

# 人工饲料对幼年工蜂生长发育及生理代谢的影响

庄明亮 李剑飞 李志勇\* 王志 牛庆生 陈东海 葛蓬 张发

(吉林省养蜂科学研究所,吉林 132108)

**摘要:** 本试验利用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)对幼年工蜂进行代谢组学分析,旨在探究不同人工饲料对幼年工蜂生长发育及生理代谢的影响,为蜂王邮寄的人工饲料配制提供一定理论依据。试验选取1日龄的意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)300只,分为5组,分别饲喂5种人工饲料,每组30只工蜂。对照组饲料:蔗糖粉:蜂蜜=3:1;试验组A饲料:蔗糖粉:蜂粮:蜂蜜=6:5:1;试验组B饲料:蔗糖粉:蜂粮:蜂蜜=6:3:1;试验组C饲料:蔗糖粉:花粉:蜂蜜=6:5:1;试验组D饲料:蔗糖粉:花粉:蜂蜜=6:3:1。用5种人工饲料进行室内喂养,记录蜜蜂7d内的死亡数量;解剖试验组A和对照组第1、3、5、7天的工蜂咽下腺,测定其平均重量、颜色和饱满度;采用LC-MS方法检测试验组A和对照组蜜蜂饲喂7d后的代谢物差异,对检测数据进行模式识别分析,筛选并鉴别差异代谢物。结果表明:1)对照组和试验组A蜜蜂第1~5天时均没有出现死亡,在第6和7天时试验组A蜜蜂死亡数量均显著低于对照组( $P<0.05$ )。试验组B、C、D的蜜蜂在6d内全部死亡。2)试验组A第7天时的蜜蜂咽下腺平均重量显著高于对照组( $P<0.05$ ),咽下腺颜色为全部乳白色,且咽下腺小体饱满。3)采用主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别方法(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)分析代谢组数据,结果显示试验组A和对照组明显分离,共鉴定出23个差异代谢物,包括氨基酸、脂类、糖类等,其中有10种代谢物上调,13种代谢物下调。差异代谢物通路分析发现,差异极显著的通路有牛磺酸和亚牛磺酸生物合成通路、赖氨酸降解通路、戊糖磷酸盐代谢通路、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化通路( $P<0.01$ ),差异显著的通路有氨基酸的生物合成通路,色氨酸代谢通路,碳代谢通路,丁酸代谢通路,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路,丙酮酸代谢通路( $P<0.05$ )。由此可见,试验组A的饲料更适合蜜蜂工蜂的生长发育和生存,在邮寄环境中可代替常用的炼糖饲料。

**关键词:** 蜜蜂;饲料;寿命;咽下腺;代谢物分析

中图分类号:S891

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)02-1070-11

蜜蜂作为重要的传粉昆虫,具有巨大的生态价值和经济价值<sup>[1-2]</sup>。其中,工蜂是蜂群中的主要组成部分,负责采集花粉花蜜、修造巢脾、哺喂幼虫等除了生殖以外的所有任务。研究工蜂的营养代谢,寻求合理、均衡的蜜蜂饲料,在蜂群无法获得天然饲料或者特殊环境中使用时,有利于工蜂的生长发育和延长工蜂的寿命,对于养蜂生产意义重大。

近年来,蜜蜂的营养研究取得了阶段性进展,但主要集中在蜜蜂幼虫发育时期的蛋白质<sup>[3-5]</sup>、维生素<sup>[6-7]</sup>、矿物质<sup>[8]</sup>等营养需要,缺少对成年工蜂营养的系统研究。蜂粮是成年工蜂的天然食粮,是蜜蜂从蜜源植物中采集的花粉混入花蜜和分泌物贮存在蜂巢中后发酵的不规则团状物<sup>[9]</sup>。有研究表明,蜂粮中营养成分特别复杂,含碳水化合物、蛋白质、脂肪、维生素、类黄酮和类胡萝卜素

收稿日期:2020-07-21

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20190201284JC);国家蜂产业技术体系建设项目(CARS-44-KXJ3)

作者简介:庄明亮(1989—),男,吉林辽源人,助理研究员,硕士,从事蜜蜂生殖生物学研究。E-mail: mingliang89@126.com

\*通信作者:李志勇,研究员,E-mail: apis-li@163.com

等<sup>[10-12]</sup>,对维持蜂群正常的发育生长有着至关重要的作用<sup>[13-14]</sup>。

本试验通过饲喂蜜蜂含有一定比例蜂粮、花粉、蔗糖粉的饲料,与传统的炼糖饲料进行对比,筛选出最优配方的饲料,通过液相色谱/质谱联用技术(liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)检测其对幼年工蜂代谢图谱的影响,通过主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial leastsquares discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial leastsquares-discriminant analysis, OPLS-DA),筛选对工蜂代谢影响的差异代谢物,并结合代谢通道数据库京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)探讨代谢通路,发掘对蜜蜂生长发育和寿命起关键作用的营养因素,为合理配制工蜂饲料提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 蜂群

试验蜂群为吉林省养蜂科学研究所饲养的意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*),蜜蜂群势13足框,蜂子比为0.9,3.0张封盖蜜脾、0.5张粉脾的健

康蜂群。

#### 1.1.2 试剂与amp;原料

蜂粮(取自健康蜂群,现取现用)、花粉(杂花粉)、蜂蜜(7月蜂场自取波美度42°成熟椴树蜜,保存于干燥通风的室内)、蔗糖粉(食品级研磨80目颗粒,广西大新湘桂制糖有限公司)、甲醇(色谱纯,上海筠安分析技术有限公司)、甲酸(色谱纯,上海筠安分析技术有限公司)、乙腈(色谱纯,上海筠安分析技术有限公司)、L-2-氯苯丙氨酸(色谱纯,生工生物工程股份有限公司)等。

### 1.2 试验饲料

以蔗糖粉、蜂粮、蜂蜜和花粉为原料,按照一定比例混合配制5种饲料。对照组饲料:蔗糖粉和蜂蜜按3:1比例进行充分揉搓,装入饲料盒5g备用;试验组A饲料:蔗糖粉、蜂粮、蜂蜜按照6:5:1比例充分揉搓,装入饲料盒5g备用;试验组B饲料:蔗糖粉、蜂粮、蜂蜜按照6:3:1比例充分揉搓,装入饲料盒5g备用;试验组C饲料:蔗糖粉、花粉、蜂蜜按照6:5:1比例充分揉搓,装入饲料盒5g备用;试验组D饲料:蔗糖粉、花粉、蜂蜜按照6:3:1比例充分揉搓,装入饲料盒5g备用。饲料盒为长方体(长×宽×高=15cm×4cm×3cm),顶面用铁纱,其余为木质结构。饲料组成见表1。

表1 饲料组成

Table 1 Composition of diets

%

原料 Ingredients	对照组 Control group	试验组 A Experimental group A	试验组 B Experimental group B	试验组 C Experimental group C	试验组 D Experimental group D
蔗糖粉 Sucrose powder	75.00	50.00	60.00	50.00	60.00
蜂蜜 Honey	25.00	8.40	10.00	8.40	10.00
蜂粮 Bee bread		41.60	30.00		
花粉 Pollen				41.60	30.00
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

### 1.3 试验方法

试验前准备空巢脾,放到继箱里利用工蜂清理干净。将清理干净的巢脾放入巢箱中间位置,并用框式限王产卵器限制蜂王在此巢脾上产卵12h,然后将蜂王取出,把产卵巢脾放入继箱中,工蜂出房前1天放到34.5℃培养箱里,待工蜂出房,即1日龄工蜂。试验抓取1日龄工蜂在室内常温

(25~29℃)饲养,分为5组,模拟蜂王邮寄时饲喂工蜂情况,一次性补足上述5种人工饲料。每组做3个平行。

### 1.4 指标的观察和测定

#### 1.4.1 蜜蜂死亡情况的观察

每组饲料盒内装入30只1日龄的工蜂,放在室内常温(25~29℃)饲养。每天定时观察蜜蜂的

死亡情况,作记录并清理死蜂。

#### 1.4.2 咽下腺重量测定和观察

室内饲养对照组和试验组 A 第 1、3、5 和 7 天后,每组取 7 只工蜂,剪下工蜂头部用浓度 75% 的酒精进行表面消毒,并剪去触角,用昆虫针固定在蜡盘中间。在解剖显微镜下用小手术剪刀剪除复眼,然后用昆虫针挑去咽下腺周围的头涎腺后,轻轻取出咽下腺。把刚解剖好的咽下腺用天平进行称重。然后把咽下腺放在干净的载破片上,滴 1 滴蒸馏水,让咽下腺展开,置于显微镜下观察颜色和饱满程度。

#### 1.4.3 代谢组学分析测定

##### 1.4.3.1 样品采集

对照组和试验组 A 室内饲养 7 d,取样生命体征正常的蜜蜂(以能自由爬动为准),2 只成年工蜂装入 1 个 2 mL 离心管中,放入液氮中冷冻 2 h 转入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,每组 6 个重复。

##### 1.4.3.2 样本前处理

研磨整只蜜蜂,称取 30 mg,加入内标(L-2-氯苯丙氨酸, 0.3 mg/mL; Lyso PC17:0, 0.01 mg/mL,均为甲醇配制)各 20  $\mu\text{L}$  和 400  $\mu\text{L}$  的甲醇:水(体积比为 4:3);加入 2 个小钢珠,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 2 min 预冷,加入研磨机(60 Hz, 2 min);冰水浴中超声提取 10 min;  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置 20 min;离心 10 min (13 000 r/min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),取 300  $\mu\text{L}$  上清液挥干,然后 400  $\mu\text{L}$  甲醇-水(体积比为 1:4)复溶,涡旋 30 s,超声 2 min;离心 10 min (13 000 r/min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),用注射器吸取 150  $\mu\text{L}$  的上清液,使用 0.22  $\mu\text{L}$  的有机相针孔过滤器过滤后,转移到 LC 进样小瓶,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存,直到进行 LC-MS 分析。

##### 1.4.3.3 检测条件

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C-18 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),流速 0.35 mL/min,柱温  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;流动相 A 为 0.1% 甲酸,流动相 B 为甲醇。流动相梯度洗脱程序见表 2。

质谱条件:质谱采用电喷雾离子源(ESI),喷雾电压正离子 3 500 V 负离子 3 100 V,鞘气体流速 35 arb,辅助气体流速 10 arb,毛细管温度  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.5 数据统计分析

试验数据通过预处理,利用代谢组学处理软件 Progenesis QI v2.3 软件(Nonlinear Dynamics,

Newcastle, UK) 分析,利用 PLS-DA、OPLS-DA 得分图和 PLS-DA 排序点图验证模型是否稳定和出现过拟合现象,用变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP)分析结合 *t* 检验来筛选差异代谢物。计算方法为 R 语言的 Cor 函数,其中  $Q^2$  代表模型预测率,  $R^2$  代表模型可解释率,  $Q^2 > 0.5$  表示模型具有较好的判别分析能力,  $Q^2$  和  $R^2$  越接近说明模型越稳定可靠无过拟合现象。基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,使用 KEGG、人类代谢组数据库(the human metabolome database, HMDB)、Lipidmaps (v2.3) 以及 Metabolute Link (METLIN) 数据库并结合文献进行定性。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Mobile phase gradient elution program %

时间 Time/ min	流动相 A Mobile phase A	流动相 B Mobile phase B
0.01	95	5
1.50	95	5
3.00	70	30
7.00	40	60
9.00	10	90
11.00		100
12.00		100
15.00	95	5

## 2 结果

### 2.1 不同饲料对蜜蜂死亡数量的影响

由表 3 可知,各组蜜蜂在第 1 和 2 天时均没有出现死亡;试验组 C 和试验组 D 均在第 3 天时出现死亡,在第 5 天时 30 只工蜂全部死亡;试验组 B 在第 3 天时出现死亡,在第 6 天时 30 只工蜂全部死亡;对照组和试验组 A 第 1~5 天时均没有出现死亡,在第 6 和 7 天时试验组 A 蜜蜂死亡数量均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同饲料对蜜蜂咽下腺发育的影响

由表 4 可知,工蜂食用人工饲料第 1 天时,对照组和试验组 A 咽下腺平均重量差异不显著( $P > 0.05$ );咽下腺颜色均为水白色;咽下腺小体饱满度均为不饱满。工蜂食用人工饲料第 3 天时,对照组和试验组 A 咽下腺平均重量差异不显著( $P > 0.05$ );对照组咽下腺颜色为水白色,试验组 A 咽

下腺颜色为少数乳白色,多数水白色;咽下腺小体饱满度均为不饱满。工蜂食用人工饲料第 5 天时,对照组和试验组 A 咽下腺平均重量差异不显著 ( $P>0.05$ );对照组咽下腺颜色为少数乳白色,多数水白色;试验组 A 咽下腺颜色为少数水白色,多数乳白色;对照组咽下腺小体饱满度为不饱满,试

验组 A 咽下腺小体饱满度为较饱满。工蜂食用人工饲料第 7 天时,对照组和试验组 A 咽下腺平均重量差异显著 ( $P<0.05$ );对照组咽下腺颜色为少数乳白色,多数水白色;试验组 A 咽下腺颜色为全部乳白色;对照组咽下腺小体饱满度为较饱满,试验组 A 咽下腺小体饱满度为饱满。

表 3 不同饲料对蜜蜂死亡数量的影响

Table 3 Effects of different diets on death number of honeybees

只

项目 Items	对照组 Control group	试验组 A Experimental group A	试验组 B Experimental group B	试验组 C Experimental group C	试验组 D Experimental group D
第 1 天 Day 1	0	0	0	0	0
第 2 天 Day 2	0	0	0	0	0
第 3 天 Day 3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1.67±0.58 <sup>b</sup>	4.67±1.15 <sup>c</sup>	6.33±0.58 <sup>d</sup>
第 4 天 Day 4	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	6.00±1.00 <sup>b</sup>	10.33±1.53 <sup>c</sup>	12.33±0.58 <sup>d</sup>
第 5 天 Day 5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	11.33±0.58 <sup>b</sup>	16.00±2.64 <sup>c</sup>	11.33±0.58 <sup>b</sup>
第 6 天 Day 6	3.67±1.53 <sup>c</sup>	0.67±0.58 <sup>b</sup>	11.00±1.00 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
第 7 天 Day 7	3.67±2.08 <sup>c</sup>	1.67±0.58 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ),相同或无字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ).

表 4 不同饲料对蜜蜂咽下腺发育的影响

Table 4 Effects of different diets on hypopharyngeal gland development of honeybees

项目 Items	组别 Groups	咽下腺平均重量 Mean weight of hypopharyngeal gland/mg	咽下腺颜色 Hypopharyngeal gland colour	咽下腺小体饱满度 Plumpness of hypopharyngeal gland corpuscle
第 1 天 Day 1	对照组 Control group	0.73±0.03	水白色	不饱满
	试验组 A Experimental group A	0.72±0.02	水白色	不饱满
第 3 天 Day 3	对照组 Control group	0.81±0.03	水白色	不饱满
	试验组 A Experimental group A	0.82±0.01	少数乳白色,多数水白色	不饱满
第 5 天 Day 5	对照组 Control group	0.84±0.02	少数乳白色,多数水白色	不饱满
	试验组 A Experimental group A	0.86±0.03	少数水白色,多数乳白色	较饱满
第 7 天 Day 7	对照组 Control group	0.90±0.02 <sup>a</sup>	少数乳白色,多数水白色	较饱满
	试验组 A Experimental group A	1.06±0.03 <sup>b</sup>	全部乳白色	饱满

同一时间同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ),无字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

In the same time and column, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), while with no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ).

### 2.3 蜜蜂代谢物 PCA

由图 1 可知,以基于 LC-MS 的代谢组学方法鉴别代谢物,总离子色谱图没有明显的峰漂移,具有稳定的保留时间。将提取出的数据矩阵进行单变量和多变量统计分析,通过  $t$  检验,设置阈值为

VIP>1.0,差异倍数(FC)>2.0,筛选出 429 个差异代谢物,其中 185 个下调,244 个上调。

由图 2-A 可知,每个点代表 1 个样本,点与点的距离代表样本之间的相似性,全部样本均在 95%的置信区间内,对照组与试验组 A 能够明显

区分(正方形代表对照组,三角形代表试验组 A)。

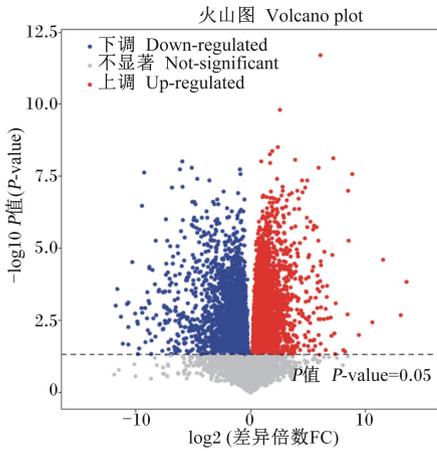


图 1 对照组与试验组 A 差异代谢物的火山图

Fig.1 Volcano plot of differential metabolites between control group and experimental group A

由图 2-B 可知,在 PCA 模型的基础上进一步探讨不同饲料对蜜蜂引起的代谢差异,找到差异

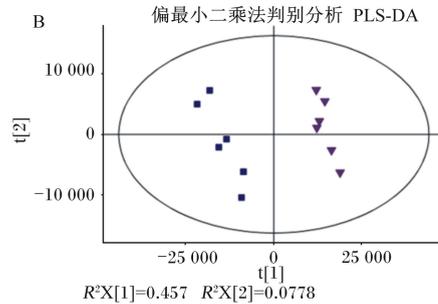
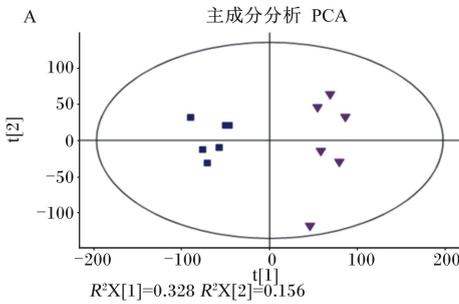


图 2 对照组与试验组 A 代谢物 PCA 和 PLS-DA 得分图

Fig.2 PCA and PLS-DA score scatter plots of metabolites between control group and experimental group A

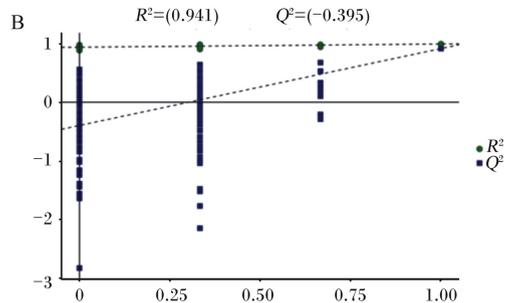
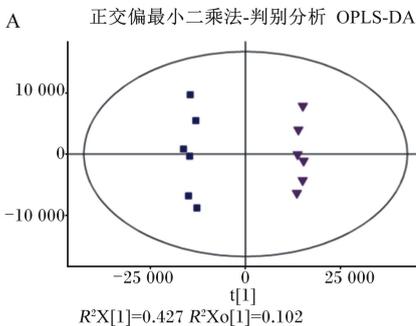


图 3 对照组与试验组 A 的 OPLS-DA 得分图和排序验证图

Fig.3 OPLS-DA score scatter plots and sorting validation plots between control group and experimental group A

代谢物,建立 PLS-DA 模型,对对照组和试验组 A 重建模型,放大它们之间的差异,得到更好的分类效果。运用交叉验证 (cross validation) 法对 PLS-DA 模型进行验证,  $Q^2$  均大于 0.50,模型均稳定可靠 ( $Q^2 > 0.50$  表示模型具有较好的判别分析能力)。

OPLS-DA 得分图见图 3-A,结合了正交信号校正 (OSC) 和 PLS-DA 方法,减少噪音干扰,使重要变量得到凸显,有利于差异代谢物的识别, OPLS-DA 分析通过去除不相关的差异来筛选,能够得到更准确的差异变量。对 OPLS-DA 模型分析,前 3 个有效主成分的  $R^2X(\text{cum}) = 0.628$ ,  $R^2Y(\text{cum}) = 0.995$ ,  $Q^2(\text{cum}) = 0.917$ ,表明模型质量较好(正方形代表对照组,三角形代表试验组 A)。

为了判别模型是否过拟合,对模型进行排序验证,见图 3-B。所有的  $Q^2$  均在  $R^2$  之下,并且  $Q^2$  的回归直线与 y 轴的交点均在 y 轴的负半轴 ( $Q^2 < 0$ ),没有过拟合现象,模型稳定可靠有意义,可进行差异代谢物的分析。

## 2.4 差异代谢物鉴定与分析

### 2.4.1 差异代谢物鉴定

由表 5 可知,试验组 A 与对照组的差异代谢物情况,利用代谢物的精确分子质量和二级质谱

信息在 KEGG、HMDB 等数据库搜索比对,进行鉴定指认,共指认出 23 个差异代谢物,包括氨基酸、维生素、糖类等,其中有 10 种代谢物上调,13 种代谢物下调。

表 5 对照组与试验组 A 的差异代谢物

Table 5 Differential metabolites between control group and experimental group A

项目 Items	代谢物 Metabolites	保留时间 RT/min	变量投 影重要度 VIP	变化趋势 Variation trend	P 值 P-value	分子式 Molecular formula
氨基酸 Amino acids	N-乙酰藜豆氨酸 N-acetyldjenkolic acid	1.12	8.23	下降	0.003 7	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
	酪氨酸 Tyrosine	3.74	5.26	下降	0.001 7	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>
	L-脯氨酸 L-proline	1.32	3.65	下降	0.006 4	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	谷氨酸 Glutamic acid	3.35	3.39	上升	0.008 9	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
	异亮氨酸 Isoleucine	4.15	3.43	上升	0.002 0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	赖氨酸 Lysine	2.97	3.18	上升	0.002 7	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	牛磺酸 Taurine	1.00	2.89	上升	0.000 8	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S
维生素 Vitamins	维生素 <sub>4</sub> Vitamin B <sub>4</sub>	1.02	5.83	上升	0.000 6	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>
	维生素 B <sub>2</sub> Vitamin B <sub>2</sub>	1.00	2.99	上升	0.000 4	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
	维生素 B <sub>5</sub> Vitamin B <sub>5</sub>	2.52	2.83	上升	0.000 5	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>
糖类及其衍生物 Sugars and their derivatives	葡萄糖酸 Gluconic acid	1.11	15.40	下降	0.019 0	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
	α-乳糖 α-lactose	1.21	4.51	下降	0.001 7	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
脂肪酸 Fatty acids	十二烷基葡萄糖苷 Dodecyl glucoside	5.19	2.57	下降	0.019 0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>
	棕榈酸 Palmitic acid	7.58	4.57	下降	0.001 1	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
核酸及其衍生物 Nucleic acids and their derivatives	硬脂酸 Stearidonic acid	7.68	2.38	上升	0.000 3	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
	肌苷 Inosine	1.47	3.11	下降	0.019 0	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
	阿糖基次黄嘌呤 Arabinosylhypoxanthine	1.06	2.65	下降	0.000 4	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
其他 Others	磷酸三乙酯 Triethyl phosphate	5.23	12.98	下降	0.027 0	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P
	胡椒碱 Piperonaline	4.55	4.69	下降	0.010 0	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>
	野百合碱 Monocrotaline	3.12	3.11	下降	0.007 3	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>
	3-羟基黄酮 3-hydroxyflavone	1.09	2.63	上升	0.000 8	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
	头孢呋辛 Cefuroxim	1.95	2.18	上升	0.002 6	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> OS
	巴比妥酸 Kynurenic acid	3.74	8.23	下降	0.000 2	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>

### 2.4.2 差异代谢物通路分析

由图 4 可知,差异极显著的通路有牛磺酸和亚牛磺酸生物合成通路,赖氨酸降解通路、戊糖磷酸盐代谢通路、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化通路 ( $P < 0.01$ ); 差异显著的通路有氨基酸的生物合成通路,色氨酸代谢通路,碳代谢通路,丁酸代谢通路,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路,丙酮酸代谢通路 ( $P < 0.05$ )。

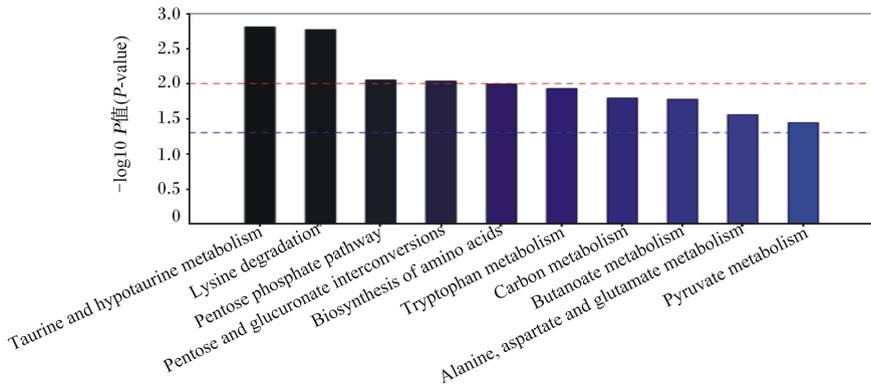
## 3 讨论

随着人们对蜜蜂种质资源的重视,引入蜜蜂

良种成为饲养管理的重要措施,其中长途邮寄蜂王引种又是目前最为常用方式。长途邮寄蜂王会装入几只陪嫁青年工蜂,再装入炼糖饲料,保证邮寄过程蜂王的安全,但通常会出现蜂王腹部收缩变小、延迟产卵的现象。蜜蜂营养对于蜜蜂正常生长、繁殖起着重要的作用,在日常饲养管理中通过补充蜂蜜和花粉来保证蜂群的生长和繁育<sup>[15]</sup>,但在长途邮寄等特殊环境中如何保证蜜蜂存活和发育。本试验通过陪嫁工蜂入手,通过不同配方的饲料对比,找到既能保证工蜂长时间存活又能保证咽下腺发育的饲料,这样陪嫁青年工蜂就能

分泌蜂王浆饲喂蜂王,保证蜂王的营养需求。然后利用代谢组学研究蜜蜂工蜂代谢规律,找到影

响工蜂生长发育的关键营养因子。



Taurine and hypotaurine metabolism:牛磺酸和亚牛磺酸生物合成;Lysine degradation:赖氨酸降解;Pentose phosphate metabolism:戊糖磷酸盐代谢;Pentose and glucuronate interconversions:戊糖和葡萄糖醛酸相互转化;Biosynthesis of amino acids:氨基酸的生物合成;Tryptophan metabolism:色氨酸代谢;Carbon metabolism:碳代谢;Butanoate metabolism:丁酸代谢;Alanine, aspartate and glutamate metabolism:丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;Pyruvate metabolism:丙酮酸代谢。

条柱的顶端高于蓝线时,其所代表的通路差异显著( $P<0.05$ );条柱的顶端高于红线时,其所代表的通路差异极显著( $P<0.01$ )。

When the top of the column was higher than the blue line, the pathway had significant difference ( $P<0.05$ ), and when the top of the column was higher than the red line, the pathway had significant difference ( $P<0.01$ ).

图4 差异代谢物 KEGG 代谢通路富集图

Fig.4 Differential metabolite KEGG metabolism pathway enrichment map

### 3.1 不同饲料对蜜蜂死亡数量的影响

根据工蜂在蜂群日常的饲料,本试验配制不同比例的蜂粮和花粉的人工饲料,与仅含有蜂蜜和蔗糖的练糖饲料对比。结果发现,最先出现蜜蜂死亡是试验组 C 和 D,出现在室内饲养的第 3 天,第 5 天时试验组 C 和 D 蜜蜂全部死亡。试验组 B 蜜蜂在第 5 和 6 天出现大量死亡,试验组 B 的饲料出现粘黏蜜蜂现象,这可能是导致蜜蜂出现大量死亡的原因。试验组 B、C、D 蜜蜂在 5 d 内即全部死亡,存活时间短,无法满足实际要求。7 d 内试验组 A 蜜蜂死亡数量最少,延长室内饲养时间发现 A 组蜜蜂存活时间更长且蜜蜂生命体征更活跃,表明试验组 A 的饲料更加适合蜜蜂,能够保证蜜蜂在无法排泄的特殊环境中正常存活,存活时间能够满足全国范围内的邮寄。Gregory<sup>[16]</sup> 研究发现,用不同蛋白质水平的代用花粉对实验室笼养蜜蜂进行寿命测定,得出蛋白质水平较高的代用花粉能提高工蜂存活率,本试验结果与此相一致。

### 3.2 不同饲料对蜜蜂咽下腺发育的影响

咽下腺是一对位于工蜂头部的内分泌腺体,是合成、分泌蜂王浆的主要腺体,其分泌物是饲喂蜂王和幼虫的主要食物,咽下腺的重量、颜色和饱满度是评价其发育的重要指标,一般认为颜色乳白色、咽下腺小体饱满是发育成熟的标识<sup>[17]</sup>。蜜蜂咽下腺的发育必须需要蛋白质,蜂王浆的多种生物活性成分也都与蛋白质有关。对能够长时间存活的对照组和试验组 A 蜜蜂,分别在食用饲料第 1、3、5、7 天时进行咽下腺解剖称重和观察,咽下腺的重量在食用饲料第 7 天时 2 组出现差异,试验组 A 蜜蜂的咽下腺重量显著大于对照组。咽下腺颜色在食用饲料第 3 天时出现不同,试验组 A 少数咽下腺小体为乳白色,而对照组咽下腺小体全部为水白色;第 7 天时试验组 A 咽下腺小体全部为乳白色,对照组咽下腺小体只有少数乳白色。对照组和试验组 A 咽下腺小体,食用饲料第 1 和 3 天后均呈不饱满状态,在食用饲料第 7 天后 A 组咽下腺小体十分饱满,对照组咽下腺小体还不是十分饱满。通过对咽下腺称重和颜色、饱满度的

观察,表明试验组 A 的蜜蜂在第 7 天时咽下腺基本发育成熟,试验组 A 饲料比对照组饲料更有助于蜜蜂咽下腺的发育。

### 3.3 不同饲料对蜜蜂生理代谢的影响

#### 3.3.1 氨基酸代谢

本研究结果显示,对照组和试验组 A 鉴定出 7 种氨基酸差异显著,其中 4 种氨基酸含量上升,3 种氨基酸含量下降。试验组 A 脯氨酸含量比对照组上升。白小琼等<sup>[18]</sup>研究表明,脯氨酸在蜜蜂的生长发育中起重要作用,约占蜜蜂氨基酸总需求量的 50%。试验组 A 牛磺酸含量比对照组上升,通过进一步对代谢通路分析发现牛磺酸和亚牛磺酸生物合成通路差异极显著。牛磺酸是一种含硫氨基酸,是重要的氨基酸,具有促进大脑发育、调节神经传导和参与胆盐代谢等功能<sup>[19]</sup>,而且是蜂王浆中重要的氨基酸。牛磺酸含量上升表明试验组 A 的饲料更加有利于蜜蜂咽下腺的发育,可能是咽下腺发育成熟导致分泌蜂王浆所致。试验组 A 赖氨酸含量比对照组下降,通过进一步对代谢通路分析发现赖氨酸降解通路出现差异。赖氨酸是蜜蜂体内的一种必需氨基酸,赖氨酸碳骨架分解后会形成乙酰-辅酶 A (CoA),以调节体内的脂肪酸合成异常,为脂质的合成提供前体物质<sup>[20]</sup>。氨基酸代谢在蜜蜂生长发育、提高免疫力、脂肪代谢等方面起到重要作用。

#### 3.3.2 维生素代谢

本试验中维生素检测出差异的有维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>4</sub> 和维生素 B<sub>5</sub>,试验组 A 比对照组含量均上升。维生素 B<sub>2</sub> 是自然界广泛分布的维生素,它参与构成各种黄素酶的辅基,在生物氧化过程中作为递氢体,与糖、蛋白质和脂肪代谢密切相关。蜂粮中含有丰富的维生素,试验组 A 蜜蜂 7 d 内死亡数量最少,且寿命比对照组蜜蜂长。廖春华等<sup>[21]</sup>研究表明,维生素 B<sub>2</sub> 对中华蜜蜂工蜂的寿命有影响,工蜂的平均寿命随着维生素 B<sub>2</sub> 添加量的升高而增加。维生素 B<sub>2</sub> 参与了蜜蜂体内的生物氧化,提高蜜蜂体内糖、蛋白质和脂肪的代谢能力,有利于蜜蜂个体的生长发育和延长蜜蜂个体的寿命。维生素 B<sub>4</sub> 在体内代谢中参与形成多种重要的中间物质,如 ATP、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)等,是 DNA 和 RNA 的重要组成部分。维生素 B<sub>5</sub> 主要以 CoA 形式参与糖、脂、蛋白质代谢。雷春红<sup>[22]</sup>研究表明,维生素 B<sub>5</sub> 可促进进

蜜蜂的生长发育,增强机体抗氧化能力。

#### 3.3.3 有毒物质代谢

差异代谢物中共鉴别指认出 4 种有毒代谢成分,分别是磷酸三乙酯、巴比妥酸、胡椒碱、野百合碱,这 4 种成分含量试验组 A 比对照组均下降。磷酸三乙酯在高剂量下产生一种麻醉现象和显著的肌肉松弛。胡椒碱属中毒类物质,大鼠的经口半致死剂量 514 mg/kg。野百合碱属高毒类物质,大鼠的经口半致死剂量 71 mg/kg。试验组 A 的有毒代谢产物含量比对照组均下降,可能是导致试验组 A 的蜜蜂寿命比对照组蜜蜂寿命长的原因,具体内部机理需要进一步研究。

#### 3.3.4 能量代谢

试验组 A 比对照组的肌苷含量上升。肌苷是机体内 ATP、CoA、DNA 和 RNA 的组成部分,参与机体的物质代谢和能量代谢。张鑫蕊等<sup>[23]</sup>研究表明,肌苷能提高肉鸡体内 ATP 的水平,可转化为多种核苷酸,参与蛋白质的合成并能提高各种酶的活性,刺激机体产生抗体。肌苷对蜜蜂的生长发育及代谢的影响目前还未见报道。

## 4 结 论

① 由蔗糖、蜂粮、蜂蜜按照 6:5:1 比例制成的人工饲料,在模拟邮寄环境中可提高蜜蜂存活率和寿命,而且有利于蜜蜂咽下腺的发育,因此在邮寄环境中可代替常用的炼糖饲料。

② 采用 LC-MS 检测饲喂试验组 A 和对照组饲料的 7 日龄工蜂,共筛选鉴定 23 种差异代谢物,主要包括脯氨酸、牛磺酸、赖氨酸、维生素 B<sub>2</sub>、肌苷等,主要涉及牛磺酸和亚牛磺酸生物合成通路、赖氨酸降解通路、能量代谢等通路。

### 参考文献:

- [1] RATNIEKS L W, CARRECK N L. Clarity on honey bee collapse? [J]. *Science*, 2010, 327(5962): 152-153.
- [2] 庄明亮,李志勇,王进洲,等.基于 LC-MS 技术的代谢组学方法研究吡虫啉对工蜂代谢的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(8): 2220-2227.  
ZHUANG M L, LI Z Y, WANG J Z, et al. Metabolomic analysis imidacloprid effect of honeybee worker based on liquid chromatograph mass spectrometer[J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 46(8): 2220-2227. (in Chinese)

- [ 3 ] 刘俊峰,吴小波,颜伟玉,等.饲粮蛋白水平对中华蜜蜂春繁性能及幼虫抗氧化性能的影响[J].江西农业大学学报,2011,33(5):960-964.  
LIU J F, WU X B, YAN W Y, et al. The Effect of dietary protein levels on spring multiplication and larva oxidative stability of *Apis cerana cerana*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2011, 33 ( 5 ) : 960-964. ( in Chinese )
- [ 4 ] 李成成,杨维仁,胥保华,等.意大利蜜蜂生长发育适宜蛋白供给水平及其对幼虫抗氧化活性的影响[J].中国农业科学,2011,44(22):4714-4720.  
LI C, YANG W R, XU B H, et al. Optimal protein levels required and their effects on larval antioxidation of *Apis mellifera ligustica* Spinola[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44 ( 22 ) : 4714-4720. ( in Chinese )
- [ 5 ] 王改英,杨维仁,胥保华.饲粮蛋白质水平对蜂群繁殖性能的影响[J].应用昆虫学报,2012,49(2):486-489.  
WANG G Y, YANG W R, XU B H. Effects of dietary protein levels on the reproductive performance of honeybee colonies[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2012, 49(2):486-489. ( in Chinese )
- [ 6 ] 冯倩倩,杨维仁,胥保华,等.维生素E对意大利蜜蜂产浆性能及抗氧化性的影响[J].福建农林大学学报(自然科学版),2011,40(6):632-635.  
FENG Q, YANG W R, XU B H, et al. Effects of vitamin E on royal jelly production and antioxidation of *Apis mellifera ligustica* [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University ( Natural Science Edition ), 2011, 40(6):632-635. ( in Chinese )
- [ 7 ] 冯倩倩,杨维仁,胥保华,等.不同水平维生素A对意大利蜜蜂春繁阶段群势及幼虫抗氧化性的影响[J].中国农业科学,2012,45(17):3584-3591.  
FENG Q, YANG W R, XU B H, et al. Effect of different levels of vitamin A on the colony development and larvae antioxidation of *Apis mellifera ligustica* during the period of spring multiplication [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45 ( 17 ) : 3584-3591. ( in Chinese )
- [ 8 ] 王颖.营养和空间因素对蜜蜂级型分化的影响[D].博士学位论文.泰安:山东农业大学,2015:32.  
WANG Y. Effects of nutritional factors and living space on the caste determination of honey bees [D]. Ph.D. Thesis. Taian: Shandong Agricultural University, 2015:32. ( in Chinese )
- [ 9 ] 延莎,赵柳徽,吴黎明.蜂粮及发酵蜂花粉产品研究进展[J].中国食物与营养,2019,25(7):9-15.  
YAN S, ZHAO L H, WU L M. Research advancement on bee bread and fermented bee pollen food [J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25 ( 7 ) : 9-15. ( in Chinese )
- [ 10 ] VAUDO A D, TOOKER J F, GROZINGER C M, et al. Bee nutrition and floral resource restoration [J]. Current Opinion in Insect Science, 2015, 10:133-141.
- [ 11 ] DI PASQUALE G, ALAUX C, LE CONTE Y, et al. Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health [J]. PLoS One, 2016, 11 ( 9 ) : e0162818.
- [ 12 ] 高丽娇,刘佳霖,罗文华,等.不同蜂花粉对意大利蜜蜂蜂群繁殖和工蜂发育的影响[J].动物营养学报,2019,31(10):4630-4636.  
GAO L J, LIU J L, LUO W H, et al. Effects of different bee pollens on colony reproduction and worker development of *Apis mellifera ligustica* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31 ( 10 ) : 4630-4636. ( in Chinese )
- [ 13 ] BARENE I, DABERTE I, SIKSNA S. Investigation of bee bread and development of its dosage forms [J]. Medicinos Teorija ir Praktika, 2015, 21(1):16-22.
- [ 14 ] ZULUAGA C M, SERRATO J C, QUICAZAN M C. Chemical, nutritional and bioactive characterization of colombian bee-bread [J]. Chemical Engineering Transactions, 2015, 43:175-180.
- [ 15 ] DEGRANDI-HOFFMAN G, ECKHOLM B, HUANG M. Methods for comparing nutrients in beebread made by Africanized and European honey bees and the effects on hemolymph protein titers [J]. Journal of Visualized Experiments, 2015(97):52448.
- [ 16 ] GREGORY P G. Protein diets and their effects on worker weight, longevity, consumption and hemolymph protein levels of *Apis mellifera* [C]//Proceedings of the american bee research conference, [ s.l. ] : [ s.n. ], 2006.
- [ 17 ] DEGRANDI-HOFFMAN G, CHEN Y P, HUANG E, et al. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. Journal of Insect Physiology, 2010, 56(9):1184-1191.
- [ 18 ] 白小琼,孔德义.牛磺酸研究进展[J].中国食物与营养,2011,17(5):78-80.  
BAI X X, KONG D Y. Research advancement of taurine [J]. Food and Nutrition in China, 2011, 17 ( 5 ) : 78-80. ( in Chinese )

- [19] DE GROOT A P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.) [J]. *Physiol Comp Oecologia*, 1953(3):197-285.
- [20] NARKEWICZ M R, JONES G, MORALES D. Serine and glycine transport in fetal ovine hepatocytes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, 2000, 1474(1):41-46.
- [21] 廖春华, 袁安, 吴小波, 等. 维生素 B<sub>2</sub> 对中华蜜蜂工蜂寿命及学习记忆能力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2016, 28(10):3346-3351.
- LIAO C H, YUAN A, WU X B, et al. Effects of vitamin B<sub>2</sub> on lifespan and learning memory ability of worker bees for *Apis cerana cerana* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(10):3346-3351. (in Chinese)
- [22] 雷春红. 饲料中泛酸水平对意大利蜜蜂生长性能、抗氧化性能及脂质代谢的影响 [D]. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学, 2017:19-20.
- LEI C H. Effects of dietary pantothenic acid level on growth performance, antioxidant indices and lipid metabolism of honey bee (*Apis mellifica* L.) [D]. Master's Thesis. Taian: Shandong Agricultural University, 2017:19-20. (in Chinese)
- [23] 张鑫蕊, 闫俊书, 宦海琳, 等. 肉种鸡饲料肌苷酸对生长后期子代生长性能及血清免疫指标的影响 [J]. *饲料工业*, 2019, 40(6):13-16.
- ZHANG X R, YAN J S, HUAN H L, et al. Effect of inosine acid in feedstuffs for broiler breeders on growth performance and serum immune indicators of offspring in later growth stage [J]. *Feed Industry*, 2019, 40(6):13-16. (in Chinese)

# Effects of Artificial Diets on Growth and Development and Physiological Metabolism of Young Worker Bees

ZHUANG Mingliang LI Jianfei LI Zhiyong\* WANG Zhi NIU Qingsheng

CHEN Donghai GE Peng ZHANG Fa

(Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China)

**Abstract:** To study the effects of different artificial diets on growth and development and physiological metabolism of young worker bees, the metabonomics analysis was conducted for worker bees based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and to provide some theoretical basis for the preparation of artificial diet of mated queen bee. A total of 300 one-day old *Apis mellifera ligustica* was selected and divided to 5 groups with 30 worker bees in each group, and fed with Five kinds of artificial diets. Control group diet: sucrose powder :honey = 3:1; experimental group A diet :sucrose powder :bee feed :honey = 6:5:1; experimental group B diet: sucrose powder :bee feed :honey = 6:3:1; experimental group C diet: sucrose powder :pollen :honey = 6 :5:1; experimental group D diet: sucrose powder :pollen :honey = 6:3:1. Five kinds of artificial diet were used for indoor feeding, recorded the death number of honeybees within 7 days. The hypopharyngeal glands of worker bees on days 1, 3, 5 and 7 were dissected and measured the average weighing, color and plumpness. The metabolite differences of honeybees after feeding 7 days between experimental group A and control group were detected by LC-MS method, the detected data were carry out the pattern recognition analysis, screened and identified the different metabolites. The results showed as follows: 1) the honeybees in control group and experimental group A were no death during days 1 to 5, the death number of honeybees on days 6 and 7 of experimental group A was significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The honeybees in experimental groups B, C and D were all died within 6 days. 2) The mean weight of hypopharyngeal gland of honeybees on day 7 of experimental group A was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ), the hypopharyngeal gland colour were all milky white, and hypopharyngeal gland corpuscle was plump. 3) The metabolomic data were analyzed by principal component analysis (PCA), partial leastsquares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial leastsquares-discriminant analysis (OPLS-DA), the results showed that the experimental group A and the control group were significantly separated, the 23 different metabolites were identified, included amino acid, lipid and saccharides, among then, 10 metabolites were up-regulated and 13 metabolites were down-regulated. The differential metabolite pathways analysis showed that the pathways with significant differences were taurine and hypotaurine metabolism pathway, alysine degradation pathway, pentose phosphate metabolism pathway and pentose and glucuronate interconversions pathway ( $P < 0.01$ ), and the pathways with significant differences were biosynthesis of amino acids pathway, tryptophan metabolism pathway, carbon metabolism pathway, butanoate metabolism pathway, alanine, aspartate and glutamate metabolism pathway and pyruvate metabolism pathway ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the diet of experimental group A is more suitable for the growth, development and survival of worker bees, it can replace the common sugar refining diet in mailing environment. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(2): 1070-1080 ]

**Key words:** honeybees; bee feed; life span; hypopharyngeal gland; metabolites analysis