

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201904071

西方蜜蜂食用茶多酚后对 3 种蜜蜂报警 信息素成分的触角电位反应*

王媛¹, 董坤¹, 龚志文², 李源², 谭垦^{2**}

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南昆明 650201;

2. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 热带森林生态重点实验室, 云南勐腊 666303)

摘要:【目的】研究西方蜜蜂采集蜂食用茶多酚溶液后, 对 3 种报警信息素成分的触角电位反应, 为探讨茶多酚在神经生物学中的作用提供参考和科学依据。【方法】以西方蜜蜂为试验对象, 按照长效和短效确定 2 个作用时间饲喂其不同质量浓度的茶多酚溶液后采用触角电位 (EAG) 技术检测蜜蜂对 3 种报警信息素乙酸异戊酯 (IPA)、乙酸辛酯 (OA) 和乙酸苄酯 (BA) 的 EAG 反应。【结果】茶多酚长效作用比短效作用更能增强采集蜂对 3 种报警信息素成分的 EAG 反应; 茶多酚短效作用的蜜蜂对 OA 的 EAG 反应比 IPA 小, 但长效作用的蜜蜂对 OA 的 EAG 反应比 IPA 强; 在 3 种报警信息素成分中, 蜜蜂对 BA 的 EAG 反应最强。【结论】蜜蜂在茶多酚干预下对不同报警信息素成分的敏感性会发生明显变化, 表明茶多酚可增强蜜蜂的防御能力。

关键词: 西方蜜蜂; 茶多酚; 蜜蜂报警信息素; 触角电位

中图分类号: S 894.1

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0183-05

Electroantennogram Response of *Apis mellifera* to Three Alarm Pheromone Components after Feeding on Tea Polyphenols

WANG Yuan¹, DONG Kun¹, GONG Zhiwen², LI Yuan², TAN Ken²

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden,

Chinese Academy of Science, Mengla 666303, China)

Abstract: [Purpose] The electroantennogram (EAG) response of foragers of *Apis mellifera* to three alarm pheromone components was measured after they fed on tea polyphenols, in order to provide reference and scientific basis for exploring the role of tea polyphenols in neurobiology.

[Methods] Foragers of *A. mellifera* after feeding on different mass concentrations of tea polyphenols (TP) for different durations were used as test material. Their electroantennogram (EAG) responses to three alarm pheromone components isopentyl acetate (IPA), octyl acetate (OA) and benzyl acetate (BA) was detected by the electroantennography. [Result] Compared with short-acting, long-acting could be more effective to enhance the EAG responses of forager to three alarm pheromone components. Foragers with short-acting exhibited lower EAG response to OA than to IPA. However, the EAG

收稿日期: 2019-04-25

修回日期: 2019-06-27

网络首发时间: 2021-01-08 07:09:11

*基金项目: 国家现代蜂产业技术体系项目 (CARS-44-KXJ13)。

作者简介: 王媛 (1993—), 女, 重庆人, 在读硕士研究生, 主要从事蜜蜂生物学研究。

E-mail: luirluir@163.com

**通信作者 Corresponding author: 谭垦 (1962—), 男, 云南昆明人, 博士, 研究员, 主要从事化学生态学和蜜蜂生物学研究。E-mail: kentan@xtbg.ac.cn

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210106.1109.002.html>



response of foragers with long-acting to OA was stronger than that to IPA. BA elicited the strongest EAG response of bees among three alarm pheromone components. [**Conclusion**] Our results verified that the sensitivity of bees to different alarm pheromones components would change significantly under TP intervention, suggesting that TP improved the adaptability of bees to the changes of environment.

Keywords: *Apis mellifera*; tea polyphenol; bee's alarm pheromone; electroantennogram

蜜蜂是自然界最重要的授粉昆虫之一,对作物授粉和维持自然生态系统平衡发挥着重要作用^[1-2]。蜜蜂作为社会性昆虫,其化学通信系统十分复杂,当蜜蜂受到惊扰时,会从蜇针腺释放信息素作为报警信号^[3],进而作出相应的应激反应行为。蜜蜂报警信息素是多组分信息素混合物,在整合蜂群防御反应中起重要作用^[4]。报警信息素的主要成分(质量分数>10%)有乙酸异戊酯(isopentyl acetate, IPA)、乙酸辛酯(octyl acetate, OA)、乙酸苄酯(benzyl acetate, BA)和其他化合物^[5-7]。IPA是报警信息素混合物的主要活性成分,但是易挥发,所以IPA无法有效地标记到入侵者,召集其他蜜蜂进行进一步的攻击;OA的挥发性较小,具有持久性,可以帮助蜜蜂定位移动的目标;BA能有效增加蜂房中扇风蜜蜂的数量,这可能是防御性反应的一部分^[8-9]。

中国是世界上产茶最多的国家,茶叶的种植主要集中在南方,是某些地区的主要蜜源植物。茶花花蜜中含有一定量的茶多酚(tea polyphenols, TP)。茶多酚又称为儿茶素,属多酚类物质,是一种多羟基酚类衍生物的混合物,主要由表儿茶素(epicatechin, EC)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)和表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)组成;其中,EGCG具有抗氧化、抗炎和铁螯合特性,是TP最主要的功能成分^[10-11]。在小鼠实验中,EGCG调节黑质中的膜铁转运蛋白,降低氧化应激,可以降低帕金森病的发生^[12]。TP具有二价金属螯合、抗氧化和抗炎活性,能够穿透大脑屏障,并治疗神经疾病细胞和保护神经元细胞^[13]。

触角是蜜蜂听觉和嗅觉感受器,主要感知周围环境和接收化学信号^[14-15]。触角电位(electroantennogram, EAG)技术可以直接检测昆虫对化学信号的反应^[16]。EAG原理是当昆虫触角的嗅

觉受体神经元受到气味刺激时,整个触角会形成串联电路,触角端部与基部之间会产生生物电位,记录触角端部和基部间电位的变化^[17]。EAG被广泛用于昆虫电生理学和化学生态学研究^[17-18]。蜜蜂进行个体之间的交流很大程度上依赖于信息素^[4]。同时,蜜蜂也是公认的研究神经生物学的模式生物,可用于脊椎动物神经生物学的比较研究^[19]。蜜蜂在进行采集活动时,会遇到不同的外界蜜源,一些蜜源植物含有茶多酚。茶多酚能否改善采集蜂对报警信息素的EAG反应?这是一个值得探究的问题。蜜蜂对化学信号有优秀的认知能力,从而更利于蜂群的生存和发展^[20]。本研究通过饲喂西方蜜蜂不同质量浓度的TP溶液,分别在2h和5d后检测其对3种蜜蜂报警信息素成分IPA、BA和OA的EAG反应,研究结果有助于揭示短期和长期食用TP蜜蜂的嗅觉神经对报警信息素的敏感性。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

以30%(w/v)的蔗糖水为溶剂,配制不同质量浓度的TP溶液,分别为0、10和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以正己烷为溶剂,将3种蜜蜂报警信息素(表1)标准品分别配制成质量浓度为100 ng/mL 的溶液。

1.2 试验设备

触角电位仪主要由以下几部分组成:(1)由学习记忆检测装置构成刺激控制系统;(2)电极固定器;(3)放大器(荷兰Syntech公司);(4)HP34405A数字万用表(美国Agilent公司)作为数据采集控制器;(5)装有BenchVue软件(美国Keysight公司)的台式电脑。

1.3 蜂群准备

试验用蜂群由云南农业大学动物科学技术学院东方蜜蜂研究所提供。在实验蜂场选择3群群势相当且均有4脾以上的蜂群。适宜的天气条件

表 1 蜜蜂报警信息素组分信息

Tab. 1 Honeybee alarm pheromone components information

分类 classification	化合物 chemicals	纯度/% purity	来源 source
溶剂 solvent	正己烷 hexane	98	天津市风船化学试剂有限公司 Tianjin Fengchuan Chemical Reagent Technologic Co. Ltd.
蜜蜂报警信息素成分 bee alarm pheromone components	乙酸异戊酯 (IPA) isopentyl acetate	>98	东京化成工业株式会社 Tokyo Chemical Industry
	乙酸辛酯 (OA) octyl acetate	>99	北京百灵威科技有限公司 Beijing Bailing Way Technology Co. Ltd.
	乙酸苄酯 (BA) benzyl acetate	>99	东京化成工业株式会社 Tokyo Chemical Industry

下, 10: 00—11: 00 之间用玻璃试管在试验蜂群巢门口抓捕外出的采集蜂, 用不同质量浓度 TP 溶液饲喂 2 h 和 5 d 后分别进行 EAG 反应检测。

1.4 试验方法

首先将毛细管拉制成 EAG 反应所需的玻璃电极备用, 准备好洗净并烘干的巴斯德管和用正己烷浸泡过的滤纸条 (0.4 cm×2.0 cm)。EAG 系统中连接蜜蜂触角基部的电极吸入昆虫生理盐水, 连接顶端的电极以 Ringer 溶液为缓冲液, 所采用的金属丝为铂丝。用 0.5~10 μL 移液枪取 5 μL IPA、BA 和 OA 样品滴到滤纸片上, 然后用干净的镊子把滤纸片放进巴斯德管, 管口连接刺激控制系统。先用对照气味正己烷刺激蜜蜂触角, 再换其他气味。气味刺激由低质量浓度到高质量浓度的顺序进行。蜜蜂 EAG 反应过程中, 气流的速度为 15 mL/s, 气味刺激持续时间为 3 s, 每次刺激时间间隔 30 s, 相对湿度 90%, 放大器的放大倍数是 21 倍^[21]。

取出准备好的蜜蜂, 从触角基部剪下左触角, 再剪下该触角顶端 2 节鞭节, 迅速置入电极, 待基线平稳后开始试验数据的采集和记录。

同样的方法测试该蜜蜂的右侧触角发现左右触角反应没有明显差异, 因此之后的试验均采用蜜蜂左侧触角进行 EAG 反应试验。蜜蜂触角被刺激时, 电脑上的 BenchVue 波形图波峰与波谷之间会出现电压差, 记录下该数据作为反应值。每一蜂群各处理收集 6 只采集蜂的数据。

1.5 数据处理

用 SPSS 19.0 软件对收集的数据进行分析。单变量分析出各处理组平均值和标准误差, 单因素分析各组之间的差异显著性, 对多组数据的多重比较采用 Duncan 检验分析方法进行分析。对试验分析结果采用 GraphPad Prism 5 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 蜜蜂食用不同质量浓度 TP 溶液 2 h 和 5 d 后的 EAG 反应

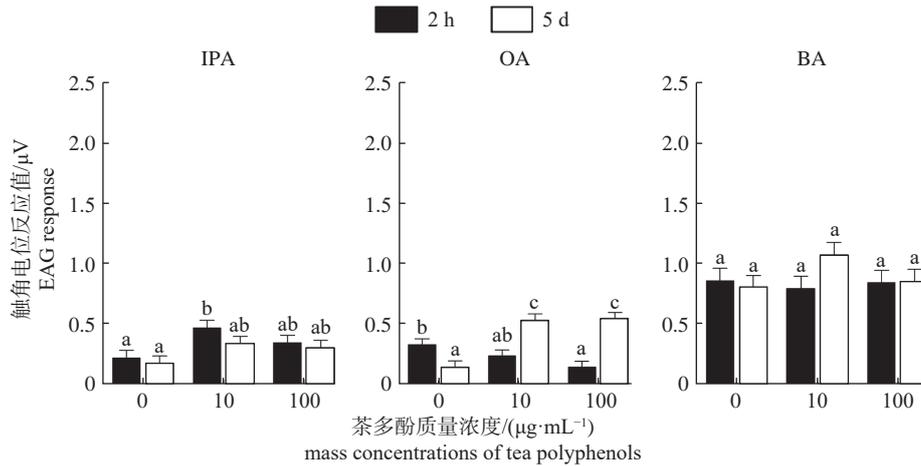
由图 1 所示: 饲喂采集蜂 TP 溶液 2 h 和 5 d 后, 对 IPA 的 EAG 反应均有增强的趋势, 且 2 h 试验组蜜蜂的 EAG 反应更明显, 但是差异不显著。饲喂 2 h 后的蜜蜂对 OA 的 EAG 反应随质量浓度升高而有明显下降的趋势, 而饲喂 5 d 的蜜蜂对 OA 的 EAG 反应和对照组相比明显升高且差异显著, 因此饲喂蜜蜂 TP 后因饲喂持续时间的长短而呈现出完全相反的结果。饲喂不同质量浓度 TP 的蜜蜂对 BA 的 EAG 反应与对照组比较没有显著差异, 2 h 和 5 d 试验组的蜜蜂之间的 EAG 反应也没有差异。

2.2 采集蜂食用不同质量浓度 TP 溶液后对不同气味的 EAG 反应

由图 2 所示: 从总体情况看, 饲喂蜜蜂 2 h 和 5 d 其 EAG 反应趋势基本一致, 均显示蜜蜂对 BA 的反应更为明显。饲喂 TP 溶液 2 h 后, 采集蜂对 BA 的 EAG 反应最强, 明显高于 IPA 和 OA; 食用 TP 溶液 2 h 后的蜜蜂对 OA 的 EAG 反应比 IPA 小。饲喂 TP 溶液 5 d 的蜜蜂同样对 BA 的 EAG 反应最强, 且与 IPA 和 OA 差异显著 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 试验组除外); 但 5 d 的蜜蜂对 OA 的 EAG 反应比 IPA 强, 尽管 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 试验组中二者之间的差异不显著。也就是说, 蜜蜂对 IPA 和 OA 的 EAG 反应呈现出了时间效应。

3 讨论

总的来说, 蜜蜂对 3 种信息素均有不同程度的 EAG 反应, 这也反映出蜜蜂在社会活动中对不同报警信息素所产生的行为差异。



注：不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)；下同。

Note: Different letters mean significant difference ($P < 0.05$); the same as below.

图 1 饲喂采集蜂 TP 溶液 2 h 和 5 d 后的 EAG 反应比较

Fig. 1 Comparison of EAG responses after feeding foragers TP solution for 2 h and 5 d

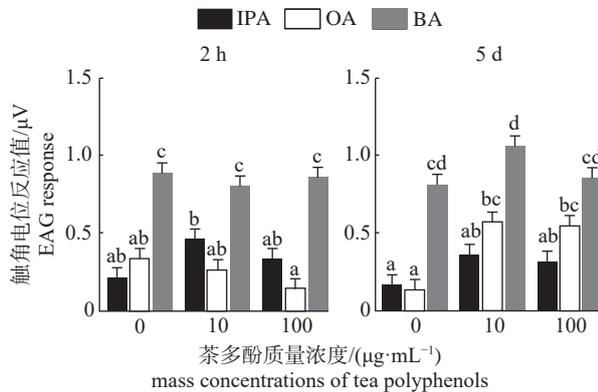


图 2 采集蜂对 IPA、BA 和 OA 的 EAG 反应比较

Fig. 2 Comparison of EAG responses of foragers to IPA, BA and OA

IPA 和 OA 的释放量随着工蜂的年龄增长而增加，在第 30~40 天增加至最高水平。同一蜂群中，守卫蜂和采集蜂释放 IPA 和 OA 的量最大^[22]。本研究发现：蜜蜂对 IPA 的 EAG 反应根据时间作用长短和质量浓度的变化所做出的反应变化不是很明显，但是短时效应相对长时效应反应更为明显。就 OA 而言，蜜蜂在食用茶多酚 2 h 和 5 d 的 EAG 反应，呈现出截然相反的结果，具体表现为茶多酚短时作用让蜜蜂对 OA 的反应随质量浓度的升高而出现下降的现象，而茶多酚长时作用下让蜜蜂对 OA 的反应随质量浓度的升高而出现上升的现象，说明蜜蜂在茶多酚干预下，根据干预时间的长短而表现出不同的应对反应，提示蜜蜂会根据外界环境的变化而做出不同的应对策略。

BA 不同于 IPA 和 OA，采集蜂的 BA 释放量最高，而守卫蜂和内勤蜂等其他岗位的工蜂释放 BA 的量比采集蜂低很多，也就是说 BA 释放量与蜜蜂年龄无关，而与蜜蜂的工作相关^[22]。如果 BA 是采集蜂用于标记采集时或返回巢穴入口时遇到危险的报警信息素化合物，那么采集蜂的 BA 水平升高是合理的。BA 在蜜蜂防御中起到标记危险的作用，而不同于 IPA 和 OA 可以引起蜜蜂攻击。采集蜂在野外进行采集活动时，对 BA 敏锐的识别能力可以帮助其提前感知危险信息并规避。如果采集蜂对 IPA 和 OA 的敏感性和 BA 一样，那么蜂群在防御活动中的损失将会很大。其他研究结果同样也发现采集蜂对 BA 有较强的 EAG 反应^[23]。不管从短效还是长效作用来说，蜜蜂对 BA 的 EAG 反应最为强烈，表明蜜蜂食用茶多酚之后，对 BA 依然保持高度的敏感性，这与前人研究的结果相吻合^[23]。前人研究表明：蜜蜂在食用能使之兴奋的物质如咖啡因的情况下对外界的信息更加敏感^[24]。茶多酚与咖啡因有类似的能让动物个体产生兴奋的功能，如果蜜蜂在自然状况下采集到含有 TP 的蜜源，短期内蜜蜂对同伴释放的报警信息素更敏感，但锁定攻击目标的能力变弱。长期食用含 TP 花蜜的蜜蜂对报警信息素更敏感，这使蜂群的防御能力增强，人类或其他动物更容易受到这种蜜蜂的攻击。本试验结果也验证了蜜蜂在 TP 干预下对不同报警信息素的敏感性发生明显变化，侧面表明了蜜蜂对外

界环境变化的适应能力。

另外值得一提的是,蜜蜂对OA的EAG反应在控制气味正己烷的刺激作用下表现出明显差异。根据试验结果推测其原因,可能是由于在限制蜜蜂采集活动的情况下进行试验,对蜜蜂的生理产生了一定程度的改变,故降低了对气味的敏感性。但是TP能让蜜蜂提高其对报警气味的敏感性(图1)。从这一角度分析也得出TP提高蜜蜂对报警信号的敏感性具有明显作用。

4 结论

报警信息素作为蜜蜂防御行为和应激行为的信息交流媒介,对蜜蜂的生命活动至关重要。本研究表明:茶多酚长效作用于蜜蜂能提高其对报警信息素的敏感性,对今后报警信息素的研究可以提供一定的理论参考依据。

[参考文献]

- [1] KLEIN A, VAISSIÈRE B, CANE J H, et al. Importance of crop pollinators in changing landscapes for world crops[J]. *Proceedings of the Royal Society B (Biological Sciences)*, 2007, 274(1608): 303. DOI: 10.1098/rspb.2006.3721.
- [2] THORP R W. The collection of pollen by bees[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2000, 222(1/2/3/4): 211. DOI: 10.1007/bf00984103.
- [3] PANKIW T. Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making[J]. *Apidologie*, 2004, 35(2): 217. DOI: 10.1051/apido:2004009.
- [4] BREED M D, GUZMÁNNOVOA E, HUNT G J. Defensive behavior of honeybee: organization, genetics, and comparisons with other bees[J]. *Annual Review of Entomology*, 2003, 49(1): 271. DOI: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123155.
- [5] KOENIGER N, WEISS J, MASCHWITZ U, et al. Alarm pheromones of the sting in the genus *Apis*[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1979, 25(6): 467. DOI: 10.1016/S0022-1910(79)80004-9.
- [6] BLUM M S, FALES H M, TUCKER K W, et al. Chemistry of the sting apparatus of the worker honeybee[J]. *Journal of Apicultural Research*, 1978, 17(4): 218. DOI: 10.1080/00218839.1978.11099929.
- [7] JOHN B F. Pheromones of social bees[M]. New York: Comstock Publishing Associates, 1987.
- [8] WAGER B R, BREED M D. Does honey bee sting alarm pheromone give orientation information to defensive bees?[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2000, 93(6): 1329. DOI: 10.1603/0013-8746(2000)093[1329:DHBSAP]2.0.CO;2.
- [9] FREE J B, FERGUSON A W, SIMPKINS J R. Honeybee responses to chemical components from the worker sting apparatus and mandibular glands in field tests[J]. *Journal of Apicultural Research*, 1989, 28(1): 7. DOI: 10.1080/00218839.1989.11100814.
- [10] SINIJA V R, MISHRA H N. Green tea: health benefits[J]. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 2008, 17(4): 232. DOI: 10.1080/13590840802518785.
- [11] SUZUKI Y, MIYOSHI N, ISEMURA M. Health-promoting effects of green tea[J]. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*, 2012, 88(3): 88. DOI: 10.2183/pjab.88.88.
- [12] QI X, MONICA L, ANUMANTHA G K, et al. Epigallocatechin gallate has a neurorescue effect in a mouse model of Parkinson disease[J]. *The Journal of Nutrition*, 2017, 147(10): 1926. DOI: 10.3945/jn.117.255034.
- [13] MANDEL S, AMIT T, REZNICHENKO L, et al. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders[J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2010, 50(2): 229. DOI: 10.1002/mnfr.200500156.
- [14] KIRCHNER W H. Hearing in honeybees: the mechanical response of the bee's antenna to near field sound[J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 1994, 175(3): 261. DOI: 10.1007/BF00192985.
- [15] MARSHALL J. On the sensitivity of the chemoreceptors on the antenna and fore-tarsus of the honey-bee, *Apis mellifica* L.[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1935, 12(1): 17.
- [16] 田厚军, 陈艺欣, 黄玉清. 昆虫触角电位技术的研究进展[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(5): 907. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0384.2011.05.045.
- [17] MYRICK A J, BAKER T C. Locating a compact odor source using a four-channel insect electroantennogram sensor[J]. *Bioinspiration and Biomimetics*, 2011, 6(1): 016002. DOI: 10.1088/1748-3182/6/1/016002.
- [18] HAN B Y, HAN B H. EAG and behavioral responses of the wingless tea aphid *Toxoptera aurantii* (Homoptera: Aphididae) to tea plant volatiles[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(11): 4485. DOI: 10.1016/s1872-2032(08)60005-0.
- [19] GIURFA M. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well[J]. *Journal of Comparative Physiology*, 2007, 193(8): 801. DOI: 10.1007/s00359-007-0235-9.
- [20] 尚玉昌. 蜜蜂的通讯行为[J]. *生物学通报*, 2008, 43(4): 8. DOI: 10.3969/j.issn.0006-3193.2008.04.004.
- [21] WANG Z W, WEN P, QU Y, et al. Bees eavesdrop upon informative and persistent signal compounds in alarm pheromones[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25693. DOI: 10.1038/srep25693.
- [22] ALLAN S A, SLESSOR K N, WINSTON M L, et al. The influence of age and task specialization on the production and perception of honey bee pheromones[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1987, 33(12): 917. DOI: 10.1016/0022-1910(87)90003-5.
- [23] WEN P, CHENG Y N, QU Y F, et al. Foragers of sympatric Asian honey bee species intercept competitor signals by avoiding benzyl acetate from *Apis cerana* alarm pheromone[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6721. DOI: 10.1038/s41598-017-03806-6.
- [24] WRIGHT G A, BAKER D D, PALMER M J, et al. Caffeine in floral nectar enhances a pollinator's memory of reward[J]. *Science*, 2013, 339(6124): 1202. DOI: 10.1126/science.1228806.

责任编辑: 何承刚