

吉 挺,沈 芳,刘振国.卡尼鄂拉蜂工蜂咽下腺解剖形态学和超微结构研究[J].江苏农业科学,2014,42(11):247-250.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.089

卡尼鄂拉蜂工蜂咽下腺解剖形态学和超微结构研究

吉 挺,沈 芳,刘振国

(扬州大学动物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:为了分析卡尼鄂拉蜂(*Apis mellifera carnica*)工蜂咽下腺发育的不同阶段解剖形态和超微结构变化规律,探讨咽下腺在工蜂分泌王浆过程中的细胞学机制,运用扫描电镜和透射电镜方法比较分析 5 个不同日龄内勤蜂(3、6、9、12、16 日龄)和 3 个不同阶段越冬蜂(越冬阶段、春繁阶段、淘汰阶段)工蜂小囊发育饱满程度和细胞超微结构。结果表明,3 日龄工蜂咽下腺小囊发育尚未完全,而线粒体、内质网等细胞器已经出现;9 日龄工蜂咽下腺小囊直径极显著大于其他日龄内勤蜂工蜂($P < 0.01$),发育最为饱满,内质网、核糖体、导管等细胞器成分也最为丰富;春繁阶段越冬蜂工蜂咽下腺小囊直径极显著大于其他阶段越冬蜂($P < 0.01$),与 9 日龄工蜂相比差异不显著($P > 0.05$),但细胞器数量较 9 日龄有所下降;淘汰阶段越冬蜂和 16 日龄工蜂咽下腺细胞出现崩解现象。说明卡尼鄂拉蜂咽下腺小囊总体发育较为迟缓;伴随蜂王浆分泌,内勤蜂和越冬蜂咽下腺小囊发育均呈现“饱满—萎缩”的发育规律;多个细胞器参与蜂王浆的合成和分泌,细胞器丰富程度反映出工蜂泌浆能力的高低。

关键词:卡尼鄂拉蜂;咽下腺;扫描电镜;透射电镜

中图分类号: S891⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0247-04

咽下腺位于工蜂头腔内,是 1 对高度盘绕的长串葡萄状腺体,每条腺体包括 1 根分泌导管和数以百计的囊泡^[1]。作为蜜蜂工蜂特有的蜂王浆合成分泌的主要组织^[2-3],承担着蜂王浆主要营养成分如蛋白质、糖类及脂类物质的分泌职能。咽下腺自 1956 年被命名以来,其发育形态和超微结构的研究有了长足的发展。曾志将等比较意蜂与中蜂咽下腺小囊大小、长度和宽度差异,发现同品种间各日龄内勤蜂咽下腺小囊数量差异不显著,而意蜂咽下腺小囊平均数量比中蜂多 61.3%,长度长 35.7%,宽度差异不显著,并且意蜂咽下腺小囊细胞的细胞器更丰富^[4]。Knecht 等通过对蜜蜂咽下腺显微结构观察发现,工蜂羽化出房后,粗面内质网迅速增多,8 日龄工蜂达到最大;外勤蜂粗面内质网数量减少,与咽下腺分泌活性相一致^[5]。胡福良等对产浆量不同的 3 种意蜂不同日龄工蜂咽下腺的超微结构比较发现,高产浆性能的浙农大 1 号意蜂咽下腺小囊数量较之王浆低产意蜂品种高出 14.7%,且细胞线粒体、粗面内质网、分泌颗粒等结构丰富,初步揭示了王浆高产性能和咽下腺细胞超微结构、分泌生理机制之间的关系^[6]。Deseyn 等发现,3 日龄的工蜂咽下腺小囊已经存在,到 6 日龄时最为发达,随后小囊数量开始减少,而 21 日龄采集蜂咽下腺小囊消失,头部只存在其萎缩退化的结构,不再分泌蜂王浆;越冬蜂咽下腺小囊中有大量的分泌囊泡,其中储备的分泌物将在春繁时用以饲喂幼虫^[7]。苏松坤等通过对

不同日龄浆蜂咽下腺小囊计数和显微形态观察,发现 4~17 日龄的浆蜂咽下腺小囊均有乳白色分泌物产生,泌浆期较原意长 7~8 d,从形态学角度阐述了浆蜂王浆高产的原因^[8]。杜芝兰通过对中华蜜蜂工蜂咽下腺的超微结构观察,描述了粗面内质网、高尔基复合体、线粒体、分泌块等细胞器的形态结构和分泌导管,基本阐明中蜂王浆的合成及转运途径^[9]。马卫华等对意蜂咽下腺结构和功能进行了分析,推断咽下腺具有分泌王浆和消化酶的功能^[10]。

咽下腺分泌活性受蜂群结构、气候、日龄等因素的影响。一般认为在群势正常、群体结构完整蜂群中,6~12 日龄内勤蜂咽下腺充分发育,分泌活性最为活跃,承担饲喂小幼虫和蜂王工作。Knecht 等通过免疫组化技术检测工蜂咽下腺小囊内王浆蛋白含量,发现 8 日龄蛋白含量最多,表明咽下腺在 8 日龄前后分泌活性最强。越冬蜂在蜂群越冬期间不承担哺育与采集任务,其咽下腺分泌活性得到最大程度保留^[5]。在越冬蜂咽下腺中检测到少量王浆蛋白存在,表明越冬蜂咽下腺始终携带有王浆蛋白^[5];到春繁阶段后因受到幼虫食物(蜂花粉)和蜂王恢复产卵等外界环境因素的影响,越冬蜂泌浆行为又将开启,并表现出足够的哺育幼虫能力,直至有新的内勤蜂出房加以替代^[7]。由此可知在正常蜂群中,西方蜜蜂工蜂咽下腺分泌王浆应在内勤蜂 6~12 日龄与越冬蜂春繁阶段。

卡尼鄂拉蜂(简称卡蜂,拉丁学名 *Apis mellifera carnica*)是我国除意蜂之外分布最广的西方蜜蜂地理亚种。作为王浆低产品种,其咽下腺发育机制被研究者所忽视。通过对卡蜂不同发育时期咽下腺形态与超微结构,对比较不同产浆性能蜂种咽下腺发育差异更具意义。

基于上述观点,笔者采集了卡蜂咽下腺泌浆前后 5 个不同日龄(3、6、9、12、16 日龄)的内勤蜂及 3 个不同阶段(越冬阶段、春繁阶段和淘汰阶段)的越冬蜂,分别研究其咽下腺发

收稿日期:2014-07-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:31172272);国家蜂产业技术体系建设专项(编号:CARS-45-SYZ6);江苏省科技支撑计划(编号:SBE201230535)。

作者简介:吉 挺(1974—),男,江苏东台人,博士,副研究员,主要从事蜜蜂种质资源保护和利用等方面的教学与研究。E-mail: tj@yzu.edu.cn。

育形态和超微结构,以期阐明咽下腺发育和应答调节机制,为研究咽下腺在蜜蜂社会分工中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的卡蜂单雄授精蜂王由吉林省养蜂科学研究所提供,蜂群由扬州大学实验蜂场试验场组织,饲养期间提供充足的糖水和花粉,周边有零星的油菜蜜源。

对新羽化出房工蜂背部进行标记,在 2013 年 5 月采集 3、6、9、12、16 日龄的内勤蜂,2014 年 1—3 月采集越冬阶段(winter bee,1 月中旬)、春繁阶段(spring multiplication bee,2 月中旬)和淘汰阶段(retired bee,2 月底)工蜂。每个时间点各取 30 只,于解剖镜下迅速解剖咽下腺,置于 2.5% 戊二醛中,4 ℃ 保存。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂配制 0.2 mol/L 磷酸缓冲液:精确称量 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58 g,加双蒸水定容至 1 L,pH 值调至 7.4。2.5% 戊二醛:量取 25% 戊二醛母液 10 mL,加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 40 mL,加双蒸水定容到 100 mL。1% OsO_4 :将装有 1 g OsO_4 的安瓿瓶洗净,放入装有 100 mL 水的棕色试剂瓶中,在通风橱内把安瓿瓶敲破,配制 1% 水溶液(提前配制,4 ℃ 密封保存)。

1.2.2 主要设备 PS48 型体视显微镜(上海光学仪器厂);刻蚀镀膜仪(BAL-TEC sputter coater,SCD500);Hitachi HCP-2 型临界点干燥仪(Hitachi 公司);XL-30 ESEM 型环境扫描电子显微镜(Philips 公司);Tecnai 12 型透射电子显微镜(Philips 公司);RM2235 型徕卡超薄切片机(Leica Biosystems 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 扫描电镜(SEM) 将剖取的咽下腺(15 头)迅速转移到 2.5% 戊二醛固定液中(4 ℃,2 h)保存,以尽可能保持细胞原有生活状态,减少组织结构变化。经 PBS 清洗 3 次,15 min/次,1% OsO_4 固定后再用 PBS 清洗 3 次,15 min/次,再经系列浓度乙醇[50%、70%、80%、90%、100%、100% (加无水硫酸钠)]脱水,每浓度 15 min,经乙酸戊酯:乙醇=1:1 处理 30 min 后转入纯戊酯中处理 30 min,然后经 CO_2 临界点干燥 24 h,样品处理结束。将样品粘到载物片上,经表面镀膜处理后电镜观察(扬州大学测试中心),腺泡小囊直径测量和发育程度评价为形态学观察提供依据,数据统计采用 SPSS 16.0 的 *t* 检验。

1.3.2 透射电镜(TEM) 样本经戊二醛固定液中(4 ℃,2 h),经 PBS 清洗 3 次,15 min/次,1% OsO_4 固定后再用 PBS 清洗 3 次,15 min/次,系列浓度乙醇(50%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇)逐级脱水,乙醇:丙酮=1:1、100% 丙酮各 15 min,包埋剂与丙酮的混合液(体积比 1:1)处理样品 1 h,用包埋剂与丙酮的混合液(体积比 3:1)处理样品 3 h,纯包埋剂处理样品过夜。将经过渗透处理的样品包埋起来,70 ℃ 加热过夜,即得到包埋好的样品。样品在 Leica 超薄切片机中切片,获得 70~90 nm 的切片,该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液各染色 15 min,即可在透射电镜中观察。

2 结果与分析

2.1 不同日龄工蜂咽下腺形态学扫描电镜观察

扫描电镜结果(图 1)表明,随着日龄的增大,内勤蜂咽下腺小囊直径总体上呈现“饱满—萎缩”的趋势。3 日龄工蜂咽下腺发育尚未完全,呈不规则囊泡状结构,表面褶皱,无法对其小囊直径进行测量。随后咽下腺小囊逐步发育,6 日龄工蜂咽下腺小囊形状规则,表面光滑,大小不一,排列稀疏;9 日龄工蜂咽下腺小囊排列紧密,发育最为饱满,小囊直径极显著大于其他日龄内勤蜂阶段($P < 0.01, n \geq 34$)(图 2)。12、16 日龄咽下腺小囊直径下降,6、12、16 日龄之间无统计学差异($P > 0.05$)。

越冬蜂不同阶段咽下腺小囊直径变化规律与前者相似,咽下腺小囊直径在春繁阶段达到最大值,与 9 日龄工蜂差异不显著($P > 0.05$),较越冬蜂和淘汰蜂有显著的统计学意义($P < 0.01, n \geq 34$)。越冬阶段工蜂咽下腺小囊发育饱满,直径近似于 16 日龄,但排列松散,且形状不规则;春繁阶段工蜂咽下腺小囊排列紧密,并相互挤压成簇,囊泡分支较多;淘汰阶段工蜂咽下腺小囊出现脱落和崩解。

2.2 不同日龄工蜂咽下腺超微结构透射电镜观察

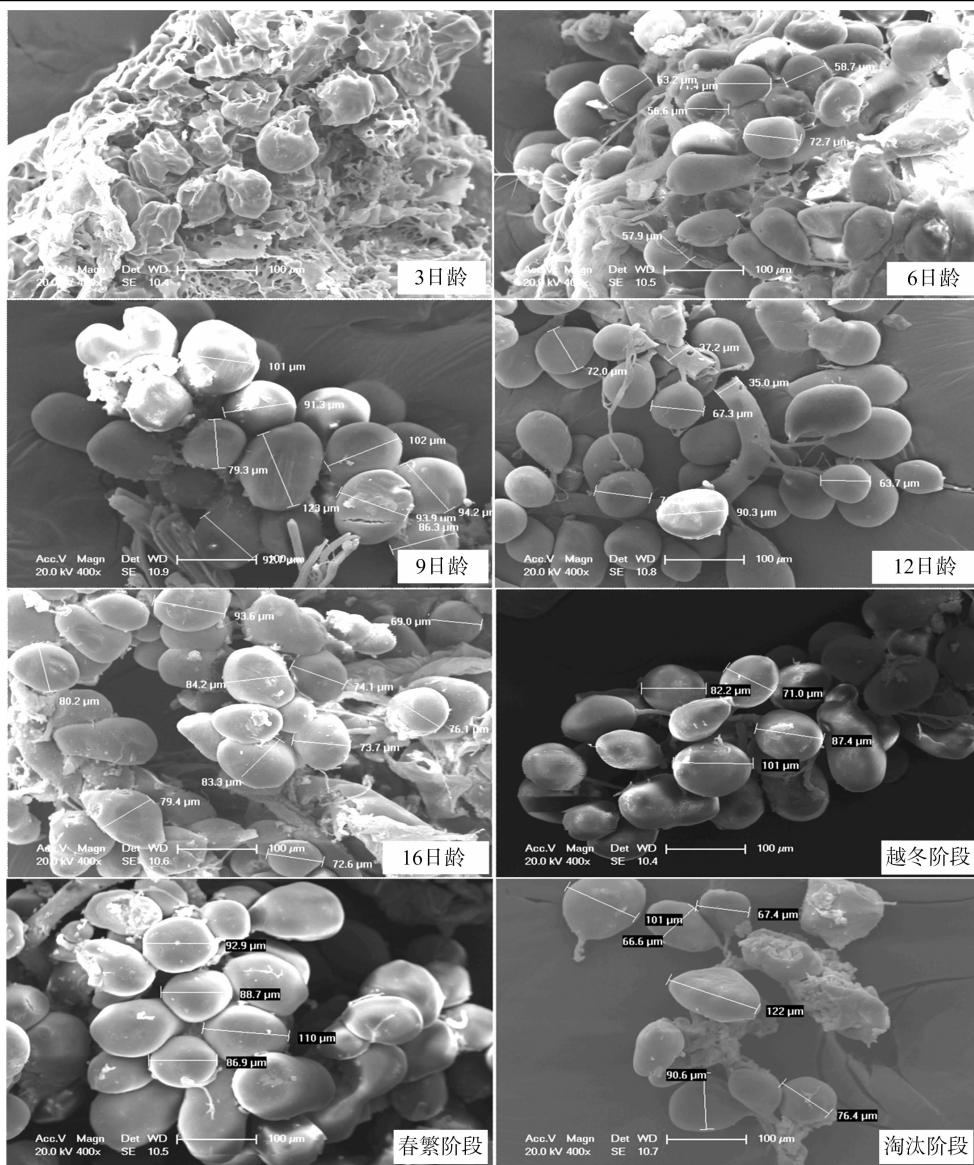
透射电镜结果(图 3)显示,3 日龄工蜂咽下腺小囊细胞内线粒体较为丰富,并出现分泌颗粒,表明此阶段细胞较为活跃,可能已经合成王浆蛋白,并以分泌颗粒的形式,存储在分泌泡中^[9]。6 日龄出现了粗面内质网和胞外管,表明蛋白质合成转运结构已经发育完善,为后续王浆分泌高峰期打下基础。9 日龄的线粒体明显增多,分布较为分散,出现大量的存储泡和分泌颗粒,大小不一,着色较深,占据细胞的大部分体积,呈现聚集现象。12 日龄小囊细胞体积萎缩,线粒体数量减少,细胞质出现了空泡结构。16 日龄中几乎没有线粒体出现,核仁增大,溶酶体数量增多。

越冬蜂在其越冬阶段,工蜂咽下腺小囊细胞形态与 16 日龄相似,排列紧密,细胞器较少;春繁阶段,工蜂咽下腺小囊细胞内线粒体、粗面内质网和分泌颗粒增多,胞外导管发达,但和内勤蜂 9 日龄相比,细胞器排列相对较为稀疏,且细胞器的数量也较少;越冬蜂在淘汰阶段,细胞结构明显不完整,细胞质偏移,出现了崩解现象。

3 讨论

电镜技术越来越多地应用到了生物样本组织结构变化、超微结构观察等分析中,为在生理调节过程等生物学研究提供形态依据,在生命科学研究领域发挥着重要作用。

扫描电镜结果表明,3 日龄卡蜂工蜂咽下腺尚未发育完全,存在很多皱褶,形态不规则,无法准确测量小囊直径和进行数据统计。而冯毛在对 1 日龄的浆蜂和原意工蜂头部解剖中都发现了发育较为完备的咽下腺^[11],表明意蜂内勤蜂咽下腺较卡蜂发育早。和意蜂相比,卡蜂的工蜂泌浆能力较低,可能与其咽下腺发育迟缓有一定关系。3 日龄的工蜂不承担王浆分泌工作^[12],但透射电镜结果显示,3 日龄卡蜂的咽下腺小囊细胞内已出现了数量较多的线粒体,可能此时小囊内已有王浆合成,此结果与 Knecht 研究结果^[5]相似;同时透射电镜未见细胞间的分泌导管结构,表明 3 日龄工蜂咽下腺小囊



图中为工蜂咽下腺小囊直径, 标尺为 100 μm , 放大倍数为 400 倍, 电压为 20.0 kV

图1 不同日龄、阶段工蜂咽下腺扫描电镜图

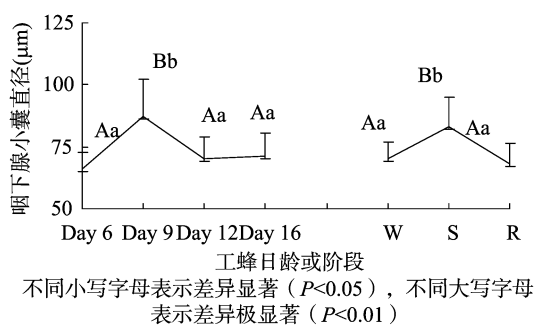


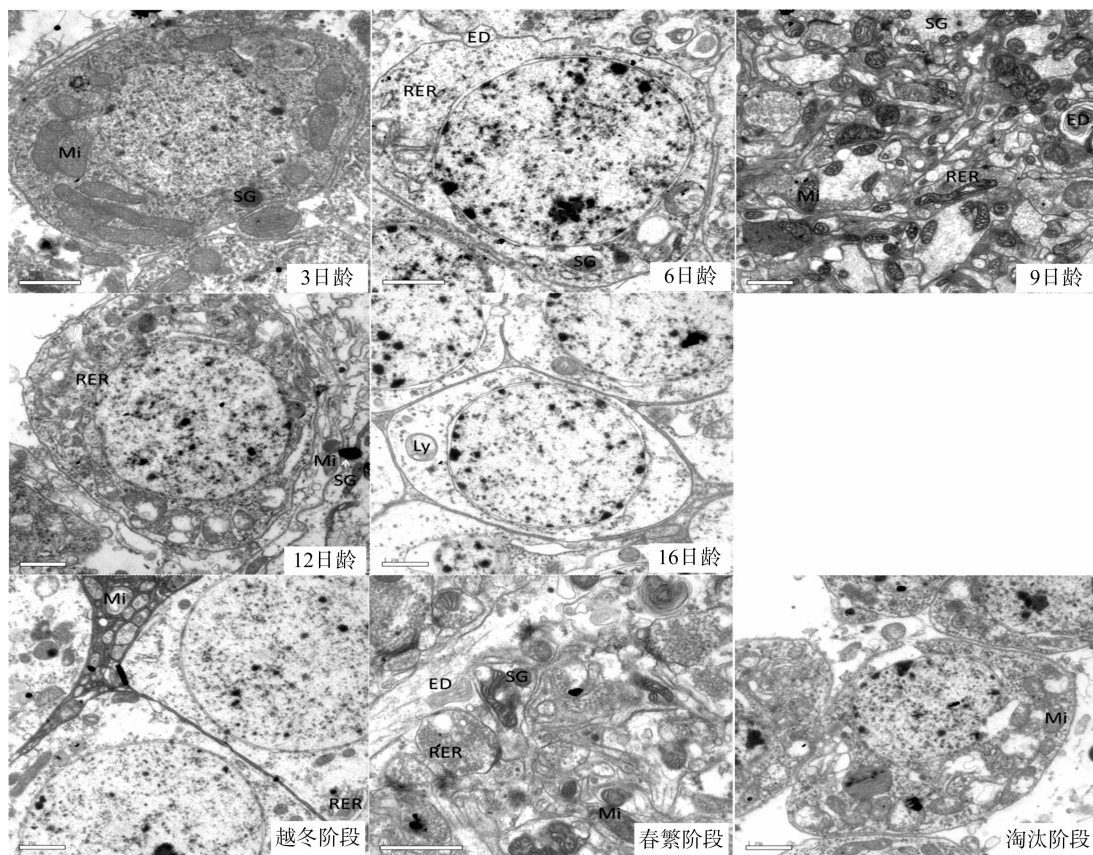
图2 不同日龄、阶段工蜂咽下腺小囊发育统计结果

内有王浆合成,但不能分泌王浆,其现有细胞结构将为后续日龄工蜂咽下腺大量合成和分泌蛋白质提供支持。

在工蜂社会分工中,6~12日龄是其分泌王浆、饲喂小幼虫的时期。电镜结果表明,从6日龄始,工蜂咽下腺小囊渐变

饱满,细胞结构和细胞器出现相应改变,具体表现在粗面内质网、线粒体等细胞器渐变丰富,存储泡和转运导管大量出现,其中以9日龄最为显著。9日龄工蜂咽下腺小囊直径最大 ($P < 0.01$),各种与蛋白合成与分泌相关的细胞器最为丰富,表明在此日龄王浆蛋白得到充分合成并存储在细胞内的存储泡,使咽下腺小囊膨大。而到16日龄,咽下腺小囊细胞内出现较多的溶酶体,细胞结构的完整性被破坏,细胞崩解,细胞功能丧失,导致王浆蛋白合成和分泌功能丧失,在形态学上体现为小囊萎缩。由此可见,内勤蜂咽下腺小囊细胞器的丰富程度变化与其分泌王浆活性是一致的。

同样越冬蜂在其越冬阶段里,工蜂咽下腺形态饱满,但细胞器结构较少,仅有少量的粗面内质网和线粒体结构,蜂群内囚王限卵的状态制约着越冬蜂咽下腺分泌王浆的活性,使其泌浆行为趋于停滞^[13]。而春繁阶段越冬蜂在幼虫信号和采食花粉等营养物质的刺激下,细胞内蛋白合成和分泌相关细



Mi—线粒体; Ly—溶酶体; ED—胞外管; RER—内质网; SG—分泌颗粒

图3 不同日龄、阶段工蜂咽下腺透射电镜图(标尺1 μm)

胞器结构丰富,使咽下腺小囊膨大,咽下腺呈现分泌活性。但越冬蜂在春繁阶段咽下腺小囊细胞器水平低于9日龄工蜂,表明春繁阶段工蜂王浆合成和分泌的能力较9日龄工蜂低,这一点与春繁蜂饲喂能力不如适龄工蜂强^[14]相一致。由此,不同日龄、不同阶段工蜂的饲喂能力差异在电镜分析得到合理解释。

综上所述,通过对卡蜂咽下腺小囊外部形态和细胞内部结构电镜分析表明,卡蜂工蜂咽下腺小囊总体发育较为迟缓,随着日龄增加,咽下腺小囊直径呈现“饱满—萎缩”的趋势,细胞结构出现“渐变增多—逐渐减少”的变化。不同日龄内勤蜂中,9日龄工蜂咽下腺小囊直径最大,细胞器水平最高;在越冬蜂中,春繁阶段工蜂咽下腺小囊直径最大,细胞器水平最高,但其细胞器水平均低于9日龄工蜂,表明咽下腺小囊内细胞器的水平反映了蜜蜂泌浆能力的高低。

致谢:感谢吉林省养蜂科学研究所薛运波所长、牛庆生研究员为本试验提供卡尼鄂拉蜂蜂王;感谢扬州大学测试中心老师对本试验电镜数据采集的指导和帮助。

参考文献:

- [1] 曾志将. 工蜂王浆腺研究进展[J]. 养蜂科技, 1993(3): 26—31.
- [2] Britto F B, Caetano F H. Morphological features and occurrence of degenerative characteristics in the hypopharyngeal glands of the paper wasp *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) [J]. *Micron*, 2006, 37(8): 742—747.
- [3] Liu Z G, Ji T, Yin L, et al. Transcriptome sequencing analysis reveals

- the regulation of the hypopharyngeal glands in the honey bee, *Apis mellifera carnica* Pollmann [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81001.
- [4] 曾志将, 席方贵, 温泽章, 等. 意蜂与中蜂王浆腺形态的研究 [J]. 中国养蜂, 1990(5): 6—7.
- [5] Knecht D, Kaatz H. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees [J]. *Apidologie*, 1990, 21(5): 457—468.
- [6] 胡福良, 陈盛禄, 林雪珍, 等. 意大利蜂工蜂咽下腺细胞超微结构与分泌活性 [J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(1): 75—80.
- [7] Deseyn J, Billen J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae) [J]. *Apidologie*, 2005, 36: 49—57.
- [8] 苏松坤, 罗建能, 黄家兴, 等. 意蜂咽下腺生理发育形态与王浆产量的关系 [J]. 中国蜂业, 2006(11): 5—7.
- [9] 杜芝兰. 蜜蜂超微结构 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 51—63.
- [10] 马卫华, 郭亚平, 张小民, 等. 意大利工蜂咽下腺结构观察 [J]. 环境昆虫学报, 2012, 34(4): 472—477.
- [11] 冯毛. 意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 工蜂咽下腺发育蛋白质组分析 [D]. 北京: 中国农业科学院. 2010: 35—41.
- [12] 曾志将. 养蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 145—147.
- [13] Huang Z Y, Otis G. Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Insectes Sociaux*, 1989, 36(4): 264—276.
- [14] 徐士磊, 石丽萍. 蜜蜂生物学特性在饲养管理中的合理利用 [C]. 中国养蜂学会蜜蜂饲养管理专业委员会第十三次学术研讨会, 江苏扬州, 2007年4月.