



庞倩, 沈芳, 殷玲, 等. 移虫日龄对蜂王生长发育的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 93–97.

移虫日龄对蜂王生长发育的影响

庞倩¹, 沈芳², 殷玲³, 吉挺^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 阜阳市畜牧兽医局, 安徽阜阳 23600;

3. 江苏农牧科技职业技术学院, 江苏泰州 225300)

摘要: 移取 1、2、3 日龄工蜂幼虫进行人工育王, 通过 HPLC-MS 的方法, 分别测定 4 日龄蜂王幼虫体内保幼激素 (JHⅢ) 和 9 日龄蛹体内蜕皮激素 (Ecd) 的滴度, 并通过形态学和解剖学的方法对不同移虫日龄培育的处女王的初生重、卵巢重、头重和卵巢管数进行比较分析, 以研究不同移虫日龄对意大利蜂蜂王生长发育的影响。结果显示, 不同移虫日龄所培育的蜂王幼虫 4 日龄 JHⅢ 和 9 日龄 Ecd 浓度均存在显著差异, 且随着移虫日龄的增加, 蜂王幼虫体内 JHⅢ 和 Ecd 含量均显著下降; 不同移虫日龄所培育的处女王其初生重、卵巢重、头重及卵巢管数均存在显著差异, 且随着移虫日龄的增加, 蜂王的初生重、卵巢重和头重显著减轻, 蜂王的卵巢管数显著减小; 蜂王的初生重和卵巢管数成显著正相关关系, 相关系数 $r=0.82$ 。说明移虫日龄越小幼虫获得的生长条件越好, 越有利于蜂王个体尤其是繁殖性状的发育, 人工育王实践中应移取虫龄尽量小的幼虫。

关键词: 蜂王; 移虫日龄; 生长发育

中图分类号: Q965; S892.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-0093-05

Study on the effect of instar of the grafted larvae on the queen growth and development

PANG Qian¹, SHEN Fang², YIN Ling³, JI Ting^{1*}, (1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 22500, Jiangsu Province, China; 2. Fuyang Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Fuyang 23600, Anhui Province, China; 3. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China)

Abstract: The objective of this study is to research the effect of the instars of the grafted larvae on queen growth and development. The HPLC-MS was used to determine the JHⅢ titer of 4 d larvae and the Ecd titer of 9 d larvae, methods of morphology and anatomy were used to measured correlated parameters on queen of different instar of the grafted larvae. Including the birth weight, ovary weight, head weight and ovariole number. The results indicated that there were significant differences among the JHⅢ titer of 4 days larvae and the Ecd titer of 9 d larvae grafted in different instars. And the older the larvae grafted, the more significant differences showed. And birth weight, ovary weight, head weight and ovariole number were significantly reduced with the increase of grafted instar. The ovaries number is significantly and positively correlate with the birth weight ($r=0.82$). All of the results indicated that the earlier the larvae grafted, the earlier the better conditions the larvae get, the better development status of the queen. So, we should choose as early as possible of the worker larvae to foster the queen bee.

Key words: Queen bee; grafting instar of larvae; development

基金项目: 国家自然科学基金 (31502020, 31172272); 现代农业产业技术体系 (CARS-45-SYZ6)

作者简介: 庞倩, 女, 1994 年生, 安徽宿州人, 硕士研究生, E-mail: 18852717155@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: tj@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-02-29; 接受日期 Accepted: 2016-04-19

蜜蜂有 3 种类型分别是工蜂、雄蜂和蜂王, 3 种类型的蜜蜂在生长发育中都需要经过卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段 (白红玲和韩伟, 2013)。一般一个蜂群中头会有一头蜂王, 并且决定着蜂群质量的好坏, 因此研究蜂王的生长发育对生产实践具有指导意义。

在实际的人工育王生产中, 移虫日龄对蜂王的生殖发育影响较大, 移虫时间越晚, 繁殖性能受影响越大, 但是移虫时间越早, 蜂群对王台的接受率就越低, 因此寻找到最佳的移虫时间是蜜蜂育种工作中的关键点和难点, 而移虫日龄对蜂王生殖发育影响的分子机理的解析将为这一难点的突破提供理论依据。而当前关于蜂王发育机理的研究中, 众多研究者关注于 3 日龄前后幼虫差异导致的发育差异及其分子机制 (Weaver, 1957; Woyke, 1971; Hardie *et al.*, 1982), 而关于移取不同虫龄的幼虫育王所引起差异的研究较少。本研究针对养蜂生产实际中移虫日龄对蜂王生殖性能的影响, 移取 1、2、3 日龄工蜂幼虫进行人工育王, 分别测定 4 日龄蜂王幼虫体内 JHⅢ和 9 日龄蛹体内 Ecd 的滴度, 并对不同移虫日龄培育的处女王的初生重、卵巢重、头重和卵巢管数进行比较分析, 以研究蜂王幼虫 3 日龄内的外部环境对意大利蜂蜂王生长发育的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

单雄授精的意大利蜂王。

甲醇、乙腈 (均为色谱纯, 美国 Fisher 公司), JHⅢ、Ecd 标准品 (美国 Sigma 公司)

限王产卵器、昆虫培养箱、精密电子天平、立体解剖显微镜; 离子阱质谱联用仪 (Agilent 1100, 美国安捷伦公司产品); AS3120 超声波清洗机 (奥特赛恩斯仪器有限公司); 高效液相色谱仪 (Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配有二极管阵列 DAD 检测器, 美国安捷伦公司产品)。

1.2 试验方法

1.2.1 蜂王的培育

灭菌后的空巢脾, 放入限王产卵器中, 经工蜂清理 24 h 后, 控制蜂王产卵 6 h, 将空脾转移到继箱中孵育。98 h 后移取巢脾上的幼虫为 1 日龄

幼虫, 122 h 后移取巢脾上的幼虫为 2 日龄, 146 h 后移取巢脾上的幼虫为 3 日龄。培育至蜂王出房的前一天, 全部转移到昆虫培养箱等待蜂王出房。

1.2.2 蜂王幼虫激素的测定

通过 HPLC-MS 的方法, 分别测定 4 日龄蜂王幼虫体内 JHⅢ和 9 日龄蛹体内 Ecd 的滴度。

1.2.3 蜂王出房重、头重及卵巢重的测定

蜂王出房后, 随机选择 35 头处女王用精密电子天平称量其出房重。蜂王称重后解剖蜂王, 分别称量头重和卵巢重。

1.2.4 蜂王卵巢管计数

参考许少玉等 (1984) 的方法进行蜂王卵巢小管的计数。把切段后的卵巢置于干净的载玻片上, 然后滴几滴蒸馏水, 在解剖显微镜下用昆虫针轻轻的将卵巢小管分离并计数。

1.2.5 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件对本实验中的数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 移虫日龄对蜂王幼虫 JHⅢ和 Ecd 滴度的影响

通过 HPLC-MS 的方法测定 4 日龄幼虫体内 JHⅢ浓度和 9 日龄蛹体内 Ecd 浓度, 结果见图 1。如图所示, 随着移虫日龄的增加, 4 日龄幼虫体内 JHⅢ浓度不断降低。1 日移虫的幼虫体内 JHⅢ浓度最高, 且极显著高于 2 日龄移虫幼虫 ($P < 0.01$); 3 日龄移虫的幼虫体内 JHⅢ浓度最低, 且极显著低于 1 日龄和 2 日龄移虫的幼虫 ($P < 0.01$)。9 日龄蛹体内 Ecd 浓度和 4 日龄幼虫体内 JHⅢ浓度变化趋势一样, 随着移虫日龄的增加, 浓度不断降低, 并且不同移虫日龄蛹体内 Ecd 浓度差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 移虫日龄对蜂王初生重和头重的影响

移虫日龄对蜂王出房重和头重的影响见表 1。由结果可知, 随着移虫日龄的增加, 蜂王出房重和头重降低, 各移虫日龄间基本存在显著差异。1 日龄移虫组蜂王出房重和头重都极显著高于 2 日龄和 3 日龄移虫组蜂王 ($P < 0.01$); 2 日龄移虫组蜂王出房重极显著高于 3 日龄移虫组蜂王 ($P < 0.01$), 2 日龄和 3 日龄移虫组蜂王头重差异不显著 ($P > 0.05$)。

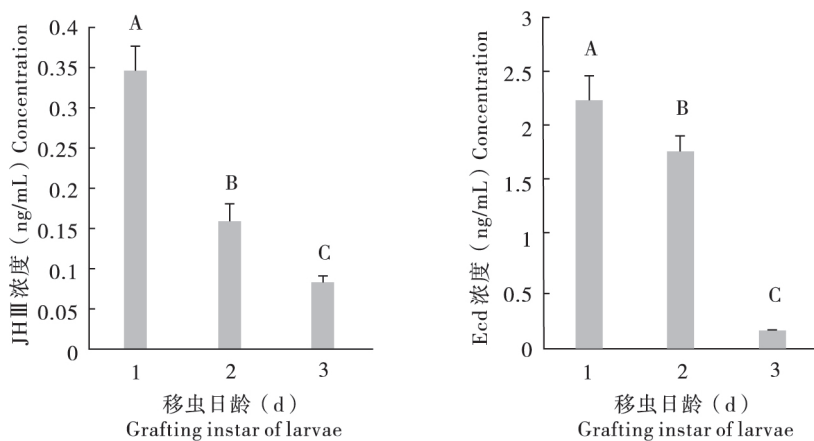


图1 移虫日龄对蜂王幼虫 JHⅢ和 Ecd 浓度的影响

Fig. 1 The effect of the instar of the grafted larvae on the queen larvae JH and Ecd titer

表 1 移虫日龄对蜂王出房重和头重的影响
Table 1 The effect of the instar of the grafted larvae on the queen birth weight and head weight

分组	出房重 (mg)	头重 (mg)
Groups	Birth weight	Head weight
1 日龄组	231.24 ± 0.38 A	13.70 ± 1.15 A
1 instar group		
2 日龄组	219.05 ± 4.56 B	12.66 ± 1.34 Ba
2 instars group		
3 日龄组	190.84 ± 5.82 C	12.26 ± 1.52 Bb
3 instars group		

注: 相同字母代表差异不显著, 不同的小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母代表差异极显著 ($P < 0.01$)。表 2 同。Note: The same letters represent no significant difference. The different small letters represent significant difference ($P < 0.05$). Different capital letters represent extremely significant difference ($P < 0.01$). Same to table 2.

2.3 移虫日龄对蜂王卵巢重和卵巢管数的影响

移虫日龄对蜂王卵巢重和卵巢管数的影响见表 2。结果显示, 随着移虫日龄的增加, 卵巢重量降低, 卵巢管数减少。各日龄蜂王卵巢重和卵巢管数之间存在极显著差异 ($P < 0.01$), 并且, 随着移虫日龄的增加, 卵巢重量和卵巢管数变化趋势相同。

2.4 蜂王卵巢管数和蜂王初生重的关系

蜂王初生重与卵巢管数的相关性研究结果见图 2。从图可知, 蜂王初生重和蜂王卵巢管数呈线性关系: $y = 1.1379x + 19.52$, 相关系数 $r = 0.82$, 表明蜂王初生重和蜂王卵巢管存在显著正相关。因此, 生产中应该选择初生重更高的处女王。

表 2 移虫日龄对蜂王卵巢重和卵巢管数的影响
Table 2 The effect of the instar of the grafted larvae on the queen ovary weight and the number of queen ovarian tubes

分组	卵巢重 (mg)	卵巢管数 (mg)
Groups	Ovary weight	The number of ovarian
1 日龄组	23.51 ± 1.95 A	283 ± 10.29 A
1 instar group		
2 日龄组	21.26 ± 2.10 B	267.18 ± 10.30 B
2 instars group		
3 日龄组	17.63 ± 1.83 C	232.68 ± 11.59 C
3 instars group		

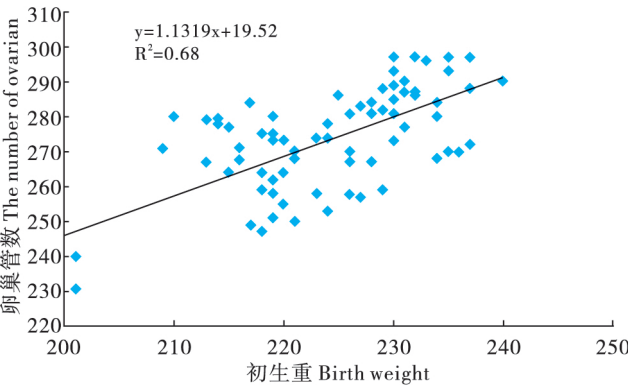


图 2 蜂王初生重和卵巢管数的相关性

Fig. 2 The correlation between queen birth weight and the number of ovarian tube

3 结论与讨论

3.1 移虫日龄对幼虫保幼激素和蜕皮激素的影响

蜂王浆的质和量对蜜蜂的发育以及级型分化起着关键作用, 移虫日龄的不同即主要体现在饲

喂蜂王浆的不同,而蜂王浆的作用则是通过对 JH 的影响达到的 (Riddiford *et al.*, 2010)。JH 有三种同系物,即 JH I、JH II 和 JH III,而在蜜蜂中仅发现了 JH III (嵇保中等, 2007)。在蜜蜂幼虫期,其体内 JH III 发生两次上升过程,而且蜂王幼虫体内 JH III 滴度远高于工蜂幼虫。在幼虫发育到 4 – 5 d 的时候,体内 JH III 滴度会出现一个峰值,该峰值决定了幼虫级型的发育方向 (Jin *et al.*, 2011)。JH III 的主要作用包括保持幼虫的特性、调控昆虫的发育、变态和生殖等过程 (Shelby *et al.*, 2007; Riddiford *et al.*, 2010; Hiruma *et al.*, 2013) 还可以提高脂肪体中卵黄蛋白原基因的转录水平,促使卵黄蛋白原合成速率提高,满足卵巢的需求,与幼虫期卵巢的发育密切相关,JH 的缺乏是导致成虫滞育的主要内因之一 (董飒, 2012)。在蜜蜂幼虫发育过程中大量的蜂王浆能够改变成熟幼虫中 JH III 的浓度,由于浓度的差异,可以激活幼虫体内不同的发育模式,得到充足蜂王浆的蜂王成熟早,生殖器官发育完全,工蜂则因为得到较少的蜂王浆而成熟晚,生殖器官发育不完全,从而使得雌性幼虫发育成完全不同的两种级型——具有繁殖能力的蜂王和没有繁殖能力的工蜂 (彭文君, 2007; 陈璇, 2012; 丁桂玲, 2014)。本实验测定了不同移虫日龄的 4 日龄蜂王幼虫体内的 JH III 滴度,结果显示,不同移虫日龄的幼虫血淋巴 JH III 滴度差异极显著,并且移虫日龄越大,血淋巴 JH III 滴度越低。

在蜜蜂体内,Ecd 和 JH III 相互作用,JH III 可以启动 Ecd 的生物合成,调控 Ecd 的分泌 (Rachinsky *et al.*, 2002; 周娇等, 2013),二者共同调节蜜蜂的发育和变态过程。另外,有研究指出营养条件能够引起成虫体内 Ecd 滴度的变化 (Terashima *et al.*, 2005)。本研究中不同移虫日龄的 9 日龄蜂王蛹,表现出显著不同的 Ecd 浓度,并且,移虫日龄越大,Ecd 滴度越低,分析原因可能是由于 JH III 滴度的不同导致启动 Ecd 合成的能力不同,再加上饲喂王浆的不同从而最终导致移虫日龄越小的幼虫其体内 Ecd 滴度越高,高浓度的 Ecd 可以促进幼虫过渡到蛹期,缩短幼虫期,促进蜂王相对于工蜂更快的发育。而移虫越晚,幼虫体内 Ecd 滴度越低,发育较为迟缓,发育状态越接近工蜂。

对不同移虫日龄蜂王幼虫的 JH III 和 Ecd 测定的结果表明,两种激素滴度呈现出随着移虫日龄

的增加而减少的趋势,并且各组之间差异显著。究其原因,主要是 1 日龄移虫组的幼虫最先被移到王台并获得“王台王浆”的饲喂,3 日龄移虫组幼虫最后被移到王台,结合前人的研究结果,幼虫所处巢房的大小会影响幼虫的发育 (Shi *et al.*, 2011),同时蜂群中的外激素也会影响工蜂巢中幼虫的发育 (黄少康, 2005),并且工蜂蜂房所饲喂的“蜂房王浆”与在蜂王王台所饲喂的“王台王浆”其组分上是否存在差异有待于进一步研究,这些因素共同造成幼虫发育状态的不同,最终导致幼虫体内 JH III 和 Ecd 的显著差异。

3.2 移虫日龄对蜂王形态指标的影响

蜂王初生重是评价蜂王质量的重要指标,大量研究表明蜂王的初生重与其卵巢管数呈线性正相关,幼虫初生重越大,蜂王的卵巢管数越多,繁殖性能越好。本研究中蜂王初生重和卵巢管相关系数为 $r=0.82$,和陈世璧 (1991) 的研究结果一致。

本研究中随着日龄的增加蜂王的初生重、头重和卵巢管数均降低,和前人研究结果一致 (Woyke, 1971),说明移虫的日龄越小,培育的蜂王质量越好。之所以不同移虫日龄蜂王的发育情况存在显著差异,是因为幼虫所获得的食物不同。在王台中的幼虫可以得到哺育蜂更多的照顾,分到充足的王浆,而工蜂房中的幼虫相对于王台中的幼虫处于营养匮乏状态。另外,高浓度的 JH 可以促进蜂王卵巢的发育,有国内的学者通过在蜜蜂蜂王幼虫食物中添加 JH 类似物,显著提高了蜂王的初生重、促进卵巢的发育,这进一步证明蜂王初生重和卵巢管数与幼虫体内 JH 滴度都是彼此成正相关。

蜂王卵巢管数直接决定蜂王的产卵力,是评价蜂王质量的决定性指标 (Gilley *et al.*, 2003; 王静, 2012)。本研究中随着移虫日龄的增加蜂王幼虫 JH III 和 Ecd 滴度降低,蜂王卵巢管数量极显著降低,表明移虫日龄越小,蜂王的质量越高。生产中应该选择日龄尽量小的幼虫来培育高质量的蜂王,以确保蜂群的群势和生产性能。

参考文献 (References)

- Bai HL, Han W. Development and utilization of the bee larva, pupa [J]. *Agricultural Development and Equipments*, 2013, 6: 20.
- [白红玲, 韩伟. 蜜蜂幼虫、蛹的开发与利用 [J]. 农业开发与装备, 2013, 6: 20]
- Chen SB. The quality standards of queens [J]. *Journal of Bee*, 1991,

- 1: 36–42. [陈世璧. 谈蜂王的质量标准 [J]. 蜜蜂杂志, 1991, 1: 36–42]
- Chen X. Genome-wide Identification of MicroRNAs and Their Regulation of Transcriptome on Female Caste Determination of Honey Bee (*Apis mellifera*) [D]. Zhejiang University, 2012: 225. [陈璇. 蜜蜂 (*Apis mellifera*) microRNA 的全基因组挖掘及在雌性蜜蜂级型分化关键时期转录组水平调控作用 [D]. 浙江大学, 2012: 225]
- Ding GL. The juvenile hormone of honey bees [J]. *Apiculture of China*, 2014, 1: 55–56. [丁桂玲. 蜜蜂的保幼激素 [J]. 中国蜂业, 2014, 1: 55–56]
- Dong S. Research status and development of insect hormone [J]. *World Pesticides*, 2012, 34 (3): 32. [董飒. 昆虫激素的研究现状及发展 [J]. 世界农药, 2012, 34 (3): 32]
- Gilley DC, Tarpy DR, Land BB. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies [J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2003, 55: 190–196.
- Hardie J, Lees AD, Kerkut GA, et al. Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology [J]. *Insect Physiol.*, 1982, 16: 167–246.
- Hiruma K, Kaneko. Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2013, 103: 73–100.
- Huang SK. The Bee Physiology [M]. Fujian Agriculture and Forestry University, 2005: 97–101. [黄少康. 蜜蜂生理学 [M]. 福建农林大学蜂学学院, 2005: 97–101]
- Ji BZ, Liu SW, Tian L, et al. Advances in studies on juvenile hormone biosynthesis [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2007, 19 (1): 90–96. [嵇保中, 刘曙雯, 田铃, 等. 保幼激素生物合成研究进展 [J]. 生命科学, 2007, 19 (1): 90–96]
- Jin HZ, Yi TQ, Ya LH. Quantitative determination of juvenile hormone III and 20–hydroxyecdysone in queen larvae and drone pupae of *Apis mellifera* by ultrasonic – assisted extraction and liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography*, 2011: 2533–2541.
- Peng WJ. About the royal jelly [J]. *Apiculture of China*, 2007, 58 (12): 46. [彭文君. 关于蜂王浆 [J]. 中国蜂业, 2007, 58 (12): 46]
- Rachinsky A, Tobe SS, Feldlaufer MF. Terminal steps in JH biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera* L.): Developmental changes in sensitivity to JH precursor and allatotropin [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 30 (89): 729–737.
- Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK, et al. A role for juvenile hormone in the prepupal development of drosophila melanogaster [J]. *Development*, 2010, 137 (7): 1117–1126.
- Shelby JA, Madewell R, Moczek AP. Juvenile hormone mediates sexual dimorphism in horned beetles [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2007, 308 (4): 417–427.
- Shi Y, Huang Z, Zeng J. Diet and cell size both affect queen – worker differentiation through DNA methylation in honey bees [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (4): e18808.
- Terashima J, Takaki K, Sakurai S, et al. Nutritional status affects 20–hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in drosophila melanogaster [J]. *Journal of endocrinology*, 2005, 187 (1): 69–79.
- Wang J. Effect of queen cells accepted on external morphology and quality of queens [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2012, 7: 65–66. [王静. 王台数量对蜂王外部形态和质量的影响研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2012, 7: 65–66]
- Weaver N. Effects of larval age on dimorphic differentiation of the female honeybee [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1957, 50: 283–294.
- Woyke J. Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination [J]. *Journal of Apicultural Research*, 1971, 10: 45–55.
- Zhou J, Li J, Weng Q, et al. The regulation of ecdysteroid on insect growth and productive processes [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (5): 1413–1418. [周娇, 李娟, 翁强, 等. 蜕皮激素对昆虫生长及生殖过程的调控 [J]. 应用昆虫学报, 2013, 50 (5): 1413–1418]