

红光熊蜂卵黄原蛋白基因的 cDNA 全长 序列克隆和表达分析*

李继莲^{1**} 吴杰¹ 彩万志² 彭文君^{1***}

(1. 农业部授粉昆虫生物学重点实验室 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093;

2. 中国农业大学昆虫系 北京 100193)

摘要 红光熊蜂 *Bombus ignitus* Smith 是许多经济作物和野生植物的重要授粉昆虫之一。卵黄原蛋白基因 (vitellogenin, Vg) 在昆虫的生殖调控和行为方面起到重要的作用, 本试验对 Vg 基因全长 cDNA 的克隆和测序及在蜂王、工蜂和雄性蜂三型蜂中的表达分析得出: Vg 基因的全长 cDNA 为 5 481 bp, GenBank 中的登录号为 FJ913883, 有一个完整的开放阅读框 (ORF), 编码 1 772 个氨基酸, N-末端的前 16 个氨基酸为一个信号肽。接近 C-末端区域存在保守的 GL/ICG 基元, 其后含有 9 个半胱氨酸, 而且 DGXR 位于 GL/ICG 基元上游 18 个氨基酸残基处。其氨基酸序列与韩国的熊蜂 *B. ignitus* 和 *B. hypocrita* 相似性高达 95%, 与西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的相似性达到 51%。Vg 的 mRNA 首先在蜂王蛹期的白眼蛹 (Pw) 时期出现, 其表达量在蜂王整个蛹期发育过程中呈上升趋势, 且在黑眼蛹 (Pbd) 时期达到最高, 在成年蜂的脂肪体中的表达量仍在升高, 甚至更高。Vg 也在工蜂蛹期的白眼蛹 (Pw) 时期被检测到, 然后在整个蛹期发育过程中呈现上升趋势, 在刚羽化出房时达到高峰, Vg 的 mRNA 水平随着成年蜂日龄的增加而增加, 到 15 日龄时达到最高, 然后呈现下降趋势。对于雄性蜂, Vg 的 mRNA 虽然卵黄原蛋白基因的 mRNA 水平几乎在整个蛹期发育阶段都表达, 但是表达水平非常低, 只有在刚羽化出房时期表达水平较高。

关键词 熊蜂, *Bombus ignitus*, 卵黄原蛋白, 荧光定量 RT-PCR

The expression of the mRNA and cloning for the vitellogenin cDNA in the bumblebee, *Bombus ignitus*

LI Ji-Lian^{1**} WU Jie¹ CAI Wan-Zhi² PENG Wen-Jun^{1***}

(1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research,

Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;

2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract *Bombus ignitus* Smith is one of the important pollinators of many economically important crops and wildflowers. vitellogenin (Vg) plays a key role in the control of reproduction and reproductive behavior of this species. In this study, Vg cDNA of *B. ignitus* was cloned and sequenced. It is composed of 5 481 bp and contains an ORF of 1 772 amino acids within a putative signal peptide of 16 residues (GenBank accession number FJ913883). Close to the C-terminus there is a GL/ICG motif followed by nine cysteines, and a DGXR motif is located 18 residues upstream of the GL/ICG motif. BLASTX analysis of the conceptual translation products revealed 95% similarity to *B. ignitus* from Korea and to *B. hypocrita*. The deduced amino acid sequence shows significant similarity with *Apis mellifera* (51%) and a high number of conserved motifs. The mRNA of *B. ignitus* vitellogenin (Vg) was analysed in queens, workers and drones, from pupae to adults. Vg mRNA was found in the white-eyed pupal (Pw) stage in queens and its expression increased during the entire pupal development, reaching a peak in the dark brown pupal (Pbd) stage. It also had a high expression in the adult fat

* 资助项目: 国家自然科学基金 (30972149)、国际科技合作项目 (2009DFA32600)、公益性行业 (农业) 科研专项课题 (201203080-4)、国家蜂产业技术体系建设专项 (CARS-45)。

** E-mail: bumblebeelj@ hotmail. com

*** 通讯作者, E-mail: pengwenjun@ vip. sina. com

收稿日期: 2012-04-16, 接受日期: 2012-06-29

body. In workers, the Vg expression was detected in the white-eyed pupal (Pw) stage, its levels increasing with age and reaching a high point in 15 d, after which it decreased progressively. Vg mRNA was also observed in drones, the highest level of expression being observed in newly emerged adult drones.

Key words bumblebee, *Bombus ignitus*, vitellogenin, quantitative real-time RT-PCR

卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)是特异存在于非哺乳类性成熟的卵生雌性动物血液中的一种蛋白,是几乎所有卵生动物卵黄磷蛋白(vitellin, Vt)的前体。卵黄蛋白为正在发育的胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、维生素、磷和硫等营养和功能性物质。随着研究的深入,人们发现卵黄蛋白不仅为胚胎发生提供营养物质,它在生物体内还具有其他的生物学功能(Hagedorn and Kunkel, 1979; Kunkel *et al.*, 1985; Raikhel and Dhadialla, 1992; Amdam and Omholt, 2003)。昆虫卵黄蛋白的研究是近年来昆虫生理学和生物化学最活跃的领域之一(Hatakeyama *et al.*, 1990; Raikhel *et al.*, 2005; Swevers *et al.*, 2005; Shaul *et al.*, 2006)。

20 世纪 60 年代以来,对昆虫 Vg 的研究不断增加,许多昆虫种类的 Vg 基因序列已被克隆,目前, Vg 研究比较深入的昆虫种类主要在鳞翅目、膜翅目、双翅目、半翅目,其中鳞翅目研究最早(Telfer, 1954),而膜翅目昆虫种类中主要集中于社会性昆虫西方蜜蜂 *Apis mellifera*、植食性的菜叶蜂 *Athalia rosa*、群居性的木工蚁 *Camponotus festinates*、寄生性的蝇蛹和金小蜂 *Nasonia vitripennis*、肉食性的胡蜂 *Encarsia formosa*,膜翅目的这些种类中西方蜜蜂的研究较为全面且深入(Amdam *et al.*, 2003, 2006; Donnell *et al.*, 2004)。

熊蜂不仅具有重要的经济价值,而且也作为一种模式昆虫被国内外研究,如:授粉生物学(Pyke, 1978; Yu and Sutton, 1997; Bingham and Orthner, 1998),学习行为和视觉(Chittka, 1998; Lotto and Chittka, 2005),寄主和寄生物之间生态关系和协同进化(Schmid-Hempel, 2001; Otterstatter *et al.*, 2005),昆虫免疫学(Rees *et al.*, 1997; Schmid-Hempel, 1998)、社会进化和发展可塑性、性别决定机制(Beye *et al.*, 2003; Zayed and Packer, 2005);生理学和行为学(Heinrich, 1979; Vogt *et al.*, 1994)、保护生物学和物种多样性(Biesmeijer *et al.*, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2007)等方面。除此之外,熊蜂在分子水平的研究也越来

越受到重视,如熊蜂 *Bombus terrestris* BAC 文库的构建(Wilfert *et al.*, 2008);EST (cDNA)文库的构建(Kim *et al.*, 2006);不同熊蜂种的抗生物肽、丝氨酸蛋白酶、SOD1 等基因序列和部分序列的克隆与测序的完成(Reber-Funk *et al.*, 2006; Choo *et al.*, 2007),但对于制约熊蜂繁育的分子生物学基础理论知识仍缺乏。

鉴于此,本文以昆虫生理学和分子生物学理论知识为基础,以卵黄原蛋白基因为研究对象,利用分子生物学和生物信息学常用的技术方法对 Vg 基因进行克隆及其在三型蜂中的表达水平进行研究,从而揭示其发育的分子机理,为熊蜂分子遗传学的研究和商品化熊蜂的繁育奠定基础,也为提高熊蜂的繁殖效率提供依据,为熊蜂的大规模应用奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

红光熊蜂蜂群由中国农业科学院蜜蜂研究所昆虫授粉与生态研究室提供,蜂群饲养在暗室中,温度:28~29℃,RH:55%~60%,蜂王、工蜂和雄性蜂蛹期的发育日龄参照 Michelette 和 Soares (1993)、Barchuk 等(2002)及 Dallacqua 等(2007)的方法,按其发育阶段的外部形态特征取样(表 1),每个发育阶段选取 10 只,为了获取不同日龄的蜂王、工蜂、雄性蜂个体,在三型蜂刚出房 1 h

表 1 红光熊蜂蛹期发育阶段的外部形态特征
Table 1 External morphological characters used to stage developing pupae of *Bombus ignitus*

蛹期	复眼颜色	体表色
Pupal stage	Eye coloration	Body cuticle
Pw	白色	无色
Pp	粉红色	无色
Pb	褐色	无色
Pbl	黑色	附肢着色
Pbd	黑色	附肢黑色,胸部和腹部亮色
Pdd	D 黑色	体表全黑色

内,用昆虫标记笔在其胸部背板中央标记,每个日龄选取 10 只。

1.2 卵黄原蛋白基因的 cDNA 扩增

取 4 ~ 6 日龄的蜂王的脂肪体按照 TRIzol reagent (Invitrogen, USA) 说明方法提取总 RNA, 采用昆虫卵黄原蛋白氨基酸保守的 GL/ICG 区域设计简并引物 (Isof-vitellogenin-1: 5'GGI CT (GC) TG (CT) GG 3'; Isof-vitellogenin-2: 5'GGI AT (CT) TG (CT) GG 3', I indicates inosine), 按照反转录试剂盒 (Takara, RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 Japan) 中的 3'RACE 操作说明合成 3'端 cDNA 序列, PCR 反应条件为 94℃ 变性 2 min, 共 35 个循环 (94℃, 30 s; 55℃, 1 min; 72℃ for 1 min), 72℃ 延伸 10 min。采用 GeneRacer kit 156 (Invitrogen, USA) 合成 cDNA 的全长序列, 并涉及引物 (Vg-S: TAC CAC TGA CGG TTT TAT TGC TT, Vg-R: TTG TGC CTT GTC TTC TCC T) 验证 RACE 方法获得的全长 cDNA 序列。

1.3 cDNA 的克隆与测序

采用 Agarose Gel DNA Purification kit Ver. 2.0 (Takara, Dalian, China) 试剂盒回收的目的基因 PCR 产物, 与 pMDTM19-T 载体构建重组质粒。挑选阳性重组克隆菌落进行菌落 PCR 和提取质粒鉴定, 将鉴定的阳性克隆送上海英俊公司测序。

1.4 卵黄原蛋白基因的生物信息学分析

使用 Blastn 检索程序 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 在 GenBank、EMBL、DDBJ、PDB 数据库中进行核苷酸序列同源性序列检索分析, 采用蛋白质翻译工具 (<http://www.expasy.org>) 翻译为氨基酸。用 SwissProt 蛋白质数据库 (<http://www.expasy.org/sprot/>) 分析开放阅读框 (ORF), 用 SignalP3.0 软件和 NetNGlyc 1.0 软件预测其他生物信息学功能, 使用 ClustalW (1.83) 多序列分析软件构建系统发育树, 基因全长序列通过 Bankit 提交程序提交 GenBank。

1.5 不同时期的卵黄原蛋白基因的表达分析

取蜂王 6 个时期蛹 (表 1) 的腹部, 将 1 ~ 7 日龄成蜂的腹部剪下, 去除肠道和蜚针, 留下脂肪体和表皮, 按照 TRIzol reagent (Invitrogen, USA) 提取总 RNA, 采用 M-MuLV (Takara, Dalian, China), 反转录为 cDNA, 然后用 IQ-SYBR-Green

Supermix (BioRad) 进行 real-time PCR。用 Beacon designer 7.5 软件设计内参基因 actin88 引物 (ActinS:5'-CCG CGA CAT TAA GGA GAA AC -3'; ActinR:5'-CCA TAC CCA GGA AGG AAG GT -3') 和目的基因引物 (VgS:5'-TTG AGT TTA CGT CCT CTG CT -3', VgR:5'-CAA CAT TGA ACA AGT CAT CG -3'), 扩增片段为 172 bp。所有试验重复 3 次。数据采用 IQ5 软件行 CT 值相对定量分析, 以 act88 为内参。目的基因表达水平用 $\Delta\Delta Ct$ 法计算: 目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct/\text{target gene} - Ct/\text{actin 88})_{\text{test group}} - (Ct/\text{target gene} - Ct/\text{actin 88})_{\text{control}}$ 。每个日龄样品重复 3 次, 不同日龄之间的相对表达量的显著性差异用软件 SPSS13.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1 红光熊蜂卵黄原蛋白基因的全长 cDNA 克隆

以蜂王腹部组织提取的总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA 第一链, 根据昆虫 Vg 基因所编码的氨基酸序列 C-末端区域存在保守的 GL/ICG 基元合成的简并引物 PCR 扩增 3'端, 在 1 700 bp 左右出现清晰的条带, 克隆测序后得到序列长度为 1 729 bp, 并含有终止子 (TAA) 和位于其下游 101 个核苷酸处出现一个多腺苷酸化加尾信号 (AATAAA), 根据已获得的 3'端序列设计引物, 采用 RACE 方法获得卵黄原蛋白基因的全长 cDNA 序列为 5 481 bp, 并根据所得序列分别在 5'端和 3'端设计上下游引物, 扩增全长 cDNA 序列, 在 6 000 bp 左右出现清晰的条带, 在 GenBank 库中的登录号为 FJ913883。

2.2 基因序列的开放阅读框及编码氨基酸分析

用 SwissProt 蛋白质数据库 (<http://www.expasy.org/sprot/>) 分析红光熊蜂卵黄原蛋白基因 cDNA 序列有一个完整的开放阅读框 (ORF), 编码 1 772 个氨基酸, 根据 SignalP3.0 软件预测出 N-末端的前 16 个氨基酸为一个信号肽。NetNGlyc 1.0 软件预测有 5 个糖基化位点, 其中 3 个可能是有效的糖基化位点在 296 ~ 298, 568 ~ 570, 1388 ~ 1390。序列还含有一个小的多聚丝氨酸区 (氨基酸位置: 372 ~ 380), 接近 C-末端 1597 ~ 1600 区域存在保守的 GL/ICG 基元, 其后含有一些半胱氨

酸。此外, DGXR 位于 18 GL/ICG 基元上游 18 个氨基酸残基处。

2.3 蜂王不同时期的卵黄原蛋白基因的表达分析

蜂王蛹期和 1 ~ 7 日龄的成年蜂的卵黄原蛋白

基因在 mRNA 表达水平定量的研究得出卵黄原蛋白基因的 mRNA 首先在蛹期的 Pw 时期出现, 其表达量在整个蛹期发育过程中呈现上升趋势, 而且在 Pbd 时期达到最高, 在成年蜂的脂肪体中的表达量仍在升高, 甚至更高(图 1)。

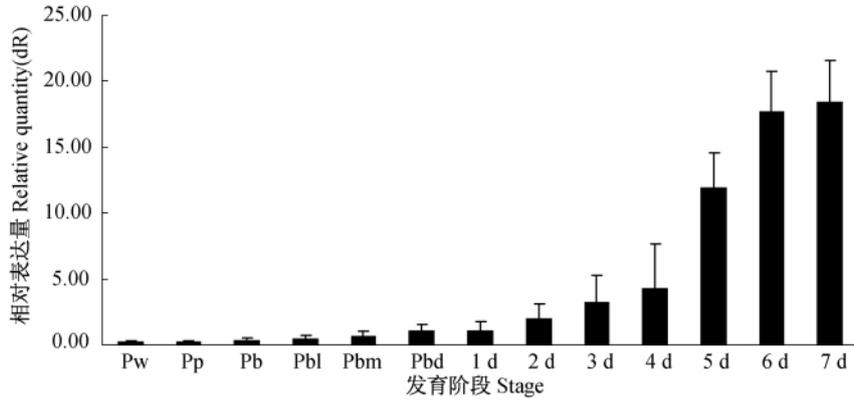


图 1 蜂王蛹期和 1 ~ 7 日龄发育的卵黄原蛋白基因相对表达量

Fig. 1 Relative vitellogenin expression (mRNA) during the development of 6 pupal stages and 1 - 7 days of adults in *Bombus ignitus* queens

数据为平均值 ± 标准误, 下图同。

Data are mean ± SE. The same below.

2.4 工蜂不同时期的卵黄原蛋白基因的表达分析

通过实时定量 PCR 法得出卵黄原蛋白首先在工蜂蛹期的 Pw 时期被检测到, 然后在整个蛹期发育过程中呈现上升趋势, 在刚羽化出房时达到高

峰(图 2)。为了了解成年工蜂发育过程中卵黄原蛋白基因的转录, 提取了 1、5、10、15、20、25 日龄的成年蜂腹部脂肪体的总 RNA, 结果得出卵黄原蛋白基因的 mRNA 水平随着日龄而增加, 到 15 日龄时达到最高, 然后呈现下降趋势(图 2)。

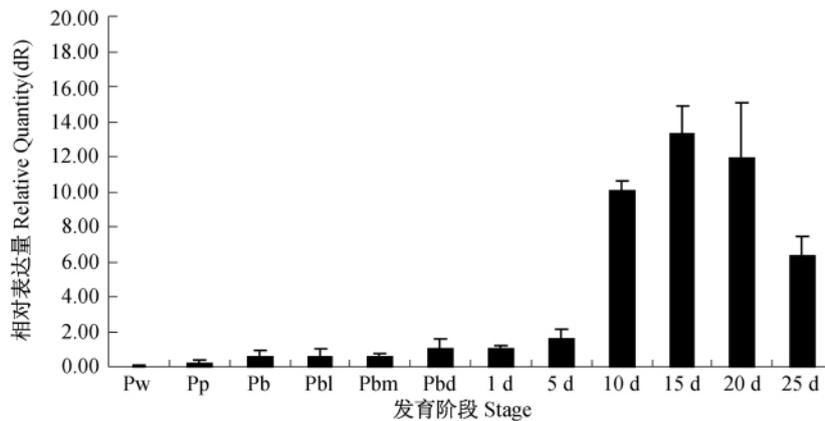


图 2 工蜂蛹期和 1、5、10、15、20、25 日龄发育的卵黄原蛋白基因相对表达量

Fig. 2 Relative vitellogenin expression (mRNA) during the development of 6 pupal stages and 1, 5, 10, 15, 20, 25 days of adults in *Bombus ignitus* workers

2.5 雄蜂不同时期的卵黄原蛋白基因的表达分析

对于雄性蜂,卵黄原蛋白 mRNA 在蛹期的最初阶段没有表达,在 Pp 时期才表达,此后的蛹期

和成年蜂发育阶段以不同水平表达。虽然卵黄原蛋白基因的 mRNA 水平几乎在整个蛹期发育阶段都表达,但是表达水平非常低,只有在刚羽化出房时期表达水平较高(图 3)。

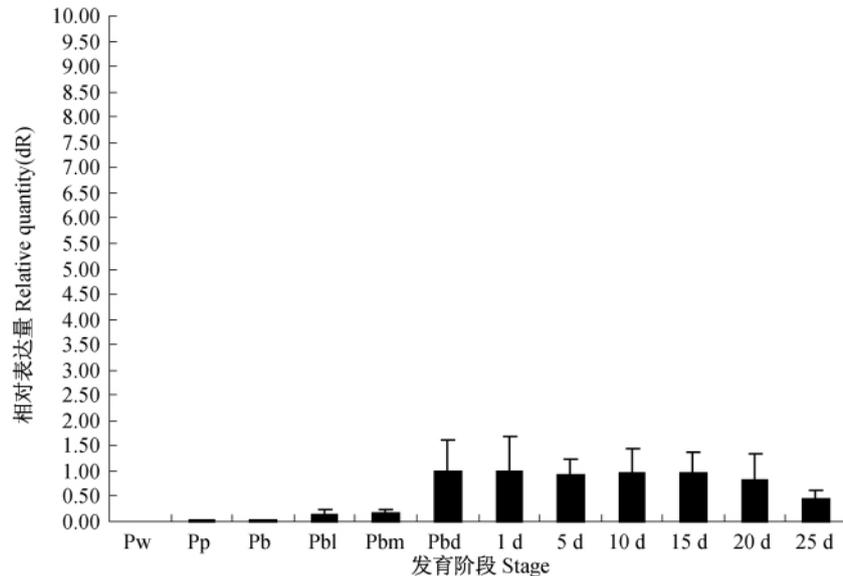


图 3 雄蜂蛹期和 1、5、10、15、20、25 日龄发育的卵黄原蛋白基因相对表达量

Fig. 3 Relative vitellogenin expression (mRNA) during the development of 6 pupal stages and 1, 5, 10, 15, 20, 25 days of adults in *Bombus ignitus* males

3 讨论

本文研究得出红光熊蜂卵黄原蛋白基因氨基酸序列含有一个小的多聚丝氨酸区(氨基酸位置: 372 ~ 380),接近 C-末端 1597 ~ 1600 区域存在保守的 GL/ICG 基元,其后含有一些半胱氨酸(膜翅目昆虫为 9 个)(Chen *et al.*, 1997; Comas *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000a, 2000b; Tufail *et al.*, 2000, 2001)。此外, DGXR 位于 18 GL/ICG 基元上游 18 个氨基酸残基处,这出现在目前所知道的大部分昆虫的卵黄原蛋白中(Tufail *et al.*, 2000; Piulachs *et al.*, 2003),只有蟑螂 *Leucophaea maderae* 中没有(Tufail and Takeda, 2002)。

本文研究得出蜂王的卵黄原蛋白基因的 mRNA 首先在 Pw 阶段表达,这与前期关于蜜蜂卵黄原蛋白基因的研究报道不同,蜜蜂卵黄原蛋白基因首先不是在 Pw 时期表达,而是在 PbmI 时期表达(Piulachs *et al.*, 2003),可能是物种间的差异导致。但是熊蜂蜂王的卵黄原蛋白基因的 mRNA 与蜜蜂卵黄原蛋白基因的 mRNA 的在随后的表达

是一致的,都是在整个蛹期呈现上升趋势,而且在 Pbd 达到顶峰,到成年蜂脂肪体时期甚至更高。

工蜂卵黄原蛋白基因的 mRNA 也是首先在 Pw 阶段表达,并随着年龄呈现上升趋势,到 15 日龄达到最高,此后呈下降趋势。这不同于 *A. mellifera* 卵黄原蛋白基因的 mRNA 水平,在成年蜂发育时期是一直呈现下降趋势。对于这种差别的可能解释是熊蜂蜂群具有不同于蜜蜂的独特的产卵模式:熊蜂蜂群发育的第二阶段,也就是竞争出现时,蜂群内的社会环境发生明显的变化,一些工蜂开始产卵,大部分雌性蜂发育成年轻的蜂王。在任何情况下,与蜜蜂一样,成年工蜂脂肪体的卵黄原蛋白基因的表达都比成年蜂王的低(图 1, 2)。一些研究认为当蜂群失去蜂王时,工蜂的卵黄原蛋白基因开始大量合成,工蜂的卵巢也开始发育,工蜂产雄性蜂,这样可以确保蜂群能继续发展,直到新的蜂王产生为止(Engels *et al.*, 1990; Oldroyd *et al.*, 1994)。

此外,卵黄原蛋白基因 mRNA 在雄性蜂中也被检测到,结果显示出只在刚羽化出房时期较高,

和 *A. mellifera* 一样, *B. ignites* 雄性蜂的卵黄原蛋白基因 mRNA 水平在蛹期和成蜂时期发育过程中都比蜂王的低。前人研究得出雄性蜂合成卵黄原蛋白基因的能力被认为是膜翅目昆虫性别决定的单倍体机制, 当性别专一位点缺乏时在雄性蜂中可能出现部分雌性特征的表达 (Trenczek *et al.*, 1989; Engels *et al.*, 1990)。然而, 这种解释似乎不太可能, 因为在其它一些昆虫的雄性中卵黄原蛋白基因也表达, 但没有出现性别决定机制, 如半翅目昆虫 *Rhodnius prolixus* (Valle *et al.*, 1987)。在膜翅目昆虫范围内, 事实上卵黄原蛋白基因在非社会性昆虫的雄性中并不表达, 如 *Athalia rosae* (Kageyama *et al.*, 1994) 和 *Pimpla nipponica* (Nose *et al.*, 1997), 说明卵黄原蛋白基因在雄蜂中表达是与社会生物学有关的。昆虫卵黄原蛋白基因具有运输糖、液体、磷酸盐、维生素和荷尔蒙的作用 (Chen *et al.*, 1997; Sappington and Raikhel, 1998), 而且这可能也是 *B. ignitus* 雄蜂的卵黄原蛋白基因的作用。

参考文献 (References)

- Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW, 2003. Social exploitation of vitellogenin. *PNAS*, 100 (4) :1799—1802.
- Amdam GV, Norberg K, Page REJ, 2006. Down regulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural. Brain. Research.*, 169 (2) :201—205.
- Amdam GV, Omholt SW, 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.*, 22 (3) :451—464.
- Barchuk AR, Bitondi MMG, Simoes ZLP, 2002. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.*, 2 (1) :9.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW, 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes a SR-type protein. *Cell*, 114 (4) :419—429.
- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, 2006. Parallel declines on pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313 (5785) :351—354.
- Bingham RA, Orthner AR, 1998. Efficient pollination of alpine plants. *Nature*, 391 (2) :238—239.
- Chen JS, Sappington W, Raikhel AS, 1997. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals common ancestry. *J. Mol. Evol.*, 44 (3) :440—451.
- Chittka L, 1998. Sensorimotor learning in bumblebees: Long-term retention and reversal training. *J. Exp. Biol.*, 201 (3) :515—524.
- Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Lee SB, Kim JH, Sohn HD, Jin BR, 2007. A serine protease from the midgut of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera : Apidae) : cDNA cloning, gene structure, expression and enzyme activity. *Eur. J. Entomol.*, 104 (1) :1—7.
- Comas D, Piulachs MD, Belles X, 2000. Vitellogenin of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae) : nucleotide sequence of the cDNA and analysis of the protein primary structure. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 45 (1) :1—11.
- Dallacqua RP, Simes ZLP, Bitondi MMG, 2007. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Soc.*, 54 (1) :70—76.
- Donnell DM, 2004. Vitellogenin of the parasitoid wasp, *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) : gene organization and differential use by members of the genus. *Insect Biochem. Physiol.*, 34 (9) :951—961.
- Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simoes ZLP, Trube A, Braun R, Dittrich F, 1990. Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility // Hoshi M, Yamashita O (eds.). *Advances in Invertebrate Reproduction*, vol. 5. Elsevier, Amsterdam. 495—502.
- Fitzpatrick U, Murray TE, Paxton RJ, Breen J, Cotton D, Santorum V, Brown MJF, 2007. Rarity and decline in bumblebees—A test of causes and correlates in the Irish fauna. *Conserv. Biol.*, 136 (2) :185—194.
- Hagedorn HH, Kunkel JG, 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 24 (2) :475—505.
- Hatakeyama M, Sawa M, Oishi K, 1990. Ovarian development and vitellogenesis in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* Jakovlev (Hymenoptera Tenthredinidae). *Invert. Reprod. Develop.*, 17 (2) :237—245.
- Heinrich B, 1979. *Bumblebee Economics*. Harvard University Press. 23—28.
- Kageyama Y, Kinoshita T, Umesono Y, Hatakeyama M, Oishi K, 1994. Cloning of cDNA for vitellogenin of *Athalia rosae* (Hymenoptera) and characterization of the vitellogenin gene expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24 (3) :599—605.
- Kim YJ, Hwang JS, Yoon HJ, Yun EY, Lee SB, Ahn MY,

- Kim NS, Kim I, Jeon JP, Hwang SJ, 2006. Expressed sequence tag analysis of the diapausing queen of the bumblebee *Bombus ignitus*. *Entomol. Res.*, 36 (1) :191—195.
- Kunkel JG, Nordin JH, 1985. Yolk proteins // Kerkut GA, Gilbert LI (eds.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press. Oxford. 83—111.
- Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K, 2000a. A simple and rapid method for cloning insect vitellogenin cDNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 (1) :189—194.
- Lee JM, Nishimori Y, Hatakeyama M, Bae TW, Oishi K, 2000b. Vitellogenin of the cicada *Graptopsaltria nigrofuscata* (Homoptera) : analysis of its primary structure. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 (1) :1—7.
- Lotto RB, Chittka L, 2005. Seeing the light: Illumination as a contextual cue to color choice behavior in bumblebees. *PNAS*, 102 (5) :3852—3856.
- Michelette ER, Soares AEE, 1993. Characterization of preimaginal development stages in Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 24 (2) :431—440.
- Nose Y, Lee JM, Ueno T, Hatakeyama M, Oishi K, 1997. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Apocrita: Ichneumonidae) : vitellogenin primary structure and evolutionary considerations. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 (5) :1047—1056.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM, Crozler RH, 1994. Anarchy in the beehive. *Nature*, 371 :49.
- Otterstatter MC, Gegeer RJ, Colla SR, Thomson JD, 2005. Effects of parasitic mites and protozoa on the flower constancy and foraging rate of bumblebees. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 58 (3) :383—389.
- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simoes ZLP, Belles X, 2003. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33 (4) :459—465.
- Pyke GH, 1978. Optimal foraging in bumblebees and coevolution with their plants. *Oecologia*, 36 (2) :281—293.
- Raikhel AS, Brown MR, Belles X, 2005. Hormonal control of reproductive process // Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier Ltd., Oxford. 433—491.
- Raikhel AS, Dhadialla T, 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.*, 37 (2) :217—251.
- Reber-Funk C, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P, 2006. Microsatellite loci for *Bombus* spp. *Mol. Ecol. Notes.*, 6 (1) :83—86.
- Rees JA, Moniatte M, Bulet P, 1997. Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 (3) :413—422.
- Sappington TW, Raikhel AS, 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 (1) :277—300.
- Schmid-Hempel P, 1998. *Parasites in Social Insects*. Princeton University Press. 88—99.
- Schmid-Hempel P, 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions—addressing the questions with bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, 88 (1) :147—158.
- Shaul R, Shmuel P, Carmen S, Claytus D, Amir S, 2006. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 145 (1) :39—50.
- Swevers L, Raikhel AS, Sappington TW, Shirk P, Iatrou K, 2005. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle // Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier Ltd., Oxford. 87—155.
- Telfer WH, 1954. Immunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex limited blood protein in egg formation by the cecropia silkworm. *J. Gen. Physiol.*, 37 (2) :539—558.
- Trenczek T, Zillikens A, Engels W, 1989. Developmental patterns of vitellogenin hemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 35 (2) :475—481.
- Tufail M, Hatakeyama M, Takeda M, 2001. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, *Periplaneta Americana*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 48 (1) :72—80.
- Tufail M, Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K, Takeda M, 2000. Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 45 (1) :37—46.
- Tufail M, Takeda M, 2002. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and

- analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(4):1469—1476.
- Valle D, Lima Gomes JEP, Goldenberg S, Garca ES, 1987. *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: dependence upon the blood source. *J. Insect Physiol.*, 33(2):249—254.
- Vogt FD, Heinrich B, Dabolt TO, McBath HL, 1994. Ovary development and colony founding in subarctic and temperate-zone bumblebee queens. *Can. J. Zool.*, 72(5):1551—1556.
- Wilfert L, Torres-Muñoz M, Reber-Funk C, Schmid-Hempel R, Tomkins J, Gadau J, 2008. Construction and characterization of a BAC-library for a key pollinator, the bumblebee *Bombus terrestris* L. *Insectes Soc.*, 56(1):44—48.
- Yu H, Sutton JC, 1997. Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. *Biol. Control*, 10(2):113—122.
- Zayed A, Packer L, 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *PNAS*, 102(6):10742—10746.