

蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 幼虫级型分化差异蛋白质组分析

吴 静^{1,2}, 李建科²

(¹郑州大学生物工程系, 郑州 450001; ²中国农业科学院蜜蜂研究所/农业部授粉昆虫重点开放实验室, 北京 100093)

摘要: 【目的】对蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 蜂王与工蜂级型分化期的蛋白质组进行比较, 以探明蜂王和工蜂在级型分化时期蛋白质表达调控方面的异同。【方法】采用双向电泳建立蜂王和工蜂级型分化期蛋白质组表达谱, 获得图谱中蛋白质表达的数量、表达量、等电点和分子量等信息, 然后进行比较蛋白质组研究。【结果】在幼虫 3 日龄, 蜂王表达 288 个蛋白质, 工蜂表达 259 个蛋白质, 2 种级型蜂共有蛋白质为 156 个, 其中 25 个蛋白质在蜂王中的表达量显著大于 ($P < 0.05$) 工蜂, 34 个蛋白质工蜂表达量显著大于 ($P < 0.05$) 蜂王, 而蜂王和工蜂的特异蛋白质分别为 132 个和 103 个; 到幼虫 5 日龄时, 蜂王表达 274 个蛋白质, 工蜂为 236 个, 这 2 种级型蜂共有蛋白质点为 95 个, 其中蜂王 15 个蛋白质的表达量显著大于 ($P < 0.05$) 工蜂, 工蜂 26 个蛋白质的表达量显著大于 ($P < 0.05$) 蜂王, 而蜂王特异蛋白质点为 179 个, 工蜂特异蛋白质点为 141 个; 到蛹 11 日龄时, 蜂王蛋白质组有 311 个蛋白质点, 而工蜂则有 278 个蛋白质点, 2 种蜂共有蛋白质点为 194 个, 其中蜂王 45 个蛋白质的表达量显著大于 ($P < 0.05$) 工蜂, 工蜂 35 个蛋白质的表达量显著大于 ($P < 0.05$) 蜂王, 而蜂王的特异蛋白质点为 117 个, 工蜂特异蛋白质点为 84 个。【结论】在蜜蜂 3 日龄、5 日龄、11 日龄时, 蜂王和工蜂的蛋白质表达谱存在显著差异, 蜂王表达的蛋白质总数和特有蛋白质数都较工蜂多, 说明蜂王幼虫的基因表达和代谢比工蜂幼虫更加旺盛。2 种级型蜂发育中所表达的共有蛋白质可能是它们发育所必须的管家蛋白质, 但级型间部分共有蛋白质的表达模式存在较大差异, 在 3 个日龄中蜂王和工蜂中所表达的特异蛋白质表明在级型分化中, 不同级型需要不同的蛋白质来调节各自的发育。这些特异蛋白质是否是级型发育相关的功能蛋白质, 还有待进一步的研究。

关键词: 蜜蜂; 级型分化; 双向电泳; 蛋白质组

Proteomic Analysis of the Honeybee (*Apis mellifera* L.) Caste Differentiation Between Worker and Queens Bees Larvae

WU Jing^{1,2}, LI Jian-ke²

(¹Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; ²Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093)

Abstract: 【Objective】To investigate into the differentially expressed proteins between the honeybee (*Apis mellifera* L.) worker and queens larvae, the proteome profiling of the workers and the queens were compared on day 3, day 5 and day 11 during the developmental process of the honeybee caste differentiation. 【Method】Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was employed to set up protein profiling of the queens and the workers during their eleven days development. Then the protein abundance, molecular weight and pI were analyzed. 【Result】Totally, 288 and 274 proteins were detected in the proteome profile of queens on day 3 and day 5, respectively, which is significantly higher than those detected in workers (259 and 236, accordingly). And in the head of 11-day pupae, also evidently higher number of total proteins (311) was detected in queens than those of workers (278). On the third day, 156 proteins were presented in both queens and workers larvae, while 132 proteins were specific to queens larvae, and 103 proteins were exclusive to workers larvae. While on the fifth day, larvae of queens and workers had 95 shared proteins, and 179 proteins were specific to queen larvae and 141 proteins to workers larvae. Until the eleventh day, 194 proteins were resolved in the

收稿日期: 2009-06-24; 接受日期: 2009-08-25

基金项目: 国家蜜蜂产业技术体系和公益性行业科研专项 (nyhyzx07-041)

作者简介: 吴 静, 硕士研究生。Tel: 010-62591449; E-mail: echowujng@126.com。通信作者李建科, 教授, 博士。Tel: 010-62591449; E-mail: apisljk@126.com

head of queen and workers, while 117 and 84 proteins were unique to the heads of queen and workers, respectively. **【Conclusion】** Significant differences were found in the proteome between queens and workers during the process of caste differentiation. While the increased number of total and specific proteins in queens showed that the metabolic rate and gene expression of queens is higher than those of workers. The proteins both in queens and workers suggest that they should be indispensable for caste development, but their expression patterns are different between two bee castes. The protein specifically expressed at each time-point indicate that different caste developmental stages need specific proteins to be involved in.

Key words: honeybee (*Apis mellifera* L.); caste differentiation; two-dimensional gel electrophoresis; proteome

0 引言

【研究意义】蜜蜂是一种重要的经济动物,其授粉行为对农业生产和全球生态起着重要的作用,同时它也是研究社会行为和学习记忆导航行为的模式生物。蜜蜂群体内由2种性别3种级型的蜜蜂个体组成,即工蜂、蜂王和雄蜂。蜂王和工蜂都是由受精卵发育而来的雌性,仅仅由于蜂王出生在王台中并被饲以过量的王浆,而工蜂出生在工蜂巢房中仅被饲以3天王浆,幼虫就渐渐向着2个不同的级型发育^[1-2]。蜜蜂具有典型的级型分化现象,即蜂王和工蜂虽然都是雌性,但只有蜂王具有生殖能力而工蜂则不具有。它们在外形态、内部解剖、生理和行为上存在较大差异^[3]。蜜蜂级型分化是营养调控的结果,是一个循序渐进的过程,贯穿整个幼虫期和蛹期^[3]。本文通过分析蜂王和工蜂这2种级型蜂在不同发育时期蛋白质组的特点,比较其蛋白质表达谱的时空差异,寻找级型间的差异蛋白质,并分析这些特异蛋白质在级型分化中所起的作用,为从分子水平上研究级型分化的机理提供参考。**【前人研究进展】**对社会性昆虫级型分化的现象,早在18世纪科学家们就利用互换培育试验发现,只有小4日龄(3—3.5日龄)的雌性蜂幼虫才具有双向发育能力;超过5日龄级型分化过程不再逆转^[4-8],同时内部解剖也发现蜂王和工蜂4日龄中期(72 h)时已具有相同的卵巢原基,72 h后级型间的卵巢原基才出现差异^[8]。蜜蜂在级型分化中主要受到营养(食物的质和量)、激素和分子调控3个方面的影响^[3]。卵孵化后蜂王幼虫和工蜂幼虫分别被饲以不同质和量的食物,蜂王幼虫被饲喂的王浆含糖量是12%,而工蜂幼虫被饲喂的工蜂浆的含糖量仅为4%,并且蜂王幼虫被饲喂的次数比工蜂幼虫的多10倍以上^[9-11]。营养是级型分化的启动因子,它使蜜蜂产生内分泌信号,从而分泌对级型分化有调节作用的激素。到幼虫5日龄后期蜂王幼虫分泌保幼激素的滴度是同期工蜂的26倍^[12]。内分泌激素通过在分子层次进行调控,从而最终决定级型分化的方向。基因研究表明,蜂王和工

蜂在分化过程中有240个表达不同的基因,级型发育中的工蜂上调表达了较多发育基因,而蜂王上调表达了较多代谢相关的基因,这些基因可以通过调节机体的代谢来指导级型分化^[13-16]。对蜂王和工蜂发育阶段mRNA翻译水平的比较发现,孵化后12 h蜂王和工蜂mRNA的翻译产品完全一样;在83 h(4日龄末,即将进入5日龄)时,翻译产品出现差别;到156 h(预蛹期)时,翻译产品差异最大^[10]。对不同级型蜜蜂血淋巴内蛋白质组分析发现,在蜂王血淋巴液中含有大量与繁殖功能相关的蛋白质,而在工蜂血淋巴液则没有,因此,这些蛋白质有促进卵母细胞的成熟的功能^[17]。最近, RNA 干扰研究证明,当刚孵化幼虫的甲基化转移酶基因被沉默时,幼虫就朝着蜂王的方向发育,由此可见, DNA 甲基化可储存蜜蜂后天遗传信息,这些信息可改变幼虫营养摄入,从而决定幼虫的发育方向^[18]。**【本研究切入点】**目前对蜜蜂级型分化已从营养、激素和基因组方面进行了较为翔实的研究,但利用比较蛋白质组学方法研究蜜蜂级型间发育的相关文献还未见报道。近年来,中国国内已对不同蜜蜂幼虫发育的蛋白质组进行了研究,这为研究蜜蜂级型发育蛋白质组学提供了参考。**【拟解决的关键问题】**本文对蜂王和工蜂不同日龄间蛋白质组进行比较,探索级型间蛋白质时空表达差异,进一步分析这些蛋白质表达差异在级型分化中所起的作用,以期阐明蜜蜂级型分化分子机理奠定基础。

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) 蛋白质分子量标准、Bio-lyte (pH3—10)、矿物油均为伯乐公司产品。十二烷基硫酸钠 (SDS)、甘油均为 Sigma 公司产品。Tris 碱、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、考马斯亮兰 (CBB) G-250、尿素、硫脲、过硫酸铵 (AP)、CHAPS、牛血清白蛋白 (BSA)、DTT、甘氨酸为 Amresco 公司产品。琼脂糖为 Solarbio 公司产品。碘乙酰胺购自

Applichem 公司。

1.2 取样

2008 年 7 月—9 月, 蜂王和工蜂幼虫取自中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场的意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.)。先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, 4 h 后将巢脾从控制器中提出, 蜂王置于其它巢脾上, 再将已产有卵的巢脾放回控制器中, 卵 3 d 后发育成为蜂幼虫, 将此时 1 日龄的幼虫部分转移到王台中, 其余部分仍留在巢脾中分别发育, 当蜜蜂发育到第 3、5、11 日龄时, 蜂王和工蜂各取 60 只经生理盐水洗涤 3 次后, 3 日龄和 5 日龄的幼虫立即放入 -70°C 备用, 11 日龄的蛹只取其头部立即放入 -70°C 备用。

1.3 蛋白质提取, 蛋白质浓度测定及双向电泳 (2-DE)

蛋白质提取方法根据李建科报道的方法^[13]。制成的蛋白质样品溶液, 直接使用或是在 -70°C 冷藏备用。蛋白质浓度按照 Bradford 介绍的方法进行测定^[19]。使用 BSA 做标准曲线, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。双向电泳采

用李建科已报道的双向电泳方法^[13]。

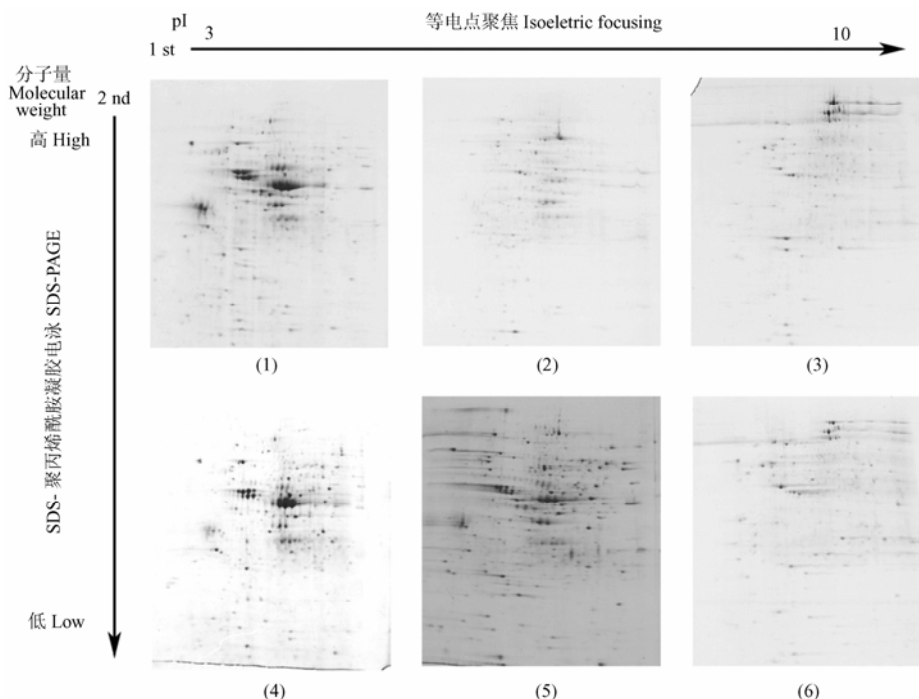
1.4 图像分析

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)。每个级型同 1 日龄的双向电泳凝胶图谱, 选 3 张重复性好的图谱逐一扫描得 3 次重复, 之后利用 PDQuest V 8.0.1 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行图象扫描、斑点检测和匹配分析。并用总密度方法 (Total Density in Gel Image) 对蛋白质表达量进行均一化处理 (Normalization)。采用 ANOVA (Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C., USA) 的邓肯法对数据进行统计检验。

2 结果和分析

2.1 蜂王和工蜂蛋白质表达图谱分析

图 1 是 3 次具有很好重复性的蜂王和工蜂在 3、5、11 日龄时蛋白质组代表图谱之一, 每张图谱分析采用相同的参数 (灵敏度 9.04, 尺寸比例 1 : 5, PDQuest 8.0.1, Bio-Rad Hercules, CA, USA)。蜂王在 3 个日龄分别检测到的蛋白质点数为 288、274、311 个,



(1)、(2) 分别代表 3 日龄、5 日龄蜂王幼虫蛋白质图谱; (3) 代表 11 日龄蜂王蛹头部蛋白质图谱; (4)、(5) 分别代表 3 日龄、5 日龄工蜂幼虫蛋白质图谱; (6) 代表 11 日龄工蜂蛹头部蛋白质图谱。每个样品上样量 380 μg , CBB G-250 染色
(1), (2), (4), (5) are protein profiles corresponding to queen and worker larvae on day 3 and day 5, respectively. (3), (6) represent proteome profiles of the head of queen and worker pupae on day 11. A 380 μg each sample were subjected to 2-DE and stained by CBB G-250

图 1 蜂王与工蜂级型分化期发育 2-DE 蛋白质图谱

Fig. 1 2-DE profile of queens and workers (*Apis mellifera* L.) during the process of caste differentiation

这些蛋白质的分子量范围为 14.4—94 kD, 等电点范围为 3—10; 而工蜂在 3 个相应日龄检测到的蛋白质点数为 259、236、278 个, 这些蛋白质的分子量范围为 14.5—94 kD, 等电点范围为 3—9.19。在 3 个发育阶段中蜂王所表达的蛋白质点数量和特有蛋白质点数量

都明显高于工蜂 (图 2)。

2.2 蜂王与工蜂 3 日龄幼虫蛋白质组比较

在幼虫期 3 日龄时, 蜂王和工蜂的共有蛋白质点数为 156 个, 其分子量范围为 15.61—94 kD, 等电点范围为 3—8.82 (图 3-A, 图 3-B), 其中 25 个蛋白

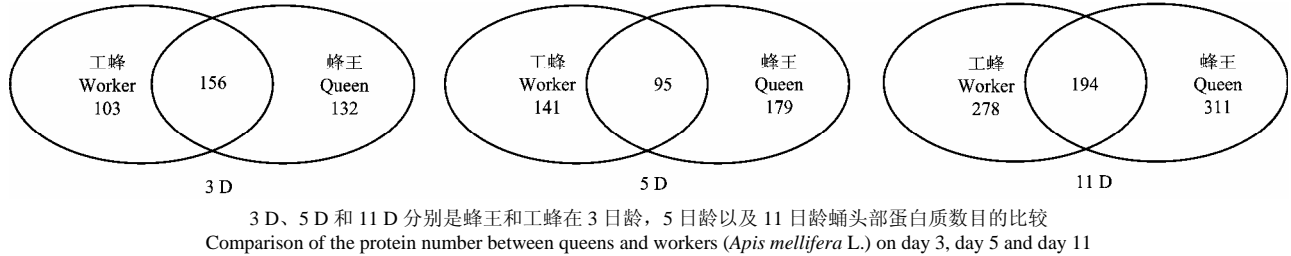


图 2 蜂王与工蜂在 3 个日龄表达的共有蛋白质和特异蛋白质数文氏图

Fig. 2 Venn diagrams show unique and well resolved proteins of queens and workers (*Apis mellifera* L.) on day 3, day 5 and day 11

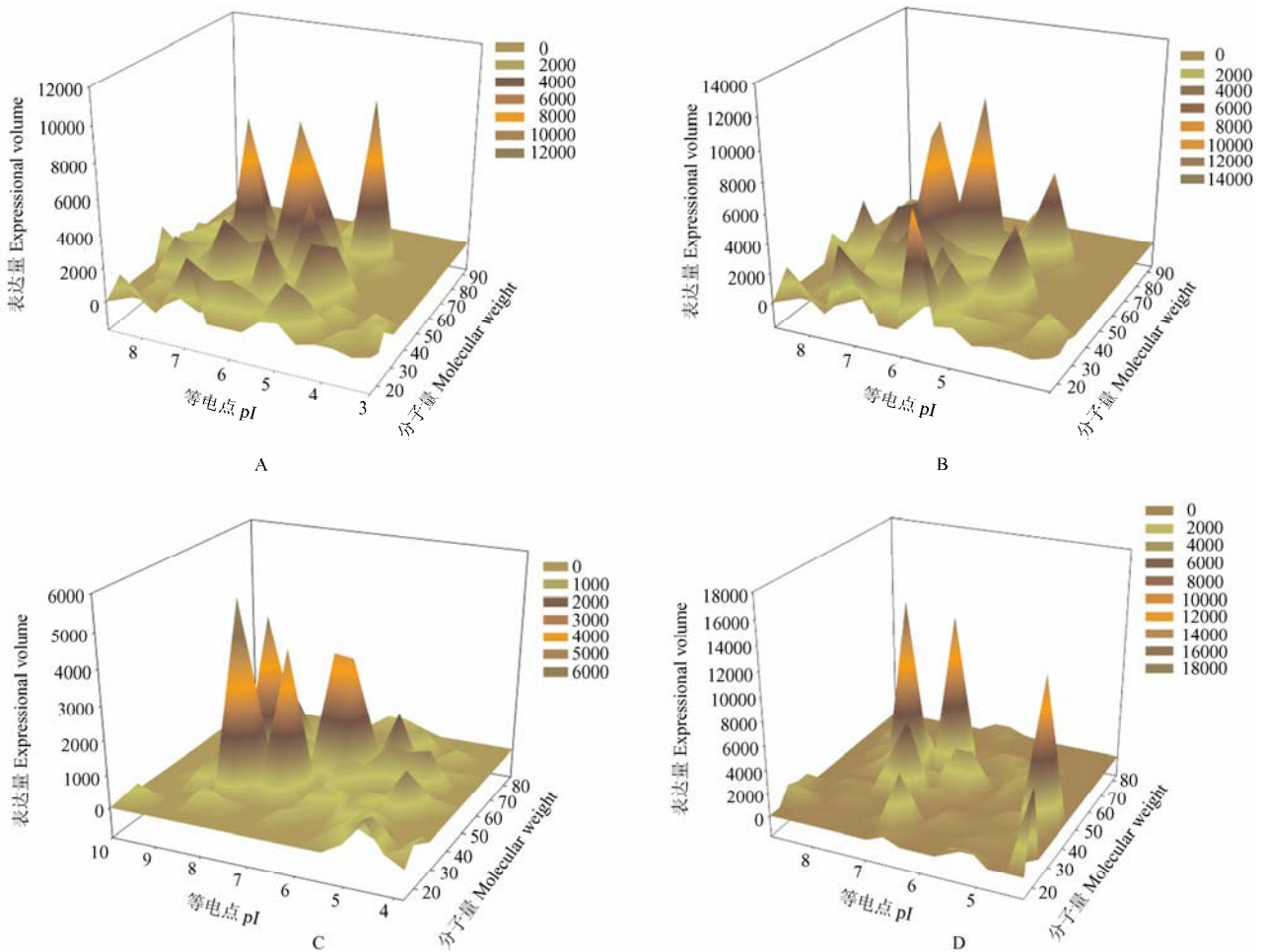


图 3 蜂王与工蜂幼虫 3 日龄表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 3 Three dimensional views on protein expression between queens and workers (*Apis mellifera* L.) on day 3

质点蜂王的表达量显著高于工蜂, 34 个蛋白质点工蜂的表达量显著高于蜂王 ($P < 0.05$)。蜂王特异表达的蛋白质数为 132 个, 主要分布在分子量 14.4—85.81 kD 和等电点 3.82—10 范围内, 这些点表达量为 28.3—5 299.6 ppm (图 3-C); 而工蜂 3 日龄所表达的 103 个特异蛋白质分子量为 14.71—83.12 kD, 等电点为 4.2—8.84, 表达量在 72.33—15 290.23 ppm 范围内(图 3-D)。

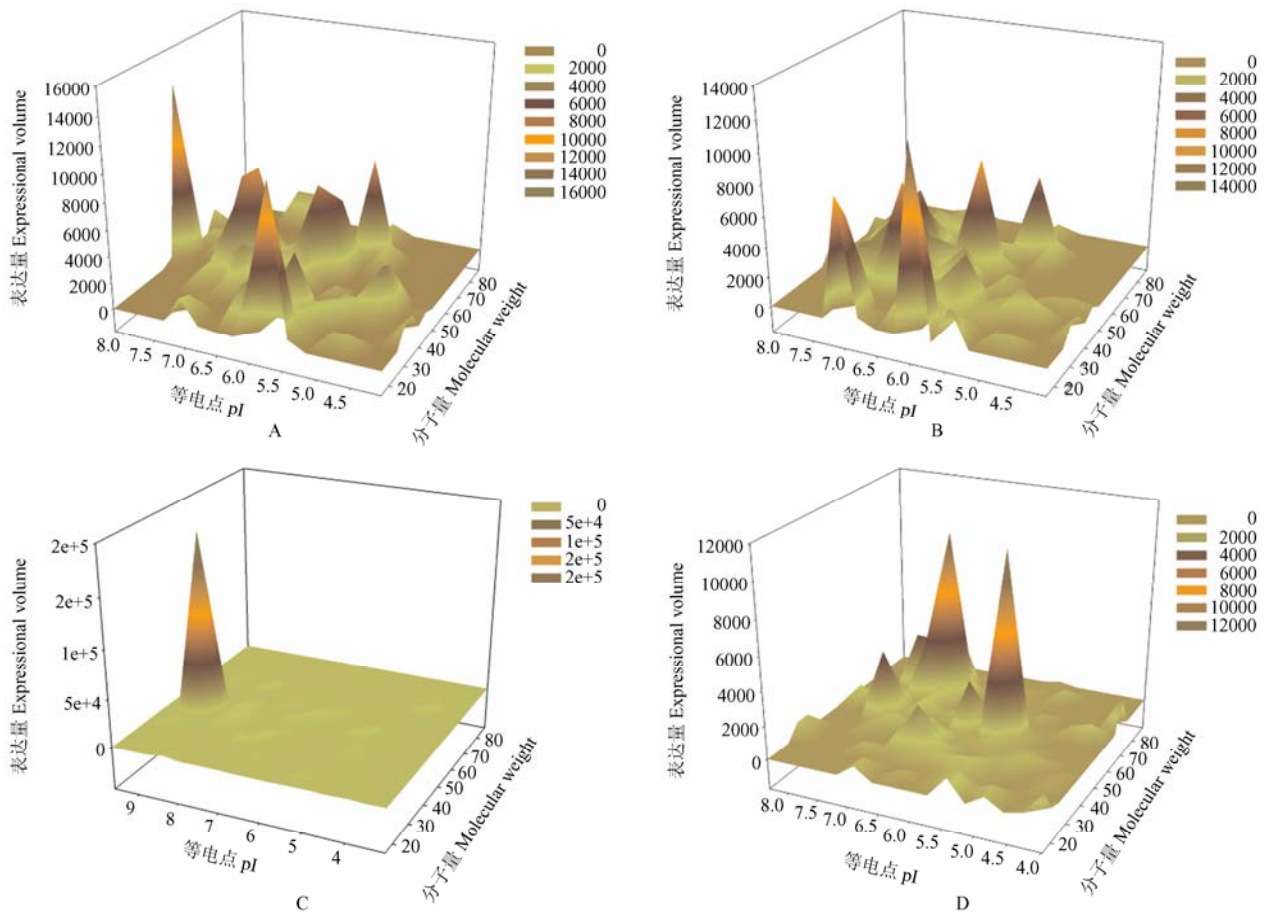
2.3 蜂王与工蜂 5 日龄幼虫蛋白质组比较

在幼虫期 5 日龄时, 2 种级型幼虫共有蛋白质点数为 95 个 (分子量为 15.32—88.12 kD, 等电点为 4.72—8.1), 蜂王的 15 个蛋白质表达量显著大于工蜂, 工蜂的 26 个蛋白质表达量显著大于蜂王 ($P < 0.05$, 图 4-A, 图 4-B)。蜂王在 5 日龄表达 179 个

特异蛋白质, 分子量为 15.77—86.85 kD, 等电点为 pH 3.1—9.64, 表达量为 44.3—5 975.1 ppm (图 4-C)。工蜂在 5 日龄所表达的 141 个特异蛋白质分子量为 15.08—89.15 kD, 等电点为 3.98—8.33, 表达量在 55.6—8 029.2 ppm 范围内 (图 4-D)。

2.4 11 日龄蜂王与工蜂蛹头部蛋白质比较

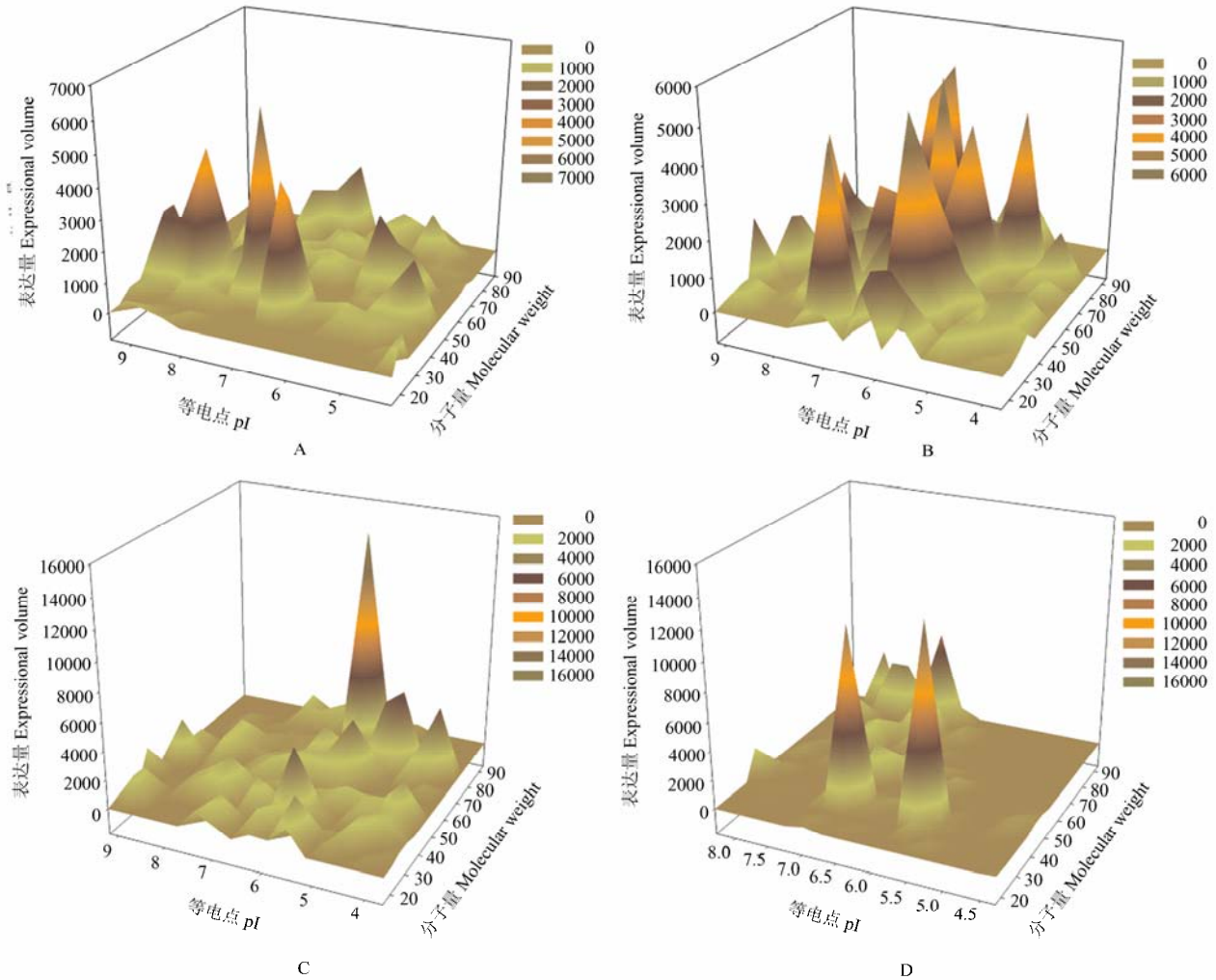
在 11 日龄蜂王和工蜂的头部检测到 194 个共有蛋白质点, 这些蛋白质分子量集中在 15.26—93.94 kD, 等电点分布在 4.72—9.19, 其中, 蜂王的 45 个蛋白质表达量显著高于工蜂, 而工蜂的 35 个蛋白质表达量显著高于蜂王 ($P < 0.05$, 图 5-A, 图 5-B)。从 11 日龄蜂王的头部检测到 117 个特异蛋白质, 其分子量为 14.5—90.1 kD, 等电点为 4.11—9.43, 表达量为 150.4—6 035.7 ppm (图 5-C)。从 11 日龄工蜂头部检



A 和 B 分别代表蜂王和工蜂 5 日龄共有蛋白质三维图谱, C 和 D 代表蜂王和工蜂 5 日龄特异蛋白质三维图谱。三坐标轴分别代表等电点、分子量和蛋白质表达量
 A and B represent the proteins expression both in queens and workers on day 5, C and D represent the unique proteins expressed in queens and worker on day 5, respectively. Three axes refer to pI, molecular weight (Mr) and protein abundance, respectively

图 4 蜂王与工蜂幼虫 5 日龄表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 4 Three dimensional views on protein expression between queens and workers (*Apis mellifera* L.) on day 5



A 和 B 分别代表蜂王和工蜂头部 11 日龄共有蛋白质三维图谱, C 和 D 代表蜂王和工蜂头部 11 日龄特异蛋白质三维图谱。三坐标轴分别代表等电点、分子量和蛋白质表达量

A and B represent the proteins expression both in head of queens and workers on day 11, C and D represent the unique proteins expressed in head of queens and workers on day 11, respectively. Three axes refer to pI, molecular weight (Mr) and protein abundance, respectively

图 5 蜂王与工蜂蛹 11 日龄表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 5 Three dimensional views on protein expression in head of queens and workers (*Apis mellifera* L.) on day 11

测到 84 个特异蛋白质, 其分子量为 16.61—93.48 kD, 等电点为 4.3—8.29, 表达量为 54.2—1 1334.7 ppm (图 5-D)。

2.5 蜂王与工蜂日龄间比较

有 113 个蛋白质在蜂王 3 日龄和 5 日龄都有表达, 这些蛋白质的分子量范围为 15.77—79.04 kD, 等电点范围为 3.92—8.81, 占蜂王 5 日龄所表达总蛋白质的 41.2%。3 日龄和 5 日龄的工蜂有 83 个共有蛋白质, 说明 5 日龄工蜂所表达的蛋白质中有 35.2% 来自 3 日龄, 这些蛋白质的分子量范围为 15.61—76.34 kD, 等

电点范围为 4.01—7.77。

3 讨论

本研究旨在探讨蜂王和工蜂在级型分化不同阶段蛋白质组表达的特点。在 3 个日龄中蜂王表达的蛋白质数量和特有蛋白质数均显著大于工蜂, 表明蜂王在级型分化期的基因表达更为活跃, 机体代谢更加旺盛。这与幼虫期蜂王的呼吸率始终高于工蜂相符^[20]。但是前人研究发现在级型蜂发育过程中, 工蜂比蜂王上调表达较多基因, 这可能是由于从基因到蛋白质表达要

经过转录调节,翻译后修饰,因此,基因与蛋白质的表达趋势不是完全对应的。尽管蜂王和工蜂具有相同的基因型,但在级型分化过程中各自的基因表达存在一定差异^[21],工蜂比蜂王上调较多发育基因,这些基因主要参与花粉囊、腊腺、腿等特定器官的形成^[13]。同时,也发现在3日龄和5日龄2种级型蜂的共有蛋白质中工蜂表达上调的蛋白质数目明显高于蜂王,因此推断这些上调表达的蛋白质是与工蜂特定器官发育相关,是为哺育、清洁、采集、抵御等复杂的社会行为做准备。

蜂王和工蜂在3日龄所表达蛋白质数目都较5日龄时多,工蜂尤为明显,说明此阶段幼虫生长发育速度较快,这与已报道的工蜂幼虫在48—96 h时发育速度最快相一致^[22]。3日龄时蜂王和工蜂共有蛋白质各自表达蛋白质的一半以上,可能是由于此时的幼虫都具有双向发育能力。但共有蛋白质在2种级型间的表达量有较大的差异,这可能与它们的代谢通路有关,在分子水平蜂王会过量表达氧化还原酶基因,而工蜂在水解酶基因的表达上是过量的^[23-24]。

5日龄时,蜂王表达的蛋白质中有41.2%来自于3日龄,而工蜂仅有35.2%与3日龄表达的蛋白质相同,这说明在级型分化初期,蜂王的基因表达可能更具保守性。这与前人对蜂王和工蜂发育阶段 mRNA 翻译产物的研究相一致^[10],但与2种级型蜂在发育过程工蜂的基因表达更为保守的结果相矛盾^[14],这个矛盾可能是由于蛋白质表达过程中基因的转录、修饰等造成的。蜂王和工蜂幼虫分别在5.5日龄和6日龄时进入蛹期,因而5日龄的蜂王和工蜂幼虫体型较大,脂肪含量较高,生长相对缓慢,血淋巴中的一些血蛋白质、酶以及 RNA 加工相关蛋白质含量都较低,这些生理生化特征与本研究结果5日龄蛋白质数表达较少,代谢相对不活跃相符^[25]。

在11日龄时,蜂王头部表达的蛋白质总数和特有蛋白质的数目都大于工蜂的头部表达的蛋白质数,说明在此阶段蜂王的发育速度高于工蜂,这符合它们在蛹期发育历期的差异(蜂王蛹期7.5日,工蜂蛹期12日),同时蜂王的嗅觉神经小球比工蜂提前4 d形成也证明了这点^[26]。而此时2种级型蜂大量表达的特有蛋白质则说明,在此阶段蜂王和工蜂的头部有一定差异,这主要是由于工蜂从事众多巢内外的活动,因此与学习和记忆力相关的羧体也较蜂王的发达而造成的^[13]。

通过对蜂王和工蜂不同日龄的蛋白质表达谱研究

发现,在2种级型蜂3个日龄中,分别检测到156、95和194个共有蛋白质,这些蛋白质可能是这2种级型蜂发育的必需蛋白质,但在表达模式上存在一定的差异(图3-A,图3-B,图4-A,图4-B,图5-A,图5-B),这表明2种级型蜂的共有蛋白质可以通过表达量的变化来协同调节级型分化。同时基因水平研究发现在级型发育过程中,蜂王和工蜂分别上调不同基因来调节级型发育^[13-16],这说明在3个日龄中蜂王和工蜂表达的特异蛋白质(图3-C,图3-D,图4-C,图4-D,图5-C,图5-D)可能是导致级型间差异的原因,并与繁殖^[27]、能量代谢^[28]、采集^[29]、飞行^[30]等功能相关。由此可见,蜂王和工蜂除管家蛋白质之外,还需要一些特异蛋白质来调控各自的级型分化,但这些特异蛋白质在级型分化中如何发挥作用,还有待进一步研究。

级型分化是蜜蜂研究的热点,国内外大量文献已从营养^[9-11]、激素^[31-33]、基因^[13-16,18]等方面进行深入研究,这些研究为深入了解蜜蜂级型分化奠定了良好基础。而蛋白质组则可以大规模、全方位地从蛋白质水平比较蜜蜂级型分化期蛋白质组的异同,本研究也只是初步对蜂王和工蜂级型分化期蛋白质组对比分析,虽然发现了大量的差异蛋白质,但只是一个定性研究,今后可利用质谱技术和数据库序列查询手段,对蛋白质表达谱中的部分蛋白质进行功能鉴定,这对阐明蜜蜂幼虫发育和解释级型分化的分子机理更有意义。

4 结 论

对蜂王和工蜂级型分化期的蛋白质组分析表明,在级型分化期的各个阶段蜂王与工蜂的蛋白质组表达谱都存在显著差异,蜂王较工蜂表达的蛋白质总数和特有蛋白质数都多,说明蜂王在发育过程中基因表达和代谢更加旺盛。在蜜蜂发育过程中2种级型蜂所表达的共有蛋白质和特有蛋白质共同调节蜜蜂的级型分化,其中共有蛋白质可能是其发育所必须的管家蛋白质,它们在级型间的表达模式存在较大差异;而蜂王和工蜂表达的特异蛋白质则说明在级型发育中不同级型需要不同的蛋白质来调控。但这些特异蛋白质是否与级型发育的功能蛋白质相关,还有待进一步研究。

References

- [1] Allsopp M H, Calis J N M, Boot W J. Differential feeding of

- worker larvae affects caste characters in the Cape honeybee, *Apis mellifera* capensis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2003, 54: 555-561.
- [2] Haydak M H. Larval food and development of castes in the honeybee. *Journal of Economic Entomology*, 1943, 36: 778-792.
- [3] Page Jr R E, Peng C Y S. Aging and development in social insects with emphasis on the honeybee, *Apis mellifera* L.. *Experimental Gerontology*, 2001, 36: 695-711.
- [4] Shuel R W, Dixon S E. The early establishment of dimorphism in the female honey bee, *Apis mellifera* L.. *Insectes Sociaux*, 1960, 7: 265-270.
- [5] Haydak M H. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology*, 1970, 15: 143-156.
- [6] Jay S C. Rearing honeybee brood outside the hive. *Journal of Apicultural Research*, 1964, 3: 51-60.
- [7] Page R E, Scheiner R, Erber J, Amdam G V. The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). *Current Topics in Developmental Biology*, 2006, 74: 253-286.
- [8] Weaver N. Physiology of caste determination. *Annual Review of Entomology*, 1966, 11: 79-102.
- [9] Asencot M, Lensky Y. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochemistry*, 1988, 18: 127-134.
- [10] Severson D W, Williamson J L, Aiken J M. Caste-specific transcription in the female honey bee. *Insect Biochemistry*, 1989, 19: 215-220.
- [11] Oldroyd B P, Beekman M. Effects of selection for honey bee worker reproduction on foraging traits. *Plos Biology*, 2008, 6(3): 463-470.
- [12] Hartfelder K, Rembold H. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 1991, 160(6): 617-620.
- [13] Barchuk A R, Cristino A S, Kucharski R, Costa L F, Simões Z L, Maleszka R. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7: 70-88.
- [14] Evans J E, Wheeler D E. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology*, 2000, 2(1): 10011-10016.
- [15] Corona M, Estrada E, Zurita M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 1999, 202: 929-938.
- [16] 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 USA*, 1999, 96(10): 5575-5580.
- [17] Chan Q W T, Howes C G, Foster L J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006, 5(12): 2252-2262.
- [18] Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 2008, 319: 1827-1830.
- [19] Bradford M 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.
- [20] Shuel R W, Dixon S E. Respiration in developing honeybee larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1968, 7: 11-19.
- [21] Graham J M. *The Hive and the Honey Bee*. Illinois: Dadant & Sons Press, 1992: 73-101.
- [22] Wang D I. Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1965, 4: 3-6.
- [23] Pereboom J J M, Jordan W C, Sumner S, Hammond R L, Bourke A F G. Differential gene expression in queen-worker caste determination in bumble-bees. *Proceedings of the Royal Society*, 2005, 272: 1145-1152.
- [24] Hepperle C, Hartfelder K. Differentially expressed regulatory genes in honeybee caste development. *Naturwissenschaften*, 2001, 88: 113-116.
- [25] Elekonich M M, Jez K, Ross A J, Robison G E. Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49: 359-366.
- [26] Groh C, Rössler W. Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. *Arthropod Structure and Development*, 2008, 37: 459-468.
- [27] Cristino A S, Nunes F M F, Lobo C H, Bitondi M M G, Simões Z L P, Costa L F, Lattorff H M G, Moritz R F A, Evans J D, Hartfelder K. Caste development and reproduction: A genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 703-714.
- [28] 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.
- [29] McKay D J, Estella C, Mann R S. The origins of the *Drosophila* leg

- revealed by the cis-regulatory architecture of the *Distalless* gene. *Development*, 2009, 136(1): 61-71.
- [30] Judice C C, Carazzole M F, Festa F, Sogayar M C, Hartfelder K, Pereira G A G. Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15: 33-44.
- [31] Guidugli K R, Nascimento A M, Amdam G V, Barchuk A R, Omholt S, Simões Z L P, Hartfelder K. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2005, 579(22): 4961-4965.
- [32] Barchuka A R, Bitondi M M G, Simões Z L P. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2002, 2: 1-8.
- [33] Pankiw T, Page R E. Response thresholds to sucrose predict foraging behavior in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2000, 47: 265-267.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)