

基于 LC-MS 的越冬期长白山中华 蜜蜂代谢组学分析*

刘楠楠^{1**} 邢力¹ 伞治豪¹ 王静² 刘立英^{3***}

(1. 吉林农业科技学院, 吉林 132101; 2. 黑龙江省农业科学院牡丹江分院, 牡丹江 157000;

3. 辽宁农业职业技术学院, 营口 115009)

摘要 【目的】长白山中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* in Changbai Mountain 是在长白山独特的自然生态环境中, 历经长期的自然选择压力而形成的东方蜜蜂 *Apis cerana* 的一个生态类型, 对当地冬季严寒, 无霜期短等严酷自然环境具有显著的生态适应性。本研究旨在探究越冬期特定环境下长白山中华蜜蜂耐寒适应性相关的代谢物和代谢通路。【方法】以越冬中期的长白山中华蜜蜂为研究对象, 采用液相色谱-质谱联用技术 (Liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) 对比越冬期 (12 月) 和非越冬期 (8 月) 工蜂肠道组织中代谢物的变化。【结果】越冬蜂和非越冬蜂个体在正、负离子模式下分别获得 125 和 219 个差异代谢物, 在正、负离子模式下最显著差异的代谢物中筛选得到褪黑素、异鼠李素、飞燕草素、亚油酸、亚麻酸、喹啉酸、犬尿氨酸、硫胺素、吡哆醇和紫丁香苷等多种与蜜蜂抗氧化损伤、抗微生物侵染、抗寒、营养和能量物质的合成与代谢相关的差异代谢物。差异代谢物显著富集于嘌呤代谢、磷酸戊糖途径、糖基磷脂酰肌醇 (Glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚生物合成以及硫中继系统、烟酸和烟酰胺代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等 KEGG 通路。【结论】长白山中华蜜蜂主要通过调节抗氧化代谢和能量物质合成代谢应对越冬期逆境胁迫, 研究结果初步阐释了长白山中华蜜蜂耐寒适应性的代谢特点和调控基础。

关键词 长白山中华蜜蜂; 越冬; 代谢组学; 液相色谱-质谱; 耐寒

Metabolomic analysis of *Apis cerana cerana* in the Changbai Mountain during the overwintering period based on liquid chromatography mass spectrometry

LIU Nan-Nan^{1**} XING Li¹ SAN Zhi-Hao¹ WANG Jing² LIU Li-Ying^{3***}

(1. Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, China;

2. Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Mudanjiang 157000, China;

3. Liaoning Agricultural Vocational and Technical College, Yingkou 115009, China)

Abstract [Aim] To investigate the metabolites and metabolic pathways related to cold-resistance in the honeybee *Apis cerana cerana*, an ecological type of *A. cerana* native to the Changbai Mountains, during the overwintering period. [Methods] Changes in metabolites in the guts of overwintering (December) and non-overwintering (August) honeybees were detected using a non-targeted metabolomics methods based on liquid chromatography mass spectrometry. [Results] 125 positive and 219 negative ion mode, differentially expressed metabolites were detected in overwintering and non-overwintering honeybees. Of these, 180 were upregulated and 164 were downregulated. The VIP top 30 metabolites included various differential

*资助项目 Supported projects: 吉林农业科技学院博士启动基金项目 [(2022) 751] 号; 吉林农业科技学院食品科学与工程重点学科资助; 吉林省科技发展计划项目 (20240601087RC)

**第一作者 First author, E-mail: liunannan888@jlnku.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: 366714602@qq.com

收稿日期 Received: 2024-07-30; 接受日期 Accepted: 2024-12-16

metabolites, many of which appear related to reducing antioxidant damage, antimicrobial activity, cold resistance, synthesis and the metabolism of nutrients or energy substances, such as melatonin, isorhamnetin, delphinidin, linoleic acid, Y-linolenic acid, quinolinic acid, kynurenine, thiamine, pyridoxine, and syringin. The most significant difference was among the positive and negative ion modes. In addition, the purine metabolism, pentose phosphate pathway, glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis, as well as the sulfur relay system, nicotinate and nicotinamide metabolism, alanine, aspartic acid, and glutamate metabolism, were the most significantly downregulated and upregulated KEGG pathways. Differential metabolites were significantly enriched in KEGG pathways such as the purine metabolism, pentose phosphate pathway, glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis, sulfur relay system, nicotinate and nicotinamide metabolism, alanine, aspartic acid, and glutamate metabolism. **[Conclusion]** *A. c. cerana* mainly responds to overwintering stress by regulating its antioxidant metabolism, energy substance synthesis and metabolic rate. These results shed light on the metabolic characteristics and regulatory basis of cold-resistance in *A. c. cerana* in the Changbai Mountains.

Key words *Apis cerana cerana* in Changbai Mountain; overwintering; metabolomics methods; liquid chromatography mass spectrometry; cold-resistance

蜜蜂作为世界上最重要的农作物传粉昆虫之一,与蝴蝶、蝙蝠、蜂鸟等其他传粉者提供的授粉服务对全世界的生态系统健康及粮食安全至关重要 (Potts *et al.*, 2016)。东方蜜蜂 *Apis cerana* 广泛分布于亚洲及附近岛屿,生存范围涵盖热带、亚热带、温带等气候区域,在中国已有上千年的饲养历史 (Chen *et al.*, 2017)。长白山中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* in Changbai Mountain (简称长白山中蜂) 是长白山特有的东方蜜蜂生态型,在维系区域生物多样性和提供关键授粉服务等生态功能方面贡献巨大 (Corlett, 2004; Park *et al.*, 2015)。然而,其种群数量在最近几十年经历了严重的下降,健康受到严重胁迫,已处于濒危-维持状态 (Liu *et al.*, 2017, 2022a)。相关研究发现,本土蜜蜂在活力与环境适应能力方面,表现得比外来蜜蜂更为出色 (Büchler *et al.*, 2014; Meixner *et al.*, 2014)。长白山中蜂表现出形态和行为上的适应性来适应漫长而寒冷的冬天,例如:较大的翅和体长、体色偏黑、耐寒力高、采集力强、分蜂性弱等特点,可在 -40 °C 的酷寒条件下自然越冬 (于瀛龙等, 2013; 刘楠楠等, 2020), 是我国本土耐寒蜂种的优异代表,极具保护和开发价值。

东方蜜蜂在耐寒性、越冬期活跃性及蜂群结构动态调节方面优于西方蜜蜂 (杨爽等, 2010)。然而,蜜蜂的越冬表现与其抗寒能力密切相关,有学者提出中华蜜蜂或存在基于“葡萄糖-甘油-

氨基酸”的抗寒系统 (陈豪等, 2010; 徐凯等, 2018)。本课题组前期研究发现,长白山中蜂机体保护酶系统在越冬期起到了重要的防御作用,其总氨基酸、葡萄糖与甘油可能是关键的抗冻保护物质。(刘楠楠等, 2022; 刘楠楠, 2022)。采用 Oxford Nanopore 技术对越冬期长白山中蜂进行全长转录组测序,揭示了其耐寒适应性的相关线索,如:寒冷环境的刺激会诱导越冬蜜蜂产生更多的选择性剪接 (Alternative splicing, AS) 和可变多聚腺苷酸化 (Alternative polyadenylation, APA) 机制以应对不利环境,差异表达转录本和差异表达基因在 Hippo、FoxO 信号通路的上调与 MARK 通路的下调,是其越冬分子适应性的重要表现。(Liu *et al.*, 2022b)。然而,越冬期蜜蜂耐寒性的代谢变化和潜在机制在很大程度上仍然未知。

超高效液相色谱在分离速度与效率上显著超越了传统高效液相色谱,应用日益广泛。

(Plumb *et al.*, 2005)。近年来,国内学者利用超高效液相色谱技术侧重于开展蜜蜂发病机制的研究。龙登隆等 (2021) 利用高效液相质谱联用的非靶向代谢组学方法检测了副伤寒患病群和正常越冬群西方蜜蜂工蜂肠道中代谢物的变化;杜亚丽等 (2023) 分别利用液相色谱-质谱联用和气相色谱-质谱联用技术对患枣花病和健康意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂进行了中肠非靶向代谢组学检测。目前,尚未有针对

东方蜜蜂耐寒性的代谢组学检测的相关报道。本研究利用高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 代谢组学平台,以长白山中蜂为研究对象,比较分析越冬期和非越冬期工蜂肠道组织代谢物的组分和含量,挖掘相关代谢物及代谢通路,研究结果可为解析长白山中蜂种群适应栖息地寒冷的分子机制研究提供基础数据,为蜂群安全越冬策略制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试蜂群为纯种长白山中蜂,2023 年取自国家级中蜂(长白山中蜂)自然保护区长白朝鲜族自治县马鹿沟镇(41°44'28"N, 128°21'32"E)。选取室外自然越冬的健康长白山中蜂蜂群 3 群,在越冬中期(12 月)取样,摘取越冬工蜂的整个肠道后迅速投入液氮中,标记为“CD-Dec”,置于 -80 °C 保存备用。将每 30 只工蜂完整肠道组织的混合样作为 1 个样品,每个时期设置 6 个生物学重复。以当年 8 月的工蜂为对照组,标记为“CD-Aug”,采样方法同 12 月样品。

1.2 仪器和试剂

试剂:乙腈、甲醇、氨水、乙酸铵和甲酸均为色谱级(生产商 Millipore)。

仪器:Q Exactive Plus 质谱仪(Thermo Scientific 公司)、Nexera X2 LC-30AD 超高压液相色谱仪(Shimadzu 公司)、色谱柱(ACQUITY UPLC BEH Amide 1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm column)、Bioruptor 超声波系统(Diagenode 公司)、Concentrator plus 真空离心浓缩仪和 5430R 离心机(均为 Eppendorf 公司)。

1.3 代谢物提取

实验设置 QC 样本,由所有待测样品等体积混合而成。液氮研磨后,准确称取 60 mg 样品,加入 200 μL 水与 800 μL 预冷甲醇/乙腈(1:1, v/v),涡旋混匀。冰浴超声 1 h, -20 °C 静置 2 h, 4 °C 16 000 r/min 离心 20 min,收集上清并真空浓缩干燥。质谱分析前,使用 450 μL

甲醇-水(1:1, v/v)复溶干燥物,4 °C 20 000 r/min 离心 40 min,取上清进样。

1.4 LC-MS 分析

1.4.1 色谱分离 使用超高效液相色谱系统(UHPLC),搭配 HILIC 色谱柱分离,进样量 3 μL ,柱温 25 °C,流速 0.3 mL/min。流动相 A 为水+25 mmol/L 乙酸铵, B 为乙腈,梯度洗脱程序:0-1 min 保持 95% B; 1-7 min B 由 95% 线性降至 65%; 7-9 min B 线性降至 35%; 9-10.5 min 维持 35% B; 10.5-11 min B 回升至 95%; 11-15 min 保持 95% B。

1.4.2 质谱采集 所有样品均采用电喷雾电离(ESI),分别在正(+)、负离子(-)模式下检测。经 UPLC 分离后,通过 QE Plus 质谱仪(配备 HESI 源)进行分析,离子化参数:喷雾电压 3.8 kV(+)和 3.2 kV(-);毛细管温度 320 °C($\pm$);鞘气体流速 30 arb($\pm$);辅助气体流速 5 arb($\pm$);探头加热器温度 350 °C($\pm$)。

质谱采集参数:质谱时长:12 min。母离子扫描范围:80-1 200 m/z,一级质谱分辨率:

70 000 @ m/z 200, AGC target: 3×10^6 ,一级 Maximum IT: 100 ms。二级质谱分辨率:17 500 @ m/z 200, AGC target: 1×10^5 ,二级 Maximum IT: 50 ms。

1.5 数据分析

原始数据经 MSDIAL 软件完成峰对齐、保留时间校正及提取峰面积。正负离子数据经总峰面积归一化后,整合离子峰并通过 R 软件进行模式识别。采用 Quality control(QC)样本的质谱 Base peak 图比对及总体样本 PCA 分析双策略,评估实验系统稳定性;使用 MSDIAL 软件提取代谢物离子峰,经 Unit variance scaling(UV)处理后进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)分析、正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA);以 Fold change(FC)>1.5 或 Fold change(FC)<0.667,且 $P<0.05$ 作为筛选标准,进行单变量统计分析。基于 OPLS-DA 模型的变量投影重要度(Variable importance for

the projection, VIP), 评估不同代谢物的表达模式对各组样本分类判别的贡献度。将同时满足多元统计分析 $VIP > 1$ 和单变量统计分析 $P < 0.05$ 的代谢物, 界定为存在显著性差异的代谢物; 然后, 对正、负离子模式下 VIP 值较高的代谢物进行注释分析; 最后, 差异代谢物经 HMDB 人类代谢组学数据库 (The human metabolome database) 和 KEGG 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 完成分类注释及富集分析。

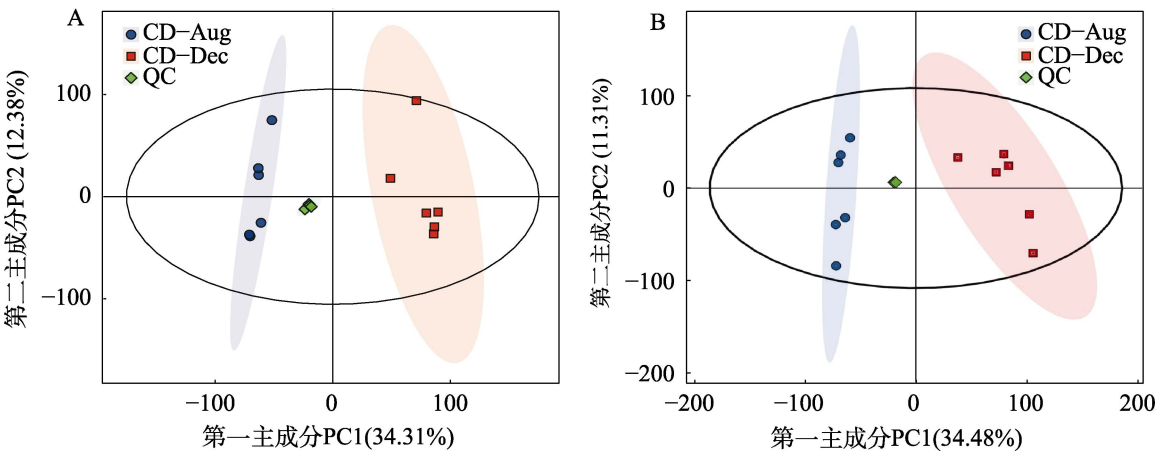


图 1 QC 样本质谱 base peak 图比对及主成分分析
Fig. 1 Results of QC sample base peak comparison and principal component analysis

A. 样品的正离子模式 PCA 得分图; B. 样品的负离子模式 PCA 得分图。CD-Aug: 8 月长白山中蜂工蜂肠道样品; CD-Dec: 12 月长白山中蜂工蜂肠道样品; QC: 质控样品。
A. PCA score plots of different groups of positive ion mode; B. PCA score plots of different groups of negative ion mode. CD-Aug: Intestinal samples of *Apis cerana cerana* in Changbai Mountain in August; CD-Dec: Intestinal samples of *A. c. cerana* in Changbai Mountain in December; QC: Quality control.

2.2 差异代谢物筛选

共筛选得到 344 个差异代谢物, 其中正离子模式下获得越冬蜂与非越冬蜂组间差异代谢物 125 个, 上调 53 个, 下调 72 个, 能够比对到 KEGG 和 HMDB 数据库的 47 个 (图 2: A); 负离子模式下获得差异代谢物 219 个, 上调 127 个, 下调 92 个, 能够比对到 KEGG 和 HMDB 数据库的 94 个 (图 2: B)。

2.3 差异代谢物表达分析

对正、负离子模式下重要程度较高 (VIP 值

2 结果与分析

2.1 实验质量评价

对所有实验样本及 QC 样本提取的峰进行 PCA 分析, 经循环交互验证构建 PCA 模型 (图 1)。结果显示, QC 样本聚集紧密, 说明本实验重复性较佳。长白山中蜂越冬组 and 对照组在正离子模式 (图 1: A) 及负离子模式 (图 1: B) 下均能各聚一类, 实验所获代谢谱的差异可体现样本间固有的生物学差异。

前 30) 的代谢物进行注释分析后, 发现脱氧腺苷、异鼠李素、异丁酸、飞燕草素、米帕林、褪黑素、亚麻酸、亚油酸、左旋多巴、7-O-甲基圣草酚、2'-脱氧肌苷-5'-磷酸、L-β-高苏氨酸的含量下降幅度较大, 紫丁香苷、犬尿氨酸、石黄醛、柠康酸、吡哆醇、硫胺素、S-腺苷-L-高半胱氨酸、喹啉酸、十五烷酸、2,8-二羟基喹啉、D-果糖 1-磷酸、3,4-二-O-咖啡酰基奎宁酸、4-羟基喹啉等则在肠道中大量积累 (表 1, 图 3)。

2.4 差异代谢物功能分析

2.4.1 差异代谢物分类 正、负离子模式下 KEGG

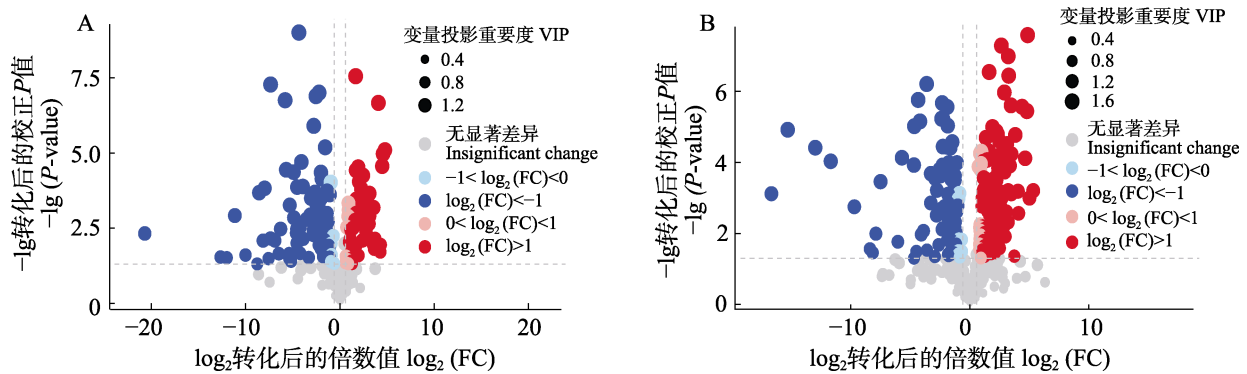


图2 正(A)、负(B)离子模式下差异代谢物火山图

Fig. 2 Volcano plot of differential metabolites of positive (A) and negative (B) ion mode

颜色对应差异倍数 (Fold change, FC), 点的大小对应正交偏最小二乘判别分析

OPLS-DA 模型的 VIP 值; 竖直线表示 $\log_2(1/1.5)$ 和 $\log_2(1.5)$,

图中红色点表示上调代谢物, 蓝色点表示下调代谢物, 灰色点表示无显著差异的代谢物。

The color corresponds to fold change, and the circle size represents the VIP value of the orthogonal partial least squares discriminant analysis model. Vertical dashed line indicate $\log_2(1/1.5)$ and $\log_2(1.5)$. Red, blue and gray represent up-regulated, down-regulated and indifference, respectively.

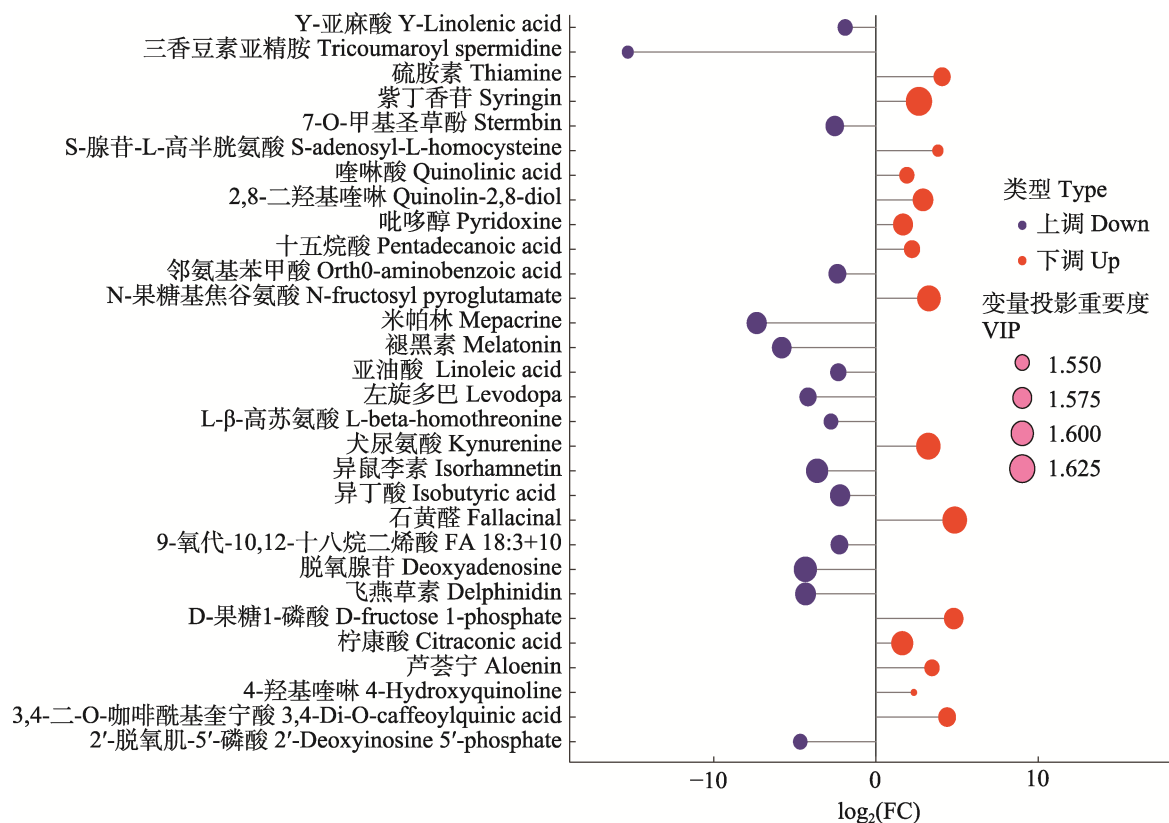


图3 差异代谢物重要性分析柱状图 (VIP 值前 30)

Fig. 3 Histogram of importance analysis of differential metabolites (VIP Top 30)

横坐标为差异倍数 (Fold change, FC) 的对数转化, 纵坐标为代谢物。左侧蓝色点与右侧红色点分别

表示下调和上调的差异代谢物。点的尺寸对应 VIP 值, 点越大, 重要性越高。

The x-axis represents the logarithmic transformation of fold change, and the y-axis represents metabolites. The blue and red dots on both sides represent the differential metabolites that are down regulated and up regulated, respectively.

The dot size represents the VIP value, and the larger the dot, the higher the VIP value and importance.

表 1 基于 LC-MS 非靶向代谢组学鉴定到的差异代谢物重要性分析

Table 1 Importance analysis of differential metabolites identified by LC-MS non-targeted metabolomics

代谢物 Metabolites	保留时间 (min) Retention time (min)	VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P-value	趋势 Trend
Y-亚麻酸 Y-Linolenic acid	1.074	1.549	0.269	2.743×10^{-6}	↓
三香豆素亚精胺 Tricoumaroyl spermidine	1.808	1.538	2.489×10^{-5}	1.199×10^{-5}	↓
硫胺素 Thiamine	5.460	1.558	16.907	2.170×10^{-7}	↑
紫丁香苷 Syringin	1.841	1.625	6.282	5.146×10^{-8}	↑
7-O-甲基圣草酚 Sternbin	4.336	1.566	0.172	1.291×10^{-7}	↓
S-腺苷-L-高半胱氨酸 S-Adenosyl-L-homocysteine	6.294	1.536	14.115	1.682×10^{-5}	↑
喹啉酸 Quinolinic acid	3.821	1.549	3.747	1.008×10^{-5}	↑
2,8-二羟基喹啉 Quinolin-2,8-diol	1.216	1.579	7.472	1.072×10^{-6}	↑
吡哆醇 Pyridoxine	6.864	1.575	3.179	2.815×10^{-8}	↑
十五烷酸 Pentadecanoic acid	1.083	1.554	4.675	1.336×10^{-5}	↑
邻氨基苯甲酸 Ortho-aminobenzoic acid	6.864	1.562	0.193	5.873×10^{-6}	↓
N-果糖基焦谷氨酸 N-Fructosyl pyroglutamate	7.601	1.601	9.628	3.608×10^{-7}	↑
米帕林 Mepacrine	8.486	1.576	0.006	5.313×10^{-8}	↓
褪黑素 Melatonin	6.675	1.572	0.018	1.769×10^{-7}	↓
亚油酸 Linoleic acid	1.061	1.554	0.200	2.133×10^{-6}	↓
左旋多巴 Levodopa	6.871	1.559	0.055	6.983×10^{-6}	↓
L-β-高苏氨酸 L-Beta-homothreonine	7.401	1.547	0.146	1.259×10^{-6}	↓
犬尿氨酸 Kynurenine	2.396	1.608	9.388	1.021×10^{-7}	↑
异鼠李素 Isorhamnetin	1.205	1.591	0.081	6.187×10^{-7}	↓
异丁酸 Isobutyric acid	7.666	1.576	0.216	9.938×10^{-8}	↓
石黄醛 Fallacinal	1.477	1.610	28.941	2.605×10^{-8}	↑
9-氧代-10,12-十八烷二烯酸 FA 18:3+10	1.142	1.561	0.209	5.980×10^{-6}	↓
脱氧腺苷 Deoxyadenosine	7.518	1.598	0.049	9.943×10^{-10}	↓
飞燕草素 Delphinidin	1.518	1.581	0.049	1.736×10^{-6}	↓
D-果糖 1-磷酸 D-Fructose 1-phosphate	1.526	1.572	27.731	3.591×10^{-6}	↑
柠康酸 Citraconic acid	5.012	1.589	3.078	2.844×10^{-7}	↑
芦荟宁 Aloenin	6.297	1.549	10.978	2.474×10^{-6}	↑
4-羟基喹啉 4-Hydroxyquinoline	1.689	1.531	5.056	1.603×10^{-5}	↑
3,4-二-O-咖啡酰基奎宁酸 3,4-Di-O-Caffeoylquinic acid	1.046	1.562	20.937	2.711×10^{-6}	↑
2'-脱氧肌苷-5'-磷酸 2'-Deoxyinosine 5'-phosphate	1.496	1.546	0.039	9.539×10^{-6}	↓

↑代表长白山中蜂越冬蜂体内显著上调, ↓代表显著下调。
↑ and ↓ represent up-regulated and down-regulated in overwintering honeybees in *Apis cerana cerana* in Changbai Mountain, respectively.

数据库中的物质分类结果显示,差异代谢物主要被注释到聚酮化合物、多肽、核酸、苯丙素类、碳水化合物和脂肪酸等类别(图 4: A)。HMDB 数据库结果显示,差异代谢物的主要类别是有机酸及其衍生物、有机杂环化合物、苯丙素和聚酮类、脂类和类脂分子、苯环型化合物等(图 4: B)。

2.4.2 差异代谢物 KEGG 通路分析 分别对正、负离子模式下的差异代谢物进行 KEGG 功能富集分析,结果显示差异代谢物主要被注释到神经活性配体-受体相互作用、ABC 转运蛋白、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、酪氨酸代谢、色氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、嘧啶代谢、

嘌呤代谢、组氨酸代谢、半乳糖代谢、辅因子的生物合成、氨基酸的生物合成、 β -丙氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢(图 5: A)。

为了系统研究代谢变化,利用差异丰度得分(Differential abundance scores, DA score)捕捉通路中整体代谢物相对于对照组增加或减少的趋势。结果显示,嘌呤代谢、磷酸戊糖途径、糖基磷脂酰肌醇(Glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚生物合成是最显著下调的 KEGG 通路,硫中继系统、烟酸和烟酰胺代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢是最显著上调的 KEGG 通路(图 5: B)。

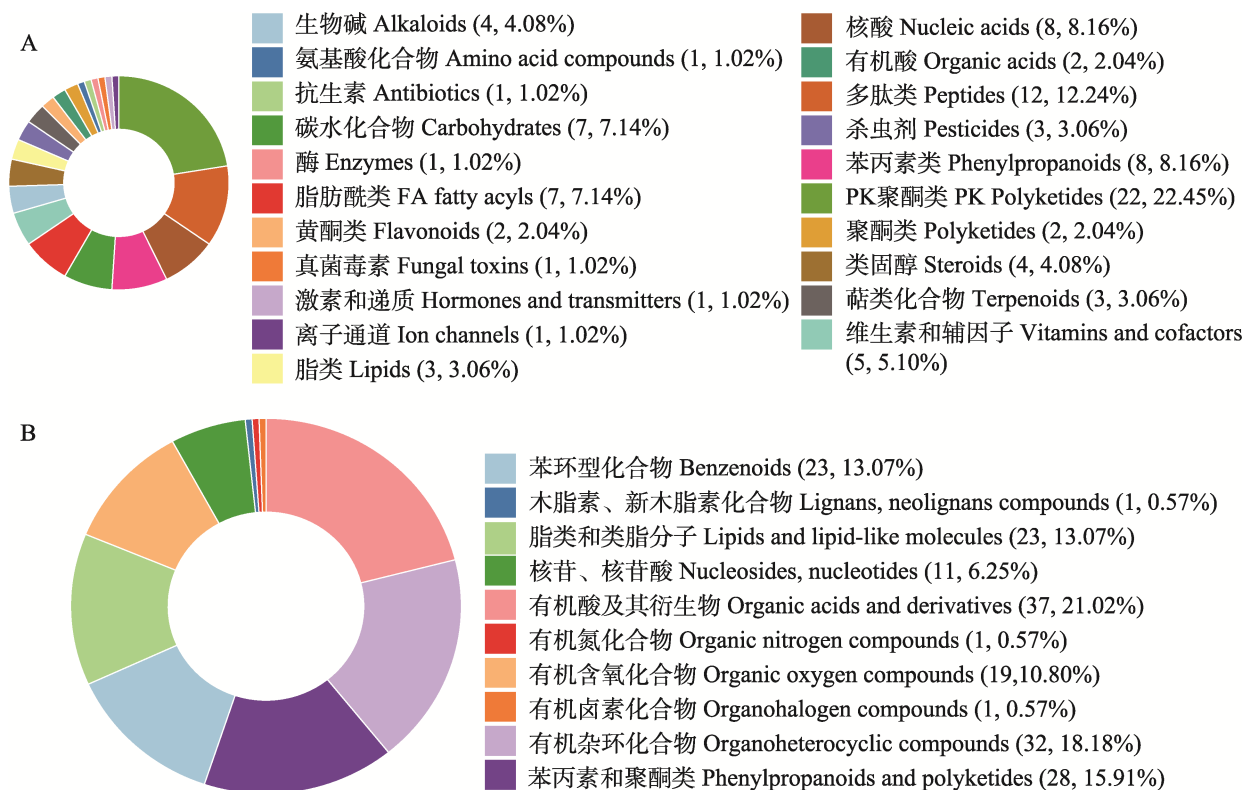


图 4 差异代谢物分类图

Fig. 4 Results of differential metabolites classification

A. KEGG 分类结果; B. HMDB 分类结果。不同颜色代表一级分类, 面积越大说明该分类中差异代谢物的数量越多。图例标明分类名称、差异代谢物数量及其所占百分比。

A. Result of KEGG; B. Result of HMDB. Different colors represent a classification level, and the larger the area, the more differential metabolites there are in the classification. The legend indicates the classification name, the number of differential metabolites, and the percentage in the chart.

3 结论与讨论

冬季对于蜜蜂种群的存活是巨大挑战, 越冬

能力是体现蜂种优势的重要生物学性状之一, 是影响种群繁殖、越冬死亡率和分布范围的重要因素, 与养蜂业的经济效益密切相关。然而, 相关

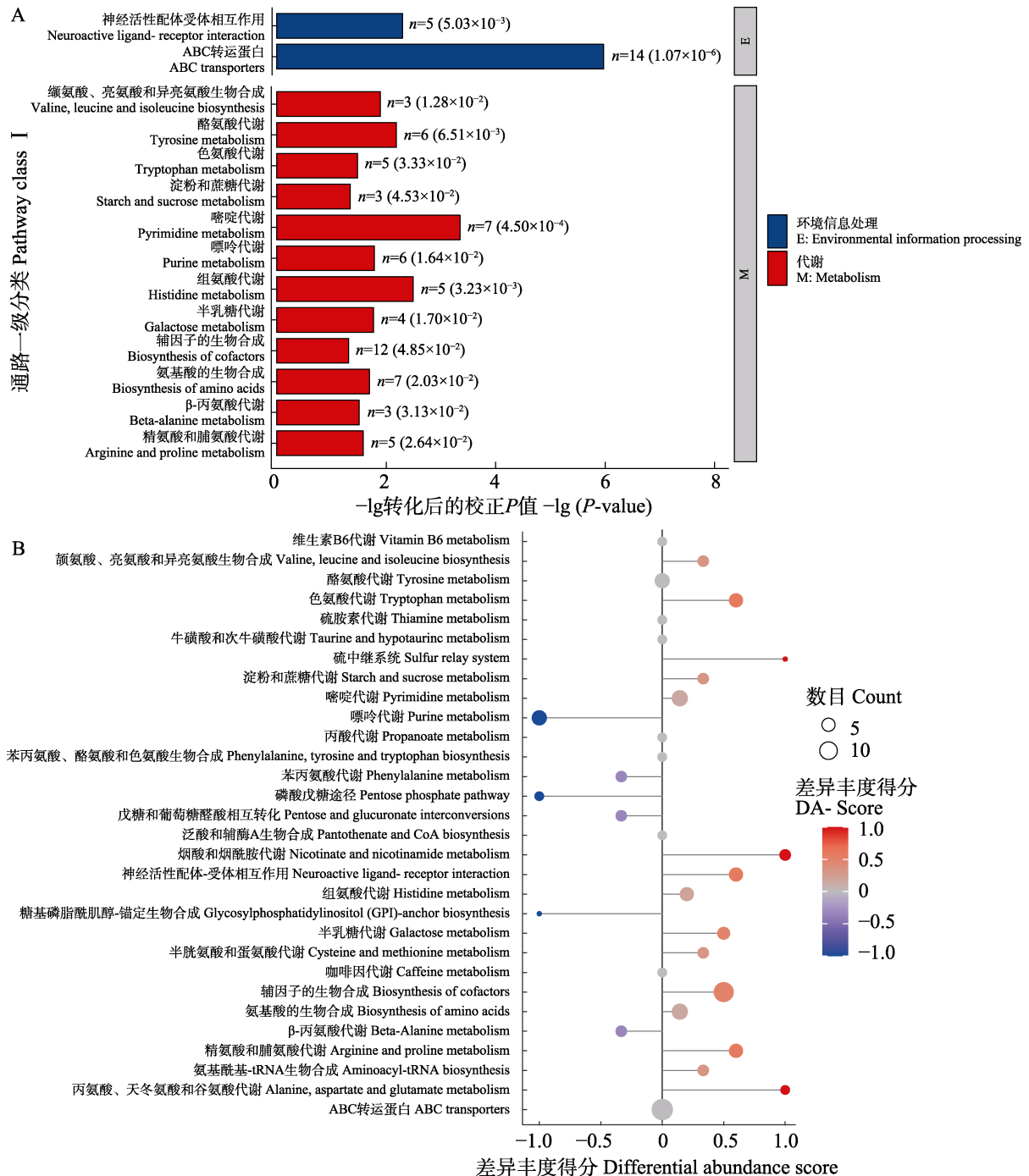


图 5 差异代谢物 KEGG 通路分析

Fig. 5 Analysis of differential metabolite KEGG pathway

A. KEGG 通路富集柱状图; B. 差异丰度得分展示代谢通路整体上下调的趋势。

图 A 中横坐标为 P -value 的负对数转化, 纵坐标为具体通路柱子, 柱子右侧有具体的数量和 P -value 值。图 B 中横坐标为差异丰度得分, 纵坐标为通路, 每个圈对应一条通路, 圆圈大小表示注释到该通路中的代谢物数量。

A. Histogram of KEGG pathway enrichment; B. Differential abundance scores display the trend of upregulation or downregulation of metabolic pathways.

In Fig. A, the abscissa represents the negative logarithm-transformed P -value, and the ordinate displays specific pathways. The corresponding number of entities and the P -value are annotated to the right of each bar. In Fig. B, the abscissa represents the differential abundance score (DA score), and the ordinate displays pathways. Each circle corresponds to an individual pathway, with its size proportional to the number of metabolites annotated to that pathway.

代谢层面的抗寒机制却很少被发现。本研究基于色谱-质谱联用技术对长白山中蜂的越冬蜂和非越冬蜂工蜂肠道的代谢物水平进行分析,在正离子和负离子模式下,共筛选获得 344 个差异代谢物质,对差异代谢物质进行功能富集后得到与越冬期冷适应性相关的显著富集的 KEGG 通路。

在筛选差异代谢物的过程中, OPLS-DA VIP 得分是评估某种物质对整体差异贡献程度的核心指标。本研究对正、负离子模式筛选到的重要程度最高的代谢物进行注释后发现多个与抗氧化损伤、抗微生物侵染、抗寒、营养与能量物质的合成和代谢相关的物质。例如,越冬蜂肠道内异鼠李素、飞燕草素、褪黑素、亚油酸、亚麻酸、左旋多巴、L- β -高苏氨酸等显著下调。异鼠李素具有良好的抗炎、抗氧化及神经保护作用,可以通过上调 Keap1/Nrf2 信号通路抑制 6-OHDA 诱导的细胞氧化损伤而改善神经元细胞毒性作用(郑雨微等, 2023),还可保护 IEC-6 细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤,以及通过激活 PI3K/Akt 介导的 Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路缓解 H_2O_2 诱导的肠上皮细胞功能障碍(王德宇等, 2023)。花色素具有较强的抗氧化作用,而飞燕草素是花色素中最主要的单体活性成分,也是常见花色素中羟基数量最多的一种,丰富的羟基造就了其高效的生物学功能,特别是能够有效抑制各种肿瘤细胞的活性(赵誉彤, 2023)。褪黑素在生物体发育过程中发挥抗氧化、抗衰老、昼夜调节等作用,在蜜蜂的肠道中是可以调节温度的信号分子(Tan *et al.*, 2015; Amaral and Cipolla-Neto, 2018; Li *et al.*, 2018)。在蜂粮中添加外源褪黑素能有效提高中华蜜蜂的抗寒性,缓解低温胁迫对蜜蜂引起的氧化损伤(范文艳, 2020)。蜜蜂肠道中高浓度的亚麻酸和亚油酸不仅可以为蜜蜂提供能量与营养,还具有抵抗真菌和细菌感染的作用(Manning, 2001; 王圣伟等, 2015)。邱园妹(2022)通过饲喂含有 1%青霉素-链霉素的 50% (w/v) 糖水的 7 日龄西方蜜蜂工蜂,观察其嗅觉学习行为的代谢组学研究显示,左旋多巴对蜜蜂神经递质、儿茶酚胺、神经元的数量以及神经递质的合成存在抑制作

用。L- β -高苏氨酸是苏氨酸的衍生物, L-苏氨酸是重要的生物活性分子,对蛋白质合成、能量代谢和营养吸收发挥调节作用,并可提升肠道的消化和吸收能力(Gaifem *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2021)。另一方面,越冬蜂肠道内紫丁香苷、柠康酸、3, 4-二-O-咖啡酰基奎宁酸、喹啉酸、犬尿氨酸、硫胺素、吡哆醇、S-腺苷-L-高半胱氨酸、十五烷酸、4-羟基喹啉的含量显著升高。紫丁香苷、柠康酸与 3, 4-二-O-咖啡酰基奎宁酸均具有消除氧化自由基、提高抗氧化物酶活性的功能(刘妮娜等, 2006; Zhang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022c; 田海涛等, 2023)。喹啉酸和犬尿酸是犬尿氨酸代谢产物,是主要作用于中枢神经系统的神经活性代谢物(Castro-Portuguez and Sutphin, 2020)。研究显示,色氨酸代谢通路可能是肠道微生物调控蜜蜂嗅觉学习的关键通路,而犬尿酸代谢正是色氨酸代谢的支路,在模式生物脑肠轴相关研究中,犬尿酸代谢被认为是肠道微生物与大脑互作的主要调控通路(Zhang *et al.*, 2022)。4-羟基喹啉是一类重要的生物活性物质,参与调节色氨酸代谢并发挥神经保护作用,同时在抗菌、抗病毒等领域也有着重要作用(茆勇军和何海军, 2014)。因此,喹啉酸、犬尿氨酸、4-羟基喹啉等代谢物的上调表达可能表明了机体通过调解体内的色氨酸途径来保护越冬蜂的学习记忆能力。硫胺素和吡哆醇等 B 族维生素是昆虫生长和代谢所必需的微量有机物,特别是在越冬期饲料中添加适量维生素,有助于提高越冬蜂成活率(冯倩倩等, 2011)。十五烷酸对成熟脂肪细胞具有非常显著的促进葡萄糖消耗的作用,对糖和脂质代谢可起到一定的调节作用(付文诚, 2017)。在我国长白山地区,冬季漫长而寒冷,越冬期可长达 6 个月,且面临病原微生物侵袭、饥饿、营养不良等多重生存压力威胁。差异代谢物上调或下调的显著波动表明代谢物随着逆境胁迫的变化,也处于不断调整的动态变化过程中。异鼠李素、飞燕草素、褪黑素等具有抗氧化功效代谢物的显著下调表明机体在应激条件下需要消耗一定的抗氧化物质,而紫丁香苷、柠康酸与 3, 4-二-O-咖啡酰基奎宁酸等的显

著上调可能与维持机体长时间的抗氧化状态有关。课题组前期分析和比较了长白山中蜂和意大利蜜蜂在室外自然越冬条件下的抗氧化酶系活性以及耐寒相关的生理指标差异,结果表明长白山中蜂的抗氧化防御系统在越冬期发挥了重要作用(刘楠楠等, 2022), 与本研究在代谢组水平上的结果相一致。综上所述,越冬蜂与非越冬蜂在代谢物质上存在着显著差异,越冬蜂通过消耗或积累异鼠李素、紫丁香苷等具有抗氧化功能的生物活性代谢产物,参与氧化应激防御反应,降低由低温等胁迫因子引起的氧化伤害,提高机体的越冬抗性。

越冬期蜂群基本生活的维持离不开作为能量基础的营养物质。基于差异代谢物的分类结果可知,它们主要被富集在聚酮化合物、肽、核酸、苯丙素类、脂肪酸、有机酸及其衍生物、有机杂环化合物等生物活性物质,以及碳水化合物、脂类和类脂分子等能量类物质,参与多种不同的代谢途径,为中蜂的越冬行为提供能量和物质方面的支撑。基于差异代谢物功能分析结果可知,越冬蜂与非越冬蜂的差异代谢物主要富集到蛋白质、氨基酸、糖类等与营养和能量物质相关的合成和代谢通路。其中,嘌呤代谢、磷酸戊糖途径、糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚生物合成、硫中继系统、烟酸和烟酰胺代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢是最显著上/下调的 KEGG 通路。嘌呤是重要的核苷酸前体物质,在新细胞核形成中具有重要作用,嘌呤代谢为 DNA、RNA、ATP、辅酶和信号分子提供嘌呤基(Smith and Atkins, 2002; Nyhan, 2005),作用于嘌呤能受体参与神经调节,在神经再生和神经保护中发挥作用(Ribeiro *et al.*, 2016; Szopa *et al.*, 2021)。戊糖磷酸途径是糖代谢的重要途径之一,该途径的中间产物参与脂肪酸和氨基酸的合成,与糖酵解和三羧酸循环相互补充、相互配合,增加机体的适应能力(沈同和王镜岩, 1991)。糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白是细胞膜的重要组成部分,能够与细胞膜的微结构区域或富含胆固醇和神经节苷脂的区域相结合形成同聚物,具有调节细胞极化、促进能量物质转运、信号转导的作用

(Simons and Ikonen, 1997; Sabharanjak *et al.*, 2002; Paladino *et al.*, 2004)。tRNA 的碱基的化学修饰对于调节翻译和优化蛋白质合成至关重要(Pabis *et al.*, 2020)。有研究表明硫中继系统具有稳定 tRNA 结构方面的作用,与微生物对酸度、重金属和有机溶剂的耐受性相关(Cheng *et al.*, 2022)。烟酸和烟酰胺是两种与维生素 B3 密切相关的化合物,参与机体的脂肪代谢、有氧呼吸及糖酵解、氧化应激等生理生化反应(Romani *et al.*, 2019; 魏筱诗等, 2020)。丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸是中华蜜蜂体内参与抗寒功能的氨基酸种类,遇到低温应激时被转化为能量或其他抗寒类物质(徐凯等, 2018)。在本研究中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、色氨酸代谢、组氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等氨基酸合成和代谢水平的上调提示越冬蜂机体内蛋白质的生物合成与能量代谢较为活跃,为机体应对冷胁迫提供物质基础和能量支撑,进而助力越冬蜂抗寒。基于 16S rDNA V3-V4 区域高通量测序技术的越冬期长白山中蜂的肠道菌群分析显示,氨基酸及碳水化合物的运输和代谢途径得到显著富集(Liu *et al.*, 2023),与本研究在代谢组水平上的结果相一致。因此推测,越冬蜂通过调节细胞内外物质转运、辅因子合成、能量物质代谢等相关通路,以增强机体的低温胁迫耐受性,维持内环境稳态,来为蜂群越冬行为提供营养和能量支撑。

综上所述,季节性冷驯化提高了长白山中蜂种群的抗寒能力。蜜蜂主要通过调节抗氧化代谢和能量物质合成代谢应对越冬期逆境胁迫,研究结果揭示了长白山中蜂应对栖息地寒冷的代谢特征,为东方蜜蜂抗寒性状的深入开发利用提供了基础数据。本文仅针对越冬中期的工蜂展开实验研究,后续将进行多组学数据的整合分析,以进一步明确越冬期蜂群的耐寒调控机理,研究关键基因、酶和代谢物的变化,并将其应用于抗寒蜂种的选育。

参考文献 (References)

Amaral FGD, Cipolla-Neto J, 2018. A brief review about melatonin,

- a pineal hormone. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 62(4): 472–479.
- Büchler R, Costa C, Hatjina F, Andonov S, Meixner MD, Le Conte Y, Uzunov A, Berg S, Bienkowska M, Bouga M, Drazic M, Dyrba W, Kryger P, Panasiuk B, Pechhacker H, Petrov P, Kezić N, Korpela S, Wilde J, 2014. The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 53(2): 205–214.
- Castro-Portuguez R, Sutphin GL, 2020. Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. *Experimental Gerontology*, 132: 110841.
- Chen C, Liu ZG, Luo YX, Xu Z, Wang SH, Zhang XW, Dai RG, Gao JL, Chen X, Guo HK, Wang HH, Tang J, Shi W, 2017. Managed honeybee colony losses of the Eastern honeybee (*Apis cerana*) in China (2011–2014). *Apidologie*, 48(5): 692–702.
- Chen H, Liang GM, Zou LY, Guo F, Wu KM, Guo YY, 2010. Research progresses in the cold hardiness of insects. *Plant Protection*, 36(2): 18–24. [陈豪, 梁革梅, 邹朗云, 郭芳, 吴孔明, 郭予元, 2010. 昆虫抗寒性的研究进展. 植物保护, 36(2): 18–24.]
- Cheng RL, Li XF, Jiang LJ, Gong LF, Geslin C, Shao ZZ, 2022. Virus diversity and interactions with hosts in deep-sea hydrothermal vents. *Microbiome*, 10(1): 235.
- Corlett RT, 2004. Flower visitors and pollination in the oriental (indomalayan) region. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(3): 497–532.
- Du YL, Xu K, Zheng LF, Liu YL, Jiang YS, 2023. Study on the pathogenesis of jujube flower disease in *Apis mellifera liguatica* workers based on midgut metabolomics. *Acta Entomologica Sinica*, 66(9): 1171–1182. [杜亚丽, 徐凯, 郑丽芳, 刘玉玲, 姜玉锁, 2023. 基于中肠代谢组学意大利蜜蜂工蜂枣花病的发病机理研究. 昆虫学报, 66(9): 1171–1182.]
- Fan WY, 2020. Function of exogenous melatonin and melatonin synthase gene T5H-1 in the cold resistance of *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [范文艳, 2020. 外源褪黑素与褪黑素合成酶基因 T5H-1 在中华蜜蜂抗寒过程中的功能研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Feng QQ, Xu BH, Liu F, Li CC, Yang WR, 2011. The effect of vitamins on the growth and development of honeybees. *Apiculture of China*, 62(1): 14–15. [冯倩倩, 胥保华, 刘锋, 李成成, 杨维仁, 2011. 维生素对蜜蜂生长发育的影响. 中国蜂业, 62(1): 14–15.]
- Fu WC, 2017. Effects of pentadecanoic acid on glucose metabolism and its mechanism. Master dissertation. Shanghai: East China Normal University. [付文诚, 2017. 十五烷酸对糖代谢的调控及机理探究. 硕士学位论文. 上海: 华东师范大学.]
- Gaifem J, Gonçalves LG, Dinis-Oliveira RJ, Cunha C, Carvalho A, Torrado E, Rodrigues F, Saraiva M, Castro AG, Silvestre R, 2018. L-threonine supplementation during colitis onset delays disease recovery. *Frontiers in Physiology*, 9: 1247.
- Li GL, Zhang YM, Ni Y, Wang Y, Xu BH, Guo XQ, 2018. Identification of a melatonin receptor type 1A gene (AccMTNR1A) in *Apis cerana cerana* and its possible involvement in the response to low temperature stress. *Naturwissenschaften*, 105(3/4): 24.
- Liu NN, 2022. Research on genetic resources evaluation of *Apis cerana cerana* in Changbai Mountain. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [刘楠楠, 2022. 长白山中华蜜蜂遗传资源评价研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Liu NN, Fang M, Ye HY, He BF, 2006. Stress of media of citroconic acid on *A. pascens DMDC12* and increase of its SOD activity. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 29(4): 69–72. [刘妮娜, 方民, 叶艳华, 何冰芳, 2006. 柠檬酸培养基对 *A. pascens DMDC12* 的胁迫作用与其 SOD 活性的提高. 南京师大学报(自然科学版), 29(4): 69–72.]
- Liu NN, Li JL, Chang ZG, 2022. Measurement of protective enzyme activities and physiological indices of the cold tolerance in Changbaishan Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*) and Italian honeybee (*Apis mellifera* L.) during the overwintering period. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 44(2): 39–43. [刘楠楠, 李杰奎, 常志光, 2022. 越冬期长白山中华蜜蜂与意大利蜜蜂保护酶系活性及耐寒生理指标的测定. 特产研究, 44(2): 39–43.]
- Liu NN, Liu HM, Ju Y, Li XA, Li Y, Wang TJ, He JM, Niu QS, Xing XM, 2022a. Geometric morphology and population genomics provide insights into the adaptive evolution of *Apis cerana* in Changbai Mountain. *BMC Genomics*, 23(1): 64.
- Liu NN, Lü WM, Lü HY, San ZH, Piao YL, Li FL, 2023. Analysis of diversity and composition of *Apis cerana* gut microbiome in overwintering period. *Journal of Apicultural Science*, 67(2): 135–146.
- Liu NN, Ren ZY, Ren QD, Chang ZG, Li JL, Li XG, Sun ZY, He JM, Niu QS, Xing XM, 2022b. Full length transcriptomes analysis of cold-resistance of *Apis cerana* in Changbai Mountain during overwintering period. *Gene*, 830: 146503.
- Liu NN, Wang XM, Li JL, He JM, 2020. Production performance and biological characteristics of Changbaishan Chinese bee

- during the blooming periods of *Tilia*. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 42(6): 5–9. [刘楠楠, 王新明, 李杰奎, 何金明, 2020. 椴树花期长白山中华蜜蜂生产性能及生物学特性分析. 特产研究, 42(6): 5–9.]
- Liu S, Wang LH, Guo J, Tang YJ, Chen YP, Wu J, Li JL, 2017. Chinese Sacbrood virus infection in Asian honey bees (*Apis cerana cerana*) and host immune responses to the virus infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 150: 63–69.
- Liu Y, Zhu XY, Tong XX, Tan ZQ, 2022c. Syringin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting neuroinflammation and TLR4 signaling. *Perfusion*, 37(6): 562–569.
- Long DL, Niu QS, Du YL, Liu YL, Wang Z, Chang ZG, Xu K, 2021. Using metabolomic methods to screen metabolites associated with paratyphoid disease in honeybees. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(3): 601–611. [龙登隆, 牛庆生, 杜亚丽, 刘玉玲, 王志, 常志光, 徐凯, 2021. 基于代谢组方法筛选蜜蜂副伤寒相关差异代谢物的研究. 应用昆虫学报, 58(3): 601–611.]
- Manning R, 2001. Fatty acids in pollen: A review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2): 60–75.
- Mao YJ, He HJ, 2014. Progress in synthesis of 4-hydroxyquinoline derivatives. *Chemistry*, 77(10): 950. [茆勇军, 何海军, 2014. 4-羟基喹啉类化合物的合成研究进展. 化学通报, 77(10): 950.]
- Meixner MD, Büchler R, Costa C, Francis RM, Hatjina F, Kryger P, Uzunov A, Carreck NL, 2014. Honey bee genotypes and the environment. *Journal of Apicultural Research*, 53(2): 183–187.
- Nyhan WL, 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86(1/2): 25–33.
- Pabis M, Termathe M, Ravichandran KE, Kienast SD, Krutyholowa R, Sokolowski M, Jankowska U, Grudnik P, Leidel SA, Glatt S, 2020. Molecular basis for the bifunctional Uba4-Urm1 sulfur-relay system in tRNA thiolation and ubiquitin-like conjugation. *The EMBO Journal*, 39(19): e105087.
- Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L, Zurzolo C, 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *The Journal of Cell Biology*, 167(4): 699–709.
- Park D, Jung JW, Choi BS, Jayakodi M, Lee J, Lim J, Yu Y, Choi YS, Lee ML, Park Y, Choi IY, Yang TJ, Edwards OR, Nah G, Kwon HW, 2015. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1): 1.
- Plumb RS, Granger JH, Stumpf CL, Johnson KA, Smith BW, Gaultz S, Wilson ID, Castro-Perez J, 2005. A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and oa-TOF mass spectrometry: Application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice. *The Analyst*, 130(6): 844–849.
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ, 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632): 220–229.
- Qiu YM, 2022. Study on effects of gut bacterium on learning behavior in *Apis mellifera* L. Master dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [邱园妹, 2022. 肠道微生物对西方蜜蜂嗅觉学习的影响研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Ribeiro FF, Xapelli S, Miranda-Lourenço C, Tanqueiro SR, Fonseca-Gomes J, Diógenes MJ, Ribeiro JA, Sebastião AM, 2016. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology*, 104: 226–242.
- Romani M, Hofer DC, Katsyuba E, Auwerx J, 2019. Niacin: An old lipid drug in a new NAD⁺ dress. *Journal of Lipid research*, 60(4): 741–746.
- Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S, 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Developmental Cell*, 2(4): 411–423.
- Shen T, Wang JY, 1991. Biochemistry (Second Edition). Beijing: Higher Education Press. 103–107. [沈同, 王镜岩, 1991. 生物化学 (第二版). 北京: 高等教育出版社. 103–107.]
- Simons K, Ikonen E, 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633): 569–572.
- Smith PMC, Atkins CA, 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 128(3): 793–802.
- Szopa A, Socała K, Serefko A, Doboszevska U, Wróbel A, Poleszak E, Wlaź P, 2021. Purinergic transmission in depressive disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 224: 107821.
- Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ, 2015. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. *Molecules*, 20(10): 18886–18906.
- Tang Q, Tan P, Ma N, Ma X, 2021. Physiological functions of threonine in animals: Beyond nutrition metabolism. *Nutrients*, 13(8): 2592.
- Tian HT, Zhang Z, Cai CY, Deng ZP, 2023. Metabolism and excretion of isochlorogenic acid B in rats by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 25(11): 3605–3614. [田海涛, 张喆, 蔡

- 春颖, 邓志鹏, 2023. 基于超高效液相色谱-质谱技术的异绿原酸 B 大鼠体内代谢及排泄研究. *世界科学技术-中医药现代化*, 25(11): 3605–3614.]
- Wang DY, Yang DL, Chang L, 2023. Protective effect of isorhamnetin on H₂O₂-induced oxidative stress injury of intestinal epithelial cells. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 44(1): 7–11. [王德宇, 杨东亮, 常刘, 2023. 异鼠李素对 H₂O₂ 诱导的肠上皮细胞氧化应激损伤的保护作用. *陕西中医*, 44(1): 7–11.]
- Wang SW, Xu BH, Wang HF, 2015. Appropriate linoleic acid supplemental level in *Apis mellifera ligustica* worker larvae diet. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 27(5): 1440–1449. [王圣伟, 胥保华, 王红芳, 2015. 意大利蜜蜂工蜂幼虫饲料中亚油酸的适宜添加水平. *动物营养学报*, 27(5): 1440–1449.]
- Wei XS, Yao JH, Wang C, 2020. Similarities and differences of niacin and niacinamide in study on metabolism and production of ruminant. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 32(12): 5509–5515. [魏筱诗, 姚军虎, 王翀, 2020. 烟酸和烟酰胺在反刍动物机体代谢及生产研究中的异同性. *动物营养学报*, 32(12): 5509–5515.]
- Xu K, Niu QS, Liu YL, Chen DH, Du YL, Guo LN, Zhao HT, Jiang YS, 2018. Effects of temperature on major physiological indicators of cold tolerance in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(5): 889–895. [徐凯, 牛庆生, 刘玉玲, 陈东海, 杜亚丽, 郭丽娜, 赵慧婷, 姜玉锁, 2018. 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. *应用昆虫学报*, 55(5): 889–895.]
- Yang S, Zhuang D, Wang ZW, Li H, Zhang ZY, Tan K, 2010. Study on foraging behavior of *Apis cerana* and *Apis mellifera* in warm winter. *Journal of Bee*, 30(5): 10–12. [杨爽, 庄迪, 汪正威, 李华, 张祖芸, 谭垦, 2010. 对暖冬期东西方蜜蜂采集行为的研究. *蜜蜂杂志*, 30(5): 10–12.]
- Yu YL, Zhou SJ, Xu XJ, Zhu XJ, Zhou BF, 2013. Analysis on genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Changbai Mountains. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Nature Science Edition)*, 42(6): 643–647. [于瀛龙, 周姝婧, 徐新建, 朱翔杰, 周冰峰, 2013. 长白山中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*) 遗传多样性分析. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 42(6): 643–647.]
- Zhang HH, Gu HJ, Jia QH, Zhao YQ, Li HQ, Shen SR, Liu X, Wang GS, Shi QM, 2020. Syringin protects against colitis by ameliorating inflammation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 680: 108242.
- Zhang ZJ, Mu XH, Cao QN, Shi Y, Hu XS, Zheng H, 2022. Honeybee gut *Lactobacillus* modulates host learning and memory behaviors via regulating tryptophan metabolism. *Nature Communications*, 13(1): 2037.
- Zhao YT, 2023. Exploring the proliferative inhibitory effect and mechanism of delphinidin on human colorectal cancer SW480 cells based on network pharmacology. Master dissertation. Chengdu: Chengdu Medical College. [赵誉彤, 2023. 基于网络药理学探究飞燕草素对人结直肠癌 SW480 细胞的增殖抑制作用及机制研究. 硕士学位论文. 成都: 成都医学院.]
- Zheng YW, Yu LC, Xia SJ, He YX, Lv HM, 2023. Effect of isorhamnetin on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cytotoxicity and protection against oxidative injury. *Journal of China Agricultural University*, 28(11): 140–150. [郑雨微, 于浪潮, 夏士杰, 何雨曦, 吕红明, 2023. 异鼠李素对 6-羟基多巴胺诱导的神经元细胞毒性的影响及氧化损伤的保护作用. *中国农业大学学报*, 28(11): 140–150.]