研究论文

蜂王浆对蜜蜂学习记忆及相关基因 *Dnmt3* 的影响分析*

龚志文[1***] 刘 娜[1**] 张祖芸[1] 宋文菲[2] 闫振华[2***]

（1. 红河学院生物科学与农学学院，蒙自 661199；2. 红河学院发展规划中心，蒙自 661199）

摘 要 **【目的】** 了解西方蜜蜂 *Apis mellifera* 工蜂所产蜂王浆（Royal jelly，RJ）对自身学习记忆能力的影响，为食物对蜜蜂个体学习记忆的影响研究提供理论参考。**【方法】** 根据蜜蜂的食物差异，用 30% 蔗糖糖水（30% Sucrose，30% S）与蜂王浆混合配制成 0% RJ、10% RJ 和 40% RJ 共 3 个浓度的混合溶液，分别饲喂出房蜂王与工蜂，笼养 5 d 后进行食欲嗅觉相关的学习记忆能力测试，并比较蜜蜂对不同气味的辨识能力；*Dnmt3* 基因作为参与蜜蜂学习记忆形成的重要基因之一，采用实时荧光定量 PCR 测定该基因在不同浓度蜂王浆影响下蜂王与工蜂头部的相对表达情况。**【结果】** PER（Proboscis extension reflex）试验结果表明，食用 40% RJ 后，工蜂和蜂王学习记忆能力均显著提高（工蜂：$F_{2,1805}$=35.29, P<0.000 1；蜂王：$F_{2,909}$=8.69, P=0.000 2）且均表现出良好的气味辨识力，但工蜂的气味辨识能力优于蜂王。*Dnmt3* 基因表达分析结果表明，食用蜂王浆后，工蜂头部 *Dnmt3* 基因上调表达，蜂王头部 *Dnmt3* 基因则下调表达。**【结论】** 蜂王浆能够提高蜜蜂认知能力并影响蜜蜂头部 *Dnmt3* 基因的表达，可为进一步研究蜂王浆对蜜蜂学习记忆的内在影响提供一定的理论依据。

关键词 西方蜜蜂；工蜂；蜂王；蜂王浆；学习记忆；*Dnmt3*

Effect of royal jelly on honeybee learning and memory and *Dnmt3* gene expression

GONG Zhi-Wen[1***] LIU Na[1**] ZHANG Zu-Yun[1] SONG Wen-Fei[2] YAN Zhen-Hua[2***]

(1. College of Biological and Agricultural Sciences, Honghe University, Mengzi 661199, China;
2. Development and Planning Center, Honghe University, Mengzi 661199, China)

Abstract **[Aim]** This study aims to investigate the effect of royal jelly (RJ) on honeybee learning and memory to gain a greater understanding of the underlying mechanisms of honeybee memory. **[Methods]** After emergence, queens and workers were raised in cages and fed 0% RJ, 10% RJ, and 40% RJ dissolved in 30% sucrose. Five days post-emergence we tested their learning, memory, and odor discrimination using the appetitive olfactory related proboscis extension reflex (PER) paradigm. Given the critical role of *Dnmt3* gene in honeybee acquisition and extinction learning and memory formation, we tested the *Dnmt3* gene expression pattern by real-time quantitative PCR in the brain of queens and workers fed RJ. **[Results]** Results of the PER test indicate that learning, memory, and odor discrimination was significantly improved (worker: $F_{2,1805}$=35.29, P<0.000 1; queen: $F_{2,909}$=8.69, P=0.000 2) in both castes that were fed 40% RJ. However, odor discrimination was higher in workers compared to queen bees. Gene testing showed that *Dnmt3* gene expression was upregulated in worker bees but downregulated in queen bees following a diet of 40% RJ. Here we provide evidence that a high concentration of RJ can

*资助项目 Supported projects：2021 年云南省地方本科高校联合专项资金资助项目（202101BA070 001-074）；2022 年云南省教育厅科研基金资助项目（2022J0887）；2022 年度红河学院科研基金博士专项项目（XJ22B17）；云南省兴滇英才支持计划-青年人才专项项目（XDYC-QNRC-2022-0196）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：gzwen0123@126.com；410757743@qq.com

***共同通讯作者 Corresponding authors，E-mail：gzwen0123@126.com；chivayan@163.com

收稿日期 Received：2023-11-12；接受日期 Accepted：2024-05-21

improve honeybee cognition and influence the expression pattern of the *Dnmt3* gene. **[Conclusion]** These findings offer valuable insights into the role of RJ in facilitating honeybee learning and memory.

Key words *Apis mellifera*; worker; queen; royal jelly; learning and memory; *Dnmt3*

蜜蜂是与人类关系非常密切的社会性昆虫，可提供丰富蜂产品，更重要的是其农业授粉价值和参与大自然生态平衡的生态价值（Williams, 1994）。通常情况下，一个正常的蜂群中有一只蜂王和一定数量的雄蜂，其余均为工蜂。蜂王主要负责蜂群的稳定和产卵工作，蜂群内的大部分工作包括内勤、食物采集和防御等工作均由工蜂群体完成，而雄蜂的唯一作用是与蜂王交配（曾志将, 2007）。蜂王与工蜂同属雌性二倍体，但在蜂群中的表型和功能型差异甚大，造成二者级型分化的重要因素之一是食物差异（Winston, 1987; Kucharski *et al*., 2008）。众所周知，工蜂和雄蜂主要以蜂蜜和花粉为食，3 日龄以内的幼虫和蜂王终生的食物来源于巢内小日龄成年工蜂咽下腺和上颚腺分泌的蜂王浆（Royal jelly, RJ）。因此，蜂王浆对蜂群健康发展的重要性毋庸置疑。

蜂王浆成分复杂，主要含有 60%-70%水分、12%-15%蛋白质、10%-16%糖、3%-6%脂肪以及 0.8%-3.0%维生素、盐和自由氨基酸（Rembold, 1983; von Planta, 1888; Fang *et al*., 2010; Collazo *et al*., 2021）。蜂王浆中含有 20 种不同种类的有机酸，其中 10-羟基-2-癸烯酸（10-hydroxy-2-decenoic Acid, 10-HDA）是蜂王浆中独有的物质（Saffet *et al*., 2022）。蜂王浆中的蛋白质 82%-90%属于王浆主蛋白（Major royal jelly proteins，MRJPs）家族成分，已经被鉴定出来的有 9 种，分别为 MRJP-1-MJRP-9（Schmitzová *et al*., 1998; Drapeau *et al*., 2006; Fujita *et al*., 2013; Mandacaru *et al*., 2017）。其中，MRJP-1 的占比最大并在蜜蜂中具有多种生理调节功能，如 *mrjp-1* 基因参与蜜蜂的认知行为调控（Hojo *et al*., 2010; 蔚添添等, 2021; 龚志文等, 2024）。

众多研究表明蜜蜂拥有良好的认知能力，且蜂王与工蜂之间存在明显的认知能力差异，如 5 日龄蜂王的学习能力远远高于同日龄工蜂的学习能力，并与 20 日龄采集蜂相当（Gong *et al*., 2018）。Shi 等（2018）发现蜂王浆可以提高蜜蜂的记忆，并伴随与学习记忆相关的 2 个基因（*GluRA* 和 *Nmdar1*）上调表达。以上研究表明蜂王浆可以对蜜蜂认知行为能力产生一定影响，但仅限于当前的研究发现还难以解释蜂王浆对蜂王与工蜂之间的认知行为能力差异。

蜜蜂含有 3 种 DNA 甲基化转移酶，与人类 DNA 甲基化转移酶高度同源（Wang *et al*., 2006），而 Kucharski 等（2008）从级型分化的角度研究发现，蜂王与工蜂之间的 DNA 甲基化水平存在显著差异，采用 RNAi 技术干扰 *Dnmt3* 基因表达后，蜜蜂幼虫发育为蜂王，否则发育为工蜂。此外，蜂王与工蜂的学习记忆会受到 DNA 甲基化转移酶基因（主要是 *Dnmt3*）的影响，表现为经 DNA 甲基化转移酶抑制剂处理后，伴随着 *Dnmt3* 基因表达的抑制，蜜蜂的学习记忆受到不同程度的损害（Lockett *et al*., 2010; Biergans *et al*., 2012, 2015; Gong *et al*., 2018），证明 *Dnmt3* 基因参与蜜蜂学习记忆的形成。因此，本研究采用 *Dnmt3* 基因表达量来研究蜂王浆食物影响下 DNA 甲基化水平的变化与蜜蜂学习记忆之间的联系。

蜂王与工蜂虽均为雌性蜜蜂，但只有蜂王具备完全生殖能力，其达到性成熟时期与雄蜂完成交尾后即进入孵化产卵阶段（曾志将, 2007），因此蜂王在一生当中的各个发育阶段也面临不同的生活状态。此外，人们通常会认为，蜂王除了交尾和分蜂会飞离巢穴以外，均在巢内专司产卵工作，无需强大的记忆能力即可满足其在巢内的工作，而工蜂大部分时间在巢外从事采集工作，除需记住蜜源和巢址等信息外，还需具有时空记忆来满足其复杂的采集活动。众所周知，由于食物蜂王浆的影响，形成蜜蜂级型分化后工蜂与蜂王之间表型和功能型的显著差异，且不同发育阶段蜂王的食物均与蜂王浆相关，因而与工蜂的食物完全不同，结合认知行为能力的差异，故对不同发育阶段蜂王 *Dnmt3* 基因表达的研究而设计了本试验，该研究可为蜂王浆对蜜蜂认知行

为能力及蜜蜂的行为多态性研究提供新的理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

健康的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 蜂群 6 群，蜂群来自红河学院自建蜂场；自组装蜜蜂学习记忆检测设备 1 套（Gong *et al*., 2019）；蜂王浆（100%，云南华联蜂产品有限公司）；主要试剂：正己醛（Hexane，罗恩化学有限公司）、壬醛（Nonanal，罗恩化学有限公司），RNA 提取试剂盒（天根生化有限公司），RNase free ddH_2O（天根生化有限公司），实时荧光定量 PCR 试剂盒（TaKaRa 公司），染料为 SYBR® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）（TaKaRa 公司）。

1.2　不同浓度蜂王浆溶液的配制

取出冻存的蜂王浆，解冻后按照比例与 30%（w/w）蔗糖糖水（Sucrose, S）进行混合，蜂王浆溶液主要配制成 3 个浓度（w/w），分别为 0% RJ（30% S，对照组）、10% RJ 和 40% RJ。

1.3　供试蜜蜂

从 3 个试验蜂群中分别取出欲出房的封盖子脾，放入准备好的自制蜜蜂孵化箱并置于人工气候箱（HQH-250，上海慧泰仪器制造有限公司）中继续培育[孵化温度为（34.5±0.5）℃，湿度为 65%]。6 h 后从人工气候箱中取出孵化箱，将羽化出房的蜜蜂全部取出，50 头蜜蜂为一组，置于预先准备好的饲养笼（20 cm × 20 cm × 15 cm）中，饲养笼置于人工气候箱中[培育温度为（25.0±0.5）℃，湿度为 65%]。为保证食欲条件反射的准确性，蜜蜂需处于一定的饥饿状态，根据先前对蜜蜂食物量需求的研究的报道（Galizia *et al*., 2012; Gong *et al*., 2018），每天早晚共 2 次饲喂糖水或者蜂王浆溶液，每头蜜蜂每次 10 μL（10 μL 移液器饲喂），5 d 后取出进行测试。

来自 3 个试验蜂群封盖 5 d 的王台分别放置在囚王笼，并放置在人工气候箱中继续培养，待羽化后每天饲喂 2 次糖水或者蜂王浆溶液，每次 10 μL，5 d 后取出进行测试。老蜂王（约 200 d）为蜂场上换王期间统一获取，分别置于囚王笼中，每个囚王笼中放置 7-10 头工蜂进行哺育，5 d 后取出进行测试。

因蜂王一生都以蜂王浆为食，但本研究前期试验发现 0% RJ 和 10% RJ 饲喂蜂王的学习能力无显著差异，且饲养 5 d 的存活率相当（死亡率为 20%-35%）。因此，为观察蜂王认知行为的有效性，本研究仅设置了差异较大的 2 个蜂王浆浓度（0% RJ 和 40% RJ）进入后续研究。

1.4　PER 试验

1.4.1　训练前准备　对符合试验条件的 5 日龄蜂王或者工蜂进行固定，固定好的蜜蜂静置 1 h 后进行筛选，淘汰不符合试验条件的蜜蜂，筛选和淘汰的详细操作步骤参照 Gong 等（2019）方法。符合试验条件的蜜蜂置于托盘中等待 5 h 后进行伸吻反应（Proboscis extension reflex, PER）测试，每个试验蜂群每个处理原则上测试统计 30 头蜂王和工蜂的有效数据。

1.4.2　学习训练与记忆检测　对蜜蜂学习训练与记忆检测的详细操作步骤具体参照 Gong 等（2019）方法。首先将固定好的蜜蜂置于观测台适应恒定气流 15 s 后给予正己醛气味刺激 3 s，在该气味刺激进行至 2 s 时，用棉签蘸取 30 %糖水刺激蜜蜂触角喂食蜜蜂 3 s，气味刺激测试时观察蜜蜂的伸吻情况。以上试验即完成了一个完整的学习训练过程，重复以上操作 6 次，每次重复的时间间隔为 10 min。6 次重复训练试验完成后，记下完成时间点，然后将测试蜜蜂放入人工气候箱，每天早晚共 2 次饲喂糖水溶液，每头蜜蜂每次 10 μL（10 μL 移液器饲喂）。

分别在蜜蜂学习训练完成后 1、5 和 24 h 对蜜蜂进行记忆检测。将蜜蜂置于观测台适应恒定气流 15 s 后给予正己醛对其进行气味刺激 3 s，观察并记录蜜蜂的伸吻情况。

1.4.3　气味辨识力测试　完成对试验蜜蜂进行联合气味正己醛记忆检测 10 min 后，用壬醛对蜜蜂进行气味刺激，持续时间为 3 s，观察并记录蜜蜂的伸吻情况，以便与蜜蜂对正己醛联合气

味的辨别情况作比较。

1.5 *Dnmt3* 基因表达分析

1.5.1 样品采集 对用糖水溶液或者不同浓度蜂王浆溶液饲喂 5 d 后的工蜂和蜂王分别取其头部，每个处理每个蜂群各 3 头，分别装入 1.5 mL RNasefree 的 EP 管，迅速放入液氮中，用于后续检测。

为了更好地分析蜂王浆对蜜蜂学习记忆能力的影响，将不同生活阶段蜂王 *Dnmt3* 基因的相对表达量与蜂王浆饲喂蜂王 *Dnmt3* 基因的相对表达量在同一水平进行比较分析。采集蜂王样本：（1）出房蜂王，即刚出房的蜂王（0 d）；（2）交尾期蜂王，即已经达到性成熟阶段但还未与雄蜂交尾的蜂王（7 d）；（3）产卵蜂王，即已经与雄蜂交尾并开始产卵的蜂王（12 d）；（4）老蜂王，即产卵至少半年蜂王（约 200 d）。以上样本除老蜂王是蜂场上随机获取以外，其余 3 个样本均来自 3 个试验蜂群，每个试验蜂群采集 3 头蜂王。将蜂王从蜂群中取出以后，取其头部并迅速放入液氮中，随后将样品保存至 - 80 ℃冰箱待用。

1.5.2 RNA 提取与 cDNA 合成 取 3 头同一处理蜜蜂头部混合为一个样品，放入含液氮的研钵内，研磨至粉末状后移至加有 1 mL Trizol 的 1.5 mL EP 管中，提取样本 RNA。所得总 RNA 通过琼脂糖凝胶（凝胶浓度为 1.1%）电泳评估 RNA 完整性。用核酸蛋白测定仪（LD-CF60，莱恩德科技有限公司）测定 OD260/280 值和 RNA 浓度值。总 RNA 基因组 DNA 去除按照 Primer Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser （Perfect real time）（TaKaRa 公司）操作过程进行，反应体系为 10 μL：5 μL 总 RNA，2 μL Buffer，1 μL gDNA Eraser，2 μL ddH_2O。反转录反应体系为 20 μL：10 μL 上述基因组去除反应液，4 μL Buffer，1 μL PrimerScript RT enzyme mix I，1 μL RT enzyme mix，4 μL ddH_2O。反转录反应条件：体系混匀后，37 ℃反应 15 min，85 ℃灭活 5 s，4 ℃反应 10 min。反转录产物保存于 - 20 ℃。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 使用 Primer 5 软件进行荧光定量 PCR 引物设计，荧光定量检测基因引物由宝生物工程（大连）有限公司合成。采用在蜜蜂发育过程中表达较稳定的保守基因 *Rps8* 作为内参基因（Kucharski *et al*., 2008）。引物序列为：*Dnmt3*（5′-3′）：F-CAGCGATGACCTGCGATCGGCGATA，R-TACAGGGTTTATATCGTTCCGAAC；*Rps8*（5′-3′）：F-ACGAGGTGCGAAACTGACTGA，R-GCACTGTCCAGGTCTACTCGA。

荧光定量反应体系为 25 μL：2 μL cDNA，9.5 μL ddH_2O，0.5 μL 上游引物，0.5 μL 下游引物，12.5 μL SYBR Premix Ex Taq II。离心放入 q-PCR 仪（CFX96, Bio-rad）中进行扩增。q-PCR 反应条件为：95 ℃预变性 30 s，40 个循环（95 ℃ 10 s，62 ℃ 30 s）。扩增反应结束后进行溶解曲线分析：65 ℃升到 95 ℃，每升高 0.5 ℃停留 5 s 采集信号。每个样品重复 3 孔。

1.6 数据分析

所有数据均采用 JMP Pro v13.0.0（SAS Institute, USA）进行分析。用重复测量方差分析法分析蜜蜂学习与记忆的所有数据，并以蜂群为随机效应，其他因素为固定效应，对所有因素之间作交互分析。不同处理组之间学习和记忆比较使用限制性最大似然法（The restricted maximum likelihood method, REML）的线性混合模型进行组间和组内分析，并采用 Tukey HSD 检验进行两两比较。工蜂或蜂王不同记忆时间点的 Tukey HSD 检验，均在以 PER 伸吻率为参照标准进行两两比较；在相同时间内，不同蜂王浆浓度处理组之间的伸吻率（包括对正己醛和壬醛两种气味的伸吻率）进行 Tukey HSD 检验两两比较。蜜蜂的气味辨识力使用蜜蜂伸吻率和辨别指数（Discrimination index, DI）对学习和记忆进行单独分析，DI 的潜在数值为 - 1、0 或者 1。图表数值采用平均值±95% CI（置信区间）表示。

2 结果与分析

2.1 蜜蜂的学习记忆

2.1.1 工蜂的学习记忆 从总体模型看，经蜂王浆饲喂后，工蜂的学习效应（Trial effect）差异

极显著（$F_{5,1732}$=30.94, P<0.000 1）（图 1：A），且不同处理（Group）之间的效应差异极显著（$F_{2,1805}$=35.29, P<0.000 1）（图 1：A），但是学习训练测试与不同处理之间的交互作用不明显（$F_{10,1732}$=1.52, P=0.126 1）。经比较后各组工蜂群体模型变异性为 0%，R=0.22。不同浓度蜂王浆饲喂后工蜂学习总体情况差异显著（P<0.05）（图 1：A），具体来看，经 40% RJ 饲喂的工蜂学习情况明显优于 10% RJ 实验组和蔗糖糖水对照组（0% RJ），体现在第 2 次学习训练测试至第 4 次学习训练测试（P<0.05），而经 10% RJ 饲喂处理组与蔗糖糖水对照组之间差异不显著（P≥0.05）（图 1：A）。

饲喂蜂王浆后，工蜂的记忆效应（Trial effect）差异极显著（$F_{2,807}$=38.75, P<0.000 1），且不同处理（Group）之间的效应差异极显著（$F_{2,853}$=28.49, P<0.000 1）（图 2：A-C）。但是学习训练测试与不同处理之间的交互作用不明显（$F_{4,807}$=0.15, P=0.962 5）。经比较后各组工蜂群体模型变异性为 0.17%，R=0.21。不同浓度蜂王浆饲喂后工蜂记忆总体情况差异显著（P<0.05）（图 2：A-C），具体来看，5 h 的记忆结果明显比 1 和 24 h 好，1 h 的记忆结果最差（P<0.05）（图 2：A-C）。40% RJ 饲喂后工蜂的记忆效果明显比 10% RJ 实验组和 0% RJ 对照组的记忆结果要好（P<0.05）（图 2：A-C）。

2.1.2　蜂王的学习记忆　从总体模型看，各组蜂王的学习效应差异极显著（$F_{5,912}$=81.81, P<0.000 1），且不同处理之间的效应差异极显著（$F_{2,909}$=8.69, P=0.000 2）。且学习训练测试与不同处理之间的交互作用明显（$F_{10,912}$=2.67, P=0.003 2）。经过比较后各组蜂王群体模型变异性为 0%，R=0.48。各组蜂王学习总体情况差异明显（P<0.05）（图 1：B），具体来看，经过 40% RJ 处理的蜂王学习情况比老蜂王和 0% RJ 对照组稍好，与老蜂王相比主要体现在第 2 次学习训练测试和第 3 次学习训练测试之间，与 0% RJ 对照组相比主要体现在第 4 次学习训练测试至第 6 次学习训练测试之间（图 1：B）。

各组蜂王的记忆效应差异极显著（$F_{2,400}$=7.49, P=0.000 6），且不同处理之间的效应差异极显著（$F_{2,488}$=8.76, P=0.000 2）。但学习训练测试与不同处理之间的交互作用不明显（$F_{4,400}$=1.33, P=0.258 1）。经比较后各组蜂王群体模型变异性为 0.17%，R=0.41。各组蜂王记忆总体情况差异显著（P<0.05）（图 2：D-F），具体来看，1 和 5 h

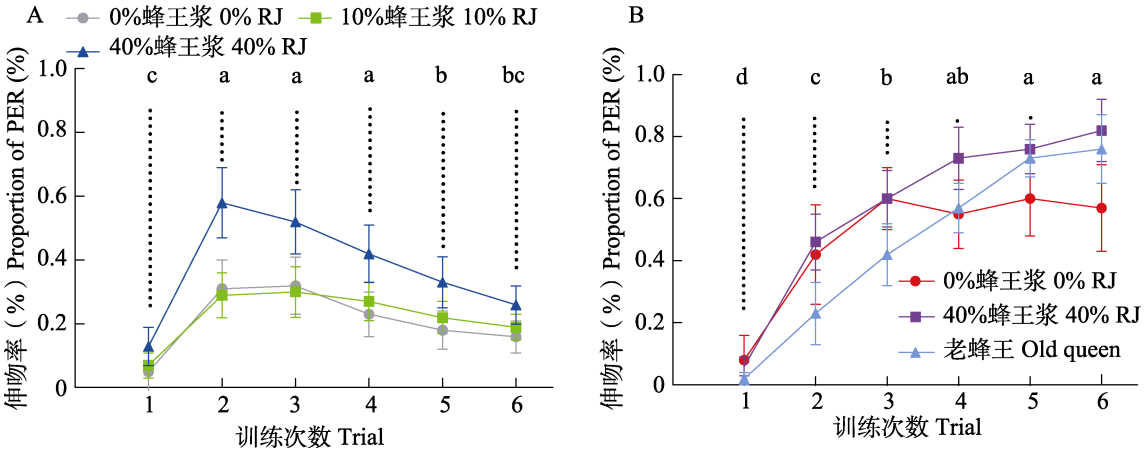

图 1　饲喂蜂王浆后工蜂（A）和蜂王（B）的学习情况

Fig. 1　Learning acquisition between workers (A) and queens (B) fed by royal jelly

RJ: 蜂王浆；PER: 伸吻反应。下图同。 图中数据为平均值±标准误，折线上标有相同字母表示差异不显著（P≥0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）（Tukey HSD 检验）。

RJ: Royal jelly; PER: Proboscis extension reflex. The same below. Data in the figure are presented as mean±SE. The same letters above broken lines mean no significant difference (P≥0.05), while different letters mean significant difference (P<0.05) by Tukey HSD test.

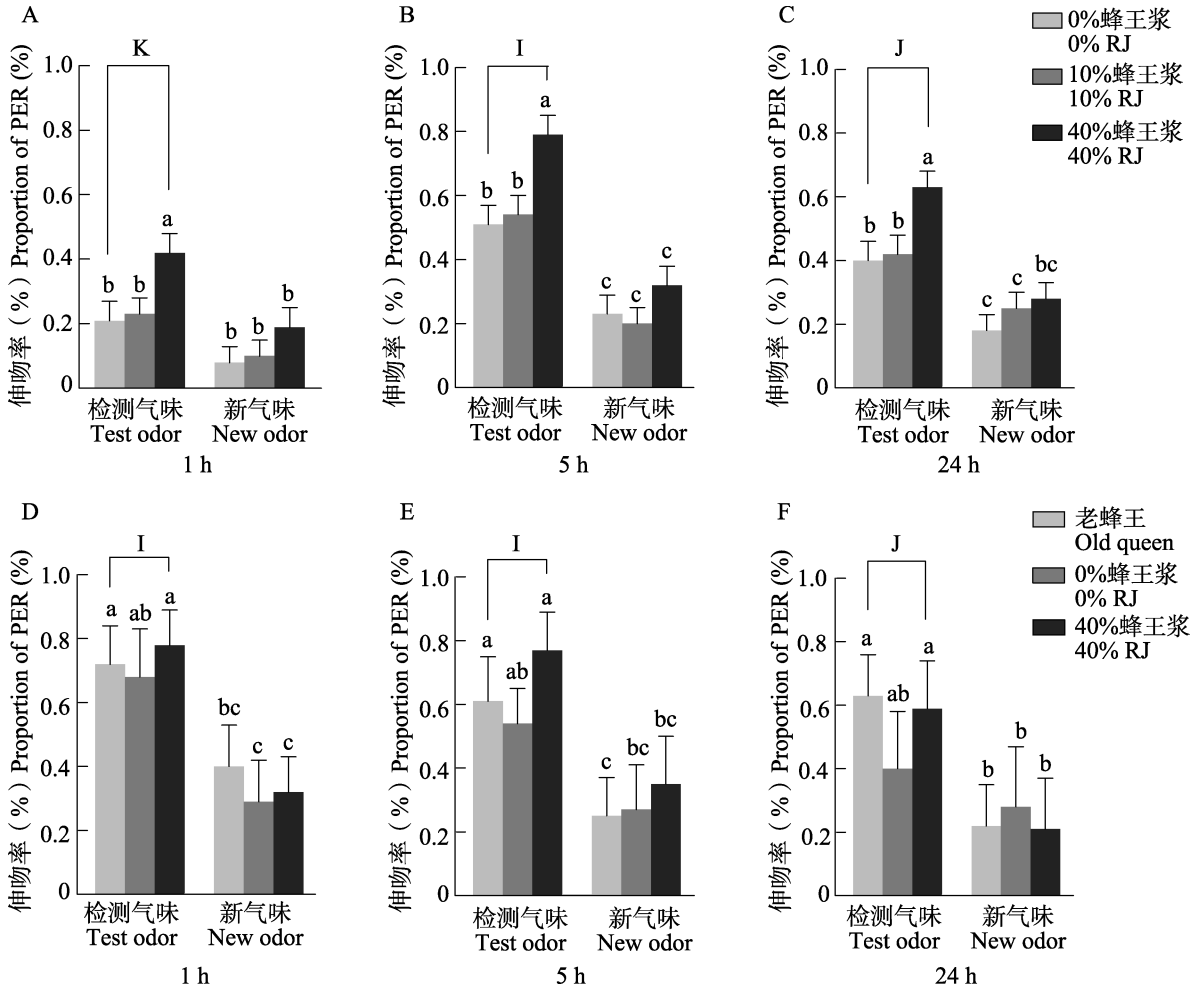

图 2　工蜂（A-C）和蜂王（D-F）在记忆检测阶段对检测气味和新气味的伸吻情况

Fig. 2　Workers (A-C) and queens (D-F) show proportion of PER to test odor and new odor at the stage of memory test

图中数据为平均值±标准误，柱上大写字母表示经不同浓度蜂王浆饲喂后，工蜂或蜂王分别在 1、5 和 24 h 记忆检测时伸吻率总体表现的 Tukey HSD 检验分析结果；小写字母表示经不同浓度蜂王浆饲喂后，工蜂或蜂王在 1、5 或 24 h 记忆检测时对检测气味和新气味伸吻率的 Tukey HSD 检验分析结果。字母相同表示差异不显著（$P \geqslant 0.05$），字母不同表示差异显著（$P<0.05$）。图 3 同。

Data in the figure are presented as mean±SE. Histograms with capital letters means Tukey HSD test results of total PER percent among three memory test time point with workers or queens fed by different concentration of RJ, while small letters means Tukey HSD test results of PER percent to test odor and new odor between different concentration of RJ treatments at the same memory test time point. With the same letters mean no significant difference ($P \geqslant 0.05$), with difference letters mean significant difference ($P<0.05$). The same for Fig. 3.

的记忆结果明显比 24 h 好。40% RJ 处理的蜂王与老蜂王在不同时间点（1、5 和 24 h）检测结果显示的记忆能力虽然均比蔗糖糖水（0% RJ）对照组好但差异不显著（$P \geqslant 0.05$）（图 2：D-F）。

2.2　蜜蜂的气味辨识力

2.2.1　工蜂的气味辨识力　就工蜂对与糖水联合的气味（正己醛）和非联合的新气味（壬醛）之间的辨别能力来看，实验组（10% RJ、40% RJ）和对照组（0% RJ）工蜂均显示在 5 h 记忆检测时的气味辨识力明显高于 1 h（$P<0.05$）（图 3：A-C），而 5 与 24 h 记忆检测时的气味辨识力之间差异不显著（$P \geqslant 0.05$）（图 3：A-C）。

从不同处理组之间的气味辨识力总体表现

看，40% RJ 处理组工蜂对联合气味与新气味之间的辨别能力明显高于 0% RJ 对照组和 10% RJ 实验组（$P<0.05$）（图 3：A-C），而 0% RJ 对照组和 10% RJ 实验组的工蜂对联合气味与新气味之间的辨别能力无明显差异（$P\geqslant0.05$）（图 3：A-C）。这一结果说明高浓度蜂王浆可以提高工蜂的气味辨识力。

2.2.2　蜂王的气味辨识力　通过比较发现，0% RJ 对照组蜂王、老蜂王和 40% RJ 处理组蜂王的气味辨识力总体上无显著差异（$P\geqslant0.05$）（图 3：D-F）。进一步比较发现，0% RJ 对照组蜂王的气味辨识力随着时间的推移明显下降（$P<0.05$）（图 3：D-F），而老蜂王和 40% RJ 饲喂蜂王的气味辨识能力并没有随着时间延长而明显下降。这一结果说明蜂王浆可以较好维持蜂王的气味辨识力。

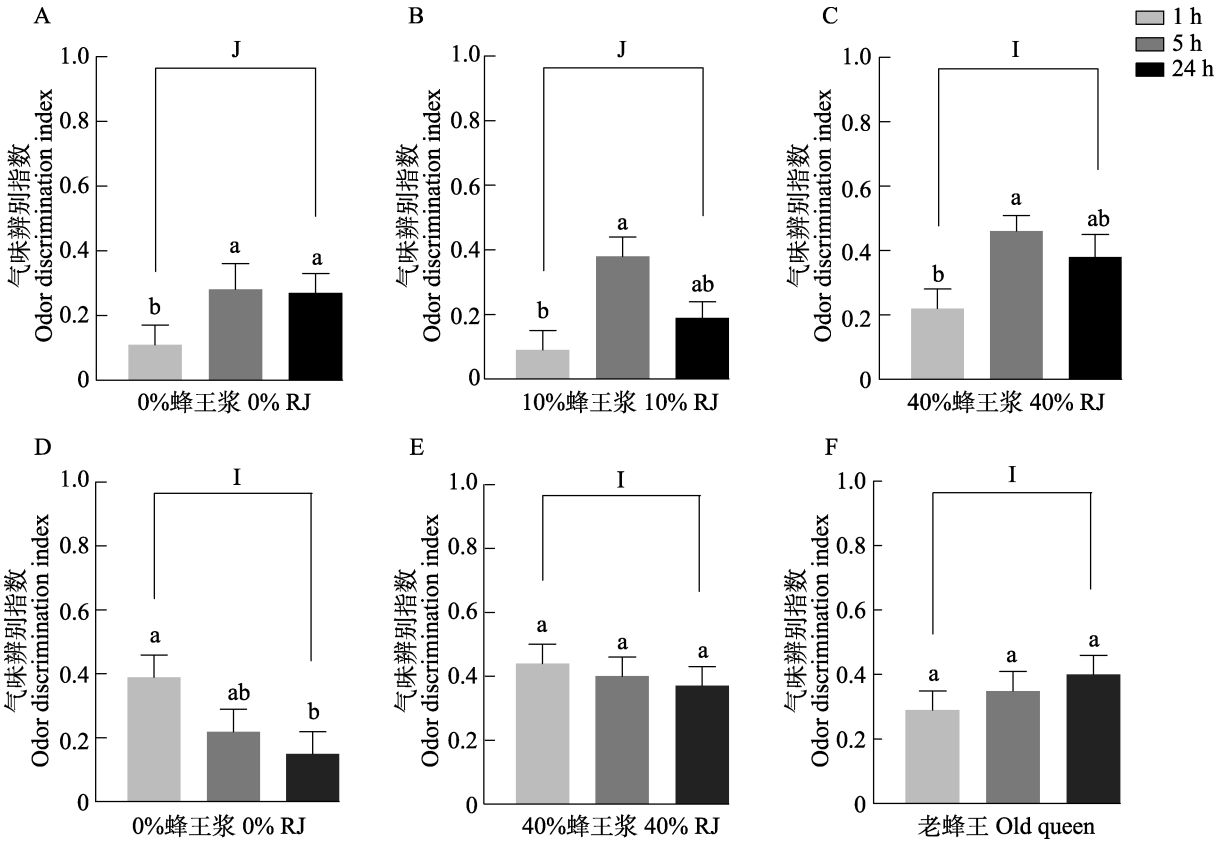

图 3　不同浓度蜂王浆饲喂后工蜂（A-C）和蜂王（D-F）的气味辨识力比较

Fig. 3　Discriminatory comparison between workers (A-C) and queens (D-F) fed by different concentration of RJ

2.3　蜜蜂的 *Dnmt3* 基因相对表达量

2.3.1　工蜂的 *Dnmt3* 基因相对表达量　从实验结果总体上看，不同蜂王浆浓度饲喂后工蜂之间的效应差异显著（$F_{2,2}=4.09$，$P=0.021\ 2$）。经比较发现，食用蜂王浆后工蜂的 *Dnmt3* 基因表达量显著高于对照组（0% RJ）工蜂（$P<0.05$），说明蜂王浆饲喂对工蜂头部 *Dnmt3* 基因的表达有明显影响，然而 10% RJ 和 40% RJ 饲喂工蜂的 *Dnmt3* 基因表达量之间无显著差异（$P>0.05$）（图 4：A）。

2.3.2　蜂王的 *Dnmt3* 基因相对表达量　蜂王经蜂王浆饲喂后，其 *Dnmt3* 基因表达量与对照组（0% RJ）相比较明显降低（$P<0.000\ 1$）。此外，比较出房蜂王、交尾期蜂王、产卵蜂王和老蜂王 4 个不同生活阶段蜂王头部 *Dnmt3* 基因表达量的结果发现，交尾期蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量最高，出房蜂王次之，老蜂王和产卵蜂王的最小（$F_{3,3}=79.03$, $P<0.000\ 1$）。出房蜂王和交尾期蜂王均属于处女蜂王，其 *Dnmt3* 基因表达量明显高于交尾过后的产卵蜂王和老蜂王（$P<0.05$）

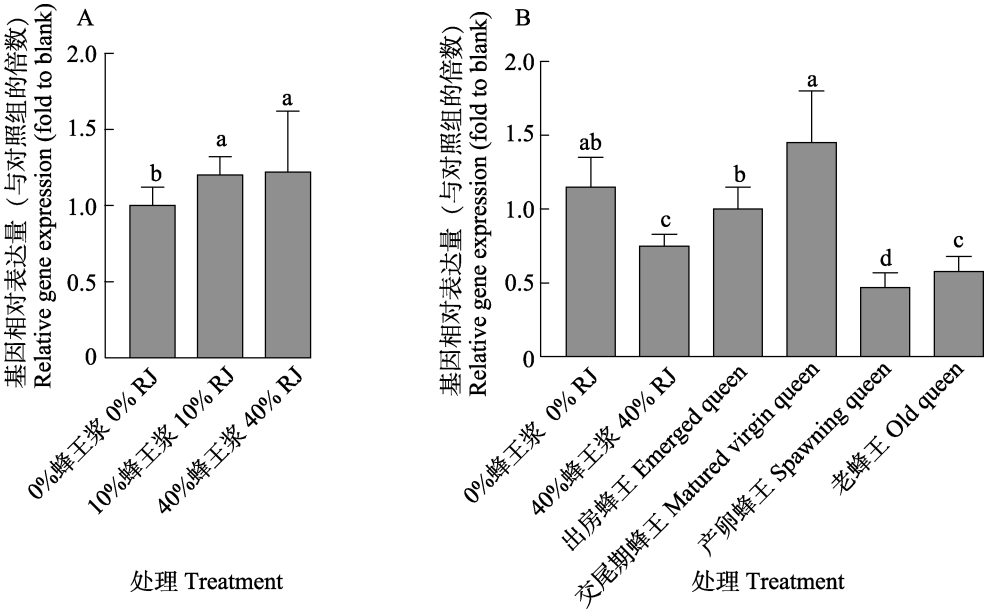

图 4　不同浓度蜂王浆对西方蜜蜂工蜂（A）与蜂王（B）*Dnmt3* 基因相对表达量的影响

Fig. 4　The effect of different concentrations of royal jelly on the expression levels of *Dnmt3* gene in workers (A) and queens (B) of *Apis mellifera*

图中数据为平均值±标准误，柱上标有相同字母表示差异不显著（$P \geqslant 0.05$），不同字母表示差异显著（$P<0.05$）（Tukey HSD 检验）。

Data in the figure are presented as mean±SE. The same letters above bars mean no significant difference ($P \geqslant 0.05$), while different letters mean significant difference ($P<0.05$) by Tukey HSD test.

（图 4：B）。进一步分析发现，对照组（0% RJ）蜂王与出房蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量相当，而 40% RJ 饲喂蜂王与老蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量相当。

3　讨论

蜜蜂因其高生态价值而受到广泛关注，特别是其所产的蜂王浆，因其高营养价值和在蜂群中的重要作用成为食品科学和昆虫社会科学研究的热门话题。学习记忆是动物认知行为研究的重要领域，因此，蜂王浆对学习记忆影响的研究具有重要意义。本研究中，5 日龄西方蜜蜂经蜂王浆饲喂，工蜂和蜂王的学习与记忆能力均有不同程度提高，且不同浓度蜂王浆饲喂的工蜂和蜂王均表现出良好的气味辨识力；工蜂的 *Dnmt3* 基因表达量因蜂王浆影响而显著提高，而蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量则显著降低。此外，不同生活阶段蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量差异显著，其中交尾期蜂王表达量最高，出房蜂王次之，产卵蜂王和老蜂王的最低。

高浓度蜂王浆（40% RJ）影响下，工蜂学习能力和记忆能力均显著提高，并具有良好气味辨识能力，证实了蜂王浆具有提高工蜂学习记忆能力和气味辨识力的作用。另外，工蜂的学习曲线在后期出现了下降的趋势，是因为试验工蜂为 5 日龄幼龄工蜂，其蜜囊尚未完全发育成熟，在经过 3-4 次学习训练后蜜蜂或接近饱腹状态，故出现伸吻率下降的现象，而非未获得联想学习能力。采用这一日龄工蜂作为试验对象，是综合考虑了工蜂与蜂王的日龄相适性和工蜂伸吻率，以及参考 Ichikawa 和 Sasaki（2003）及 Hojo（2010）等的研究。

蜂王浆可提高动物认知能力的作用已在其他动物模型如小鼠中得到了证实（Zamani *et al*., 2012a, 2012b）。蜂王浆中含有丰富的蛋白质，目前已经被鉴定出来的王浆主蛋白有 MRJP 1-MRJP 9（Schmitzová *et al*., 1998; Drapeau *et al*., 2006; Fujita *et al*., 2013; Mandacaru *et al*., 2017），

是蜂王浆蛋白中的重要组成部分，其功能也逐步被发现。西方蜜蜂的研究报道指出，王浆主蛋白基因不仅在工蜂的咽下腺表达，在血淋巴和蕈形体中也有表达，且在工蜂不同发育阶段，王浆主蛋白的成分有所变化（Klaudiny *et al*., 1994; Kubo *et al*., 1996; Ohashi *et al*., 1997; Kucharski *et al*., 1998; Ohashi *et al*., 2000; Feng *et al*., 2009; Ueno *et al*., 2009）。Hojo 等（2010）也发现，工蜂蕈形体中 *mrjp-1* 基因表达量降低导致工蜂的学习能力下降（Kucharski and Maleszka, 2005; 蔚添添等, 2021）并与隔离饲养工蜂的学习能力下降的结果相符（Ichikawa and Sasaki, 2003）。因此，以上结果足以证明蜂王浆中的一些成分与蜜蜂自身学习记忆确有关联。然而，由于蜂王浆成分复杂，还需更多的研究验证蜂王浆对蜜蜂认知能力的影响机制。

之前的研究表明，蜂王的学习记忆能力要显著高于工蜂（Gong *et al*., 2018）。蜂王自卵孵化为幼虫开始便终生食用蜂王浆，蜂王与工蜂也因此在表型和功能方面有显著差异，这一差异表明可以采用限制蜂王对蜂王浆的摄取以测定蜂王浆对蜂王认知行为能力的影响（Kucharski and Maleszka, 2005; Hojo *et al*., 2010; 蔚添添等, 2021）。本研究结果符合预期，即停止饲喂蜂王浆后蜂王的认知能力呈下降趋势，而进食蜂王浆的蜂王即使日龄已经超过半年，其认知能力变化仍不明显，证明蜂王浆不仅能提高蜂王学习记忆能力，还能够维持其对气味良好的辨别能力，同时也侧面印证了王浆主蛋白对学习记忆的影响。

饲喂蜂王浆后，虽然蜂王与工蜂的学习记忆能力和气味辨识力均提高，但工蜂的 *Dnmt3* 基因明显上调表达，蜂王的 *Dnmt3* 基因明显下调表达。尽管级型分化让蜂王与工蜂之间的 DNA 甲基化水平本身就存在差异，蜂王体内的 *Dnmt3* 基因表达水平显著低于工蜂（Kucharski *et al*., 2008），出现截然不同结果的可能解释是，试验工蜂 *Dnmt3* 基因上调是因为蜂王无蜂王浆食物供应而出现一定适应性变化的内在生理表现。如 Lockett 等（2010）研究发现降低 *Dnmt3* 基因表达会使蜜蜂的学习记忆能力下降，而 Levenson 等（2006）研究证明蜜蜂 *Dnmt3* 基因上调表达会激发比如 PKC 信号途径（Protein kinase C signal pathway）而提高蜜蜂的学习记忆。因此推测，蜂王体内 *Dnmt3* 基因表达可能较为复杂且不止参与认知行为调控，还参与生长发育和生殖调控，蜂王出现 *Dnmt3* 基因表达量下调的现象是因为限制蜂王进食蜂王浆本身会使 *Dnmt3* 基因表达量上调，从而导致了蜂王浆饲喂后 *Dnmt3* 基因表达量下调的假象。这需进一步试验验证，如至少需要从 RNAi 干扰技术抑制 *Dnmt3* 基因表达，或者采用 DNA 甲基化转移酶抑制以干扰 *Dnmt3* 的表达验证蜜蜂的行为。但这一推断一定程度上可以从本研究结果反映出来，40% RJ 实验组蜂王与老蜂王的学习曲线与 *Dnmt3* 基因表达量均相似。另外，0% RJ 对照组蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量与出房蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量相当，而较交尾期蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量低，但不同生活阶段蜂王的 *Dnmt3* 基因表达量并没有呈现一定的发育时间规律性。

Kucharski 等（2008）的研究报道指出，利用 RNAi 饲喂技术使 *Dnmt3* 基因沉默表达，导致西方蜜蜂 3 日龄小幼虫往蜂王方向发育，使 *Dnmt3* 基因上调表达则会导致幼虫往工蜂方向发育。DNA 甲基化在蜜蜂级型分化的作用似乎与 *Dnmt3* 基因在蜜蜂学习记忆过程中的作用相反，但 *Dnmt3* 基因参与学习记忆形成已经在昆虫如蜜蜂、哺乳动物如小鼠中得到证实（Kucharski *et al*., 2008; Lockett *et al*., 2010; Biergans *et al*., 2012, 2015; Li *et al*., 2014; Gong *et al*., 2018; Shi *et al*., 2023），如 *Dnmt3* 基因表达水平可以控制西方蜜蜂触角叶中突触的收缩与扩展（Biergans *et al*., 2017）。因此，根据此前的研究以及本研究结果可以进一步推测，DNA 甲基化系统在蜜蜂级型分化及学习记忆中的作用可能是独立运行的。

总之，不管是工蜂还是蜂王，本研究均证明了经过蜂王浆饲喂确实能提高蜜蜂的学习记忆能力和气味辨识能力。基于蜂王浆作为蜂王和幼虫的食物以及在蜂群社会中的重要作用，深入探索其对蜜蜂认知行为能力的影响很有必要且意义深远，本研究作为阶段性成果，为下一步的验证研究和更多试验探索提供了一定的研究基础。行为学与分子生物学结合研究的方式无疑是解

释蜜蜂学习记忆机理的有效途径，然而由于蜜蜂学习记忆的形成机制复杂，仍需要长期的科学探索以获得更多事实依据。

参考文献 (References)

Biergans SD, Claudianos C, Reinhard J, Galizia CG, 2017. DNA methylation mediates neural processing after odor learning in the honeybee. *Scientific Reports*, 7: 43635.

Biergans SD, Giovanni Galizia C, Reinhard J, Claudianos C, 2015. Dnmts and Tet target memory associated genes after appetitive olfactory training in honey bees. *Scientific Reports*, 5: 16223.

Biergans SD, Jones JC, Treiber N, Giovanni GC, Szyszka P, 2012. DNA methylation mediates the discriminatory power of associative long-term memory in honeybees. *PLoS ONE*, 7(6): e39349.

Collazo N, Carpena M, Nuñez-Estevez B, Otero P, Simal-Gandara J, Prieto MA, 2021. Health promoting properties of bee royal jelly: Food of the queens. *Nutrients*, 13(2): 543.

Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R, 2006. Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, 16(11): 1385–1394.

Fang Y, Feng M, Li JK, 2010. Royal jelly proteome comparison between *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Journal of Proteome Research*, 9(5): 2207–2215.

Feng M, Fang Y, Li JK, 2009. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*, 10: 645.

Fujita T, Kozuka-Hata H, Ao-Kondo H, Kunieda T, Oyama M, Kubo T, 2013. Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *Journal of Proteome Research*, 12(1): 404–411.

Galizia C, Eisenhardt D, Giurfa M, 2012. Honeybee Neurobiology and Behavior: A Tribute to Randolf Menzel. Springer Netherlands. 393–484.

Gong ZW, Song WF, Liu N, Zhang ZY, Yan ZH, 2024. *Journal of Honghe University*, 22(2): 137–140. [龚志文，宋文菲，刘娜，张祖芸，闫振华，2024. 王浆主蛋白 1(MRJP-1)及其对蜜蜂学习记忆影响的研究进展. 红河学院学报, 22(2): 136–140.].

Gong ZW, Tan K, Nieh JC, 2018. First demonstration of olfactory learning and long-term memory in honey bee queens. *Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 14): jeb177303.

Gong ZW, Tan K, Nieh JC, 2019. Hornets possess long-lasting olfactory memories. *Journal of Experimental Biology*, 222(Pt 13): jeb200881.

Silva TGDSE, Paulo MEFDVD, Silva JRMD, Alves ADS, Britto LRG, Xavier GF, Sandoval MRL, 2020. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon*, 6(2): e03281.

Hojo M, Kagami T, Sasaki T, Nakamura J, Sasaki M, 2010. Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie*, 41(2):194–202.

Ichikawa N, Sasaki M, 2003. Importance of social stimuli for the development of learning capability in honeybees. *Applied Entomology and Zoology*, 38(2): 203–209.

Klaudiny J, Kulifajová J, Crailsheim K, Šimúth J, 1994. New approach to the study of division of labour in the honeybee colony (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 25(6): 596–600.

Kubo T, Sasaki M, Nakamura J, Sasagawa H, Ohashi K, Takeuchi H, Natori S, 1996. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry*, 119(2): 291–295.

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871): 1827–1830.

Kucharski R, Maleszka R, Hayward DC, Ball EE, 1998. A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften*, 85(7): 343–346.

Kucharski R, Maleszka R, 2005. Microarray and real-time PCR analyses of gene expression in the honeybee brain following caffeine treatment. *Journal of Molecular Neuroscice*, 27(3): 269–276.

Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD, 2006. Evidence that DNA (Cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23): 15763–15773.

Li HY, Wu XK, Wu Q, Gong DZ, Shi MJ, Guan LL, Zhang J, Liu J, Yuan B, Han GZ, Zou Y, 2014. Green tea polyphenols protect against okadaic acid-induced acute learning and memory impairments in rats. *Nutrition*, 30(3): 337–342.

Lockett GA, Helliwell P, Maleszka R, 2010. Involvement of DNA methylation in memory processing in the honey bee. *Learning Memory*, 21(12): 812–816.

Mandacaru SC, Do Vale LHF, Vahidi S, Xiao YM, Skinner OS, Ricart CAO, Kelleher NL, de Sousa MV, Konermann L, 2017. Characterizing the structure and oligomerization of major royal jelly protein 1 (MRJP1) by mass spectrometry and complementary biophysical tools. *Biochemistry*, 56(11): 1645–1655.

Ohashi K, Natori S, Kubo T, 1997. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry*, 249(3): 797–802.

Ohashi K, Sasaki M, Sasagawa H, Nakamura J, Natori S, Kubo T, 2000. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony. *Zoological Science*, 17(8): 1089– 1094.

Rembold H, 1983. Royal jelly//Ruttner F(ed.). Queen Rearing: Biological Basis and Technical Instruction. Bucharest: Apimondia Publishing House. 35–42.

Saffet E, Can GY, Asl Z, Nesrin EB, 2022. Organic acids and their derivatives: Minor components of bee pollen, bee bread, royal jelly and bee venom. *European Food Research and Technology*, 248(12): 3037–3057.

Schmitzová J, Klaudiny J, Albert Š, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, Júdová J, Šimúth J, 1988. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.. *Cellular and Molecular Life Science*, 54(9): 1020–1030.

Shi G, Feng J, Jian LY, Fan XY, 2023. DNA hypomethylation promotes learning and memory recovery in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regeneration Research*, 18(4): 863–868.

Shi JL, Liao CH, Wang ZL, Wu XB, 2018. Effect of royal jelly on longevity and memory-related traits of *Apis mellifera* workers. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(4): 1430–1433.

Ueno T, Nakaoka T, Takeuchi H, Kubo T, 2009. Differential gene expression in the hypopharyngeal glands of worker honeybees (*Apis mellifera* L.) associated with an age-dependent role change. *Zoological Science*, 26(8): 557–563.

von Planta A, 1888. Ueber den futtersaft der bienen. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 12(4): 327–354.

Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314(5799): 645–647.

Williams IH, 1994. The dependences of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews*, 6(1): 229–257.

Winston ML, 1987. The Biology of The Honey Bee. Cambridge: Harvard University Press. 56.

Yu TT, Qiu YM, Hou MS, Wang TB, Su SK, Li ZG, 2021. Effects of silencing of major royal jelly protein 1 (Mrjp1) gene by RNAi on learning and memory in worker bees of *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica*, 64(10): 1145–1152. [蔚添添, 邱园妹, 候梦赏, 王天宝, 苏松坤, 李志国, 2021. RNAi 沉默王浆主蛋白 1(Mrjp1)基因对意大利蜜蜂工蜂学习和记忆的影响. 昆虫学报, 64(10): 1145–1152.]

Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian A, 2012a. Effect of royal jelly on improving passive avoidance learning and spatial learning and memory in rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 20(2): 211–219.

Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian AA, 2012b. Effect of royal jelly on spatial learning and memory in rat model of streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. *Advanced Biomedical Research*, 1: 26.

Zeng ZJ, 2007. Honeybee Biology. Beijing: China Agricultural Press. 31. [曾志将, 2007. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社. 31.]