

温度对中华蜜蜂和意大利蜜蜂个体主要抗寒生理指标的影响*

徐 凯^{1, 2**} 牛庆生^{1***} 刘玉玲¹ 陈东海¹
杜亚丽² 郭丽娜² 赵慧婷³ 姜玉锁^{2***}

(1. 吉林省养蜂科学研究所, 吉林 132108; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801;
3. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801)

摘 要 【目的】为了探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 个体耐寒性差异的生理机制。【方法】本试验分别对 20 日龄的中华蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂进行 0、10、25 °C 持续 4 h 的温度处理, 随后测定不同温度处理后两蜂种体内葡萄糖、甘油和氨基酸的含量。【结果】低温状态下中华蜜蜂体内葡萄糖含量显著降低, 意大利蜜蜂在 0 °C 组显著下降却在 10 °C 组显著上升; 中华蜜蜂体内甘油在低温环境下显著积累, 意大利蜜蜂体内甘油水平在 10 °C 时显著的上调却在 0 °C 组无显著变化; 中华蜜蜂体内 17 种氨基酸在各温度处理间显著变化, 且多数的氨基酸含量表现出 10 °C 组降低而 0 °C 组积累的趋势, 意大利蜜蜂体内只有 15 种氨基酸参与机体的抗寒机制, 其中多数的氨基酸表现为低温环境下大量积累, 仅有亮氨酸和精氨酸表现为低温时被转化消耗的现象。【结论】低温条件下可引起两蜂种体内葡萄糖、甘油和氨基酸含量的显著变化, 初步推测蜜蜂体内可能存在“葡萄糖-甘油-氨基酸”的抗寒物质系统, 但两蜂种在不同程度的低温处理后各生理指标的变化存在较大的差异, 从一定程度上阐释两蜂种抗寒性的差异。本研究为蜜蜂个体抗寒生理机制的进一步研究提供基础数据, 同时为蜜蜂抗寒新品系的选育提供理论依据。

关键词 中华蜜蜂, 意大利蜜蜂, 生理指标, 低温胁迫, 抗寒物质系统

Effects of temperature on major physiological indicators of cold tolerance in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*

XU Kai^{1, 2**} NIU Qing-Sheng^{1***} LIU Yu-Ling¹ CHEN Dong-Hai¹
DU Ya-Li² GUO Li-Na² ZHAO Hui-Ting³ JIANG Yu-Suo^{2***}

(1. Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 3. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the physiological mechanisms responsible for differences in cold tolerance between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. 【Methods】Twenty-day old adult worker bees of each species were exposed to either 0 °C, 10 °C and 25 °C for 4 h in a constant temperature and humidity incubator after which their glucose, glycerin and amino acid content was detected. 【Results】The glucose content of *A. c. cerana* decreased significantly at 0 °C and 10 °C whereas that of *A. m. ligustica* decreased in the 0 °C treatment group but increased in the 10 °C treatment group. Glycerin content increased with at 0 °C and 10 °C in *A. c. cerana* but increased in the 10 °C treatment group, and underwent no significant change in the 0 °C group, in *A. m. ligustica*. Temperature significantly affected amino acid levels in *A. c. cerana*; 16 of the 17 amino acids measured declined in the 10 °C group and increased in the 0 °C group. In contrast, levels of only 15

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金资助项目 (31372386); 国家蜂产业技术体系专项 (CARS-44-SYZ 4); 吉林省中青年科技创新领军人才及团队项目 (20180519009JH); 吉林省科技创新中心-基地与科技服务平台建设 (20180623003TC)

**第一作者 First author, E-mail: xukaiyuzhong@126.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: 1463199779@qq.com; jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2017-10-31, 接受日期 Accepted: 2017-12-28

amino acids changed dramatically with temperature in *A. m. ligustica*. Most amino acids increased as temperature decreased, except leucine and arginine which decreased at low temperatures. **[Conclusion]** Levels of glucose, glycerin and amino acids were significantly affected by temperature, which suggests that there may be a “glucose-glycerin-amino acid” system that enhances cold hardiness in *A. c. cerana* and *A. m. ligustica*. The different effects of temperature on levels of these cryoprotectants in these two species may to some extent explain their different degrees of cold tolerance. This study provides a foundation for further study of the physiological mechanisms underlying cold tolerance in honey bees, and a theoretical basis for breeding of new, more cold-resistant strains.

Key words *Apis cerana cerana*, *Apis mellifera ligustica*, physiological indicators, cold stress, substance system

温度是决定昆虫生长发育和地域分布的一个重要的非生物因素,为了缓解由于季节周期或者偶然因素引起的温度变化对昆虫自身的伤害,处于高纬度和高海拔地区繁殖的昆虫不得不进化出一系列生理生化机制来降低低温对机体的伤害 (Doucet *et al.*, 2009)。昆虫的抗寒生理机制是一个极为复杂的生理过程,不同的昆虫种类和分布区域也使昆虫的抗寒生理机制呈现多样化 (黄国洋等, 1990)。蜜蜂属于膜翅目昆虫,对我国现代农业的发展和自然生态环境的保护具有重要的作用 (Zhang *et al.*, 2014)。蜜蜂对气温的变化极为敏感,低温不但可以直接延缓蜜蜂个体的生长发育和降低繁殖效率,而且极大程度上影响了蜜蜂对蜜粉源的采集行为 (周冰峰, 2002; 陈琳等, 2016)。蜜蜂个体抗寒生理机制的研究对提高早春和越冬期蜂群的饲养管理水平和蜜蜂抗寒新品系的选育具有重要的作用。

昆虫抗寒生理机制的研究主要体现在昆虫体内抗寒物质的积累上,这些抗寒物质主要包括糖类、多元醇、氨基酸和糖蛋白。如欧桦小蠹虫 *Scolytus ratzeburgi* Janson 幼虫体内存在“甘油-山梨醇-葡萄糖-海藻糖”的抗寒物质系统 (Holden and Storey, 1994)。桑螟 *Phthonadria atrilineata* 越冬幼虫以“小分子碳水化合物-氨基酸-甘油-蛋白质-结合脂肪”组成抗寒物质系统 (陈永杰等, 2005)。茶尺蠖 *Ectropis obliqua* Prout 在经过低温驯化后糖原、脂质和蛋白质水平显著上升,显示出“糖原-脂质-蛋白质”的抗寒系统 (段小凤等, 2015)。诸如上述昆虫抗寒生理机制的研究很多,但关于社会性膜翅目昆虫的抗寒生理机制的相关研究鲜见报道。目前我国

养蜂业中养殖规模最大的蜂种资源分别是本地品种中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (下文简称中蜂) 和引入品种意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (下文简称意蜂)。两蜂种在对低温的适应性方面具有较大的差异,例如中蜂的个体临界温度较意蜂低 3 °C (吴杰, 2012), 东方蜜蜂的过冷却点较西方蜜蜂低 1 °C (李志勇等, 2006)。本研究对不同温度处理后中蜂和意蜂工蜂体内葡萄糖、甘油和氨基酸含量进行测定,从抗寒物质代谢的角度探究两蜂种低温适应性的差异,以期为蜜蜂个体抗寒生理机制的进一步研究提供基础数据,同时为蜜蜂抗寒新品系的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂个体的温度处理

试验所用中蜂和意蜂均采自山西农业大学动物科技学院实验蜂场。各选取健康无病、群势 6 足框、无自然分蜂的正常蜂群 3 群。在每群蜂中各挑选 1-2 个正在产卵的巢脾进行标记,从产卵的当天进行记录,在第 20 天取出老熟的封盖子脾,置于 34 °C 的恒温恒湿箱中,待其羽化出房后,用无毒、无味的油漆在其胸背部标记工蜂 500 头后,放回原蜂群中,随后在 20 日龄采样。不同温度处理的蜜蜂取样后 ($n=300/\text{品种}$) 均单独放置于扎孔的 15 mL 离心管中,分别将其放入 25、10、0 °C 的恒温恒湿箱中,每个温度处理的样本量均为 90 头,计时,于 4 h (前期预实验获得的最佳处理时间) 后取出后迅速投入液氮中,随后于 -80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法)购自南京建成生物工程研究所;组织甘油含量酶法测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司,17种氨基酸混合标准品购自Sigma公司,浓盐酸、异硫氰酸苯酯、三乙胺、乙腈和醋酸钠购自国药集团化学试剂有限公司。

恒温恒湿培养箱 HWS-0358 (宁波江南仪器厂),5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf),ND-1000 核酸蛋白测定仪 (Nanodrop),全功能微孔光度检测仪 (BioTek),液相色谱分析仪 (ThermoFisher U3000)。

1.3 蜜蜂体内葡萄糖含量的测定

取处理后的样品,用液氮研磨后按重量比1:20加入相应的生理盐水,旋涡混匀。按照葡萄糖测定试剂盒的方法测定各样品的吸光度。葡萄糖含量(mmol/L) = 样本管吸光度/校准管吸光度 $\times$ 校准液浓度。

1.4 蜜蜂体内甘油含量的测定

取处理后的蜜蜂样品,用液氮研磨后按每克样品加入2 mL裂解液后匀浆,然后按照试剂盒操作说明书测定各样品管的吸光度。将标准品分别稀释为1 000、500、250和125 mmol/L 后测定各标准管的吸光度,随后进行标准曲线的绘制。本试验所得的标准曲线方程为 $y=0.2942x-0.0337$, $R^2=0.9992$ 。根据该方程将各样本的吸光度换算为相应的甘油含量,再以每毫克蛋白浓度校正获得最终的甘油含量。

1.5 蜜蜂体内氨基酸含量的测定

蜜蜂体内各氨基酸的含量通过高效液相色谱法(HPLC法)测定,样品的测定由青岛科标检测研究院有限公司完成。

1.6 数据统计分析

运用SPSS17.0软件中的单因素ANOVA方法进行方差分析,并选用Duncan's新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同温度处理对蜜蜂体内葡萄糖含量的影响

中蜂和意蜂工蜂个体经不同温度处理后体内葡萄糖含量见图1。由图1可知,中蜂、意蜂不同温度处理后(各自)体内葡萄糖含量存在显著的变化($P < 0.05$),且两蜂种间的葡萄糖水平存在一定差异。在中蜂体内,25 $^{\circ}\text{C}$ 处理组的葡萄糖含量最高,0 $^{\circ}\text{C}$ 组次之,10 $^{\circ}\text{C}$ 组的含量最低且显著低于25 $^{\circ}\text{C}$ 组和0 $^{\circ}\text{C}$ 组($P < 0.05$)。在意蜂体内,10 $^{\circ}\text{C}$ 组的葡萄糖含量最高,显著高于25 $^{\circ}\text{C}$ 组和0 $^{\circ}\text{C}$ 组($P < 0.05$),并且25 $^{\circ}\text{C}$ 处理组的葡萄糖含量显著高于0 $^{\circ}\text{C}$ 组($P < 0.05$)。通过比较两蜂种在不同处理后的葡萄糖水平可发现,中蜂体内的葡萄糖含量显著高于意蜂($P < 0.05$)。

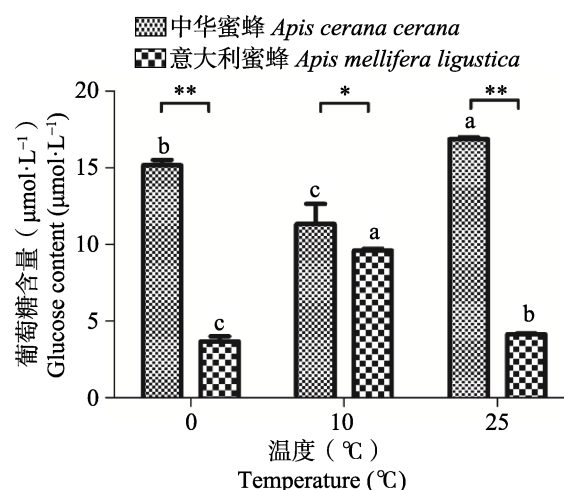


图1 不同温度处理下蜜蜂体内葡萄糖含量

Fig. 1 The glucose contents of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* in different temperature treatments

柱上标有不同字母表示相同品种不同温度处理间差异显著($P < 0.05$);**和*分别表示不同品种在同一温度处理在0.01和0.05水平上的差异显著。下同。

Histograms with different lowercase letters indicate significantly different between different temperature treatments of the same species at 0.05 level. ** and * indicate significantly different between different species of the same stages at 0.01 level and 0.05 level, respectively. The same below.

2.2 不同温度处理对蜜蜂体内甘油含量的影响

中蜂和意蜂工蜂个体经不同温度处理后体内甘油含量见图 2。由图 2 可知,中蜂、意蜂两蜂种体内的甘油含量在不同温度处理组间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。在中蜂体内,10 °C 处理组的甘油水平最高,0 °C 处理组次之,25 °C 处理组甘油含量最低 ($P < 0.05$)。在意蜂体内,10 °C 处理组的甘油水平最高,显著高于 0 °C 和 25 °C 处理组 ($P < 0.05$),但 25 °C 和 0 °C 两处理组之间无显著差异。此外,比较两蜂种在相同处理时的甘油含量可发现,意蜂体内甘油含量要显著高于中蜂 ($P < 0.01$)。

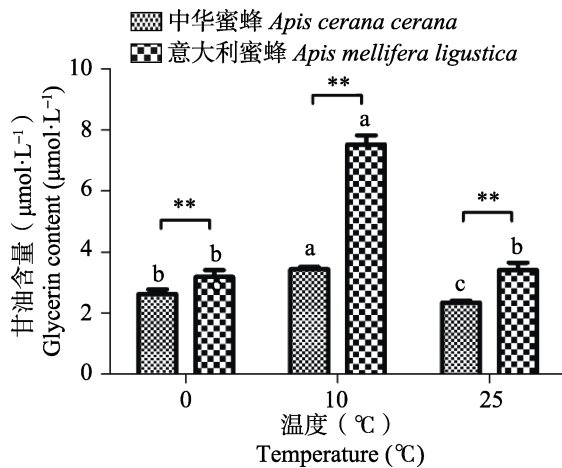


图 2 不同温度处理下蜜蜂体内甘油含量
Fig. 2 The glycerin contents of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* in different temperature treatments

2.3 不同温度处理对蜜蜂体内氨基酸含量的影响

中华蜜蜂和意大利蜜蜂不同温度下体内氨基酸含量见表 1。由表 1 可知,中蜂、意蜂两蜂种在不同温度处理后体内氨基酸含量存在显著差异 ($P < 0.05$)。在中蜂体内,17 种氨基酸的含量在不同处理间均存在显著差异 ($P < 0.05$),其中,除半胱氨酸的含量表现为 0 °C 处理组最高,10 °C 组次之,25 °C 含量最低之外,其他各氨基酸均表现为 0 °C 处理组表达量最高,25 °C 组次之,10 °C 组含量最低。在意蜂体内,除谷氨酸和缬氨酸之外 15 种的含量在各处理组均存

在显著差异 ($P < 0.05$),在其他氨基酸中,大多数氨基酸(丝氨酸、半胱氨酸、组氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸以及赖氨酸)的含量表现为 10 °C 组最高,0 °C 组次之,25 °C 组最低;甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸的含量表现为 0 °C > 10 °C > 25 °C;亮氨酸和精氨酸的含量表现为 10 °C > 25 °C > 0 °C;天冬氨酸的含量表现为 0 °C 组显著高于 10 °C 和 25 °C,且 10 °C 和 25 °C 两组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。通过比较两蜂种各氨基酸的含量可发现,除谷氨酸、甘氨酸和脯氨酸之外,其余氨基酸在两蜂种体内的含量存在极显著的差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 蜜蜂个体抗寒生理机制的假设

根据昆虫对低温或结冰的适应性,早期的研究将昆虫分为耐结冰型和避免结冰型两类,但随着研究的逐渐深入,该分类已不能满足所有昆虫的分类需要。Bale 等 (1996) 在研究中将冷休克以及持续性或短期低温的行为添加到二分法中形成了从最不耐寒到最耐冻的 5 个等级的分法。但最近有研究将冷休克、体液结冰和冰冻伤害的不断累积这 3 种低温伤害作为衡量指标将昆虫分为 8 个等级,其涉及不适应低温到对 3 种低温策略高度适应的所有昆虫 (Nedved, 2000)。其中最不耐寒的等级被称为“Sneezy”,该等级对冷休克,体液结冰和冰冻伤害的不断累积都十分敏感,这种昆虫以家蝇 *Musca domestica* 和果蝇 *Drosophila melanogaster* 这些热带昆虫为代表 (Coulson and Bale, 1990; Czajka and Lee, 1990)。结合蜜蜂对低温的适应性以及在低温时的体征表现,本研究中暂时将蜜蜂的抗寒等级定为“Sneezy”级,其与果蝇保持一致,为低温与结冰极为敏感 (Chill and freeze sensitive) 型。对果蝇抗寒生理机制的研究表明,果蝇通过增加体内“糖原-三酰基甘油-脯氨酸”抗寒系统的浓度来提高机体抗寒性 (Chen and Walker, 1993)。与果蝇相比,蜜蜂也具有自身独特的对低温的适应性,例如,蜜蜂体内供能的主要碳源为葡萄糖,

表 1 不同温度处理下蜜蜂血淋巴中氨基酸含量
Table 1 The amino acid contents of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* in different temperature treatments

氨基酸 Amino acids		中华蜜蜂 <i>Apis cerana cerana</i>			意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera ligustica</i>			品种间差异 Varietal difference
		0 °C	10 °C	25 °C	0 °C	10 °C	25 °C	
天冬氨酸	Asp	13.27±0.13 ^a	10.33±0.08 ^c	11.12±0.19 ^b	11.12±0.04 ^a	9.12±0.21 ^b	9.00±0.09 ^b	**
谷氨酸	Glu	20.53±0.07 ^a	13.04±0.09 ^c	18.15±0.06 ^b	16.83±0.08 ^a	12.33±7.88 ^a	13.11±0.06 ^a	ns
半胱氨酸	Cys	5.36±0.16 ^a	4.42±0.04 ^b	3.54±0.05 ^c	3.72±0.07 ^a	3.46±0.09 ^b	3.78±0.01 ^a	**
丝氨酸	Ser	10.86±0.02 ^a	6.74±0.13 ^c	8.33±0.01 ^b	6.70±0.01 ^b	6.96±0.01 ^a	5.97±0.01 ^c	**
甘氨酸	Gly	11.26±0.03 ^a	7.99±0.04 ^c	8.78±0.01 ^b	9.24±0.02 ^a	9.18±0.01 ^b	8.48±0.02 ^c	ns
组氨酸	His	6.84±0.01 ^a	5.13±0.09 ^c	5.37±0.05 ^b	2.99±0.01 ^b	3.23±0.02 ^a	2.77±0.01 ^c	**
精氨酸	Arg	14.55±0.12 ^a	9.87±0.11 ^c	10.78±0.09 ^b	7.26±0.02 ^c	7.82±0.02 ^a	7.34±0.02 ^b	**
苏氨酸	Thr	8.82±0.03 ^a	5.94±0.07 ^c	6.62±0.18 ^b	5.18±0.02 ^b	5.37±0.01 ^a	4.74±0.01 ^c	**
丙氨酸	Ala	14.52±0.05 ^a	10.60±0.21 ^b	10.86±0.09 ^b	10.87±0.02 ^a	10.76±0.01 ^b	9.82±0.01 ^c	**
脯氨酸	Pro	13.06±0.11 ^a	9.23±0.13 ^c	9.98±0.01 ^b	10.99±0.01 ^a	10.68±0.03 ^b	10.46±0.01 ^c	ns
酪氨酸	Tyr	8.47±0.01 ^a	6.23±0.1 ^c	6.64±0.03 ^b	5.14±0.58 ^{ab}	5.70±0.05 ^a	5.01±0.01 ^b	**
缬氨酸	Val	10.94±0.02 ^a	8.20±0.11 ^c	8.68±0.06 ^b	7.51±1.75 ^a	8.63±0.01 ^a	7.81±0.01 ^a	**
蛋氨酸	Met	4.14±0.03 ^a	3.32±0.05 ^c	3.44±0.05 ^b	3.02±0.01 ^b	3.43±0.01 ^a	2.55±0.01 ^c	**
异亮氨酸	Ile	9.38±0.02 ^a	6.89±0.17 ^c	7.52±0.06 ^b	6.90±0.03 ^b	7.47±0.07 ^a	6.78±0.02 ^c	**
亮氨酸	Leu	15.78±0.03 ^a	11.39±0.32 ^c	12.36±0.14 ^b	11.16±0.01 ^c	12.31±0.06 ^a	11.62±0.03 ^b	**
苯丙氨酸	Phe	7.28±0.01 ^a	5.46±0.12 ^c	5.94±0.01 ^b	4.93±0.008 ^b	5.10±0.01 ^a	4.70±0.01 ^c	**
赖氨酸	Lys	12.83±0.03 ^a	9.30±0.11 ^c	10.36±0.01 ^b	9.08±0.02 ^b	9.40±0.01 ^a	8.46±0.01 ^c	**

表中数据为平均数±标准差, 不同字母表示相同品种不同温度处理间差异显著 ($P < 0.05$), **分别表示不同品种在同一温度处理在 0.01 水平上的差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示不同品种间氨基酸含量无显著差异 ($P > 0.05$)。
Data are mean±SD, and followed by different lowercase letters indicate significant difference among treatments in the same species at the 0.05 level, ns indicate that there are no significant difference between different species in amino acid contents.

其越冬日粮中还包括大量花粉, 采自外界的多种蜜粉源植物, 花粉的主要成分为多种氨基酸。本试验结果也表明蜜蜂个体体内葡萄糖、甘油和各氨基酸在不同温度处理组中的含量存在显著差异。因此, 本研究推测蜜蜂个体抗寒机制可能为“葡萄糖-甘油-多种氨基酸”系统。

3.2 低温处理对蜜蜂体内葡萄糖含量的影响

碳水化合物是昆虫越冬期重要的抗寒物质。葡萄糖是蜜蜂越冬期间的主要能源物质(蜂蜜和转化糖)的主要成分, 该生理指标水平也直接反映出蜜蜂个体在抵御低温时能量的代谢与积累。在本试验中发现, 中蜂在低温 4 h 后葡萄糖水平均出现了显著下降, 表明中蜂在低温时通过转化

葡萄糖为 ATP 来缓解低温对机体的伤害, 该结果与桑螟越冬幼虫体越冬前期的研究结果类似(陈永杰等, 2005)。其中 10 °C 时葡萄糖水平显著低于 0 °C 推测是由于 0 °C 时温度过低, 新陈代谢速率下降所导致的。意蜂 0 °C 时葡萄糖水平较 25 °C 时出现显著下降, 与中蜂结果相似。但 10 °C 时, 意蜂葡萄糖水平大量积累, 显著高于 25 °C 和 0 °C 处理组, 该结果与低温处理下黄地老虎幼虫体内血糖水平大量积累的结果相近(黄国洋等, 1990), 推测可能是因为意蜂通过积累葡萄糖水平来应对轻度的低温应激, 但绝不排除是由于自身其他能源物质代谢所引起的代谢产物(葡萄糖)的大量合成, 该推测还有待于进一步的试验证明。比较两蜂种的葡萄糖水平不难看出中蜂

体内葡萄糖水平显著高于意蜂,其表明在低温环境下中蜂体内葡萄糖代谢速率显著高于意蜂,该结果有可能与中蜂较意蜂个体更抗寒的现象有一定的关联性。

3.3 低温处理对蜜蜂体内甘油含量的影响

甘油作为当前公认的具有抗寒保护作用的一种多元醇,在昆虫抗寒生理机制的相关研究中屡见报道,多数的研究表明在低温下机体细胞合成并积累一定的甘油有利于缓解冰冻与低温对细胞的机械损伤(Chen and Walker, 1993; Kostal *et al.*, 2007)。本研究中发现中蜂体内甘油水平在各温度处理组之间显著变化,其低温处理组的甘油水平显著高于 25 °C 组,表明在低温下中蜂体内甘油出现一定积累,甘油的积累有助于中蜂抵御寒冷。10 °C 组的表达量高于 0 °C 组,可能与不同温度下蜜蜂新陈代谢速率有关。在意蜂体内发现,0 °C 组与 25 °C 甘油水平无显著变化,可能是由于 0 °C 时温度过低,机体甘油合成速率过低导致。10 °C 处理组甘油水平显著高于其他两组,其水平是 0 °C 和 25 °C 组的 2 倍以上,表明意蜂在轻度低温的情况下甘油的保护效果极为显著。经过比较两蜂种的甘油水平可发现,意蜂体内甘油水平显著高于中蜂,该结果表明甘油对意蜂的低温保护作用要高于中蜂。

3.4 低温处理对蜜蜂体内氨基酸含量的影响

氨基酸作为构成蛋白质的基本单位参与了大多数的能量物质代谢,近年来研究表明,机体内游离氨基酸含量与昆虫抗寒能力存在一定的相关性。张拥军(2007)在二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫的研究中表明二化螟体内丙氨酸和丝氨酸的含量在越冬期间显著上调,并推测丙氨酸可能参与屏蔽晶核的作用,从而降低冰点和过冷却点,该结果与桑尺蠖 *Phthonandria atrilineata* Butler 和松阿扁叶蜂 *Acantholyda posticalis* 的抗寒生理机制的研究相似(孙绪良等, 2000; 梁中贵等, 2005)。同时,也有研究表明脯氨酸的含量与昆虫的抗寒性相关,并指出脯氨酸除了作为能量代谢外还具有维持细胞膜

稳定性的作用,可提高果蝇的抗寒能力(Chen and Walker, 1993)。近年来的研究表明多数的氨基酸的含量均与昆虫的抗寒性相关,如丝氨酸、丙氨酸、酪氨酸、赖氨酸以及精氨酸参与了桑螟的抗寒生理机制(陈永杰等, 2005)。谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甘氨酸参与桃小食心虫 *Carposina sasakii* Matsumura 的抗寒生理机制(赵楠等, 2014)。本研究中结果表明,中蜂、意蜂体内各氨基酸的水平在不同处理组间的变化趋势存在较大差异,表明多种氨基酸的含量与蜜蜂的低温适应性相关,与上述研究结果相近。在中蜂体内 17 种氨基酸的含量在不同温度处理组间均存在显著变化,与 25 °C 处理组相比,16 种氨基酸(除半胱氨酸)表现为在 0 °C 时大量积累,而在 10 °C 时存在大量的消耗转化,推测可能是由于中蜂在轻度低温时通过转化氨基酸为能量来抵御寒冷,而在低温情况下通过各氨基酸的大量积累,通过对细胞膜的保护等一系列途径发挥着低温保护作用(Chen and Walker, 1993)。而在意蜂体内,根据各氨基酸水平的变化趋势可分为以下几类,其中,12 种氨基酸(丝氨酸、半胱氨酸、组氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、赖氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸以及天冬氨酸)表现为低温处理后各氨基酸水平显著提高,表明这 12 种氨基酸的积累有助于意蜂抵御寒冷。与上述氨基酸相反的是,亮氨酸和精氨酸表现为低温处理后其含量显著下降,表明这两种氨基酸可能在意蜂遇到低温应激时被转化为能量或转化为其他抗寒类物质来提高机体的抗寒性。除此之外,谷氨酸和缬氨酸在不同处理间无显著变化,表明该氨基酸可能不参与意蜂的抗寒生理机制。通过比较两蜂种间各氨基酸的含量发现脯氨酸的表达量在两蜂种间无显著差异,提示脯氨酸在两蜂种抗寒机制中可能存在一定的共性作用。

4 结论

蜜蜂个体的抗寒生理机制可能为“葡萄糖-

甘油-多种氨基酸”的抗寒物质系统,该系统在中蜂、意蜂两蜂种间存在一定程度上的差异。在低温环境下,中蜂在依赖葡萄糖代谢的程度上高于意蜂,而意蜂体内甘油积累程度远远高于中蜂,中蜂体内参与抗寒功能的氨基酸种类为 17 种,高于意蜂(15 种),而且各氨基酸在两蜂种不同低温温度处理时的变化也存在一定差异,上述的差异可能是两蜂种对低温适应性不同的主要原因。

参考文献 (References)

- Bale JS, 1996. Insect cold hardiness: A matter of life and death. *European Journal of Entomology*, 93(3): 369–382.
- Chen CP, Walker VK, 1993. Increase in cold-shock tolerance by selection of cold resistant lines in *Drosophila melanogaster*. *Ecological Entomology*, 18(3): 184–190.
- Chen L, Xu XJ, Wang Q, Zhu XJ, Hao ZB, Zhou SJ, Zhou BF, 2016. Effects of low temperature on unfertilized honeybee (*Apis mellifera ligustica*) eggs. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(3): 574–580. [陈琳, 徐新建, 王青, 朱翔杰, 郝振帮, 周姝婧, 周冰峰, 2016. 低温 20 °C 对意大利蜜蜂未受精卵发育的影响. 应用昆虫学报, 53(3): 574–580.]
- Chen YJ, Sun XG, Zhang WG, Guo YY, Mu ZG, Guo GZ, 2005. Relationship between variation of protein, amino acid, low-molecular carbohydrate in over-wintering *Diaphania pyralis* Walker larvae and cold-hardiness. *Science of Sericulture*, 31(2): 111–116. [陈永杰, 孙绪良, 张卫光, 郭彦彦, 牟志刚, 郭光智, 2005. 桑螟越冬幼虫体内蛋白质、氨基酸、碳水化合物变化与抗寒性的关系. 蚕业科学 31(2): 111–116.]
- Coulson SJ, Bale JS, 1990. Characterisation and limitations of the rapid cold-hardening response in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Insect Physiology*, 36(3): 207–211.
- Czajka MC, Lee RE Jr, 1990. A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 148: 245–254.
- Doucet D, Walker VK, Qin W, 2009. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects. *Cell Mol. Life Sci.*, 66(8): 1404–1418.
- Duan XF, Wang XQ, Li PW, Tian JT, Peng P, Chen SC, 2015. Effects of cold hardening on physiological indices related to cold tolerance in *Ectropis obliqua* pupae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1413–1420. [段小凤, 王晓庆, 李品武, 田景涛, 彭萍, 陈世春, 2015. 冷驯化对茶尺蠖抗寒性生理指标的影响. 应用昆虫学报, 52(6): 1413–1420.]
- Holden CP, Storey KB, 1994. 6-phosphogluconate dehydrogenase from a freeze tolerant insect: Control of the hexose monophosphate shunt and NADPH production during cryoprotectant synthesis. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 24(2): 167–173.
- Huang GY, Wang MC, You ZP, 1990. Studies on cold tolerance functions of *Agrotis segetum*. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 24(2): 140–146. [黄国洋, 王萌长, 尤子平, 1990. 黄地老虎耐寒机制初探. 浙江农林学报, 24(2): 167–173.]
- Kostal V, Zahradnickova H, Simek P, Zeleny J, 2007. Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *J. Insect Physiol.*, 53(6): 580–586.
- Li ZY, Xue YB, Wang Z, Chang ZG, 2006. The study of test of supercooling point and relationship with the overwintering performance in *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Journal of Bee*, 26(11): 12–13. [李志勇, 薛运波, 王志, 常志光, 2006. 东西方蜜蜂越冬期过冷冷却点的测试及过冷却点与越冬性能的关系. 蜜蜂杂志, 26(11): 12–13.]
- Liang ZG, Zhang WG, Liu XH, Meng QY, Sun XG, 2005. Cold-hardiness analysis of over-wintering larva of *Acantholyda posticalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(6): 695–699. [梁中贵, 张卫光, 刘学辉, 孟庆英, 孙绪良, 2005. 松阿扁叶蜂越冬幼虫体内抗寒物质分析. 昆虫知识, 42(6): 695–699.]
- Nedved O, 2000. Snow white and the seven dwarfs: a multivariate approach to classification of cold tolerance. *Cryo Letters*, 21(6): 339–348.
- Sun XG, Li ST, Guo HL, 2000. Study on cold hardiness of overwintering larvae, *Phthonandria atrilineata* Butler. *Science of Sericulture*, 26(3): 129–133. [孙绪良, 李恕廷, 郭慧玲, 2000. 桑尺蠖越冬幼虫的耐寒性研究. 蚕业科学, 26(3): 129–133.]
- Wu J, 2012. Apiology. Beijing: China Agriculture Press. 134–138. [吴杰, 2012. 蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社. 134–138.]
- Zhang Y, Liu Y, Guo X, Li Y, Gao H, Guo X, Xu B, 2014. sHsp22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defence and development in *Apis cerana cerana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 53(2): 1–12.
- Zhang YY, 2007. Study on the cold hardiness and mechanism of over wintering larva of *Chilo Supperssalis* Walker. Master thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [张拥军, 2007. 二化螟越冬幼虫耐寒性及其机理研究. 硕士学位论文文. 武汉: 华中农业大学.]
- Zhao N, Guo TT, Yu Y, Men XY, Zhou XH, Zhuang QY, Xu YY, Li LL, 2014. Study on cold tolerance and variations of biochemical substances in *Carposina sasakii* Matsumura overwintering larvae under constant low temperature. *Shandong Agricultural Sciences*, 46(7): 107–111. [赵楠, 郭婷婷, 于毅, 门兴元, 周仙红, 庄乾营, 许永玉, 李丽莉, 2014. 恒定低温下桃小食心虫越冬幼虫体内生化物质变化及耐寒性研究. 山东农业科学, 46(7): 107–111.]
- Zhou BF, 2002. Bee Feeding and Management. Xiamen: Xiamen University Press. 56. [周冰峰, 2002. 蜜蜂饲养管理学. 厦门: 厦门大学出版社. 56.]