

低温 20℃对意大利蜜蜂未受精卵发育的影响*

陈琳** 徐新建 王青 朱翔杰 郝振帮 周姝婧 周冰峰***

(福建农林大学蜂学学院, 福州 350002)

摘要 【目的】蜜蜂是狭温性昆虫的代表, 低温对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 未受精卵发育的影响尚不清楚。【方法】将 0~66 h 卵龄的意大利蜜蜂未受精卵放置在 20℃ 下分别处理梯度时间。【结果】低温 20℃ 导致意大利蜜蜂未受精卵的孵化率下降, 发育历期延长。0、3、6、9 h 卵龄的卵对低温极敏感, 处理 0.5 h 孵化率下降, 处理 4.0 h, 全部死亡; 发育 12、24 h 的卵在低温中处理 4.0 h 不受影响 ($P>0.05$), 处理 12.0 h, 全部死亡; 发育 36 h 以上的卵则较耐低温, 处理 12.0 h 无影响 ($P>0.05$), 处理 36.0 h, 各卵龄没有全部死亡, 其中最低的孵化率为 25.4%。12~66 h 的卵在低温 20℃ 下的发育历期 (y) 与处理时间 (x) 呈现显著的线性回归关系, 发育历期延长的时间约等于处理时间长。【结论】意大利蜜蜂未受精卵对低温 20℃ 的敏感性与卵龄关系密切, 低卵龄的意大利蜜蜂未受精卵比高卵龄更易受低温影响。这些结果为深入研究温度对蜜蜂胚胎发育影响的机制奠定基础, 也为蜜蜂的科学饲养提供了理论依据。

关键词 意大利蜜蜂, 未受精卵, 温度, 发育历期, 孵化率

Effects of low temperature on unfertilized honeybee (*Apis mellifera ligustica*) eggs

CHEN Lin** XU Xin-Jian WANG Qing ZHU Xiang-Jie HAO Zhen-Bang
ZHOU Shu-Jing ZHOU Bing-Feng***

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract [Objectives] Although the honeybee is known to be a stenothermal insects the effect of low temperature on the hatching of haploid *Apis mellifera ligustica* eggs remains unclear. [Methods] Haploid eggs of different ages were subjected to 20℃ for a different number of hours. [Results] The hatching rate and developmental duration of unfertilized eggs were significantly affected by cold exposure. Unfertilized eggs between 0 and 9 h of age were more cold-sensitive than older eggs, being significantly affected by the minimal duration of 0.5 h cold exposure and with 100% mortality when exposed to cold for more than 4.0 h. In contrast, eggs between 12 and 24 h, and those >36 h old, showed no negative effects after 4.0 h and 12.0 h cold exposure, respectively. A simulation analysis showed that egg hatching duration was highly correlated with the duration of cold exposure, and that the increase in time until hatching was approximately equal to the duration of cold exposure. [Conclusion] Sensitivity to cold depends on how recently unfertilized eggs had been laid. Newly laid eggs were more susceptible to low temperatures than older eggs. These results will be helpful for further study of how temperature effects honeybee embryo development, and provides a scientific basis for novel beekeeping strategies.

Key words *Apis mellifera ligustica*, unfertilized egg, temperature, development duration, hatchability

温度是影响昆虫的生长、发育、生殖及存活等生命活动最重要的环境因子(丁岩钦, 1994; 时培建等, 2011)。蜜蜂是高度社会化的昆虫,

就蜜蜂个体而言是变温动物, 体温随着环境温度变化而变化(周冰峰等, 2002)。蜂群需要耗费大量的能量(Kronenberg and Heller, 1982; Jones

*资助项目 Supported projects: 现代农业蜂产业技术体系建设专项资金 (CARS-45-KXJ11)

**第一作者 First author, E-mail: fay321@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: bingfengfz@126.com

收稿日期 Received: 2015-12-31, 接受日期 Accepted: 2016-01-26

et al., 2004) 来调节巢温, 并维持蜂巢中心子区的温度稳定在 35℃ (Julia et al., 2005; Matthias, 2010), 主要是因为蜜蜂发育需要一个非常稳定的温度, 蜜蜂个体发育具有狭温性, 温度是影响蜜蜂发育最主要的因子之一。

蜜蜂卵的发育温区是 31~38℃, 最适发育温度是 35℃, 发育历期约为 3 d (曾志将, 1989; 周冰峰, 2002)。在蜂群中, 蜜蜂能保持子脾的温度在 32~36℃ 的范围内, 这样才能保证蜜蜂能够正常发育 (Kleinhenz et al., 2003)。在 30℃ 下, 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (以下简称中蜂) 卵不孵化。在 32~36℃, RH70% 培育条件下, 中蜂和意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (以下简称意蜂) 受精卵的孵化率都在 90% 以上, 在 34~36℃, RH70% 培育条件下, 中蜂未受精卵的孵化率都在 90% 以上, 发育历期随着温度的升高而缩短 (周冰峰等, 2002; 曹义锋等, 2008)。35℃、36℃ 下的意蜂受精卵的发育历期分别为 67.44 h、65.76 h, 二者差异不显著, 此外, 其余各温度下的发育历期都差异极显著, 最大相差近 1 d (周冰峰等, 2002)。

目前, 尚未见低温胁迫对蜜蜂卵发育影响的相关结果。本研究系统地研究了不同卵龄的意蜂未受精卵在低温 20℃ 下处理不同时间对其孵化率和发育历期的影响, 找到对低温敏感的发育阶段以及较耐低温的发育阶段。研究低温 20℃ 对意蜂未受精卵发育的影响, 不仅是对蜜蜂个体发育规律的探究, 而且对丰富蜜蜂发育生物学和蜜蜂个体生态学具有一定意义, 为科学饲养蜜蜂, 调节巢温的饲养管理技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

意蜂未受精卵取样于健康、群势在 7 足框以上且蜂王产卵力强的意蜂实验蜂群。根据蜂王在雄蜂房里产未受精卵的生物特性, 把蜂王扣在雄蜂巢脾上产卵 1 h, 将带卵的巢脾迅速剪下带回恒温恒湿箱内培养。

1.2 温度的控制

恒温恒湿箱 (CTHI-250B, 上海施都凯有限

公司; BSC-250, 上海博迅实业有限公司) 的温湿度由温湿度电子记录仪 (HC-02, 浙江杭州医用器械有限公司) 每隔 5 min 自动记录, 同时每隔 1 h 人工记录 1 次温度和相对湿度。监控过程中, 若发现温度出现异常波动, 随时调整。保证恒温恒湿箱温度在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 之间波动, 相对湿度在 $\pm 5\%$ 之间波动。

1.3 实验设计

本研究对 0、3、6、9、12、24、36、48、60、66 h 卵龄的卵分别低温 20℃ 处理 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0、28.0、32.0、36.0 h, 此外对 0、3、6、9 h 卵龄的卵分别低温处理 0.5、1.0、2.0 h。当处理到孵化率为 0 时就不再进行更长时间处理。处理组与对照组的样本量均为 20 粒/群, 取 3 群, 每个处理样本量为 60 粒。

对照组的样本在蜜蜂卵发育的最适温湿度 ($35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、RH75% $\pm 5\%$ 条件下培养至孵化。处理组的样本先在最适温湿度条件下培养至相应卵龄后, 放入 ($20 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、RH75% $\pm 5\%$ 的恒温恒湿箱中处理相应时长, 再放回最适温湿度条件下培养至孵化, 接近孵化每隔 1 h 观察一次样本孵化情况。

1.4 数据统计分析

经过反正弦转化后的孵化率和发育历期采用 Tukey 氏 HSD 检验, 两组数据的差异性比较采用 *t*-检验 (SPSS13.0)。对 12~66 h 卵龄的意蜂未受精卵的发育历期和处理时间进行线性回归分析。

2 结果与分析

低温 20℃ 对意蜂未受精卵发育有影响, 表现为孵化率下降和发育历期延长。

2.1 低温 20℃ 对不同卵龄的意蜂未受精卵的孵化率的影响

低温 20℃ 对意蜂未受精卵的孵化率均有影响。在胚胎的不同发育阶段, 耐低温胁迫能力有所不同。胚胎的早期最不耐低温, 随着胚胎发育进程, 耐低温胁迫能力有所增强。

2.1.1 低温 20℃处理 0~9 h 卵龄意蜂未受精卵的孵化率 低温 20℃对胚胎早期的发育影响大, 低温 20℃处理 0.5~1.0 h, 孵化率显著降低; 处理 4.0 h 几乎全部死亡, 处理 8.0 h, 全部死亡。

发育 0、3、9 h 卵在 20℃条件处理 0.5 h 时, 孵化率分别为 82.8%、86.2%、86.9%, 与对照组 98.3%相比差异显著 ($P<0.05$)。发育 0~9 h 卵处理 1.0 h, 孵化率 29.0%~66.7%, 与对照组相比均差异极显著 ($P<0.01$); 处理 2.0 h, 孵化率 17.7%~48.5%; 处理 4.0 h, 孵化率 1.4%~3.3%, 与处理 8.0 h 时的孵化率 0 相比差异不显著 ($P>0.05$)。0~9 h 卵龄意蜂未受精卵, 发育 6 h 卵相对更耐低温胁迫 (图 1)。

2.1.2 低温 20℃对 12 h、24 h 卵龄意蜂未受精卵的影响 发育 12 h、24 h 的卵比 0~9 h 卵耐低温胁迫能力增强, 低温 20℃处理 4.0 h 孵化率与对照组差异不显著, 处理 12.0 h 孵化率基本为 0。发育 24 h 的卵比 12 h 更耐低温胁迫。

低温 20℃处理 4.0 h, 发育 12 h、24 h 卵的孵化率分别为 91.9%和 92.3%, 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$); 处理 8.0 h, 发育 12 h 卵的孵化率为 61.3%, 差异极显著 ($P<0.01$), 发育 24 h 卵的孵化率为 93.7%, 差异不显著 ($P>0.05$)。处理 12.0 h, 发育 12 h 卵的孵化率为 0; 发育 24 h

卵处理 12.0~20.0 h 的孵化率为 0~7.5%, 组间孵化率差异不显著 ($P>0.05$) (图 2)。

2.1.3 低温 20℃对 36~66 h 卵龄意蜂未受精卵的影响 发育 36~66 h 的卵相对耐低温胁迫, 低温 20℃处理 12.0 h 孵化率为 85.5%~97.1%, 与对照组差异不显著 (图 3)。

发育 36 h 的卵低温 20℃处理 16.0、20.0、24.0 h 孵化率为 82.6%~88.7%, 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$); 低温处理 28.0 h, 孵化率为 79.4%, 差异显著 ($P<0.05$); 低温处理 32.0 h 和 36.0 h, 孵化率分别为 62.5%和 30.2%, 差异极显著 ($P<0.01$) (图 3:A)。

发育 48 h 的卵低温 20℃处理 16.0 h 孵化率为 80.7%, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$); 低温处理 20.0~36.0 h, 孵化率分别 38.7%~78.6%, 差异极显著 ($P<0.01$) (图 3:B)。

发育 60 h 的卵低温 20℃处理 16.0 h 孵化率为 87.5%, 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$); 低温处理 20.0~36.0 h, 孵化率分别 64.1%~76.6%, 差异显著 ($P<0.05$) (图 3:C)。

发育 66 h 的卵低温 20℃处理 16.0 h、20.0 h, 孵化率分别为 84.8%、90.2%, 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$); 低温处理 24.0~36.0 h, 孵

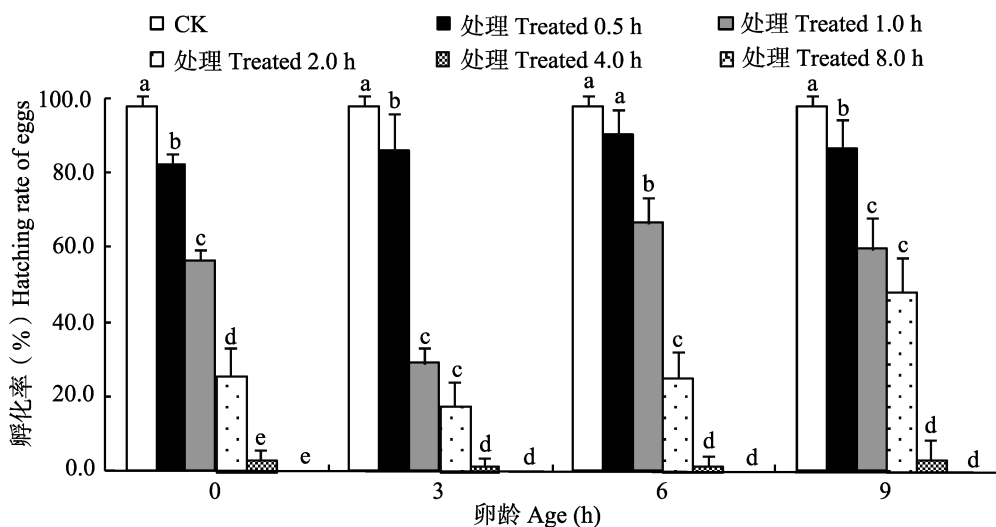


图 1 低温 20℃处理发育 0~9 h 意蜂未受精卵的孵化率

Fig. 1 The hatching rates of 0-9 h unfertilized eggs which were subjected to 20℃

同一处理卵龄组内小写字母不同表示孵化率差异显著 ($P<0.05$)。图 2, 图 3 同。

The different lowercase letters in the same age group show significant different at 0.05 level. The same for Fig.2 and Fig.3.

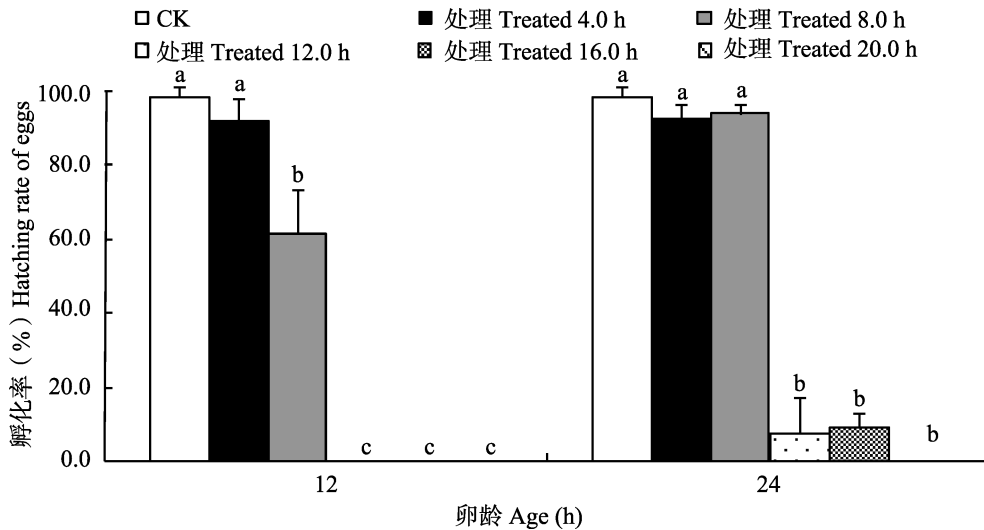


图 2 低温 20℃处理发育 12 h、24 h 意蜂未受精卵的孵化率
Fig. 2 The hatching rates of 12 h, 24 h unfertilized eggs which were subjected to 20℃

化率为 25.4%~70.3%，差异均极显著 ($P<0.01$) (图 3 : D)。

2.2 低温 20℃对意蜂未受精卵发育历期的影响

低温 20℃处理 4.0 h 以上，能够显著延长意蜂未受精卵的发育历期，处理时间越长，发育历期延长的幅度越大。

2.2.1 低温 20℃处理对卵龄 12~66 h 的意蜂未受精卵发育历期的影响 低温 20℃处理 4.0~36.0 h，卵龄 12~66 h 卵的发育历期，延长 2.6~37.3 h (表 1)。处理 4.0 h，延长 2.6~5.3 h；处理 8.0 h，延长 6.9~9.2 h；处理 12.0 h，延长 9.9~13.6 h；处理 16.0 h，延长 14.3~17.6 h；处理 20.0 h，延长 18.3~22.6 h；处理 24.0 h 延长 22.1~25.1 h；处理 28.0 h，延长 26.3~28.3 h；处理 32.0 h，延长 28.8~32.2h；处理 36.0 h，延长 33.1~37.3 h。与对照组意蜂未受精卵发育历期 75.1 h 相比，差异均极显著延长 ($P<0.01$)。

低温 20℃处理 12~66 h 卵龄的卵，其发育历期 (y) 与处理时间 (x) 呈现显著的线性回归关系 (图 4)，关系模型为： $y=0.9769x+75.218$ ($R^2=0.9981$, $F=3642.1818$, $P=9.00358 \times 10^{-6}<0.01$)。意蜂未受精卵经过 20℃处理后，延长的发育历期约等于低温处理的时间长度。

2.2.2 低温 20℃处理对卵龄 0~9 h 的意蜂未受精卵发育历期的影响 低温 20℃处理刚产出的 0 h

意蜂未受精卵 0.5~2.0 h，发育历期与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。发育 3 h 的卵，处理 0.5 h 发育历期差异不显著 ($P>0.05$)；处理 1.0~2.0 h，发育历期延长 3.3~3.6 h，差异极显著 ($P<0.01$)。发育 6 h 的卵，处理 0.5~2.0 h 发育历期延长 2.1~5.3 h，差异显著 ($P<0.05$) 或差异极显著 ($P<0.01$)。发育 9 h 的卵处理 1.0 h，发育历期延长 4.3 h，差异显著 ($P<0.05$) (表 2)。

3 讨论

(1) 本研究证实，在 20℃环境温度下 0.5~1.0 h 意蜂未受精卵的发育就可能受到影响。在种用父群的饲养管理中，应注意控制子脾暴露在箱外的时间和巢内保温条件。相对胚胎发育早期的卵，高卵龄的卵较耐低温。如果应用卵输送的形式传递种用雄蜂，可运送发育 36 h 以上未受精卵的卵脾。

(2) 0~9 h 卵龄的卵处于胚胎的卵裂发育阶段 (Fleig and Sander, 1985; Nelson, 1915)，低温 20℃对此发育阶段影响最大。12~24 h 卵龄的卵正处于胚盘形成阶段 (Fleig and Sander, 1986)，此发育阶段对低温 20℃较敏感。卵龄为 36~66 h 卵龄的卵处于胚层分化、器官系统形成阶段 (Fleig and Sander, 1986)，此发育阶段的意蜂未受精卵对低温较强的耐受性。蜜蜂胚胎不

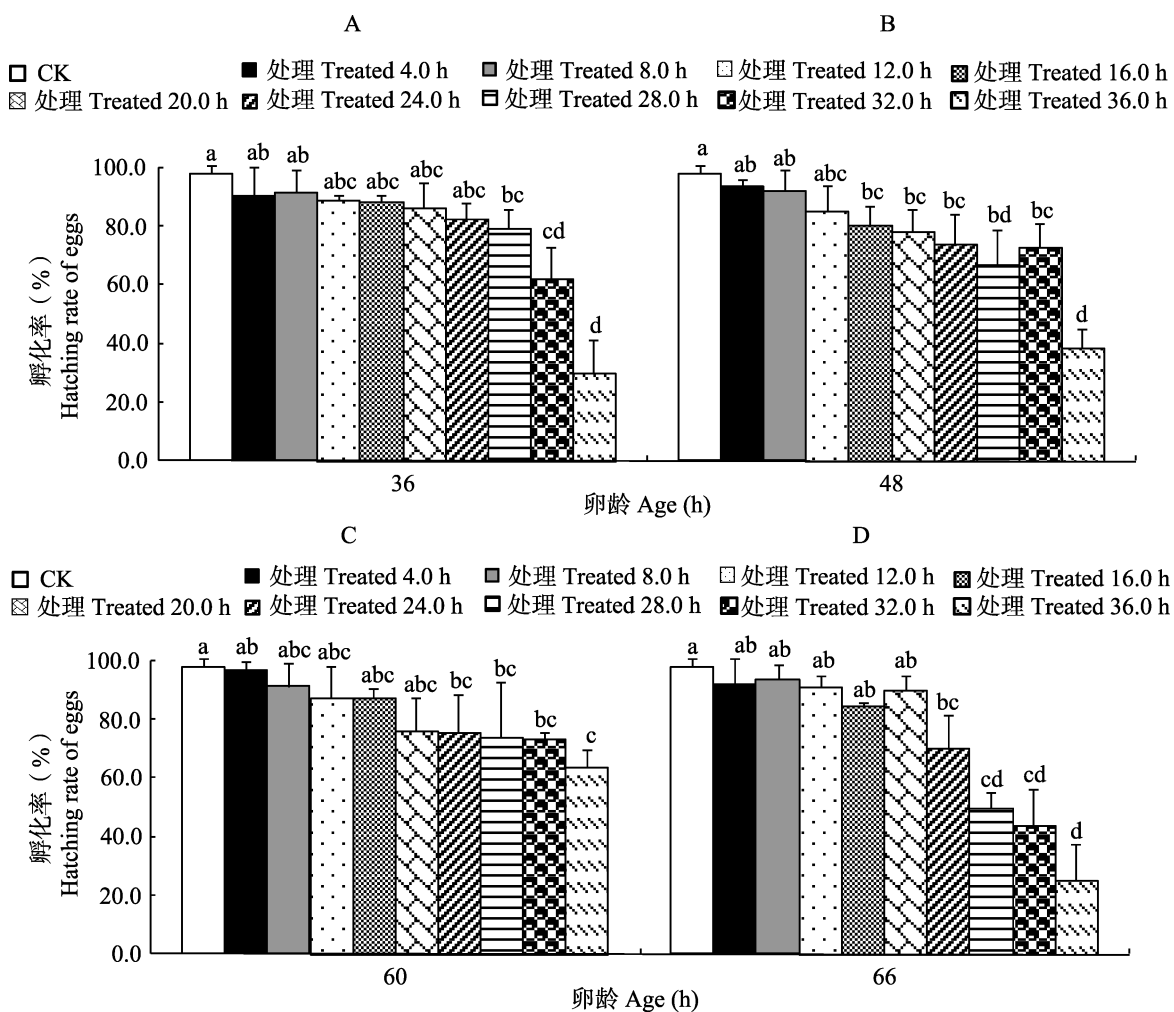


图 3 发育 36~66 h 意蜂未受精卵低温 20℃处理的孵化率

Fig. 3 The hatching rates of 36~66 h unfertilized eggs which were subjected to 20℃

A: 36 h 卵龄; B: 48 h 卵龄; C: 60 h 卵龄; D: 66 h 卵龄。

A: 36 h age; B: 48 h age; C: 60 h age; D: 66 h age.

表 1 卵龄为 12~66 h 的意蜂未受精卵 20℃处理发育历期

Table 1 Developmental duration of 12~66 h age unfertilized eggs (*Apis mellifera ligustica*) which were subjected to 20℃

卵龄 Age (h)	处理时间 Treatment time (h)									
	4.0	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	36.0	对照组 Control
12	77.8±2.8	83.5±3.1	NH	NH	—	—	—	—	—	75.1±3.0
	Bb	Cc								Aa
24	78.6±1.4	83.2±2.7	88.4±1.1	90.8±3.3	NH	NH	—	—	—	75.1±3.0
	Bb	Cc	Dd	Ee						Aa
36	79.3±3.7	82.0±2.9	87.5±2.6	91.5±2.7	93.4±1.1	97.2±1.3	103.4±1.5	107.3±1.7	112.4±1.9	75.1±3.0
	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff	Gg	Hh	Ii	Jj	Aa
48	77.7±2.3	82.1±2.1	85.0±1.6	92.6±4.6	94.7±2.0	97.6±2.0	101.4±1.8	107.3±3.0	111.6±2.8	75.1±3.0
	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff	Gg	Hh	Ii	Jj	Aa

续表 1 (Table 1 continued)										
卵龄 Age (h)	处理时间 Treatment time (h)									对照组 Control
	4.0	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	36.0	
60	80.4±2.9	84.3±1.9	88.7±1.9	92.7±2.5	97.7±3.0	100.2±3.9	101.6±1.5	105.3±1.1	111.5±3.7	75.1±3.0
	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff	Gg	Hh	Ii	Jj	Aa
66	78.9±2.0	83.0±2.5	85.7±3.6	89.4±4.5	95.4±2.5	97.3±3.8	103.0±6.4	103.6±2.7	108.2±2.7	75.1±3.0
	Bb	Cc	Cd	De	Ef	Ef	Fg	Fg	Gh	Aa

表中数据为平均值±标准差, 同行数据后标有不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$, Turkey 氏 HSD 检验), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, Turkey 氏 HSD 检验); NH: 卵没有孵化; -: 没有数据; 表 2 同。

The data in the table are mean ± SD, and those in the same row followed by different capital letters are extremely significantly different ($P<0.01$, Tukey's HSD test), while followed by different lowercase letters are significant different ($P<0.05$, Tukey's HSD test). NH: No eggs hatched. -: No data. The same for Table 2.

同发育阶段对低温胁迫的耐受性机理需要进一步研究。

(3) 通过对低温 20℃处理条件下意蜂未受精卵的发育历期与处理时间的线性回归方程可以看出处理后的延长的发育历期约等于低温处理时间长度, 卵正常发育历期为 75 h 左右, 36 h 卵龄经过 4.0 h 处理后发育历期为 79 h, 66 h 卵龄处理 8.0 h 后发育历期为 83 h (表 1)。这可能是由于在低温 20℃中, 卵是停止发育的, 恢复到最适发育温度 35℃后继续正常发育。也有可能低温胁迫下开始, 卵的发育速率就变慢直至孵化。可通过其他研究手段进行后续研究, 探明其发育历期延长的真正原因。

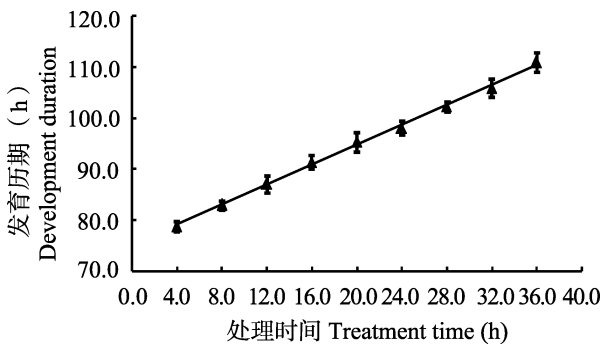


图 4 低温处理后的 12~66 h 卵龄意蜂未受精卵平均发育历期与处理时间的关系

Fig.4 The linear relationship between average developmental duration after cold treatment of 12-66 h age unfertilized egg (*Apis mellifera ligustica*) and the cold exposure time

表 2 卵龄为 0~9 h 的意蜂未受精卵 20℃处理发育历期								
Table 2 Developmental duration of 0-9 h age unfertilized eggs (<i>Apis mellifera ligustica</i>) which were subjected to 20℃								
卵龄 (h) Age	处理时间 Treatment time (h)							对照组 Control
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	12.0	16.0	
0	76.4±2.7	76.8±3.0	77.5±3.3	77.5±3.5	NH	NH	-	75.1±3.3
	Aa	Aa	Aa	Aa				Aa
3	76.0±2.1	78.9±3.8	78.4±4.2	NH	NH	-	-	75.1±3.3
	ABa	BCb	Cb					Aa
6	77.2±2.4	80.4±4.3	79.3±3.2	NH	NH	-	-	75.1±3.3
	ABb	BCc	Cc					Aa
9	76.4±2.2	79.4±4.0	77.8±1.7	93.0±0.0	NH	NH	NH	75.1±3.3
	Aab	Ab	Aab	Bc				Aa

参考文献 (References)

- Cao YF, Yu LS, Fang HP, Ding J, 2008. Investigation on growth period and total effective temperature of eggs of *Apis cerana cerana* Fab. in Wannan mountainous area. *Journal of Bee*, (10): 3-4. [曹义锋, 余林生, 方华平, 丁建, 2008. 皖南中华蜜蜂卵发育历期与有效积温的研究. 蜜蜂杂志, (10): 3-4.]
- Ding YQ, 1994. Mathematical Ecology of Insects. Beijing: Science Press. 318-332. [丁岩钦, 1994. 昆虫数学生态学. 北京: 科学出版社. 318-332.]
- Fleig R, Sander K, 1985. Blastoderm development in honey bee embryogenesis as seen in the scanning electron microscope. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 8(4): 279-286.
- Fleig R, Sander K, 1986. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): a SEM study. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 15(5/6): 449-462.
- Jones JC, Myerscough MR, Graham S, Oldroyd BP, 2004. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science*, 305(5682): 402-404.
- Julia CJ, Paul H, Madeleine B, Ryszard M, Benjamin PO, 2005. The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A*, 191(12): 1121-1129.
- Kleinhenz M, Bujok B, Fuchs S, Tautz J, 2003. Hot bees in empty broodnest cells: heating from within. *J Exp. Biol.*, 206(23): 4217-4231.
- Kronenberg F, Heller HC, 1982. Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. B*, 148(1): 65-76.
- Matthias AB, 2010. The Influence of Developmental Temperatures on Division of Labour in Honeybee Colonies. Saale: Martin Luther University Press. 31.
- Nelson, 1915. The Embryology of the Honey Bee. New Jersey: Princeton University Press. 261.
- Shi PJ, Chi BXZ, Ge F, 2011. Development and application of models for describing the effects of temperature on insects' growth and development. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1179-14460. [时培建, 池本孝哉, 戈峰, 2011. 温度与昆虫生长发育关系模型的发展与应用. 应用昆虫学报, 48(5): 1149-1160.]
- Zeng ZJ, 1989. Hatching of Honeybee eggs. *Apiculture of China*, (2): 11. [曾志将, 1989. 蜜蜂卵的孵化. 中国养蜂, (2): 11.]
- 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.]
- Zhou BF, Lin SH, Su J, Xue FQ, Jiang TB, 2002. Effects of temperature on the developments of honeybee oosperms and queen pupae. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 31(4): 511-513. [周冰峰, 林世煌, 苏静, 薛奋勤, 江天宝, 2002. 温度对蜜蜂受精卵和封盖王蛹发育的影响. 福建农林大学学报(自然科学版), 31(4): 511-513.]