



李震,王宜平,秦凯鑫,等.油茶花蜜中氨基酸成分及其对西方蜜蜂工蜂生存的影响[J].江西农业大学学报,2025,47(6):1658–1667.

LI Z, WANG Y P, QIN K X, et al. Effects of amino acids in *Camellia oleifera* nectar on the survival of the *Apis mellifera* workers[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2025, 47(6): 1658–1667.

油茶花蜜中氨基酸成分及其对西方蜜蜂工蜂生存的影响

李震¹, 王宜平¹, 秦凯鑫², 黎力之¹, 刘琴¹, 郭冬生^{1*}

(1. 宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 2. 江西生物科技职业学院, 江西 南昌 330200)

摘要:【目的】植物花蜜中的氨基酸含量会影响蜜蜂的采集偏好,前期研究发现富含花蜜的油茶花对采集蜂缺乏吸引力,导致蜜蜂为油茶授粉增产效率偏低。旨在比较不同油茶品种花蜜中氨基酸的种类与含量,以探明油茶花蜜中的影响西方蜜蜂的氨基酸成分以及其对西方蜜蜂的影响,为提高蜜蜂对油茶的授粉效率提供新思路。【方法】以赣447、长林18和赣68油茶花蜜为研究对象,利用液相色谱质谱联用技术(LC/MS)检测不同品种的油茶花蜜中氨基酸种类和绝对含量;同时评估油茶花蜜中含量最高的氨基酸(L-谷氨酰胺)对西方蜜蜂寿命、免疫和解毒相关基因表达量的影响。【结果】(1)赣447、长林18和赣68油茶花蜜中均含有21种氨基酸中的19种氨基酸,但组分和浓度有差异,其中,赣447、长林18油茶花蜜均未检测到甘氨酸和半胱氨酸,而赣68油茶花蜜中未检测到天冬酰胺和半胱氨酸。(2)3种油茶花蜜中L-谷氨酰胺的含量最高,其中赣447油茶花蜜中高达(1 612.63±17.85)mg/kg,3种油茶花蜜中的脯氨酸(Pro)和γ-氨基丁酸(GABA)含量均较低(<100 mg/kg)。(3)与赣447花蜜中剂量相同的L-谷氨酰胺(1 610 mg/kg)添加到日粮中对西方蜜蜂工蜂的寿命无显著影响($P>0.05$),也不会诱导工蜂的防御素1基因(*Defensin1*)和抗菌肽基因(*Abaecin*)2种免疫基因以及细胞色素P450基因(*CYP450*)、谷胱甘肽-S-转移酶3基因(*GSTS3*)和过氧化氢酶基因(*Catalase*)3种解毒基因上调表达。【结论】油茶花蜜中高含量的L-谷氨酰胺不会威胁西方蜜蜂工蜂的生存,而较低含量的脯氨酸和γ-氨基丁酸(GABA)可能是导致油茶花对西方蜜蜂吸引力较弱的原因。

关键词:油茶;西方蜜蜂;花蜜;氨基酸;授粉

中图分类号:S897^{+.1} 文献标志码:A

文章编号:1000-2286(2025)06-1658-10

CSTR:32399.14.aauj.2025143

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effects of amino acids in *Camellia oleifera* nectar on survival of *Apis mellifera* workers

LI Zhen¹, WANG Yiping¹, QIN Kaixin², LI Lizhi¹, LIU Qin¹, GUO Dongsheng^{1*}

收稿日期:2024-12-23 修回日期:2025-01-14

基金项目:国家自然科学基金地区项目(32160804)、江西省自然科学基金项目(20242BAB20310)和江西省现代农业产业技术体系(JXARS-13)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China Regional Program (32160804), Jiangxi Provincial Natural Science Foundation Project (20242BAB20310) and the Earmarked Fund for JXARS-honeybee (JXARS-13)

作者简介:李震,讲师,博士,orcid.org/0000-0002-1418-9428, zhenli1995@sina.com; *通信作者:郭冬生,教授,博士,主要从事蜜蜂生物学研究,orcid.org/0009-0000-2845-0060, gds960016@126.com。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

(1.College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China; 2.Jiangxi Biotech Vocational College, Nanchang 330200, China)

Abstract: [Objective] The amino acid content of plant nectar affects the collecting preference of bees. Previous research found that nectar-rich *Camellia oleifera* flowers were unattractive to foragers, leading to low efficiency of bees pollinating *C. oleifera* to increase yields. This experiment aims to compare the types and contents of amino acids in the nectar of three different species to investigate the effects of the amino acid composition of *C. oleifera* nectar on *Apis mellifera*, thus providing new ideas for improving the pollination efficiency of honey bees on *C. oleifera*. [Method] Three types of *C. oleifera* nectar were used for the study, and the amino acid types and absolute contents of different varieties of *Camellia oleifera* nectar were detected by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS). The effects of the highest levels of amino acids (L-Glutamine) in *C. oleifera* nectar on the expression of genes related to longevity, immunity and detoxification in western honey bees were also assessed. [Result] (1) Gan 447, Changlin 18 and Gan 68 *C. oleifera* nectar all contained 19 of the 21 amino acids, but there were differences in the fractions and concentrations, among which, glycine and cysteine were not detected in Gan 447 and Changlin 18 *C. oleifera* nectar, while asparagine and cysteine were not detected in Gan 68 *C. oleifera* nectar. (2) The content of L-glutamine was the highest in the three oil tea nectars, including Gan 447 oil tea nectar, which was as high as $(1\ 612.63 \pm 17.85)$ mg/kg, and the content of proline (Pro) and γ -aminobutyric acid (GABA) in the three *C. oleifera* nectars were low (<100 mg/kg). (3) The addition of L-glutamine at the same dose as that in the nectar of Gan 447 ($1\ 610$ mg/kg) to the diet had no significant effect on the lifespan of Western honeybee (*Apis mellifera*) workers ($P>0.05$), Nor does it induce the upregulated expression of the worker bees' detoxification genes [defensin 1 (Defensin1) and abaecin (Abaecin)] as well as immune genes [cytochrome P450 (Cytochrome P450, CYP450), glutathione S-transferase 3 (GSTS3), and catalase (Catalase)]. [Conclusion] High levels of L-glutamine in *C. oleifera* nectar do not threaten the survival of *A. mellifera* workers. Lower levels of proline and GABA in *C. oleifera* nectar may contribute to the weaker attractiveness of *C. oleifera* flowers to *A. mellifera*.

Keywords: *Camellia oleifera*; nectar; LC-MS; amino acids; pollination

【研究意义】花蜜是植物蜜腺外体分泌的甜味物质,其成分主要由糖类、氨基酸、蛋白质、维生素、黄酮、糖苷、生物碱和水分组成^[1-5]。植物花蜜中化学成分的主要作用是吸引传粉昆虫为自身授粉,达到繁衍后代的目的^[6]。当前,商业种植油茶时普遍采用的是单一作物种植方式,且在种植时对植被破坏较为严重,这导致油茶授粉昆虫的种类和数目均严重缩减^[7-8]。而油茶是需要异花授粉的木本油料作物^[9],授粉不充分或授粉效率低下是限制油茶产业发展的重要因素^[10-11]。造成蜜蜂中毒的主要化学成分是油茶花蜜、花粉中含有的甘露三糖、棉籽糖和水苏糖这3种寡糖成分^[12]。此外,本团队前期研究^[12]发现刚进场的西方蜜蜂和东方蜜蜂为油茶授粉时,油茶花对2种蜜蜂的吸引力均较弱。深入研究油茶对蜜蜂吸引力较弱的机理,可为后续科学指导蜜蜂高效为油茶授粉提供依据。【前人研究进展】氨基酸在授粉昆虫体内发挥重要调控作用。蜜蜂不能合成亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、组氨酸、异亮氨酸和色氨酸等外源性氨基酸,须通过采集蜜源植物的花蜜、花粉来供给^[13]。其中,蜜蜂工蜂正常发育所需的较多的氨基酸包括:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸和苏氨酸^[14-15]。蜜蜂体内的氨基酸除了构成蛋白质和多肽外,还以神经激素和神经肽的前体物质直接或间接地作为神经递质发挥作用^[16]。当幼虫缺乏足够的氨基酸时,其生长发育会受到严重阻碍,可能出现发育迟缓、体型变小等情况^[17]。蜜蜂大幼虫在化蛹过程中,需要大量的蛋白质来构建身体组织,如肌肉、器官等^[18]。蜜蜂封盖前5 d食用花粉中的氨基酸会增加大幼虫脑组织中游离氨基酸的浓度,而包括脯氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、牛磺酸和 γ -氨基丁酸在内的游离氨基酸均会促进羽化出房工蜂神经系统的发育^[16]。对于成年蜜蜂来说,氨基酸对于维持其正常的飞行能力至关重要,飞行肌的收缩和舒张需要能量和蛋白质的支持,氨基酸是合成飞行肌蛋白的原料^[19]。如果缺乏必要的氨基酸,飞行肌的功能会受到影响,会导致蜜蜂的飞行能力下降,包括飞行速

度、耐力等方面^[20]。因此,为了繁育后代和蜂群发展,采集蜂会优先采集富含自身生长发育所需外源氨基酸的花蜜和花粉^[21]。

【本研究切入点】不同的显花植物花蜜中氨基酸组成成分和含量对采集蜂的采集偏好有着显著影响,这对显花植物繁育后代成功与否起着关键作用。而笔者前期研究发现富含花蜜的油茶花朵对西方蜜蜂采集蜂缺乏吸引力,造成蜜蜂为油茶授粉的积极性下降,授粉效率低下,进而导致油茶座果率低。然而,目前油茶花蜜中的氨基酸种类和绝对含量尚不清楚,且油茶花蜜中高含量的氨基酸是否对蜜蜂产生毒害也未被探明。【拟解决的关键问题】本研究利用(liquid chromatography–tandem massspectrometry, LC/MS)技术研究赣 447(G447)、赣 68(G68)和长林 18(CL18)3 个品种油茶花蜜中氨基酸含量差异,并评估油茶花蜜中高含量的氨基酸对西方蜜蜂生存,以及免疫、解毒相关基因表达的影响,进一步探究油茶花对蜜蜂吸引力较弱的原因,以期为提高油茶蜜蜂授粉效率提供理论支撑,促进油茶产业提质增效。

1 材料与方法

1.1 供试油茶花蜜

本试验测试的 3 个品种油茶花蜜取自江西省修水县(114°56′N,29°04′E)的赣 447(以下简称 G447)和赣 68(以下简称 G68)油茶花蜜,以及来自江西省宜春市袁州区(114°20′N,27°73′E)油茶园的长林 18(以下简称 CL18)油茶花蜜。利用 5 mL 无菌注射器吸取花蜜,吸取过程中要轻柔操作且针头禁止靠近柱头以避免花粉污染花蜜。

1.2 LC/MS 检测油茶花蜜中游离氨基酸含量方法

1.2.1 标准品的配制

称取适量 21 种氨基酸标准品(美国 Sigma 公司),使用甲醇或水配制成单标母液。量取各母液适量制成混合标准品,用水逐一稀释至合适质量浓度,制成工作标准溶液。氨基酸的信息及各质量浓度点见表 1。母液及工作标准溶液均保存于 0 ℃。

表 1 标准样品梯度浓度信息
Tab.1 Standard samples gradient concentration information ng/mL

化合物 Compound	序号 No.	标准样品编号 Standard sample number									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
甘氨酸 Glycine	1	–	20 000	10 000	8 000	4 000	2 000	1 600	–	–	–
丙氨酸 L-Alanine	2	–	5 000	2 500	2 000	1 000	500	400	200	100	50
γ-氨基丁酸 4-Aminobutyric acid	3	1 000	500	250	200	100	50	40	20	10	5
丝氨酸 L-Serine	4	–	1 000	500	400	200	100	80	40	20	10
脯氨酸 L-Proline	5	1 000	500	250	200	100	50	40	20	10	5
缬氨酸 L-Valine	6	–	–	250	200	100	50	40	20	10	5
苏氨酸 L-Threonine	7	2 000	1 000	500	400	200	100	80	40	20	–
异亮氨酸 L-Isoleucine	8	2 000	1 000	500	400	200	100	80	40	20	10
亮氨酸 L-Leucine	9	2 000	1 000	500	400	200	100	80	40	20	10
天冬酰胺 L-Asparagine	10	20 000	10 000	5 000	4 000	2 000	1 000	800	400	–	–
天冬氨酸 L-Aspartic acid	11	–	2 000	1 000	800	400	200	160	80	40	20
半胱氨酸 L-Cysteine	12	1 000	500	250	200	100	50	40	20	–	–
L-谷氨酰胺 L-Glutamine	13	1 000	500	250	200	100	50	40	20	–	–
赖氨酸 L-Lysine	14	1 000	500	250	200	100	50	40	20	10	5
谷氨酸 L-Glutamic acid	15	2 000	1 000	500	400	200	100	80	40	20	10
甲硫氨酸 L-Methionine	16	2 500	1 250	625	500	250	125	100	50	25	–
组氨酸 L-Histidine	17	2 000	1 000	500	400	200	100	80	40	20	10
苯丙氨酸 L-Phenylalanine	18	1 000	500	250	200	100	50	40	20	10	5
精氨酸 L-Arginine	19	2 000	1 000	500	400	200	100	80	40	20	10
酪氨酸 L-Tyrosine	20	2 500	1 250	625	500	250	125	100	50	25	12.5
色氨酸 L-Tryptophan	21	500	250	125	100	50	25	20	10	5	2.5

1.2.2 样品前处理

分别用移液器吸取 100 μL 3 种油茶花蜜样本(每种样本 3 个重复)于 2 mL EP 管中,准确加入 400 μL 10% $V(\text{甲酸甲醇溶液}):V(\text{H}_2\text{O})=1:1$ 溶液,12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,取原始上清 100 μL ,加入 400 μL 10% $V(\text{甲酸甲醇溶液}):V(\text{H}_2\text{O})=1:1$ 溶液(稀释 5 倍),涡旋振荡 30 s,取稀释后的样本 100 μL ,加入浓度为 100 mg/kg 的双同位素内标 100 μL 涡旋振荡 30 s,上清液过 0.22 μm 膜过滤,过滤液加入到检测瓶中。

1.2.3 LC/MS 检测

仪器:Waters UPLC 液相色谱仪(美国 Waters 公司)串联 AB 三重四极杆质谱仪(ThermoFisher 科技有限公司)。色谱条件:色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7 μm ,美国 Waters 公司),进样量 5 μL ,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,流动相 A-10% 甲醇水(含 0.1% 甲酸),B-50% 甲醇水(含 0.1% 甲酸)。梯度洗脱条件为 0~6.5 min,10%~30% B;6.5~7 min,30%~100% B;7~8 min,100% B;8~8.5 min,100%~10% B;8.5~12.5 min,10% B。流速:0~8.5 min,0.3 mL/min;8.5~12.5 min,0.3~0.4 mL/min。

质谱条件:电喷雾电离(ESI)源,正离子电离模式。离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$,离子源电压 5 500 V,碰撞气 6 psi,气帘气 30 psi,雾化气和辅助气均为 50 psi。采用多重反应监测(MRM)进行扫描。用于定量分析的离子对见表 2。

表 2 用于分析的定量离子对
Tab.2 Quantitative ion pairs for analysis

化合物 Compound	编号 No.	母离子/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$) Precursor ion	子离子/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$) Product ion	化合物 Compound	编号 No.	母离子/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$) Precursor ion	子离子/($\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$) Product ion
甘氨酸 Glycine	1	76.026	30.000	半胱氨酸 L-Cysteine	12	121.158	90.000
丙氨酸 L-Alanine	2	90.097	44.100	L-谷氨酰胺 L-Glutamine	13	147.089	84.100
γ -氨基丁酸 4-Aminobutyric acid	3	104.051	87.000	赖氨酸 L-Lysine	14	147.150	84.000
丝氨酸 L-Serine	4	106.054	60.100	谷氨酸 L-Glutamic acid	15	148.086	84.200
脯氨酸 L-Proline	5	116.092	70.000	甲硫氨酸 L-Methionine	16	150.101	132.900
缬氨酸 L-Valine	6	118.148	72.000	组氨酸 L-Histidine	17	156.076	110.000
苏氨酸 L-Threonine	7	120.098	102.000	苯丙氨酸 L-Phenylalanine	18	166.102	120.100
异亮氨酸 L-Isoleucine	8	132.052	85.900	精氨酸 L-Arginine	19	175.103	70.000
亮氨酸 L-Leucine	9	132.077	85.900	酪氨酸 L-Tyrosine	20	184.078	166.200
天冬酰胺 L-Asparagine	10	133.055	116.000	色氨酸 L-Tryptophan	21	206.054	178.200
天冬氨酸 L-Aspartic acid	11	134.052	88.000				

1.3 西方蜜蜂工蜂孵化及人工笼养

选取 3 群健康西方蜜蜂(*Apis mellifera*),抽样检测发现蜂螨寄生率 $\leq 1\%$ ^[12]。同时,试验群中带有出房之际的工蜂巢脾,判定依据是使用无菌尖头镊子划开封盖子脾时发现巢房内工蜂的复眼已经有黑色素沉着。试验分为 2 组,每组 180 只工蜂,分 3 个杯笼饲喂,每杯 60 只工蜂(来自 3 群蜜蜂,每群 20 只工蜂)。对照组西方蜜蜂工蜂饲喂 50% 蔗糖(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)溶液,处理组工蜂饲喂含有 1 610 mg/kg 的 L-谷氨酰胺(0.161 g/100 g 糖水,浓度与 G447 中 L-谷氨酰胺含量相同)的 50% 蔗糖溶液。这些装有工蜂的杯笼置于培养箱中(温度:34.5 ℃,相对湿度:75%)培养。试验开始后于每日 9 时记录工蜂生存情况并及时清理死亡工蜂,直到所有的蜜蜂死亡。最后绘制各组的 Kaplan–Meier 生存曲线。

1.4 qPCR 测定工蜂免疫和解毒相关基因的相对表达量

1.4.1 工蜂样品采集

在 1.3 的试验中,2 个试验组各多饲喂 1 杯工蜂用于采样,每杯 45 只工蜂(来自 3 群蜜蜂,每群 15 只工蜂),分别于 0, 10, 25 d 取 6 头蜜蜂用于检测免疫和解毒相关基因的相对表达量。

1.4.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

以单只蜜蜂头部作为一个样品供提取总 RNA 用,总 RNA 的提取和 cDNA 的合成参考杨何妍^[22]的方法。根据 TransZolTM Up Plus RNA 提取试剂盒(北京全式金公司)的说明提取总 RNA。用 cDNA 合成试剂盒制备的 cDNA,最终体积为 20 μL。

1.4.3 引物设计及 qPCR 检测

根据文献[23]报道的引物信息,选取防御素 1 基因(*Defensin1*)、抗菌肽基因(*Abaecin*)、细胞色素 P450 基因(*CytochromeP450*, *CYP450*)、谷胱甘肽-S-转移酶 3 基因(*Glutathione S-transferase 3*, *GSTS3*)和过氧化氢酶基因(*Catalase*)分别作为西方蜜蜂免疫和解毒相关基因并设计引物(表 3),其中以 *GAPDH* 基因作为内参,每个样品进行 4 次技术重复。运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算免疫和解毒相关基因的相对表达量^[24]。

表 3 引物序列信息
Tab.3 Primer sequence information

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer(5'-3')	下游引物 Reverse primer(5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature
防御素 1 <i>Defensin1</i>	GTTGAGGATGAATTCGAGCC	TTAACCGAAACGTTTGTCCC	57.5
抗菌肽 <i>Abaecin</i>	TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	58.0
细胞色素 P450 <i>CytochromeP450</i> (<i>CYP450</i>)	CAAAATGGTGTCTCCTTACCG	ATGGCAACCCATCACTGC	58.0
谷胱甘肽-S-转移酶 3 <i>Glutathione S-transferase 3</i> (<i>GSTS3</i>)	TGCATATGCTGGCATTGATT	TCCTCGCCAAGTATCTTGCT	57.0
过氧化氢酶 <i>Catalase</i>	GTCTTGGCCCAAACAATCTG	CATTCTCTAGGCCCACCAAA	58.0
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>glyceraldehyde-3-phosphate</i> <i>dehydrogenase</i> (<i>GAPDH</i>)	GCTGGTTTCATCGATGGTTT	ACGATTTGACCACCGTAAC	58.0

1.5 数据统计方法

使用 SPSS 25.0 分析油茶花蜜成分、免疫和解毒相关基因表达量的试验数据,数据用平均值±标准误(mean±SE)表示。试验数据采用“one-way ANOVA 检验”或“t 检验”进行统计分析。组间差异被认为是显著的概率水平为 $P<0.05$ 。用 Kaplan–Meier 曲线来评估各工蜂的存活率,并进行比较,当对数秩检验 $P<0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 3种油茶花蜜中游离氨基酸含量

2.1.1 氨基酸标准曲线结果

21种氨基酸成分的相关系数 R^2 为0.990 1~0.997 2,线性良好,结果见表4。

表4 氨基酸标准曲线信息
Tab.4 Amino acids standard curve information

化合物 Compound	编号 No.	保留时间/min Retention time	线性方程 Linear equation	拟合系数(R^2) Fitting coefficient
L-谷氨酰胺 L-Glutamine	1	4.49	$y=0.002\ 354x+0.006\ 795$	0.990 1
精氨酸 L-Arginine	2	4.06	$y=0.004\ 38x+0.019\ 79$	0.995 6
赖氨酸 L-Lysine	3	4.02	$y=0.003\ 512x+0.007\ 147$	0.993 3
谷氨酸 L-Glutamic acid	4	4.49	$y=0.002\ 354x+0.006\ 795$	0.990 1
酪氨酸 L-Tyrosine	5	6.17	$y=0.002\ 498x+0.011\ 24$	0.997 2
色氨酸 L-Tryptophan	6	10.90	$y=0.009\ 861x+0.032\ 95$	0.991 5
组氨酸 L-Histidine	7	4.06	$y=0.006\ 849x+0.009\ 201$	0.993 9
苯丙氨酸 L-Phenylalanine	8	9.48	$y=0.011\ 27x+0.023\ 98$	0.997 0
丝氨酸 L-Serine	9	4.41	$y=0.002\ 714x+0.022\ 26$	0.992 9
苏氨酸 L-Threonine	10	4.49	$y=0.001\ 251x+0.011\ 97$	0.993 1
脯氨酸 L-Proline	11	4.67	$y=0.009\ 493x+0.022\ 53$	0.994 9
天冬氨酸 L-Aspartic acid	12	4.48	$y=0.002\ 508x+0.011\ 61$	0.995 6
缬氨酸 L-Valine	13	5.41	$y=0.011\ 59x+0.026\ 59$	0.990 2
异亮氨酸 L-Isoleucine	14	7.13	$y=0.001\ 363x+0.004\ 859$	0.995 9
甲硫氨酸 L-Methionine	15	5.76	$y=0.003\ 607x-0.051\ 1$	0.993 0
丙氨酸 L-Alanine	16	4.46	$y=0.002\ 009x+0.007\ 833$	0.994 2
γ -氨基丁酸 4-Aminobutyric acid	17	4.29	$y=0.003\ 683x+0.006\ 042$	0.996 7
亮氨酸 L-Leucine	18	7.57	$y=0.009\ 437x+0.038\ 77$	0.995 8
天冬酰胺 L-Asparagine	19	4.48	$y=0.002\ 508x+0.011\ 61$	0.995 6
甘氨酸 Glycine	20	4.38	$y=2.343\times10^{-5}x-0.003\ 627$	0.996 9
半胱氨酸 L-Cysteine	21	4.68	$y=3\times10^{-4}x+9.237\times10^{-5}$	0.990 5

2.1.2 3种油茶花蜜中游离氨基酸含量测定结果

从表5可以看出,同种氨基酸在不同品种来源的花蜜中含量差异较大。G447和CL18均含有20种常见氨基酸的18种氨基酸,均未检测到甘氨酸和半胱氨酸;G68含有20种常见氨基酸的18种氨基酸,未检测到天冬酰胺和半胱氨酸。3种油茶花蜜中,L-谷氨酰胺的含量最高,其中G447中高达(1 612.63±17.85)mg/kg。G447和G68中L-谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸和谷氨酸的含量较高(>100 mg/kg),CL18中含量较高的氨基酸仅有L-谷氨酰胺和谷氨酸(>100 mg/kg)。在3种油茶花蜜中均检测到脯氨酸和 γ -氨基丁酸,且CL18中脯氨酸和 γ -氨基丁酸含量显著高于G447和G68($P<0.05$),含量分别为(99.14±0.33)mg/kg和(61.90±0.61)mg/kg。

2.1.3 L-谷氨酰胺对西方蜜蜂工蜂寿命的影响

L-谷氨酰胺对西方蜜蜂工蜂平均寿命的影响见图1,0.16%剂量组工蜂的平均寿命与对照组相比无显著差异(Chi-square=3.392,d.f.=1, $P>0.05$)。

表 5 3 种油茶花蜜中游离氨基酸含量差异($n=3$)

Tab.5 Differences in free amino acids composition in 3 kinds of *Camellia oleifera* flower nectar mg/kg

化合物 Compound	编号 No.	G447	G68	CL18
L-谷氨酰胺 L-Glutamine	1#	1 612.63±17.85 ^a	564.38±6.90 ^c	954.01±6.66 ^b
精氨酸 L-Arginine	2#	576.65±2.01 ^a	151.00±1.77 ^b	34.06±0.21 ^c
赖氨酸 L-Lysine	3*	269.60±0.79 ^a	133.78±2.77 ^b	97.29±1.29 ^c
谷氨酸 L-Glutamic acid	4#	190.51±2.81 ^a	233.22±1.15 ^a	289.95±2.10 ^b
酪氨酸 L-Tyrosine	5#	86.36±1.17 ^a	26.87±0.13 ^b	10.66±0.03 ^c
色氨酸 L-Tryptophan	6*	67.53±1.24 ^a	27.12±0.45 ^b	27.45±0.25 ^b
组氨酸 L-Histidine	7#	61.64±0.14 ^a	24.68±0.10 ^b	24.92±0.22 ^b
苯丙氨酸 L-Phenylalanine	8*	47.56±0.34 ^a	21.09±0.24 ^b	11.76±0.09 ^c
丝氨酸 L-Serine	9#	38.10±0.25 ^a	22.63±0.50 ^b	17.84±0.43 ^c
苏氨酸 L-Threonine	10*	31.87±0.74 ^a	16.12±0.26 ^b	15.80±0.11 ^b
脯氨酸 L-Proline	11#	26.27±0.22 ^a	25.42±0.36 ^a	99.14±0.33 ^b
天冬氨酸 L-Aspartic acid	12#	23.37±0.10 ^a	14.62±0.12 ^a	17.19±0.26 ^a
缬氨酸 L-Valine	13*	21.53±0.26 ^a	11.08±0.06 ^b	9.92±0.15 ^c
异亮氨酸 L-Isoleucine	14*	16.67±0.17 ^a	1.41±0.03 ^b	8.22±0.07 ^c
甲硫氨酸 L-Methionine	15*	14.65±0.28 ^a	2.89±0.04 ^b	2.21±0.06 ^b
丙氨酸 L-Alanine	16#	12.79±0.19 ^{ab}	11.69±0.003 ^b	17.57±0.10 ^a
γ-氨基丁酸 4-Aminobutyric acid	17	9.14±0.04 ^a	7.04±0.13 ^a	61.90±0.61 ^b
亮氨酸 L-Leucine	18*	4.99±0.07 ^a	0.67±0.06 ^b	1.80±0.20 ^b
天冬酰胺 L-Asparagine	19#	3.78±1.62 ^a	ND	3.00±0.88 ^a
甘氨酸 Glycine	20#	ND	71.55±0.54	ND
半胱氨酸 L-Cysteine	21#	ND	ND	ND

*代表必需氨基酸,#代表非必需氨基酸。ND代表未检测到。同行相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$),同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

* indicates essential amino acids,# indicates non-essential amino acids.ND means not detected.The same lowercase letters in the same row indicate no significant difference($P>0.05$),the different lowercase letters in the same row indicate significant difference($P<0.05$).

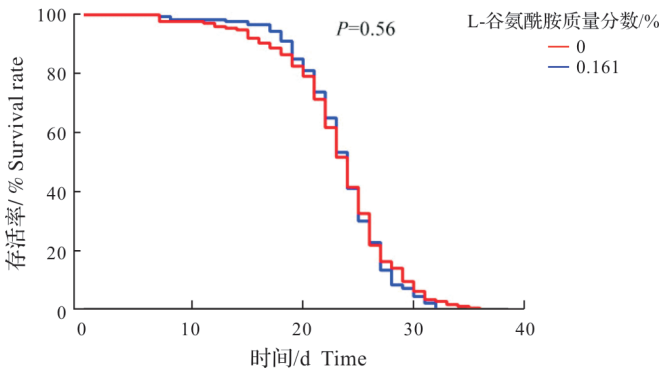
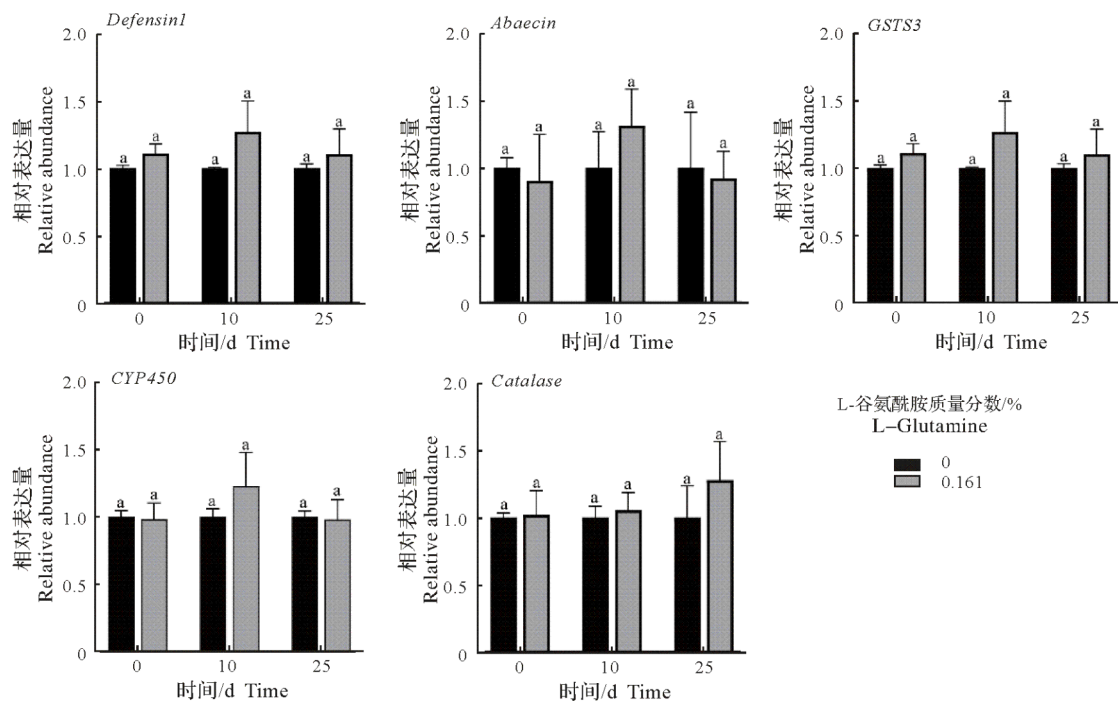


图 1 L-谷氨酰胺对西方蜜蜂工蜂平均寿命的影响

Fig.1 Effects of L-Glutamine on the average lifespan of *Apis mellifera* workers

2.1.4 L-谷氨酰胺对西方蜜蜂工蜂免疫和解毒相关基因表达量的影响

L-谷氨酰胺对西方蜜蜂工蜂免疫相关基因(*Defensin1*,*Abaecin*)及解毒相关基因(*GSTS3*,*CYP450*,*Catalase*)表达量的影响(图 2),0.16%L-谷氨酰胺剂量组工蜂在 10,20,25 d 的免疫及解毒相关基因的表达量与对照组相比差异均不显著($P>0.05$)。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

The different lowercase letters indicate significant difference($P<0.05$).

图2 L-谷氨酰胺对西方蜜蜂工蜂免疫相关基因(*Defensin1*, *Abaecin*)和解毒相关基因(*GSTS3*, *CYP450*, *Catalase*)相对表达量的影响

Fig.2 Effects of L-Glutamine on the relative expression levels of immune- genes(*Defensin1*, *Abaecin*) and detoxification-related genes(*GSTS3*, *CYP450*, *Catalase*) of *Apis mellifera* workers

3 讨论与结论

氨基酸是继糖类之后最丰富的花蜜溶质,合成蛋白质的20种常见氨基酸在花蜜中均有报道^[25]。花蜜中的某些必需氨基酸似乎对授粉昆虫具有一定的吸引力,例如添加脯氨酸和丙氨酸的糖水比纯糖水更受西方蜜蜂偏爱,且蜜蜂对脯氨酸的偏爱度高于 α -丙氨酸^[26]。这是因为脯氨酸有一个特点:它能够刺激一些昆虫物种的唇形盐受体细胞,导致这些授粉昆虫可能能够识别脯氨酸的味道^[27-28]。

觅食花蜜的昆虫在飞行的初始阶段优先利用脯氨酸^[29]。在长距离觅食过程中,有一种能量基质可以随时使用对蜜蜂来说是一种重要优势。脯氨酸是许多昆虫(包括蜜蜂)血淋巴中最丰富的氨基酸,许多类型的蜜源植物花蜜中都含有大量的脯氨酸,如柑橘、椴树、苜蓿、木槿、棉花和香薷等^[30]。脯氨酸在烟草植物中可以累积到总氨基酸水平的45%~60%^[31]。采集蜂对富含脯氨酸的花蜜有强烈偏好,对含有丝氨酸的花蜜感到厌恶^[26]。此外,脯氨酸与天冬氨酸均属于甜味氨基酸,能够为花蜜增添层次感和口感^[32]。但3种油茶花蜜中检测到的脯氨酸和天冬氨酸的含量较低。本研究发现G447和CL18中氨基酸谱的种类一致,均未检测到甘氨酸和半胱氨酸;G68中也含有21种常见氨基酸谱的18种,缺乏的是天冬酰胺和半胱氨酸。

值得注意的是,虽然脯氨酸在3种油茶花蜜中含量较低,但3种油茶花蜜中L-谷氨酰胺的质量分数占比较高(G447中达0.16%)。生存试验表明:油茶花蜜中高含量的L-谷氨酰胺不会缩减西方蜜蜂工蜂的寿命。*Defensin*, *Hymenoptaecin* 和 *Abaecin* 是蜜蜂体内主要的免疫基因,参与宿主免疫功能的调节^[33-35]。谷胱甘肽-S-转移酶基因(*GSTS*)、细胞色素P450基因(*CYP450*)和过氧化氢酶基因(*Catalase*)都是参与蜜蜂机体解毒功能的基因^[35]。本试验通过荧光定量检测发现0.16% L-谷氨酰胺的持续添加不会诱导10 d和25 d蜜蜂机体内免疫和解毒相关基因的表达。Paoli等^[36]研究发现富含必需氨基酸的花蜜会减少采集蜂寿命,这表明花蜜中的必需氨基酸与非必需氨基酸比例也可能影响授粉昆虫的生存。3种油茶花蜜中的必需氨基酸所占比例均较低,这也暗示着油茶花蜜中的必需氨基酸成分对蜜蜂的生存能力威胁较小。除了构成蛋白质的20种常见氨基酸,植物中还含有大约250种非蛋白质氨基酸^[37]。花蜜中一些包括 γ -

氨基丁酸(GABA)、 β -丙氨酸、鸟氨酸、牛磺酸和瓜氨酸等在内的非蛋白质氨基酸,其中又数GABA和 β -丙氨酸这2种非蛋白质氨基酸最为常见^[38-40]。有趣的是,蜜蜂和熊蜂一般会访问花蜜中GABA浓度高的植物物种^[39]。本次检测的3种油茶花蜜中脯氨酸和GABA的含量较低,这也可能是油茶这一大宗蜜源(单花最高泌蜜量可达1 mL)对蜜蜂吸引力较弱的潜在因素之一。

本研究成功测定了3种油茶花蜜中氨基酸组成成分及绝对含量,且探明油茶花蜜中含量较高的L-谷氨酰胺对西方蜜蜂的工蜂并无毒害作用。未来本团队将对比油茶花蜜中的氨基酸成分和常见蜜源植物(如油菜)花蜜的氨基酸成分、筛选差异氨基酸组分,以及拟开展工蜂触角电位试验确定油茶花对蜜蜂缺乏吸引力的关键因素。

致谢:蜜蜂生物学与饲养江西省重点实验室开放基金(2024SSY151)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] KROEMER T, KESSLER M, LOHAUS G, et al. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae[J]. Plant biology, 2008, 10(4): 502-511.
- [2] NICOLSON S W. Pollination by passerine birds: why are the nectars so dilute?[J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2002, 131(4): 645-652.
- [3] HEIL M. Nectar: generation, regulation and ecological functions[J]. Trends in plant science, 2011, 16(4): 191-200.
- [4] DE LA BARRERA E, NOBEL P S. Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin[J]. Trends in plant science, 2004, 9(2): 65-69.
- [5] CHEN X L, PENG X R, GONG X Y, et al. Flavonoid glycosides from the nectar of *Camellia reticulata* Lindl[J]. Natural product research, 2022, 36(7): 1827-1833.
- [6] RERING C C, BECK J J, HALL G W, et al. Nectar-inhabiting microorganisms influence nectar volatile composition and attractiveness to a generalist pollinator[J]. New phytologist, 2018, 220(3): 750-759.
- [7] 黄彤, 任燕, 夏榆森, 等. 不同栽培模式对油茶幼林土壤养分和茶油品质的影响[J]. 农业与技术, 2020, 40(7): 61-66.
HUANG T, REN Y, XIA Y S, et al. Effects of different cultivation patterns on soil nutrients and *Camellia oleifera* quality in young *Camellia oleifera* forests[J]. Agriculture and technology, 2020, 40(7): 61-66.
- [8] 李震, 黄强, 彭成涛, 等. 油茶授粉蜜蜂的培育与应用[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(4): 944-951.
LI Z, HUANG Q, PENG C T, et al. Cultivation and application of *Camellia oleifera* pollination bees[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(4): 944-951.
- [9] 王渊. 湖南油茶主要栽培品种遗传多样性及其配置技术的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011.
WANG Y. The researches on genetic diversity and varieties configuration of *Camellia oleifera* Abel Hu[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2011.
- [10] 贺兴江, 韦小平, 周文才, 等. 基于GC-MS法分析油茶花及花蜜气味化学成分[J]. 特种经济动植物, 2020, 23(4): 18-21.
HE X J, WEI X P, ZHOU W C, et al. Analysis of chemical components of *Camellia oleifera* flowers and nectar odor based on GC-MS method[J]. Special economic animals and plants, 2020, 23(4): 18-21.
- [11] XIE Z, CHEN X, QIU J. Reproductive failure of *Camellia oleifera* in the plateau region of China due to a shortage of legitimate pollinators[J]. International journal of agriculture & biology, 2013, 15(3): 458-464.
- [12] LI Z, HUANG Q, ZHENG Y, et al. Identification of the toxic compounds in *Camellia oleifera* honey and pollen to honey bees (*Apis mellifera*)[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2022, 70(41): 13176-13185.
- [13] BARRAUD A, BARASCOU L, LEFEBVRE V, et al. Variations in nutritional requirements across bee species[J]. Frontiers in sustainable food systems, 2022, 6: 824750.
- [14] ALSHALLASH K S, ABOLABAN G, ELHAMAMSY S M, et al. Bee pollen as a functional product-chemical constituents and nutritional properties[J]. Journal of ecological engineering, 2022, 24(2): 173-183.
- [15] DUFOUR C, FOURNIER V, GIOVENAZZO P. Diversity and nutritional value of pollen harvested by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies during lowbush blueberry and cranberry (Ericaceae) pollination[J]. The canadian entomologist, 2020, 152(5): 622-645.
- [16] GAGE S L, CALLE S, JACOBSON N, et al. Pollen alters amino acid levels in the honey bee brain and this relationship changes with age and parasitic stress[J]. Frontiers in neuroscience, 2020, 14: 231.
- [17] CHATHA A M M, NAZ S, DANABAS D. Effects of environmental factors on the physiology and development of honey bees

- [J].Abasyn journal of life sciences, 2022, 5(2):33-51.
- [18] BRYŚ M S, STANIEC B, STRACHECKA A. The effect of pollen monodiets on fat body morphology parameters and energy substrate levels in the fat body and hemolymph of *Apis mellifera* L. workers[J].Scientific reports, 2024, 14(1):15177.
- [19] ROBERTS S P, ELEKONICH M M. Muscle biochemistry and the ontogeny of flight capacity during behavioral development in the honey bee, *Apis mellifera*[J].Journal of experimental biology, 2005, 208(22):4193-4198.
- [20] BRODSCHNEIDER R, OMAR E, CRAILSHEIM K. Flight performance of pollen starved honey bees and incomplete compensation through ingestion after early life pollen deprivation[J].Frontiers in physiology, 2022, 13:1004150.
- [21] BRYŚ M S, STRACHECKA A. The key role of amino acids in pollen quality and honey bee physiology—a review[J].Molecules, 2024, 29(11):2605.
- [22] 杨何妍. 狄斯瓦螨和杀螨剂氟氯苯氧菊酯对西方蜜蜂生存能力的影响[D]. 南昌:江西农业大学, 2022.
YANG H Y. Effects of *Varroa destructor* and acaricide flumethrin on the survival ability of workers in *Apis mellifera*[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2022.
- [23] LIAO C H, HE X J, WANG Z L, et al. Short-term exposure to lambda-cyhalothrin negatively affects the survival and memory-related characteristics of worker bees *Apis mellifera*[J].Archives of environmental contamination and toxicology, 2018, 75:59-65.
- [24] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J].Nature protocols, 2008, 3(6):1101-1108.
- [25] BOGO G, BORTOLOTTI L, SAGONA S, et al. Effects of non-protein amino acids in nectar on bee survival and behavior[J].Journal of chemical ecology, 2019, 45:278-285.
- [26] BERTAZZINI M, MEDRZYCKI P, BORTOLOTTI L, et al. Amino acid content and nectar choice by forager honeybees (*Apis mellifera* L.)[J].Amino acids, 2010, 39:315-318.
- [27] HANSEN K, WACHT S, SEEBAUER H, et al. New aspects of chemoreception in flies[J].Annals of the New York academy of sciences, 1998, 855(1):143-147.
- [28] WACHT S, LUNAU K, HANSEN K. Chemosensory control of pollen ingestion in the hoverfly *Eristalis tenax* by labellar taste hairs[J].Journal of comparative physiology A, 2000, 186:193-203.
- [29] MICHEU S, CRAILSHEIM K, LEONHARD B. Importance of proline and other amino acids during honeybee flight: (*Apis mellifera carnica* POLLMANN)[J].Amino acids, 2000, 18:157-175.
- [30] CRAILSHEIM K, LEONHARD B. Amino acids in honeybee worker haemolymph[J].Amino acids, 1997, 13:141-153.
- [31] CARTER C, SHAFIR S, YEHOANATAN L, et al. A novel role for proline in plant floral nectars[J].Naturwissenschaften, 2006, 93:72-79.
- [32] CASTEELS P, TEMPST P. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a nonporeforming mechanism involving stereospecificity[J].Biochemical and biophysical research communications, 1994, 199(1):339-345.
- [33] 姜澳, 黎洪霞, 刘肇龙, 等. 飞龙掌血蜂蜜挥发性物质组成及关键香气物质分析[J].食品科学, 2024, 45(11):175-185.
JIANG A, LI H X, LIU Z L, et al. Analysis of volatile composition and key aroma compounds in *Toddalia asiatica* Lam. honey[J].Food science, 2024, 45(11):175-185.
- [34] CASTEELS P, AMPE C, JACOBS F, et al. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*)[J].Journal of biological chemistry, 1993, 268(10):7044-7054.
- [35] DOMÍNGUEZ E, GIARDINI P M, QUINTANA S, et al. Fatty acid profile of *Apis mellifera* workers in the face of an immune challenge[J].Apidologie, 2024, 55(1):15.
- [36] BONCRISTIANI H, UNDERWOOD R, SCHWARZ R, et al. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*[J].Journal of insect physiology, 2012, 58(5):613-620.
- [37] PAOLI P P, WAKELING L A, WRIGHT G A, et al. The dietary proportion of essential amino acids and Sir2 influence lifespan in the honeybee[J].Age, 2014, 36:1239-1247.
- [38] VRANOVA V, REJSEK K, SKENE K R, et al. Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions[J].Plant and soil, 2011, 342:31-48.
- [39] PETANIDOU T, VAN LAERE A, ELLIS W N, et al. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars?[J].Oikos, 2006, 115(1):155-169.
- [40] NEPI M. Beyond nectar sweetness: the hidden ecological role of non-protein amino acids in nectar[J].Journal of ecology, 2014, 102(1):108-115.

(责任编辑:刘俊峰)