

不同蛋白源日粮对蜜蜂工蜂血淋巴代谢组与蛋白质组的影响*

韩鹏飞^{1,2**} 钟实^{1,2} 李继莲² 任争光^{1***} 马川^{2***}

(1. 北京农学院生物与资源环境学院, 北京 102206; 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 北京 100193)

摘要 【目的】蜜蜂是维持生态平衡的关键传粉昆虫, 营养匮乏已成为其种群衰退的重要诱因之一。本研究旨在探究3种不同蛋白质日粮对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 高产浆蜂工蜂血淋巴代谢物与蛋白质表达的影响, 从分子层面解析蛋白源差异对蜜蜂生理代谢的调控作用, 为蜜蜂精准饲养提供理论依据。

【方法】在笼养条件下, 将新出房工蜂分别饲喂茶花蜂花粉、油菜蜂花粉、大豆粉及无蛋白对照日粮, 于9日龄时采集血淋巴, 采用超高效液相色谱-质谱联用技术进行非靶向代谢组学与蛋白质组学分析, 系统比较各组代谢物与蛋白质表达谱的差异。【结果】代谢组学分析共鉴定出129种代谢物, 与对照组相比, 各日粮组均显著激活了苯丙氨酸、酪氨酸与色氨酸生物合成通路 ($P < 0.05$)。相较于大豆粉, 油菜蜂花粉饲喂显著上调了 α -亚麻酸代谢通路 ($P < 0.05$)。蛋白质组学分析共鉴定和定量到640种蛋白质, 各日粮组普遍富集于碳代谢、氨基酸生物合成及糖酵解/糖异生等核心代谢途径, 蜂花粉组较大豆粉组协同调控了 α -亚麻酸代谢与花生四烯酸代谢通路 ($P < 0.05$)。【结论】补充蛋白质日粮可协同激活工蜂血淋巴中能量代谢及氨基酸合成的核心通路, 从而有效支持其哺育期的蜂王浆分泌功能。相较于大豆粉, 蜂花粉在脂质代谢和氨基酸生物合成等关键生理过程中展现出更全面、系统的营养支持作用。尤其值得注意的是, 油菜蜂花粉在必需脂肪酸代谢、脂质合成与细胞膜功能调控方面表现出更显著的营养生理优势与代谢调控潜力。本研究结果为蜂群精准饲养与高效人工饲料的研发提供了重要依据。

关键词 蜂花粉; 大豆粉; 血淋巴; 代谢组学; 蛋白质组学

Effects of different dietary protein sources on the hemolymph metabolome and proteome of worker honeybees

HAN Hang-Fei^{1,2**} ZHONG Shi^{1,2} LI Ji-Lian² REN Zheng-Guang^{1***} MA Chuan^{2***}

(1. College of Bioscience and Resources Environment, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. State Key Laboratory of Resource Insects, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract [Aim] To elucidate the molecular mechanisms underlying diet-induced physiological regulation in a royal jelly-producing strain of honeybee (*Apis mellifera ligustica*), and thereby improve the husbandry of this strain. [Methods] The effects of three different diets on the hemolymph metabolome and proteome of the royal jelly-producing strain were investigated. Caged newly emerged worker bees were randomly assigned to one of four dietary treatments: Camellia bee pollen, rapeseed bee pollen, soybean meal, or a protein-free, control diet. Hemolymph samples were collected from 9-day-old bees and analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS)-based, untargeted metabolomics and proteomics, to systematically compare metabolite and protein profiles among the treatment groups. [Results] A total of 129 metabolites were identified. Compared to the control group, all treatment groups had significantly higher phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, activity ($P < 0.05$). Notably, the α -linolenic acid metabolism was

*资助项目 Supported project: 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2024-IAR)

**第一作者 First author, E-mail: hanfei10042025@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: zgren2005@126.com; machuan@caas.cn

收稿日期 Received: 2026-01-30; 接受日期 Accepted: 2026-03-28

markedly upregulated in the rapeseed bee pollen-fed group relative to the soybean meal-fed group ($P < 0.05$). A total of 640 proteins were identified and quantified by proteomics analysis. All dietary groups showed common enrichment in core metabolic pathways, including carbon metabolism, amino acid biosynthesis and glycolysis/gluconeogenesis. Furthermore, the bee pollen-fed groups had stronger co-regulation of the α -linolenic acid and arachidonic acid metabolism than the soybean meal-fed group ($P < 0.05$). **[Conclusion]** Protein supplementation enhances pathways related to energy metabolism and amino acid synthesis in worker bee hemolymph, thereby supporting royal jelly secretion in nurse bees. Among the protein sources evaluated, bee pollen provides superior integrated nutritional support than soybean meal, as demonstrated by the stronger enrichment of the lipid-metabolic and amino-acid biosynthetic pathways of bee-pollen fed bees. Notably, feeding bees rapeseed bee pollen resulted in greater modulation of essential fatty acid metabolism, lipid synthesis, and membrane-associated functions, indicating its suitability for precise adjustment of honeybee nutrition. Collectively, these findings provide a molecular basis for optimizing precision feeding strategies and formulating better artificial diets for honeybees.

Key words bee pollen; soybean meal; hemolymph; metabolomics; proteomics

蜜蜂作为自然界重要的传粉昆虫之一,对维持自然生态系统稳定性和生物多样性具有关键作用 (Potts *et al.*, 2010)。然而,近年来,全球多地蜂群数量持续下降,蜂群损失日趋严重 (Kulhanek *et al.*, 2017),已成为广泛关注的生态问题。导致蜜蜂衰退的因素复杂多样,主要包括气候变化、营养匮乏、栖息地丧失、寄生虫与病原体侵染以及农药暴露等 (Goulson *et al.*, 2015)。其中,营养不良可导致工蜂体重下降、寿命缩短,并可能损害幼虫和蜂王的生长发育 (Brodschneider and Crailsheim, 2010),被认为是驱动蜜蜂种群损失的主要因素之一 (Dolezal and Toth, 2018)。

蜜蜂的营养主要来源于花粉和花蜜。花蜜为蜜蜂飞行、体温调节与蜂蜡合成提供主要能量;花粉则是蛋白质、氨基酸、脂质、甾醇、维生素及矿物质等关键营养物质的主要来源,是影响个体寿命的主要因素 (Wright *et al.*, 2018)。成年蜜蜂对于花粉的摄入主要集中在幼蜂阶段,充足的营养摄入对其咽下腺发育与蜂王浆合成至关重要 (Crailsheim *et al.*, 1992)。发育成熟的咽下腺分泌的蜂王浆是蜂王及 3 日龄内工蜂幼虫的专一性食物,对维持蜂王持续产卵及幼虫早期正常发育至关重要 (Moritz and Crailsheim, 1987)。3 日龄后,工蜂幼虫逐渐转为摄食蜂蜜与蜂花粉混合物 (Crailsheim, 1990),蜂花粉成为其顺利完成发育阶段的关键营养来源。幼虫期营养不良

可导致羽化后工蜂寿命缩短 (Scofield and Mattila, 2015)、卵巢发育受阻 (Hoover *et al.*, 2006)、认知功能下降 (Arien *et al.*, 2015)、农药耐受力降低 (Mogren *et al.*, 2019),进而扰乱其劳动分工 (Scofield and Mattila, 2015),最终损害蜂群的整体生产力。因此,充足的蜂花粉供给直接影响蜂群的健康水平、繁殖能力与生产性能。

蜂花粉的营养价值主要取决于其蛋白质含量与必需氨基酸组成 (Cook *et al.*, 2003)。不同植物来源的蜂花粉在成分和营养质量上差异显著 (Di Pasquale *et al.*, 2013),这种差异可进一步影响蜜蜂寿命 (Liang *et al.*, 2025)、咽下腺发育 (Pernal and Currie, 2000)及免疫功能 (Alaux *et al.*, 2010)等,并最终引发蜜蜂生理与代谢的系统性变化 (Di Pasquale *et al.*, 2013)。在养蜂生产中,蜂花粉常用于配制蜂群补充饲料,对维持蜂群存活与提升生产力具有积极作用 (Brodschneider and Crailsheim, 2010)。系统探究不同蜂花粉饲喂对蜜蜂生理代谢的调控作用,对优化蜂群营养管理具有重要意义。

在我国,油菜蜂花粉 (Rapeseed bee pollen, RBP)与茶花蜂花粉 (Camellia bee pollen, CBP)是两种重要的天然蛋白质源。其中,RBP产量最高,是春季蜂群繁殖的关键蛋白来源,其粗蛋白含量约为 20%-30%,且包含蜜蜂所需的全部 10 种必需氨基酸 (高丽娇等, 2016)。饲喂 RBP 能显著延长工蜂寿命、促进咽下腺发育,并提高

咽下腺蛋白质含量及中肠蛋白水解酶活性 (Liang *et al.*, 2025)。CBP 同样在我国养蜂业中广泛应用, 含有咖啡因、山奈酚等生物活性成分, 因而具备较强的抗炎与抗氧化能力 (Yang *et al.*, 2019)。在早春或粉源匮乏时期, 蜂农常以大豆粉 (Soybean meal, SBM) 为基础配制人工饲料, 以满足蜂群营养需求 (Paray *et al.*, 2021)。然而, 此类饲料在营养组成上无法完全替代天然蜂花粉, 后者通常在维持群势、提高产蜜量等方面表现更优 (Dodoluglu and Emsen, 2007)。目前, 关于蜂花粉与 SBM 之间的成分差异对蜜蜂系统性代谢状态的影响机制尚不明确。此外, 尽管 CBP 和 RBP 均为优质天然蛋白源, 但二者在脂肪酸、氨基酸及矿物质等组成上存在显著差异 (董文滨等, 2013), 这些差异可能对蜜蜂生理代谢产生特异性调控作用, 仍有待通过系统研究加以阐明。

血淋巴是循环于蜜蜂体腔的关键体液, 承担着物质运输、营养分配与激素调节等多项生理功能 (Chan *et al.*, 2006), 被视为评估蜜蜂整体生理状态的理想材料 (Chan *et al.*, 2009)。近年来, 随着质谱技术的快速发展, 基于血淋巴的代谢组学与蛋白质组学分析, 为解析蜜蜂营养、健康及环境适应等表型提供了重要的分子手段 (Chan and Foster, 2008)。在代谢层面, 不同蜂花粉的摄入可显著影响 7 日龄工蜂的血淋巴代谢, 具体表现为鞘脂代谢、色氨酸代谢及含硫氨基酸代谢通路的激活 (Chang *et al.*, 2022), 并影响蜜蜂脂肪体与血淋巴中蛋白酶及其抑制剂的活性 (Bryś *et al.*, 2025)。在蛋白质层面, 血淋巴中载脂蛋白与卵黄原蛋白等特定蛋白质的表达水平, 可作为评估西方蜜蜂营养与健康状态的重要生物标志物 (Isani *et al.*, 2023)。

我国从意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 中成功选育出蜂王浆高产品系 (浆蜂), 其蜂王浆产量较原种提高约 10 倍, 单群年产量可达 10 kg 以上 (Altaye *et al.*, 2019)。得益于该品系的推广, 我国蜂王浆年总产量增至约 4 000 吨, 占全球总产量的 90% 左右 (Ararso *et al.*, 2018)。蜂王浆产量的大幅提升意味着浆蜂需要更高的营养与代谢支持, 尤其是对蛋白质的摄入需求显著增加,

这对维持浆蜂代谢稳态和持续分泌蜂王浆的能力至关重要。与此一致, 研究发现浆蜂品系的花粉采集量显著高于普通意大利蜜蜂 (Han *et al.*, 2017)。因此, 不同来源蜂花粉的营养组成差异, 可能对浆蜂的生理代谢产生更为显著的影响。

本研究以浆蜂为研究对象, 在实验室笼养条件下, 对新出房工蜂分别饲喂 CBP、RBP、SBM 及无蛋白质对照日粮 (CK)。于 9 日龄时采集工蜂血淋巴样品, 基于代谢组学与蛋白质组学技术, 系统分析 3 种蛋白质日粮对血淋巴代谢物与蛋白质表达谱的影响。通过整合两组学数据, 旨在从分子层面解析不同蛋白源对蜜蜂生理代谢的差异性影响, 为完善蜜蜂营养理论及优化蜂群饲料配置提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂饲喂处理与样品采集

供试蜜蜂为浆蜂, 按照标准养蜂方法进行统一饲养管理。选取 6 群群势相近的健康浆蜂, 将成熟封盖子脾置于 (34±1) °C、相对湿度 70%、光周期为 0L:24D 的培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司, DHP-9082 型) 中孵育。收集 12 h 内新出房的工蜂 (1 日龄), 转移至金属网木制饲养笼 (10 cm × 6 cm × 12 cm), 每笼 100 只。实验共设置 4 个组别, 包括 3 个蛋白质日粮组及 1 个无蛋白对照组, 每组 5 个重复, 总计 20 笼。所有饲养笼均于 30 °C、50% 相对湿度的黑暗条件下进行培养。

日粮配制过程中, CBP、RBP 及 SBM 均于 45 °C 下干燥 24 h 至恒重, 随后与蜂蜜及水混合调制至湿润均匀、可压制成形的饼状物。蜂蜜与水的添加量根据不同蛋白质原料的吸水性与黏结性进行调整, 以提高取食接受度 (Paray *et al.*, 2021)。其中, CBP 与 RBP 日粮均按质量比 4:2:1 (蜂花粉:蜂蜜:水) 配制, SBM 日粮按 1:2:1 (大豆粉:蜂蜜:水) 配制。饲养期间, 每笼顶部插入 3 支注射器, 其中 1 支装有纯净水 2.5 mL, 另外 2 支装有 50% 蜂蜜水溶液各 2.5 mL; 笼底放置装有 2 g 相应饲料的饲喂管。各处理组

分别饲喂对应的蛋白质日粮, 对照组不添加任何蛋白质饲料, 仅通过注射器提供纯水与 50% 蜂蜜水溶液。所有食物均每日统一更换。实验持续至工蜂达 9 日龄时, 从每笼中随机选取 20 只工蜂采集血淋巴样品。采集时, 先拔除其一侧触角, 随后轻压胸部, 使血淋巴自触角根部溢出, 并用毛细管收集 (Borsuk *et al.*, 2017)。所获样品经液氮速冻后, 置于 -80 °C 冰箱中保存, 用于后续代谢组学与蛋白质组学分析。

1.2 试剂和仪器

试剂: 乙腈、甲醇、甲酸和甲酸铵均为色谱级 (美国 Thermo Scientific 公司)。超纯水由纯水仪制备 (生产商 Millipore)。

仪器: Q Exactive 质谱仪、Orbitrap Exploris 480 质谱仪、Easy-nLC 1000 纳升液相色谱系统、Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱均为美国 Thermo Scientific 公司; Microfuge 22R 台式低温离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); RVC 2-18 旋转蒸发浓缩仪 (德国 Martin Christ 公司)。

1.3 代谢组学分析

将保存于 -80 °C 的血淋巴样品置于冰上解冻, 涡旋振荡 10 s 后, 取 20 μ L 样品与 80 μ L 预冷甲醇充分涡旋混匀。随后超声处理 5 min 后, 于 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 5 min。收集上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后转移至进样瓶, 待上机分析。按相同流程制备两份空白对照样品; 另从每份血淋巴提取液中分取 5 μ L, 混合后作为质量控制 (Quality control, QC) 样本。

血淋巴样品的代谢组分析在 Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱系统与 Q Exactive 高分辨质谱仪联用平台上完成。质谱采集在正、负离子切换模式下进行, 具体色谱条件如下: 使用 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m), 柱温 50 °C, 流速 0.3 mL/min, 进样量 2 μ L。流动相 A 为含 0.1% 甲酸与 10 mmol/L 甲酸铵的 30% 乙腈水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸与 10 mmol/L 甲酸铵的 95% 乙腈水溶液。梯度洗脱程序设定为: 0 - 0.5 min, 0% - 0% A; 0.5 - 7.5 min, 0% - 75% A; 7.5 - 8.5 min, 75% - 75% A;

8.5 - 9.0 min, 75% - 0% A; 9.0 - 13.0 min, 0% - 0% A。质谱采集采用全扫描/数据依赖二级扫描 (Full MS/dd-MS²) 模式, 质量扫描范围设为 70 - 1 000 m/z, 一级全扫描分辨率为 70 000 (半峰全宽), 二级扫描分辨率为 17 500 (半峰全宽), 电喷雾离子源在正、负离子模式下的喷雾电压分别设为 3.5 与 3.0 kV。进样分析前, 系统通过连续进样 10 针 QC 样本进行平衡; 正式分析中样本按随机顺序运行, 并每隔 10 个样品插入一针 QC 样本以监控仪器稳定性及进行后续数据校正。

将获得的质谱原始数据导入 Compound Discoverer 3.2 软件 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 进行色谱峰识别与峰面积提取, 并结合 mzCloud、HMDB、KEGG 及 LIPID MAPS 等公共数据库进行比对注释。采用 SIMCA-P 14.1 (瑞典 Umetrics 公司) 软件进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 与正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。单变量筛选以倍数变化 (Fold change, FC) > 1.2 或 FC < 0.83 且 $P < 0.05$ 作为初步筛选标准。进一步结合 OPLS-DA 模型提供的变量投影重要度 (Variable importance in projection, VIP), 将同时满足 VIP > 1.0、FC > 1.2 或 FC < 0.83 以及 $P < 0.05$ 的代谢物界定为差异代谢物 (Differentially abundant metabolites)。最后, 利用 MetaboAnalyst 6.0 在线平台 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) 对差异代谢物进行代谢通路富集分析, 显著性阈值设为 $P < 0.05$ 。

1.4 蛋白质组学分析

血淋巴蛋白质的提取、胰蛋白酶酶解及脱盐等步骤基于先前研究的方法进行 (Ararso *et al.*, 2018)。肽段样品采用 Easy-nLC 1000 纳升液相色谱系统与 Orbitrap Exploris 480 高分辨质谱仪联用对肽段样品进行分析。将 3 μ L 酶解后多肽样品经 PepMap100 C18 捕集柱 (3 μ m, 75 μ m \times 2 cm) 富集后, 转移至分析柱 (2 μ m, 75 μ m \times 25 cm) 进行分离。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈溶液, 流速设为 300 nL/min, 梯度洗脱程序如下: 0-2 min, 4% -

8% B; 2-39 min, 8%-25% B; 39-50 min, 25% - 35% B; 50-57 min, 35%-95% B; 57-60 min, 95%-95% B。质谱采集采用数据依赖采集模式, 具体参数如下: 一级全扫描范围为 350-1 500 m/z, 分辨率为 60 000; 二级扫描的分辨率为 15 000, 隔离窗口设为 1.6 m/z, 高能碰撞解离 (Higher-energy collisional dissociation, HCD) 归一化碰撞能量为 30%。

将获得的质谱原始数据导入 PEAKS Studio 软件 (Bioinformatics Solutions 公司, Waterloo, 加拿大) (Ma *et al.*, 2003), 以从 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 下载的蜜蜂蛋白质组 (编号 UP000005203) 为参考数据库进行检索分析。搜索参数设置如下: 前体离子质量容差 $15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 碎片离子质量容差 0.05 D; 酶切方式为胰蛋白酶, 最多允许 2 个漏切位点; 固定修饰为半胱氨酸氨基甲基化, 可变修饰为甲硫氨酸氧化。在肽段和蛋白质水平均以假阳性率 (False discovery rate, FDR) $\leq 1\%$ 进行质量控制。蛋白质定量基于各蛋白中丰度最高的 3 条多肽进行, 并使用总离子流图 (Total ion chromatograms, TIC) 进行归一化校正。为保障分析可靠性, 仅保留在全部实验组 (各日粮组及对照组) 中各至少 3 个生物学重复均被检出的蛋白质用于后续分析。

将定量蛋白质数据导入 SIMCA 14.1 (瑞典 Umetrics 公司) 软件, 经对数转换与 Pareto 标准化预处理后, 进行 PCA 分析。差异表达蛋白 (Differentially abundant proteins) 的筛选标准为 $FC > 1.2$ 或 $FC < 0.83$ 且 $P < 0.05$ 。使用 TBtools (Chen *et al.*, 2023) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库对鉴定到的差异蛋白进行功能注释, KEGG 富集分析通过 KOBAS (Xie *et al.*, 2011) 在线网站完成。以 $P < 0.05$ 为显著性阈值, 满足该条件的 GO 条目与 KEGG 通路被视为显著富集。

1.5 数据分析

统计分析采用 SPSS Statistics 29 软件 (IBM 公司, 美国) 完成。组间比较前对连续变量进行正态性 (Shapiro-Wilk) 与方差齐性 (Levene)

检验; 在满足检验前提的情况下, 采用独立样本 t 检验进行两两比较; 若不满足方差齐性, 则采用 Welch 校正 t 检验; 若不满足正态性, 则采用 Mann-Whitney U 检验。显著性水平设定为 $P < 0.05$, 结果以均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示。

2 结果与分析

2.1 血淋巴代谢组主成分分析

基于代谢组学分析, 本研究从工蜂血淋巴中共鉴定出 129 种代谢物。采用 PCA 对日粮组及对照组血淋巴样本的代谢轮廓进行解析, 结果如图 1 所示。QC 样本在图中聚集紧密, 表明实验具有较好的重复性与稳定性。日粮组与对照组沿第一主成分 (PC1) 分离, PC1 与第二主成分 (PC2) 的累计贡献率达 50.7% (分别为 30.6% 和 20.1%), 说明不同蛋白质日粮的摄入显著改变了工蜂血淋巴的代谢物组成。

2.2 差异代谢物及 KEGG 通路富集分析

基于 $VIP > 1.0$ 、 $FC > 1.2$ 或 $FC < 0.83$ 且 $P < 0.05$ 的标准, 筛选得到组间差异代谢物。OPLS-DA 模型经 200 次置换检验验证, 其 R^2 均大于 Q^2 , 且 Q^2 回归线的 Y 轴截距均为负值, 表明模型具有良好的预测能力与稳定性。如图 2 (A-F) 所示, 与对照组相比, 各日粮组均引起血淋巴代谢物组成的显著变化。其中, RBP 饲喂组差异代谢物最多 (27 个: 19 个上调, 8 个下调), 显著富集于缬氨酸, 亮氨酸与异亮氨酸生物合成 ($P = 0.003$)、酪氨酸代谢 ($P = 0.020$)、一碳单位代谢池 (叶酸) ($P = 0.022$)、丙氨酸, 天冬氨酸与谷氨酸代谢 ($P = 0.022$)、苯丙氨酸, 酪氨酸与色氨酸生物合成 ($P = 0.041$) 以及半胱氨酸与甲硫氨酸代谢通路 ($P = 0.041$); CBP 饲喂组共鉴定出 22 个差异代谢物 (16 个上调, 6 个下调), 显著富集于缬氨酸, 亮氨酸与异亮氨酸生物合成 ($P = 0.002$)、一碳单位代谢池 (叶酸) ($P = 0.015$)、半胱氨酸与甲硫氨酸代谢 ($P = 0.028$) 及苯丙氨酸, 酪氨酸与色氨酸生物合成通路 ($P = 0.034$); SBM 饲喂组有 21 个差异代谢物 (9 个上调, 12 个下调), 显著富集于苯丙氨酸, 酪氨酸

酸与色氨酸生物合成 ($P = 0.026$)、氮代谢 ($P = 0.033$) 及苯丙氨酸代谢通路 ($P = 0.046$)。为系统比较不同组间代谢物丰度差异,选取上述显著富集通路中的关键代谢物(包括多巴胺、酪氨酸、甲硫氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺、组氨酸等)进行热图分析。相较于对照组,这些代谢物在各日粮组中均呈现上调趋势,表明相关氨基酸合成与代谢通路在日粮干预后得到整体激活(图 3: B)。

日粮组间比较表明,RBP 相较于 CBP 饲喂组存在 14 个显著差异代谢物(上调 6 个,下调 8 个),显著富集到嘌呤代谢 ($P = 0.019$) 及 α -亚麻酸代谢 ($P = 0.030$); RBP 相较于 SBM 饲喂组共发现 12 个显著差异代谢物(上调 10 个,下调 2 个),显著富集于一碳单位代谢池(叶酸) ($P = 0.004$)、半胱氨酸与甲硫氨酸代谢 ($P = 0.008$)、缬氨酸,亮氨酸与异亮氨酸生物合成 ($P = 0.037$) 以及 α -亚麻酸代谢通路 ($P = 0.037$); CBP 相较于 SBM 饲喂组鉴定出 12 个显著差异代谢物(上调 9 个,下调 3 个),主要富

集于硫胺素代谢通路 ($P = 0.046$) (图 3: A)。

2.3 血淋巴蛋白质组学主成分分析

血淋巴蛋白质组学分析共鉴定和定量到 640 种蛋白质。PCA 结果显示,所有样本均位于 95% 置信区间内。对照组与 3 种日粮组沿 PC1 轴分离,说明日粮蛋白质摄入显著改变了工蜂血淋巴的蛋白质组成。PC1 与 PC2 分别解释了总变异的 29.2% 和 13.1% (图 4)。

2.4 差异蛋白数量

在日粮组与对照组的比较中,RBP 饲喂组共鉴定到 44 个上调蛋白和 219 个下调蛋白,CBP 饲喂组发现 37 个上调蛋白和 232 个下调蛋白,SBM 饲喂组则鉴定到 37 个上调蛋白和 104 个下调蛋白。日粮组间比较结果显示,RBP 相较于 CBP 饲喂组共鉴定到 19 个上调及 20 个下调蛋白; RBP 相较于 SBM 饲喂组共发现 15 个上调与 68 个下调蛋白; CBP 相较于 SBM 饲喂组则鉴定到 13 个上调和 90 个下调蛋白(图 5: A-F)。

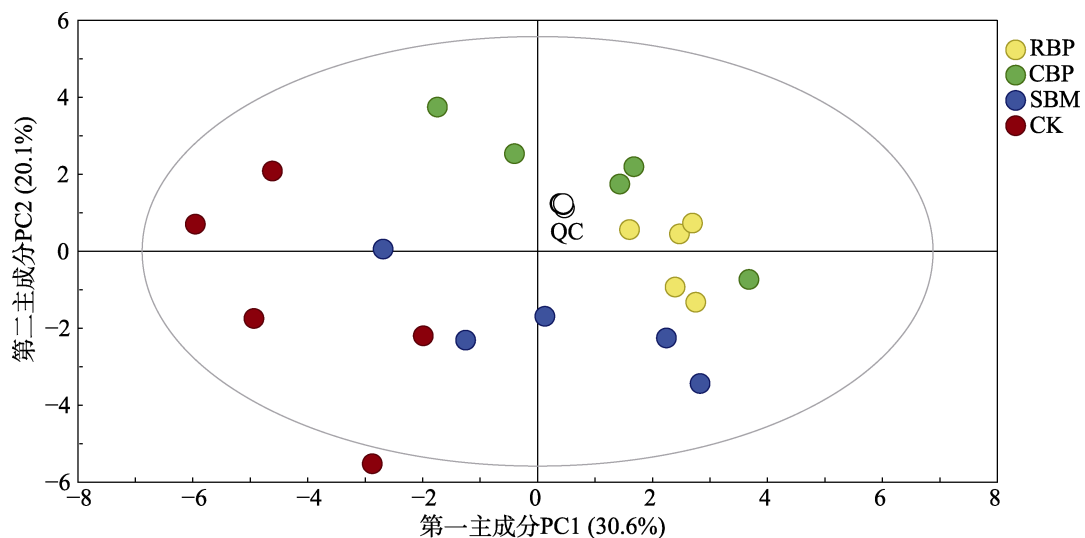


图 1 血淋巴代谢组 PCA 得分图

Fig. 1 PCA score plot of the hemolymph metabolome

RBP: 油菜蜂花粉饲喂组; CBP: 茶花蜂花粉饲喂组; SBM: 大豆粉饲喂组;

CK: 无蛋白日粮对照组; QC: 质量控制。下图同。图中各散点代表一个独立样本,点间距离反映样本代谢组成的相似程度,椭圆区域表示 95% 置信区间。图 4 同。

RBP: Rapeseed bee pollen-fed group; CBP: Camellia bee pollen-fed group; SBM: Soybean meal-fed group; CK: Protein-free diet group; QC: Quality control. The same below. Each point represents an independent sample, and the distance between points reflects the similarity of metabolite composition among samples.

The ellipse indicates the 95% confidence interval. The same for Fig. 4.

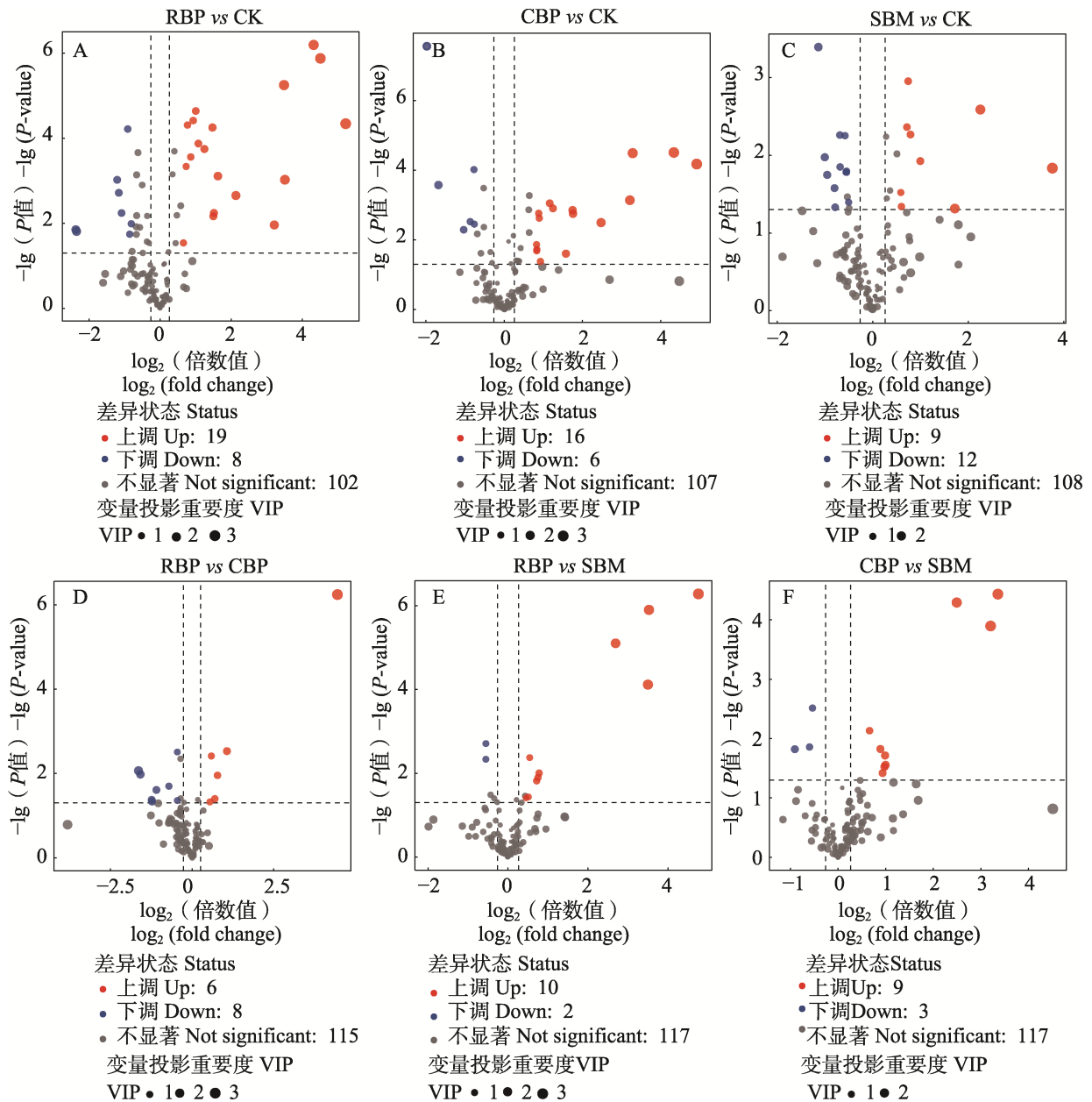


图 2 差异代谢物火山图

Fig. 2 Volcano plot for differentially abundant metabolites

A. RBP 饲喂组与 CK 组比较; B. CBP 饲喂组与 CK 组比较; C. SBM 饲喂组与 CK 组比较; D. RBP 饲喂组与 CBP 饲喂组比较; E. RBP 饲喂组与 SBM 饲喂组比较; F. CBP 饲喂组与 SBM 饲喂组比较。

图中圆点颜色表示代谢物差异状态, 大小对应正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型的 VIP 值。

两条垂直虚线分别表示差异倍数的 $\log_2(1/1.2)$ 与 $\log_2(1.2)$ 的阈值。

红色、蓝色和灰色圆点分别表示上调、下调和差异不显著代谢物。

- A. Comparison between the RBP-fed group and the CK group; B. Comparison between the CBP-fed group and the CK group; C. Comparison between the SBM-fed group and the CK group; D. Comparison between the RBP-fed group and the CBP-fed group; E. Comparison between the RBP-fed group and the SBM-fed group; F. Comparison between the CBP-fed group and the SBM-fed group. Dot color indicates the differential status of metabolites, and dot size represents the VIP value from the OPLS-DA model. The vertical dashed lines indicate the thresholds of $\log_2(1/1.2)$ and $\log_2(1.2)$ for the fold change. Red, blue, and gray dots represent upregulated, downregulated, and non-significantly changed metabolites, respectively.

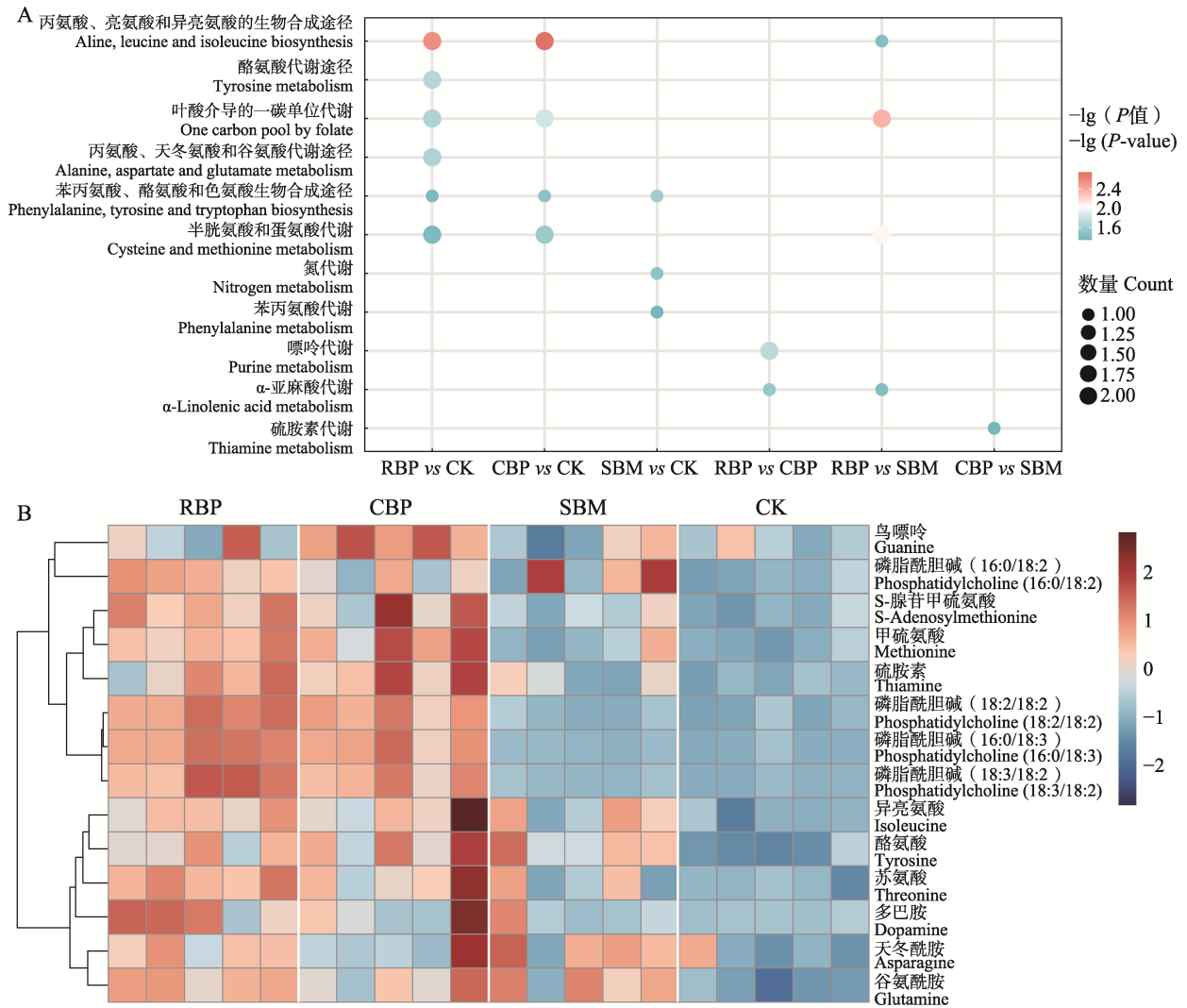


图3 差异代谢物 KEGG 通路富集 (A) 及组间关键差异代谢物比较分析 (B)

Fig. 3 KEGG enrichment (A) and intergroup comparison of differentially abundant metabolites (B)

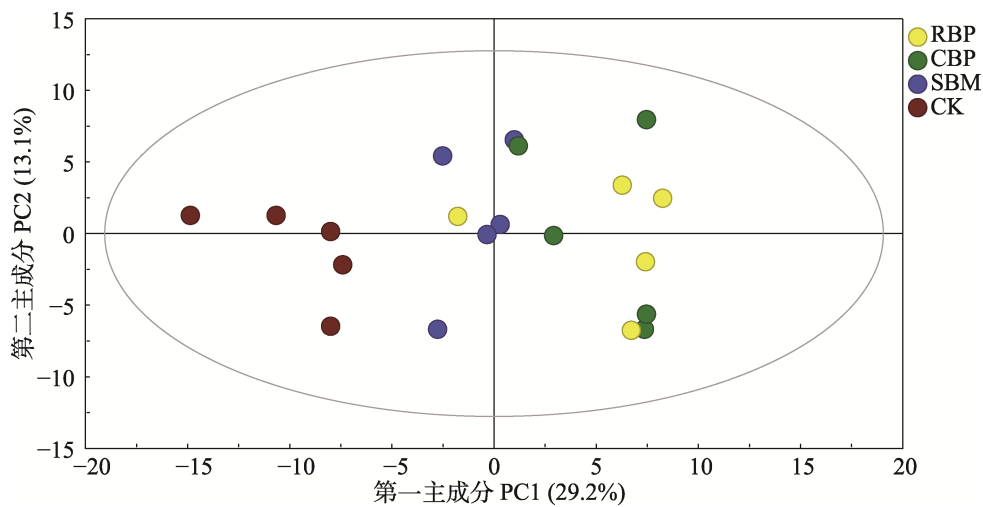


图4 血淋巴蛋白质组学 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of the hemolymph proteome

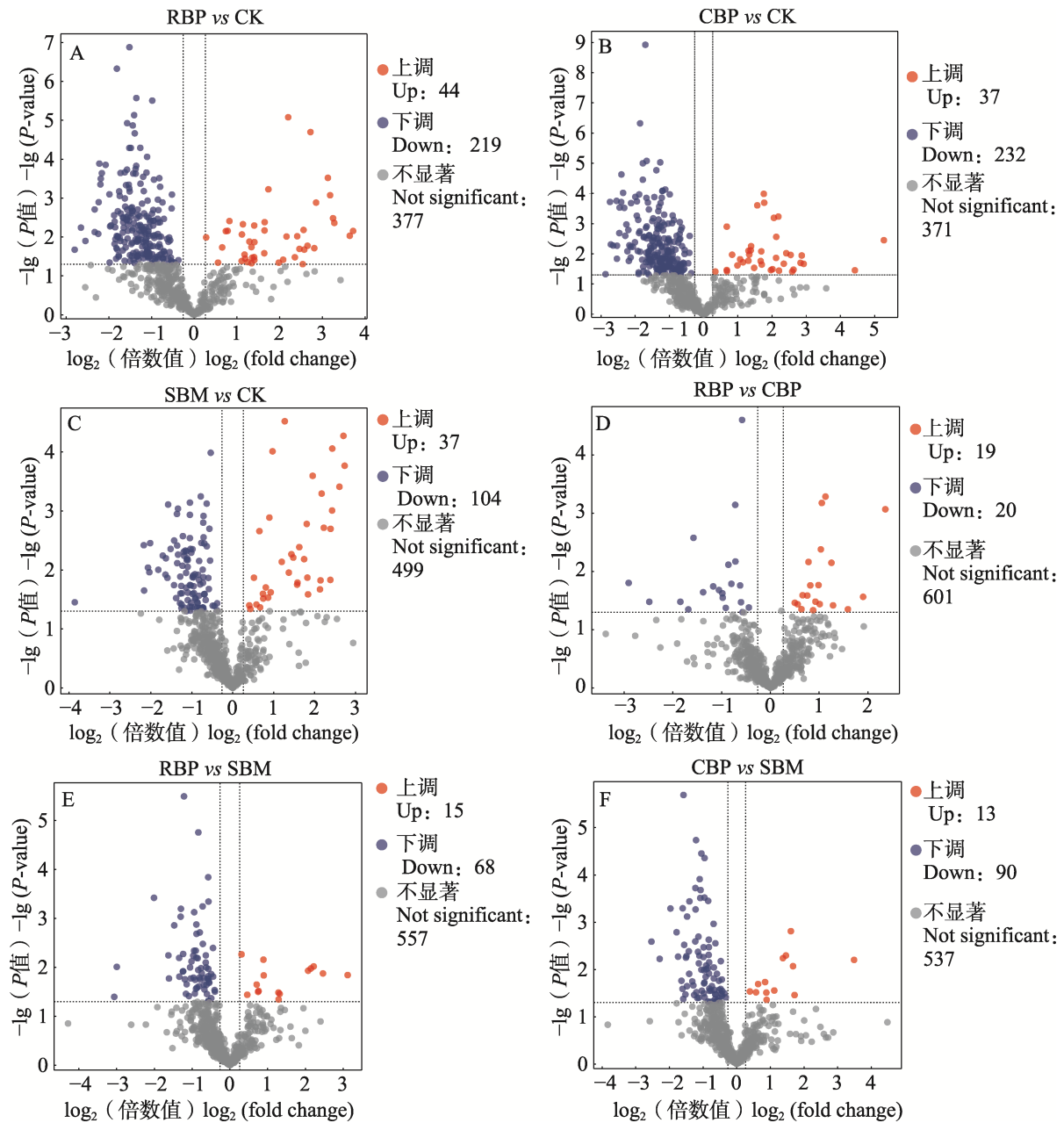


图 5 差异蛋白火山图

Fig. 5 Volcano plot for differentially abundant proteins

A. RBP 饲喂组与 CK 组比较; B. CBP 饲喂组与 CK 组比较; C. SBM 饲喂组与 CK 组比较; D. RBP 饲喂组与 CBP 饲喂组比较; E. RBP 饲喂组与 SBM 饲喂组比较; F. CBP 饲喂组与 SBM 饲喂组比较。火山图的横坐标为差异倍数 (Fold change) 经 \log_2 转化后的值, 纵坐标为 P 值经 $-\lg$ 转化后的值。图中圆点的颜色代表差异倍数的大小, 两条垂直虚线分别标示了差异倍数的 $\log_2(1/1.2)$ 与 $\log_2(1.2)$ 的阈值。红色、蓝色和灰色圆点分别表示上调、下调和差异不显著蛋白质。

A. Comparison between the RBP-fed group and the CK group; B. Comparison between the CBP-fed group and the CK group; C. Comparison between the SBM-fed group and the CK group; D. Comparison between the RBP-fed group and the CBP-fed group; E. Comparison between the RBP-fed group and the SBM-fed group; F. Comparison between the CBP-fed group and the SBM-fed group. The volcano plot displays the distribution of metabolites based on statistical significance and magnitude of change. The x-axis represents the \log_2 -transformed fold change value, and the y-axis shows the $-\lg$ -transformed P -value.

The color of each dot corresponds to the magnitude of the fold change. The vertical dashed lines indicate the thresholds of $\log_2(1/1.2)$ and $\log_2(1.2)$ for the fold change. Red, blue, and gray dots represent upregulated, downregulated, and non-significantly changed proteins, respectively.

2.5 血淋巴差异蛋白 KEGG 功能富集分析与 GO 功能分类

对各日粮组与对照组之间的差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析, 选取其中显著富集的前 10 条通路进行展示(图 6)。与对照组相比, RBP 饲喂组差异蛋白显著富集于代谢通路、碳代谢、糖酵解/糖异生、氨基酸生物合成以及戊糖与葡萄糖醛酸互变等通路 ($P < 0.01$); CBP 饲喂组则主要富集在碳代谢、代谢通路、糖酵解/糖异生、氨基酸生物合成和丙酮酸代谢等相关通路 ($P < 0.01$); SBM 饲喂组则主要富集于代谢通路、 β -丙氨酸代谢、糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢以及戊糖与葡萄糖醛酸互变等通路 ($P < 0.01$)。

进一步对不同日粮组间差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析。结果显示, RBP 与 CBP 饲喂组

比较, 泛酸和辅酶 A 生物合成通路呈现显著富集 ($P < 0.01$); RBP 与 SBM 饲喂组比较富集通路最为丰富, 主要包括花生四烯酸代谢、代谢通路、 α -亚麻酸代谢、氨基酸生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸互变、醚脂代谢及溶酶体 ($P < 0.01$); 此外, 果糖和甘露糖代谢 ($P = 0.010$)、 β -丙氨酸代谢 ($P = 0.011$) 及嘧啶代谢 ($P = 0.018$) 亦显著富集。CBP 与 SBM 饲喂组相比同样富集于花生四烯酸代谢 ($P < 0.01$)、 α -亚麻酸代谢 ($P < 0.01$)、醚脂代谢 ($P = 0.012$) 等脂质相关通路, 并涉及谷胱甘肽代谢 ($P = 0.034$)、碳代谢 ($P = 0.044$) 和 ECM-受体相互作用通路 ($P < 0.01$) (图 6)。

基于 GO 数据库, 对上述差异蛋白进行功能富集分析。通过将差异蛋白归类至生物过程 (Biological process, BP)、细胞组分 (Cellular component, CC) 和分子功能 (Molecular function,

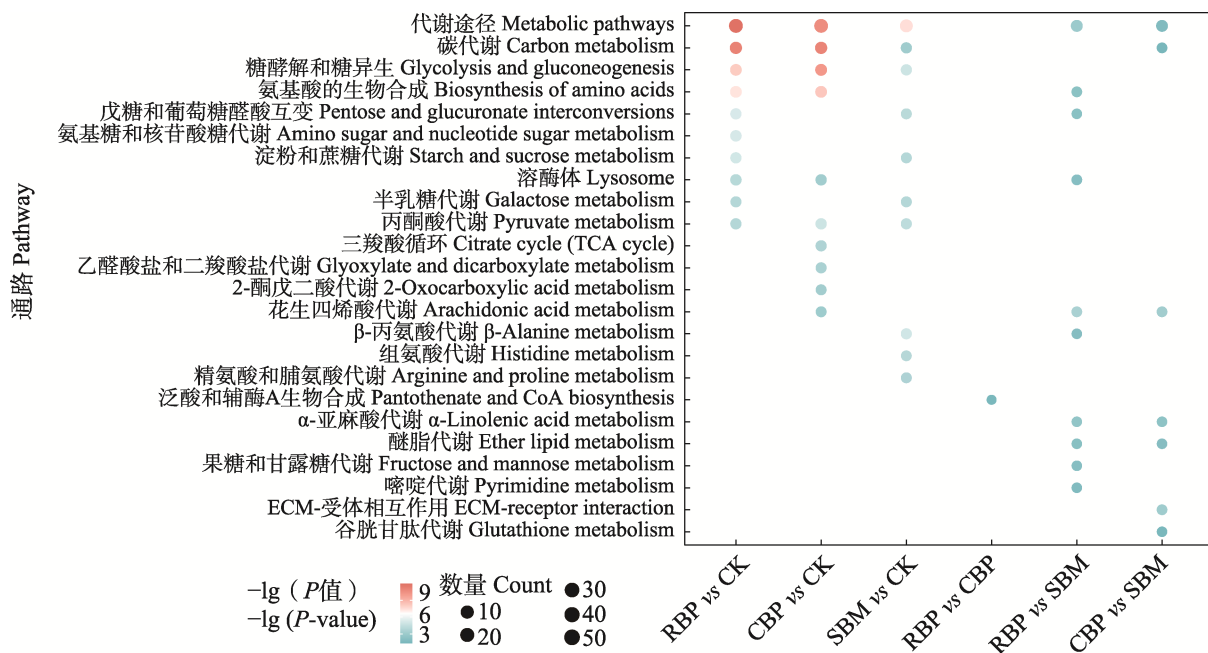


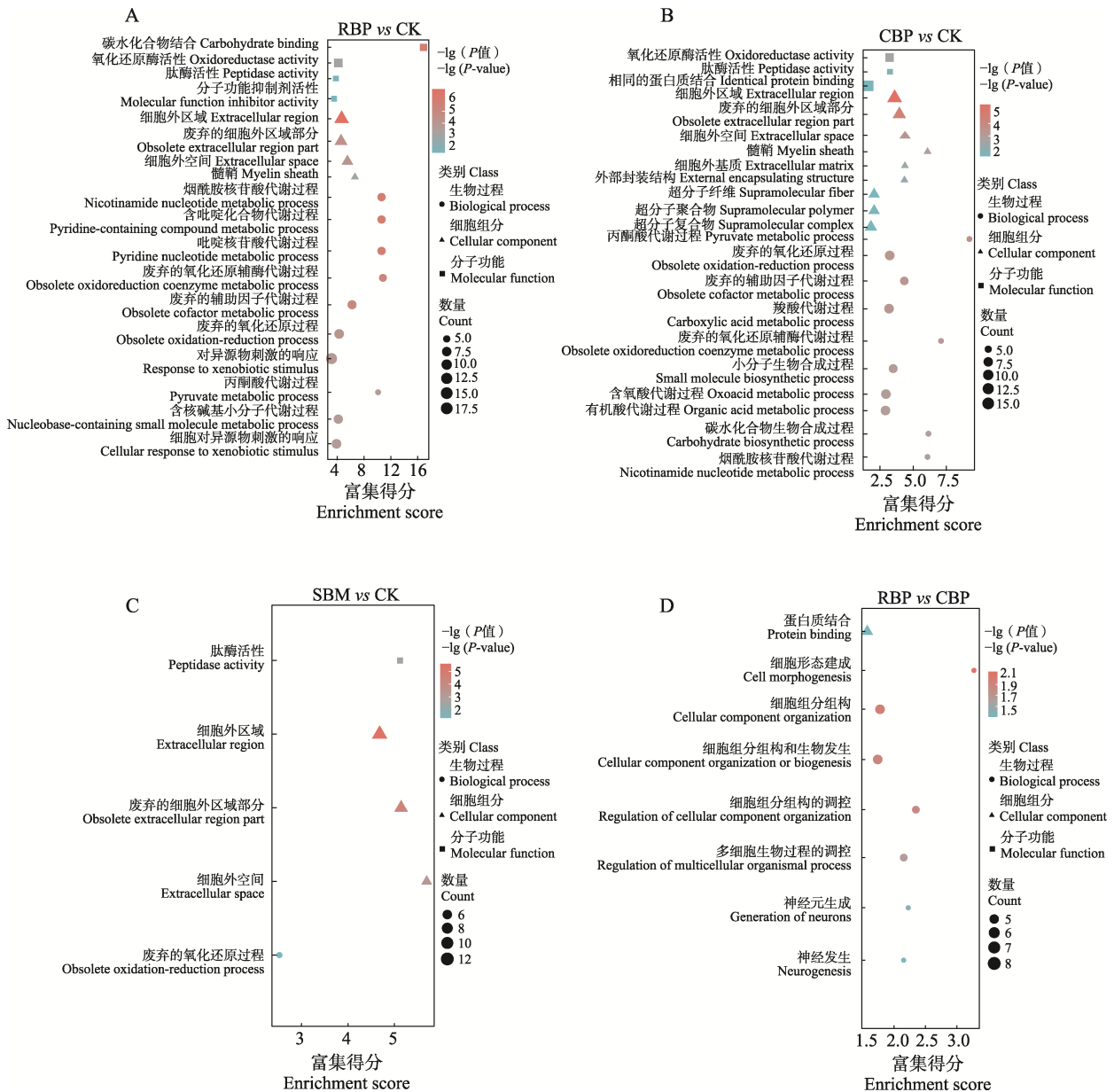
图 6 差异蛋白 KEGG 通路富集图
Fig. 6 Enriched KEGG pathways of differentially abundant proteins

横轴表示组间比较, 纵轴为对应的通路名称。右侧渐变色条代表经 $-\lg$ 转化后的富集分析 P 值, 颜色深度表示通路的富集显著性; 同时, 圆圈的大小表示在该通路中富集到的蛋白数量。
 The horizontal axis represents the between-group comparisons, and the vertical axis lists the corresponding pathway names. The color gradient bar on the right indicates the $-\lg$ -transformed P -value from the enrichment analysis, with its depth of color denoting the significance of enrichment. The size of each circle corresponds to the number of proteins enriched in the respective pathway.

MF) 三大类别中, 系统筛选每类中最显著富集的功能条目, 以揭示不同组间差异蛋白所涉及的核心生物学功能与细胞定位。结果表明, 与对照组相比, RBP 饲喂组差异蛋白主要富集到胞外区域 (CC)、糖结合 (MF) 以及烟酰胺/吡啶核苷酸代谢 (BP) ($P < 0.01$); CBP 饲喂组差异蛋白主要富集于胞外区域 (CC) ($P < 0.01$), 同源蛋白结合 (MF) ($P = 0.035$), 以及丙酮酸代谢、有机酸/羧酸代谢与烟酰胺核苷酸代谢 (BP) ($P < 0.01$); SBM 饲喂组则主要富集到胞外区域 (CC)

与肽酶活性 (MF) ($P < 0.01$)。

日粮组间 GO 富集结果表明, RBP 与 CBP 饲喂组间差异蛋白显著富集于细胞成分组织 ($P = 0.011$)、细胞形态发生及其调控 ($P < 0.01$)、神经元发生 (BP) ($P = 0.043$) 以及蛋白结合 (MF) ($P = 0.048$); RBP 与 SBM 饲喂组主要富集到胞外区域 (CC) 以及外源物响应与代谢相关过程 (BP) ($P < 0.01$); CBP 与 SBM 饲喂组则主要集中于细胞周边 ($P = 0.017$) 与胞外区 (CC) ($P = 0.022$) (图 7: A-F)。



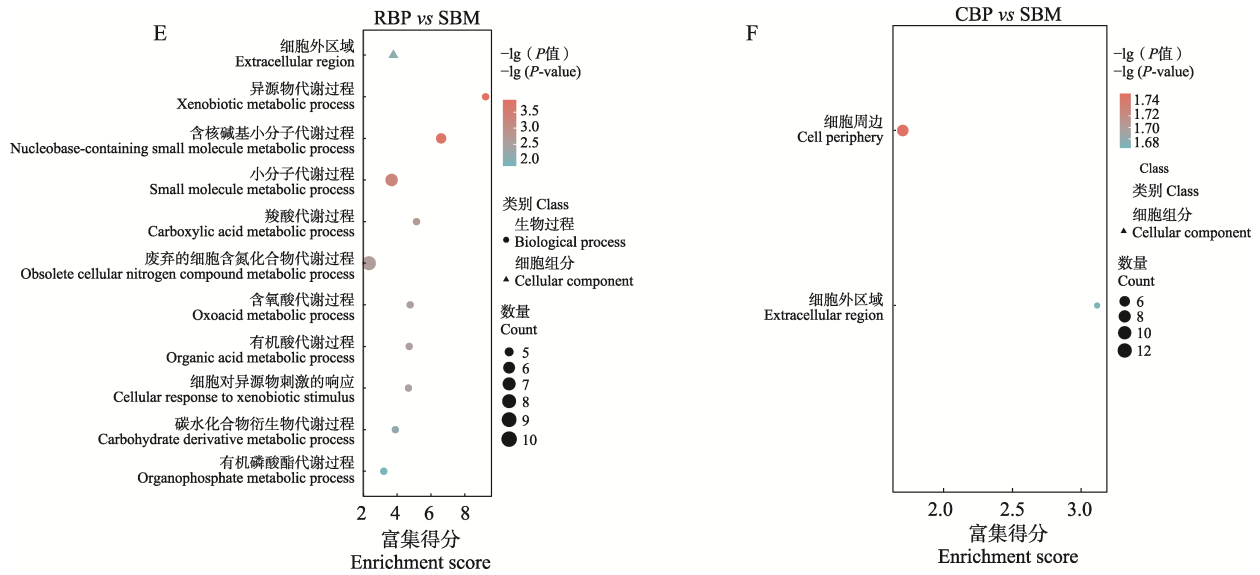


图 7 差异蛋白 GO 富集

Fig. 7 Enriched GO terms of differentially abundant proteins

A. RBP 饲喂组与 CK 组比较; B. CBP 饲喂组与 CK 组比较; C. SBM 饲喂组与 CK 组比较; D. RBP 饲喂组与 CBP 饲喂组比较; E. RBP 饲喂组与 SBM 饲喂组比较; F. CBP 饲喂组与 SBM 饲喂组比较。横轴为富集得分 (Enrichment score), 表征通路的富集程度; 纵轴为富集到的 GO 通路名称。右侧渐变色条表示经 $-\lg$ 转化后的富集显著性 P 值, 颜色越深代表显著性越强。图中圆圈的大小映射了在对通路中富集到的蛋白数量。

A. Comparison between the RBP-fed group and the CK group; B. Comparison between the CBP-fed group and the CK group; C. Comparison between the SBM-fed group and the CK group; D. Comparison between the RBP-fed group and the CBP-fed group; E. Comparison between the RBP-fed group and the SBM-fed group; F. Comparison between the CBP-fed group and the SBM-fed group. The horizontal axis shows the enrichment score, representing the degree of pathway enrichment, while the vertical axis lists the names of the enriched GO terms. The color gradient bar on the right indicates the $-\lg$ -transformed P -value for enrichment significance, with darker colors denoting higher significance. The size of each circle corresponds to the number of proteins enriched in the respective pathway.

3 讨论

蜜蜂作为关键的传粉昆虫, 其种群衰退与营养胁迫密切相关 (Dolezal and Toth, 2018)。尽管 CBP、RBP 及 SBM 是养蜂实践中常用的蛋白质补充来源, 但三者差异对蜜蜂生理代谢的影响仍不明确。为此, 本研究以血淋巴这一反映蜜蜂系统生理状态的理想指标为研究对象, 通过整合代谢组学与蛋白质组学技术, 系统解析了不同蛋白质日粮对蜜蜂血淋巴成分的影响。结果表明, 3 种蛋白质日粮均能显著激活年轻工蜂的基础代谢网络, 增强氨基酸生物合成等核心代谢通路, 从而为哺育期蜂王浆分泌等生理功能提供物质与能量支持。蜂花粉 (尤其是 RBP) 在促进能量代谢、必需脂肪酸代谢及脂质合成调控方面展现出更全面的营养生理优势。

3.1 蛋白质日粮摄入增强工蜂氨基酸合成与能量供应

蛋白质摄入是维持蜂类个体正常发育与生理稳态的关键营养因子, 其来源与组成对多个蜂种的生长发育具有显著影响。例如, 柳属与猕猴桃蜂花粉比岩蔷薇蜂花粉更能促进地熊蜂微蜂群的发育速度并提高糖浆采集量 (Moerman *et al.*, 2016); 更高的花粉多样性则可缩短独居蜂的发育周期并增加其体重 (Schwarz *et al.*, 2024)。对于社会性蜜蜂而言, 蛋白质营养同样至关重要: 仅依靠碳水化合物虽可维持笼养蜜蜂的存活, 但摄入蜂花粉可显著延长其寿命 (Alqarni, 2006), 这可能与蜂花粉诱导抗氧化、寿命调节及免疫功能相关基因的上调有关 (Alaux *et al.*, 2010)。此外, 成年工蜂对蛋白质的需求呈现明显的发育阶段特异性: 新出房蜂和哺育蜂需摄入大量蜂花粉

(Crailsheim *et al.*, 1992), 以获得充足的蛋白质来支持咽下腺发育和蜂王浆合成, 从而保障幼虫哺育 (Wright *et al.*, 2018)。本研究从分子代谢层面为蛋白质营养支持哺育生理的机制提供了直接证据。代谢组学分析表明, 3 种蛋白日粮均显著激活了工蜂血淋巴中苯丙氨酸, 酪氨酸与色氨酸的生物合成通路; 蛋白质组学结果进一步显示, 各日粮组共同富集于代谢通路、碳代谢、糖酵解/糖异生及丙酮酸代谢等中心碳代谢途径。这些结果共同说明, 蛋白质日粮普遍增强了蜜蜂的能量代谢核心网络, 为氨基酸等物质的生物合成提供了底物与能量基础, 从而为蜂王浆的高效合成奠定了分子基础。本研究的结论与前期针对高产浆蜂的研究结果高度一致。在蛋白质层面, 浆蜂在 4 日龄哺育蜂阶段已表现出与蛋白质合成及能量代谢相关的高丰度蛋白在血淋巴中显著富集 (Ararso *et al.*, 2018); 至 6 日龄时, 其咽下腺中碳水化合物与能量代谢蛋白的表达上调尤为显著 (Li *et al.*, 2010); 哺育期浆蜂大脑中能量合成、蛋白质代谢及信号转导相关蛋白的表达也显著增强 (Altaye, 2020)。代谢组学证据同样支持这一结论: 哺育期浆蜂的大脑、咽下腺与上颚腺中涉及神经传导、氨基酸及脂肪酸代谢的代谢通路普遍增强, 从而系统性地支撑了蜂王浆的高效合成 (祁丹丹, 2021)。

本研究发现, 蛋白质日粮显著提高了工蜂血淋巴中酪氨酸、异亮氨酸、PC (18:1/18:2) 与 PC (18:3/18:2) 等特定磷脂酰胆碱及卵黄原蛋白的丰度, 这些物质共同构成蜂王浆高效合成的代谢基础。氨基酸不仅是蛋白质合成的基本原料, 也广泛参与神经调节等重要生理功能。其中, 酪氨酸作为多巴胺合成的关键前体, 参与调控运动、学习、动机及生殖等行为 (Wicker-Thomas and Hamann, 2008; Waddell, 2010; Perry and Barron, 2013; Nall and Sehgal, 2014); 在社会性昆虫中, 多巴胺系统也参与维持社会结构与调节行为活动 (Jarriault and Mercer, 2012)。异亮氨酸作为蜜蜂的必需氨基酸, 完全依赖花粉供给 (de Groot, 1952), 其积累水平不仅反映花粉营养质量, 也能直接促进咽下腺发育并提升血淋巴蛋白浓度 (Vaezi *et al.*, 2023)。此外, 磷脂酰胆碱水平的

升高提示细胞膜结构增强与脂质代谢活跃 (van Meer *et al.*, 2008), 这可能是工蜂为适应高蛋白合成需求而进行的代谢调整。卵黄原蛋白作为重要的储存蛋白及多功能前体 (Amdam *et al.*, 2003), 在工蜂行为转变、寿命延长及越冬适应中发挥关键作用 (Amdam and Omholt, 2002, 2003; Amdam *et al.*, 2004)。上述结果表明, 蛋白质日粮通过上调氨基酸生物合成与中心碳代谢等通路, 有效提高了血淋巴中关键氨基酸、膜磷脂及卵黄原蛋白等功能性物质的水平, 从而系统性地调控哺育期工蜂的代谢网络, 以满足其蜂王浆高效合成与幼虫哺育的生理需求。

3.2 蜂花粉在促进脂质与氨基酸代谢上更具营养优势

综合代谢组学与蛋白质组学分析表明, 与 SBM 相比, 蜂花粉饲喂在调控关键营养代谢通路上具有显著优势。蛋白质组学结果显示, RBP 与 CBP 饲喂组均显著富集于 α -亚麻酸代谢与花生四烯酸代谢通路。这一差异可能源于蜂花粉中较高的不饱和脂肪酸含量, 尤其是富含 α -亚麻酸 (ω -3) 和亚油酸 (ω -6) (Manning, 2001), 二者对蜜蜂的代谢、健康、认知及行为调控均具有关键作用 (Bennett *et al.*, 2022; Furse *et al.*, 2023)。 α -亚麻酸是蜜蜂必须从膳食中获取的必需 ω -3 脂肪酸 (Hulbert and Abbott, 2012), 其含量与工蜂的学习能力 (Arien *et al.*, 2015)、生殖功能及生产性能 (Jorjani *et al.*, 2023) 密切相关, 并作为特征脂质参与劳动分工相关代谢的调节 (Zeng *et al.*, 2025)。亚油酸则是花生四烯酸的前体, 后者在类二十烷酸合成及免疫调节中发挥重要作用 (Hasan *et al.*, 2019)。值得注意的是, 膳食中 α -亚麻酸与亚油酸的比例对蜜蜂健康尤为关键, 比例失衡会损害咽下腺发育、育雏能力及学习行为, 并增加死亡率 (Arien *et al.*, 2020; Corby-Harris *et al.*, 2021; Jorjani *et al.*, 2023), 甚至影响任务分配与哺育行为 (Minahan *et al.*, 2024)。相比之下, SBM 中含有胰蛋白酶抑制剂等抗营养因子, 不仅会抑制工蜂中肠蛋白酶活性, 还会影响咽下腺的正常发育, 从而降低其作为蛋白源的营养利用效率 (Burgess *et al.*, 1996)。因此, 在

实际生产中, SBM 通常不单独使用, 而是与蜂花粉等其他蛋白源配合饲喂, 以优化饲料营养结构并缓解抗营养因子的不良影响。

已有研究证实, 花粉来源差异可显著影响蜜蜂的寿命 (Liang *et al.*, 2025)、咽下腺发育 (Di Pasquale *et al.*, 2013)、免疫功能 (Alaux *et al.*, 2010) 及蜂群群势 (Zheng *et al.*, 2014)。在诸多粉源中, RBP 表现出突出的营养与生产性能优势。与土连翘和鬼针草蜂花粉相比, RBP 饲喂可显著提升与营养功能相关的王浆主蛋白基因表达水平以及蜂王浆产量 (苟利杰等, 2020)。与 CBP 相比, RBP 饲喂能显著增大工蜂咽下腺腺泡体积 (Peng *et al.*, 2024), 提示其更有利于蜂王浆的合成与分泌。同时, 相较于茶花源蜂王浆, 油菜源蜂王浆中含有更高水平的山奈酚、赖氨酸及牛磺酸等活性成分 (Han *et al.*, 2026), 进一步体现了其在营养代谢与生理功能上的优越性。在此基础上, 本研究从分子代谢层面为 RBP 的营养优势提供了新证据。研究发现, 与 CBP 相比, RBP 饲喂显著增强了 α -亚麻酸代谢通路, 并提高了该通路中关键脂质代谢物的含量, 说明 RBP 在必需脂肪酸代谢、脂质合成与细胞膜功能调控方面具有更显著的营养生理效应。此外, RBP 饲喂组中特征性代谢物 S-甲基-L-半胱氨酸亚砷的显著上升, 与已报道的油菜源蜂王浆标志物相符 (Liu *et al.*, 2024), 也为区分不同蜂花粉来源提供了可靠的代谢组学依据。综上所述, RBP 在代谢调控、腺体发育及蜂王浆质量层面均表现出优于 CBP 的综合营养效应, 这为其在蜂群精准饲养中的科学应用提供了系统的理论与实证支持。

需要说明的是, 本研究采用实验室笼养条件对新出房工蜂进行饲喂处理, 能够有效控制外界粉源输入的干扰, 从而更准确地评估不同蛋白源日粮引发的血淋巴多组学响应。然而, 笼养条件下蜜蜂个体间的社会行为、群体结构以及群体内营养分配与交流方式与自然蜂群仍存在一定差异, 因此, 相关结果在实际生产中的适用性仍需 在蜂群条件下进一步验证和综合评估 (Williams *et al.*, 2013)。此外, 不同蛋白源日粮除本身成分组成存在差异外, 在适口性及消化吸收效率方面

也可能存在差异, 从而导致工蜂实际蛋白质摄入量 和 利用水平并不完全一致 (O'Rourke and Buchmann, 1991)。因此, 本研究中观察到的血淋巴代谢物及蛋白质丰度变化幅度, 可能同时受到蛋白源成分组成差异及实际摄入与利用差异的共同影响。

4 结论

本研究基于血淋巴非靶向代谢组学与蛋白质组学分析, 揭示蛋白质补充可在哺育期工蜂中协同激活氨基酸生物合成与中心碳代谢相关通路, 并伴随关键膜磷脂及卵黄原蛋白水平升高, 从而为蜂王浆分泌提供必要的物质基础与能量支撑。进一步比较不同蛋白来源发现, 相较 SBM, 蜂花粉可更显著地调节脂质代谢通路, 尤其在必需脂肪酸相关代谢方面表现出优势; 其中 RBP 对 α -亚麻酸代谢及其相关脂质合成的调控更为突出, 提示其作为蜜蜂精准营养蛋白来源具有更高应用潜力。总体而言, 本研究创新性地从血淋巴层面整合代谢组-蛋白质组证据, 系统阐明不同蛋白源诱导的分子调控网络变化, 为蜂群精准饲养及人工饲料配方优化提供了分子层面的科学依据。

参考文献 (References)

- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y, 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4): 562–565.
- Alqarni AS, 2006. Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers. *Journal of Biological Sciences*, 6(4): 734–737.
- Altaye SZ, 2020. Activity-based proteome profiling of hypopharyngeal gland and brain reveals the molecular basis of extreme reproductive investments that induce colony-level high royal jelly-producing bee syndrome in honeybee (*Apis mellifera ligustica*). Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [Solomon Zewdu Altaye, 2020. 活性蛋白质组揭示意大利蜜蜂群体蜂王浆高产的分子机制. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Altaye SZ, Meng LF, Li JK, 2019. Molecular insights into the enhanced performance of royal jelly secretion by a stock of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) selected for increasing royal jelly production. *Apidologie*, 50(4): 436–453.

- Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW, 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*, 97(3): 741–747.
- Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW, 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4): 1799–1802.
- Amdam GV, Omholt SW, 2002. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2): 209–228.
- Amdam GV, Omholt SW, 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4): 451–464.
- Ararso Z, Ma C, Qi YP, Feng M, Han B, Hu H, Meng LF, Li JK, 2018. Proteome comparisons between hemolymph of two honeybee strains (*Apis mellifera ligustica*) reveal divergent molecular basis in driving hemolymph function and high royal jelly secretion. *Journal of Proteome Research*, 17(1): 402–419.
- Arien Y, Dag A, Yona S, Tietel Z, Cohen TL, Shafir S, 2020. Effect of diet lipids and omega-6 : 3 ratio on honey bee brood development, adult survival and body composition. *Journal of Insect Physiology*, 124: 104074.
- Arien Y, Dag A, Zarchin S, Masci T, Shafir S, 2015. Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51): 15761–15766.
- Bennett MM, Welchert AC, Carroll M, Shafir S, Smith BH, Corby-Harris V, 2022. Unbalanced fatty acid diets impair discrimination ability of honey bee workers to damaged and healthy brood odors. *Journal of Experimental Biology*, 225(7): jeb244103.
- Borsuk G, Ptasińska AA, Olszewski K, Domaciuk M, Krutmuang P, Paleolog J, 2017. A new method for quick and easy hemolymph collection from Apidae adults. *PLoS ONE*, 12(1): e0170487.
- Brodschneider R, Crailsheim K, 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3): 278–294.
- Bryś MS, Olszewski K, Strachecka A, 2025. The relationship between pollen monodiets and the activities of proteolytic systems in the fat body and hemolymph of honeybee workers. *PLoS ONE*, 20(6): e0326175.
- Burgess EP, Malone LA, Christeller JT, 1996. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 42(9): 823–828.
- Chan QW, Foster LJ, 2008. Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology*, 9(10): R156.
- Chan QW, Howes CG, Foster LJ, 2006. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(12): 2252–2262.
- Chan QW, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ, 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics*, 10(1): 387.
- Chang HC, Ding GL, Jia GQ, Feng M, Huang JX, 2022. Hemolymph metabolism analysis of honey bee (*Apis mellifera* L.) response to different bee pollens. *Insects*, 14(1): 37.
- Chen CJ, Wu Y, Li JW, Wang X, Zeng ZH, Xu J, Liu YL, Feng JT, Chen H, He YH, 2023. TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 16(11): 1733–1742.
- Cook SM, Awmack CS, Murray DA, Williams IH, 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology*, 28(5): 622–627.
- Corby-Harris V, Bennett MM, Deeter ME, Snyder L, Meador C, Welchert AC, Hoffman A, Obernesser BT, Carroll MJ, 2021. Fatty acid homeostasis in honey bees (*Apis mellifera*) fed commercial diet supplements. *Apidologie*, 52(6): 1195–1209.
- Crailsheim K, 1990. The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*, 21(5): 417–429.
- Crailsheim K, Schneider L, Hrassnigg N, Bühlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, Schöffmann B, 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, 38(6): 409–419.
- de Groot AP, 1952. Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 8(5): 192–194.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C, 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8(8): e72016.
- Dodoglu A, Emsen B, 2007. Effect of supplementary feeding on honey bee colony. *Journal of Applied Animal Research*, 32(2): 199–200.
- Dolezal AG, Toth AL, 2018. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*, 26: 114–119.
- Dong WB, Wu XB, Liu F, Wang Y, Zeng ZJ, Xu BH, 2013. Composition of amino acids, fatty acids and mineral for different regions of rape pollen, camellia pollen. *Apiculture of China*, 64(S4): 50–54. [董文滨, 吴小波, 刘锋, 王颖, 曾志将, 胥保

- 华, 2013. 不同产地油菜花粉、茶花粉中氨基酸、脂肪酸和矿物质成分. *中国蜂业*, 64(S4): 50–54.]
- Furse S, Koch H, Wright GA, Stevenson PC, 2023. Sterol and lipid metabolism in bees. *Metabolomics*, 19(9): 78.
- Gao LJ, Liu JL, Cheng S, Dai RG, Luo WH, 2016. Analysis of nutritional components and contents on four kinds of pollens. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(10): 175–177. [高丽娇, 刘佳霖, 程尚, 戴荣国, 罗文华, 2016. 四种花粉的营养成分及含量分析. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(10): 175–177.]
- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.
- Han B, Fang Y, Feng M, Hu H, Hao Y, Ma C, Huo XM, Meng LF, Zhang XF, Wu F, 2017. Brain membrane proteome and phosphoproteome reveal molecular basis associating with nursing and foraging behaviors of honeybee workers. *Journal of Proteome Research*, 16(10): 3646–3663.
- Han HF, Liu XH, Li JL, Ma C, 2026. Metabolomic and proteomic profiling of royal jelly from honeybee (*Apis mellifera*) colonies fed with camellia versus rapeseed bee pollen. *Journal of Agriculture and Food Research*, 26: 102669.
- Hasan MA, Ahmed S, Kim Y, 2019. Biosynthetic pathway of arachidonic acid in *Spodoptera exigua* in response to bacterial challenge. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 111: 103179.
- Hoover SE, Higo HA, Winston ML, 2006. Worker honey bee ovary development: Seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *Journal of Comparative Physiology B*, 176(1): 55–63.
- Hulbert AJ, Abbott SK, 2012. Nutritional ecology of essential fatty acids: An evolutionary perspective. *Australian Journal of Zoology*, 59(6): 369–379.
- Isani G, Bellei E, Rudelli C, Cabbri R, Ferlizza E, Andreani G, 2023. SDS-PAGE-based quantitative assay of hemolymph proteins in honeybees: Progress and prospects for field application. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12): 10216.
- Jarriault D, Mercer AR, 2012. Queen mandibular pheromone: Questions that remain to be resolved. *Apidologie*, 43(3): 292–307.
- Jorjani R, Ghaffari M, Pirsá S, Babaei S, 2023. Effect of alpha-linolenic acid on some productive and reproductive traits of the Iranian bee (*Apis mellifera meda*). *Journal of Apicultural Research*, 62(2): 287–293.
- Kulhanek K, Steinhauer N, Rennich K, Caron DM, Sagili RR, Pettis JS, Ellis JD, Wilson ME, Wilkes JT, Tarpay DR, 2017. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 56(4): 328–340.
- Li JK, Feng M, Begna D, Fang Y, Zheng AJ, 2010. Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteome Research*, 9(12): 6578–6594.
- Liang RN, Liang C, Zhang Y, Huang JX, Ding GL, 2025. Influence of different diets on growth and development of eastern honey bee (*Apis cerana*). *Insects*, 16(4): 383.
- Liu ZL, Qiao D, Li HX, Chen LZ, 2024. S-methyl-L-cysteine sulfoxide as a characteristic marker for rape royal jelly: Insights from untargeted and targeted metabolomic analysis. *Food Chemistry*, 437: 137880.
- Ma B, Zhang KZ, Hendrie C, Liang CZ, Li M, Doherty-Kirby A, Lajoie G, 2003. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(20): 2337–2342.
- Manning R, 2001. Fatty acids in pollen: A review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2): 60–75.
- Minahan D, Goren M, Shafir S, 2024. Unbalanced dietary omega-6 : 3 ratio affects onset of nursing and nurse-larvae interactions by honey bees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour*, 213: 235–246.
- Moerman R, Vanderplanck M, Roger N, Declèves S, Wathélet B, Rasmont P, Fournier D, Michez D, 2016. Growth rate of bumblebee larvae is related to pollen amino acids. *Journal of Economic Entomology*, 109(1): 25–30.
- Mogren CL, Danka RG, Healy KB, 2019. Larval pollen stress increases adult susceptibility to clothianidin in honey bees. *Insects*, 10(1): 21.
- Moritz B, Crailsheim K, 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 33(12): 923–931.
- Nall A, Sehgal A, 2014. Monoamines and sleep in *Drosophila*. *Behavioral Neuroscience*, 128(3): 264–272.
- O'Rourke MK, Buchmann SL, 1991. Standardized analytical techniques for bee-collected pollen. *Environmental Entomology*, 20(2): 507–513.
- Paray BA, Kumari I, Hajam YA, Sharma B, Kumar R, Albeshr MF, Farah MA, Khan JM, 2021. Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1): 1167–1176.
- Peng ZW, Hung YT, Wu MC, 2024. Mechanistic exploration of royal jelly production in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, 14: 30277.
- Pernal SF, Currie RW, 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old

- single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31(3): 387–409.
- Perry CJ, Barron AB, 2013. Neural mechanisms of reward in insects. *Annual Review of Entomology*, 58: 543–562.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6): 345–353.
- Qi DD, 2021. Metabolomics analysis reveals the basis for metabolic adaptation to high royal jelly production. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [祁丹丹, 2021. 代谢组分析揭示了蜂王浆高产的代谢适应基础. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Schwarz JM, Knauer AC, Alaux C, Barascou L, Barraud A, Dievert V, Ghazoul J, Michez D, Albrecht M, 2024. Diverse pollen nutrition can improve the development of solitary bees but does not mitigate negative pesticide impacts. *Science of the Total Environment*, 912: 169494.
- Scofield HN, Mattila HR, 2015. Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. *PLoS ONE*, 10(4): e0121731.
- Vaezi H, Rezayazdi K, Nehzati GA, Ghorbani V, 2023. Effect of feeding different levels of the isoleucine amino acid on hemolymph protein concentration and growth of hypopharyngeal glands in worker bees (*Apis mellifera*). *Animal Production Research*, 11(4): 91–102.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW, 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2): 112–124.
- Waddell S, 2010. Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends in Neurosciences*, 33(10): 457–464.
- Wicker-Thomas C, Hamann M, 2008. Interaction of dopamine, female pheromones, locomotion and sex behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 54(10/11): 1423–1431.
- Williams GR, Alaux C, Costa C, Csaki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, 2013. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1–36.
- Wright GA, Nicolson SW, Shafir S, 2018. Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual Review of Entomology*, 63: 327–344.
- Xie C, Mao XZ, Huang JJ, Ding Y, Wu JM, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei LP, 2011. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Research*, 39(Suppl. 2): W316–W322.
- Xun LJ, Huang XQ, Li QY, Yang S, Wang YH, 2020. Effects of different bee pollens on expression of major royal jelly protein genes and yield, quality and composition of royal jelly of *Apis mellifera*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 32(2): 856–869. [荀利杰, 黄旭晴, 李庆宇, 杨爽, 王艳红, 2020. 不同蜂花粉对意大利蜜蜂蜂王浆主蛋白基因表达及蜂王浆产量、质量和成分的影响. *动物营养学报*, 32(2): 856–869.]
- Yang YF, Sun X, Ni H, Du X, Chen F, Jiang ZD, Li QB, 2019. Identification and characterization of the tyrosinase inhibitory activity of caffeine from camellia pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(46): 12741–12751.
- Zeng QX, Zong DQ, Li XB, Zhang ZH, Qiu J, 2025. Lipidomics reveals dietary alpha linolenic acid facilitates metabolism related to division of labor in honeybee workers. *Agriculture*, 15(3): 272.
- Zheng BL, Wu ZF, Xu BH, 2014. The effects of dietary protein levels on the population growth, performance, and physiology of honey bee workers during early spring. *Journal of Insect Science*, 14(1): 191.