



马兰婷,程文艺,王帅,等.饲料缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫生长发育、血液生化指标及相关基因表达量的影响[J].江西农业大学学报,2023,45(6):1486-1495.

MA L T, CHENG W Y, WANG S, et al. Effects of dietary valine supplementation levels on growth and development, blood biochemical parameters and related gene expression in *Apis mellifera* L. larvae[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(6): 1486-1495.

饲料缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫生长发育、血液生化指标及相关基因表达量的影响

马兰婷¹,程文艺^{1*},王 帅²,胥保华¹,王 颖^{1*}

(1. 山东农业大学 动物科技学院(动物医学院), 山东 泰安 271018; 2. 山东省畜牧总站, 山东 济南 250100)

摘要:【目的】旨在确定饲料缬氨酸对意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.)幼虫生长发育、血淋巴生化指标及PI3K-AKT-TOR信号通路相关基因的影响。【方法】选用1 d雌性意大利蜜蜂幼虫480只,随机分为5组,每组4个重复,每个重复24只幼虫。以基础日粮为对照组(0%缬氨酸),在基础日粮中分别添加0.25%、0.50%、0.75%和1.00%缬氨酸。分析测定6 d幼虫体质量、体蛋白、化蛹率、羽化率、血淋巴氨基酸、生化指标,以及幼虫PI3K-AKT-TOR信号通路相关基因的表达。【结果】与对照组相比,饲料缬氨酸添加组幼虫粗蛋白含量显著升高,0.25%和0.50%缬氨酸添加组幼虫体质量显著提高,0.50%缬氨酸添加水平显著提高了幼虫的化蛹率和羽化率。与0.50%缬氨酸添加组相比,0.75%和1.00%缬氨酸添加组幼虫体质量、化蛹率和羽化率显著降低。缬氨酸添加显著影响幼虫血淋巴谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、赖氨酸和脯氨酸含量。血淋巴生化分析结果表明,与对照组相比,基础日粮中添加缬氨酸可显著降低血淋巴肌酸激酶含量,但高缬氨酸添加水平可显著升高丙氨酸氨基转移酶含量。此外,0.75%和1.00%缬氨酸添加水平显著下调*AmTOR*、*Amp70S6K*、*Am4E-BP*基因表达。【结论】在基础日粮中适量添加缬氨酸能够促进幼虫生长发育,并改善幼虫的健康状况。回归分析结果表明,在本试验条件下,意大利蜜蜂幼虫饲料的适宜缬氨酸添加水平为0.308 9%。研究揭示了意大利蜜蜂幼虫对缬氨酸需求与生长发育之间的关系,为确定意大利蜜蜂幼虫饲料的适宜缬氨酸水平提供了理论依据。

关键词:意大利蜜蜂;幼虫;缬氨酸;氨基酸代谢;生长发育

中图分类号:S894 文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2286(2023)06-1486-10



Effects of Dietary Valine Supplementation Levels on Growth and Development, Blood Biochemical Parameters and Related Gene Expression in *Apis mellifera* L. Larvae

MA Lanting¹, CHENG Wenyi^{1*}, WANG Shuai², XU Baohua¹, WANG Ying^{1*}

收稿日期:2023-10-20 修回日期:2023-11-06

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2022MC069)和国家现代农业产业技术体系项目(CARS-44)

Project supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2022MC069), the China Agriculture Research System (CARS-44)

作者简介:马兰婷,实验师,博士, orcid.org/0000-0002-6498-557X, malanting@sdau.edu.cn; *共同第一作者; *通信作者:王颖,讲师,博士,主要从事蜜蜂营养与生理生态研究, orcid.org/0000-0003-0270-7897, wangying@sdau.edu.cn

(1.College of Animal Science and Technology (College of Veterinary Medicine), Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Shandong Provincial Livestock Bureau, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: [Objective] This study aims to determine the effects of dietary valine on the growth, development, hemolymph biochemical parameters, and expression of genes related to the PI3K-AKT-TOR signaling pathway in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.). [Method] A total of 480 1-day-old female Italian honeybee larvae were randomly divided into five groups with four replicates of 24 larvae each. The control group was fed a basal diet (0%), and the experimental groups were fed the basal diet supplemented with 0.25%, 0.50%, 0.75%, and 1.00% valine, respectively. The final larval weight, body composition (moisture content, crude protein), pupation rate, emergence rate, hemolymph amino acids and biochemical parameters, and expression of genes related to the PI3K-AKT-TOR signaling pathways were analyzed and measured. [Result] The results showed that compared with the control group, the crude protein content in the valine-supplemented groups significantly increased. The groups supplemented with 0.25% and 0.50% valine showed significant improvements in larval weight, while the 0.50% valine supplementation level significantly increased pupation rate and emergence rate. Compared with the 0.50% valine supplementation group, the groups supplemented with 0.75% and 1.00% valine showed significant reductions in final larval weight, pupation rate, and emergence rate. Valine addition significantly influenced larval hemolymph bar glutamate, glycine, alanine, valine, methionine, leucine, lysine, and proline content. Hemolymph biochemical analysis results indicated that valine supplementation in the basal diet significantly reduced creatine kinase levels, and high levels of valine supplementation significantly increased aspartate transaminase levels. In addition, the supplementation levels of 0.75% and 1.00% valine significantly downregulated the expression of *AmTOR*, *Amp70S6K*, and *Am4E-BP*. [Conclusion] It can be concluded that appropriate supplementation of valine in the basal diet can promote the growth and development of honeybee larvae and improve their health status. Regression analysis results suggested that the optimal level of valine supplementation in honeybee larval feed under the experimental conditions was 0.308 9%. This study revealed the relationship between valine requirement and growth and development of honeybee larvae, providing a theoretical basis for determining the suitable valine level in honeybee larval feed.

Keywords: *Apis mellifera* L.; larvae; valine; amino acid metabolism; growth and development

【研究意义】支链氨基酸(Branched-chain amino acids, BCAAs),包括缬氨酸(Valine)、亮氨酸(Leucine)和异亮氨酸(Isoleucine)。其中,缬氨酸已被广泛证实动物蛋白质合成、饲料利用、能量代谢和维持机体正常生长等方面发挥着至关重要的作用^[1-2]。缬氨酸也是蜜蜂体内的必需氨基酸^[3]。然而,目前关于缬氨酸对蜜蜂特别是蜜蜂幼虫的生理作用还知之甚少。因此,探索蜜蜂幼虫适宜的缬氨酸需要量,将有助于深入了解其在蜜蜂生长发育中的重要作用,研究结果对蜜蜂的科学、健康、高效饲养有重要意义。【前人研究进展】研究表明,缬氨酸缺乏会导致畜禽或鱼类生长迟缓、饲料转化率降低、蛋白质合成减少、体质量下降^[4-6],适量缬氨酸水平能有效促进骨骼肌蛋白合成,提高动物采食量和日增重^[7-8]。研究表明,动物血液氨基酸、血浆蛋白、免疫指标因子及丙氨酸氨基转氨酶(alanine transaminase, ALT)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、甘油三酯(triglycerides, TG)等生化指标因子的浓度与生理代谢、食物营养和健康状况密切相关^[9-13]。因此,这些参数可作为反映动物营养状况等的标志物^[9,14-15]。卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)是卵黄蛋白的前体物质,该物质的合成受食物营养的显著影响,在蜜蜂寿命调节、营养调控、免疫机能等方面发挥重要作用^[16]。研究表明,日粮中的BCAAs,特别是缬氨酸可作为营养信号因子,通过PI3K-AKT-TOR(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin)途径活化TOR下游的p70S6K1激酶和eIF4E结合蛋白(eIF4E-binding protein, 4E-BP)促进蛋白质合成^[17-18]。然而,目前尚未有饲料缬氨酸水平对蜜蜂TOR信号通路表达影响的研究报道。

【本研究切入点】关于氨基酸营养对意大利蜜蜂生长发育的研究主要集中于赖氨酸、精氨酸、色氨酸等非支链氨基酸^[12,19-20],对于饲料缬氨酸添加水平对蜜蜂幼虫生长发育方面的研究较少。现有研究表明,饲料中适宜氨基酸水平可促进蜜蜂幼虫生长发育,促进虫体蛋白质和氨基酸沉积,提高幼虫化蛹率和羽化率,并提高幼虫的免疫能力和抗氧化能力^[12,19-20]。但是,饲料中氨基酸含量过高(如赖氨酸、精氨酸),则会阻碍幼虫等正常生长发育并显著降低幼虫化蛹率、羽化率^[12,19]。因此,明确蜜蜂幼虫饲料中的适宜缬氨酸水平对蜜蜂幼虫健康饲养有重要意义。【拟解决的关键问题】研究拟以意大利蜜蜂为试验材料,探索饲料中缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫生长发育、血淋巴生化指标以及PI3K-AKT-TOR信号通路相关基因的影响,以期确定意大利蜜蜂幼虫饲料的适宜缬氨酸水平提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

试验所用意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.)幼虫取自山东农业大学试验蜂场(36.16°N,117.16°E)。

1.2 试验设计与饲养管理

从同一群意大利蜜蜂中取1 d雌性意大利蜜蜂幼虫480只,随机分为5组,每组4个重复,每个重复24只幼虫,参照孙桂云等^[10]的方法在试验室条件下饲养。使用24孔细胞培养板饲养幼虫,每天更换1次饲料,每只幼虫每次饲喂200 μ L饲料。当在恒温培养箱(35 $^{\circ}$ C,RH 95%)中的6 d幼虫(末龄幼虫)排尿酸盐时,停止饲喂,将幼虫转移至铺有无菌纸的24孔细胞培养板中,于35 $^{\circ}$ C,RH 65%下饲养至羽化出房。

试验所用基础日粮(0%)参照Kaftanoglu等^[21]的方法配制,以基础日粮为对照组(0%),在基础日粮中分别添加0.25%、0.50%、0.75%和1.00%缬氨酸,试验饲料配方见表1。

表1 意大利蜜蜂幼虫试验饲料配方及主要营养指标

Tab.1 Composition and nutrients content of the basal diet of *Apis mellifera* L.

%

原料 Ingredients	处理 Treatments				
	0	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%
蜂王浆 Royal jelly	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
葡萄糖 Glucose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
果糖 Fructose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
酵母提取物 Yeast extract	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
缬氨酸 Valine	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
无菌水 Sterile water	37.00	36.75	36.50	36.25	36.00
总计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
缬氨酸含量 Valine content	0.40	0.68	0.91	1.20	1.49

缬氨酸含量为试验饲料中缬氨酸实测含量的平均值($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$),换算成百分含量。

The content of lysine is the average value of the measured lysine content in the experimental feed ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), converted to percentage content.

1.3 指标测定与方法

1.3.1 体质量、体蛋白含量、化蛹率和羽化率测定 每组随机取10只6 d幼虫称量(精确至0.0001 g)后,每2只幼虫作为1个样本,105 $^{\circ}$ C烘干至恒重,计算水分含量;后放入100 mL凯氏定氮消解瓶中,采用凯氏定氮法测定粗蛋白含量。试验开始后,每天检查并统计幼虫或蛹的成活个数,及时移出死亡个体,直到所有幼虫羽化出房为止,计算蜜蜂幼虫化蛹率和蛹的羽化率。

1.3.2 饲料、血淋巴氨基酸含量及生化指标的测定 蜜蜂血淋巴采集参考金梦杰等^[23]的方法,用20 μ L毛细采血管采集6 d幼虫血淋巴于1.5 mL离心管中,每组3个重复,每个重复采集220 μ L血淋巴,所有血淋巴样品于-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱保存。分别准确称取0.25 g(精确至0.001 g)饲料样品和100 μ L血淋巴样品于带盖螺口玻璃试管中,加入10 mL 6 mol/L HCl、摇匀,充入 N_2 于110 $^{\circ}$ C烘箱内水解24 h后,使用L-8900型全自动氨基酸分析仪(日本日立公司)测定氨基酸含量。饲料样品测定缬氨酸含量,血淋巴样品测定天冬氨酸(Aspartic acid)、苏氨酸(Threonine)、丝氨酸(Serine)、谷氨酸(Glutamic acid)、甘氨酸

(Glycine)、丙氨酸(Alanine)、缬氨酸、蛋氨酸(Methionine)、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸(Phenylalanine)、赖氨酸(Lysine)、组氨酸(Histidine)、精氨酸(Arginine)和脯氨酸(Proline)的含量。另取 100 μ L 血淋巴用日立 7020 型全自动生化分析仪(日本日立公司)测定丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、肌酸激酶(CK)和甘油三酯(TG)的含量。

1.3.3 基因表达的测定 随机选取 1 只 6 d 幼虫(约 0.25 g)为 1 个处理,使用 RNA Express Total RNA Kit(苏州新赛美生物科技有限公司)提取总 RNA,每组 4 个重复。采用超微量分光光度计检测 RNA 浓度合格后,使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(上海罗氏制药有限公司)反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,按照 Real Time PCR 试剂盒(上海罗氏制药有限公司),在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Thermo Electron Corporation)上进行测定。反应体系 20 μ L,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 s,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 5 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环。以 β -actin 作内参基因计算目的基因的相对表达量,基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列信息
Tab.2 Primer sequences for RT-PCR

基因 Genes	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')	基因登录号 GenBank accession number
β -actin	F:CCGTGATTTGACTGACTACCT R:AGTTGCCATTTCTGTTC	NM-001185145
AmTOR	F:ACGGGACGTGATTTCTCTCA R:ACCAAAAGGGACACCATCCA	XM_006566642.1
AmP70S6k1	F:GGAGGAAATGTGTGCTCAACC R:ACCTACAACGTGATGCCATATGT	XM_624925.4
AmPI3K	F:AGACCATCCTTTTCCACGCT R:CGGCTTGGAGACCAATCTCA	XM_623894.3
Am4E-BP	F:AGGCAAGCTACCCAAAGTCA R:ACGAGTACCTCCAGGCGTAG	XM_395030.3
AmBCAAT	F:GCTCCTTTCTTTCAACTTCCTCA R:GGAATAGATCCTATCCTTGGCGT	XM_396341.4
AmVg	F:CCAGCAGCGAGGAGAACG R:TTGCGTGAACGGGGATGT	NM_001011578

1.4 数据处理

使用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,首先进行方差齐性检验,然后进行单因素方差(one-way ANOVA)分析,组间多重比较采用 Turkey 法,试验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫生长发育的影响

由图 1 可知,蜜蜂末龄幼虫体质量随日粮缬氨酸添加水平提高呈先升高后降低趋势(图 1A),其中,0.50% 缬氨酸添加组末龄幼虫体质量显著高于对照组(0%)、0.75% 和 1.00% 缬氨酸添加组($P<0.05$);对照组(0%)、0.75% 和 1.00% 缬氨酸添加组之间,0.25% 和 0.50% 缬氨酸添加组,末龄幼虫体质量无显著差异($P>0.05$)。不同日粮缬氨酸添加水平对末龄幼虫水分含量无显著性影响(图 1B, $P>0.05$)。缬氨酸添加水平显著影响末龄幼虫粗蛋白含量(图 1C),其中,0.50%、0.75% 和 1.00% 缬氨酸添加组末龄幼虫体质量显著高于对照组(0%)($P<0.05$)。以试验得到的末龄幼虫体质量实测值为标识,进行二元线性回归分析,得出饲料缬氨酸添加水平对末龄幼虫体质量影响的回归方程(图 2): $y=-74.217x^2+45.857x+249.24$, R^2 为 0.929 4,表明该回归方程可靠性较高,解析方程可知本试验条件下,饲料缬氨酸适宜添加水平为 0.308 9%。

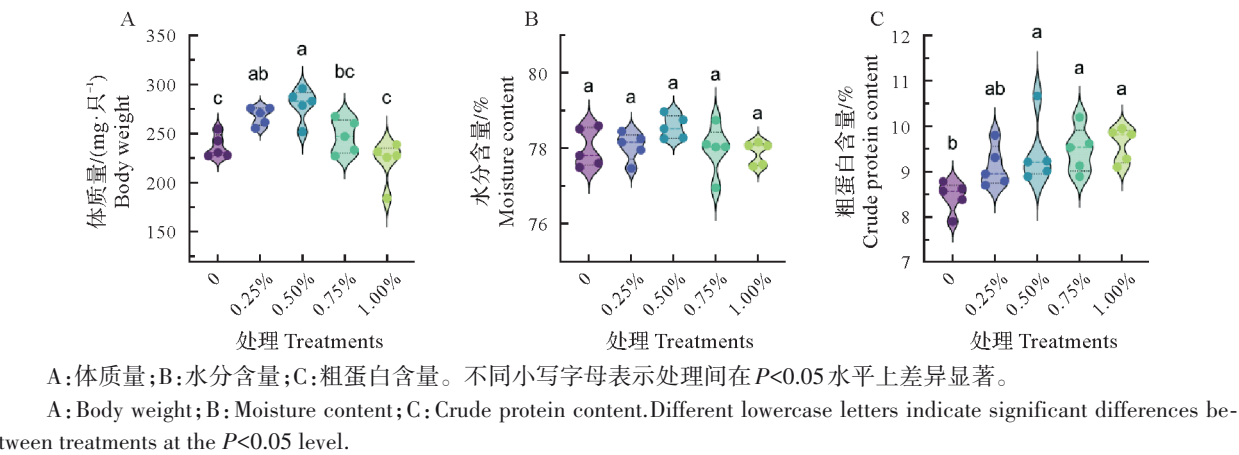


图1 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫生长发育的影响

Fig.1 The effect of dietary valine supplementation on the growth and development of *Apis mellifera* L. larvae

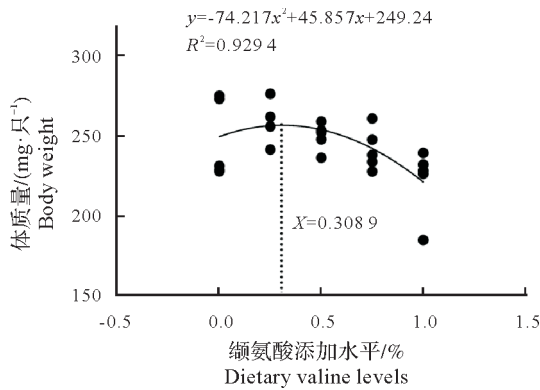
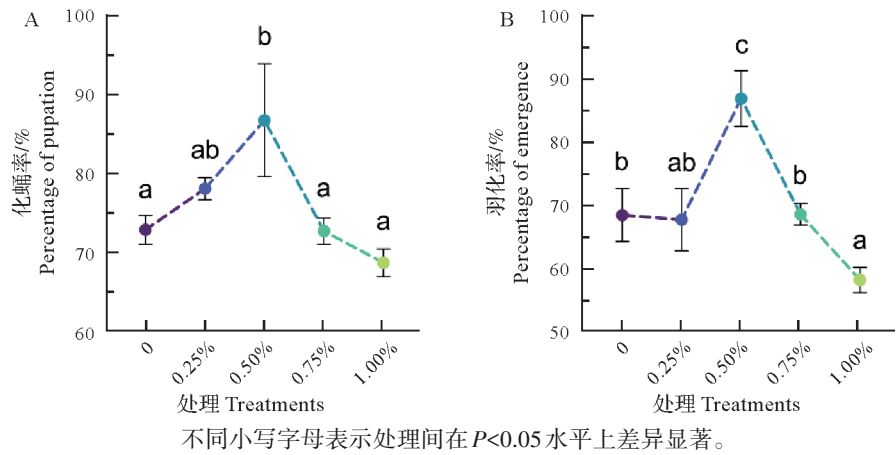


图2 缬氨酸适宜添加水平回归分析

Fig.2 Regression analysis of suitable levels of dietary valine supplementation

由图3可知,0.50%缬氨酸添加组幼虫化蛹率显著高于对照组(0%)、0.75%和1.00%缬氨酸添加组($P<0.05$)(图3A);0.50%缬氨酸添加组幼虫化蛹率显著高于对照组(0%)、0.25%、0.75%和1.00%缬氨酸添加组($P<0.05$)(图3B)。



Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the $P<0.05$ level.

图3 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫羽化率(A)和化蛹率(B)的影响

Fig.3 The effect of dietary valine supplementation on the emergence rate(A)and pupation rate(B)of *Apis mellifera* L. larvae

2.2 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫血淋巴氨基酸含量的影响

由表3可知,缬氨酸添加显著影响幼虫血淋巴谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、赖氨酸和脯氨酸含量。其中,与对照组、0.75%和1.00%缬氨酸添加组相比,0.25%和0.50%缬氨酸添加组幼虫血淋巴谷氨酸含量显著降低($P<0.05$)。各缬氨酸添加组幼虫血淋巴甘氨酸含量均显著低于对

照组($P<0.05$)。0.25%缬氨酸添加组幼虫血淋巴丙氨酸含量显著高于对照组、0.75%和1.00%缬氨酸添加组($P<0.05$),但与0.50%缬氨酸添加组无显著差异($P>0.05$)。随缬氨酸添加水平的提高,各处理组幼虫血淋巴缬氨酸含量显著升高。与对照组相比,缬氨酸添加组幼虫血淋巴蛋氨酸含量显著升高($P<0.05$),其中1.00%缬氨酸添加组蛋氨酸含量显著高于其他缬氨酸添加组($P<0.05$),0.25%、0.50%和0.75%缬氨酸添加组间幼虫血淋巴蛋氨酸含量无明显差异($P>0.05$)。0.25%缬氨酸添加组幼虫血淋巴亮氨酸含量显著高于对照组、0.50%和1.00%缬氨酸添加组($P<0.05$)。与对照组相比,缬氨酸添加显著提高幼虫血淋巴赖氨酸含量($P<0.05$),但不同缬氨酸添加组幼虫血淋巴赖氨酸含量无显著性差异($P>0.05$)。与对照组相比,缬氨酸添加显著降低幼虫血淋巴脯氨酸含量($P<0.05$),其中,1.00%缬氨酸添加组幼虫血淋巴脯氨酸含量显著低于对照组和0.25%缬氨酸添加组($P<0.05$)。

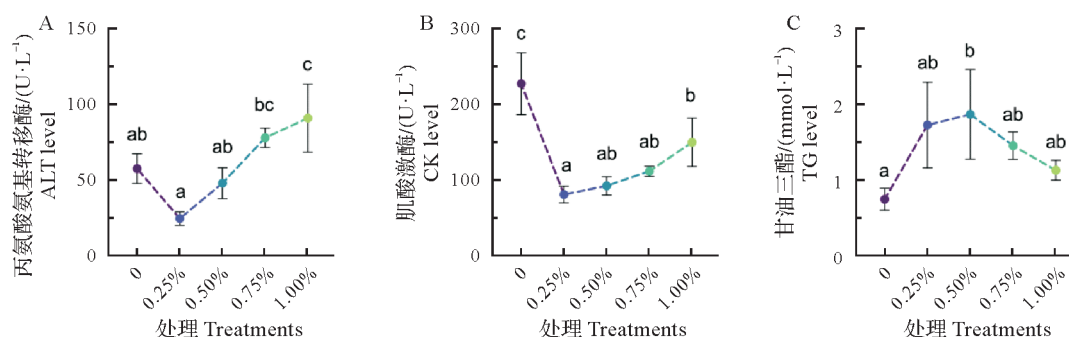
表 3 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫血淋巴氨基酸含量的影响
Tab.3 The effect of dietary valine supplementation levels on the hemolymph amino acid content of *Apis mellifera* L. larvae

氨基酸 Amino acid	处理 Treatments					mg/100 mL	
	0%	0.25%	0.50%	0.75%	1.00%	F 值 F value	P 值 P value
天冬氨酸 Aspartic acid	27.53±3.13 ^a	28.38±1.59 ^a	23.02±0.91 ^a	28.77±5.21 ^a	28.27±5.24 ^a	1.251	0.351
苏氨酸 Threonine	469.20±88.75 ^a	308.28±100.52 ^a	375.26±23.05 ^a	365.26±20.26 ^a	331.23±26.46 ^a	2.906	0.078
丝氨酸 Serine	40.81±8.00 ^a	25.26±11.63 ^a	20.26±1.08 ^a	23.81±11.71 ^a	26.45±13.23 ^a	1.821	0.201
谷氨酸 Glutamic acid	15.09±2.56 ^{ab}	3.66±2.84 ^c	7.69±2.42 ^c	8.85±2.03 ^{bc}	16.36±3.63 ^a	11.166	0.001
甘氨酸 Glycine	175.31±10.56 ^a	93.43±14.47 ^b	78.46±1.09 ^b	90.35±11.59 ^b	91.17±5.28 ^b	47.905	0
丙氨酸 Alanine	42.00±18.90 ^b	136.27±55.07 ^a	64.62±4.34 ^{ab}	51.65±12.47 ^b	60.40±8.37 ^b	5.809	0.011
缬氨酸 Valine	107.97±11.99 ^c	376.18±111.08 ^d	718.85±27.81 ^c	1 019.44±16.82 ^b	1 302.94±75.31 ^a	179.813	0
蛋氨酸 Methionine	1.43±1.33 ^c	7.10±1.29 ^b	5.50±1.95 ^b	6.53±2.59 ^b	9.19±2.12 ^a	6.682	0.007
异亮氨酸 Isoleucine	34.72±6.73 ^a	42.96±5.01 ^a	34.82±2.11 ^a	35.08±0.76 ^a	39.08±5.35 ^a	1.908	0.186
亮氨酸 Leucine	6.77±2.43 ^b	28.77±11.01 ^a	10.95±2.79 ^b	12.84±5.30 ^{ab}	12.47±4.47 ^b	5.800	0.011
苯丙氨 Phenylalanine	27.55±5.59 ^a	107.56±23.18 ^a	32.84±34.08 ^a	63.63±42.46 ^a	39.27±45.64 ^a	2.888	0.079
赖氨酸 Lysine	79.23±27.76 ^b	218.57±38.45 ^a	213.27±21.35 ^a	210.38±14.07 ^a	247.37±15.82 ^a	20.531	0
组氨酸 Histidine	39.15±5.31 ^a	38.41±1.21 ^a	39.86±2.04 ^a	35.79±1.84 ^a	34.30±0.94 ^a	2.189	0.144
精氨酸 Arginine	131.44±20.98 ^a	157.54±87.90 ^a	87.44±7.54 ^a	84.48±7.32 ^a	74.00±1.43 ^a	2.324	0.127
脯氨酸 Proline	990.08±138.52 ^a	633.53±87.22 ^b	481.54±45.15 ^{bc}	419.53±47.79 ^{bc}	286.81±26.04 ^c	34.306	0

不同小写字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平上差异显著。
Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the $P<0.05$ level.

2.3 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫血淋巴生化指标的影响

由图4可知,0.25%缬氨酸添加组末龄幼虫血淋巴中ALT含量显著低于0.75%和1.00%添加组($P<0.05$),对照组、0.25%和0.50%缬氨酸添加组幼虫血淋巴中ALT含量无显著性差异($P>0.05$),0.75%和1.00%添加组血淋巴中ALT含量无显著性差异($P>0.05$)(图4A)。与对照组相比,缬氨酸添加组幼虫血淋巴CK含量显著降低($P<0.05$),1.00%缬氨酸添加组幼虫血淋巴CK含量显著高于0.25%缬氨酸添加组($P<0.05$,图4B)。0.50%缬氨酸添加组幼虫血淋巴TG含量显著高于对照组($P<0.05$,图4C)。



A:丙氨酸氨基转移酶;B:肌酸激酶;C:甘油三酯。不同小写字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

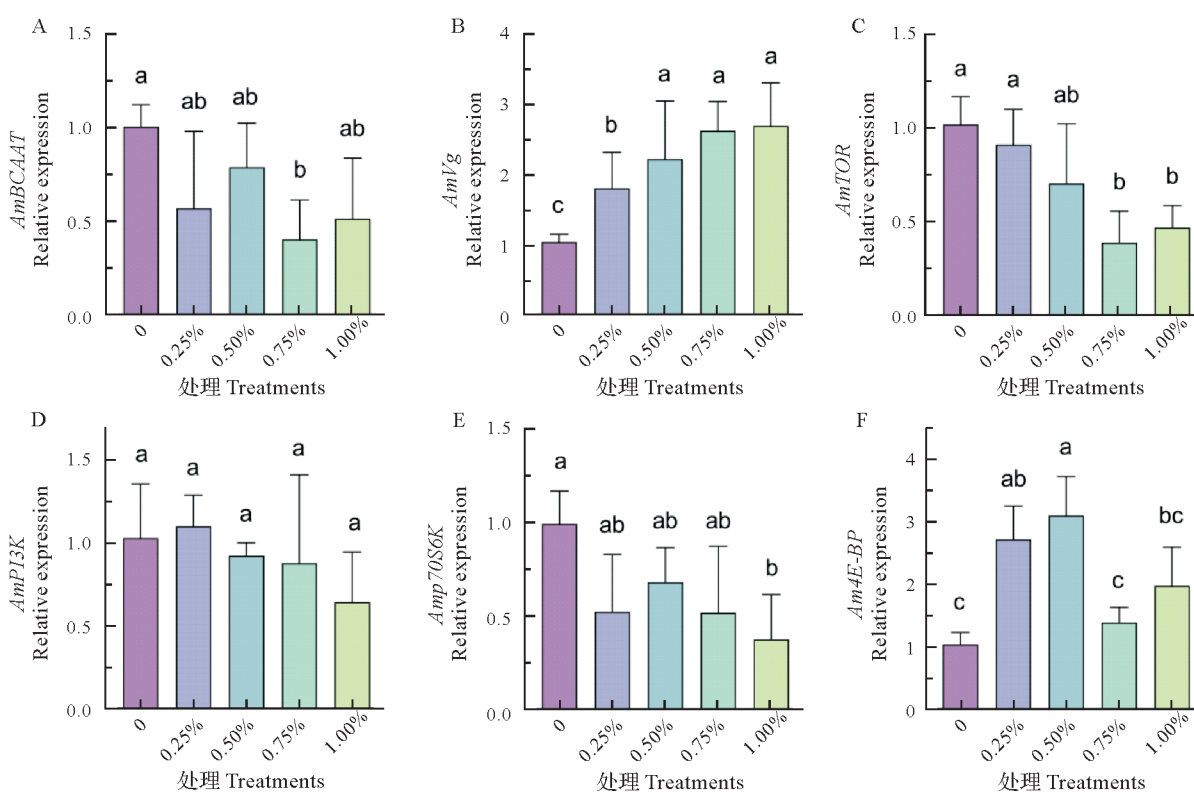
A: alanine aminotransferase (ALT); B: creatine kinase (CK); C: triglycerides (TG). Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the $P<0.05$ level.

图4 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫血淋巴生化指标的影响

Fig.4 The effect of dietary valine supplementation on the hemolymph biochemical markers in *Apis mellifera* L. larvae

2.4 缬氨酸添加水平对基因表达的影响

由图5可见,0.75%缬氨酸添加组幼虫*AmBCAAT*基因表达水平显著低于对照组($P<0.05$)。各缬氨酸添加组幼虫*AmVg*表达水平显著高于对照组($P<0.05$),0.50%、0.75%和1.00%缬氨酸添加组间无显著差异($P>0.05$)。与对照组和0.25%缬氨酸添加组相比,0.75%和1.00%缬氨酸添加组幼虫*AmTOR*基因表达水平显著降低($P<0.05$)。不同处理组幼虫*AmPI3K*基因表达无明显差异($P>0.05$)。与对照组相比,1.00%缬氨酸添加组幼虫*Amp70S6K*基因表达水平显著降低($P<0.05$)。0.25%和0.50%缬氨酸添加组幼虫*Am4E-BP*基因表达水平显著高于对照组和0.75%缬氨酸添加组($P<0.05$)。



A: *AmBCAAT*; B: *AmVg*; C: *AmTOR*; D: *AmPI3K*; E: *Amp70S6K*; F: *Am4E-BP*。不同小写字母表示处理间在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

A: *AmBCAAT*; B: *AmVg*; C: *AmTOR*; D: *AmPI3K*; E: *Amp70S6K*; F: *Am4E-BP*. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the $P<0.05$ level.

图5 缬氨酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫PI3K-AKT-TOR信号通路相关基因表达水平的影响

Fig.5 The effect of dietary valine supplementation on the expression levels of PI3K-AKT-TOR-signaling pathways related genes of *Apis mellifera* L. larvae

3 讨论与结论

3.1 缬氨酸影响蜜蜂幼虫生长发育

缬氨酸是蜜蜂生长发育所需的必需氨基酸之一,在蜜蜂蛋白质合成、脂肪代谢等方面发挥着重要作用^[3]。在动物上的研究表明,日粮中添加缬氨酸可提高动物的生长性能,促进动物生长,提高饲料转化效率^[13,22,24]。在蜜蜂上的研究表明,工蜂幼虫饲料中添加适宜的赖氨酸、蛋氨酸、色氨酸或精氨酸均可提高蜜蜂幼虫的化蛹率和羽化率,但氨基酸含量过高会显著降低幼虫的化蛹率和羽化率^[12,19-20,25]。本研究发现,低添加水平的缬氨酸可促进幼虫的生长,提高幼虫化蛹率和羽化率,但饲料中缬氨酸水平过高不但抑制幼虫的生长发育,还会显著降低幼虫的化蛹率和羽化率,该结果与前人有关其他氨基酸对蜜蜂幼虫生长性能的研究结果相一致^[12,19-20]。本研究结果表明,饲料缬氨酸水平过高或不足均会影响蜜蜂幼虫的变态发育,回归分析结果表明,在本试验条件下饲料缬氨酸添加水平为0.308 9%时最有利于意大利蜜蜂幼虫正常生长发育。食物营养是蜂王和工蜂级型分化的重要外因。前期研究证实,一些营养素在雌性蜜蜂级型分化中起重要的调控作用^[21],在人工饲养条件下,幼虫食物营养组成和质量还显著影响成蜂的级型特征^[26]。遗憾的是,本研究主要关注了饲料缬氨酸水平对蜜蜂幼虫羽化率和化蛹率的影响,没有对缬氨酸对蜜蜂级型分化的影响进行观测统计。因此,探索缬氨酸与蜜蜂级型分化之间的关系值得进一步研究。

3.2 缬氨酸添加水平影响幼虫血淋巴游离氨基酸含量

研究表明,饲料营养成分显著影响蜜蜂等昆虫血淋巴游离氨基酸水平^[12,20,27]。本研究发现,蜜蜂幼虫血淋巴缬氨酸含量与日粮缬氨酸添加水平呈明显正相关性。缬氨酸与亮氨酸和异亮氨酸同属于支链氨基酸,由于拥有相同的分解代谢途径,3种氨基酸在体内的吸收和分解代谢过程相互拮抗^[28]。在畜禽上的研究表明,日粮中的缬氨酸添加水平过高会阻碍亮氨酸和异亮氨酸的吸收和代谢^[29]。在本研究中,除0.25%缬氨酸添加组幼虫血淋巴亮氨酸含量显著提高以外,各缬氨酸添加水平对幼虫血淋巴异亮氨酸和亮氨酸含量无显著性影响,这与在哺乳动物上的有关研究结果不一致^[30]。本研究发现,饲料缬氨酸可显著提高血淋巴中赖氨酸和蛋氨酸含量,但显著降低血淋巴中的甘氨酸和脯氨酸含量,提示缬氨酸与赖氨酸及蛋氨酸的吸收或存在协同效应,与甘氨酸和脯氨酸的吸收或存在拮抗效应,值得进一步研究。

3.3 缬氨酸添加水平影响幼虫血淋巴生化指标

血淋巴生化指标为了解蜜蜂的营养水平、机体代谢和疾病状态等提供了重要信息,是评估蜜蜂机体生理功能和健康状况的重要依据。ALT在蜜蜂机体氨基酸转运中发挥了重要作用,本研究中,1.00%缬氨酸添加组蜜蜂幼虫血淋巴ALT含量显著升高,表明饲料高缬氨酸水平不利于蜜蜂健康。TG是反映体脂代谢的重要指标^[31]。本试验结果显示,尽管幼虫TG含量随缬氨酸添加水平的升高有先升高后降低的趋势,但总体而言,各处理组幼虫血淋巴TG含量保持相对稳定,提示日粮缬氨酸水平对幼虫体脂代谢的影响有限。

3.4 缬氨酸添加水平影响幼虫相关基因的表达

支链氨基酸转移酶是缬氨酸等支链氨基酸分解代谢通路的第一个限速酶^[32]。本研究发现,总体上,饲料缬氨酸未显著影响幼虫BCAAT表达。这说明在本试验条件下,BCAAT的表达未受到缬氨酸水平的直接影响。卵黄原蛋白在昆虫免疫应答、卵巢激活、寿命等方面发挥重要作用^[16],氨基酸是合成卵黄原蛋白的重要原料。本研究结果表明,在饲料中添加缬氨酸可显著上调蜜蜂幼虫AmVg基因的表达。这一发现表明,缬氨酸的添加可能通过调节相关信号通路,刺激卵黄原蛋白基因的转录和翻译过程,进而促进卵黄原蛋白等蛋白质的合成。PI3K-AKT-TOR信号通路在细胞生长调节和蛋白质合成等生物过程中发挥关键作用^[33]。BCAAs作为重要的信号分子可通过TOR下游信号传导通路中的4E-BP和p70S6K1两个关键因子调控蛋白质翻译和蛋白质合成^[34]。在动物上的研究表明,低BCAAs水平可通过TOR信号活化4E-BP1和p70S6K1,促进蛋白质的合成,而高BCAAs水平抑制TOR、p70S6K1等基因的表达,降低动物体增重和采食量^[35-37]。本研究发现,低缬氨酸添加水平组AmTOR、Am4E-BP基因表达水平无显著性变化,这或是由于缬氨酸信号对PI3K-AKT-TOR信号通路的调节可能与其浓度有关,推测低缬氨酸水平含量下Val信号已经饱和。高缬氨酸添加水平显著下调AmTOR、Am4E-BP、Amp70S6K1基因表达,这与前人有关亮氨酸在肉鸡上的研究结果相一致^[36]。

在本试验条件下,0.25%~0.50%缬氨酸添加水平可以促进意大利蜜蜂幼虫的生长,提高幼虫变态发育后期的化蛹率和羽化率,并有助于改善蜜蜂幼虫的血淋巴生化指标,二次回归预测结果表明,基础

日粮的适宜添加水平为0.308 9%。此外,还发现缬氨酸添加能够显著上调蜜蜂幼虫 *AmVg* 基因的表达,但饲料中缬氨酸含量过高能显著下调TOR信号通路相关基因的表达,提示会抑制蜜蜂蛋白质合成,导致幼虫生长发育减缓。

致谢:泰山产业领军人才高效生态农业创新类项目(LJNY202003)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] BAE J Y, PARK G, YUN H, et al. The dietary valine requirement for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, can be estimated by plasma free valine and ammonia concentrations after dorsal aorta cannulation[J]. Journal of applied animal research, 2012, 40(1): 73-79.
- [2] AHMED I, KHAN M A. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton)[J]. British journal of nutrition, 2006, 96(3): 450-460.
- [3] DE GROOT A P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.)[J]. Physiologia comparata et oecologia, 1953(3): 197-285.
- [4] AHMAD I, AHMED I, DAR N A. Dietary valine improved growth, immunity, enzymatic activities and expression of TOR signaling cascade genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* fingerlings[J]. Scientific reports, 2021, 11(1): 22089.
- [5] KURPAD A V, REGAN M M, RAJ T D, et al. The daily valine requirement of healthy adult Indians determined by the 24-h indicator amino acid balance approach[J]. The American journal of clinical nutrition, 2005, 82(2): 373-379.
- [6] SILVA J V D, RIBEIRO F B, SIQUEIRA J C D, et al. Dietary valine requirement of tambaqui (*Colossoma macropomum*) with different body weights[J]. Ciência e agrotecnologia, 2022, 46: e002122.
- [7] SELVARASU K, AMUTHA R. Economics of dietary valine supplementation on broiler ration[J]. The pharma innovation journal, 2022, 11(6): 1247-1249.
- [8] JIAN H, MIAO S, LIU Y, et al. Effects of dietary valine levels on production performance, egg quality, antioxidant capacity, immunity, and intestinal amino acid absorption of laying hens during the peak lay period[J]. Animals, 2021, 11(7): 1972.
- [9] HUANG Z, TAN X H, ZHOU C P, et al. Effect of dietary valine levels on the growth performance, feed utilization and immune function of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*[J]. Aquaculture nutrition, 2018, 24(1): 74-82.
- [10] 迟淑艳, 韩凤禄, 谭北平, 等. 饲料精氨酸水平对斜带石斑鱼幼鱼生长和肠道形态的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(2): 388-394.
- [11] CHI S Y, HAN F L, TAN B P, et al. Effects of dietary arginine level on growth performance and intestine morphology of juvenile grouper *Epinephelus coioides*[J]. Acta hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 388-394.
- [12] 崔萌萌, 李福昌, 王雪鹏, 等. 饲料赖氨酸水平对生长獭兔生长性能、氮代谢及血清免疫和生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 472-478.
- [13] CUI M M, LI F C, WANG X P, et al. Effects of dietary lysine level on growth performance, nitrogen metabolism, serum immune and biochemical indices of growing rex rabbits[J]. Chinese journal of animal nutrition, 2012, 24(3): 472-478.
- [14] 王帅, 王红芳, 胥保华. 意大利蜜蜂工蜂幼虫饲料的适宜赖氨酸水平[J]. 动物营养学报, 2017, 29(11): 4236-4244.
- [15] WANG S, WANG H F, XU B H. Dietary appropriate lysine level for *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae[J]. Chinese journal of animal nutrition, 2017, 29(11): 4236-4244.
- [16] 王震, 徐玮, 麦康森, 等. 饲料缬氨酸水平对军曹鱼鱼体脂肪含量, 血浆生化指标和肝脏脂肪代谢基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(4): 744-751.
- [17] WANG Z, XU W, MAI K S, et al. The effects of valine level on plasma biochemical indexes, lipid content and gene expression involved in lipid metabolism in cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. Acta hydrobiologica Sinica, 2016, 40(4): 744-751.
- [18] ZAKĘŚ Z, DEMSKA-ZAKĘŚ K, SZCZEPKOWSKI M, et al. Impact of sex and diet on hematological and blood plasma biochemical profiles and liver histology of pikeperch (*Sander lucioperca* L.) [J]. Archives of polish fisheries, 2016, 24(2): 61-68.
- [19] DAWOOD M A O. Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture [J]. Reviews in aquaculture, 2020, 13(1): 642 - 663.
- [20] 张卫星, 胥保华. 蜜蜂卵黄原蛋白的研究进展[J]. 蜜蜂杂志, 2014(5): 5-7.
- [21] ZHANG W X, XU B H. Overview of vitellogenin of honey bee [J]. Journal of bee, 2014(5): 5-7.
- [22] ZHOU Z, WU X, GATLIN D M, et al. Dietary valine levels affect growth, protein utilisation, immunity and antioxidant status in juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) [J]. British journal of nutrition, 2020, 125(4): 408-419.
- [23] AHMED I, AHMAD I. Effect of dietary protein levels on growth performance, hematological profile and biochemical composition

- of fingerlings rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* reared in Indian himalayan region[J]. Aquaculture reports, 2020, 16:100268.
- [19] 孙桂云, 胡希怡, 于静, 等. 饲料中添加精氨酸对意大利蜜蜂工蜂幼虫生理机能的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(6):3918-3929.
- SUN G Y, HU X Y, YU J, et al. Effects of dietary arginine on physiological function of *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae[J]. Chinese journal of animal nutrition, 2022, 34(6):3918-3929.
- [20] 赵凤奎, 胥保华, 王红芳. 意大利蜜蜂工蜂幼虫饲料中适宜色氨酸水平[J]. 中国农业科学, 2015, 48(7):1453-1462.
- ZHAO F K, XU B H, WANG H F. Appropriate level of tryptophan for *Apis mellifera* worker bee larvae feed[J]. Scientia agricultura Sinica, 2015, 48(7):1453-1462.
- [21] KAFTANOGLU O, LINKSVAYER T A, PAGE R E. Rearing honey bees, *Apis mellifera*, *in vitro* 1: effects of sugar concentrations on survival and development[J]. Journal of insect science, 2011, 11(96):1-10.
- [22] RICHERT B T, TOKACH M D, GOODBAND R D, et al. Valine requirement of the high-producing lactating sow[J]. Journal of animal science, 1996, 74(6):1307-1313.
- [23] 金梦杰, 李震, 刘建辉, 等. 西方蜜蜂羽化出房蜂王与工蜂形态及生理生化指标比较[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(5):1220-1229.
- JIN M J, LI Z, LIU J H, et al. Comparative of morphology and physiological biochemical indexes between newly emerged queen and worker of *Apis mellifera*[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(5):1220-1229.
- [24] 王宇波, 许豆豆, 何鑫, 等. 低蛋白饲料缬氨酸水平对肥育猪生长性能, 胴体性状和肉品质的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(9):1832-1840.
- WANG Y B, XU D D, HE X, et al. Effects of valine level in low protein diets on growth performance, carcass traits and meat quality of finishing pigs[J]. Acta veterinaria et zootechnica Sinica, 2019, 50(9):1832-1840.
- [25] 王丽, 王红芳, 胥保华. 意大利蜜蜂蜂王与工蜂幼虫甲基供体S-腺苷甲硫氨酸合成与代谢的差异[J]. 中国农业科学, 2016, 49(21):4231-4238.
- WANG L, WANG H F, XU B. Differences of methyl donor s-adenosylmethionine synthesis and metabolism between *Apis mellifera ligustica* queen bee larvae and worker bee larvae[J]. Scientia agricultura Sinica, 2016, 49(21):4231-4238.
- [26] KAMAKURA M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees[J]. Nature. 2011, 473(7348):478-483.
- [27] 苏筱雨, 黄大庄, 贝蓓, 等. 球孢白僵菌侵染对桑天牛幼虫血淋巴游离氨基酸含量的影响[J]. 蚕业科学, 2008, 34(3):518-520.
- SU X Y, HUANG D Z, BEI P, et al. Change of free amino acids content in haemolymph of the *Apriona germari* larvae infected with *Beauveria bassiana*[J]. Canye kexue, 2008, 34(3):518-520.
- [28] JACKSON S C, BRYSON J M, WANG H, et al. Cellular uptake of valine by lactating porcine mammary tissue[J]. Journal of animal science, 2000, 78(11):2927-2932.
- [29] TORRES N, TOVAR A R, HARPER A E. Leucine affects the metabolism of valine by isolated perfused rat hearts: relation to branched-chain amino acid antagonism[J]. The journal of nutrition, 1995, 125(7):1884-1893.
- [30] 周东胜. 能量水平和来源对后备母猪血液代谢底物、激素分泌及卵泡液微环境影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- ZHOU D S. The effects of energy levels and sources on concentration of metabolism substrate, hormone secretion in plasma and follicular fluid microenvironment in gilts[D]. Ya'an: Sichuan agricultural university, 2008.
- [31] 盛燕楠, 洪子强, 王剑, 等. 支链氨基酸转移酶在肿瘤中的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2023, 39(6):709-713.
- SHENG Y N, HONG Z Q, WANG J, et al. Research progress on branched-chain amino acid transferases in tumors[J]. Journal of clinical and experimental pathology, 2023, 39(6):709-713.
- [32] CORRADETTI M N, GUAN K L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?[J]. Oncogene, 2006, 25(48):6347-6360.
- [33] BAN H, SHIGEMITSU K, YAMATSUJI T, et al. Arginine and leucine regulate p70S6 kinase and 4E-BP1 in intestinal epithelial cells[J]. International journal of molecular medicine, 2004, 13(4):537-43.
- [34] HARA K, YONEZAWA K, WENG Q P, et al. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism[J]. Journal of biological chemistry, 1998, 273(23):14484-14494.
- [35] ANANIEVA E A, POWELL J D, HUTSON S M. Leucine metabolism in T cell activation: mTOR signaling and beyond[J]. Advances in nutrition, 2016, 7(4):798-805.
- [36] 常银莲. 支链氨基酸对肉鸡小肠发育及TOR通路相关基因表达的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- CHANG Y L. Effects of BCAAs on small intestinal development and relative genes expression of tor pathway in broilers[D]. Beijing: Chinese academy of agricultural sciences dissertation, 2016.
- [37] EDMONDS M S, BAKER D H. Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick[J]. Journal of animal science, 1987, 65(3):699-705.