是 $115.7\times 10^{-6}\sim 33\ 960.5\times 10^{-6}$ (表 3)。

2 日龄和 4 日龄幼虫中表达而在 6 日龄幼虫中关闭的蛋白质斑点共有 84 个, 其分子量为 13.9~79.2 kD, 等电点范围是 4.60~8.84, 表达量在 $137.2\times 10^{-6}\sim 24\ 390.5\times 10^{-6}$ 之间。2 日龄和 6 日龄幼虫中表达而 4 日龄幼虫中关闭的仅有 6 个, 其分子量范围是 12.2~57.0

表 1 王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期 2 日龄特有蛋白分子量 (MW)、等电点 (pI) 及表达量

Table 1 MW, pI and expression volume of the specific proteins of the larvae of the high producing royal jelly worker bees on day 2

点编号 Spot No.	分子量 MW(kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\times 10^6$)	点编号 Spot No.	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\times 10^6$)
8	16.3	5.03	355.9	2109	26.0	6.08	823.5
9	18.0	5.08	1103.8	2409	50.4	6.04	8191.3
10	13.6	5.32	335.7	2709	66.0	6.13	1920.0
11	13.1	5.55	3302.2	2710	69.6	6.06	747.7
12	13.0	5.28	628.4	2806	78.5	6.04	7426.3
13	14.1	5.28	287.0	3003	18.1	6.41	8877.0
14	22.1	5.34	902.0	3004	16.4	6.39	473.3
15	21.2	5.31	995.4	3203	36.6	6.32	970.4
104	31.2	4.67	5913.4	3204	34.5	6.44	1381.2
105	31.0	4.77	881.1	3205	36.9	6.60	363.4
106	24.2	5.26	1634.8	3405	45.5	6.60	6970.1
107	29.0	5.55	570.4	3406	43.8	6.47	7707.2
108	32.4	4.89	132.7	3508	50.3	6.29	13956.2
109	28.9	4.73	783.6	3509	49.8	6.17	9201.7
110	24.3	4.94	1269.5	4003	15.9	6.64	4707.1
207	35.0	5.06	33940.7	4004	16.4	6.69	6445.2
208	35.2	4.90	3074.0	4005	14.8	6.81	1216.8
209	36.3	5.41	815.0	4306	39.4	6.68	1536.3
308	42.3	4.66	1324.0	4408	43.0	6.59	2988.5
402	50.4	5.58	2070.3	4507	52.1	6.79	535.1
605	63.4	4.75	1130.7	4609	57.4	6.67	3278.0
701	68.0	4.77	6663.5	5107	25.3	6.87	533.7
702	64.7	5.31	2086.0	5108	26.8	6.99	332.3
703	64.5	5.13	2446.2	5109	28.7	7.03	714.0
1005	15.6	5.69	1706.4	5205	36.5	7.03	4827.8
1006	16.5	5.69	269.5	5307	40.6	7.11	331.3
1109	29.6	5.72	747.2	5311	40.1	7.03	1071.9
1110	30.0	5.88	438.7	5312	40.1	7.10	796.8
1111	27.2	5.80	729.8	5410	48.3	7.13	17257.2
1112	25.3	5.97	743.9	5411	48.3	6.86	5927.9
1304	39.7	5.71	704.4	5507	56.5	6.97	13335.7
1305	40.9	5.72	1153.4	6105	24.8	7.38	891.2
1306	41.4	5.80	1734.4	6208	33.6	7.36	243.2
1411	44.3	5.60	1855.5	6308	41.4	7.47	965.2
1509	58.2	5.91	3197.7	6405	46.1	7.35	12008.4
1510	51.1	5.80	4000.5	7005	20.9	8.04	463.3
1808	79.5	5.80	6551.5	7307	42.1	7.90	503.0
1809	78.5	5.87	641.1	7407	44.9	7.83	636.4
1907	88.2	5.86	5677.6	7408	48.8	7.94	1634.1
1908	88.2	5.96	1709.5	7409	48.4	8.00	2536.9
2007	23.6	6.13	1736.1	7510	54.1	7.61	1719.4
2107	27.6	6.08	1849.0	7708	67.3	8.00	747.1
2108	25.1	6.09	1098.2	8008	17.9	8.49	376.7

表 2 王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 工蜂幼虫期 4 日龄特有蛋白分子量 (MW)、等电点 (pI) 及表达量

Table 2 MW, pI and expression volume of the specific proteins of the larvae of the high producing royal jelly worker bees on day 4

点编号 Spot No.	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\times 10^{-6}$)	点编号 Spot No.	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\times 10^{-6}$)
4	15.2	5.41	59.6	2705	69.7	6.12	697.9
5	19.2	5.54	641.5	2706	66.6	6.17	1445.3
103	25.3	5.50	693.9	2708	68.1	6.23	197.6
202	36.4	5.20	1988.3	2803	77.7	6.12	1813.5
203	35.4	5.20	1311.2	2804	76.4	6.12	240.0
205	37.4	5.39	712.6	2805	76.4	6.18	370.5
206	35.8	5.43	5553.1	2901	79.7	6.13	398.8
301	38.9	4.72	1496.4	2902	81.0	6.24	173.8
302	38.9	4.85	2886.7	3002	18.4	6.43	3382.1
305	37.9	5.20	6181.6	3201	33.3	6.28	451.5
306	39.7	5.27	5142.6	3202	33.2	6.44	480.3
401	51.8	5.33	2844.5	3301	43.3	6.28	5997.9
601	63.1	5.30	2310.2	3302	40.2	6.35	1920.7
801	69.8	5.52	487.1	3304	39.9	6.43	1194.8
901	79.3	5.41	469.2	3306	38.2	6.47	439.4
902	79.4	5.51	791.3	3307	39.9	6.5	1656.8
1102	29.9	5.64	496.3	3401	44.6	6.28	3311.4
1104	27.0	5.8	541.0	3501	52.6	6.29	597.9
1106	28.2	5.87	605.9	3506	49.8	6.17	18212.1
1201	36.0	5.64	854.5	3601	62.2	6.25	178.4
1202	34.6	5.65	1114.6	3602	61.8	6.32	212.4
1203	33.3	5.72	454.3	3604	59.9	6.48	449.6
1401	43.7	5.64	1494.4	3701	65.9	6.28	451.6
1405	49.7	5.81	6361.3	3704	69.5	6.40	223.1
1406	44.3	5.84	1258.5	3705	68.5	6.40	565.4
1408	46.3	5.91	515.6	3801	76.6	6.25	476.2
1501	56.8	5.64	231.1	3803	76.4	6.32	682.8
1603	61.3	5.79	219.3	3804	76.0	6.38	372.8
1604	59.2	5.8	266.3	3807	70.5	6.5	399.6
1801	69.8	5.65	438.4	3901	81.2	6.31	122.9
1804	77.7	5.8	164.9	4102	26.7	6.64	446.2
1805	77.9	5.91	1051.3	4104	31.8	6.75	748.9
1806	78.4	5.92	272.0	4202	34.1	6.64	589.2
1807	75.7	5.93	420.7	4203	33.5	6.64	928.3
1901	80.3	5.63	669.1	4204	35.5	6.65	1013.8
1903	79.1	5.7	1378.8	4205	34.2	6.76	1548.1
1904	83.0	5.72	215.9	4301	41.6	6.54	799.8
1905	79.4	5.86	1296.4	4303	39.6	6.63	11815.1
1906	80.1	5.94	701.9	4402	48.0	6.55	2996.9
2004	22.0	6.1	858.5	4403	45.9	6.57	6337.3
2103	23.3	6.11	1904.0	4404	51.5	6.72	359.8
2203	36.3	6.21	610.0	4502	53.0	6.56	710.3
2301	43.3	6.12	2226.5	4503	54.3	6.58	1399.6
2401	43.5	6.03	913.3	4504	55.3	6.67	9453.2
2402	49.1	6.04	25238.8	4602	61.6	6.55	2303.5
2504	53.7	6.19	1523.0	4605	61.2	6.68	367.0
2601	64.1	6.12	246.4	4606	60.0	6.70	415.3
2603	64.0	6.17	237.9	4701	69.0	6.62	614.8
2702	69.5	6.03	167.3	4702	68.1	6.71	1180.6
2703	68.1	6.05	645.8	4703	69.1	6.76	314.0
2704	68.7	6.05	97.7	4801	78.1	6.53	389.6

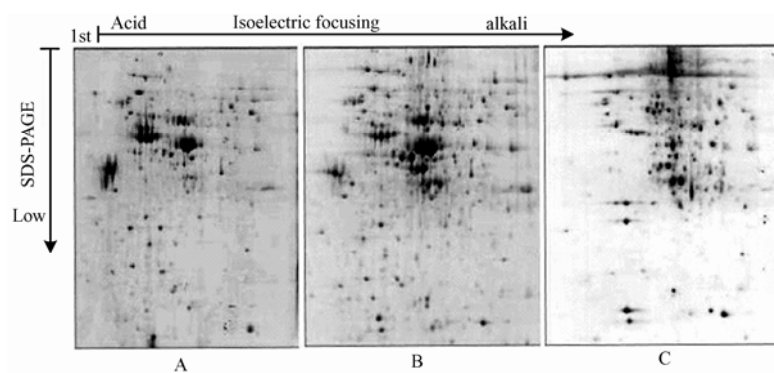
续表 2 Continued table 2

点编号	分子量	等电点	表达量	点编号	分子量	等电点	表达量
Spot No.	MW (kD)	pI	Expressional volume ($\times 10^{-6}$)	Spot No.	MW (kD)	pI	Expressional volume ($\times 10^{-6}$)
4802	70.2	6.60	333.6	7304	42.9	7.57	561.9
4803	75.0	6.62	454.6	7401	46.4	7.42	882.9
4804	78.2	6.63	203.9	7402	43.5	7.5	2277.3
4805	71.5	6.63	134.5	7403	45.6	7.56	446.4
4807	78.7	6.69	464.3	7501	54.2	7.38	1455.3
4901	84.2	6.55	1924.6	7502	53.8	7.44	680.3
4903	84.6	6.72	826.5	7506	54.9	7.6	4391.8
5102	32.5	6.90	1404.2	7509	53.2	7.77	237.2
5308	40.5	7.04	1565.1	7603	60.5	7.74	457.4
5310	36.5	7.04	2424.0	7702	68.6	7.59	227.5
5402	48.8	6.91	7855.1	7703	67.6	7.61	556.7
5403	51.8	6.92	1216.1	7704	68.3	7.69	1356.8
5413	45.8	6.88	2982.4	8004	14.4	8.16	1650.4
5416	41.6	6.97	2425.5	8006	17.7	8.47	785.2
5603	63.5	6.90	322.2	8105	24.0	8.27	127.3
5604	62.9	6.95	1042.8	8201	34.1	7.96	736.5
5702	68.1	6.85	309.2	8204	34.0	8.51	952.8
5703	65.3	6.95	611.0	8303	42.4	7.90	292.6
5704	66.0	6.98	1046.3	8305	38.4	8.28	39.8
5802	78.2	6.79	602.0	8306	38.1	8.34	54.0
5803	73.2	6.81	649.5	8401	45.5	7.85	431.7
5804	78.1	6.84	853.3	8403	47.1	7.97	1332.3
5805	75.9	6.85	627.0	8405	44.1	8.13	576.1
5902	85.5	6.9	846.6	8502	54.5	8.17	467.1
5903	82.6	6.91	749.4	8604	60.8	8.24	403.0
6102	31.3	7.33	627.3	8701	65.0	7.86	763.3
6204	36.2	7.33	2296.0	8704	65.00	8.25	280.8
6205	34.8	7.35	2163.3	8705	67.3	8.34	586.2
6303	40.8	7.31	106.2	8802	71.1	8.21	76.0
6305	40.4	7.34	301.1	8803	72.3	8.21	359.2
6401	45.7	7.15	10086	8805	76.0	8.33	738.6
6404	51.9	7.27	107.8	9002	21.8	8.59	55.5
6407	41.6	7.1	2971.6	9004	12.5	9.16	3366.0
6501	58.7	7.12	748.5	9005	17.2	9.19	2239.4
6502	54.7	7.19	1811.4	9202	34.9	8.72	1390.8
6505	56.5	7.27	1218.5	9203	34.2	9.05	4237.5
6506	53.8	7.31	1120.1	9204	34.2	9.20	8654.3
6507	58.6	7.33	396.9	9205	34.3	9.24	740.1
6601	63.6	7.18	378.5	9503	57.4	9.06	489.5
6602	60.6	7.22	639.8	9504	57.5	9.16	434.2
6603	64.0	7.27	389.5	9602	60.7	8.69	1071.1
6605	63.1	7.31	664.5	9603	60.3	8.74	615.2
6606	59.4	7.34	490.7	9604	60.3	8.80	622.2
6701	66.7	7.12	493.8	9605	60.4	8.98	191.0
6704	68.0	7.23	483.8	9702	66.8	8.77	604.0
6705	68.2	7.31	1558.0	9703	66.7	8.88	752.3
6801	73.1	7.28	963.4	9801	72.3	8.58	428.5
6903	82.9	7.22	881.7	9802	72.3	8.67	476.6
6905	83.0	7.36	355.3	9803	72.7	8.95	3408.0
7001	12.7	7.43	2260.0	9804	71.7	9.05	414.4
7003	15.9	7.71	693.4	9805	72.1	9.14	860.8
7201	36.8	7.41	1487.5	9901	79.2	8.87	1733.6
7202	32.9	7.5	808.3	9902	80.8	9.14	461.9
7301	39.9	7.38	235.3				

表 3 王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期 6 日龄特有蛋白分子量 (MW)、等电点 (pI) 及表达量

Table 3 MW, pI and expression volume of the specific proteins of the larvae of the high producing royal jelly worker bees on day 6

点编号 Spot No.	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\times 10^6$)	点编号 Spot No.	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\times 10^6$)
7	12.3	5.32	3673.7	5506	57.2	7.09	2123.7
502	54.5	5.56	1672.9	5807	69.7	7.05	5716.4
802	77.8	4.77	6430.9	5808	73.3	7.04	2111.6
1107	31.1	5.82	6951.9	5809	71.1	6.79	1053.2
1108	31.2	5.66	2563.4	6104	30.1	7.16	14225.0
1410	51.8	5.73	1183.3	6207	33.9	7.21	1312.7
1506	55.2	5.86	9134.3	6508	55.4	7.35	2251.6
1507	54.5	5.67	1807.8	6607	60.0	7.10	2475.5
1605	63.9	5.68	2710.0	6906	79.4	7.20	9625.9
2006	14.9	6.18	6925.7	6907	86.8	7.28	4318.0
2106	31.2	5.97	1623.0	7106	32.7	7.45	33960.5
2406	51.1	6.16	12359.5	7204	34.1	7.62	2699.0
2407	51.3	6.07	4479.0	7205	36.0	7.84	257.7
2408	51.8	5.99	1352.3	7206	37.5	7.78	115.7
3104	27.1	6.25	2224.6	7207	34.1	7.55	4322.0
3105	30.8	6.33	1618.5	7306	39.4	7.76	1730.0
4206	35.4	6.7	3800.1	7406	46.6	7.57	3775.9
4406	49.9	6.7	1118.6	7801	74.3	7.50	1236.0
4407	45.4	6.69	3750.2	7802	73.3	7.65	1979.7
4505	54.1	6.72	2854.8	8106	31.4	8.44	1634.9
4506	56.7	6.69	2109.0	8205	37.4	8.15	6361.4
4608	59.6	6.68	6722.6	8206	33.4	8.10	10410.6
4704	67.6	6.61	4203.4	8207	35.0	8.11	4513.9
4705	67.8	6.73	6307.3	8208	32.7	7.87	123.6
4809	76.5	6.75	1903.7	8209	34.1	7.98	5171.5
5106	32.4	7.01	4124.9	8307	39.0	7.97	2211.3
5305	42.1	7.04	920.8	8409	45.5	7.98	769.8
5407	47.7	7.00	4484.3	8410	49.2	7.99	1507.8
5408	49.9	6.88	1027	9206	34.5	8.92	1364.0
5409	49.3	6.80	1217.7	9404	44.2	8.97	6520.6
5504	55.1	6.82	1646.9	9405	46.0	9.04	346.7
5505	58.8	6.77	472.4				



王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期发育 2-DE 蛋白表达图谱。A、B、C 分别对应 2 日龄、4 日龄和 6 日龄。每个样品的上样量为 501 μg ，CBB G-250 染色

This figure is to show 2-DE protein profile of the higher production royal jelly bees during its six days larvae development. A, B, C are the protein profile corresponding to day 2, day 4 and day 6 respectively. 501 μg of each sample were subjected to 2-DE and stained by CBB G-250

图 王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期不同发育日龄 2-DE 蛋白表达图谱

Fig. Profile of the 2-DE analysis of the larvae of the high producing royal jelly worker bees (*Apis mellifera* L.) on different days

kD, 等电点范围是 5.86~7.31, 表达量范围是 908.7×10^{-6} ~ $11\,920.1 \times 10^{-6}$, 4 日龄和 6 日龄幼虫中表达而 2 日龄幼虫中关闭的有 41 个, 其分子量、等电点和表达量的范围分别是 13.8~86.6 kD、5.76~9.01 和 249.7×10^{-6} ~ $32\,852.8 \times 10^{-6}$ 。

2.3 王浆高产蜜蜂幼虫不同发育阶段共有蛋白斑点分析

王浆高产蜂种幼虫不同发育阶段共有的蛋白数为 84 个, 其分子量范围是 12.3~83.8 kD, 等电点范围是 4.80~8.64, 表达量在 255.2×10^{-6} ~ $69\,650.5 \times 10^{-6}$ 之间。对这些表达量有差异的共有蛋白进行比较分析发现。其中有 28 个蛋白在工蜂幼虫整个发育过程中上调表达, 占共有蛋白总量的 33%; 18 个蛋白在整个发育过程中下调表达, 占共有蛋白质总量的 21%, 46% 的蛋白表达增减趋势没有明显的规律性。

3 讨论

王浆高产蜜蜂是中国特有的蜂种资源和基因资源, 20 世纪 90 年代初该蜂种在中国诞生以来^[16,17], 从 80 年代末到 90 年代末, 表型研究证明了王浆高产蜜蜂的产浆量明显高于普通未经选育的意大利蜜蜂^[18-23]。20 世纪末到 21 世纪初, 研究表明工蜂咽下腺的小囊数、重量及长度可以做为王浆高产蜜蜂形态学遗传标记^[24,25], 并利用分子生物学实验技术找出王浆高产蜜蜂特异 DNA 分子标记——W316 bp^[26-33]。同时期, 数量遗传研究显示蜂群的产浆性状为是可遗传的^[34,35], 随后利用微卫星 DNA 技术研究表明有 7 个等位基因与王浆高产性状相关^[16]。在工蜂幼虫发育的 6 d 历程中, 其体重增加 1 600 多倍^[2,3], 此过程有特定的基因参与调控其发育进程^[10], 本研究基于蛋白质组学的方法, 首次分析了王浆高产蜜蜂工蜂幼虫发育阶段的蛋白质组的动态表达情况。

通过对工蜂幼虫不同发育阶段的蛋白质组图谱分析, 结果显示在 2 日、4 日、6 日龄幼虫中分别检测到了 262、418、194 个蛋白点。由此可以看出幼虫发育的第 4 天时蛋白表达最为活跃, 说明在此阶段工蜂幼虫有着较高的代谢率、呼吸率和耗氧率, 这与已报道的工蜂幼虫在 48~96 h 时发育速度最快相一致^[2]。相应的在这个阶段工蜂幼虫在形态上也发生了巨大变化, 体重迅速增加, 为其进入下个阶段化蛹做好充分准备。

在幼虫发育的第 2 日, 第 4 日, 第 6 日均能检测到 84 个蛋白点, 这是工蜂幼虫期发育不可缺少的保守

蛋白。这些共有蛋白的表达量在幼虫的发育过程中变化较大, 其中有 33% 的蛋白在整个发育期中表达量呈上调趋势, 说明随着幼虫的发育, 调控这些蛋白的基因呈上调表达, 这些基因可能包含一个 P450 细胞色素家族基因、储存蛋白、过氧化氢酶基因以及调控 70 和 90 kD 两个热敏蛋白在幼虫发育过程中过量表达的基因^[13]。21% 的共有蛋白呈下调趋势, 说明随着幼虫发育的进行, 调控这些蛋白表达的基因活性逐渐递减。其余 46% 蛋白的表达没有明显规律, 由此可见, 尽管这些共有蛋白是工蜂幼虫发育过程中的必需蛋白, 但其表达是一个动态的时空秩序进程。

除此之外, 工蜂幼虫发育的每个阶段都需要一些特异的蛋白来调控, 比如幼虫发育到第 2 日、第 4 日、第 6 日分别检测到 88、209、63 个特异蛋白。另外, 84 个蛋白在工蜂幼虫发育的第 2 日和第 4 日表达而在第 6 日关闭; 41 个蛋白在第 4 日和第 6 日表达而在第 2 日关闭, 其中有 9 个蛋白呈下调表达趋势, 这些蛋白可能与 4~6 日龄幼虫级型分化关键时期工蜂幼虫的蜕皮激素和维持细胞分化的转录因子的转录水平下调表达^[12]有关; 6 个蛋白在工蜂发育的第 2 日和第 6 日表达而在第 4 日关闭。这说明工蜂幼虫发育过程中不断有特定的基因被激活或关闭^[10]。

本研究利用蛋白质组学的方法对王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期蛋白表达谱进行初步分析, 以探明该蜂种工蜂幼虫期不同发育阶段蛋白质表达调控的一些特点, 为今后进一步阐明王浆高产分子机理奠定基础。接下来笔者将利用质谱技术和数据库序列查询对分离出的差异蛋白进行进一步分析鉴定, 了解其相对应的功能, 这将有利于加深对王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期发育机制的了解。同时还将开展王浆高产蜜蜂与未经选育的意大利蜜蜂工蜂幼虫期发育的差异蛋白的研究, 进一步探讨王浆高产相关的功能基因, 这将为探明中国王浆高产蜜蜂的高产机理及优良基因资源的保护奠定基础。

4 结论

双向电泳技术能够高通量地研究细胞或组织中的蛋白质组。本研究是利用蛋白质组学的方法对王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期的发育机理进行研究, 试验结果表明, 工蜂幼虫期发育是一个动态有序的基因调控过程, 发育第 4 日的蛋白表达最活跃。幼虫期 6 d 发育过程中 84 个共有蛋白是调控王浆高产蜜蜂工蜂幼虫期发育的必需蛋白。幼虫不同发育阶段需要不同的特异蛋白来调控。每个阶段都有相应的基因被激活或者关闭。

References

- [1] Graham M J. *The Hive and the Honey Bee*. Illinois: Dadant & Sons, INC., 1992: 73-88.
- [2] Wang D I. Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1965, 4: 3-5.
- [3] Stabe H A. The rate of growth of worker, drone and queen larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*, 1930, 23: 447-453.
- [4] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443: 931-949.
- [5] Miguel C, Enrique E, Mario Z. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *The Journal of Experimental Biology*, 1999, 202: 929-938.
- [6] Shuel R W, Dixon S E. Respiration in developing honeybee larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1968, 7: 11-19.
- [7] Rembold H. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*, 1987, 17: 1003-1006.
- [8] Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysone in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 1990, 79: 31-38.
- [9] Wheeler D E, Buck N, Evans J D. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 597-602.
- [10] Evans J D, Wheeler D E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis Mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (5): 5575-5580.
- [11] Hepperle K H. Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften*, 2001, 88: 113-116.
- [12] Evans J D, Wheeler D E. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology*, 2000, 2(1): 1-6.
- [13] Zhong B X, Li J K, Lin J R, Liang J S, Su S K, Xu H S, Yan H Y, Zhang P B, Fuji H. Possible effect of 30K proteins in embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37(5): 355-361.
- [14] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(5): 248-254.
- [15] Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. The optimal way of royal jelly production. *American Bee Journal*, 2003, 143(3): 221-223.
- [16] Li J K, Wang A P. Comprehensive technology for maximizing royal jelly production. *American Bee Journal*, 2005, 145(8): 661-664.
- [17] 陈世壁, 韩胜名. “浆蜂”生产性能考察试验总结. *中国养蜂*, 1992, 43(3): 2-5.
Chen S B, Han S M. Summary of the production capacity of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1992, 43(3): 2-5. (in Chinese)
- [18] 沈基楷, 肖体元. 浙农大 A 系意蜂生产性能考察试验报告. *中国养蜂*, 1993, 44(1): 4-6.
Shen J K, Xiao T Y. Experimental report on the production performance of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1993, 44(1): 4-6. (in Chinese)
- [19] 陈盛禄, 林雪珍. 浙农大 A 系意蜂王浆高产试验. *中国农业科学*, 1995, 28(5): 89-93.
Chen S L, Lin X Z. Experiment on the higher production royal jelly bee. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(5): 89-93. (in Chinese)
- [20] 徐祖荫, 邵峰泉, 李上星, 陈学晴. 西方蜜蜂蜜浆高产杂交优势利用研究(一). *中国养蜂*, 2000, 51(1): 10-12, 18.
Xu Z Y, Shao F Q, Li S X, Chen X Q. Study on utilizing of the cross-breed in higher honey and royal jelly production western honeybees (*Apis mellifera* L.) (I). *Apiculture of China*, 2000, 51(1): 10-12, 18. (in Chinese)
- [21] 徐祖荫, 邵峰泉, 张瑞文, 李江生, 李宏清, 赵伟亚, 陈学晴. 西方蜜蜂蜜浆高产杂交优势利用研究(二). *中国养蜂*, 2001, 52(2): 9-11.
Xu Z Y, Shao F Q, Zhang R W, Li J S, Li H Q, Zhao W Y, Chen X Q. Study on utilizing of the cross-breed in higher honey and royal jelly production western honeybees (*Apis mellifera* L.) (II). *Apiculture of China*, 2001, 52(2): 9-11. (in Chinese)
- [22] 刘艳荷, 陈盛禄, 钟伯雄. 西方蜜蜂王浆产量与品质性状的配合力和杂种优势分析. *遗传学报*, 2001, 28(10): 926-932.
Liu Y H, Chen S L, Zhong B. The combining ability and heterosis analysis of royal jelly yield and quality properties in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(10): 926-932. (in Chinese)
- [23] 苏松坤. 意大利蜂王浆生产性能遗传标记研究进展. *中国养蜂*, 2000, 51(3): 8-9.
Su S K. Currency of genetic marker of honeybee (*Apis mellifera* L.) in royal jelly production performance. *Apiculture of China*, 2000, 51(3): 8-9. (in Chinese)
- [24] 苏松坤, 陈盛禄. 意蜂王浆生产性能形态学遗传标记的研究. *遗传*, 2003, 25(6): 677-680.
Su S K, Chen S L. Research on morphological genetic marker of honeybee (*Apis mellifera* L.) in royal jelly production performance. *Hereditas*, 2003, 25(6): 677-680. (in Chinese)

- [25] 张雅娟, 蒋 滢, 王尉平, 汪成富, 葛凤晨, 张大隆. W316bp 探针鉴定高、低产王浆西蜂 DNA 分子特异标记的研究. 中国养蜂, 2001, 52(2): 6-8.
- Zhang Y J, Jiang Y, Wang W P, Ge F C, Wang C F, Zhang D L. Study on identifying the special marker of DNA in *Apis mellifera* of high or low royal jelly products with probe Dig-W316bp. *Apiculture of China*, 2001, 52(2): 6-8. (in Chinese)
- [26] 张雅娟, 蒋 滢, 王尉平, 汪成富, 葛凤晨, 张大隆. 高产王浆西蜂的 DNA 特异标记-W316bp 片段的研究. 中国养蜂, 2001, 52(3): 7-9.
- Zhang Y J, Jiang Y, Wang W P, Ge F C, Wang C F, Zhang D L. Study on a special marker- W316bp in *A. m. Lindauer* of high royal jelly products. *Apiculture of China*, 2001, 52(3): 7-9. (in Chinese)
- [27] 张雅娟, 蒋 滢, 王尉平, 汪成富, 葛凤晨, 张大隆. 地高辛标记 DNA 分子中 W316bp 特异片段成探针的研究. 中国养蜂, 2001, 52(4): 10-11, 23.
- Zhang Y J, Jiang Y, Wang W P, Ge F C, Wang C F, Zhang D L. Study on preparation of DNA probes (W316bp) marked with digoxigenin. *Apiculture of China*, 2001, 52(4): 10-11, 23. (in Chinese)
- [28] 蒋 滢, 张雅娟, 蒋菊香, 薛运波, 戴 英, 徐 颖. 优良浆意蜂 DNA 分子特异标记(W316 bp)的鉴定研究. 蜜蜂杂志, 2002, (8): 3-4.
- Jiang Y, Zhang Y J, Jiang J X, Xue Y B, Dai Y, Xu Y. Study on identification of special marker in DNA molecule of high royal jelly bee. *Journal of Bee*, 2002, (8): 3-4. (in Chinese)
- [29] 王尉平, 蒋 滢, 张雅娟, 汪成富, 黄超群. 高产王浆西蜂 DNA 分子中的相关基因标志筛选及其鉴定. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(2): 161-164.
- Wang W P, Jiang Y, Zhang Y J, Wang C F, Huang C Q. Selection and checking of the gene marker related to the high royal jelly quantity trait of *Apis mellifera* Lindauer. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18(2): 161-164. (in Chinese)
- [30] 戴 英, 徐 霞, 汪成富, 蒋 滢. 一种新型的分子标记-SCARs 验证王浆高产蜜蜂的 RAPD 分子标记-W316 bp 的研究. 中国养蜂, 2003, 54(3): 7-8.
- Dai Y, Xu X, Wang C F, Jiang Y. Study on transforming from RAPD molecular marker-W316bp of high royal jelly products into a new SCARs molecular marker. *Apiculture of China*, 2003, 54(3): 7-8. (in Chinese)
- [31] 金水华, 张大隆, 徐 颖, 郭珺超, 蒋 滢. 使用 DNA 特异基因标记-W316bp 鉴定平湖王浆高产意蜂的研究初报. 中国养蜂, 2003, 54(5): 7-8.
- Jin S H, Zhang D L, Xu Y, Wu J C, Jiang Y. Study on identifying high royal jelly products bee (*Apis mellifera* L.) using molecular marker-W316bp (I). *Apiculture of China*, 2003, 54(5): 7-8. (in Chinese)
- [32] 金水华, 张大隆, 徐 颖, 郭珺超, 蒋 滢. 使用 DNA 特异基因标记-W316 bp 鉴定平湖王浆高产意蜂的研究再报. 中国养蜂, 2004, 55(2): 4-5.
- Jin S H, Zhang D L, Xu Y, Wu J C, Jiang Y. Study on identifying high royal jelly products bee (*Apis mellifera* L.) using molecular marker-W316bp (II). *Apiculture of China*, 2004, 55(2): 4-5. (in Chinese)
- [33] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂咽下腺与繁殖力的发育遗传研究. 中国畜牧杂志, 2003, 39(6): 9-11.
- Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analysis for developmental behavior of reproductive ability and hypopharyngeal gland in western honey bees (*Apis mellifera* L.). *Chinese Journal of Animal Science*, 2003, 39(6): 9-11. (in Chinese)
- [34] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂产浆量的动态遗传研究. 遗传学报, 2003, 30(6): 547-554.
- Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analysis for developmental behavior of honeybee colony's royal jelly production traits in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(6): 547-554. (in Chinese)
- [35] Fleig R, Walldorf U, Gehring W J, Sander K. Development of the Deformed protein pattern in the embryo of the honeybee *Apis Mellifera* L. (Hymenoptera). *Development Genes and Evolution*, 1992, 201(4): 235-242.

(责任编辑 王红艳)