

雌性意大利蜜蜂复眼形态发育及其视蛋白基因的表达^{*}

雷 丽^{**} 王红芳 郝学鹏 胥保华^{***}

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘 要 【目的】复眼作为大多数昆虫最重要的视觉器官, 其小眼数量和体积大小一定程度上反映了昆虫视觉能力的强弱。视蛋白作为视觉感知中的功能性分子, 在光信号转导过程中具有重要作用, 基因的表达受到外源和内源等多种因素的影响。本研究旨在探讨蜂王和工蜂复眼形态发育及视蛋白基因的时间表达模式。【方法】选取 3 群群势相当的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 蜂群进行人工育王, 采集蜂王与工蜂蛹期各日龄蜂蛹及新蜂样品, 采用扫描电镜技术观察蜂王和工蜂复眼的外部形态结构, 利用 Image J 软件测量复眼短长轴、面积、小眼个数、小眼面积和小眼直径; 采用实时定量 PCR 技术检测蜂王和工蜂蛹期紫外光视蛋白基因 (UV-sensitive opsin, *UVop*)、绿光视蛋白基因 (Green opsin, *Lop1*) 和蓝光视蛋白基因 (Blue-sensitive opsin, *Blop*) 3 种视蛋白基因的 mRNA 表达水平。【结果】蜂王和工蜂均是在蛹期末龄 (出房前) 分化出小眼; 出房后, 蜂王和工蜂复眼面积均变小 ($P < 0.001$), 蜂王复眼短轴 ($P < 0.05$)、面积 ($P < 0.001$)、小眼个数 ($P < 0.001$) 均显著小于工蜂, 但蜂王单个小眼面积 ($P < 0.001$)、小眼直径 ($P < 0.001$) 显著大于工蜂。蜂王和工蜂 3 种视蛋白基因的 mRNA 表达水平出房后比出房前显著增加 ($P < 0.05$); 在蜂蛹前期, *UVop* 的 mRNA 表达水平高于 *Lop1* 和 *Blop* 的表达水平, 蜂王视蛋白基因 *UVop* 已经表达工蜂在蛹中后期才表达; 在化蛹中后期 *Lop1* mRNA 表达水平显著增加并超过 *UVop* 和 *Blop* 的表达, 成为表达量最高的视蛋白。【结论】蜂王小眼个数低于工蜂, 推测工蜂视觉能力优于蜂王。蜂王和工蜂视蛋白表达模式存在级型特异性, 主要表现在蛹期 *UVop* 的 mRNA 表达水平上。视蛋白的表达模式与体内视觉细胞的发育存在一定的联系, 研究结果可为进一步探索意大利蜜蜂蜂王与工蜂的复眼发育规律和感光系统的规律提供一定的理论基础。

关键词 意大利蜜蜂; 蜂王; 工蜂; 蛹期; 复眼; 扫描电镜; 视蛋白

Morphological development and opsin gene expression in the compound eye of female *Apis mellifera ligustica*

LEI Li^{**} WANG Hong-Fang CHI Xue-Peng XU Bao-Hua^{***}

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the morphological development of the compound eyes and the temporal expression of opsin genes in queen and worker bees. 【Methods】Three colonies of *Apis mellifera ligustica* with comparable swarming potential were selected for artificial queen breeding, and samples of queen and worker pupae and newly emerged bees were collected on each day of the pupal stage. Scanning electron microscopy was used to observe the external morphological structure of the compound eyes of developing queen and worker bees, and Image J was used to measure the short and long axes of compound eyes, their area, and the number, area and diameter of the ommatidia. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of three opsin genes in queen and worker pupae. mRNA expression levels of UV-sensitive opsin

*资助项目 Supported projects: 泰山产业领军人才高效生态农业创新类项目 (项目编号: LJNY202003); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-44)

**第一作者 First author, E-mail: 14526229212@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: bhxu@sdau.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-10-28; 接受日期 Accepted: 2022-05-27

(*UVop*), green opsin (*Lop1*) and blue-sensitive opsin (*BLoP*), were measured. **[Results]** Ommatidia had differentiated in both queen and worker bees at the end of the pupal period (before emergence). After emergence, the compound eye area of both queen and worker bees became smaller ($P < 0.001$), and the short axis ($P < 0.05$), area ($P < 0.001$), and number of ommatidia ($P < 0.001$) in the compound eyes of queen bees were less than those of worker bees. However, the area ($P < 0.001$) and diameter ($P < 0.001$) of the individual eyes of queen bees were larger than those of worker bees. The mRNA expression levels of the three opsin genes in queen and worker bees increased significantly ($P < 0.05$) after exiting the hive compared to before exiting the hive. In the pre-pupal stage, the mRNA expression level of *UVop* was higher than that of *Lop1* and *BLoP*, and *UVop* was already expressed by worker bees in the middle and late pupal stages. The expression level of *Lop1* mRNA increased significantly in the middle and late stages of pupation, surpassing that of *UVop* and *BLoP* to be the most highly expressed opsin gene. **[Conclusion]** Queen bees have fewer ommatidia than worker bees, suggesting that worker bees have better vision than queen bees. Opsin expression patterns differed in queens and workers, mainly in the mRNA expression level of *UVop* in the pupal stage. The expression of opsin is related to the development of visual cells *in vivo*. These results provide a theoretical basis for further investigation of the development of the compound eye and photosensory system of *Apis mellifera ligustica* queens and workers.

Key words *Apis mellifera ligustica*; queen; worker; pupal stage; compound eye; scanning electron microscopy; opsins

视觉是绝大多数昆虫获得外界信息最直接的感觉之一,而复眼是昆虫最重要的视觉器官(文超等, 2019),在寻觅食物、躲避敌害、寻找配偶、滞育和休眠等行为中具有重要的作用(Zhao *et al.*, 2009; Tamaki *et al.*, 2013; 杨卓霖, 2019)。复眼是由若干个形状大小都相近、彼此相连接的小眼构成,其中每一个小眼都由角膜、晶锥、视杆束、色素细胞和基膜构成,代表着一个高度分化的、独立的视觉单位(冷雪和那杰, 2009)。已有研究表明,复眼体积大小、小眼的个数和相邻小眼间的角度与昆虫的视觉相关,并且因种类、性别及发育阶段的不同存在差异,但这也往往与昆虫的生活习性、栖息环境以及在群体中所发挥的作用息息相关(范凡等, 2008; Everett *et al.*, 2012)。昆虫视觉的形成需要发育良好的视觉器官和内部的功能性分子完美的配合,在光信号传导的过程中,其中的视蛋白是生物内部感知调节光信号过程中的必要成分(Briscoe, 2008)。对于昆虫来说,视蛋白在昆虫中最重要的视觉功能是感光,在复眼的视网膜组织中表达(文超等, 2019)。已有研究表明,调节具有感光功能的视蛋白基因表达能改变视蛋白的光谱特异性,从而影响视觉系统的适应性(Fuller *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 2005; Dyer *et al.*, 2011)。

蜜蜂作为真社会性昆虫,由蜂王、工蜂和雄

蜂三型蜂构成,其中蜂王与工蜂是由相同遗传物质发育而来,但由于发育过程中空间、营养等因素的影响,造成蜂王与工蜂级型分化的产生,两者在体型、生殖能力、视觉能力等方面均具有极大差异。其中蜂王蛹期为 5 d,工蜂蛹期为 8 d,即分别在变态发育为白眼蛹后 5 d 和 8 d 后羽化出房为新蜂(黄少康, 2011)。复眼作为蜜蜂重要的视觉器官,在两者的视觉差异中具有重要作用。其中复眼是由数千只小眼组成,小眼多呈六边形,由角膜、晶体、视杆细胞围成的视杆束和周围的初级、次级色素细胞所构成(黄少康, 2011),每个视杆由 9 个光感细胞包围而成,视杆束上则分布着大量光敏感蛋白即视蛋白,蜜蜂光感细胞中含有 3 种不同的视蛋白基因:对紫外光敏感的 UV 视蛋白基因(UV-sensitive opsin *UVop*)、对绿光敏感的绿光视蛋白基因(*Green opsin*, *Lop1*)和对蓝光敏感的蓝光视蛋白基因(*Blue-sensitive opsin*, *BLoP*)(黄少康, 2011; Lichtenstein *et al.*, 2018)。Lichtenstein 等(2018)比较了意大利蜜蜂工蜂蛹期和雄蜂蛹期中的视蛋白基因表达水平,发现视蛋白基因 *UVop*、*BLoP* 和 *Lop* 在工蜂蛹期和雄蜂蛹期的表达量总体随着发育历期呈上升趋势,但表达模式在工蜂蛹期和雄蜂蛹期中有差异,并表现出与蛹期光感受细胞的发育相关。在其它昆虫上,张晓瑜(2014)对华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* 成虫复眼

外形态进行了扫描电镜观察,发现雌性虫的复眼内部结构无明显差异,但雌性小眼数量略多于雄性成虫,推测雌性成虫的视觉稍优于雄性成虫(张晓瑜,2014);郭鑫等(2019)通过扫描电镜对观察了禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 的全周期型及不全周期型无翅孤雌蚜以及低温短日照诱导条件下的全周期型所产 5 种蚜型成蚜的复眼外部形态,发现低温短日照会诱导管蚜复眼出现显著性差异。然而,蜂王与工蜂复眼之间的表观形态发育差异以及相关视蛋白的表达模式目前还未有研究。因此,为更好的了解蜂王与工蜂复眼的外观形态以及感光细胞的发育过程中相关视蛋白的表达,本研究首先通过体视显微镜和扫描电镜对蜂王与工蜂蛹期和两者出房后新蜂复眼的外观发育形态进行观察,并通过 qRCR 检测蜂王与工蜂复眼中紫外光视蛋白基因 (*UVop*)、绿光视蛋白基因 (*Lop1*) 和蓝光视蛋白基因 (*Blop*) 的 mRNA 表达水平,为分析蜂王和工蜂的级型分化和复眼早期发育过程中视蛋白的调控作用研究提供一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验所用蜜蜂均取自于山东农业大学动物科技学院蜂场。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:戊二醛(扫描电镜专用固定液)、锇酸、无水乙醇(分析纯)、PBS 缓冲液、醋酸异戊脂、Total RNA Kit II 试剂盒购自 OMEGA 公司,Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 Roche 公司,荧光定量试剂盒购自 TransGen 公司。

主要仪器:7500 Real-Time PCR-仪(ABI 7500, USA),真空干燥仪器,E-1045 型离子溅射仪(HITACHI 日本)、S-3400 型扫描电子显微镜(HITACHI 日本)。

1.3 试验方法

选取 3 群群势良好的蜂群,将蜂王限制在一

张空脾上,记录好日期,待蜂王产下足够卵后,做好标记。4 d 后,移取 100 只 1 日龄幼虫于人造塑料王台中,培育蜂王,其余幼虫做好标记,分别取蜂王蛹期 1-5 日龄蛹(标记为 P1-P5)及刚出房新蜂王(标记为 QNE)和工蜂蛹期 1-8 日龄蛹(标记为 p1-p8)及刚出房新工蜂(标记为 WNE)用于试验。

1.3.1 扫描电镜样品制备 采集蜂王与工蜂蛹期各日龄蜂蛹,每日龄各取 4-5 只,将其头部分别放于 10 mL 加有戊二醛固定液的离心管中(组织:戊二醛=1:10),置于 4 °C 冰箱固 24 h 后。用 PBS (pH=7.2, 0.1 mol/L) 缓冲液漂洗固定好的组织样品,漂洗 5 次,每次漂洗 20 min,加锇酸过夜,用 PBS 缓冲液冲洗 5 次,每次 20 min,后分别在 45%、55%和 75%的乙醇中脱水 30、30 和 210 min,此前操作要求试剂均应在 4 °C 冰箱中预冷;再分别置于 85%和 95%乙醇中脱水 30 min,最后置于 100%无水乙醇中过夜处理,之后使用醋酸异戊脂置换出乙醇,共置换 2 h,其中 1 h 后更换醋酸异戊脂;脱水好的样品置于真空干燥仪器中干燥,干燥好的样品选择使用导电胶带粘贴在扫描电镜观察台上,用离子溅射仪喷金后可进行扫描电镜观察并拍照。

1.3.2 总 RNA 提取与实时定量荧光 PCR 将收集到的蜂蛹立即置于干冰中,于体视显微镜下解剖,去除蜜蜂头部的触角以及吻部分,将剩余部分转移至液氮中, - 80 °C 保存,用于进一步试验处理。

用 Total RNA Kit II 试剂盒(OMEGA 公司)提取去除触角和吻部的头部的总 mRNA,并用超微量分光光度计检测 RNA 浓度,使用反转录试剂盒(Accurate biotechnology)反转录为 cDNA, - 20 °C 保存备用。按照荧光定量试剂盒(Ta Ka Ra)操作指南,用 7500 Real-Time PCR 仪(ABI 7500, USA)检测目的基因相对表达量,评估蜜蜂特定视蛋白的 mRNA 表达水平。反应程序:预变性 94 °C, 30 s;变性 94 °C, 5 s;退火 60 °C 34 s, 40 个循环。目的基因引物设计参考序列来自于 NCBI 数据库,以 *Rp 49* 为内参,采用 Primer 5.0 进行引物设计,委托生工生物技术有限公司合成引物,引物序列如表 1 所示。

表 1 基因引物序列
Table 1 Sequences of gene primers

目的基因 Target gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 (bp) Product length (bp)	登录号 GenBank accession no.
<i>UVop</i>	F: TAACTGGAATCGGTGCTGCG R: CCCCATACTCCCATCACAGG	172	NM_001011605.1
<i>Lop1</i>	F: CAAAAAGTCTTCGCACGCCA R: AGCCACATCCGAACAAGGAG	177	NM_001011639.2
<i>BLoP</i>	F: AAGACTCTCGCCGGTAAAGC R: GATGATCGCGAGTCCGATGT	174	NM_001011606
<i>Rp49</i>	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTGAACAATGG	150	XM_006564315.3

1.4 数据分析

蜂王与工蜂复眼扫描电镜用 Image J 软件 (Broken Symmetry Software) 进行处理, 测量其小眼个数与面积以及复眼直径等, 数据采用 SAS 9.2 软件进行统计分析, 多组样本之间的差异显著性采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), Duncan's 分析进行多重比较, 使用 GraphPad_Prism_8.0.2.263 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 蜂王与工蜂蛹期复眼的一般形态

体式显微镜下观察发现蜂王和工蜂复眼外

部形态相似, 近似半椭球形, 位于头部两侧, 复眼颜色随日龄由白到黑逐渐加深 (图 1: A)。扫描电镜观察发现, 蜂王复眼表面凹凸不平, 而工蜂表面相对较光滑; 蜂王和工蜂均在各自蛹期最后日龄, 即蜂王在第 5 天, 工蜂在第 8 天分化出彼此嵌合的六角形小眼, 并且小眼之间出现感觉毛 (图 2: B, C)。

在未分化出小眼前, 蜂王和工蜂的长轴直径、短轴直径以及单只复眼面积均未出现太大变化, 但在小眼分化出现后均显著降低 ($P<0.01$) (表 2)。与蜂王 4 日龄蛹相比, 蜂王 5 日龄复眼长轴直径变为 (2.08 ± 0.01) mm, 短轴直径为 (0.82 ± 0.01) mm, 面积为 (1.36 ± 0.01) mm²,

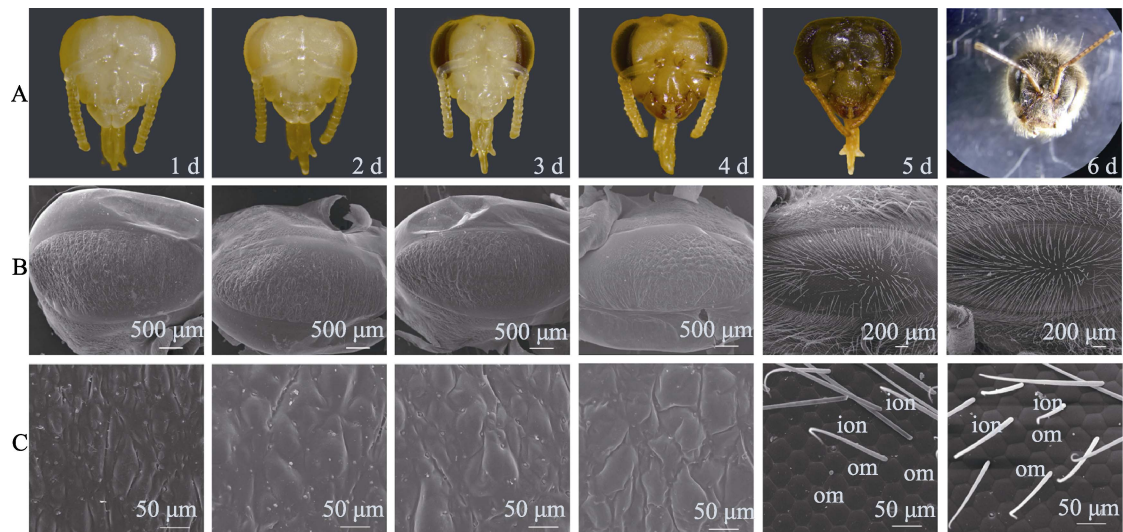


图 1 蜂王蛹期和新出房蜂王复眼外部形态

Fig. 1 Exterior morphology of compound eye in pupal stage and newly emerged queens

A. 体式显微镜下蜂王头部形态; B, C. 扫描电镜下蜂王复眼表面形态。1 d-5 d: 蜂王蛹期; 6 d: 新出房蜂王; om: 小眼; ion: 感觉毛。
A. Queens head morphology under stereomicroscope; B, C. Surface morphology of compound eye of queens under scanning electron microscope. 1 d-5 d: The pupal stage of queen; 6 d: Virgin queen; om: Ommatidium; ion: Interommatidium hair.

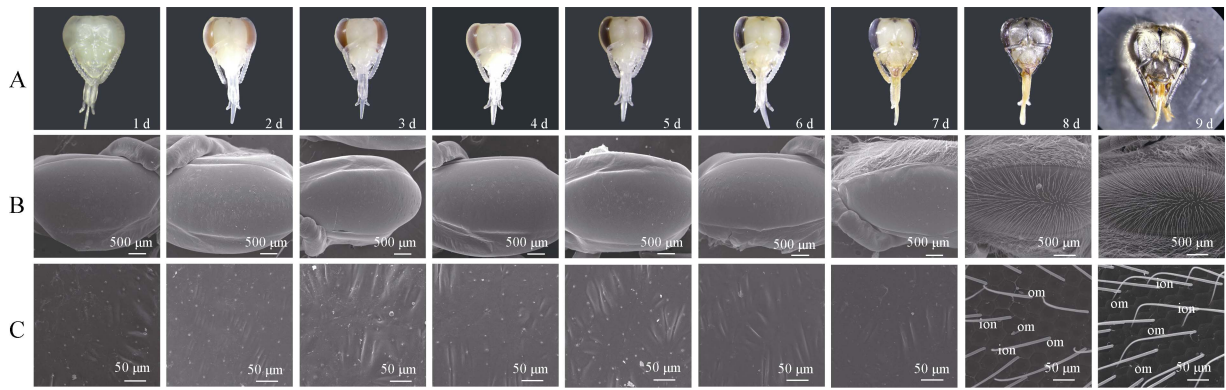


图2 工蜂蛹期和新出房工蜂复眼外部形态

Fig. 2 Exterior morphology of compound eye of worker pupal stage and newly emerged workers

A. 体视显微镜下工蜂头部形态; B, C. 扫描电镜下工蜂复眼表面形态。1 d-8 d: 工蜂蛹期;
9 d: 新出房工蜂; om: 小眼; ion: 感觉毛。

A. Workers head morphology under stereomicroscope; B, C. Surface morphology of compound eye of workers under scanning electron microscope. 1 d-8 d: The pupal stage of workers; 9 d: Newly emerged worker bees; om: Ommatidium; ion: Interommatidium hair.

呈现出减少趋势;工蜂8日龄蛹与7日龄蛹相比,工蜂复眼长轴直径变为 (2.34 ± 0.022) mm,短轴直径变为 (0.96 ± 0.01) mm,复眼面积为 (1.81 ± 0.04) mm²,与蜂王有相同的变化模式(表2)。出房后,蜂王的小眼面积增加,但工蜂的小眼面积减小;工蜂的小眼个数显著高于蜂王;在小眼个数上,蜂王和工蜂小眼个数并因出房而有所变化,蜂王新蜂小眼个数在3 700-3 800个,工蜂新蜂为5 400个左右,且小眼出现后工蜂一直显著高于蜂王;蜂王的小眼面积和小眼直径在出房后有显著增加,工蜂却与之相反(表2)。

2.2 蜂王和工蜂蛹期视蛋白表达

为进一步了解蜂王和工蜂视蛋白基因的时间表达模式,本研究对蜂王和工蜂蛹期和新蜂复眼中的紫外光视蛋白基因(*UVop*)、绿光视蛋白基因(*Lop1*)和蓝光视蛋白基因(*Blop*)的相对表达量进行分析,结果表明蜂王在蛹期一日龄时*UVop*已有表达,*Lop1*和*Blop*基因的表达量较低,但3种视蛋白表达量均随着日龄的增加表现出升高的模式,并且在出房后表达量更是成倍增加,尤其是*Lop1*的表达量增加最为显著(图3: A-C)。对蜂王同一日龄3种基因的表达量对比发现,在蛹期前期1-3 d时*UVop*的表达量高于*Lop1*和*Blop*,但从蛹期第4日龄开始,*Lop1*

的表达量显著升高超过*UVop*和*Blop*,且在蛹期最后日龄5 d时达到最高(图3: D)。

工蜂与蜂王相比,发现两者具有相似的视蛋白表达模式。3种视蛋白基因的mRNA表达水平平均随日龄的增加而显著上升,并且在出房后表达量极显著增加。在蛹期前期1-3 d *UVop*的表达量高于*Lop1*和*Blop*,在蛹期第4日龄时出现变化,*Lop1*的表达水平上升高于*UVop*和*Blop*,其表达水平也在蛹期最后日龄8 d达到最高,但与蜂王不同的是工蜂3种视蛋白的mRNA表达水平是在蛹期第5日龄开始出现上升趋势,而蜂王在蛹期第4日龄就已经出现上升趋势(图4: A-D)。

3 讨论

昆虫复眼及其结构的研究是研究其生理和行为反应的基础,在昆虫定位植物寄主等过程中,昆虫的视觉信号比化学信号更为重要,或者协同嗅觉共同发挥作用。例如日行性昆虫小豆长喙天蛾 *Macroglossum stellatarum* Linnaeus 通过视觉分辨出不同颜色和形状的花,偏爱访问蓝色的花(Balkenius and Kelber, 2006)。复眼是蜜蜂最重要的视觉器官,可分辨自然界中光强度、波长、颜色和图案等,在觅食、群集、觅偶、归巢和避敌等行为中起着重要作用(Zhao et al.,

表 2 蜂王与工蜂复眼的外部结构比较
Table 2 Comparison of external structure of compound eye between queens and workers

时期 (d) Period (d)	长轴直径 (mm) Long axis diameter (mm)		短轴直径 (mm) Short axis diameter (mm)		复眼面积 (mm ²) Area of compound eyes (mm ²)		小眼个数 (个) Amount of ommatidium (pcs)		小眼面积 (μm ²) Area of ommatidium (μm ²)		小眼直径 (μm) Diameter of ommatidium (μm)	
	蜂王 Queen	工蜂 Worker	蜂王 Queen	工蜂 Worker	蜂王 Queen	工蜂 Worker	蜂王 Queen	工蜂 Worker	蜂王 Queen	工蜂 Worker	蜂王 Queen	工蜂 Worker
1	2.46±0.07a	2.54±0.01c	1.19±0.04a	1.30±0.01c	2.43±0.09a	2.79±0.01b	-	-	-	-	-	-
2	2.46±0.08a	2.30±0.03d	1.18±0.04a	1.40±0.01a	2.36±0.15a	2.68±0.03c	-	-	-	-	-	-
3	2.48±0.07a	2.61±0.01bc	1.19±0.02a	1.34±0.02b	2.35±0.04a	2.81±0.02b	-	-	-	-	-	-
4	2.50±0.02a	2.82±0.01a	1.09±0.01b	1.34±0.01b	2.20±0.05a	3.04±0.00a	-	-	-	-	-	-
5	2.08±0.01b	2.83±0.02a	0.82±0.01c	1.34±0.01b	1.36±0.01b	2.99±0.01a	3 780±71.00a	-	450.08±3.68b	-	25.2±0.22b	-
6	2.15±0.03b	2.71±0.03ab	0.77±0.04c	1.28±0.01c	1.35±0.09b	2.81±0.04b	3 881.75±117.35 ^a	-	497.02±3.87a	-	26.94±0.23a	-
7	-	2.66±0.10b ^c	-	1.28±0.01c	-	2.74±0.08bc	-	-	-	-	-	-
8	-	2.34±0.02d	-	0.96±0.01d	-	1.81±0.04d	-	5 462.67±163.97a	-	486.41±4.96a	-	25.64±0.24a
9	-	2.22±0.04d	-	0.94±0.01d	-	1.70±0.04e	-	5 444.67±155.04a	-	465.76±3.21b	-	25.12±0.16a

表中数据为平均值±标准差, 同列数据后标有不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$, 采用单因素方差分析)。1 d-5 d: 蜂王蛹期; 6 d: 新出房蜂王; 1 d-8 d: 工蜂蛹期; 9 d: 新出房工蜂。

Data in the table are mean ± SD, and followed by different small letters in the same column indicate significant differences by one-way ANOVA ($P < 0.05$). 1 d-5 d: The pupal stage of queen; 6 d: Virgin queen; 1 d-8 d: The pupal stage of worker; 9 d: Newly emerged worker bees.

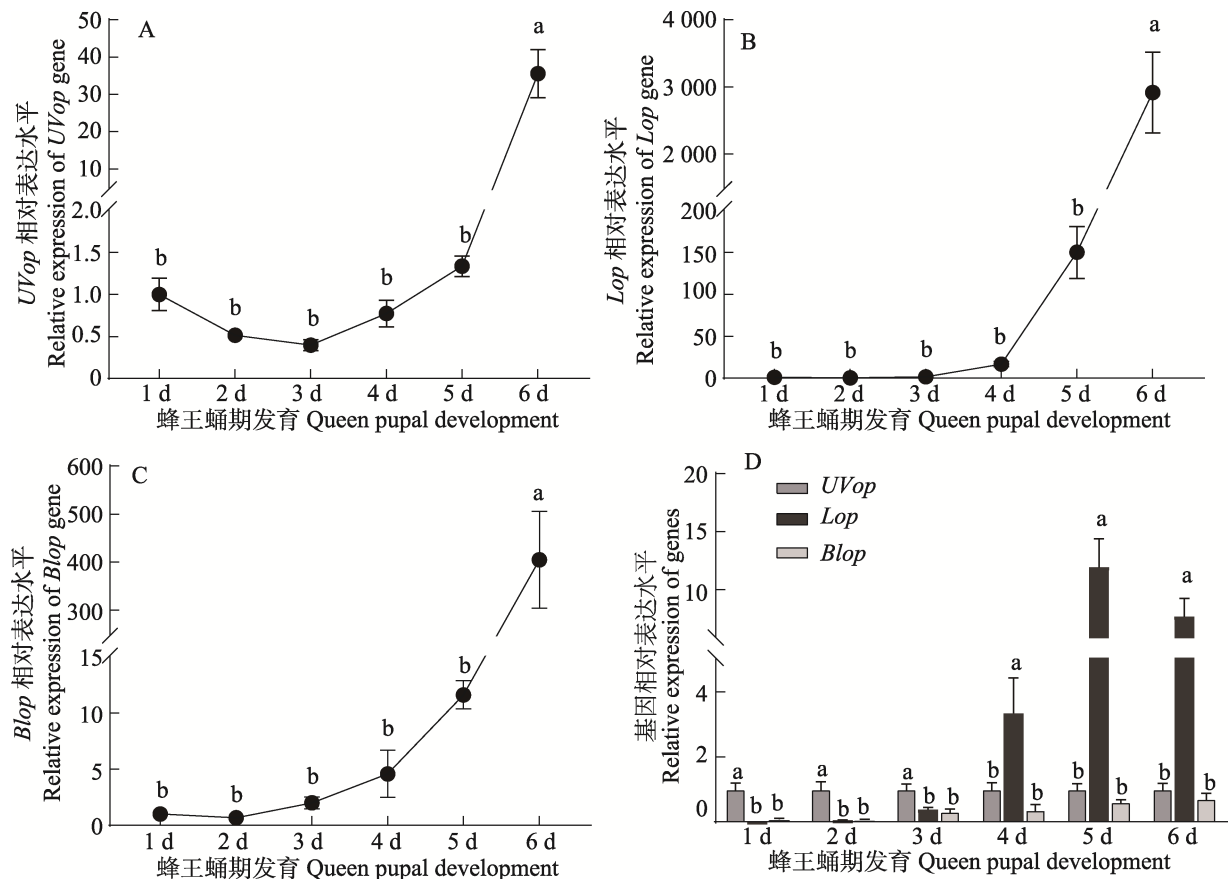


图3 蜂王发育过程中和刚出房新蜂视蛋白的表达

Fig. 3 Opsin expression during pupae and adolescent development of queens

A, B, C. 蜂王蛹期视蛋白表达; D. 各日龄中蜂王 3 种视蛋白表达比例。

1 d-5 d: 蜂王蛹期; 6 d: 新出房蜂王; UVop: 紫外光视蛋白基因;

Lop: 绿光视蛋白基因; Blop: 蓝光视蛋白基因。数据以 Mean $\pm$ SEM 的形式表示 ($n=5$)。

根据 SAS 9.1 软件, 折线和柱状图上方不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著。下图同。

A, B, C. Opsin expression during pupal of queens; D. Expression ratio of three opsins in queens at different ages.

1 d-5 d: The pupal stage of queen; 6 d: Virgin queen; UVop: Gene of ultraviolet opsin; Lop: Gene of green opsin;

Blop: Gene of blue opsin. Data are presented as Mean $\pm$ SEM ($n=5$). According to SAS software 9.1,

the different letters above the broken lines and bars indicate significant differences ($P < 0.05$),

while the same letters indicate no significant difference. The same below.

2009; 杨卓霖, 2019)。蜜蜂蜂王和工蜂同为雌性蜜蜂, 具有相同的遗传背景, 因幼虫期营养、空间和环境等因素的影响, 幼虫向蜂王和工蜂两种不同级型发育。在本研究中, 通过扫描电镜对意大利蜜蜂蜂王与工蜂整个蛹期复眼进行观察发现, 蜂王复眼发育较工蜂更快, 在变态发育变成白眼蛹后, 蜂王复眼表面就有一些凹凸不平的峰出现, 而工蜂的复眼表面相对较为光滑, 但是其小凸起到底有什么作用还有待进一步研究。蜂王在蛹期第 5 天已分化出排列紧密的六边形小

眼, 并且在相邻小眼之间有感觉毛的出现, 工蜂则是在蛹期第 8 天才分化出小眼, 比蜂王晚了 3 d, 这与蜂王和工蜂的蛹期发育时间差异是相符合的。

对蜂王和工蜂复眼长短轴直径、复眼面积、小眼个数、小眼直径和小眼面积比较发现, 蜂王复眼长短轴直径、复眼面积和小眼个数均小于工蜂, 但是蜂王的小眼直径和小眼面积大于工蜂 (表 1)。有研究表明, 复眼体积越大, 小眼的数目越多, 相邻小眼间的角度越小, 其分辨率就

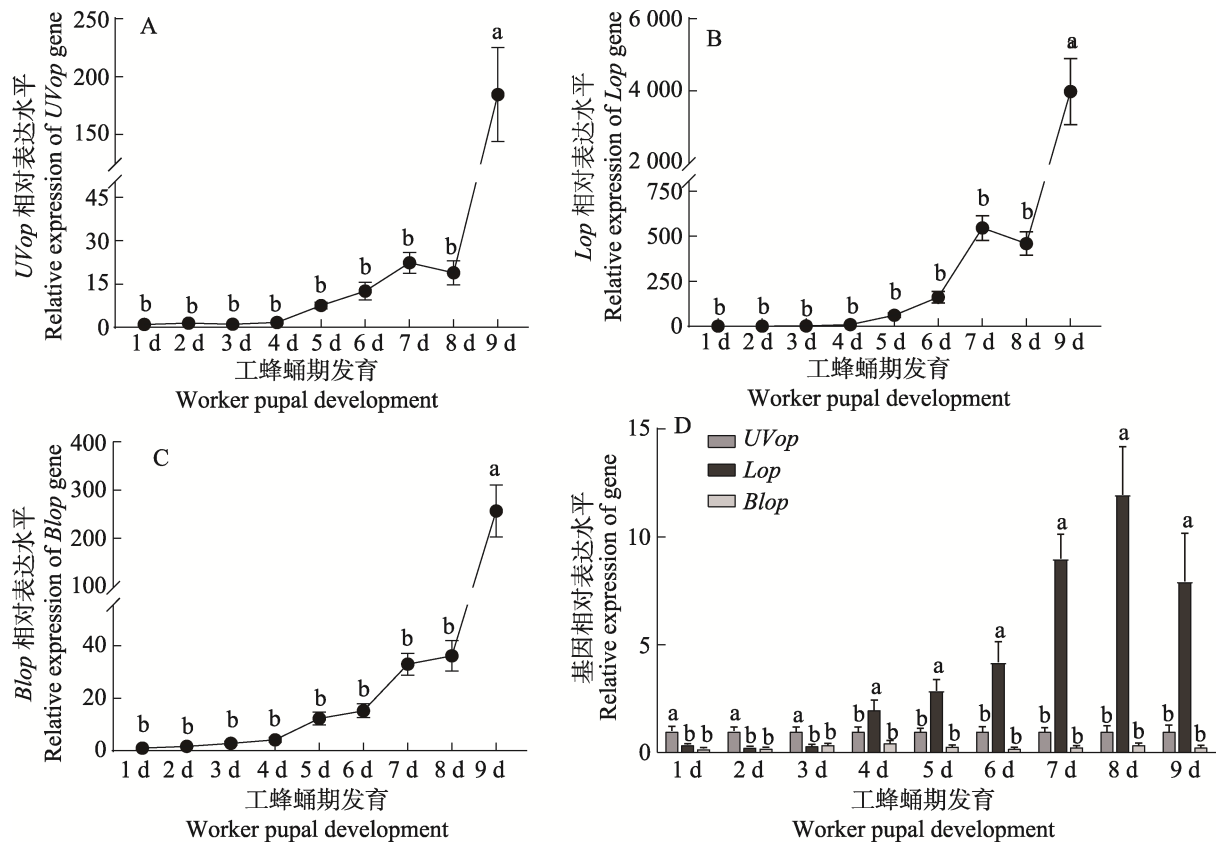


图 4 工蜂蛹发育过程中和刚出房新蜂视蛋白的表达

Fig. 4 Opsin expression during pupae and adolescent development of workers

A, B, C. 工蜂蛹期和新蜂视蛋白表达; D. 各日龄中工蜂 3 种视蛋白表达比例。

1 d-8 d: 工蜂蛹期; 9 d: 新出房工蜂; UVop: 紫外光视蛋白基因;

Lop: 绿光视蛋白基因; Blop: 蓝光视蛋白基因。

A, B, C. Opsin expression during pupal of workers; D. Expression ratio of three opsins in workers at different ages.

1 d-8 d: The pupal stage of worker; 9 d: Newly emerged worker bees; UVop: Gene of ultraviolet opsin;

Lop: Gene of green opsin; Blop: Gene of blue opsin.

越高即视觉能力越强 (Warrant *et al.*, 2004)。有研究表明, 眼睛的大小可作为适应生态和行为的重要条件, 例如鹰和蜻蜓的大眼睛可提供高的空间分辨率, 更便于寻觅食物; 夜间行动的蜜蜂、猫头鹰和深海鱼具有高度灵敏的大眼睛, 有利于觅食生存 (Fong *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2005; Balkenius and Kelber, 2006; Burton, 2008); 而眼睛大小与生物的生活习性也是相互适应的, 当生物对视力的需求减少时, 眼睛会缩小, 例如生活在洞穴的鱼类、小龙虾、蟋蟀和地下裸鼹鼠, 眼睛均相对较小 (Tan *et al.*, 2005)。昆虫复眼的视觉能力的强弱受复眼大小及空间位置等诸多因素影响, 而小眼数量是其中主要影响因素之

一。本研究的结果表明工蜂视觉能力大于蜂王, 这也与两者的生活习性相符。在蜂群中, 工蜂参与外出觅食、采集和归巢等活动, 在觅食飞行期间需要检测和识别花朵并且定位自己, 这需要强大的视觉。而蜂王大部分时间在蜂巢内度过, 对视觉系统有很高需求只有少数场合 (交配飞行、成群结队、潜逃和迁徙), 故蜂王的视力起次要作用。视觉的维持需要消耗生物大量能量, 在蜂群中, 蜂王需要将更多的能量和物质分配到生殖能力部分。蜂王与工蜂相比, 虽然工蜂复眼整体体积比蜂王大, 但蜂王的小眼面积更大, 猜测这可能与巢内的主要生命活动有关 (白昊东和胡福良, 2019)。

在本研究中,意大利雌性蜜蜂发育过程中 3 种视蛋白基因 *UVop*、*BLop* 和 *Lop1* 的时间表达模式在不同级型之间具有一定差异,紫外光、蓝光和绿光视蛋白基因在蛹期发育过程中的不同时间表达。蜂王的紫外光视蛋白基因 (*UVop*) 在蛹期第 1 天时就已表达,整个蛹期呈现出先降低后上升的表达模式,绿光视蛋白基因 (*Lop1*) 和蓝光视蛋白基因 (*BLop*) 的在蛹期第 1 天时表达量较低,从蛹期第 4 天时 mRNA 表达水平上升,但 3 种视蛋白基因均在出房后表达量极显著的上升,尤其是 *Lop1* 的表达量最为显著 (图 3: A-C)。研究表明蜜蜂眼中所呈现的图像与哺乳动物不同,蜜蜂眼中仅仅呈现黄、绿和蓝 3 种颜色,其分辨的图像特征也特别简单,比如图像是否对称、空心与实心等,但蜜蜂可以通过整合这些信息,形成独特的“蜜蜂”画面 (Warrant *et al.*, 2004)。蜂王和工蜂 *UVop*、*Lop1* 和 *BLop* 3 种视蛋白基因在蛹期相同日龄间表达模式相似,均在蛹期第 5 日龄随日龄增加逐渐上升,显示出在蛹期第 5 日龄时蜜蜂对 3 种颜色的敏感性提升,尤其是对绿光敏感性。两者视蛋白表达模式的差异主要表现在 *UVop* 的 mRNA 表达水平上 (图 4: A-C), *Lop1* 和 *BLop* 视蛋白 mRNA 表达水平在蛹期发育过程中具有相似的表达模式。已有研究表明,3 种视蛋白的表达水平与小眼视杆的发育程度以及 3 种光感受细胞的数量成正比关系 (Lichtenstein *et al.*, 2018),但蜜蜂蛹期发育均在黑暗中,说明视蛋白的表达模式对光不具有依赖性。此外,本研究发现,蜂王和工蜂复眼 *Lop1* 的表达量均是在出房前一天最高,此时恰好是小眼分化的时间,*Lop1* 的表达是否参与小眼分化的调控还有待进一步研究。

本研究从形态学角度和分子水平上对意大利雌性蜜蜂复眼的外部结构特征以及 3 种视蛋白基因的时间表达模式进行了研究,对进一步研究意大利蜜蜂蜂王与工蜂复眼的发育规律及其感光系统的内在机制具有重要的意义。

参考文献 (References)

Bai HD, Hu FL, 2019. Image recognition and memory in honeybees.

- Journal of Bee*, 39(10): 22–24. [白昊东, 胡福良, 2019. 蜜蜂的图像识别与记忆. 蜜蜂杂志, 39(10): 22–24.]
- Balkenius A, Kelber A, 2006. Color preferences influences odor learning in the hawkmoth, *Macroglossum stellatarum*. *Naturwissenschaften*, 93(5): 255–258.
- Briscoe DA, 2008. Reconstructing the ancestral butterfly eye: Focus on the opsins. *Journal of Experimental Biology*, 211(11): 1805–1813.
- Burton RF, 2008. The scaling of eye size in adult birds: Relationship to brain, head and body sizes. *Vision Res.*, 48(22): 2345–2351.
- Dyer AG, Paulk AC, Reser DH, 2011. Colour processing in complex environments: Insights from the visual system of bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (1707): 952–959.
- Everett A, Tong X, Briscoe AD, Monteiro A, 2012. Phenotypic plasticity in opsin expression in a butterfly compound eye complements sex role reversal. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1): 232–232.
- Fan F, Liu J, Qu P, Lv LH, Wei GS, 2008. Compound eye morphology of the fire ants. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(4): 642–646. [范凡, 刘杰, 屈平, 吕利华, 魏国树, 2008. 红火蚁复眼的扫描电镜观察. 昆虫知识, 45(4): 642–646.]
- Fong DW, Kane TC, Culver DC, 2003. Vestigialization and loss of nonfunctional characters. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26(1): 249–268.
- Fuller RC, Carleton KL, Fadool JM, Spady TC, Travis J, 2004. Population variation in opsin expression in the bluefin killifish, *Lucania goodei*: A real-time PCR study. *Journal of Comparative Physiology A*, 190(2): 147–154.
- Guo X, Peng X, Yang ZL, Chen MH, 2019. External morphology of the compound eye of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) observed using scanning electron microscopy. *Acta Entomologica Sinica*, 62(11): 1271–1278. [郭鑫, 彭雄, 杨卓霖, 陈茂华, 2019. 禾谷缢管蚜复眼外部形态的扫描电镜观察. 昆虫学报, 62(11): 1271–1278.]
- Huang SK, 2011. Physiology of Honeybee. Beijing: China Agriculture Press. 112–114. [黄少康, 2011. 蜜蜂生理学. 北京: 中国农业出版社. 112–114.]
- Leng X, Na J, 2009. Structure and function of insect compound eyes. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science)*, 27(2): 4. [冷雪, 那杰, 2009. 昆虫复眼的结构和功能. 沈阳师范大学学报 (自然科学版), 27(2): 4.]
- Lichtenstein L, Gröbel K, Spaethe J, 2018. Opsin expression patterns coincide with photoreceptor development during pupal development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.*, 18(1): 1.

- Parry JW, Carleton KL, Spady T, Carboo A, Hunt DM, Bowmaker JK, 2005. Mix and match color vision: Tuning spectral sensitivity by differential opsin gene expression in Lake Malawi cichlids. *Curr. Biol.*, 15(19): 1734–1739.
- Tamaki S, Takemoto S, Uryu O, Kamae Y, Tomioka K, 2013. Opsins are involved in nymphal photoperiodic responses in the cricket *Modiocoryllus siamensis*. *Physiological Entomology*, 38(2): 163–172.
- Tan S, Amos W, Laughlin SB, 2005. Captivity selects for smaller eyes. *Curr. Biol.*, 15(14): 540–542.
- Warrant EJ, Kelber A, Gislén A, Greiner B, Ribi W, Weislo WT, 2004. Nocturnal vision and landmark orientation in a tropical halictid bee. *Curr. Biol.*, 14(15):1309–1318.
- Wen C, Ma T, Wang C, Weng JB, Ji XC, Weng XJ, 2019. Progress in research on the compound eye structure and visual navigation of insect. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(1): 28–36. [文超, 马涛, 王偲, 温俊宝, 季英超, 温秀军, 2019, 昆虫复眼结构及视觉导航研究进展. 应用昆虫学报, 56(1): 28–36.]
- Yang ZL, 2019. The compound eye external structure and molecular cloning, expression analysis of opsin genes in *Rhopalosiphum padi*. Msater dissertation. Yangling: Northwest A&F University 12–13. [杨卓霖, 2019. 禾谷缢管蚜复眼外部形态及视蛋白基因的克隆与表达分析. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- Zhang XY, Ma JN, Chen H, 2014. External morphology and microstructure of compound eyes of adult *Dendroctonus armandi* Tsai et Li (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Northwest A&F University (Nat. Sci. Ed.)*, 43(9): 15–22. [张晓瑜, 马俊宁, 陈辉, 2014. 华山松大小蠹成虫复眼外部形态及内部结构的研究. 西北农林科技大学, 43(9): 15–22.]
- Zhao H, Rossiter SJ, Teeling EC, Li C, Cotton JA, Zhang S, 2009. The evolution of color vision in nocturnal mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(22): 8980–8985.